

ГИСТОХИМИЯ

А. М. Чилингарян

Новая методика для микроскопического изучения интрамуральных нервных клеток кишечника и принцип образования преципитатов свинца в клеточных структурах

(Представлено академиком АН Армянской ССР С. К. Карапетяном 29/VI 1964)

Фосфорсодержащие соединения, как известно, по данным современной биохимии, имеют чрезвычайно важное значение в обменных и энергетических процессах организма. Однако до настоящего времени эти соединения гистохимически остаются мало изученными, вследствие отсутствия соответствующих методов исследования.

Первоначальные попытки проводить реакцию на срезах фиксированной или свежемороженой мозговой ткани давали отрицательные результаты, поэтому для всестороннего изучения влияния различных факторов на развитие и особенности реакции нами, как модель, было подобрано межмышечное нервное сплетение тонкого отдела кишечника кошки, который позволит избежать процедуру приготовления срезов и иметь в физикохимическом отношении малоизмененную ткань. Этот объект нами широко применялся при изучении достоверности и специфичности метода определения активности кислой фосфагазы (^{1, 2}).

Фосфорсодержащие соединения в настоящем исследовании в клеточных структурах осаждались ионами свинца, образуя при этом нерастворимые преципитаты ортофосфатов.

Проведенные исследования позволили, с одной стороны, разработать методику для избирательного выявления нейронов кишечных сплетений, а с другой — установить определенную закономерность образования преципитатов свинца в клеточных структурах, что и лежит в основе разработанных нами новых методов для изучения ряда субстанций в клеточных структурах центральной нервной системы и в паренхиматозных органах.

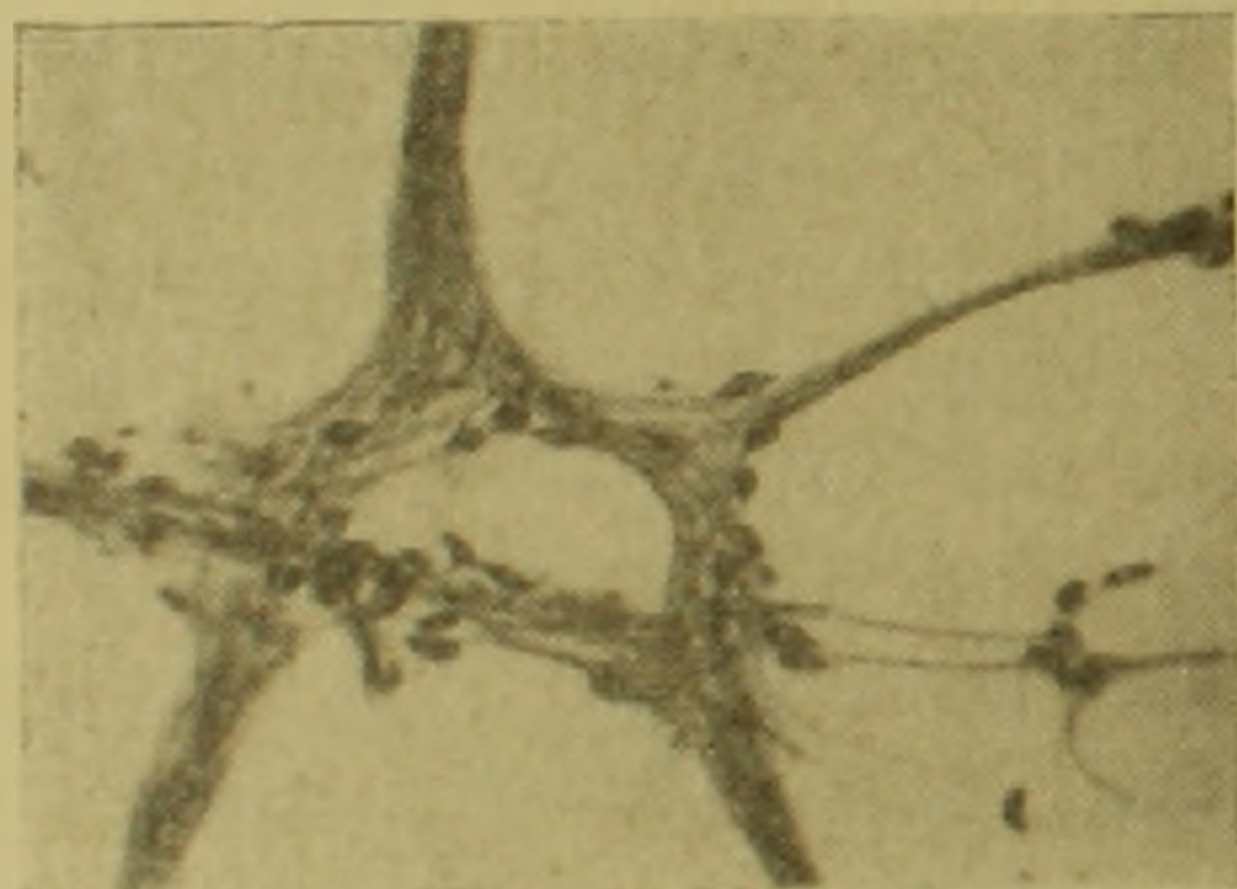
Исследования проводились на межмышечном нервном сплетении тонкого отдела кишечника кошки, а в некоторых случаях данное сплетение изучалось и на толстом отделе.

После декапитации животного быстро извлекался кишечник, который 24—48 часов фиксировался в ацетоне на холоду. Способ фиксации

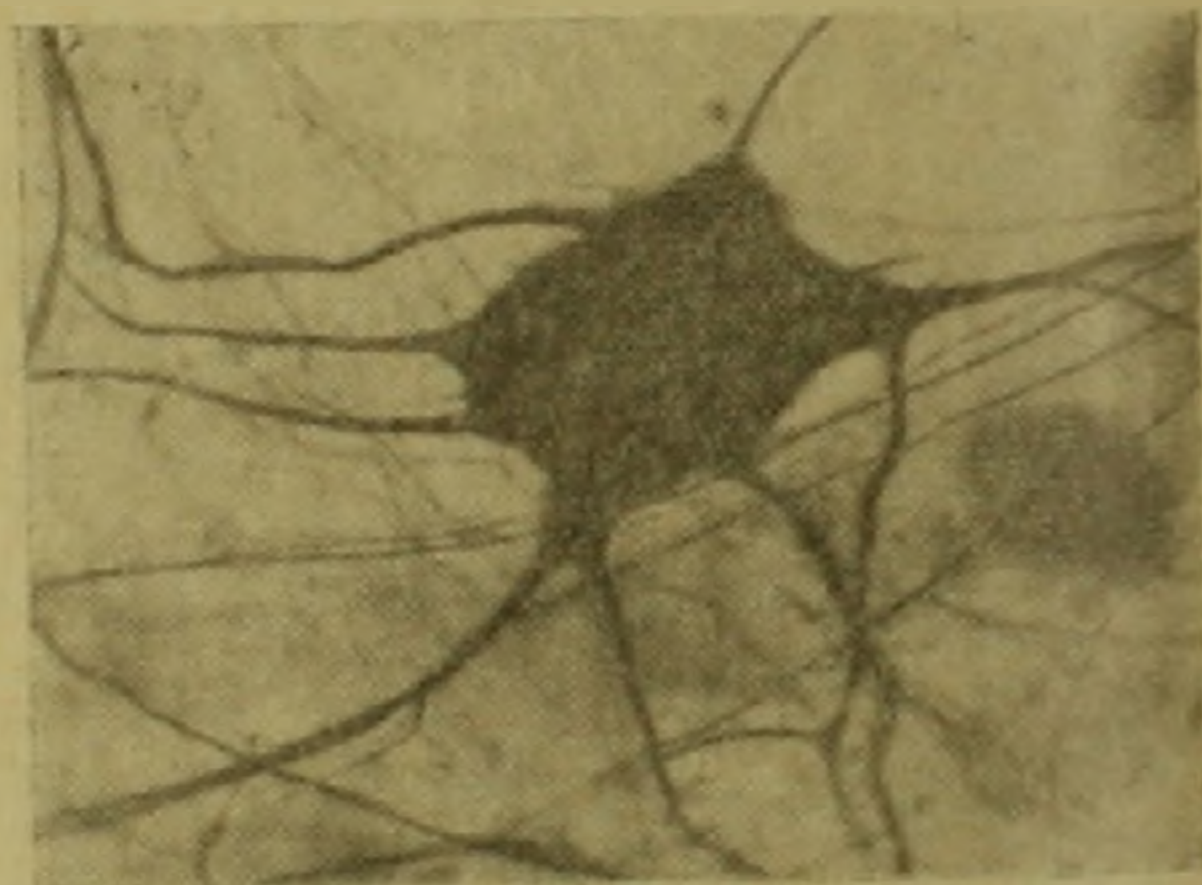
и приготовления тотальных препаратов проводился описанным ранее путем (1,2). При приготовлении тотальных препаратов следует обратить особое внимание на сроки, не оставляя их в воде более 5—10 мин.

Готовые препараты переносились в смесь следующего состава 0,01 мол. (0,38%-ый раствор) уксуснокислого свинца 100 мл и нормальной ацетатный буфер pH 5,9—35 мл. Срезы в этой смеси инкубировались при 37° 5—10 дней и более. Далее производилась промывка в воде 15—20 мин., в 2%-ной уксусной кислоте 5—10 мин., промывка в нескольких сменах воды 15 мин., погружение в 0,5—1%-ный раствор сернистого натрия или аммония 5—15 мин. и тщательная промывка в нескольких сменах воды и через дистиллированную воду, препараты заключались в глицерин-желатину или обычным путем в бальзам.

Полученные таким путем препараты межмышечного сплетения тонкого отдела кишечника по своей четкости во многом напоминают препараты серебряной импрегнации по Бильшовскому—Гросс. На бледном фоне интенсивно выступает сеть ганглиев межмышечного нервного сплетения и соединяющие их нервные стволы (фиг. 1). Ядра гладких мышц нейроглии и мезотелия, а также других тканевых элементов не реагируют. Иногда на препаратах местами выступают фрагментированные волокна, по-видимому, эластические. В ганглиях интенсивно окрашиваются перикарионы и отростки клеток II типа Догеля, которые можно про-



Фиг. 1. Межмышечное нервное сплетение тонкого отдела кишечника кошки. Реакция нервных клеток и межганглиональных нервных стволов. (Микрофото. Об. 0, ок. 6).

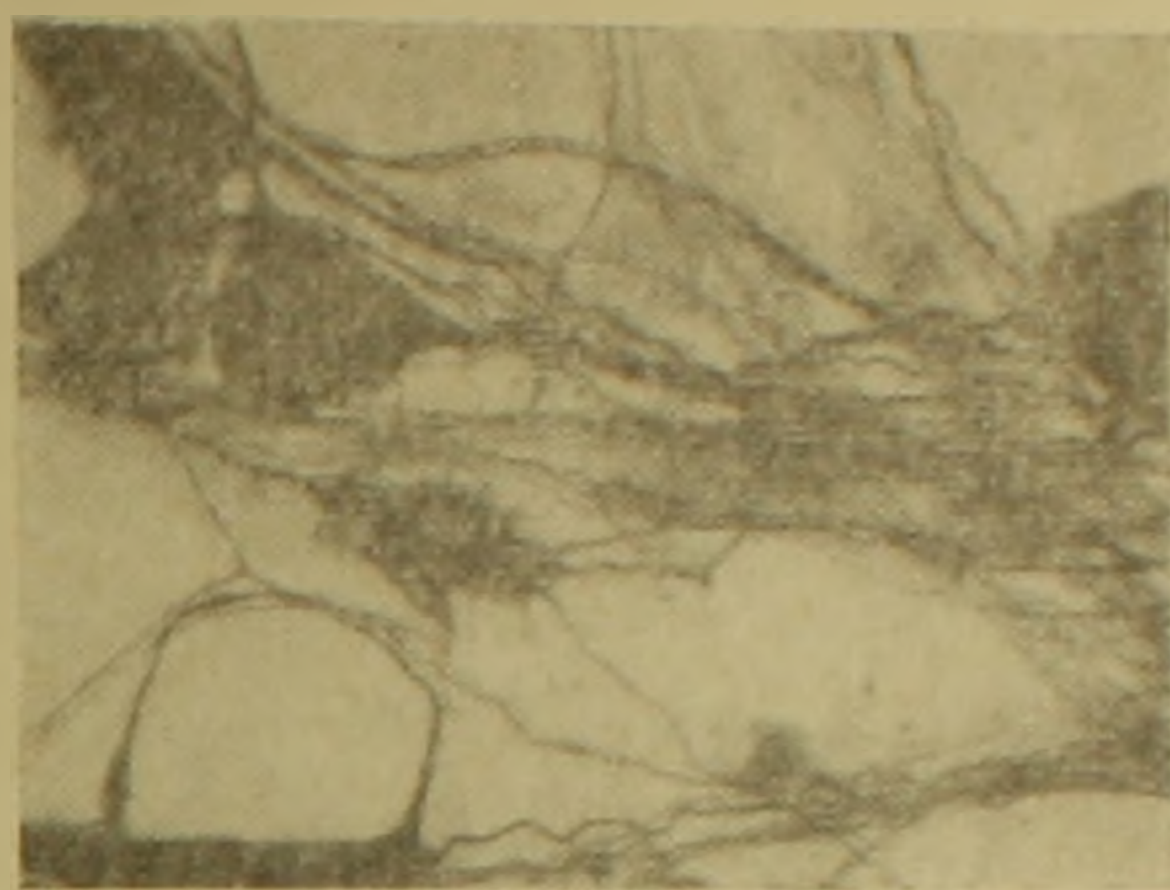


Фиг. 2. Межмышечное нервное сплетение тонкого отдела кишечника кошки. Нервная клетка II типа Догеля. Видны многочисленные отростки, отходящие от тела клетки. (Микрофото. Об. 40, ок. 10).

следить на далеком расстоянии (фиг. 1, 2). Помимо этих клеток часто, особенно при длительных сроках инкубации, в значительном количестве окрашиваются мелкие нервные клетки и клетки I типа Догеля (фиг. 3). Однако они реагируют слабее по сравнению с клетками II типа. В межганглионарных и мелких нервных стволах интенсивно выступают нервные волокна и отростки нервных клеток соседних ганглиев.

Изучение толстого отдела кишечника показывает, что в межмышечном сплетении в основном реагируют клетки II типа, а реакция нервных волокон сходна с тонким отделом. Необходимо отметить значительное отличие в реакции нервных клеток в различных отделах кишечника.

12-перстная кишка обычно дает нечеткую неравномерную, а иногда и отрицательную реакцию. Реакция тощего и подвздошного отделов может быть одинаковой или отличаться у отдельных индивидуумов. Различные отделы кишечника у отдельных индивидуумов по-разному реагируют на водную промывку после фиксации. Так, у одних часовая промывка препаратов одного отдела в воде не вызывает особых изменений в реакции, в то время как в другом отделе она может полностью ее снять.



Фиг. 3. Межмышечное нервное сплетение тонкого отдела кишечника кошки. Ганглий: в середине клетка I типа Догеля с короткими отростками. (Микрофото. Об. 24, ок. 6).

Это обстоятельство, несомненно, представляет большой интерес и, вероятно, связано с физиологическим состоянием исследуемого органа, влияющего на физико-химические свойства субстанций, реагируемых с ионами свинца. Говорить о природе последних крайне трудно из-за невозможности постановки всесторонних контрольных гистохимических экспериментов, поскольку, как было указано выше, короткая водная промывка большей частью снимает реакцию. Сам этот факт уже указывает, что мы имеем дело с низкомолекулярными соединениями легко экстрагируемых из тканей. Контроль по Танглеру ⁽³⁾ показывает, что по окончании реакции преципитат не растворяется в 10%-ном уксуснокислом аммонии, что говорит о его ортофосфатной природе.

Тем не менее данный тест нам кажется еще недостаточным для окончательного утверждения ортофосфатной природы образованных преципитатов.

Свинцовые соединения за последние годы нами широко применялись для микроскопического изучения разных структур ^(4,5). Недавно ⁽¹⁾ нами было установлено, что в контрольном субстрате для определения активности кислой фосфатазы по Гомори иногда могут окрашиваться нервные клетки кишечника, и эта находка использовалась в ряде экспериментальных работ ⁽⁶⁻⁸⁾. Однако во всех вышеуказанных наших исследованиях, надо признаться, подход большей частью был эмпирическим.

Дальнейшие наши исследования дали возможность установить основную закономерность образования преципитатов свинца с разными

субстанциями в клеточных структурах, сущность которой вкратце сводится к следующему.

1. Избирательная реакция ионов свинца с определенной субстанцией при данном рН зависит от концентраций ионов свинца и применяемого буфера.

2. Для каждого рН свойственны свои концентрационные взаимоотношения буфера и ионов свинца.

Помимо этого, в развитии реакции существенное значение имеет и состояние ткани, а также способ получения срезов (фиксация).

Зависимость реакции разных субстанций от концентрации ионов свинца и буфера покажем на следующих примерах: как стандартную концентрацию уксуснокислого свинца возьмем 0,01 мол. раствор 100 мл и 10 мл 1 мол. ацетатного буфера при рН 5,6. В данном случае при инкубации срезов настоящим способом отмечается слабая, но умеренная реакция ядер гладкомышечных клеток и местами волокна, по-видимому эластические. Очень слабо могут реагировать единичные перикарионы с короткими отростками. Если другая часть срезов инкубируется в смеси, где количество буфера увеличивается до 20 см³, то наблюдается неравномерность ядерной реакции. В одних местах она интенсивная, в других совершенно отсутствует и вместо них уже видны четко окрашенные нервные клетки и стволы. А на срезах инкубируемых в смеси с количеством буфера 25—30 см³ четко и избирательно видны нервные клетки и стволы. Картина сходна с той, которая получается при рН 5,9 при количестве буфера 35 см³, как указывалось в настоящем сообщении. При дальнейшем увеличении количества буфера полностью отсутствует окраска всех структур и препараты совершенно бесцветны.

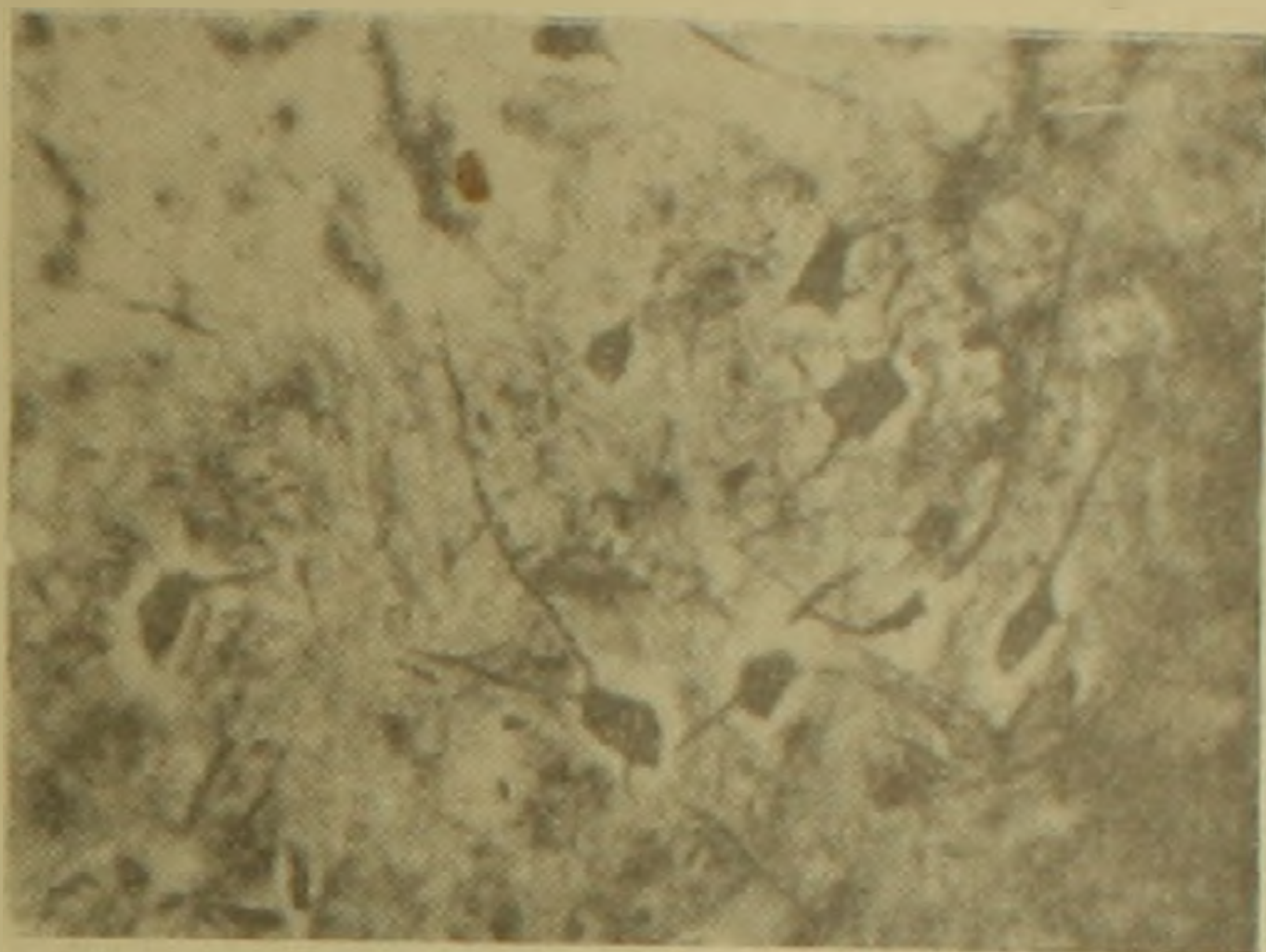
Аналогичные изменения в реакции наблюдаются при снижении концентрации ионов свинца от 0,01 мол. до 0,001 мол. при неизменном количестве буфера. Например, если к количеству раствора свинца 100 мл, но разной молярности, прибавить 10 мл 1 молярного раствора ацетатного буфера при рН 5,6, то постепенно происходит усиление и неравномерность ядерной реакции вплоть до ее исчезновения и появления избирательной реакции нервных клеток при 0,003—0,001 мол. растворе свинца.

При инкубации срезов в 0,01 мол. растворе свинца—100 мл. и мол. буфер рН 4,7—10—12 мл (контрольный субстрат по Гомори) структуры большей частью не окрашиваются. Но стоит срезы инкубировать в той же смеси, снизив лишь количество буфера до 6—8 мл или увеличив концентрацию ионов свинца, то появляется реакция ядерной или нервной субстанции, сходная с картиной при рН 5,6—5,9.

Исходя из приведенных примеров и наших других наблюдений, можно дать следующую характеристику реакций разных субстанций при различных рН. При рН от 5,6 до 3,8 для получения реакции ядерной или нервной субстанции следует соответственно уменьшить количество прибавляемого буфера или увеличить концентрацию ионов свинца. При рН от 5,6 до 6,2, наоборот, увеличивается количество буфера или снижается концентрация ионов свинца.

Таким образом, одна и та же субстанция реагирует при широких значениях (3,8—6,4), что говорит об отсутствии изоэлектрической точки. Выбранный нами рН 5,9 и буфер 35 см³ удобны в том отношении, что реакция при этом происходит более равномерно и уменьшаются ошибки технического характера.

После установления принципа образования преципитатов свинца мы также изучили реакцию нервных структур головного и спинного мозга. Для этой цели кусочки различных отделов мозга фиксировались 24 часа в холодном ацетоне. После промывки в физиологическом растворе готовились замороженные срезы, которые длительное время (25 дней) инкубировались и обрабатывались настоящим методом.



Фиг. 4 Спинной мозг кошки. Реакция отдельных нервных клеток вентрального рога. рН 5,9, буфер 35 см (Микрофото. Об. 8, ок. 6).

На структурах мозга наблюдается та же закономерность в образовании преципитатов свинца. Однако в отличие от кишечника не удалось получить равномерной и одинаковой реакции на разных участках одного и того же препарата, что, по-видимому, связано с процедурой промывания срезов и их приготовлением. На препаратах местами наблюдается четкая окраска перикарионов и отростков нервных клеток и волокон в спинном мозге, в стволе и в мозжечке (фиг. 4). В коре реагируют единичные клетки. Несмотря на неравномерность реакции нервных клеток, полученные факты говорят о возможности изучения нейронов центральной нервной системы на срезах с помощью свинцовых соединений. Четкая морфологическая картина, полученная при этом, указывает, что при успешной стабилизации субстанции нейронов мозга до реакций откроет новый путь для изучения морфологии и цитохимии нервных структур центральной нервной системы. В настоящем сообщении стабилизация этих соединений и стандартизация звеньев обработки осуществилась пока в отношении кишечника, в связи с этим методика предназначена для изучения кишечных нейронов.

Институт физиологии им. акад. Л. А. Орбели
Академии наук Армянской ССР

Հ. Մ. ՉԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ

Աղիների ներպատասխան ներզարգացման փուլերի միկրոսկոպիական
ուսումնասիրման նոր մեթոդ և կապարի նոսպածի առաջացման սկզբունք

Աղիների միջակայքային ներզարգացման հանգույցը ունի այն առավելությունը, որ նշան-
ադրություններ և տալիս խոստովելու կորվածքներ պատրաստելու անհրաժեշտությունից

է ունենալ ֆիզիկո-քիմիական տեսանկյունից թիչ փոփոխված հյուսվածք: Այս սրբիւնը նախկինում մեր կողմից ոգտագործվել է որոշ ֆերմենտատիվ ռեակցիաների հիստոքիմիական առանձնահատկութիւնները ուսումնասիրելու համար:

Մշակված է նոր մեթոդ, որը ապահովում է միջմկանային ներվային հանգույցի ընկճների և նրանց էլուստների ընտրողական ռեակցիան ու նրանց ցայտուն հայտնաբերումը: Միաժամանակ ցույց է տրված, որ նույն կենդանու բարակ աղիների տարբեր հատվածներում ռեակցիան կարող է արտահայտված լինել տարբեր աստիճանի: Այս հանգամանքը որոշակի հետաքրքրութիւն է ներկայացնում ցիտոֆիզիոլոգիական տեսանկյունից և ըստ երևույթին կապված է տվյալ հատվածի ֆիզիոլոգիական վիճակի հետ:

Կատարված հետազոտութիւնները հնարավորութիւն տվեցին գալու որոշակի եզրակացութեան, որի հիման վրա ձևակերպված է նոր օրինաչափութիւն կապարի կոմպլեքսների առաջացման մասին ընթացիկ գոյացութիւններում: Այս օրինաչափութիւնը և ընկճ է հեղինակի կողմից մշակվող նոր մեթոդների հիմքում, որոնք առաջադրվում են տարբեր գոյացութիւնների ձևաբանական և ընթացիկ քիմիական հետազոտութիւնների համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

¹ А. М. Чилингарян, Некоторые данные по гистохимии и цитоархитектонике нервных сплетений кишечника, Дисс., М., 1954. ² А. М. Чилингарян, ДАН Арм. ССР, т. XXVIII, № 4, 177 (1959). ³ Е. Тандлер, J. Histochem Cytochem. Б, 489, 1957. ⁴ А. М. Чилингарян, Материалы научно-методической конференции АГЭ сельхоз ВУЗ-ов, тез. докл. вып. II, 99, М. 1963. ⁵ А. М. Чилингарян, Е. Н. Паравян, „Известия АН Арм. ССР“ (мед. науки) 6,15, 1961. ⁶ Л. И. Евсеева, Изменение активности кислой фосфатазы и концентрации ортофосфатов в нейронах вегетативной нервной системы при нарушении кровообращения и илеусе, Автореф. дисс., М., 1956. ⁷ Х. Церет, Архив анатомии гистологии и эмбриологии I, 63, 1958. ⁸ Н. П. Петропавловская, Сравнительно-гистохимические данные об активности фосфатаз и о плюмбофильности вегетативных нейронов крупного рогатого скота, Автореф. дисс., М., 1961.