

УДК 612.13—076.4

А. М. ЧИЛИНГАРЯН

КАЛЬЦИЙ-АДЕНОЗИНТРИФОСФАТНЫЙ МЕТОД И ПЕРСПЕКТИ-
ВЫ БЕЗЫНЪЕКЦИОННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ИНТРАОРГАННОГО
МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА

Разработан кальций-аденозинтрифосфатный метод для выявления внутриорганно-микроциркуляторного русла. Метод основан на избирательном осаждении неорганического фосфора, отщепленного от АТФ ионами кальция. В последующем продукт реакции превращается в черный сульфид свинца. Исследование различных органов и тканей кошки показало, что в большинстве органов на толстых срезах и оболочках метод обеспечивает четкое и контрастное выявление сосудисто-капиллярной сети. Серьезным преимуществом метода является возможность одновременного и дифференциального исследования венозного и артериального русла. Артерии на препаратах отличаются за счет окраски гладкомышечных клеток.

Выявление и изучение внутриорганной кровеносной микрососудистой системы или микроциркуляторного русла в настоящее время проводится двумя основными путями: биомикроскопическим и традиционным инъекционным методами. Каждому пути свойственны преимущества и недостатки, достаточно освещенные в литературе [4, 6]. Наряду с этим существует и третий путь, где выявление сосудистого русла проводится без инъекции с помощью методов непосредственной окраски стенок сосудов и капилляров. Так как в этом случае сосудистое русло выявляется независимо от его наполнения кровью или контрастной массой, то эти методы приобретают исключительно важное значение при изучении экспериментального и патологического материала, особенно при изучении сосудистого русла человека, где инъекционные методы не всегда обеспечивают получение адекватной информации, а биомикроскопию можно использовать в ограниченных случаях. Однако несмотря на важное значение выявления сосудистой системы непосредственной окраской стенки сосудов изучение сосудистого русла этим путем проводится в весьма ограниченных масштабах с помощью небольшого количества методов исследований. Причину отставания в этом вопросе следует искать не только в его сложности, но и в тех жестких и малоосуществимых требованиях, которые предъявляются к микроскопическому изучению внутриорганного сосудистого русла. Для выявления различных звеньев микроциркуляторного русла как пространственно организованной системы в своем трехмерном расположении необходимо исследования проводить на толстых срезах, имеющих толщину не менее 150 мкм. Это обстоятельство сразу обесценивает значение большинства гистологических методов, при которых наряду с другими тканевыми элементами окраши-

вается и стенка сосудов. На толстых срезах при использовании подобных методов вследствие наслоения окрашенных клеточных структур исследование срезов практически становится невозможным. Поэтому первым и наиболее важным требованием к ангиологическому методу является необходимость высокой избирательности, иными словами, на толстых срезах должны окрашиваться только элементы сосудистой системы, причем весьма контрастно. К подобным методам предъявляется и другое немаловажное в ангиологическом аспекте требование, заключающееся не только в выявлении сосудисто-капиллярной сети, но и в возможности дифференциального исследования артериального и венозного русла, без которого трудно получить адекватную и точную информацию о морфофункциональном состоянии различных звеньев микроциркуляторного русла. Не менее важным обстоятельством является и универсальность самого метода. Нельзя не отметить, что до настоящего времени в большинстве исследований сосудистое русло изучалось лишь в отдельных органах и тканях, меж тем как при наличии универсального метода создается возможность поднять изучение сосудистого русла как единой системы до организменного уровня. К вышеуказанному следует прибавить и другие требования, предъявляемые к любому микроскопическому методу: простота, быстрота, надежность, доступность и необходимость получения одинаковых и воспроизводимых результатов. Как видно, перечисленные требования являются слишком жесткими и их удовлетворение практически малоосуществимо. Неудивительно поэтому, что количество методов, основанных на выявлении сосудистого русла окраской их структурных элементов, остается крайне незначительным, а имеющиеся лишь частично удовлетворяют приведенным нами требованиям.

Метод, представляющий ценность в ангиологическом аспекте, был разработан Б. Н. Клосовским [1]. Вводя определенные изменения в хром-серебряный метод Гольджи, автору удалось выявить сосудисто-капиллярную сеть мозга, а также исследовать процесс роста и новообразование капилляров в мозгу. Благодаря этому методу Б. Н. Клосовскому удалось получить большое количество новых данных, имеющих важное значение [1, 2]. Однако будучи импрегнационным, метод Б. Н. Клосовского обладает капризностью, отличается трудоемкостью. Кроме того, метод выявляет сосудистую сеть только в мозгу и не позволяет отличить артериальные сосуды от венозных.

Единственным методом, отвечающим в большей мере вышеприведенным требованиям, является серебряно-импрегнационный метод В. В. Куприянова [3]. С его помощью четко выявляется сосудисто-капиллярная сеть, а за счет окраски структурных элементов стенок сосудов и капилляров создаются реальные условия для дифференцировки различных звеньев микроциркуляторного русла. Одновременно с кровеносной выявляется и лимфатическая система. Разработка этого метода резко стимулировала появление большого количества исследовательских работ, посвященных различным аспектам микроангиологии. К сожалению, ме-

тод В. В. Куприянова дает хорошие результаты при изучении сосудистого русла на различных тонких и прозрачных оболочках. Что же касается изучения интраорганного сосудистого русла, то вследствие позышения аргирофильности различных тканевых элементов результаты оказались менее показательными [5].

В литературе нередко встречаются высказывания о возможности использования различных гистохимических методов, в частности определение фосфатаз, для выявления сосудистого русла. Однако имеющиеся высказывания в ангиологическом аспекте являются малообоснованными, поскольку даже простой анализ показывает, что с помощью этих методов можно выявить лишь отдельные звенья микроциркуляторного русла далеко не во всех органах и не у всех видов животных без возможности дифференцировать различные сосуды.

Таким образом, на основании проведенного анализа нетрудно прийти к заключению, что, несмотря на всю свою важность и перспективность, выявление внутриорганного сосудистого русла путем непосредственной окраски сосудов остается далеко не разработанным и не решенным вопросом. Естественно, что преодоление стоящих на этом пути трудностей требует громадных усилий и прочной теоретической базы. Однако на основании существующей в современной гистологии и гистохимии теоретической базы приступить к решению и разработке подобного вопроса вряд ли представится возможным. Поэтому в своих поисках мы вынуждены были основываться на той теоретической базе, которая создавалась нами на основании проведенных экспериментов и исследований. Произведенные за 25 лет исследования в основном посвящены гистохимии фосфора и перспективности его выявления при изучении нервных и сосудистых структур. Эти исследования позволили вскрыть и установить ранее неизвестные принципы и закономерности, касающиеся осаждения фосфора металлами в соответствующих структурах [8, 10]. Сначала эти закономерности были выявлены при изучении фосфата свинца, но в исследованиях, проведенных за последние 6 лет, удалось показать, что по сходным закономерностям осаждаются и золи фосфатов других металлов. Благодаря этому впервые была создана возможность проводить программную целенаправленную разработку новых методов исследований [10]. Разработанный по этой программе свинцовый метод [7] у некоторых видов животных и человека выявил сосудистое русло в мозгу [11], надпочечниках [13], скелетных мышцах и позволил изучить пролиферацию капилляров в мозгу [14]. С его помощью были получены интересные сведения о физико-химических и морфологических особенностях сосудистой системы [9]. Однако предъявляемым в ангиологическом аспекте требованиям этот метод соответствовал лишь частично. Серии новых методов, основанных на избирательном осаждении фосфора, отщепленного под действием различных фосфатаз различными металлами, позволили получить более богатые в морфологическом и ангиологическом отношении результаты [10]. Однако и они оказались далеко неадекватными. Поэтому в последнее время разработка методов велась

на основе осаждения свободного неорганического фосфора. В качестве источника фосфора в настоящем сообщении была выбрана аденозин-5-трифосфорная кислота (АТФ), с помощью которой и был разработан новый метод. В отличие от существующих АТФ-азных методов настоящий метод полностью программировался для выявления интраорганного сосудистого русла и основан на гидролизе АТФ, находящейся в инкубационной смеси, солями кальция. Образованный при этом фосфат кальция, согласно установленной нами закономерности концентрационного взаимоотношения, осаждается только в структурах сосудистого русла. В последующем этапе в особых условиях, предотвращающих перемещение и перераспределение осадка, фосфат кальция превращается в фосфат свинца, а последний, в свою очередь, в черный сульфид.

В качестве объекта исследования служили половозрелые кошки. После легкого наркоза животные декапитировались, и для исследования брались кора полушарий, сердце, печень, почки, селезенка, слюнные и эндокринные железы, кишечник, скелетные мышцы, диафрагма, яичник, матка, брыжейка, капсула почки, перикард, мозговые оболочки. Обработку материала производили по нижеследующей схеме:

1. Фиксация в 5%-ом формалине. Сроки фиксации не имеют принципиального значения. Например, на материале, фиксированном более 2 лет, удалось четко выявить сосудисто-капиллярную сеть. Но поскольку в последующем следует иметь дело с толстыми срезами, из которых адсорбированные вещества удаляются с трудом, то желательно применять короткую фиксацию (24—48 час.). Оболочки можно обрабатывать даже после 30-минутной фиксации.

2. Подготовка тонких срезов 20—60 мкм — для гистологических и толстых 150—200 мкм — для ангиологических целей. Срезы кратковременно фиксированного материала собираются в физиологический раствор, а длительно фиксированного материала — в проточную воду, где без последующего ущерба окраски можно оставить 1—2 дня.

3. Инкубация срезов в следующей смеси: а) 1,5—2 мл глицинового буфера Зеренсена, но 1 М концентрация, рН 11,5—12,00, доводится водой до 7 мл; б) 2 мл 0,1 М раствора уксуснокислого кальция; в) 1 мл 0,1 М свежеприготовленного раствора двунатриевой соли аденозин-5-трифосфорной кислоты (5 мг/мл — фирма Реанал). Сроки инкубации от 30 мин до 20 час. при 20° (для большинства органов 1—5 час.).

4. Промывка в двух сменах дистиллированной воды 2—5 мин.

5. Погружение в замещающую свинцовую смесь, приготовленную по нижеследующему способу: к 100 мл воды прибавляют 2 капли уксусной кислоты, где затем растворяют 2 г химически чистого уксуснокислого свинца, после чего прибавляют 10 мл 1 М ацетатного буфера (рН 6,2) и 15 мл 8% раствора уксуснокислого аммония. Смесь пригодна долгое время и может использоваться многократно. В указанной смеси срезы могут оставаться от 10 мин до 1 часа.

6. Промывка в двух сменах дистиллированной воды.

7. Погружение в 20% раствор уксуснокислого аммония от несколь-

ких минут до нескольких часов в зависимости от толщины срезов и сроков инкубации.

8. Промывка в двух сменах дистиллированной воды 2—5 мин.

9. Погружение в 2—5% раствор сернистого натрия 5—10 мин.

10. Промывка в нескольких сменах дистиллированной воды от 20 мин до 1 часа.

11. Заключение в глицерин-желатину или через спирт, толуол в бальзам, приготовленный на толуоле.

При описании полученных по настоящему методу результатов следует оговориться, что нет смысла и возможности подробно останавливаться на особенностях строения микроциркуляторного русла в различных органах, хорошо известных по многочисленным исследованиям. Поскольку окраска структур имеет сходный характер, то мы ограничимся общим описанием полученной морфологической картины, иллюстрируя ее на некоторых конкретных примерах. В большинстве изученных органов основным выявленным элементом являются сосуды и капилляры. На тонких срезах видны их фрагменты, а на толстых окрашивается интраорганный сосудисто-капиллярная сеть. Последняя выступает весьма четко и избирательно. Сосуды и капилляры выявляются за счет отложения в их эндотелии черного или коричневого мелкозернистого осадка. В выбранных нами условиях клеточные структуры как сосудистой стенки, так и других тканей не выявляются. Единственным исключением являются гладкомышечные клетки, которые в виде поперечных линий четко выявляются в артериях (рис. 1). Благодаря этому артериальные



Рис. 1. Артериальные сосуды на поверхности мозга. Показана окраска гладкомышечных клеток стенки сосудов, ув. 240.

сосуды можно проследить до прекапиллярных артериол, после чего мышечные клетки исчезают в капиллярах, венах и венах. Таким обра-

зом, благодаря окраске мышечных клеток на препаратах создается возможность дифференциально одновременно исследовать как артериальные, так и венозные русла.

При просмотре препаратов, приготовленных из различных оболочек, нетрудно заметить, что практически окрашиваются сосуды всех калибров и выявляются все звенья микроциркуляторного русла (рис. 2).

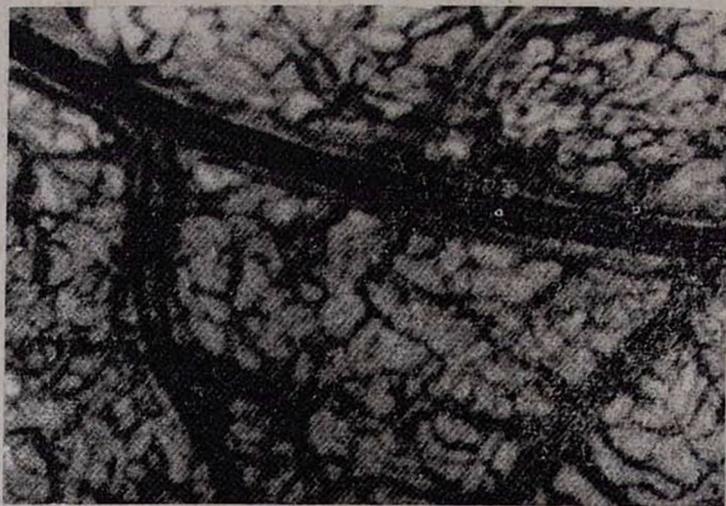


Рис. 2. Окраска сосудистого русла в мягкой мозговой оболочке. Видны интенсивно окрашенные артерии, вены и сосудисто-капиллярная сеть, ув. 56.

На приведенных микроснимках показаны результаты окраски микроциркуляторного русла в мозгу, сердце и в скелетных мышцах (рис. 3, 4 5). Нетрудно убедиться, что на этих препаратах весьма четко выявляется сосудисто-капиллярная сеть, хотя и вследствие слабого увеличения мышечные элементы в стенках сосудов различаются с трудом. Вследствие концентрации мышечных элементов артериальные сосуды окрашиваются быстрее и интенсивнее, а при длительных инкубациях окраски артерий, особенно крупных, становится диффузной.

Отмеченные нами результаты выявления микроциркуляторного русла характерны для большинства изученных нами органов. Некоторое исключение составляет печень, где сосудистое русло не только этим, но и всеми остальными другими нашими методами с использованием кальция выявляется не особенно четко. В почках наряду с четким выявлением капиллярного русла и артериол у кошек нечетко окрашиваются капилляры мальпигиевых клубочков. В связи с этим нельзя не отметить определенную специфику окраски различных звеньев микроциркуляторного русла в разных органах, требующих несколько иного подхода.

Надо особо подчеркнуть, что от существующих гистологических и гистохимических методов как этот, так и другие наши методы существенно отличаются. Эти отличия обуславливаются программ-

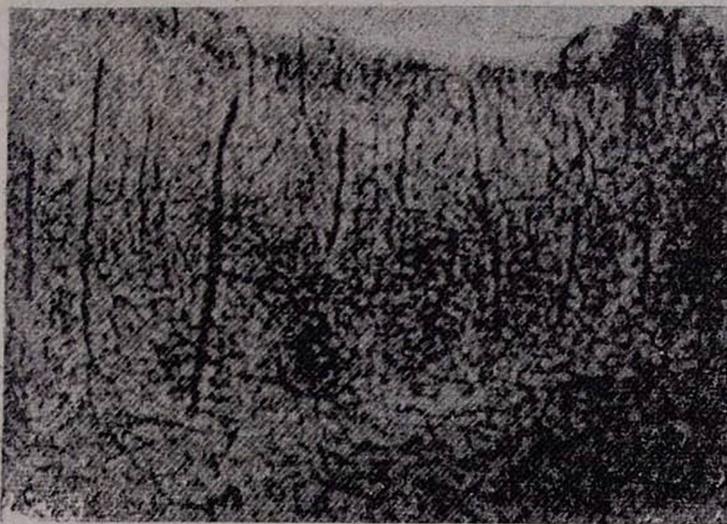


Рис. 3. Сосудисто-капиллярная сеть в коре полушарий мозга. Слева длинная артерия и рядом с ней более широкая вена, ув. 56.



Рис. 4. Сосудисто-капиллярная сеть миокарда, в центре интенсивно окрашенная артерия, ув. 120.

ным характером наших методов. С этой точки зрения, приведенная нами инкубационная смесь является весьма условной, поскольку отмеченные результаты можно получить с помощью большого количества инкубационных смесей, где соответствующим образом изменяется количество

буфера, рН смеси и концентрация кальция. Перспективность такого подхода заключается еще в том, что благодаря изменению концентрационных взаимоотношений и сроков инкубации в некоторых случаях при желаниии можно добиться избирательного выявления отдельных звеньев сосудистого русла.



Рис. 5. Скелетная мышца. Показана артерия и вена и образованная между ними сосудисто-капиллярная сеть, ув. 56.

Остановившись на природе метода, можно отметить, что по сути дела он является морфологически мало связанным с АТФ-азной активностью клеточных структур. Об этом говорят следующие исследования. Предварительное нагревание срезов в воде (10 мин при 90°) несколько задерживает, но не изменяет характер окраски срезов. Сходные данные были получены при изучении срезов, полученных из материала двухлетней фиксации. Добавление ингибиторов АТФ-азы — хлормеркурибензоата и фтористого натрия в соответствующих концентрациях не оказывает существенного влияния на скорость и характер окраски сосудов. Эти данные указывают, что преципитация фосфата кальция, по всей вероятности, происходит за счет гидролиза АТФ, при этом, однако, не исключается возможность осаждения АТФ кальцием.

Общий анализ полученных данных позволяет утверждать, что разработанный метод в целом может удовлетворить те жесткие требования, которые предъявляются методам, предназначенным для изучения внутриорганный микроциркуляторного русла. Отличаясь избирательностью, простотой и постоянством полученных результатов, метод обеспечивает четкое выявление органного сосудистого русла. Одним из важных его преимуществ является возможность дифференциального иссле-

дования артериального и венозного русла. Обладая универсальностью, он позволяет приступить к исследованию сосудистого русла не только в отдельных органах, но и одновременно в большинстве органов и тканей у одного и того же животного. Отмеченные достоинства позволяют говорить о значительных потенциальных возможностях разработанного метода. По всей вероятности, этот и разработанная в настоящее время нами серия других новых методов, которые правильно было бы назвать гистоангиологическими, в сочетании с существующими методами в определенной степени расширят возможности дальнейшего, более широкого изучения вопросов, связанных с внутриорганный кровеносной системой. Можно полагать, что эти методы позволят восполнить тот существенный пробел, который до сих пор имел место между микроангиологией, гистологией и патогистологией.

Институт физиологии им. Л. А. Орбели
АН АрмССР

Поступила 20/IX 1977 г.

Հ. Մ. ՉԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ

ԿԱԼՑԻՈՒՄ ԱՂԵՆՈՋԻՆՖՈՍՖՈՐԱԹՔՎԱՅԻՆ ՄԵԹՈԴԸ ԵՎ ՆԵՐՐՐԳԱՆԱՅԻՆ ՄԻԿՐՈՑԻՐԿՈՒԹՅԱՏՈՐ ՀՈՒՆԻ ՈՉ ԻՆՅԵԿՑԻՈՆ ՀԱՅՏՆԱՐԵՐՄԱՆ ՀՆՈՒՆԿԱՐՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներօրգանային միկրոցիրկուլյատոր հունի միկրոսկոպիական ուսումնասիրման և հայտնաբերման համար մշակված է սկզբունքային տեսանկյունով նոր մեթոդ հիմնված ադենոզին-ֆոսֆորային թթվից անշատված անօրգանական ֆոսֆորի ընտրողական նստեցմանը անոթներում և մազանոթներում: Կատոնների տարբեր օրգանների և հյուսվածքների ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ մշակված մեթոդը հայտնաբերելով անոթա-մազանոթային ցանցը հնարավորություն է տալիս դուրսին կերպով տարբերելու զարկերակային և երակային հունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кловский Б. Н. Циркуляция крови в мозгу. М., 1951.
2. Кловский Б. Н., Космарская Е. Н. Деятельное и тормозное состояние мозга. М., 1961.
3. Куприянов В. В. В кн.: Морфологические основы микроциркуляции. М., 1965, стр. 20.
4. Куприянов В. В., Караганов Я. Л., Козлов В. И. Микроциркуляторное русло. М., 1975.
5. Тихомиров А. Н., Куликов В. В. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, т. LXII, 1, 1972, стр. 104.
6. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция. М., 1975.
7. Чилингарян А. М. Журнал экспериментальной и клинической медицины АН АрмССР, 1965, 5, стр. 19.

8. Чилингарян А. М. Докт дисс. Ереван, 1968.
9. Чилингарян А. М. Клинические и экспериментальные исследования расстройств мозгового и коронарного кровообращения. Ереван, 1976, стр. 56.
10. Чилингарян А. М. Материалы IV Всесоюзной конференции по физиологии вегетативной нервной системы. Ереван, 1976, стр. 329.
11. Чилингарян А. М., Карапетян И. М. Журнал экспериментальной и клинической медицины АН АрмССР, 1965, 4, стр. 11.
12. Чилингарян А. М., Мартиросян Дж. А. Биологический журнал Армении, 1973, 8, стр. 52.
13. Чилингарян А. М., Паравян Е. Н. Известия АН АрмССР (биол. науки), т. 17, 1, 1964, стр. 85.
14. Чилингарян А. М., Паравян Е. Н. Brain Research., 28, 3, 1971., стр. 550.