

Uwidacznianie naczyń krwionośnych zmodyfikowaną metodą korozyjną

Visualization of blood vessels by means of the modified corrosion method

Konstanty Ślusarczyk¹, Stanisław Skrzelewski², Jerzy Nożyński³, Agnieszka Kędzia³, Maurycy Porc³, Brygida Beck-Ciszek⁴, Tadeusz F. Krzemiński³

¹Katedra i Zakład Anatomii Opisowej i Topograficznej Śląskiej Akademii Medycznej, Zabrze (Department of Descriptive and Topographic Anatomy, Medical University of Silesia, Zabrze, Poland)

²Katedra i Zakład Radiologii Lekarskiej i Radiognostyki Śląskiej Akademii Medycznej, Zabrze (Department of Radiology and Radiodiagnostics, Medical University of Silesia, Zabrze, Poland)

³Katedra i Zakład Farmakologii Śląskiej Akademii Medycznej, Zabrze (Department of Pharmacology, Medical University of Silesia, Zabrze, Poland)

⁴Katedra i Zakład Biofizyki Śląskiej Akademii Medycznej, Zabrze (Department of Biophysics, Medical University of Silesia, Zabrze, Poland)

Streszczenie

Wstęp: Opisano własną modyfikację metody sporządzania preparatów korozyjnych, pozwalającą obserwować przebieg naczyń krwionośnych w stosunku do ściany narządu.

Materiał i metody: Po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej przeprowadzono badania na dojrzałych samcach szczurów szczepu Sprague-Dawley. W głębokim znieczuleniu pobrano narządy klatki piersiowej. Serce perfundowano metodą Landendorffa (płyn Krebs-Henseleit). Po upływie 1 minuty przez 30 minut podawano lateks LKBS 45-50 pod ciśnieniem 15-centymetrowego słupa wody. Preparat utrwalano przez 4 doby w płynie Bouina. Następnie serce trawiono w stężonym, a po upływie 1 doby w 25-procentowym roztworze HCl. Przed rozpoczęciem trawienia i podczas jego trwania co kilka godzin serce oglądano w stereomikroskopie, wykonywano zdjęcia makrofotograficzne oraz rysunki z preparatu. Trawienie przerywano w chwili uwidocznienia drobnych gałązek naczyniowych przy zachowaniu ściany komory. Łączny czas trawienia wynosił 4 doby.

Wyniki: Uwidoczniono główne pnie obu tętnic wieńcowych oraz ich gałęzie, łącznie z bardzo drobnymi. Można było dostrzec łatwo stosunek naczyń do ściany narządu oraz istnienie zespołów między tętnicami.

Wniosek: Zaproponowana modyfikacja metody korozyjnej pozwala na bezpośrednią obserwację wszystkich, nawet bardzo drobnych, gałązek naczyniowych, przy zachowanej ścianie narządu.

Słowa kluczowe: szczury Sprague-Dawley, tętnice, metoda stopniowego wytrawiania

Abstract

Background: Our own modification of the corrosion method is described. This modification enables the observation of blood vessels with the organ walls still present.

Material and methods: Investigations were carried out on adult male Sprague-Dawley rats. The agreement of Local Ethical Committee was obtained. After deep anaesthesia the chest organs were taken out. The heart was perfused using Langendorff's method, (Krebs-Henseleit solution) for one minute and latex (LKBS 45-50) was administered for 30 min. under 15 cm H₂O pressure. Then the specimen was fixed in a Bouin solution for 4 days. Afterwards the specimen was digested in concentrated HCl for 24 hours followed by digestion in a 25% solution of HCl. Before the corrosion had started, as well as during the process of corrosion which lasted 4 days, the heart was observed under the stereomicroscope every few hours, outlines were made and photographs taken. This digestion was interrupted when small vascular branches were visualized with the heart's ventricle walls still present.

Results: The main stems of both the left and right coronary arteries and their branches including very small ones, became visible. It was easy to observe relations of the vessels to the organ wall, as well as the presence of connections between arteries.

Conclusion: Our modified corrosive method enables direct observation even of the small vascular twigs, with the organ wall preserved.

Key words: Sprague-Dawley rats, arteries, modified gradual corrosion method

Wstęp

Wypełnianie naczyń, przewodów czy narządów jamistych, z następowym wytrawianiem tkanek miękkich i pozostawieniem odlewów badanych struktur, jest od dawna stosowane i znane pod nazwą metod korozyjnych [1]. Materiały służące do wypełniania można podzielić na kilka grup:

- masy typu wosków lub kitów;
- łatwotopliwe stopy metali;
- masy nitrocelulozowe;
- tworzywa oparte na kauczuku;
- żywice syntetyczne.

We wszystkich przypadkach postępowanie sprowadza się do następujących etapów:

1. przygotowanie narządu, z którego będzie sporządzony preparat korozyjny;
2. wybór odpowiedniego materiału (masy wypełniającej), służącego do nastrzyknięcia;
3. właściwe nastrzyknięcie, czyli wypełnienie struktur, których odlew zamierza się uzyskać;
4. utwardzenie masy wypełniającej;
5. wytrawianie tkanek miękkich (korozja);
6. ostateczne wykończenie preparatu i analiza szczegółów budowy.

W pierwszym etapie (przygotowanie narządu) trzeba możliwie dokładnie wypluć przewody stanowiące przedmiot badania z zawartości (np. krew z naczyń krwionośnych). Niekiedy konieczne jest uprzednie podgrzanie narządu (a także masy służącej do nastrzyknięcia), co wprawdzie nieco komplikuje całe postępowanie, niemniej jest stosunkowo łatwe do przeprowadzenia.

Przy wyborze masy wypełniającej (etap 2.) należy wziąć pod uwagę cel badania, możliwości wypełniania pożądaných struktur, technikę samego nastrzyknięcia (etap 3.), możliwości utwardzenia masy (etap 4.) oraz sposób oceny preparatu (etap 6.).

W przypadku stosowania mas opartych na kauczuku, lateksu, konieczna jest obserwacja w wodzie, ze względu na elastyczność i giętkość odlewu, łatwo ulegającego odkształceniu [2].

Do wytrawiania tkanek miękkich (korozji — etap 5.) używa się, w różnych stężeniach, zasady (najczęściej ług potasowy) [2, 3], bądź kwasu solnego [4–6] albo specjalnych roztworów do korozji [1].

Wyżej wzmiankowane sposoby postępowania stosuje się nadal, szczególnie w celu badania przebiegu i rozkładu gałęzi naczyń krwionośnych.

Metody korozyjne nabrały znacznie większego znaczenia po wprowadzeniu mikroskopu skaningowego; w tym przypadku stanowią niezbędny etap przygotowania materiału do badań. Do nastrzyknięcia stosuje się najczęściej Mercocx CL® (Japan Vilen Comp. Ltd., Tokyo) [1, 7].

Preparaty korozyjne wykonane wyżej wymienionymi „klasycznymi” technikami można oceniać makroskopowo lub w stereomikroskopie (najczęściej). Niekiedy

Introduction

The filling of vessels, ducts or cavernous organs followed by the digestion of soft tissues while the structures to be demonstrated are left, have been known for many years as corrosion methods [1].

The materials used in these procedures can be divided into several groups:

- wax- or mastic-like masses;
- easy-melting metal-alloys;
- nitrocellulose masses;
- rubber-based substances;
- synthetic resins.

In all cases the procedures include:

1. preparation of the organ from which a corrosive specimen will be made;
2. choice of an appropriate filling material;
3. the injection proper, i.e. filling of the structures which are to be demonstrated;
4. hardening of the injected mass;
5. digestion of soft tissues, i.e. a process of corrosion;
6. and final completion of the specimen with the analysis of structural details.

In the 1st step (the preparation of the organ) it is necessary to wash out the contents of the studied ducts (e.g. washing out the blood from vessels). Sometimes it is necessary to warm up the organ and the injecting mass too. This, in fact, slightly complicates the procedure, but is relatively easy to perform.

In the 2nd step (choice of the injecting mass) the aim of the investigation, possibility of filling the adequate structures and the injection technique must be taken into account (the 3rd step). The possibilities of both the injection mass hardening (the 4th step) and the method of the specimen evaluation (the 6th step) have to be taken into consideration, too. In the case of using rubber-based substances, it is necessary to perform water observation because the elasticity and flexibility of the cast may lead to its deformation [2].

For the digestion of soft tissues (5th step of corrosion) either alkalies (most frequently kalium lye) [2, 3] or hydrochloric acid in different concentrations [4–6] or special corrosion solutions [1] are used. The above-mentioned methods are still used, especially in order to study the course and distribution of blood vessel branches. After the scanning electron microscope was introduced, the significance of the corrosion methods highly increased. These methods make up an essential stage in preparation of the investigated material. The Mercocx CL® (Japan Villena Comp. Ltd., Tokyo) is the most commonly used. For technical details see [1, 7].

The corrosive specimens obtained by means of the above mentioned “standard” techniques can be evaluated macroscopically or (most frequently) under a stereomicroscope. Sometimes histological slices may be made, e.g. when latex or araldit CY 223 is used [1].

It is possible to obtain valuable information using several methods simultaneously, e.g. both corrosion and angiographic [8, 9]. In such cases good pictures of the spatial interrelationships of vessels are achieved. However, there still remains the problem of relations of the

można dodatkowo wykonać preparaty histologiczne, np. w przypadku nastrzyknięcia lateksem lub aralditem CY223 [1]. Cenne informacje uzyskuje się, stosując kilka metod jednocześnie, np. metod korozyjnych i angiograficznych [8, 9]. Możliwy jest wtedy dobry wgląd w stosunki przestrzenne naczyń. Nadal jednak pozostaje problem stosunku naczyń (dużych pni oraz ich drobnych gałęzi) do ściany narządu. Jest to szczególnie ważne przy badaniu przebiegu naczyń serca (u człowieka naczynia wieńcowe charakteryzują się podnasierdziowym przebiegiem, natomiast u szczura — falistym, biegnąc miejscami płytko, miejscami głębiej, śródmięśniowo) [10]. W tych przypadkach problemu nie rozwiązuje również badanie histologiczne, ponieważ wymagałoby ono wykonania seryjnych skrawków całego narządu lub przynajmniej seryjnych skrawków wzdłuż przebiegu większego naczynia. W celu uniknięcia powyższych trudności oraz żmudnego i wymagającego dużego nakładu pracy postępowania autorzy opracowali własną modyfikację „klasycznej” metody korozyjnej, pozwalającą obserwować przebieg wszystkich większych pni naczyniowych, a także ich gałęzi (łącznie z bardzo drobnymi) w stosunku do grubości ściany narządu.

Material i metody

Po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na Zwierzętach w Katowicach (L. Dz. NN-013-2-36/2000) przeprowadzono badania na 20 dojrzałych samcach szczepu Sprague-Dawley o masie 450–540 g.

Zwierzętom wstrzyknięto dootrzewnowo heparynę (500 I.U./100 g mc.), a następnie (również dootrzewnowo) pentobarbital (60 mg/kg mc.). Po uzyskaniu głębokiego znieczulenia otwierano klatkę piersiową i wycinano serce wraz z płucami. Wycięte narządy perfundowano pod stałym ciśnieniem 60 mm Hg, przez minutę (metoda Langendorffa, płyn Krebs-Henseleit, pO₂ 520 mm Hg). Po podwiązaniu naczyń płucnych usuwano płuca, a do aorty wstępującej wprowadzano kaniulę z kranikiem, szczelnie ją podwiązując. Serce wraz z kaniulą zawieszano na statywie do perfuzji i pod ciśnieniem 15 cm słupa wody podawano lateks LKBS 45–50, w temperaturze pokojowej (> 18°C) przez 30 min. Następnie serce utrwalano w płynie Bouina przez 4 doby, utrzymując preparat w pozycji wiszącej. Po opłukaniu serca wodą bieżącą wykonano zdjęcia makrofotograficzne oraz rysunki z preparatu. Trawienie przeprowadzano, stosując przez dobę stężony HCl, a w kolejnych dniach jego 25-procentowy roztwór. Podczas procesu trawienia co kilka godzin serce oglądano w stereomikroskopie i kolejne etapy dokumentowano w identyczny sposób jak podano wyżej. Trawienie przerywano w chwili uwidocznienia drobnych gałązek naczyniowych przy zachowaniu ściany komory, co umożliwiało uchwycenie stosunków przestrzennych w przebiegu naczyń. Łączny czas trawienia wynosił 4 doby (1. doba — stężony HCl, 3 doby — 25-procentowy roztwór HCl).

vessels (both their large stems as well as small twigs) to the organ wall. It is particularly important when studying the cardiac vessels (e.g. the course of human coronary arteries is superficial i.e. subepicardial, while in the rat it is wave-like, partly superficial, partly deep) [10]. Even a histological examination does not solve such problems. Serial slices of a whole organ ought to be made (or at least serial slices along the course of a larger vessel).

In order to avoid these difficulties and to omit a laborious procedure, the authors have elaborated their own modification of the corrosive method. It enables one to observe the course of all larger vessels and their branches including very small ones in relation to the thickness of the organ wall.

Material and methods

Investigations were carried out on 20 adult male Sprague-Dawley rats, weighing 450–540 g each. The agreement of Local Ethical Committee in Katowice (NN-013-2-36/2000) was obtained.

Heparine (500 I.U. per 100 g of body weight) and then pentobarbital (60 mg per 100 g of body weight) were injected intraperitoneally. After deep anaesthesia the thorax was cut open and the chest organs were taken out. They were perfused for one minute under constant pressure of 60 mm Hg (Langendorff's method, Krebs-Henseleit solution, pO₂ 520 mm Hg). The pulmonary vessels were ligated and lungs were removed. A cannula with a small tap was inserted in the aorta. The heart together with the cannula was hung on a perfusion stand and latex (LKBS 45–50) was administered for 30 min. under 15 cm. H₂O pressure at room temperature (> 18°C). Then the heart was fixed in a Bouin solution for 4 days. Next, the specimen was rinsed with running water and outlines were made and photographs taken. Afterwards the specimen was digested in concentrated HCl for 24 hours followed by digestion in a 25% solution of HCl. During the process of corrosion which lasted 4 days, every few hours the heart was observed under a stereomicroscope and documentation was made as above. The digestion was interrupted when small vascular branches were visualized but the heart ventricles walls were still present. It was possible to observe spatial interrelations of the heart vessels.

Results

Immediately before the corrosion started there were visible subepicardially located veins but not arteries due to their somewhat deeper course (Fig. 1). During the process of corrosion the main stems of the both the left and right coronary arteries became visible. Their wave-like course — partially superficial, partially somewhat deeper is notable (compare Fig. 2 in [10]). Other lateral branches, and especially those which are terminal, go directly into the heart musculature (compare Fig. 3 in [10]). The latter give off many shaggy configured twigs of a terminal character (compare Fig. 7 in [10]). It is easy to observe the anastomoses

Wyniki

Bezpośrednio przed rozpoczęciem wytrawiania widoczne są podnasilczo położone żyły, natomiast ze względu na nieco głębszy przebieg tętnice nie są widoczne (ryc. 1). W miarę trwania procesu korozji widoczne stają się główne pnie tętnicy wieńcowej prawej i lewej. Zwraca uwagę ich falisty przebieg. Odcinkowo tętnica biegnie tuż pod nasierdziem, w innych miejscach zanurza się dość płytko do mięśniówki (por. ryc. 2 w pracy [10]).

Kolejne gałęzie boczne, a zwłaszcza końcowe, kierują się wyraźnie w głąb mięśnia (por. ryc. 3 w pracy [10]). Dzielą się na liczne miotełkowato ukształtowane naczynia o charakterze końcowym (por. ryc. 7 w pracy [10]). Łatwo można stwierdzić istnienie zespołów między tętnicami. Są one dość liczne między gałęziami jednoimiennej tętnicy wieńcowej, natomiast nieliczne między gałęziami prawej i lewej tętnicy wieńcowej. Do wyjątków należą też zespolenia między najdrobniejszymi gałęziami omawianych naczyń.

Dyskusja

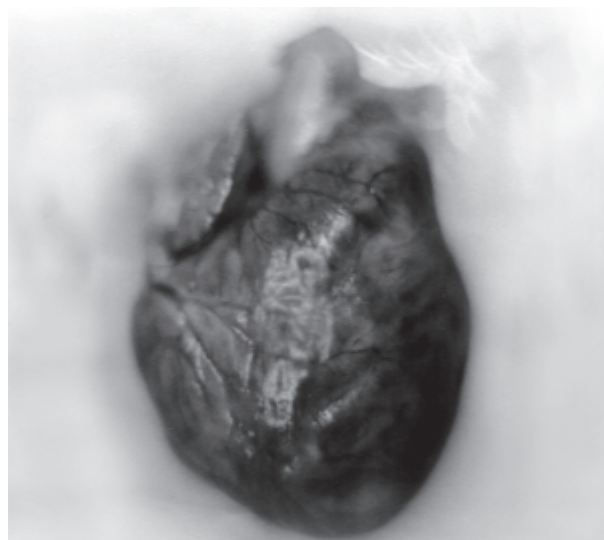
Przy opisie budowy dowolnego narządu ważna jest ocena stosunków przestrzennych. Szczególnie istotne jest uchwycenie położenia naczyń krwionośnych w ścianach narządów jamistych, co ułatwia interpretację wyników badań czynnościowych. Dotąd stosowane makroskopowe metody uwidocznienia naczyń krwionośnych nie pozwalają na ocenę stosunku tych naczyń (zwłaszcza ich najdrobniejszych gałęzi) do ściany narządu.

Z kolei metody mikroskopowe wymagają wykonania seryjnych skrawków całego narządu lub przynajmniej jego części, położonej w obszarze unaczynienia badanej tętnicy.

Zaproponowana przez autorów niniejszej pracy modyfikacja metody korozyjnej pozwala na bezpośrednią obserwację nawet drobnych gałązek naczyniowych, przy zachowanej ścianie narządu. Istota modyfikacji sprowadza się do:

- wykonania dokumentacji początkowej;
- częstej obserwacji (co kilka, kilkanaście godzin) preparatu przy użyciu stereomikroskopu, z każdorazowym dokumentowaniem obrazu;
- przerywania procesu wytrawiania w chwili uwidocznienia drobnych gałęzi naczyniowych przy zachowanej ścianie narządu.

Dodatkową korzyścią jest możliwość stosowania dowolnego materiału do wypełnienia naczyń.



Rycina 1. Serce szczura szczepu Sprague-Dawley bezpośrednio po perfuzji

Figure 1. The heart of a Sprague-Dawley rat immediately after perfusion

between the twigs of the ipsilateral, both the right or left arteries, but only a few between those which are contralateral. Exceptionally, anastomoses were also observed between the smallest twigs of each of the above mentioned vessels.

Discussion

When describing a structure of any organ it is important to evaluate spatial interrelationships. It is of a fundamental significance to depict the relations of blood vessels to the walls of cavernous organs. Such an approach simplifies the interpretation of results of functional investigations.

The macroscopical methods of vessel visualization used so far do not allow the evaluation of their relationship (especially of their smallest twigs) to the organ wall. When microscopic methods are used, serial slices of a whole organ (or at least of the part located in the area supplied by a studied vessel) ought to be made. Our modification of a corrosive method enables direct observation even of the small vascular twigs, with the heart ventricle wall preserved. The essence of the modification consists of:

- making the initial documentation;
- frequent observation (every several hours) of the specimen under a stereomicroscope;
- interrupting the digestion process when the small vascular twigs are visualized but the heart wall is still present.

An additional advantage lies in the possibility of using any material for injection.

Piśmiennictwo (References)

1. Böck P (Hrsgb.). *Romeis mikroskopische Technik*, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1989.
2. Aleksandrowicz R, Łoziński J. Krajowe żywice poliestrowe w zastosowaniu do preparatów korozyjnych. *Tworzywa-Gumy-Lakiery* 1959; 10: 1–3.
3. Bagiński S. *Technika mikroskopowa*. PWN, Warszawa 1965.
4. Hadžiselimovic H. Age characteristics of blood vessels of the human heart. *Acta Anat.* 1981; 109: 231–237.
5. Krupa U. Arterial vascularization of the interatrial septum in the human heart in relation to the type of coronary ramification. *Folia Morphol.* 1995; 54: 51–59.
6. Pezacki Z. Tętnice wieńcowe serca i ich połączenia w badaniach pośmiertnych. *Poznańskie Tow. Przyjaciół Nauk — prace Komisji Med. Dośw.* 1968; 37: 1–22.
7. Castenholz A, Castenholz HE. Castings methods of scanning electron microscopy applied to hemal lymph nodes in rats. *Lymphology* 1996; 29: 95–105.
8. Taira Y, Kanaide H, Nakamura M. The distribution of ischemia in perfused Wistar rat hearts following coronary artery occlusion. *Br J Exp Path.* 1985; 66: 613–621.
9. Skrzewski S, Krzemiński TF, Ślusarczyk K *et al.* Technika angiografii tętnic wieńcowych szczura. *Pol J Radiol.* 2005; 70: 77–81.
10. Ślusarczyk K, Skrzewski S, Nożyński J *et al.* Tętnice wieńcowe szczurów szczepu Sprague-Dawley uwidocznione sposobem stopniowego wytrawiania. *Chir Pol.* 2004; 6: 239–244.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr hab. Konstanty Ślusarczyk, prof. nadzw. ŚAM
Katedra Anatomii Opisowej i Topograficznej ŚAM
41–808 Zabrze
ul. Jordana 19
tel./faks: (032) 272–22–01

Praca wpłynęła do Redakcji: 12.04.2006 r.