

BIOLÓGIAI MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS KVALITATÍV RÖNTGEN-SUGÁR MIKROANALÍZISE*

TÓTH IDA

MTA, Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium

A vékony (maximum $0,25\ \mu\text{m}$ vastagságú) biológiai minták röntgen-sugár mikroanalízise (elektronsugaras röntgen-mikroanalízise: BERNOLÁK, SZABÓ, SZILAS 1979) alig több, mint 10 éves múlta tekint vissza, s csupán néhány száz közlemény jelent meg ebben a témakörben. Jelentősége mégis óriási, mert az egyetlen olyan vizsgáló módszer, amely közvetlen kapcsolatot teremt a morfológia és a biokémia között.

A lehetőséget egy ilyen kapcsolatteremtésre az analitikai elektronmikroszkópia biztosította: azok az elektronmikroszkópok, amelyek röntgen-sugár mikroanalizátorral vagy mikroanalizátorokkal vannak felszerelve. Mind a transzmissziós, mind a scanning elektronmikroszkópok kombinálhatók mikroanalizátorral, így az elektronmikroszkópos anyagvizsgálat során mindhárom üzemmódban (TEM: transzmissziós elektronmikroszkóp, STEM: scanning transzmissziós elektronmikroszkóp és SEM: scanning elektronmikroszkóp) nyerhető információ az anyag *in situ* mikrokémiájára vonatkozóan.

A módszer lényege, hogy az elektronbombázás hatására keletkező röntgen-sugárzást a minta közelében elhelyezett detektor érzékeli, majd az impulzusokat erősítés után egy sokcsatornás analizátor dolgozza fel, melynek eredménye az energia spektrum, illetve hullámhossz spektrum, a detektortól függően. Újabban mindkét detektor-típussal felszerelik az elektronmikroszkópokat, így célzottan alkalmazhatók. A kristályspektrométerrel nyert hullámhossz spektrumon csak egy elem vizsgálható, azonban a feloldóképessége, így a jel/zaj, azaz csúcs/háttér arány jobb, ezért a kis koncentrációban jelenlevő elemek vizsgálatára alkalmasabb. Afélvezetű típusú (általában szilícium/litium) detektorral kapott energia spektrum azonban a teljes detektálható elemösszetételt mutatja, amelyet általában rövid 100-200 másodperces analízis idővel nyerünk. A hagyományos félvezetű detektorral csupán a nátrium, illetve a nátriumnál magasabb rendszámú elemek vizsgálhatók, azonban az ún. ablak nélküli detektorokkal könnyebb elemek is vizsgálhatók.

A biológiai minták analízisében a félvezetű detektorok alkalmazása elterjedtebb, mint a kristályspektrométereké. Az eddigi közlemények kb. 10%-

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15–18 között Sümegen elhangzott előadás.

ban alkalmaztak hullámhossz spektrum kiértékelést. Ennek nem csupán a könnyebb kezelhetőség az oka, hanem az is, hogy rövidebb idő alatt több információ nyerhető a szimultán spektrum révén, így a minta károsodása minimális. A legkisebb kimutatható anyagmennyiség 10^{-19} g, (SHUMAN, SOMLYÓ 1976) tehát rendkívül érzékeny módszer.

A röntgen-sugár mikroanalízis látszólag egyszerű, gyors módszer az elemek in situ meghatározására. Azonban ahhoz, hogy értékelhető eredményeket kapjunk, gondos, meghatározott paraméterekkel végzett analízis és még gondosabb, kontamináció- és műtermék-mentes mintaelőkészítés szükséges.

Mintaelőkészítés

A röntgen-sugár mikroanalízis révén nyert adatok értékelhetősége nagymértékben függ a minta előkészítésétől. A preparálás kettős kritériuma a következő:

- i. Megfelelően kontrasztos minta a tájékozódás biztosítására.
- ii. Az elemek diszlokáció és kioldódás mentes megőrzése.

Csak a két feltétel biztosítása esetén használhatjuk ki maximálisan azt a röntgen-sugár mikroanalízis nyújtotta lehetőséget, hogy pl. egy sejtorganelum in situ elemösszetételét meghatározzuk. Ennek a kettős követelménynek egyetlen ma ismert módszer sem felel meg tökéletesen, azonban számos kompromiszikus megoldás van. Ezek az eljárások a vizsgálat céljától függően két nagy csoportra oszthatók:

1. Minden detektálható elem, vagy
2. célzottan egy-egy elem kimutatására irányuló előkészítés.

1. Minden detektálható elem kimutatására irányuló előkészítési módszerek:

1.1. A konvencionális elektronmikroszkópos előkészítés során a fixáló szerek, a vízelvonó szerek, sőt a beágyazó medium is kioldhatja, illetve diszlokálhatja az elemeket. Ezért célszerű minden kémiai anyagot mellőzni, ha minden detektálható elem eloszlását akarjuk vizsgálni. Legalkalmasabb előkészítési mód a rögzítetlen anyagból készült *fagyasztva szárított, fagyasztott ultravékony* metszés. Ilyen preparátumok készítéséhez speciális ultramikrotomok szükségesek. A hagyományos ultramikrotomok közül az LKB Ultratom I. III. és IV., a Reichert OMU-2, OMU-3, valamint a Sorvall Porter-Blum MT2B és MT2 típusai kiegészíthetők a kereskedelmi forgalomban kapható fagyasztó feltétekkel.

A preparálás lényege, hogy alacsony hőmérsékleten, általában a folyékony nitrogénben (-190°C) vagy túlhűtött, folyékony nitrogénben (-210°C), megfagyasztjuk a szövet lehetőleg minél kisebb részletét, (általában 1 mm^3). Ezután az anyagot $-80 - 100^{\circ}\text{C}$ körüli hőmérsékleten száraz késsel megmetsszük, majd tű (CHRISTENSEN 1971) vagy vákuum (APPLETON 1974) segítségével összegyűjtjük a metszeteket és az elektronmikroszkópos rostélyra helyezzük.

Szárítás után szénréteget párologtatunk rá (HODSON és WILLIAMS 1974). A metszet szárítását is alacsony hőmérsékleten kell végezni, így az elemek száradás közbeni diszlokációja elkerülhető. Laboratóriumunkban Reichert OMU-2 típusú ultramikrotom FC-2 típusú fagyasztó feltétjével dolgozunk. Ebben a készülékben a preparátum, a késtartó és a gyorsfagyasztó egység egy viszonylag kis térfogatú kamrában helyezkedik el, a hőmérséklet $0,2^{\circ}\text{C}$ pontossággal elektromos úton szabályozható -160 és $+40^{\circ}\text{C}$ között, folyékony nitrogén elektromos úton történő párologtatásával. A minta fagyasztására folyékony nitrogén helyett Freon 22-t alkalmazunk -130°C mellett. Ennek megvan az az előnye, hogy így a mintát a kamrán belül fagyaszthattuk le, és éppoly jó eredményeket kaptunk, mint túlhűtött cseppfolyós nitrogénnel.

A jó metszetkészítés feltétele, hogy minél kisebb anyagot minél gyorsabban fagyasszunk le. Úgy tapasztaltuk, hogy Vibratommal történő előmetszés ($50-100\text{ }\mu\text{m}$ -os szövetszeletek) alkalmazása nagymértékben csökkenti a fagyasztás soráni jégkristály képződést. Jól kisimíthatók a metszetek és felvételük is effektívebb, ha kis teljesítményű vákuum szivattyúval gyűjtjük össze a szalagszerűen rendeződött metszeteket. Ezt a módszert Appleton nyomán mi is adaptáltuk Reichert OMU-2 FC-2 típusú ultramikrotomunkhoz. A fagyasztva szárított ultravékony metszetekben elméletileg minden elem diszlokáció mentesen megőrizhető, így a röntgen-sugár mikroanalízis ideális preparátumai. Azonban a természetesen előforduló elemek elektron-denzitása alacsony, ezért a tájékozódás problematikus, a membránok például nem vehetők ki a megszokott módon: csupán az anyag sűrűségbeli különbségei adnak kontraszt hatást.

1.2. A lefagyasztott minta vákuumban kiszárítható, műgyantába ágyazható, így is elkerülhetjük a fixáláshoz, illetve a víztelenítéshez használt kémiai anyagok alkalmazását. Ezek a *fagyasztva szárított beágyazott metszetek*. A metódika egyszerűbb, mint a fagyasztva szárított fagyasztott ultravékony metszetek készítése, de a beágyazó anyag diszlokációt okozó hatása nem zárható ki.

1.3. A lefagyasztott anyag víztelenítését szubsztitúcióval is elérhetjük. Eredetileg SPURR (1972) írta le. A lefagyasztott anyag -80°C szubsztituálható dietil-éterrel, vagy acetonnal, vagy akroleinnel, majd néhány nap múlva szobahőmérsékletre hozható, és beágyazható. Számos növényi és állati szövetben végeztek így eredményes vizsgálatokat, azonban a nátrium és kálium ki-

oldódása megfigyelhető a *fagyasztva szubsztituált metszeteken*. (CHANDLER 1978).

1.4. Mind a kémiai, mind a fizikai fixálást mellőzve is készíthető preparátum mikroanalitikai célra: szuszpenziót levegőn, (COSTA et al. 1977, HUI és COSTA 1979, SILBERGELD és COSTA 1979) vagy kritikus pont-száritóval dehidrált állapotban vizsgálhatjuk (CLARKE et al. 1970). Rendkívül gyors, egyszerű eljárás. Szövetekből is készíthetők levegőn szárított preparátumok: ezek az *elektronmikroszkópos kenetek* (TAKAYA 1975).

Az említett módszerekről részletes áttekintést ad ERASMUS (1978).

2. Egy elem célzott kimutatására irányuló előkészítési módszerek

2.1. Célzottan, egyetlen elem lokalizációjára irányuló vizsgálatok precipitációs módszerrel végezhetők. Így a szövetben jelenlevő *endogén elem* egy csapadék-képző ágenssel oldhatatlan reakcióvégterméket képezve a szövetben megőrizhető, és röntgen-sugár mikroanalízissel vizsgálható. Sok esetben, de nem szükségszerűen a csapadék elektrondenz, így a lokalizáció könnyű. A különböző metodikákat részletesen ismerteti LÄUCHLI (1975). A precipitációs technikák tekintélyes hányada a kalcium kimutatására irányul. Laboratóriumunkban sikerrel alkalmaztuk az Oschmann—Wall technikát idegyszövetben (PÁRDUCZ és JOÓ 1976), K-piroantimonátos rögzítést izomszövetben történő kalcium lokalizálására (DUX és mtsai 1977, DUX és mtsai 1978).

2.2. Nemcsak az endogén elemek, hanem a szövetekbe bevitt *exogén elemek* is azonosíthatók megfelelő előkészítés után. Csigából (*Helix pomatia*) származó suboesophagealis idegduc bárium tartalmú oldatban történő inkubálása után a neuroszekréciós szemcsékben bárium kimutatható (JOÓ és mtsai 1977).

Az elektronmikroszkópos K-ferricianidos glikogén festési eljárás specifikus volta ellenőrizhető a csapadék rtg-sugár mikroanalízisével (BOLDOCZKI és PÁRDUCZ 1977). A ferritinben lévő vas detektálásával az agyi hajszálerek permeabilitás-fokozódása egzakt módon jellemezhető (JOÓ és KARNYUSHINA 1978).

Zink-jód-ozmium reakció idegyszövetben történő lokalizálását követően a csapadék röntgen-sugár mikroanalízise megerősítette a reakció végtermék és a kalciumkötő helyek feltételezett kapcsolatát (HALÁSZ és mtsai 1979).

Alkalmazás

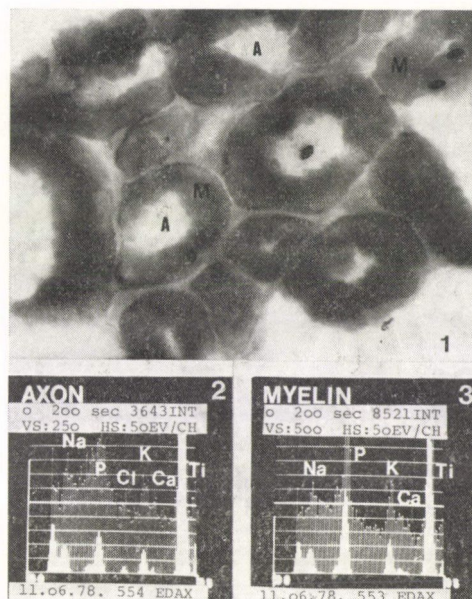
A továbbiakban a röntgen-sugár mikroanalízis laboratóriumunkban elért újabb eredményeiről szeretnék beszámolni. Adatainkat JEOL-JEM 100B-hez kapcsolt JEM-ASID scanning elektronmikroszkóp és EDAX 707 B

energiadisziperzív röntgen-sugár mikroanalizátor használatával nyertük. A metszeteket Reichert OMU-2, FC-2 típusú fagyasztó ultramikrotommal készítettük.

1. Idegszövet

1.1. Perifériás idegszövet elemösszetételének vizsgálata

Az idegszövet elemösszetételének vizsgálatára első alkalommal olyan szövetet választottunk, melynek viszonylagos egyszerű struktúrája lehetővé teszi a jó tájékozódást fagyasztott ultravékony metszeteken is. Patkány, egér és béka rögzítetlen n. ischiadicusából készítettünk fagyasztott ultravékony metszeteket és ezeket festetlenül, szenezés után vizsgáltuk az elektronmikroszkópban (1—3 ábra). A myelinizált idegrostok egyértelműen felismerhetők, így elemösszetételük in situ vizsgálható. A következő elemek: Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca és Fe voltak detektálhatók, mind az axonban, mind a myelin hüvelyben. Azonban csak a Na, K és P volt megtalálható minden vizsgált ponton, a többi elem feltehetően szekvesztrált eloszlású, amint ez más csapadékos módszerekkel történt vizsgálatokból ismert, például kalcium esetén (HILLMAN



1—3. ábra. Patkány n. ischiadicus elektronmikroszkópos részlete és röntgen-sugár mikroanalízise. 1. ábra: rögzítetlen anyagból készült fagyasztva szárított, fagyasztott, ultravékony, festetlen metszet részlete. 5 940 $\times$. M = myelin, A = axon. A foltok az analízis helyét jelzik. 2. ábra: Az axon 200 másodperces, STEM üzemmódban végzett analízisének jellemző spektruma: a háttérrel, ill. anélkül. 3. ábra: a myelin hüvely hasonlóképpen nyert jellemző spektruma. A titán a hordozó rostély anyagából származik

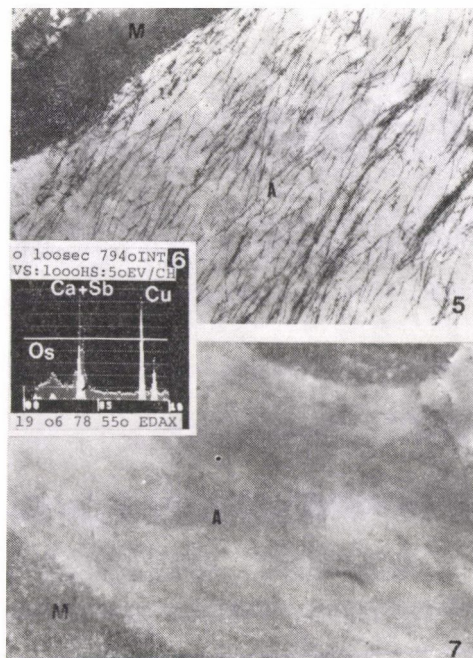
és LLINAS 1974, OSCHMAN et al. 1974, HENKART et al. 1978, DUCE és KEEN 1978).

A myelin hüvely lamellái festett készítményen látszanak csupán: rövid, 5'-es glutáraldehides fixálás után készült fagyasztott ultravékony metszet részletét mutatja a 4. ábra, amely uranyl acetáttal volt negatívan festve.

A myelin hüvely lamellái jól kivehetők. A fagyasztott ultravékony metszeteken a membrán kompartmentumok tehát nem láthatók, ezért a szekvesztráció vizsgálatára más metodikát alkalmaztunk. Csapadékos módszerrel vizsgáltuk a Ca eloszlását perifériás idegrostokban. A következő Ca-kötő helyeket lehetett megfigyelni, kálium-piroantimonátos fixálás után: axolemma, mikrotubulusok, egyes neurofilamentumok és sima felszínű endoplazmás retikulum (5. ábra). A csapadék összetételét röntgen-sugár mikroanalízissel határoztuk meg (6. ábra). Az antimon L csúcsától a kalcium K vonala nem különíthető el egyértelműen, ezért még az analízis elvégzése után is kétséges lehet a csapadék kalcium tartalma (ugyanis a kálium-piroantimonát nem szelektív csapadékos eljárás, nátriummal, magnéziummal, mangánnal, cinkkel és hisztonokkal egyaránt csapadékot alkot). Ezért 20 mM EGTA-val kezeltük a metszeteket, így a reakció specifitását kalciumra vonatkozóan kontrolláltuk (DAVIS et al. 1979); a kezelés után csapadék nem volt megfigyelhető az idegrostban



4. ábra. Patkány n. ischiadicus elektronmikroszkópos részlete. 5 perces 2,5%-os glutáraldehides fixálás után készített fagyasztott ultravékony metszet, uranyl acetáttal 1 percig felülfestve. 125 000 $\times$, M = myelin, A = axon, m = mitokondrium

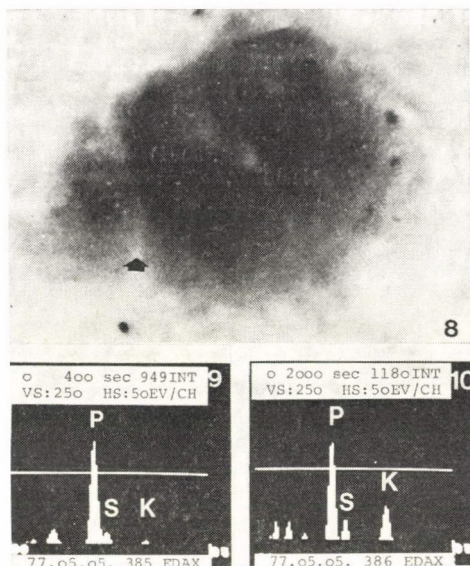


5—7. ábra. Kálium-piroantimonáttal történt fixálás után készített elektronmikroszkópos felvétel és röntgen-sugár mikroanalízissel kapott spektrum béka n. ischiadicusról. 5. ábra: Kálium-piroantimonát rögzítés után készült festett metszet részlete. 13 300 $\times$, M = myelin, A = axon. 6. ábra: a csapadék elem-összetétele, röntgen-sugár mikroanalízissel, a háttérrel, illetve anélkül. A réz csúcs a hordozó rostélyból származik. 7. ábra: Kálium-piroantimonáttal fixált, festetlen metszet részlete EGTA kezelés után. 32 000 $\times$

(7. ábra). További kísérleteket tervezünk a perifériás idegrostok kalcium kötő helyei funkcionális jelentőségének tisztázására. Eddigi eredményeinket részben ismertettük hazai, illetve nemzetközi konferenciákon (Joó és Tóth 1975, Tóth 1978).

1.2. Szinaptoszomák elemösszetételének vizsgálata

Patkány agykéregből HAJÓS (1975) módszerével preparáltunk szinaptoszomát. A szinaptoszoma frakcióból a következő módon készítettünk kene-
teket: a frakciót Eppendorf 5412 asztali centrifugával tovább üleptítettük 5 percig tartó 15 000 g alkalmazásával, majd az üledéket formvar hártás elektronmikroszkópos rostélyra terítettük polírozott nikkellal. Végül szén-dioxid után vizsgáltuk az elektronmikroszkópban. A festetlen készítményen is relatíve jól felismerhetők a szinaptoszomák (8. ábra). A funkcionális változásokat próbáltuk nyomon követni a szinaptoszomák elemösszetételének DE BELLEROCHE és BREDFORD (1972) szerinti elektromos ingerlés után történő vizsgálatával. Ingerlés hatására a foszfortartalomra vonatkoztatott szinaptoszomális kálium tartalom csökkent (9—10. ábra).



8–10. ábra. Szinaptoszómából készült elektronmikroszkópos kenet részlete, festetlen preparátum. A nyíl a szinaptikus rést jelzi. $72\,000\times$. 9. ábra: ingerelt szinaptoszóma energia spektruma. 10. ábra: Kontroll szinaptoszóma energia spektruma. Az analízis idő úgy volt megválasztva, hogy a foszfortartalom azonos legyen (400, illetve 2000 másodperc)

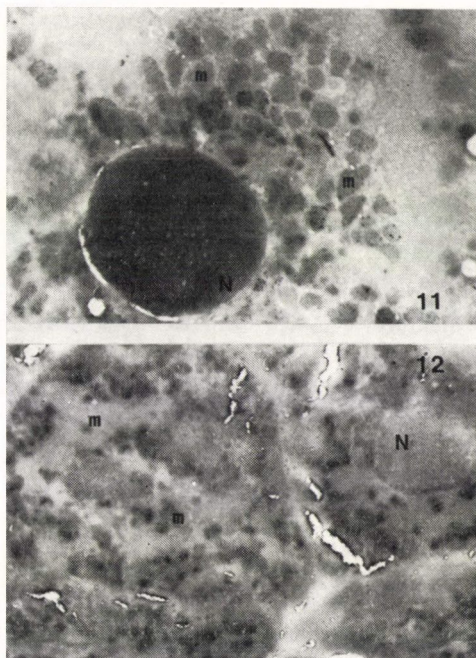
2. Májszövet elemösszetételének vizsgálata

Patkánymájából Takay módszerrel készítettünk elektronmikroszkópos keneteket. Meglepő módon minden fixálás, kontrasztosítás nélkül a májsejtek rendkívül részletűs, egyértelműen azonosítható elektronmikroszkópos képet adtak (11. ábra). Minden kétséget kizáróan felismerhetők a sejtmagok és a mitokondriumok. Az elektronmikroszkópos kenet egészen hasonló a rögzítetlen májból készült festetlen, fagyasztott ultravékony metszethez (12. ábra). A kenetek felszínének simaságát aranygőzölés után történő scanning elektronmikroszkópos vizsgálattal bizonyítottuk. Fénymikroszkópos dimenzióban 1%-os toluidinkékkel megfestett, az elektronmikroszkópos kenetkészítéssel azonos módon készült kenetek vizsgálatával győződünk meg arról, hogy ezzel a preparálással a májsejtek megőrzik integritásukat, bár a sejtek májszövetre jellemző, gerendázatszerű elhelyezkedése nem látható. A kenetek elektronmikroszkópos tanulmányozásával kitűnt, hogy a mitokondriumok 70%-a sötét, átlagosan $1000\text{ \AA}$ átmérőjű elektrondenz szemcséket tartalmaznak. A hagyományosan készült elektronmikroszkópos metszeteken is megfigyelhetők szemcsék a mitokondriális mátrixban, azonban sohasem ilyen nagy számban. A szemcsés mitokondriumok röntgen-sugár mikroanalízise azt mutatta, hogy ezek Na, Mg, P, S, K és Ca tartalmúak. A szemcsétlen mitokondriumok kalciumot nem tartalmaznak. A mitokondriális szemcsék röntgen-sugár mikroanalí-

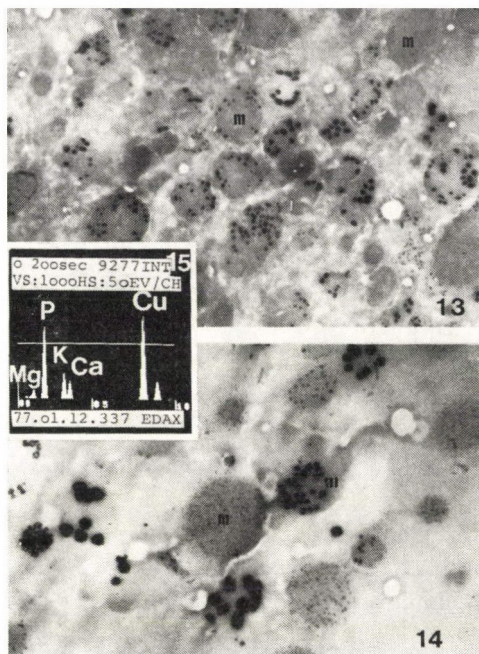
zisével két típusú szemcse különíthető el, elemösszetételük alapján: 1. P, Ca, K, Mg; 2. P, Ca, K, Mg, S.

Az individuális mitokondriumok in situ vizsgálatára más módszerrel nincs lehetőség. Ismeretes azonban, hogy az izolált mitokondriális granulumok különböző kationokat és anionokat tartalmaznak (WEINBACH és VON BRAND 1965).

Miután az elektronmikroszkópos kenetek morfológiai és röntgen-sugár mikroanalitikai értékelhetőségéről meggyőződünk, arra a kérdésre kerestük a választ, hogyan követhető nyomon egy funkcionális-morfológiai változás ezzel a feldolgozási módszerrel. Kísérleteinkben mindkét nemű, albino patkányoknak 0,25 ml/kg széntetrakloridot adtunk i. p. Akut mérgezést követően megfigyelhető az endoplazmás retikulum széttöredezése, a rER ciszternáinak vakuolizációja, degranulációja, valamint a szabad riboszomák számának növekedése (REYNOLDS 1963). Hasonló elváltozást figyeltünk meg a konvencionális elektronmikroszkópos metszeteken, 2, 4, 6 órával a mérgezés után. Ezek az elváltozások 6 órás mérgezés után voltak a legkifejezettebbek. A hagyományos preparálással párhuzamosan készített keneteken a következő jelenség volt megfigyelhető: a mitokondriumok 80%-a szemcséket tartalmazott, és a szemcsék nagysága átlagosan 2000 Å volt 2 órával a mérgezés után (13. ábra). A



11–12. ábra. Májszövet elektronmikroszkópos részletei. 11. ábra: elektronmikroszkópos kenet, festés nélküli preparátum. 9 500 ×, N = sejtmag, m = mitokondrium. 12. ábra: Rögzítetlen májszövetből készült fagyasztott ultravékony metszet, festés nélkül. 5 900 ×



13–15. ábra. Májszövetből készült elektronmikroszkópos kenetek és a röntgen-sugár mikroanalízissel kapott energia spektrum. 13. ábra: 2 órával széntetraklorid mérgezés után készült kenet. 10 000 $\times$. 14. ábra: 6 órával széntetraklorid mérgezés után készült kenet. 12 000 $\times$. 15. ábra: egy szemcse röntgen-sugár mikroanalízisével STEM üzemmódban kapott spektrum. A rézcsúcs a hordozó rostélyból származik

mérgezés 6. órájában már minden mitokondrium szemcséket tartalmazott (14. ábra). A szemcsék nagysága néhány mitokondriumban elérte a 2500–3000 Å-öt is. Egy-egy szemcse röntgen-sugár mikroanalízisével kimutatható volt, hogy igen nagy mennyiségben tartalmaznak P-t, K-ot, Ca-ot, Mg-ot (15. ábra). A szemcsék közötti mátrixban P, K, Ca, S, Mg volt detektálható. A kapott eredményeket összehasonlítva a kontroll kenetek mitokondriumainak elemösszetételével, azt találtuk, hogy a szemcsétlen mitokondriumok elemei összetételükben nem változtak a kezelés hatására. A szemcsés mitokondriumokban ezzel szemben a kezeléssel párhuzamosan megnövekedett a szemcsék elsősorban P és Ca, valamint Mg és K tartalma is. A mitokondriális mátrixban a kezelés hatására Ca és Mg jelent meg. Az összehasonlítás az azonos paraméterekkel végzett analízissel nyert impulzus értékekre vonatkozó, szemikvantitatív adat.

THIERS és munkatársai (1960) izolált mitokondriumokban lángfotometriás meghatározással szintén kimutatták a mitokondrium Ca és P tartalmának növekedését széntetraklorid adását követően.

Mivel a kenetek analízisével a funkcionális-morfológiai változások követhetőek voltak, megpróbálkoztunk biopszia során emberi májból nyert

kenetek analízisével. A röntgensugár mikroanalízis kezdetben nem volt értékelhető, mert a percutan tűbiopszia (MENGHINI) során fiziológiás sóoldatot használtak. Ha a mintavétel után a májszövetet 5%-os glükóz oldattal kimostuk, az analízis értékelhető volt. A mitokondriumok elemösszetétele, P, K, S, a citoplazmában P, S, K, Ca, Fe volt kimutatható.

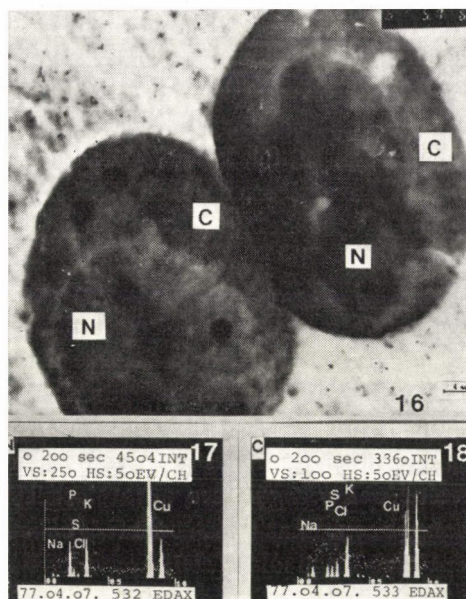
Fenti eredményeinket hazai konferencián részben ismertettük (TÓTH és mtsai 1977).

3. Granulociták röntgen-sugár mikroanalízise

Fehérvérsejtekből a szinaptoszomához, illetve a májszövethez hasonló módon elektronmikroszkópos keneteket készítettünk. A fehérvérsejtek kis része megőrzi eredeti alakját, éppúgy mint a fénymikroszkópos keneteken. Célul tűztük ki, hogy ezt az egyszerű, gyors, és könnyen reprodukálható módszert granulociták elemösszetételének vizsgálatára alkalmazzuk, krónikus granulocitás leukémiás (CGL) betegekben. Hat CGL-es férfi és nőbetegtől vénásan levett natív, illetve esetenként alvadásgátolt vérből centrifugálás után készítettünk elektronmikroszkópos keneteket. A keneteket széngőzöléssel stabilizáltuk, más előkészítési módot nem alkalmaztunk. Elektronmikroszkóposan a sejtek jól vizsgálhatók, a sejtmag és a citoplazma jól elkülöníthető (16. ábra). A különböző érési alakok a sejtmag alakjának megfelelően azonosíthatók. A 17, illetve a 18. ábra CGL-es elektronmikroszkópos kenet egyetlen granulocitájának jellemző energia spektrumát mutatja. Mind az egészséges, mind a CGL-es fehérvérsejtekben Na, P, K, Cl, S, Ca volt detektálható a sejtmagban és a citoplazmában. Összehasonlítottuk a sejtmag/citoplazma elemarányait, azonos sejten belül: kontroll, fiatal CGL-es és szegment-CGL-es fehérvérsejtekben. Az összehasonlítás alapja az azonos paraméterekkel nyert impulzus értékek. Az összehasonlítás eredményeképpen a CGL-es betegek granulocitáinak magjában a P tartalom jelentős csökkenését figyeltük meg a citoplazmához képest.

A továbbiakban a most röviden ismertetett gyors és könnyen reprodukálható módszerrel vizsgálatokat szeretnénk végezni haematológiai beteganyagban. Különösen kíváncsiak vagyunk arra, hogy a klinikumban általánosan használt citosztatikus szerek alkalmazása mennyiben változtatja meg a fehérvérsejtek elemi összetételét. Eredményeinket részben ismertettük hazai konferencián (TÓTH és mtsai 1978).

A röntgen-sugár mikroanalízis a biológiai fontos elemek intracelluláris vagy transzcelluláris transzlokációjának vizsgálatára legalkalmasabb módszer, különösen ha az adatok kiértékelése kvantitatív módon történik. A kvantitatív kiértékelés alapja a csúcs/háttér arány, azaz a mintából származó karakterisztikus röntgen-sugárzás és fékezési sugárzás aránya (HALL 1971). A pontos kvantitatív analízis végzéséhez speciális, erre a célra tervezett, vagy átalakított analitikai elektronmikroszkóp szükséges, az elektronáram pontos mé-



16–18. ábra. Krónikus granulocitás leukémiás beteg granulocitáinak elektronmikroszkópos kenete és röntgen-sugár mikroanalízise. 16. ábra: Elektronmikroszkópos kenet részlete, festetlen készítmény. A denz foltok a STEM üzemmódban végzett analízis helyei. 10 000 $\times$. 17. ábra: a sejtmag jellemző elemösszetétele. 18. ábra: a citoplazma jellemző elemösszetétele. N = sejtmag, C = citoplazma. A rézcsúcs a hordozó rostélyból származik.

résének lehetőségével. Az adatokat a számos figyelembe veendő paraméter miatt célszerű komputerrel feldolgozni. Ideális esetben 10%-os pontossággal vizsgálható az elemek kvantitatív megoszlása (SCHUMAN et al. 1976), elsősorban fagyasztott ultravékony metszeten (SOMLYÓ et al. 1979), illetve megfelelő paraméterek alkalmazásával ez a pontosság fokozható (JÁNOSSY és mtsai 1979). Elektronmikroszkópunkhoz adaptálva, a Hall módszertől eltérő alapon kidolgoztunk egy kvantitatív kiértékelési módszert, melyet a továbbiakban biológiai mintákon szeretnénk alkalmazni (KESZTHELYI és TÓTH 1979).

IRODALOM

1. APPLETON, T. C.: A cryostat approach to ultrathin "dry" frozen sections for electron microscopy: a morphological and X-ray analytical study. *J. Microscopy* **100**, 49–74 (1974).
2. BERNOLÁK, K., SZABÓ, D., SZILAS, L.: Analitikai elektronmikroszkópia, A mikroszkóp zsebkönyv. 550–553. Műszaki Könyvkiadó (1979).
3. BOLDÓCZKI, M., PÁRDUZ, Á., JOÓ, F.: Appraisal of the potassium ferricyanide method for the demonstration of glycogen granules by electron microscopy. *Micron* **8**, 201–206 (1977).
4. CHANDLER, J. A.: The application of X-ray microanalysis in TEM to the study of ultra thin biological specimen — a review. In: *Electron Probe Microanalysis in Biology* Ed: Erasmus, D. A. London, Chapman and Hall (1978).

5. CHRISTENSEN, A. K.: Frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy, with a description of pancreas and liver. *J. Cell. Biol.* **51**, 772—804 (1971).
6. CLARKE, J. A., SALSURY, A. J., WILLOUGHBY, D. A.: Application of electron probe microanalysis and electron microscopy to the transfer of antigenic material. *Nature* **277**, 69—71 (1970).
7. COSTA, J. L., TANAKA, Y., PETTIGREW, K., CUSHING, R. J.: Evaluation of the utility of air-dried whole mounts for quantitative electron microprobe studies of platelet dense bodies. *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 1079—1086 (1977).
8. DAVIS, W. L., JONES, R. G., HAGLER, H. K.: Calcium containing lysosomes in the normal chick duodenum: A histochemical and analytical electron microscopic study. *Tissue and Cell* **11**, 127—138 (1979).
9. DE BELLEROCHE, J. J., BRADFORD, H. F.: Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. *J. Neurochem.* **19**, 585—602 (1972).
10. DUCE, I. R., KEEN, P.: Can neuronal smooth endoplasmic reticulum function as a calcium reservoir? *Neuroscience* **3**, 837—848 (1978).
11. DUX, E., TÓTH, I., DUX, L., JOÓ, F., KISZELY, GY.: The possible cellular mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetate-induced myopathy. *FEBS Letters* **82**, 219—222 (1977).
12. DUX, E., TÓTH, I., DUX, L., JOÓ, F.: The localization of calcium by X-ray microanalysis in myopathic muscle fibers. *Histochemistry* **56**, 239—244 (1978).
13. ERASMUS, D. A.: *Electron Probe Microanalysis in Biology* London, Chapman and Hall (1978).
14. HAJÓS, F.: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* **93**, 485—489 (1975).
15. HALÁSZ, N., PÁRDUZ, A., KARNYUSHINA, I., TÓTH, I., JOÓ, F.: The zinc iodide-osmium (ZIO) reaction in the central nervous system: localization and relations to functional activity. *Z. mikrosk.-anat. Forsch. Leipzig* **93**, 404—416 (1979).
16. HALL, T. A.: *Physical Techniques in Biological Research*. I. A. 2nd ed. G. Oster ed. Academic Press New York. Chap. 3. (1971).
17. HENKART, M. P., REESE, T. S., BRINLEY, F. J. Jr.: Endoplasmic reticulum sequesters calcium in the squid giant axon. *Science* **202**, 1300—1303 (1978).
18. HILMAN, D. E., LLINAS, R.: Calcium containing electron-dense structure in the axons of the squid giant synapse. *J. Cell. Biol.* **61**, 146—155 (1974).
19. HODSON, S., WILLIAMS, L.: Ultramicrotomy shows the cristae of mitochondria. *Experientia* **30**, 834 (1974).
20. HUI, S. W., COSTA, J. L.: Topography and thickness of air-dried human platelets measured by correlative transmission and scanning electron microscopy. *J. Microscopy* **115**, 203—206 (1979).
21. JÁNOSSY, A. G. S., KOVÁCS, K., TÓTH, I.: Parameters for the ratio methods by X-ray microanalysis. *Anal. Chem.* **51**, 491—495 (1979).
22. JOÓ, F., ERDÉLYI, L., HALÁSZ, N.: Binding of barium to neurosecretory granules in the snail brain: a possible molecular mechanism of neurohormone release. *Neuroscience Letters* **6**, 187—191 (1977).
23. JOÓ, F., KARNYUSHINA, I.: Az agyi kapillárisok pinocitozísának és makromolekuláris transzportjának cAMP-mediált szabályozása. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 300—309 (1978).
24. JOÓ, F., TÓTH, I.: X-ray microanalysis of peripheral nerve of rat. Balaton Conference on Electron Microscopy Proceedings BT 3—4. (1975).
25. KESZTHELYI, L., TÓTH, I.: Mikroelemek koncentrációjának meghatározása vékony biológiai metszeteken. XI. Magyar Elektronmikroszkópos és Mikroanalízis Konferencia Kiadványa 203—206 (1979).
26. LÄUCHLI, A.: Precipitation technique for diffusible substances. *Microscopie Biol. Cell.* **22**, 239—246 (1975).
27. OSCHMAN, J. L., HALL, T. A., PETERS, P. D., WALL, B. J.: Association of calcium with membranes of squid giant axons. Ultrastructure and microprobe analysis. *J. Cell. Biol.* **61**, 156—165 (1974).
28. PÁRDUZ, Á., JOÓ, F.: Visualization of stimulated nerve endings by preferential calcium accumulation of mitochondria. *J. Cell. Biol.* **69**, 513—517 (1976).
29. REYNOLDS, M. D.: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alteration of the cell following with carbon tetrachloride. *J. Cell. Biol.* **19**, 139—157 (1963).
30. SHUMAN, H., SOMLYO, A. P.: Electron probe X-ray analysis of single ferritin molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**, 1193—1195 (1976).
31. SHUMAN, H., SOMLYO, A. V., SOMLYO, A. P.: Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**, 317—339 (1976).

32. SILBERGELD, E. K., COSTA, J. L.: Synaptosomal Ca metabolism studied by electron microprobe analysis. *Exp. Neurol.* **63**, 277—292 (1979).
33. SOMLYO, A. P., SOMLYO, A. V., SHUMAN, H.: Electron probe analysis of vascular smooth muscle. Composition of Mitochondria, nuclei and cytoplasm. *J. Cell. Biol.* **81**, 316—335 (1979).
34. SPURR, A. R.: Freeze substitution additives for sodium and calcium retention in cells studied by X-ray analytical electron microscopy. *Botanical Gazette* **133**, 263—270 (1972).
35. TAKAYA, K.: Energy dispersive X-ray microanalysis of zymogen granules of mouse pancreas using fresh air dried tissue spread. *Arch. histol. jap.* **37**, 387—393 (1975).
36. THIERS, R. E., REYNOLDS, E. S., VALLAE, B. L.: The effect of carbon tetrachloride poisoning on subcellular metal distribution in rat liver. *J. Biol. Chem.* **235**, 2130—2133 (1960).
37. TÓTH, I., JOÓ, F., TÓTH, T.: Elektronmikroszkópos kenetek röntgensugár mikroanalízise. X. Magyar Elektronmikroszkópos Konferencia Kiadványa 21. o. (1977).
38. TÓTH, I.: Comparative evaluation of different techniques used to detect the elemental composition of nervous structures by X-ray microanalysis. *Royal Microscopical Society Proceedings* **13**, 33 (1978).
39. TÓTH, T., TÓTH, I., MAURER, M., KRIZSA, L.: X-ray microanalysis of leukaemic and healthy granulocytes. Symposium on X-ray microanalysis, Szeged 12. o. (1978).
40. WEINBACH, E. C., VON BRAND, T.: The isolation and composition of dense granules from Ca-loaded mitochondria. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* **19**, 133 (1965).