

AZ AUTORADIOGRÁFIA MÓDSZEREI*

HÁMORI JÓZSEF

(Pécsi Orvostudományi Egyetem Anatómiai Intézete)

I. A biológiai organizmusok egyes életjelenségeinek vizsgálatára az utóbbi időben igen elterjedten használják a mesterséges radioaktív izotópokat. Főként biokémiai és fiziologiai módszerekkel összekapcsolva, az izotópok sugárzásának a mérésével eléggé pontosan és rendszerint kvantitativ is meghatározható a bevitt izotóp sorsa a szervezetben, illetőleg az, hogy az izotópot milyen szervek, esetleg — a frakcionálási technika alkalmazásával — milyen sejtalkotórészek építik be elsősorban. Az izotópok alkalmazása a biokémiában többek között nagy lépéssel vitte előre az intermedier anyagcsere kutatását. Ugyanakkor az izotópok citológiai, illetőleg hisztológiai lokalizációja fenti módszerekkel nem határozható meg. Ennek meghatározására az autoradiográfia (vagy egyszerűen csak „autográfia”) szolgál, amely nem más, mint a szövettani technikának bizonyos fototechnikával való kombinálása. E módszer nem sokkal a biokémiai és fiziológiai izotópkutató módszerek megjelenése után fejlődött ki, lényegében tehát ez is igen rövid — 20—25 éves — múltú tekinthet vissza. — Az érdemi részre áttérve, elsősorban a módszer elméleti vonatkozásaival kell foglalkoznunk. Az elméletnek a módszer gyakorlatával, alkalmazhatósági területeivel szorosabban összefüggő részeit fogjuk tárgyalni röviden, s inkább a módszer gyakorlatával szeretnénk kissé részletesebben foglalkozni. Akit a módszer elméleti alapjainak a jelen előadásban nem tárgyalt részletei is érdekelnek, az BOYD [5] könyvében, illetőleg FITZGERALD [9] monográfiájában erről bőséges tájékoztatást nyerhet.

A radioaktív sugárzásoknak három főfajtája ismeretes: α , β és a röntgen sugárzáshoz igen hasonló és a három közül egyben a legkeményebb γ sugárzás. Az α sugárzás Helium atommagokból, a β elektronokból áll, a γ tömeg és töltés nélküli elektromágneses sugárzás. Az α sugárzásban a Helium atommagok 10 000, de maximum 30 000 km/sec sebességgel haladnak, míg a β sugárzásban repülő elektronok sebessége meglehetősen változó, s megközelítheti a fény sebességét is. Az autografiás kép tulajdonképpen az izotópot tartalmazó metszet feletti fotoemulzióban levő fémezüst kiválasztásával, ill. előhívásával

* Az 1959-es nyári tihanyi tanfolyamon elhangzott előadás

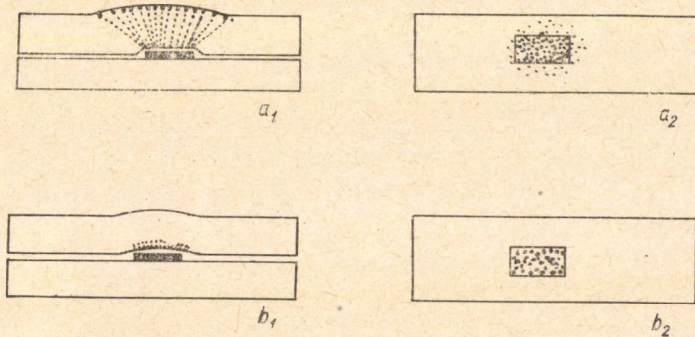
jön létre. Ezen folyamat első lépése viszont a fotoemulzióban levő reaktív anyag ionizációja, amelyet a metszetben vagy kenetben levő izotóp radioaktív sugárzása hoz létre. A reaktív anyag ionizációja független a sugárzásban repülő részecskék tömegétől, s csupán a részecske töltésétől és mozgási sebességétől függ. Egy adott úthosszon létrejött ionizáció egyenesen arányos a töltés négyzetével, s fordítva a sebesség négyzetével. Nyilvánvaló, hogy az α sugárzás, mely kettősen pozitív töltésű Helium atommagokból áll és rendszerint viszonylag kis sebességű, ugyanazon úthosszon nagyobb méretű ionizációra képes, mint az egy töltéssel rendelkező és rendszerint jóval nagyobb sebességű β sugárzás. A γ sugárzásnak tömege, tehát töltése nincs, csupán igen nagy energiája. Így legfeljebb másodlagosan, pl. fémből gerjesztett elektronok révén hasznosítható az autográfiában. — Míg az izotópok sugárzásának — pl. G. M. csővel történő — mérésénél a leginkább azon α vagy β sugárzás mérhető, amely nagyenergiájú*, az autográfiánál éppen fordítva, minél kisebb az α , vagy β sugárzás energiája, ill. sebessége, annál jobban hasznosítható — az izotóp pontos lokalizációjának megállapítására — az illető nyomjelző elem. Az autográfiánál ugyanis az izotopot tartalmazó metszetre közvetlenül, vagy esetleg 1—2 μ vastag védőréteg közbeiktatásával kerül rá a reaktív fotoemulzió. Miután ezen emulzió általában — a pontosabb lokalizáció elérése érdekében — igen vékony, 5, maximum 100 μ , természetesen csak a kis sebességű, α és β sugárzás tud reagálni a fotoemulzióban levő ezüsttel. Minél kisebb egy α , vagy β sugárzás mozgási sebessége, annál rövidebb útra képes a sugárzás, tehát, amint ez az 1. ábrán látható, annál pontosabb lesz az izotóp hisztológiai lokalizációja. — Az α sugárzást nehezebb felhasználni az autográfiában mint a β -t. Ugyanis relatíve kis sebessége, valamint kettősen pozitív töltésű He részecskéi folytán igen sok ezüstszemcsével reagálhat, ami a pontosabb lokalizációt lehetetlenné teszi (2. ábra), így az α sugárzás az emulzióban nem pontoszerű (mint a β), hanem vonalas reakcióképet idéz elő.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy autográfiához elsősorban azon radioaktív izotópok alkalmasak, melyek olyan β sugárzást bocsájtanak ki, melynek energiája, ill. sebessége nem túlságosan nagy; másodsorban használhatunk α sugárzó izotópot is, bár ez esetben pontosabb lokalizációt nem várhatunk, míg a γ sugárzás legfeljebb csak indirekt úton használható fel autográfiára.

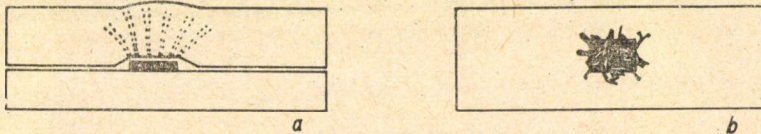
II. A következőkben az autográfia néhány hisztológiai, ill. hisztotechnikai vonatkozását kell megtárgyalnunk. Milyen preparátumokat lehet autográfiával vizsgálni? Miután az autográfia elsőrendű célja a bevitt izotóp minél pontosabb hisztológiai, citológiai lokalizációjának kimutatása, nyilvánvaló, hogy a preparátumoknak lehetőleg minél vékonyabbaknak kell lenniük. Ugyanekkor ezen vékony preparátumoknak — legyen az kenet, vagy metszet — megfelelő mennyiségű izotópot kell tartalmazniuk. Az autográfiához szükséges legala-

* Ma már forgalomban vannak olyan speciális szcintillációs mérőműszerek, melyekkel az igen kis energiájú (0,017 Mev), sugárzó H_3 -t is nagy pontossággal lehet mérni.

csenyebb izotóp koncentrációt elemenként, általában 10μ vastag metszetre számítva, az egyes, használatban levő autográfiai filmeknél, emulzióknál külön-külön ki kell kalibrálni. Csak egy példát: röntgen film és 10μ vastag metszet használata esetében, 15 nap expozíció után STEINBERG és SOLOMON [21] vizsgálatai szerint C^{14} -ből és Ca^{45} -ből $0,05 \mu$ C/gr., J^{131} -ből $0,2 \mu$ C/gr., P^{32} -ből



1. ábra. β -autográfia sémája 2 különböző energiájú β sugárzó izotópnál (a_1 és a_2 : P^{32} , Emax 17, Mev; b_1 és b_2 : H^3 , Emax 0,017 Mev.) a_1) Oldalnézet; a tárgylemez felett látható a P^{32} -t tartalmazó metszet, ezen vékony celloidin réteg, végül az emulzió. A P^{32} β sugárzása a legtöbb szemcsét az emulzió felsőbb rétegében indukálja. a_2) Az a_1 preparátum felülnézetben. A szemcsék itt is a reakciót jelzik; sok szemcsét találhatunk a metszeten kívül is, ezért a lokalizáció pontatlan. b_1) L^3 autográfia, oldalnézet. Celloidin film nincs a metszet és az emulzió között. A H^3 β sugárzása az emulzió alsó rétegében fog fotoreakciót előidézni. b_2) A b_1 preparátum felülnézetben, a lokalizáció pontos



2. ábra. β autográfia sémája. a) Oldalnézet. Egy α részecske az emulzióban sok szemcsét indukál, a szemcsék kettős sorba rendeződve az ábrán) igen sűrűn helyezkednek el egymás után. b) Felülnézet. A reakció ennek megfelelően nem pontszerű, hanem vonalkás. Egy-egy vonalka egy α sugár útját jelzi

$0,4 \mu$ C/gr., Zn^{65} -ből $2,0 \mu$ C/gr. élő szövet már jó autográfiai képet szolgáltat. Itt említhetnénk meg azt is, hogy az autográfiai módszerrel megfelelően érzékeny „nuclear-track” (NTA) film használata esetében már 50 P^{32} , vagy S^{35} atomot ki lehet mutatni. Ez annyit jelent, hogy autográfiával 10^4 kvantum a mérendő atomból már elégséges kvantitatív mérésre ugyanakkor, amikor az analitikai mikrokémiai technikánál legalább 10^{16} , spektrálanalízisnél pedig 10^{15} atom szükséges az illető elem kimutathatóságához. Ez az adat természetesen hordozómentes izotópokra vonatkozik, és vékony, $5-10 \mu$ vastag metszetre.

Az autográfiás vizsgálatokhoz a metszetet készíthetjük fixálás nélkül, fagyasztva lemetszve, ilyenkor azonban igen gyakori a metszet fölé kerülő emulzióban a pszeudo-reakció*. Rendszerint formalin, vagy azzal egyenértékű, sőt esetleg még jobb CARNOY, BOUIN, formol-alkohol, aceton fixálást használunk természetesen attól függően, hogy a szövetben levő izotóp vízben oldódó vagy oldhatatlan-e. Ezen fixálószer használata után a pszeudo-reakció veszélye csökken. A beágyazószer ugyancsak az izotóp oldódási viszonyainak megfelelően kell kiválasztani. Mi pajzsmiriggyel kapcsolatos J^{131} (HÁMORI, MESS, SZÉKELY [11]), valamint csonttal kapcsolatos P^{32} vizsgálatainkban jobbnak találtuk a polywax beágyazást, mint a paraffint. Ez a beágyazás amellet, hogy rövid idő alatt kivitelezhető, csak igen kis mértékben oldja ki a paraffin beágyazással egyébként kioldódó szerves J^{131} -et. Ugyanakkor S^{35} -tel jelzett metionin agyszöveti lokalizációjával kapcsolatos vizsgálatainkban a gyorsított paraffin beágyazást találtuk a legalkalmasabbnak. Nyilvánvaló, hogy a beágyazószer mindig esetenként, a kísérleti körülményeknek és a kérdéses izotóp-vegyület oldódási viszonyainak figyelembevételével kell megválasztanunk. — Külön problémát jelenthet a nehezen metszhető, pl. csontszövet előkészítése autográfiához, bár ma már számos módszert ismerünk (ARNOLD [1], ROOFE, HOECHER és VOORHEES [18]), ami megkönnyíti a nem dekalcinált csont metszését is. Ha azonban figyelembe vesszük azt, hogy a Ca^{45} beszerzés általában jóval körülményesebb, mint a helyette — néhány speciális esettől eltekintve — használható, s ugyanazon lokalizációt mutató P^{32} , akkor kitűnik, hogy még csontszövetre vonatkozó vizsgálatoknál is előnyösebb a P^{32} használata. P^{32} -t tartalmazó csontnál ugyanis a dekalcinálást elvégezve, beágyazva vagy fagyasztva már könnyebb a csontszövetet is metszeni. Előfelvétel csupán a dekalcinálás előtt a P^{32} oldhatatlan sóként való kicsapása a szövetben, amit 10%-os formalinban oldott 1—2%-os ólomacetátot tartalmazó fixálószerrel érhetünk el (SIFPERT [19]). Az eközben képződött ólomfoszfát vízben és alkoholban egyaránt oldhatatlan és most már a dekalcinálás a rutin szerint — pl. 30%-os hangyasavval — elvégezhető.

A fagyasztott, vagy beágyazott metszeteket nem tojásozott tárgylemezre visszük, s a beágyazószer kioldjuk — bár ez nem feltétlenül szükséges —, sőt ha esetleges izotópkkioldástól tartunk, a beágyazószer kioldását el is kell hagynunk. Ezzel a metszeteket előkészítettük a következő lépéshez, a fotóemulzióval vagy filmmel való lefedéshez és az expozícióhoz. Ha pszeudoreakció veszélye áll fenn, akkor még a fotoemulzióval való lefedés előtt a metszeteket híg — 1%-os — celloidinnal is le kell fednünk, hogy így megakadályozzuk a direkt kontaktust a metszet és az emulzió között. (Kivéve a H^3 izotópot, melynek igen gyenge — 0,017 Mev — energiájú sugárzását már ez a vékony celloidin film is erősen megszuiri. Így H^3 használatánál a celloidinezéstől el kell tekintenünk.)

* A pszeudoreakciót általában a metszetben levő redukálógyökök (pl. SH^- gyök) idézik elő, melyek fotoreakciót indukálnak az emulzióban.

III. A fotoreakciót tekintve a radioautográfiánál három alapvető módszer használatos: 1. kontakt, vagy appozíciós autográfia, 2. „ráhelyezéssel” (mounting) módszer és 3. a „bevonó” (coating) módszer. — A kontakt módszerrel a tárgylemezen levő metszetre megfelelő filmet visznek, rászorítják úgy, hogy a metszet egyenletesen érintkezzék az exponálandó anyaggal, majd az appozíció végén a filmet előhívják, fixálják. A filmet a metszettől külön, vagy a metszetre, eredeti helyzetébe visszaerősítve lehet vizsgálni. Ez a módszer természetesen pontos citológiai lokalizációt nem tesz lehetővé. Ugyanakkor teljes szervből készült metszetenél igen szép „szervautográfiás” képet adhat. — Ugyancsak hasonló elven alapszik a „ráhelyezéssel” (mounting) módszer is, amelyet először ENDICOTT és YAGODA [8] írtak le. Ennél a metszetenem tárgylemezre, hanem direkt a fotoemulzióra viszik fel. Bár ennél a citológiai lokalizáció jó, a pszeudoreakció veszélye nagy, ezért az előző módszerrel együtt általában kevésbé kedvelt, mint a „bevonó” (coating) autográfia. A „bevonó” autográfiás módszer 3 különböző módozatát igen elterjedten használják. Az egyik a BELANGER és LEBLOND [3, 4] nyomán kifejlődött folyékony emulzióval történő tulajdonképpen „bevonó” (coating) módszer, a második BELANGER [2] inverziós technikája, míg a harmadik a DONIACH és PELC [6, 15, 16] nyomán elterjedt „lehúzó” (stripping)-film metódika. A folyékony emulziós „bevonás”-nál úgy járunk el, hogy a tárgylemezen levő kiszáritott metszetenem — melyet, mint említettük az esetleges pszeudo-reakció kikapcsolására 1%-os celloidinnel is lefedhetünk — a sötétkamrában megfelelő hőmérsékletre felmelegített emulzióba mártjuk, vagy a metszetenem kis pipetta segítségével számított mennyiségű emulzióval lecseppentjük. A tárgylemezeket 30—45°-os dőlésszögű állványra helyezzük, ami az emulzió egyenletes eloszlását segíti elő a metszetenem. Az emulzió 20—25 perc alatt megmerevedik, s ez után exponálható. Az emulzió vastagsága — konstans hőmérsékletű emulzióval történt lefedésnél — valamennyi metszetenem megközelítőleg azonos. Nekünk KOLOUSEK, FISCHER és LODIN [12] „bevonó” módszerével vannak tapasztalataink. Egyik előnye ezen módszernek az, hogy az emulzió házilag előállítható, az alapanyagok olcsók. A citológiai lokalizáció jó, tekintve, hogy az emulzió finomszemcsés. — Az inverziós technikánál ugyancsak folyékony emulziót használunk. A nem festett metszetenem celloidinezés után fedjük le az emulzióval, exponálás, előhívás és fixálás után a preparátumot víz alatt (metszet + celloidin + előhívott film) levesszük a tárgylemezről, s a megfordított preparátumot ismét felvisszük egy tiszta tárgylemezre. Ekkor tehát a tárgylemezen közvetlenül a film fekszik, e felett a celloidin-réteg és legfelül a metszet. Ezután festjük a metszetenem, a filmet a celloidin-réteg védi a festődéstől. Ez a technika főleg csont- és fogautográfiánál ad kitűnő eredményt.

A leginkább használt és kvantitatív autográfiára is legalkalmasabb „lehúzó” (stripping)-film módszernél úgy járunk el, hogy a speciális autográfiás stripping-filmből sötétkamrában megfelelő nagyságú darabot kivágunk,

majd 20C^0 -ú vízbe helyezzük, ahol a filmdarabka cca. 3 perc alatt kiterül. Ezután a tárgylemezen levő metszetre vízből felhúzzuk a kiterült zselatinás emulziót úgy, hogy a metszettel, ill. a celloidin réteggel a film emulziós rétege érintkezzen. A preparátum kiszáradása után exponálható. A stripping-filmekkel kapcsolatban meg kell említenünk, hogy hasonlóképpen a normál filmekhez és az egyéb, pl. „ráhelyezéssel” módszernél használatos autográfiás filmekhez, itt is használunk durva szemcsés, érzékeny, tehát citológiai lokalizációra kevésbé alkalmas filmeket, s ugyancsak használatos a finom szemcsés, de kevésbé érzékeny film is. Az előbbinél pár órá, vagy 1—2 napos expozíció után már tudunk némi autohisztoradiográfiás tájékoztatást nyerni, míg az utóbbinál hosszabb az expozíciós idő, de finomabb a lokalizáció. A stripping-film egyik különös előnye a folyékony emulziós („bevonó”) módszerekkel szemben az, hogy az emulzió vastagsága egyforma, így jobban felhasználható kvantitatív célokra.

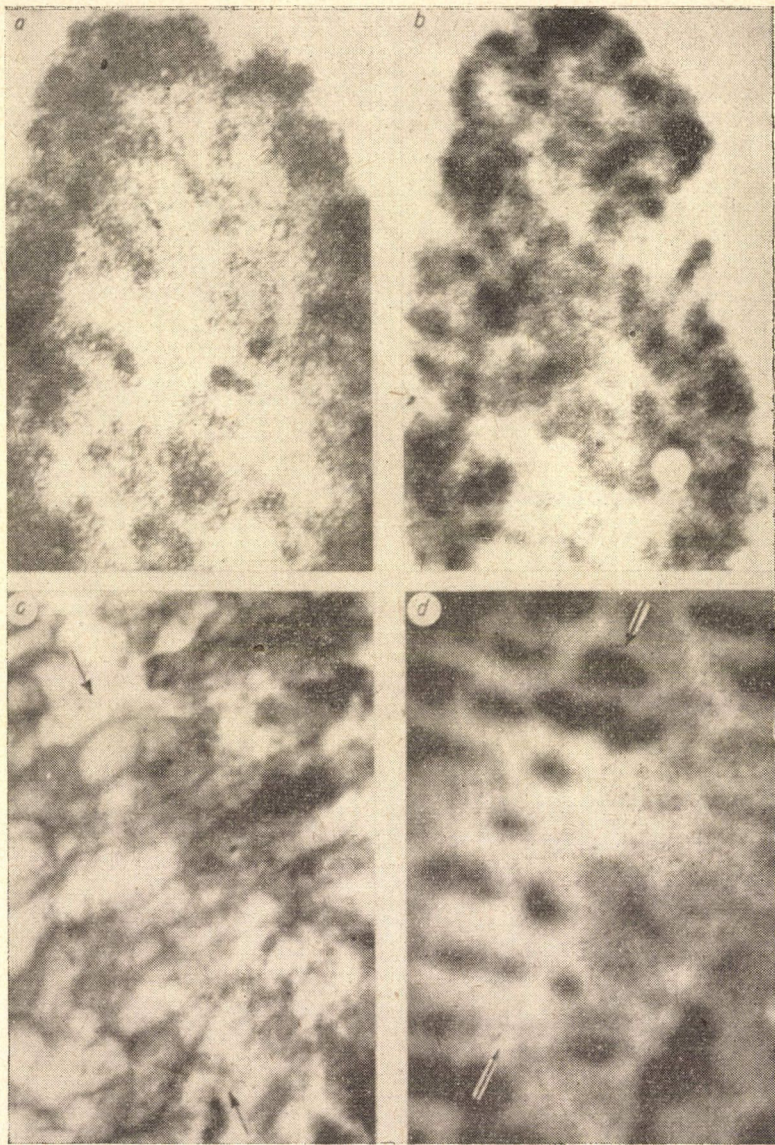
A metszetek lefedése után az expozíciót $5\text{—}10\text{C}^0$ körüli hőmérsékleten, páramentesítés végett CaCl_2 -os exsiccatorban végezzük. A metszeteket célszerű kis tárgylemeztartó dobozban raktározni az expozíció időtartamára, természetesen gondot fordítva arra, hogy fény ne érje őket. Az expozíciós idők az alkalmazott izotóptól, emulziótól, a metszetben levő izotóp koncentrációjától függenek. Az expozíciós időt ezeknek megfelelően ki kell kalibrálni, mielőtt egy nagyobb kísérletsorozatot kezdenénk el. Ezt egyszerűen több, ugyanazon szervből, szövetből készült, a kérdéses izotópot tartalmazó metszetnek 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 50 napos expozíció utáni előhívásával határozhatjuk meg. Általában a 8 napos felezési idejű J^{131} -nél 2—14 nap, a 14 napos P^{32} -nél 6—20 nap, a 87 napos S^{35} -nél 20—40 nap expozíciós időket használunk, finom szemcsés filmeknél. C_{14} esetében az expozíciós idő elérheti a 90 napot is. Az expozíciót követő hívás (a hívószert filmenként és emulzióként természetesen más és más), majd fixálás után alapos, 30 perces csapvizes mosás és esetleges, de lehetőleg elkerülendő víztelenítés, majd lefedés következik. Kanadabalzsam lefedőanyagként nem ajánlható, tanácsos az autográfiás készítményt inkább glicerin-zselatinával, vagy valamilyen alkalmas műanyaggal lefedni. Mi erre a célra a Magyarországon a Kőbányai Műanyaggyárban gyártott Arbocoll „H”, ill. Microcoll „B” (VÁGÁS [23]) karbamid műgyantát használjuk jó eredménnyel. A kész autográfiás preparátumokat normál mikroszkóp alatt vizsgálhatjuk, bár meg kell jegyezni, hogy különösen festetlen készítmények esetében, a fázis-kontraszt mikroszkóp előnyösebb. Egyébként a metszeteket főleg expozíció előtt, de esetenként a fotográfiai procedura után is, meg lehet festeni. Ez bizonyos esetben jobb tájékozódást biztosít, bár nem mindenkor szükséges.

IV. A továbbiakban az autográfiás módszereknél használható izotopokról, ill. azok alkalmazási területéről kell néhány szót szólni. Általában azon izotópok használhatók a módszernél, melyeknek nem túlságosan rövid a

felezési idejük, melyek mint azt már az előzőekben láttuk, β sugárzók és mellett nem túl nagy energiájú β sugárzást bocsájtanak ki magukból. Így igen közönségesen használt izotópok a 8 napos felezési idejű J^{131} , a 2,6 napos Au^{198} , P^{32} (14 nap), S^{35} (87 nap), Ca^{45} (152 nap), H^3 (12 év), és C^{14} (5500 év). Ritkábban használt izotópok a Fe^{59} (46 nap), As^{74} (17 nap), Zn^{65} (250 nap), Ag^{110} (270 nap), Sr^{89} (54 nap) és még mások.

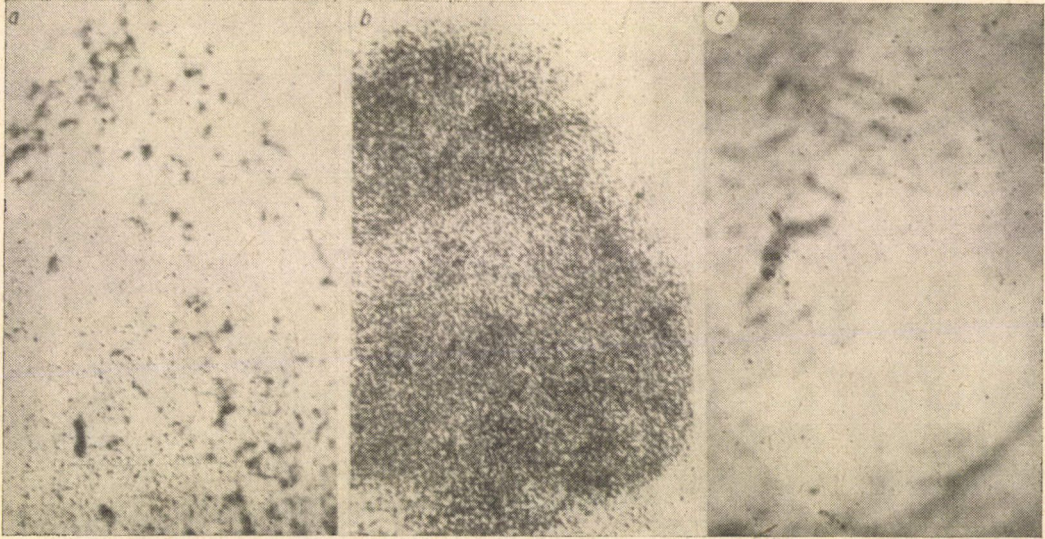
A J^{131} izotópot, tekintve, hogy ezt a pajzsmirigy hormonjába beépíti, majdnem szelektíve a pajzsmirigy veszi fel. Így igen jól alkalmazható a pajzsmirigy egyes funkcióinak vizsgálatára. Autoradiográfiával elég pontosan lehet mind a mirigyhámsejtekbe (3/a ábra), mind a kolloidba (3/b ábra) épült J^{131} -t lokalizálni, ami alapot nyújt a biokémiai és fiziológiai izotópmódszerek alapján nyert eredmények morfológiai értelmezésére. Intézetünkben az embrionális hormonműködések megindulásának vizsgálatával kapcsolatosan a csirkeembrió pajzsmirigy működésének megindulását határoztuk meg J^{131} autográfia segítségével (HÁMORI, MESS, SZÉKELY [11]). Az irodalomban talált, egymásnak meglehetősen ellentmondó adatokkal szemben a fejlődés korai szakaszában dekapitált, tehát hipofizektomizált „kontrolok” való összehasonlítás alapján sikerült egyértelműen megállapítanunk, hogy a csirkeembrió pajzsmirigye pontosan definiálható fejlődési stádiumban, 37+ stádiumban, cca. 10–11 napos fejlődés után kezd nagyobb mennyiségben J^{131} -t tárolni. Jólal kisebb fokú J^{131} tárolás, úgynevezett spontán aktivitás már 8–9 napos, 35. stádiumú embriók pajzsmirigyében is található, de a J^{131} csak 37. stádium után kezd follikulárisan az ekkor megjelenő kolloidnak megfelelően lokalizálódni (4/a, b, c ábrák). — Az itt röviden vázolt kísérleti megfigyeléseket figyelembe véve, valamint abból az adatból kiindulva, hogy a csirkeembrió pajzsmirigye már 6 napos inkubáció után reagál a kívülről bevitt tireotrof hormonra (TIXIER — VIDAL [22]), (ebben az időszakban az embrió hipofízise még nem termel TSH-t) a 6–8 napos csirkeembriók J^{131} raktározását tesztként lehet nézetünk szerint felhasználni kívülről bevitt TSH mennyiségi titrálására. Tekintettel a korai embrionális pajzsmirigy már előzőekben is tapasztalt nagyfokú érzékenységre, várható volt, hogy az egyébként nem J^{131} raktározó 6–8 napos csirkeembrió pajzsmirigy már igen kis mennyiségű TSH-ra reagálni fog. Valóban, erre vonatkozó kísérleteink (MESS, HÁMORI [13]) arra utalnak, hogy már 1/2000 IE TSH-t ki tudunk mutatni ezen módszer segítségével.

A J^{131} másik alkalmazási területe egyes antigén-antitest reakciók pontos szövettani kimutatásánál található. Mindazon fehérjék ugyanis, amelyek egy speciális ciklusos aminosavat, tiroxint is tartalmaznak polipeptidjeikben, specifikusan megkötik a jódot. Az ily módon jódizotoppal jelölt fehérje-természetű antigént ott fogjuk az autográfiás metszetben megtalálni, ahol az a megfelelő antitesttel reakcióba lépett. Így pl. egér anti-vese antigént főleg a vese glomerulusokban találhatjuk meg (PRESSMAN, EISEN, FITZGERALD [7]). J^{131} -gyel jelölt hormonok vizsgálata során kiderült, hogy jelölt tiroxin a beadás után 4



3. ábra. Pajzsmirigy J^{131} és csont P^{32} autográfia. a) 2 napos csirke pajzsmirigyének J^{131} raktározása, $10 \mu C$ J^{131} beadása után 10 perccel leölt állatból. Tipikus hámreakció. b) Ugyanaz, 1 órával a J^{131} beadása után leölt állatból. Kolloid reakció. c) 5 napos újszülött patkány tibia epifizisfugájának P^{32} raktározása. Az állat a leölés előtt 24 órával $2 \mu C$ /testsúly gr. P^{32} -t kapott. A nyílak közé eső vonaltól balra porc, jobbra az epifizisfuga. Csak az epifizisfuga felett látható igen mérsékelt aktivitásra utaló néhány szemcse. d) Ugyanaz, de előzőleg 2 napon keresztül összesen 100γ STH-val kezelve. A kép bal oldalán levő porc felett igen gyenge, a jobboldali epifizisfuga felett erős aktivitás látható

órával leölt állatban elsősorban a neurohipofízisben és a tuber cinereumban lokalizálódik. J^{131} -el jelölt ACTH a mellékvesékben és a pajzsmirigyekben mutatható ki autográfiával (SONENBERG, KESTON, MONEY [20]); jelölt prolaktint sem aktív, sem a nyugvó tejmirigyekben nem sikerült kimutatni, a hormon az ováriumban, elsősorban a corpus luteumokban volt lokalizálható.



4. ábra. Különböző korú normális és dekapitált csirkeembryók pajzsmirigyeinek J^{131} raktározása. Az embryók a leölés előtt 24 órával $6 \mu C J^{131}$ -t kaptak. a) 36. stádiumú (cca. 10 napos) normális csirke-embryo pajzsmirigyének J^{131} raktározása. Mérsékelt aktivitás. b) 37+. stádiumú (cca. 11 nap) normális embryo. Erős aktivitás. c.) 40. stádiumú (cca. 16 nap) dekapitált embryo. Gyenge aktivitás

A C^{14} és főként H^3 izotópot igen sok biológiailag aktív vegyület, anyagcseretermék és anyagcsere-folyamat jelzésére használhatjuk fel. A C^{14} izotóp-nak igen sok oldalú felhasználási területéről csak egy kiragadott példát szeretnék említeni: C^{14} -autográfia segítségével megállapították, hogy az előzőleg C^{14} -gyel jelzett algákkal való táplálás esetén a papucsállatkában az így bekerült izotóp először csak az emésztő vakuolákban található meg, később pedig az egész sejtben egyformán oszlik el (FITZGERALD [9]). Ugyancsak találhatók adatok arra nézve is, hogy papucsállatkák a tenyészoldatból C^{14} -gyel jelzett glicint, hangyasavat, acetátot, nukleinsav-prekurzert adszorbeálnak. A H^3 izotópot, tekintve, hogy a C^{14} -hez hasonlóan csupán β sugárzó s amellet igen gyenge energiájú (0,017 Mev), különösen jól fel lehet használni pontosabb citológiai (intracelluláris) folyamatok, ill. részecskék vizsgálatára. H^3 -al jelölt timidin és adenin bázisok röviddel a szervezetbe történt bevitel után intra-

nukleárisan található meg. Sejtosztódásnál még a kromoszomális lokalizáció is igen jól megfigyelhető. A H^3 izotóp általában minden olyan vegyület jelzésére alkalmas, amely hidrogént tartalmaz, a jelzés könnyű, tekintve, hogy a proton-cserélődés spontán, s gyorsan folyik le az esetek többségében. A H^3 és C^{14} alkalmazása adta, szinte korlátlan lehetőségeket azonban még csak igen kis mértékben hasznosították. Nyilvánvaló mindazonáltal, hogy a jövő autoradiográfiája természetesen több speciális izotóp alkalmazása mellett, e két, a biológiai vegyületekben majdnem mindenütt előforduló és autográfiához kiválóan felhasználható elem radioaktív izotópját fogja a vizsgálatok döntő többségében hasznosítani.

Igen elterjedten használt és az előbb felsorolt elemekkel egyenértékű, illetve azonos fontosságú két elem az S^{35} és a P^{32} . Az S^{35} -öt részben a kéntartalmú aminosavak vizsgálatánál használják fel. S^{35} -tel jelzett metionin alkalmas egyes szövetrészek, vagy pl. az idegrendszerben egyes magvak, ill. azok sejteinek kísérletes beavatkozást követő funkcióváltozásának, anyagcsereváltozásainak regisztrálására, tekintve, hogy a metionin felvételtől a vizsgált objektum protein-szintézisének fokára következtethetünk vissza. — Egy másik alkalmazási területe az S^{35} -nek a porcszövet, ill. porcosodás vizsgálata. Itt az S^{35} -t szulfát alakjában használják.

A foszfor ugyancsak sok biológiailag igen fontos vegyületben szerepel, pl. nukleinsavak, foszfatidák stb. A csontban pedig $Ca_3(PO_4)_2$ alakjában találhatunk nagyobb mennyiségű szervetlen foszfort. Autográfiával kimutatták, hogy a bevitt P^{32} igen gyorsan épül be a nukleinsavakba és másodsorban a foszfolipoidokba. Ugyanakkor erősen fejlődésben levő fiatal állatokban igen jellemző a P^{32} beépülése a növekedő csontba, elsősorban az epifízis-fugába. Mi ezt a tényt egy új, a konvencionális tibia-testnél érzékenyebb növekedési hormon (STH) titrálás kidolgozásánál hasznosítottuk (MESS, HÁMORI [14]). Módszerünk azon alapszik, hogy 1—2 napos újszülött patkánynak beadott STH a beadott mennyiségnek megfelelő módon növeli az epifízis-fuga specifikus P^{32} felvételét (3/c, d ábra). Ezt kvantitatív autoradiográfiával számszerűleg is sikerült megállapítani. A módszer hipofízis STH tartalmának titrálására is használható, így lehetővé teszi az STH termelés idegrendszeri szabályozásának kísérletes vizsgálatát is, mellyel intézetünkben Dr. Mess foglalkozik.

Megemlíteném még a Zn^{65} izotópot, melynek autoradiográfiás vizsgálata ugyancsak arra utal, egyéb, hisztologia és hisztokémiai adatokkal egybevágóan, hogy a pancreas Langerhans-szigeteiben az insulint a β sejtek termelik. — Tekintve, hogy a RES kolloidális poloniumot, aranyat, urániumot és még néhány más anyagot igen könnyen fagocitál, ezen elemek izotópjait jól fel lehet használni a RES funkcióinak autográfiás vizsgálatára.

Itt szeretnék még megemlíteni egy igen érdekes, részben már kísérletesen is igazolt (GILLIES [10], DUNCOMBE [7]) elképzelést a kvalitatív autográfiának „poliautográfiává” történő kiszélesítésére. Felhasználva ugyanis az egyes izo-

tópok radioaktív sugárzása energiájának különböző voltát, elvileg elképzelhető, hogy ugyanazon metszetről, megfelelő emulziót használva egyszerre több, akár 7—8 izotópot is kimutathassunk. A módszer azon alapszik, hogy a különböző energiájú β sugarak az emulzióban energiájuk nagyságának megfelelő utat képesek csak megtenni. Így egy gyenge energiájú β sugárzás az emulzió alsóbb rétegében fog ezüstszemcséket indukálni, nagyobb energiájú pedig inkább az emulzió felsőbb szintjében. Ezt az 5. ábrán tüntettük fel sémásan. A metszet 3 β sugárzó izotópot, P^{32} -t (E. max: 1,7 Mev), J^{131} -t (E. max: 0,6 Mev) és H^3 -ot (E. max: 0,017 Mev) tartalmaz. (A J^{131} γ sugárzása nem jön számításba.) Látható az ábrán, hogy a 3 izotóp az emulzió 3 egymásfeletti rétegében indukálja a legnagyobb mennyiségű ezüstszemcsét. — E módszer további kifejlesztése nagy lehetőségeket ígér a jövőre vonatkozóan. Végül



5. ábra. „Poliautográfia”, sémásan. A 3 izotóp maximális reakciója az emulzió 3 különböző rétegében látható

érintenünk kell néhány szóban az autográfia kvantitatív vonatkozásait is. A kvantitatív autográfiának két fő módszerét ismerjük: 1. fényelnyeléses sűrűségmérés fotométerrel. Ez kis nagyításoknál használható csupán. A második módszer ennél kevésbé elegáns, de szövetrészek vagy akár sejtek kvantitatív autográfiájára is alkalmas, nevezetesen a fotoemulzióban redukált ezüstszemcsék számolása és statisztikai kiértékelése révén. Mindkét módszernél természetesen igen lényeges a) egyforma metszet vastagság, b) egyforma emulzió vastagság, c) a fotográfiai procedurákat mindig azonos körülmények szigorú betartásával kell elvégeznünk, végül d) olyan emulziót kell használnunk, amelyben az ezüstszemcsék megközelítőleg egyformák, és nagyságuk a $0,8—1,0 \mu$ -t nem haladja meg. Erre a célra a legmegfelelőbb a Kodak finom szemcsés stripping-film. Használható még KOLOUSEK, FISCHER, LODIN [12] „bevonós” módszere is, azzal a kikötéssel, hogy az emulzió vastagságának uniformitását konstans lefedési körülményekkel feltétlenül biztosítani kell. Intézetünkben dolgozunk kvantitatív autográfiával is és megállapíthattuk, hogy a módszer a fentemlített feltételek szigorú betartása mellett a kvantitatív kép mennyiségi viszonyainak pontosabb meghatározására, ill. kiegészítésére igen jól alkalmazható.

Összefoglalva; az autoradiográfia, amely társtudományához, a hisztokémiához hasonlóan tulajdonképpen morfológiai alapon áll, jellegénél fogva cito-hisztokémiai, ill. fiziológiai következtetések levonására alkalmas. A mód-

szer azáltal, hogy a szerv, szövet által felvett radioaktív izotóp pontosabb lokalizációját teszi lehetővé, részben jó kiegészítője a G. M. csöves stb. méréseket felhasználó biokémiai, ill. fiziológiai izotóp kutatásoknak, másrészt teljesen önálló kutatási feladatok megoldását is lehetővé teszi. A módszer könnyen elsajátítható, nem drága, alkalmazási területe szinte kimeríthetetlen. Ez adja magyarázatát annak, hogy ma már mind többen érdeklődnek, ill. dolgoznak autoradiográfiával, a kísérletes biológiai vizsgálómódszerek egyik legfiatalabb kiegészítő, társmethodikájával.

IRODALOM

1. ARNOLD, J. S. (1951) A method for embedding undecalcified bone for histologic sectioning, and its application to radioautography. *Science*, **114**, 178—180.
2. BELANGER, L. F. (1950) A method for routin detection of radiophosphates and other radioactive compounds in tissues. The inverted autograph. *Anat. Record*, **107**, 149—159.
3. BELANGER, L. F. (1952) Improvements to the melted emulsion technique of autography. *Nature*, **170**, 626.
4. BELANGER, L. F., LEBLOND, C. P. (1946) A method for locating radioactive elements in tissues by covering histological sections with photographic emulsion. *Endocrinology*, **39**, 8—13.
5. BOYD, G. A. (1955) *Autoradiography in Biology and Medicine*. Acad. Press. New-York.
6. DONIACH, I., PELC, S. R. (1950) Autoradiograph technique. *Brit. J. Radiol.*, **23**, 184—192.
7. DUNCOMBE, W. G. (1959) An autoradiographic method for distinguishing samples labelled with phosphorus-32 and sulfur-35. *Nature*, **183**, 319.
8. ENDICOTT, K. M., YAGODA, H. (1947) Microscopic autoradiographic technique for locating and quantitating radioactive elements in tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **64**, 170—172.
9. FITZGERALD, P. J. (1955) *Radioautography — its use in cytology*. (Mellers, R. C.: Analytical Cytology) McGraw—Hill, New York.
10. GILLIES, M. T. (1958) A simple autoradiographic method for distinguishing Insects labelled with phosphorus-32 and sulphur-35. *Nature*, **182**, 1683.
11. HÁMORI, J., MESS, B., SZÉKELY, Gy. (1959) Onset of thyroidal J¹³¹ accumulation in normal and decapitated chick embryos. *Acta Biol. Hung.*, **10**, 207—214.
12. KOLOUSEK, J., FISCHER, J., LODIN, ZD. (1956) Eine autoradiographische Methode mit einer zugänglichen Emulsion. *Acta histochem.*, **3**, 328—333.
13. MESS, B., HÁMORI, J. TSH titrálás csirkeembryok pajzsmirigyének J—131 autográfiája alapján. (Közlésre előkészítésben.)
14. MESS, B., HÁMORI, J. STH titrálás újszülött patkányokon, tibiaeophysifuga P-32 autográfiája alapján. (Közlésre előkészítésben.)
15. PELC, S. R., (1956) The stripping film technique of autoradiography. *Int. J. Appl. Radiation and Isotopes*, **1**, 172—177.
16. PELC, S. R., HOWARD, A. (1952) Techniques of autoradiography and the application of the stripping film method to the problems of nuclear metabolism. *Brit. Med. Bull.*, **3**, 132—135.
17. PRESSMAN, D., EISEN, H. N., FITZGERALD, P. J. (1950) The zone of localization of anti-kidney serum. *J. Immunol.*, **64**, 281—287.
18. ROOFE, P. G., HOECKER, F. E., VOORHEES, C. D. (1949) A rapid bone sectioning technique. *Pro. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **72**, 619—622.
19. SIFFERT, R. S. (1948) The demonstration of P³² in bone by radioautography. *Science*, **108**, 445—448.
20. SONENBERG, M., KESTON, A. S., MONEY, W. L. (1951) Studies with labelled anterior pituitary preparations. *Endocrinology*, **48**, 148—161.
21. STEINBERG, D., SOLOMON, A. K. (1949) The detection of Ca⁴⁵, J¹³¹, P³², and Zn⁶⁵ by photographic film. *Rev. Sci. Inst.*, **20**, 655—699.
22. TIXIER—VIDAL, A. (1958) Etude histiophysiologique des relations hypophyse et thiroide chez l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. microsc. et Morphol. expér.* **47**, 2352—340.
23. VÁGÁS, E. (1957) "Arbocoll H" as a histologic mounting medium. *Stain Techn.*, **32**, 255.