

A KVANTITATÍV HISZTOKÉMIA PROBLÉMÁI. CITOFOTOMETRIA LÁTHATÓ ÉS ULTRAIBOLYA FÉNYBEN*

W. SANDRITTER

(Orvostudományi Egyetem Kórbonctani Intézete, Frankfurt a. M. Németország)

A hisztológiában korábban a sejtek szerkezetének és működésének felderítésére a morfológiai módszerek szolgáltak. Emellett a sejtek kémiai összetételének vizsgálata messzemenően háttérbe szorult. Csak az utóbbi 15—20 évben dolgoztak ki a biokémiából ismert reakciók alapján olyan hisztokémiai módszereket, melyek lehetővé teszik a sejten található biológiai anyagok kvalitatív kimutatását. A hisztokémiának, hasonlóan a biokémiához arra is törekednie kellett, hogy a kvalitatív módszerek mellett a kimutatott anyagok mennyiségi meghatározását is lehetővé tegye. Ehhez pedig széles alapokon nyugvó kutatásra volt szükség, mely be kellett bizonyítsa, hogy a biológiai objektumok fotometriás mérése általában lehetséges és megállapítania, hogy melyik reakciók értékelhetők ki ezen az alapon. CASPERSSON és iskolája (1936, 1950) Stockholmban e területen vezető szerepet töltött be. Az ő munkáinak köszönhetőek azok a fizikai-optikai módszerek, amelyek 10^{-12} — 10^{-14} g nagyságrendű sejtanyagok meghatározását tették lehetővé. E módszerrel ma már csaknem az egész elektromagnetikus spektrumot felöleljük a rövid hullámhosszú röntgensugaraktól (elemek analízise, szárazanyag-tartalom meghatározás, ENGSTRÖM, 1950) az ultraibolya- és látható fényben történő fotometrián keresztül az infravörös spektrofotometriáig (1. ábra). Az interferencmikroszkópia (DYSON, 1950; DAVIES és mts. 1954, SCHIEMER és mts. 1957, SANDRITTER és mts. 1958) ennek a kutatási irányzatnak a legfiatalabb ága.

A röntgenhisztoradiográfia módszerével, monokromát-sugarakkal, bizonyos elemek kimutatása sikerrel járt. Ezek az elemek általában csak patológiás körülmények között fordulnak elő olyan magas koncentrációban, hogy kvantitativ mérhetőek legyenek. 10 \AA -ös hullámhossztartomány alkalmas a sejtek szárazsúly-meghatározására. Egyszerű röntgenhisztoradiográfia (PHILIPPS CMR 5) olyan módszert dolgoztunk ki, melynek segítségével az előbb említett szárazsúly-meghatározás referens-rendszer rutinszerű alkalmazása nélkül válik lehetővé. (SANDRITTER és MÜLLER 1959, MÜLLER és mts. a Handbuch der Histochemie-ben jelenik meg). A kis röntgensövekkel és vacuum-berendezés-

* Készült a Deutsche Forschungsgemeinschaft védnöksége alatt. — Előadás az MTA Biol. Csop. rendezésében 1959. szeptember 25-én.

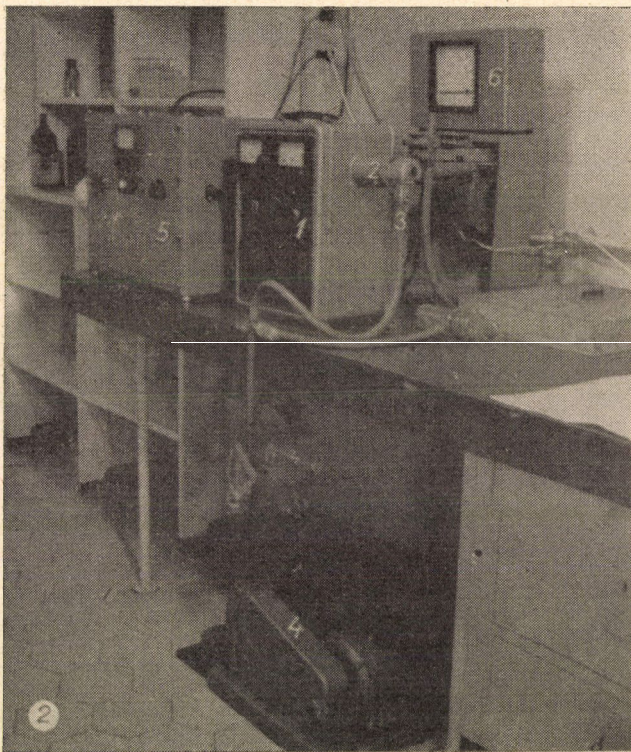
sel ellátott röntgenhisztoradiográf a 2. ábrán látható. A röntgensugarakkal exponált szövetről kontakt „árnyék”-képet kapunk (3. ábra). Ennek feketedése a szárazsúllyal arányos. Különböző sejtek szárazsúlyának röntgenhisztoradio-

<i>Sugárfajta</i>	λ <i>Kimutatandó anyag</i> <i>(ill. színreakció)</i>	<i>Módszer</i>	
<i>Infravörös</i>	1000 <i>Nagymolekulájú vegyületek</i> <i>(RNS, DNS, szénhidrát,</i> <i>lipid, fehérje, stb.)</i>	<i>Infravörös mikrofotometria</i>	
	800		
<i>Látható fény</i>	700 <i>Pigmentek</i> <i>Fastgreen (Histon)</i> <i>Millon (tyrosin, tryptophan)</i> <i>SS és SH csoportok</i> <i>Arginin</i>	<i>Cytophotometria látható fényben</i>	
	600 <i>Feulgen (DNS)</i> <i>Gallocyanin (DNS, RNS)</i>		
	500 <i>Szárazsúly</i>		<i>Interferencmikroskópia</i>
	400 <i>Methylzöld (DNS)</i> <i>Haemoglobin</i> <i>Légzőferment</i>		
<i>Ultraibolya fény</i>	300 <i>Thyreoglobulin</i> <i>Tyrosin és tryptophan</i> <i>Nukleinsavak</i>	<i>Ultraibolya mikrofotometria</i>	
<i>Vakuum-ultraibolya fény</i>	200		
	10		
	1 <i>Szárazsúly</i>	<i>Rtg-mikroradiographia</i>	
<i>Rtg-sugár</i>	N	<i>Rtg-histospektroszkópia</i>	
	Na		
	Mg		
	P		
	S		
	Cl		
	K		
	Ca		
	Fe		
	Cu		
Ag			
J			
	0,1		
	0,01		

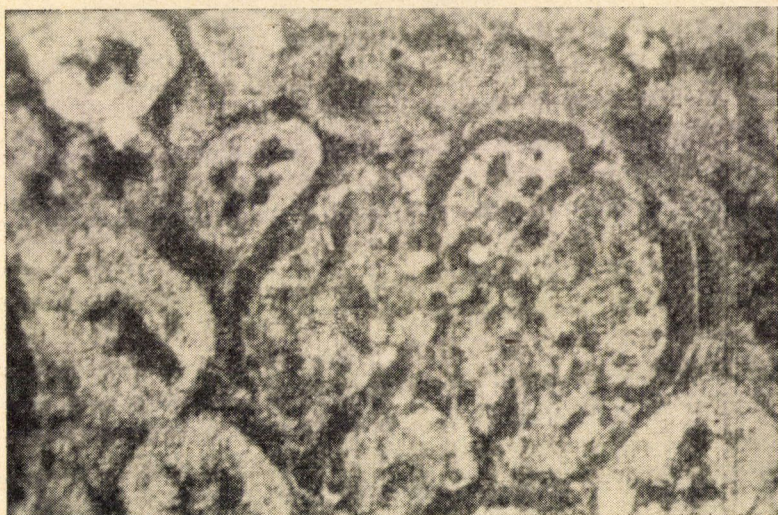
I. ábra. A kvantitatív hisztotometriai módszerek és az elektromágneses spektrum áttekintése

gráffal és interferencia-mikroszkóppal történt összehasonlító mérései nagyon jó összhangban vannak, 10–15%-os egyezést mutatnak (SANDRITTER és MÜLLER 1959).

A röntgenhisztoradiográffal kapott radiogramok kvantitatív kiértékelése fotométerrel történik. Festett és festetlen sejtek, ill. fényképfelvételek



2. ábra. A PHILIPPS-röntgenhisztoradiográf (CMR 5.) képe. 1. mérőműszer doboza, 2. röntgen-cső, 3. szövettani preparátum doboza, és a fényképező lemez részére szolgáló feltét, 4. vakuum-pumpa, 5. stabilizátor, 6. speciális voltmérő

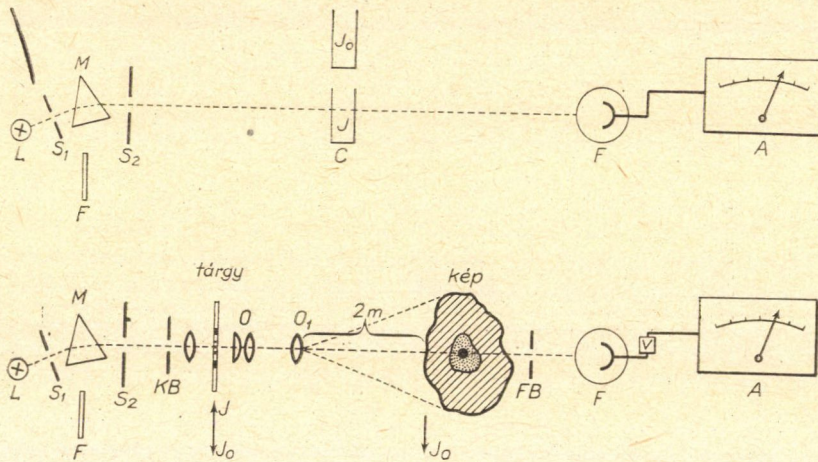


3. ábra. patkány vese-glomerulus röntgenhisztoradiográfias képe (kb. 400 × utánnagyítás).
A nagyobb szárazsúllyal bíró helyek világosabbak

fotometriájának általános célja az egyes sejtekben talált, meghatározott anyagok koncentrációjának, mennyiségének és kvalitatív jellegének (abszorpciós mérések) a mérése. A fotometriás módszerek alkalmazása a mikrofotometriában különleges feltételekhez kötött.

I. Elméleti és gyakorlati feltételek

A „makrofotometriában” (oldatok mérése küvetában) mind technikai (műszer), mind kémiai (oldat) szempontból könnyebb a mérési feltételek betartása, mint a mikrofotometriában. A 4. ábrából kitűnik, hogy a mikrofotometriában hasonló műszer-elrendezéssel dolgozunk, mint oldatok mérésekor,



4. ábra. A makro- (fent) és mikrofotometria (lent) elve. L = fényforrás, S_1, S_2 = a monokromátor (M) be- és kilépő nyílása, F = szűrő, KB = kondenzor blende, J_0 = folyadékkal telt küvetta (C), ill. a mikroszkópos készítmény festetlen (vak) területe, J = a mérendő anyaggal telt küvetta (C), ill. a mérendő tárgypont a mikroszkópos preparátumban, O = objektív lencse, O_1 = okulár, FB = fotométer-blende, F = fotocella, ill. elektronsokszorozó, V = erősítő, A = mérőműszer

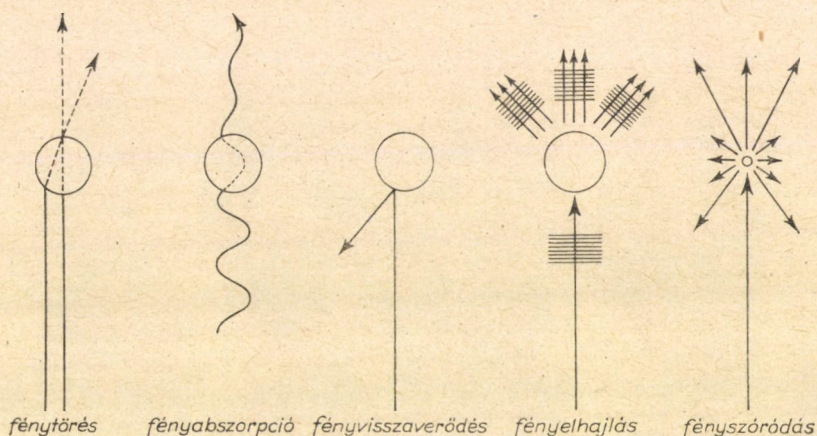
metriában hasonló műszer-elrendezéssel dolgozunk, mint oldatok mérésekor, a különbség csak annyi, hogy a küvetta helyén a mikroszkóp és a mikroszkópos kép áll.

A mérések mindkét esetben azonos elven alapulnak. Fénysugarakat bocsátunk át a preparátum üres (vak) (I_0) és a mérendő tárgyat tartalmazó területén (I) és az abszorpció (A), ill. extinkció (E) a következő képlet alapján számítható ki:

$$A = \frac{I_0 - I}{I_0}, \quad \text{ill.} \quad E = \log \frac{I_0}{I}.$$

A fotometria alapfeltétele a LAMBERT—BEER törvény érvénye a preparátumban, amely kimondja, hogy az extinkció (E) egyenesen arányos az abszorbeáló molekulák koncentrációjával és a rétegvastagsággal, azaz $E = e_1 \cdot c \cdot d$, ahol az e_1 a molaris extinkciós koefficiens ha a koncentrációt mol/l-ben adjuk meg.

A mikrofotometriában felmerülő problémák mindenekelőtt mind a vizsgálandó preparátum nehéz fizikai-optikai és kémiai sajátosságaiból, mind pedig a mikroszkóp optikai sajátosságaiból adódnak. CASPERSSON (1936) érdeme, hogy a mikrofotometriai módszerek alapvető elméleti kérdéseit tisztázta. E vizsgálatokban tekintettel volt arra, hogy a biológiai objektum a rajta keresztülhaladó fénysugarakat többféle módon változtatja meg. Az 5. ábrán



5. ábra. A fénysugarak biológiai objektumban történő változásainak durva sematikus ábrázolása

sematikusán ábrázoljuk e fényjelenségeket egyszerű modellen (gömb): a fénytörést, fényabszorpciót, fényvisszaverődést, fényelhajlást és a fényszóródást. Mivel a mikrofotometriában a szöveti preparátum mikroszkópos képét fotometráljuk, a lehető legjobban kell biztosítanunk az összhangot a tárgy és a kép, valamint a fényintenzitás alakja és eloszlása között. Eszerint a mikroszkópos rendszernek meghatározott feltételeket kell teljesítenie és a biológiai objektum lehetőleg kevés olyan zavaró tényezővel rendelkezzen, amely fénytörés, szóródás stb. formájában jelentkezik.

A mikrofotometria CASPERSSON (1950) munkáin alapuló elvi feltételeit a következőkben foglaljuk össze: (SWIFT, 1950, 1955. UBER 1939, THORELL 1947, WALKER 1956, NURNBERGER 1955, POLLISTER és ORSTEIN 1955, SANDRITTER 1959 és lásd még a következő symposionokat, amelyek a Disc. Faraday Soc. 9, 1950. és a Labor. Invest. 1, 1952. számaiban jelentek meg, valamint

Kolloquium über quantitative Histochemie, Frankfurt 1959, amely az Acta Histochemicában jelenik meg).

1. A mikroszkóp objektívje teljesítse az ABBE-féle sinus-törvényt.
 2. Az objektív numerikus apertúrája legalább 0,85 legyen.
 3. A kondenzor numerikus apertúrája 0,2—0,3 legyen.
 4. A mélység-élesség a lehető legnagyobb legyen (fókusz-hatás).
 5. A lehetőleg pontosan mérhető tárgy nagysága a használt fény hullámhosszának legalább 3—4 -szerese legyen (pl. $4 \times 500 \text{ m}\mu = 2,0 \mu$).
 6. A mérendő tárgy (metszet, sejt) és a lefedő közeg (balzsam, stb.) törésmutatója lehetőleg azonos legyen.
 7. A rendszerben a szórt fény mennyisége a lehető legcsekélyebb legyen.
 8. A fényforrás blendéje (Leuchtfeldblende, a továbbiakban LB) a lehető legkisebb legyen.
 9. Legyünk tekintettel a tárgy inhomogenitására.
 10. A szöveti preparátumot kíméletesen készítsük elő (fixálás).
 11. Minden munkafeltétel könnyen változtatható és testelhető legyen.
- Modellek és „konstans” biológiai anyagok (pl. spermium) méréseivel, valamint más független módszerekkel való összehasonlító mérések révén az eredményeket kontrollálni kell (teszt-kísérletek).

ad 1. *Sinustörvény*

Ha a tárgyból kilépő összes fénysugár egyesül a képben, akkor az ABBE-törvényt biztosítottuk. Ma ezt a feltételt minden aplanat-rendszerrel elérhetjük.

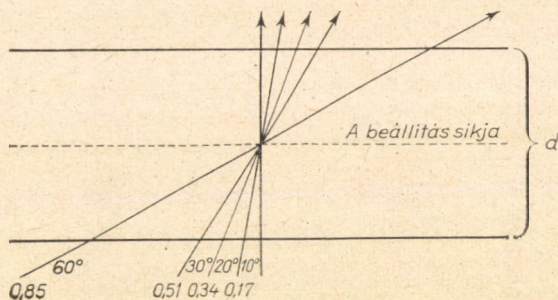
ad 2. *Az objektív numerikus apertúrája*

A nagyobb numerikus apertúrájú objektívek a metszetek által eltérített fény nagyobb részét gyűjtik össze, mint a kisebb numerikus apertúrájú objektívek. Az ilyen objektívek esetében a tárgyból kilépő fény egy része nem jut be az objektív nyílásába és a mért értékek túlnagyok lesznek. Abban az esetben, ha a tárgy és a törőközeg törésmutatójának aránya 1,1, akkor a $2 \times 30^\circ$ nyílású objektív a tárgyból kilépő sugarak 95%-át gyűjti össze (CASPERSSON 1950).

ad 3. *A kondenzor numerikus apertúrája*

A metszetre a megvilágító-berendezésből különböző szög alatt esnek fénysugarak. Ez a fénykúpot határoló szög a kondenzor blende nyílásától függ (6. ábra). Ez a „ferde” megvilágítás oda vezet, hogy a blende szélétől jövő sugarak, egy párhuzamos lapokkal határolt tárgyban, hosszabb utat tesznek meg, mint a központi sugarak. Egyszerű számítással kitűnik, hogy a széli sugarak 0.17-es kondenzor-nyílás mellett, 5μ vastag tárgy esetében, 0.5μ -nál hosszabb utat tesznek meg, 0,34-es apertúra esetén az út $0,3 \mu$, és így tovább. Ezért elméletileg a mért abszorpciónak emelkedni kell. A keletkező hiba a hullámhossztól, a törésmutatótól és az extinkció nagyságától függően elméletileg kiszámítható (CASPERSSON 1936, BLOUT 1933) és így megfelelő

korrekciós görbét vehetünk fel. (WALKER 1956). Amellett azonban a hiba nagysága döntően a tárgy alakjától függ, mely egzaktul nem határozható meg. Gömb vagy ellipszoid alakú tárgyak esetében a hiba gyakorlatilag 0 nulla. Ez a probléma csak empirikusan, pl. modellen kutatható (lásd alább: cseppszuszpenziók). Ezek a modellanyagon végzett mérések azt mutatják (7. ábra), hogy kisebb tárgyak esetében csekélyebbek ugyan a hibák (kisebb extinkció, nagyobb kondenzor-nyílás), azonban a törésmutató különbségeket sem hanyagolhatjuk el. Biológiai objektum (pl. májsejt-mag) mérésekor, a kondenzor-nyílástól függetlenül, az extinkciók azonosak. A kontroll-kísérletek szerint közepes kondenzor-nyílás esetén (az objektív numerikus apertúrájának $\frac{1}{3}$ -a)



A kondenzor numerikus apertúrája

6. ábra. Planparallel síkokkal határolt tárgyon áthaladó fénysugarak, d = a tárgy vastagsága

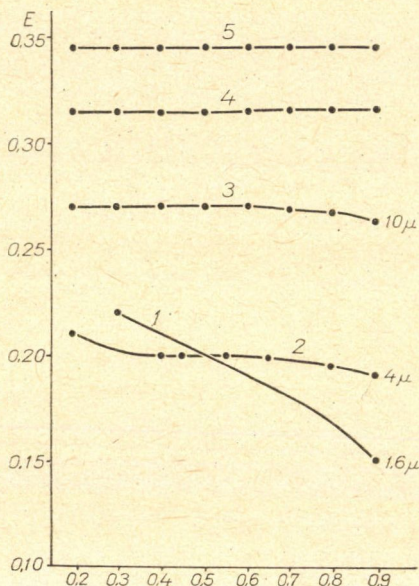
várhatók a legjobb eredmények. Kisebb apertúra esetén (0,1), a mérés eredményeket zavaró, járulékos fázishatások lépnek fel.

Kisebb kondenzor-nyílás alkalmazása mellett szólnak azonban más megfontolások is.

ad 4. A *mélységélesség* (fókusz-hatás) kisebb numerikus apertúrájú kondenzor használata esetén nagyobb, mert a tárgyat gyakorlatilag párhuzamos fénysugarakkal világítjuk át. A fókuszon kívül fekvő tárgy-struktúrák azonos fény mennyiséget abszorbeálnak, az energia azonban a két síkban nagyobb felületre oszlik el és így az egy ponton végzett mérések hibákhoz vezetnek. Ez a hiba az extinkció nagyságától függ (DAVIES és WALKER 1953). Kisebb kondenzor-nyílás esetén azonban az ún. „letapogató” (scanning) mérésekkel csökkenthető, ill. megszüntethető. Speciális esetekben a sejtek mechanikus szétnyomása révén ugyancsak kiküszöbölhető.

ad 5. A *minimális tárgynagyság* (a használt fény hullámhosszának 3—4-szerese) CASPERSSON (1936) szerint az ABBE-féle képkeletkezési elméletből és MIE elméletéből (szférikus testen történő fényeloszlás) következik. Az utóbbi elmélet az egyedülálló részecskékre érvényes. Lényegében itt arról van szó, hogy (a fény hullámhosszához viszonyítva) kis, ill. középnagy részecskék esetén fényszóródás lép fel (szóródási kúp), amelyet csak a nagy numerikus

apertúrájú objektívek képesek befogadni. A szóródás következtében visszafelé is halad a fény és ez természetesen számos hibát tartalmazó mérési eredményhez vezet. Biológiai objektumokban különböző alakú és nagyságú, szorosan egymás mellett fekvő részecskét találunk, amelyek matematikailag nem definiálhatók, és így ez a probléma elméletileg nem oldható meg. Ezért empirikusan kell megállapítanunk, hogy méréseink helyes eredményeket tükröznek-e (LAMBERT—BEER-törvény, lásd alább). Az objektum megengedett nagyságá-



7. ábra. A kondenzor apertúra és az extinkció nagyságának összefüggése

1. alkoholban oldott $1,6 \mu$ nagyságú naftalin-cseppek $257 m\mu$ (King és Roe 1953), 2. 4μ nagyságú FASTGREEN cseppek $632 m\mu$, 3. 10μ nagyságú Sudan IV. cseppek $497 m\mu$, 4. gallocyanin-chromtimsóval festett májsejtek, 5. gallocyanin-chromtimsóval festett pleurahámsejtek

ról mondottakon kívül a tárgy alakja és nagysága mellett a tárgy és a lefedő közeg közötti

ad 6. törésmutató különbségek is nagy szerepet játszanak. A fényvisszaverődés, a fényelhajlás, a fénytörés a törésmutatótól függ. A fényvisszaverődésnél keletkezett veszteség nagyobb törésmutató-különbségek esetén csekély (CASPERSSON 1936). Nagy numerikus apertúrájú objektívek használatával a fénytörés még nagy törésmutató-különbségeket is kiegyenlíthet (lásd fent).

Különböző szövetek látható fényben történő vizsgálatához már rendelkezésünkre állnak megfelelő és különböző törésmutatójú médiumok. Ezek szöveti preparátumokon jól alkalmazhatók (Mounting media, CARGILLE, New York).

Festetlen preparátumok mérései révén ezenfelül az eltérített fény (szórt fény) mennyisége meghatározható. Ultraibolya fényben történő mérések esetén nehezebb a helyzet, a legutóbbi időkhöz ugyanis nem ismertük a szövetek törésmutatóját közepes hullámhosszúságú ultraibolya sugarakban.

JANSEN (1958) újabban meghatározta ultraibolya fényben, különböző fixálók után, a szövetek törésmutatóját. Ez $250 \text{ m}\mu$ hullámhossz esetén $n = 1,62$, látható fényben $n = 1,57$. Jó törésmutatójának bizonyult a benzol (csaknem azonos diszperziós görbe).

A tárgyban haladó fénysugarak eddig említett változásai a továbbiakban „nem abszorpciós fényvesztés”-hez (Nichtabsorptionslichtverlust)

ad 7. a szórt fényhez vezetnek. A monokromátorban, a mikroszkóp tubusában és az optika üveg-levegő határfelületén (lásd még: SCHWARZSCHILD—VILLIGER effektus) fellépő szórt fény mellett az objektumban keletkező fényszóródás játssza a legfontosabb szerepet. Az objektum részecskéinek nagyságától, a törésmutató különbségektől és a fény hullámhosszától függően fényvesztés lép fel, amely a mért abszorpciót fokozza. Látható fényben ez az effektus nem nagy és könnyen kiküszöbölhető. Ultraibolya fényben történő mérés esetén különböző korrekciókat vezettek be, amelyek azonban csak megközelítő értékekhez vezetnek.

Az üveg-levegő határon fellépő szórt fény hatásáról a szerzők különbözőképp vélekednek (NAORA 1951, 1952, ORSTEIN és POLLISTER 1952, LISON 1953). Ez az ún. SCHWARZSCHILD—VILLIGER-effektus (1906) a világos, gyengén abszorbeáló környezetben fekvő, nagy extinkcióval bíró objektuomk extinkciójának csökkenését idézi elő.

ad 8. Kis fényforrás blendével (a továbbiakban *LB*) az előbbi, a SCHWARZSCHILD—VILLIGER-effektusból eredő, hibát csökkenthetjük. Teljesen átlátszatlan objektum (pl. szénszemcse) mérésével az *LB* nagysága és az előbbi effektusból eredő hiba közötti összefüggést könnyen vizsgálhatjuk. A 8. ábrán bemutatott saját kísérleteinkben 99%-os abszorpciót találtunk maximálisan 50μ átmérőjű *LB* használata esetén. Kisebb extinkcióval bíró objektumok mérésekor a hiba kisebb. Gondolnunk kell azonban arra, hogy az általában előforduló mérési hibák nagyobb abszorpciók esetén nagyon nagyok és így a szénszemcsék mérésekor kapott eredmények abszolút értékeket nem adhatnak. A hiba a lehető legkisebb átmérőjű *LB* használatakor erősen redukálható (esetünkben pl. 30μ a *LB* átmérője). Emellett fontos, hogy az extinkció 1,0-nél ne legyen nagyobb.

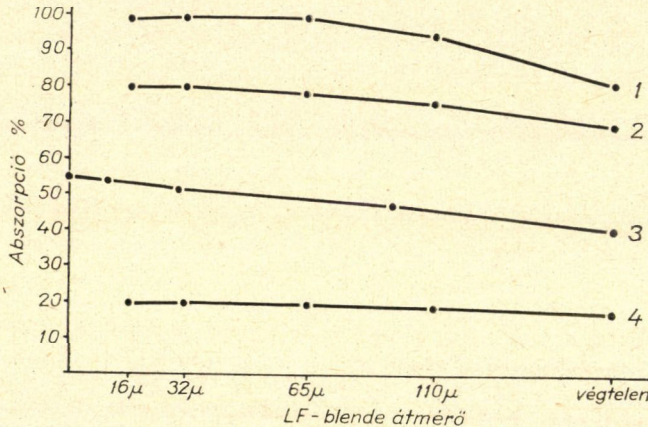
A citofotometria hibalehetőségeinek megbeszélése során mindig felmerül az

ad 9. inhomogenitás kérdése (BLICK és mts, 1951, CASPERSSON 1955). Az inhomogenitásból eredő hiba a mérendő tárgy részecskéinek nagyságától, azok eloszlásától és a fotométer-blende nagyságától függ.

Példa: Tétélezzük fel, hogy a mérendő tárgy 0,2, vagy 0,8 extinkcióval bíró homogéne eloszlott anyag. Ha ezt az anyagot két azonos nagyságú terü-

leten osztjuk el, akkor 0,2 extinkció helyett 0,187-et és 0,8 extinkció helyett 0,611-et kapunk. Tehát a hiba nagyobb extinkció esetén nagyobb.

Ezt a hibát csak kis fotométer-blendével (pl. $0,5 \mu$) küszöbölhetjük ki. A mérést pedig legjobban igen sok pont mérése révén az ún. „letapogató” (scanning) módszerrel végezhetjük el. Számos laboratóriumban az ún. „plug” mérést végzik, ebben az esetben a fotométer-blende átmérője $\frac{2}{3}$ -a a mérendő tárgy (sejtmag) átmérőjének. Ilyen módszerrel mérések csak akkor engedhetők meg, ha az abszorbeáló anyag egyenlően van elosztva. Minden esetben úgy



8. ábra. Az LF-blende és a mért abszorpció közti összefüggés

1. koromszemcse (30μ átmérőjű), fotométer blende $0,8 \mu$, kondenzor numerikus apertúrája $0,25$, objektív numerikus apertúrája $1,25$, hullámhossz $550 m\mu$, $2,7 \mu$ átmérőjű lymphocytamag, 3. $6,2 \mu$ átmérőjű májsejtmag (patkány) (NAORA 1955), 4. glicerinen oldott 10μ átmérőjű FASTGREEN-cseppek

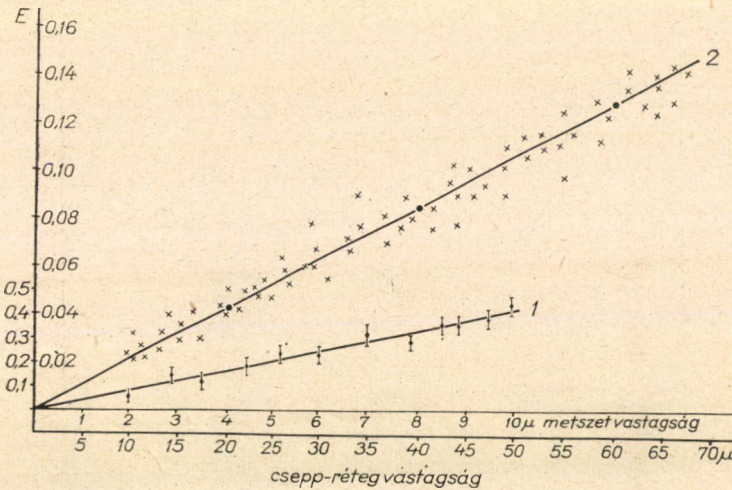
kell végeznünk azonban a méréseket, hogy a legkisebb átmérőjű fotométer-blendével sok pontot mérjünk le (egy sejtmagon belül pl.), majd azt a blendét választjuk ki, melynek használata esetén az eredmények még egyeznek.

Az előbb említett összes hibatényezők nagymértékben függenek a vizsgálendő anyag előkészítésétől is (fixálás, beágyazás, utókezelés).

ad 10. Így a *fixálás* a tárgy zsugorodásához vezethet (ez magasabb extinkciót jelent), abszorbeáló anyagvesztés állhat elő (SANDRITTER 1958) nemcsak savas fixálók használatakor, hanem az anyag terítésekor (6% veszteség ultraibolya fényt abszorbeáló anyagból) is. Ugyanakkor az optikai tulajdonságok megváltozhatnak. Különösen CARNOY-fixálás fokozza az anyag struktúrális és optikai inhomogenitását (törésmutató-inhomogenitás). Már egyedül a hődenaturáció is okozhatja az abszorpció spektrum meghamisítását (SCHAUENSTEIN és mts. 1955). Ezenkívül a nukleinsavak és a fehérjék ultraibolyafényben mért extinkciós koefficiensei a pH-tól, a polymerizáltság-

tól és a sókoncentrációtól függően is megváltozhatnak. Saját tapasztalatunk szerint ultraibolya fényben történő mérésekre a mélyhűtéses-száritás (Freeze-drying) a legalkalmasabb. A fehérjék egyáltalán nem, vagy csak kismértékben denaturálódnak és így a szöveti preparátumban csak kis törésmutatókülönbségek lépnek fel.

ad 11. Az eddig tárgyalt hibalehetőségek a lehető legtöbb metodikai teszt-kísérlet alkalmazását teszik szükségessé, ill. mérési eredményeinket fel-



9. ábra. Összefüggés a rétegvastagság és az extinkció között (LAMBERT—BEER-törvény)

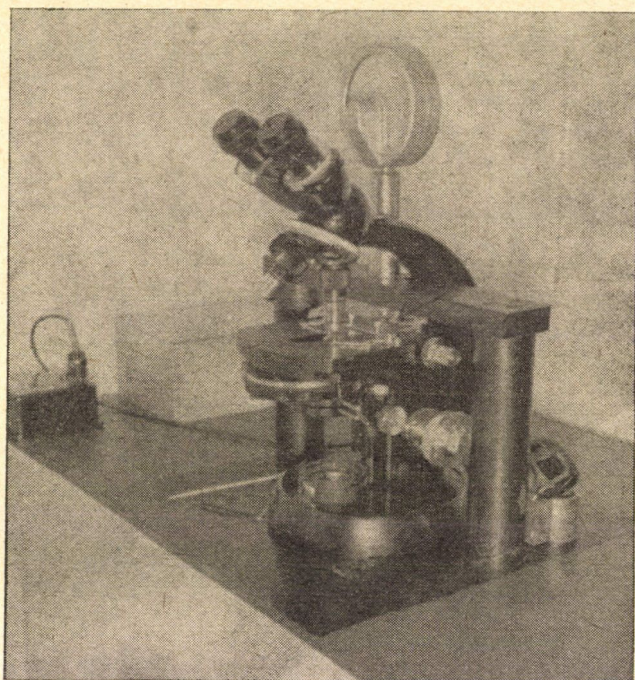
1. a rétegvastagság (emberi máj gallocyanin-chromtimsó festés) és az extinkció közötti viszony. Mérési feltételek: a kondenzor numerikus apertúrája 0,25, *LF*-blende átmérője 30 μ , az objektív numerikus apertúrája 1,25, Φ = mérési eltérések, 2. különböző vastagságú, gömb alakú cseppek mérési eredményei (Sudan IV., kb. 70 mérés), a mérési feltételek az előbbivel azonosak. A kihúzott vonal megfelel azoknak az extinkciós értékeknek, amelyeket 1 cm-es rétegvastagságú küvetében történő mérések alapján 20, 40, 60 μ rétegvastagságra számoltunk át. Az ordinátán a bal oldalon jelölt extinkciós értékek a metszeteken végzett és a jobb oldalon jelölt extinkciós értékek a festékcseppeken végzett mérési eredményeket jelentik

tétlenül egyeztetnünk kell más, független módszerekkel kapott adatokkal. Fentebb már említettük csepp-szuszpenziós kísérleteinket. Ezek kitűnő modellek számos befolyásoló tényező megismerésére. E modellkísérleteket oly módon kell elvégeznünk, hogy a csepp átmérője és az extinkció arányban álljanak. A 9. ábrán bemutatott kísérleteinkben festékcseppekre és májsejtre vonatkozó adataink a LAMBERT—BEER törvénnyel egybehangzanak, azaz a rétegvastagság emelkedésével egyenes arányban növekszik az extinkció. Ugyanezt az összefüggést találtuk ultraibolyában végzett kísérletek kapcsán 265 és 280 $m\mu$ -nál.

Mérési eredményeink megbízhatóságát más módon is ellenőrizhetjük. A mérendő anyagot relatíve konstans mennyiségben tartalmazó objektumokat

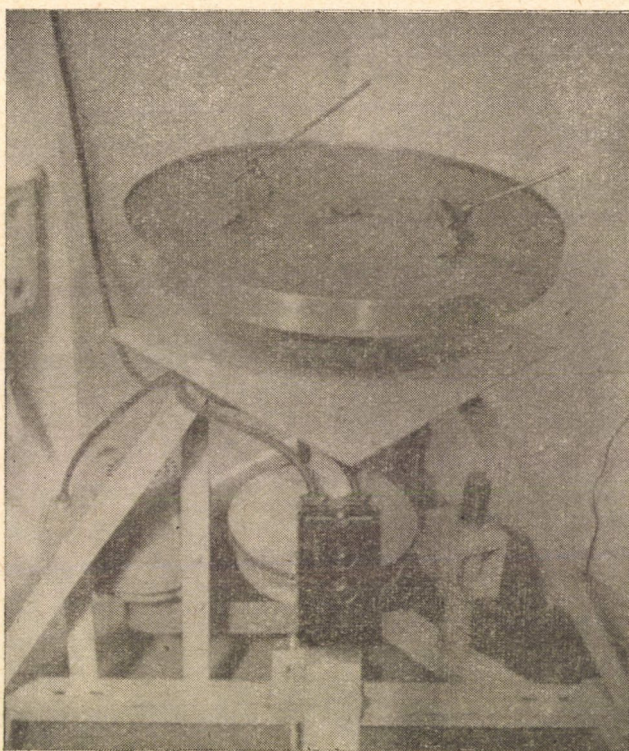
mérünk (pl. spermium, DNS-meghatározás esetében), vagy eredményeinket kémiai úton történő meghatározásokkal hasonlítjuk össze (lásd alább).

A citofotometriában használt metszetek vastagságának mérésére különleges optikai segédeszközt kellett szerkesztenünk (10. ábra). Ez lényegében olyan fáziskontraszt-mikroszkóp, amelyet az ún. mikrokátorral (Fa. JOHANN-



10. ábra. A metszetrovastagság mérésére szolgáló készülék. A nyíl a mikrokátor és a mikroszkóp tárgyasztalának összeköttetését jelzi.

SON, SCHWEDEN) kapcsoltunk egybe. A mikroszkóp mikrométer csavarja a tárgyasztalt emeli vagy süllyeszti és a mikrokátor $0,05 \mu$ pontossággal mutatja a tárgyasztal elmozdulását. A metszetrovastagságot a metszet alsó és felső fel-színének élesre állításával határozzuk meg. A számításhoz ismernünk kell a preparátum törésmutatóját és az objektív numerikus apertúráját. Ezzel, az ún. fókuszáló, módszerrel kapott eredmények egyeznek az interferencia-mikroszkópos metszetrovastagság méréssel kapott eredményekkel (WEISSBACH, Kolloquium für quantitative Histochemie, Frankfurt 1959, megjelenik az Acta Histochemicában). Nagy gondot kell fordítanunk a mikrotomkés élessé-gére, a kés csorbái nem lehetnek $1-2 \mu$ -nál nagyobbak. Saját mikrotomkés fenő készülékünk a 11. ábrán látható.



11. ábra. Mikrotomkés fenő készülék forgó üveglappal

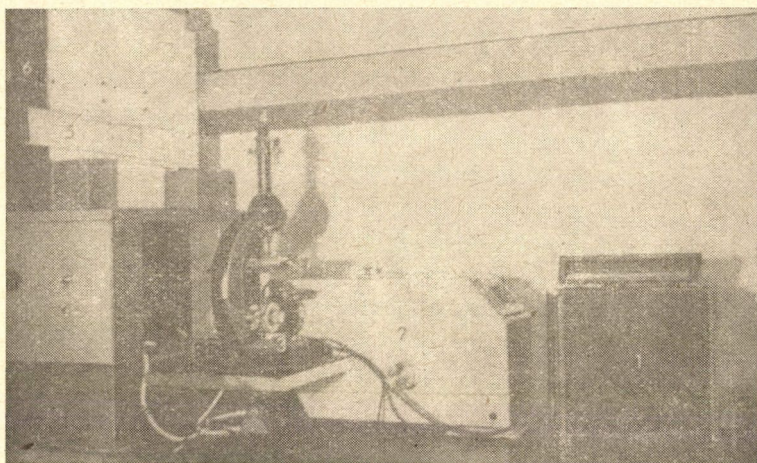
II. A mérőműszerek felépítése

A bevezetőben röviden említettük a mikrofotométerek elvi felépítését. A készülék felépítése lényegében a kutatók kérdésfeltevéséből adódik. (Homogén vagy inhomogén tárgy, látható vagy ultraibolya fény használata, abszorpciós görbe felvétele vagy az anyag összmenyiségének meghatározása.) A citofotométerek építésénél azt a célt kell szem előtt tartanunk, hogy a méréseket lehetőleg pontosan és a legrövidebb idő alatt végezhessük el. Látható fényben történő mérésekhez a készülékek egyszerűbben építhetők, mint az ultraibolya-mérésekhez. Elvileg ez ideig két különböző metodikai lehetőség áll rendelkezésünkre.

1. *Direkt mérésekre alkalmas készülék* LISON (1950) elve szerint. Saját készülékünk is ilyen (12. ábra), amely stabilizált fényforrással (stabilizálás feltétlenül szükséges, mert az áramingadozások befolyásolják a méréseket), monokromátorral, ill. ék-interferencia szűrővel, elektronsokszorozóval (RCA 1 P 21 typ. cső) és házilag épített erősítővel rendelkezik. A szöveti preparátum

képét fehér ernyőre vetítjük, ezen az ernyőn van a fotométer (elektronsokszorozó) blendéje is. Ilyen készüléket igen olcsón építhetünk.

2. Az *indirekt mérésekre szolgáló készülék* előnye az, hogy világos szobában dolgozhatunk és automatikusan regisztráló, „letapogató” (scanning) méréseket is végezhetünk. Saját készülékünket a 13. ábra mutatja. A mérés úgy történik, hogy osztott sugármenet mellett a mérendő pontot az okulár fonálkeresztjére állítjuk. A fonálkereszt közepe pontosan egybeesik az elektronsokszorozó nyílásának közepével. A mérendő tárgy (sejt, sejtmag) nagyságá-



12. ábra. LISON elve alapján épített, látható fényben működő cytofotométer (Sandritter és mts. 1958)

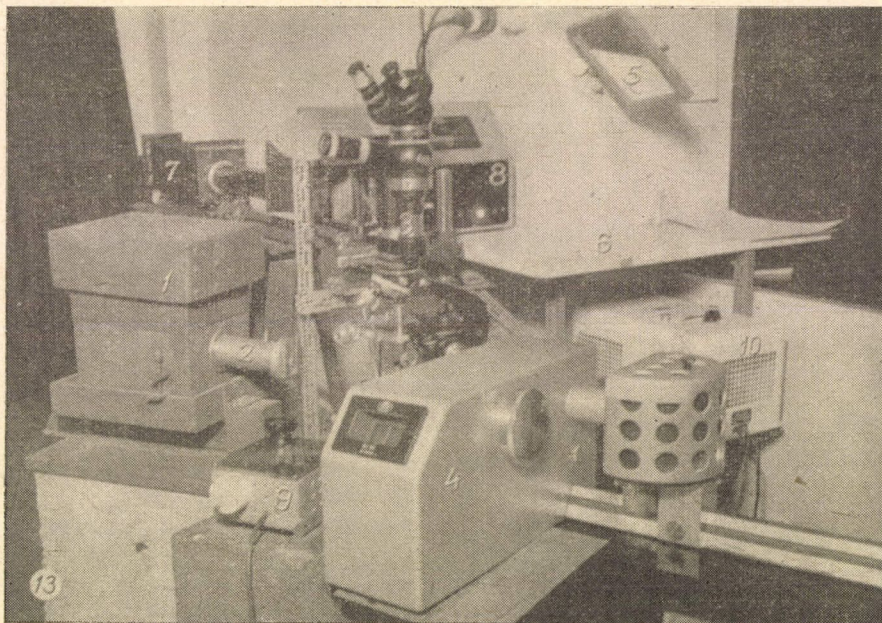
1. galvanométer, 2. monokromátor, 3. prizma, ill. tükör, 4. projekciós prizma, 5. képernyő, melyen különböző átmérőjű és tolható blende található, 6. dob és az ékinterferenciaszűrőhöz szükséges fordulatszámoló

nak meghatározására a tárgy képét a falra szerelt tükör segítségével asztalra vetítjük és ott planiméterrel lemérjük.

Ez a készülék is csak egyes pontok mérésére ($0,5 \mu$ átmérőjű terület) készült. Ultraibolya fényben történő fotometria céljából azonban CASPERSSON elve alapján automatikusan regisztráló készüléket építettünk be (14. ábra). A preparátum egyenletes és folyamatos mozgását ($1 \mu/\text{sec.}$) speciális, mikroszkóp-asztalra szerelt motor végzi és az elektronsokszorozó által adott feszültség-különbséget egy íróberendezés abszorpciós görbe formájában adja vissza. Így a „letapogató” (scanning) eljárás segítségével, egy adott hullámhosszon, lehetővé válik a sejtben egy bizonyos anyag összmenyiségének meghatározása. A sejt egy bizonyos pontjának abszorpciós görbét is felvehetjük

oly módon, hogy a mérendő pont mozdulatlan marad, a monokromátor hullám-váltó dobja mozog és folyamatosan változtatja a spektrumot (közelebbi leírást lásd SANDRITTER 1958).

Ilyen komplikált készülék házilag való felépítése időtrabló. A jövőben ezt a fáradságot megtakaríthatjuk, mert a C. ZEISS (Oberkochen) cég ilyen készülék gyártását előkészítette.



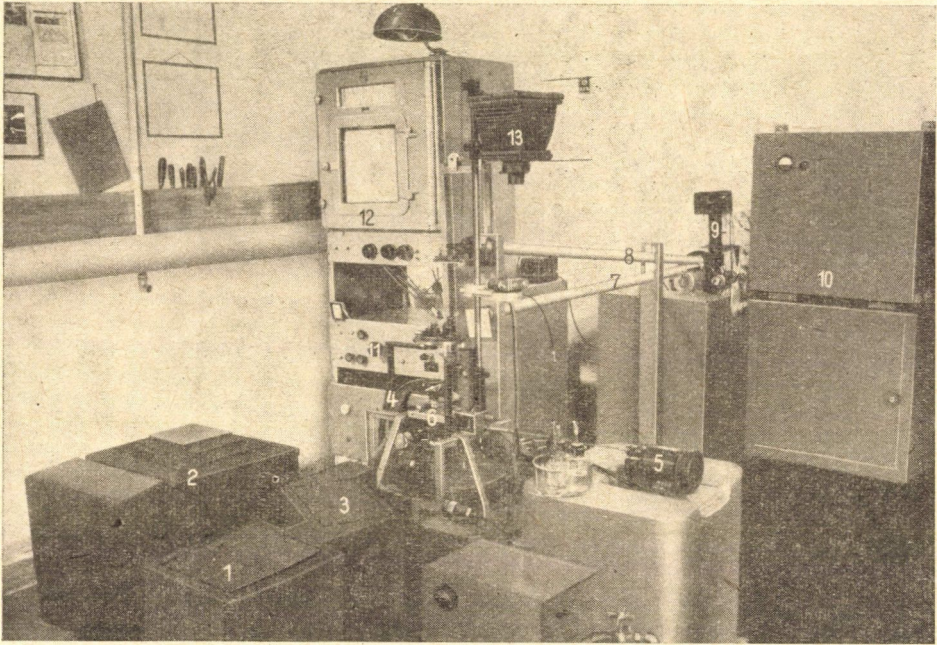
13. ábra. Látható fényben működő cytotométer (indirekt módszer) monokromátorral, magas feszültségű, vagy xenon-lámpával, osztott sugármenettel (tubus a megfigyelés számára és projekciós tubus az elektronsokszorozó számára) és mérőműszerrel

1. xenon-lámpa, 2. tubus, lencse, irisblendé és szűrő számára, 3. osztott sugármenetű mikroszkóp, 4. monokromátor fényforrással, 5. fali tükör projekcióhoz, 6. rajzoló asztal, 7. elektronsokszorozó, 8. mérőműszer, 9. a szobai világitást szabályozó ellenállás, 10. a xenon-lámpához szükséges segédeszköz (Sandritter és mts. Mikroszkopie, 14, 25, 1959)

Élő sejtek vizsgálatához speciálisan épített készülékre van szükségünk. Dr. SCHEIMER-rel közösen ultraibolya-spektrográffal kombinált fáziskontraszt mikrokinematográf-berendezést állítottunk össze. Ezzel a készülékkel az élő sejtet látható fényben folyamatosan fényképezhetjük, ugyanakkor rövid idő alatt (1/100 sec.) egy adott ponton ultraibolya fényben abszorpció-mérést végezhetünk. Ilyen módon az élő sejt nukleinsavainak változásait hosszú ideig követhetjük.

A hasonló elven alapuló fényképezési módszerekre vonatkozóan a Handbuch der Histochemie-ben leírtakra utalunk.

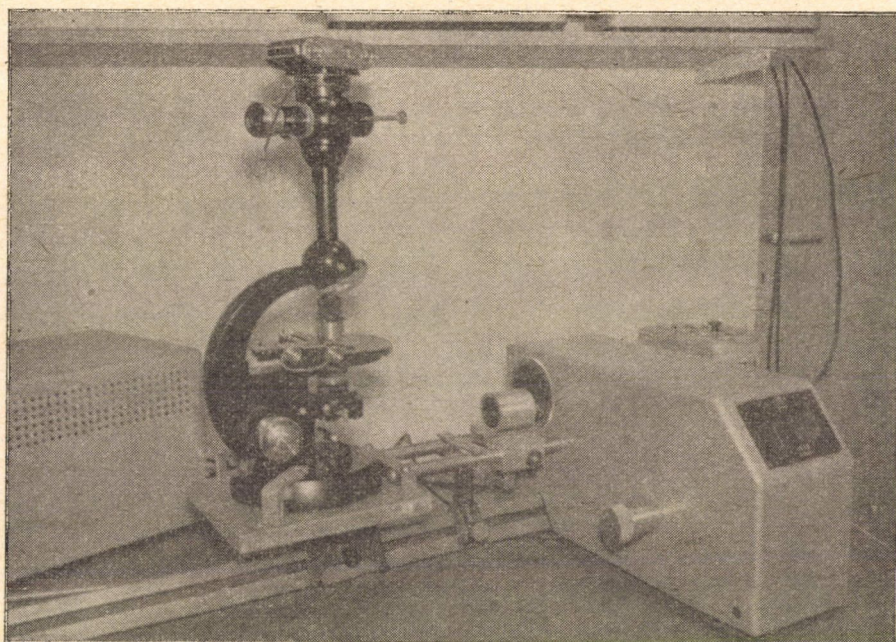
Az ultraibolya fényben történő mikrofotográfiára szolgáló egyszerű berendezés a 15. ábrán látható. A ZEISS-spektrofotométer monokromátorát mikroszkóppal kombináltuk. A mikroszkópot akromát tükroptikával (BECK,



14. ábra. automatikusan regisztráló ultraibolya-mikrospektrográf (SANDRITTER, 1958)

1. és 3. monokromátor és higanygőzlámpa, 2. xenonlámpa, 4. mikroszkóp, 5. a tárgyasztalt mozgató motor, 6. a tárgyasztal, 7. mérési sugárvédő cső, 8. összehasonlító sugárvédő cső, 9. elektronsokszorozó, 10. az elektronsokszorozót tápláló akkumulátor, 11. erősítő, 12. íróberendezés, 13. kamra

London: A kondenzor numerikus apertúrája 0,6, az objektív numerikus apertúrája 0,9) láttuk el. A mikroszkópi készítményt látható fényben állítjuk be, és anélkül, hogy a fókuszot változtatnánk, ultraibolya fényre kapcsolunk és így fényképezünk. Referens-rendszerként ék szolgál (a film gammája) és a filmet automatikusan regisztráló denzitométerrel értékeljük. Ennek a fényképezési módszernek a fontossága nem olyan nagy, mint a direkt fotometriáé, előnye viszont, hogy a mérések bármikor megismételhetők.



15. ábra. Mikrofoto-berendezés ultraibolya fényben történő fényképezéshez. A készülék ZEISS-monokromátorból és tükróptikával ellátott mikroszkópból áll

III. A mérések értékelése, mérési eredmények

Az ultraibolya fényben történő fényképezést a festetlen metszetek feloldó-képességének emelésére KÖHLER (1904) dolgozta ki. Valóban az ultraibolya fényben készült képek feloldása kétszer nagyobb, mint a látható fényben készült képeké (16., 17. ábra), sőt a fényképező lemez (265 $m\mu$ -nál) feketedéséből még a nukleinsav-tartalomra is következtethetünk.

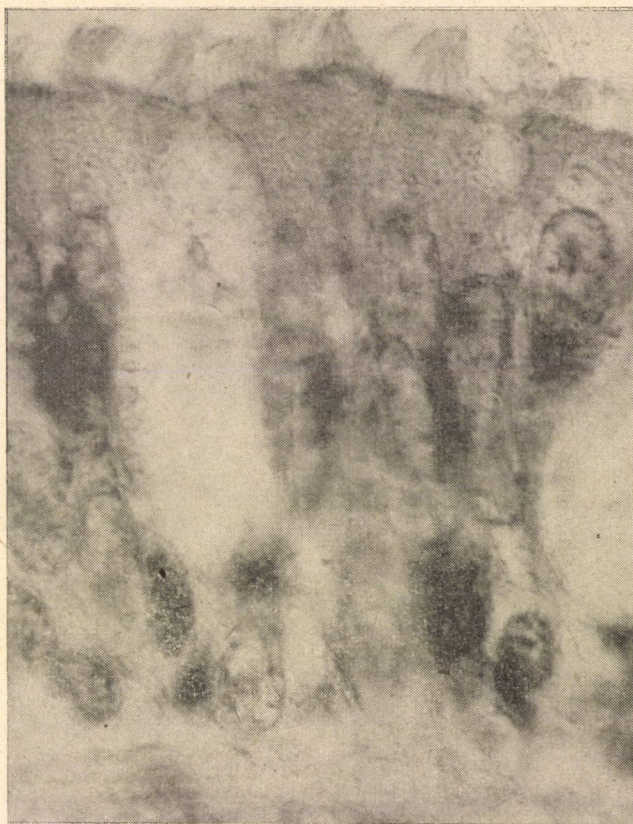
Mérési eredményeink értékelésekor ismernünk kell az extinkciós koefficiens (e_1). Ha látható fényben szemikvantitatív méréseket végzünk, elegendő az eredményeket önkényes egységekben ábrázolnunk ($\bar{O}E = E \times F$). Ebben a képletben E az extinkció középértékét, F a területet jelenti. Ultraibolya fényben történő mérésekkor mindenekelőtt a nukleinsavak mennyiségi meghatározása a célunk. Ha a nukleinsav extinkciós koefficiense 20, akkor az összmenyiség a következő képletből számítható ki: $M = \frac{E_{265} \cdot F}{20}$, ahol F a területet cm^2 -ben és E_{265} a 265 $m\mu$ hullámhossz esetén mért extinkciók középértéke.

Egy sejt átlagos extinkciójának meghatározására szolgáló eljárást a saját automatikusan regisztráló méréseink esetén a 18. ábrán ábrázolunk.



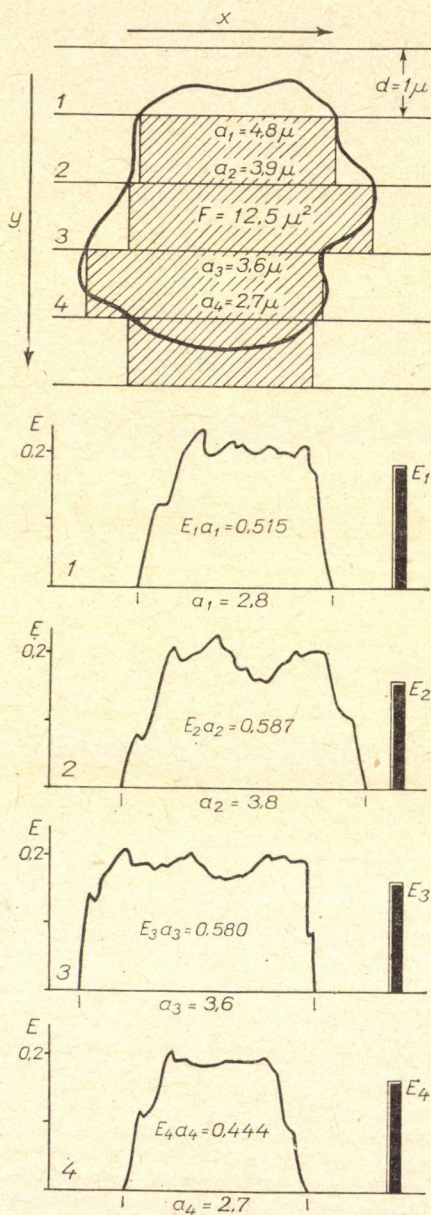
16. ábra. 265 $m\mu$ hullámhosszúságú fényben fényképezett festetlen emberi bőrhámsejtek

A mért extinkciók összegéből az átlagos extinkciót és a területet is megkapjuk. A 19. ábrán mutatjuk be emberi spermium ilyen extinkciós görbéjét. Egyes sejtek nukleinsav mennyiségének kvantitatív meghatározása kielégítő eredményekhez vezetett, amelyek más független módszerrel (kémiai meghatározás) egyeznek. Ez az egyezés azt mutatja, hogy metodikai kikötéseink helye-



17. ábra. 265 $m\mu$ hullámhosszúságú fényben fényképezett emberi bronchusnyálkahártya csillósörös hám- és kehelysejtjei

sek. Amint az 1. táblázatból látható, anyagok egész sorára érvényesnek találtak a nukleinsav tartalom és a kromosoma-szám közötti korreláció törvényét (haploid, diploid) és az értékek a kémiai meghatározással is egyeznek. Ezzel kapcsolatban arra is utalnunk kell, hogy az ultraibolya fotometria az egyetlen módszer, amellyel a nukleinsavtartalom az egyes sejtekben meghatározható, mert a kémiai vizsgálatokban csak integrált középértékeket kapunk. A középérték pedig könnyen csábít arra a következtetésre, hogy az ép sejtek DNS-tartalma állandó (DNS-állandóság törvénye). Ha azonban az egyes értékeket

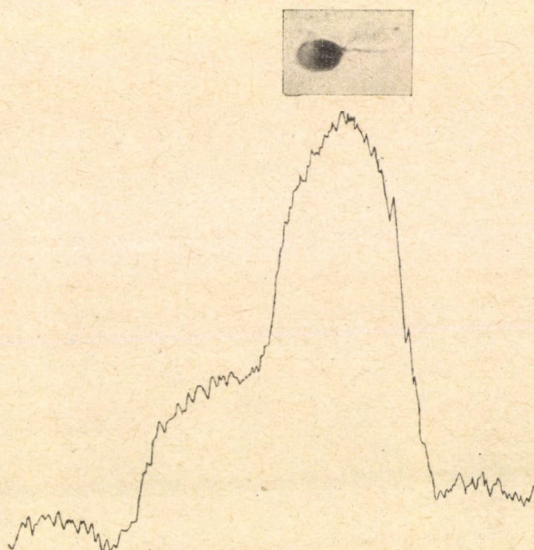


18. ábra. A „scanning”-mérések kiértékelése vázlatosan. Az ábra felső részén vázlatosan sejt-magot ábráztunk. A mérésvonalakat 1—4 számokkal jelöltük

d = a mérési vonalak távolsága, $a_1 - a_4$ a mérési vonalak hossza, F = a planiméterrel mért terület. Az ábra alsó részén az $a_1 - a_4$ = mérési vonalakkhoz tartozó extinkciókat ábráztuk. Oldalt az extinkciók középértékét ($E_1 - E_4$) ábráztuk

figyeljük, világossá válik, hogy a mérés eredmények a GAUSS-görbe alakjában a középértékektől szórnak és az eltérés magánál a spermiumnál 50%-ig rúghat.

Egyes tumorsejtekben (20. ábra) normális sejtekhez viszonyítva nagyon nagy nukleinsav-értékeket találunk. Ezért megvizsgáltuk, hogy mennyire visz közel bennünket pl. a gallocyaninnal festett vagina-kenetben az objektív fotometriai diagnózis a tumorsejtek felismeréséhez. Eddigi eredményeink

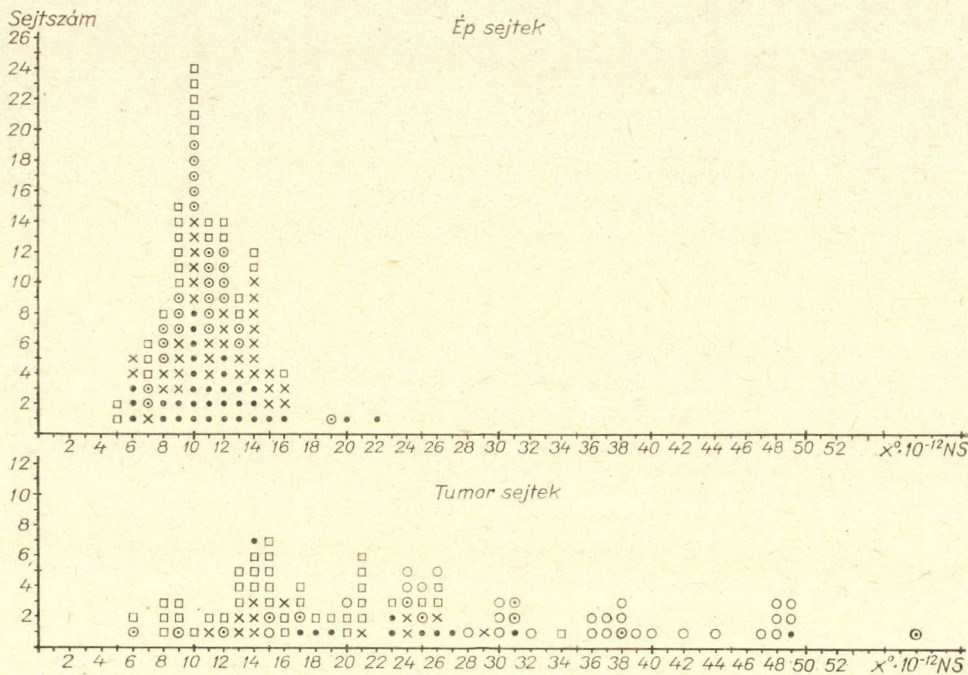


19. ábra. Felül emberi spermium 265 $m\mu$ hullámhossznál felvett képe. Alul a spermium hossz-
tengelyén keresztül felvett görbe

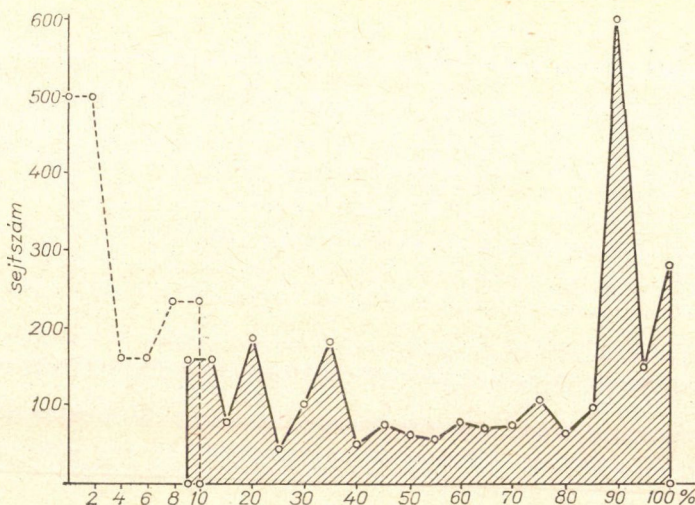
biztatóak és, mint a 21. ábrán láthatjuk, a tumorsejtek nukleinsav-értékei az esetek 90%-ában nagyobbak, mint a normális szöveteké. Ilyen módon a nukleinsavak elméleti kutatása gyakorlati jelentőségűvé válhat.

A sejtek anyagainak ultraibolya fényben történő kvalitatív vizsgálatára számos lehetőség van (22. ábra). Különbséget tehetünk tiszta fehérje spektrum (abszorpciós maximum 280 $m\mu$ -nál, amelyet a tyrozin és a tryptophan tartalom okoz) és nukleinsavspektrum között, amelynek csúcsa 265 $m\mu$ -nál van. Ha a nukleinsav görbén 280 $m\mu$ -nál találunk második csúcsot, az fehérje jelenlétére, ha 290 $m\mu$ -nál, az hiszton-típusú fehérje jelenlétére utal. Ezenkívül hasonló módon a pajzsmirigy-kolloidban levő diodtyrozin (330 $m\mu$ -nál) kimutatása is lehetséges.

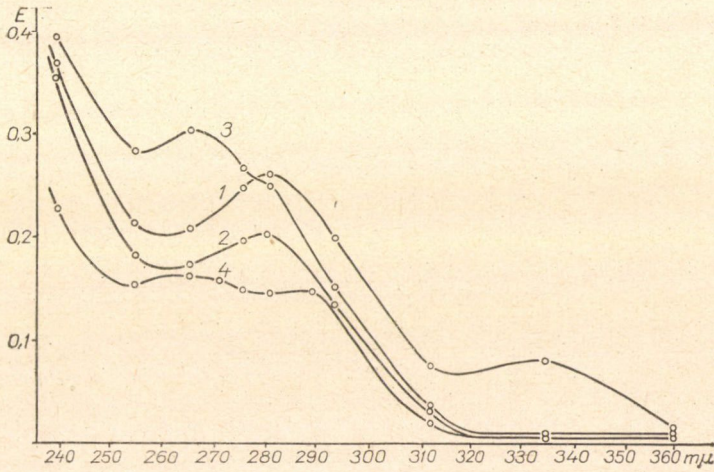
A látható fényben történő citofotometria esetében számos kvantitatív és specifikus festés áll rendelkezésünkre, amelyek fotométer segítségével szemi-
kvantitatívan kiértékelhető. Biztos, hogy a jövőben a lehetőségek még nagyobbak lesznek. Itt mindenképp néhány használható festési módszert kell megneveznünk.



20. ábra. Ép és rákos sejtek nukleinsav tartalma (nem korrigált értékek).
 Ép sejtek: . = ép szájnyálkahártya-epithel, × = csillószőrés hám, ⊙ = a sratum basale sejtjei, □ = alveolaris epithel
 Tumorsejtek: . = laphámrák, S 214/57, × = laphámrák K. G., ⊙ = laphámrák N. R., □ = kissejtes carcinoma, o = alveolaris carcinoma

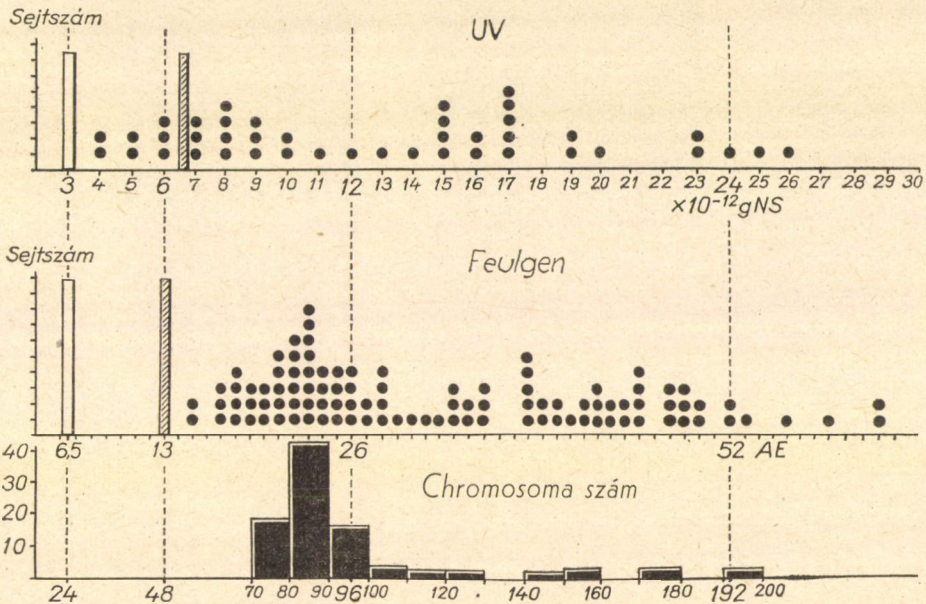


21. ábra. Ép és különböző tumoros sejtek nukleinsav tartalmának százalékos értékei bizonyos önkényesen választott határon belül. — — — — — = ép sejtek, — . — . — = különböző tumorsejtek



22. ábra. Néhány a biológiában előforduló ultraibolya abszorpciós görbe

- 1. pajzsmirigy kolloid (fehérje és thyreoglobulin), 2. parafollicularis sejtek, cytoplazma (fehérje),
- 3. pajzsmirigy folliculus sejtek cytoplazmája (nukleinsav és fehérje), 4. nucleolus (nukleinsav és histon)



23. ábra. HELA-sejtek ultraibolya fotometriával és a FEULGEN-fotometriával kapott eredményei. (Asu 1954, Chromosomaszám vizsgálat) (SANDRITTER és SCHIEMER, Verh. dtsh. Ges. der Path. 1958)

□ = spermiumok értékei, □·□·□ = thymus lymphocyták értékei, = HELA-sejtek értékei

1. FEULGEN reakció a desoxyribonukleinsav kimutatására (570 $m\mu$, SAIFF, 1955).

2. Gallocyanin-krómtímó festés a ribonukleinsav és desoxyribonukleinsav együttes kimutatására (575 $m\mu$, EINARSON 1951, SANDRITTER és mts. 1954, DIEFENBACH és mts. 1954).

3. MILLON reakció a tyrozin (490 $m\mu$) és a tyrozin és a tryptophan együttes kimutatására (365 $m\mu$, SWIFT és RASCH, 1954).

4. Arginin reakció (510 $m\mu$, Baker 1947).

5. FAST green-festés a hisztontípusú fehérjék kimutatására (635 $m\mu$, ALFERT és mts. 1953).

6. Az SS- és SH-csoportok kimutatása (585 $m\mu$, BAHR 1957).

A 23. ábrából láthatjuk, hogy a festési módszerek is jól egyező eredményeket adhatnak. Ez a példa továbbá a DNS-tartalom és a kromosoma-szám közötti szoros korrelációt is mutatja.

A kvantitatív fotometriai módszerek áttekintése azt mutatja, hogy ez a kutatási irány nagy fejlődés előtt áll, különösen akkor, ha a jövőben növekvő mértékben sikerül más hisztokémiai reakciókat (szénhidrátok, lipidek, enzimek) is kvantitatív alapra helyezni. A hisztokémikus a jövőben éppen úgy nem nélkülözheti a citofotometriai módszereket, ahogy a biokémikusnak mindennapi kutatásaiban állandóan alkalmazott módszer a fotometria.

IRODALOM

- ALFERT, M. és J. O. GESCHWIND: Proc. Nat. Acad. Sci. **39**, 991 (1953).
 BAHR, G. F.: Acta Radiol. (Stockholm) Suppl. 1957. S. 147.
 BAKER, J. R.: Quart. J. Micr. Sci. **83**, 115 (1947).
 BLOUT, E. R.: Advances in Biol. Med. Phys. **3**, 285 (1953).
 CASPERSSON, T.: Cell Growth and Cell Funktion, W. W. Norton N. Y. 1950.
 CASPERSSON, T.: Scand. Arch. Physiol. **73**, Suppl. 8.
 CASPERSSON, T.: Experientia **11**, 45 (1955).
 DAVIES, H. G. és P. M. B. WALKER: Progr. Biophys. Biophys. Chemistry **3**, 195 (1953).
 DAVIES, H. G. WILKINS, H. F. és LA COUR, L. F.: Quart. J. Micr. Sci. **95**, 271 (1954).
 DIEFENBACH, H. és SANDRITTER, W.: Acta Histochem. **1**, 55 (1955).
 DYSON, J.: Proc. Roy. Soc. **104**, 170 (1950).
 EINARSON, L.: Acta Path. Scand. **28**, 82 (1951).
 ENGSTRÖM, A.: Progr. Biophys. Biophys. Chem. **1**, 164 (1950).
 GLICK, D. A., ENGSTRÖM, A. és B. G. MALMSTRÖM: Science **114**, 253 (1951).
 HSHU, T. C.: Texas Report Biol. Med. **12**, 833 (1954).
 JANSSEN, M. T.: Exp. Cell. Res. **15**, 239 (1958).
 KING, R. J. és E. M. ROE: J. Roy. Micr. Soc. **73**, 82 (1953).
 KÖHLER, A.: Zschr. wiss. Mikr. **21**, 129 (1904).
 LISON, L.: Science **118**, 382 (1953).
 LISON, L.: Acta Anat. **10**, 33 (1950).
 NAORA, H.: Science **114**, 279 (1951).
 NAORA, H.: Science **116**, 248 (1952).
 NURNBERGER, J. I.: Ultraviolet microscopy and microspectroscopy. In: R. C. Mellors: Analytical Cytology, Mc Graw Hill, N. Y. 1955.
 SANDRITTER, W., DIEFENBACH, H. és F. KRANTZ: Experientia **10**, 210 (1954).
 SANDRITTER, W.: Ultravioletmikrospektrophotometrie, in Hdb. d. Histochemie I, 220 (1958). A. Fischer, Stuttgart.
 SANDRITTER, W., SCHIEMER, H. G. ALT, W., MÜLLER, D. és E. BEHROUZI: Frankf. Zschr. Path. **69**, 167 (1958).
 SANDRITTER, W. és D. MÜLLER: Experientia **15**, 158 (1958).

- SCHAUENSTEIN E., BAYZER, H. és K. KRONEGGER: Monatshefte Chemie **86**, 637 (1955).
 SCHIEMER, H. G., ALT, W. és W. SANDRITTER: Acta Histochem. **4**, 325 (1957).
 SCHWARZSCHILD, K. és W. VILLIGER: Astrophys. J. **23**, 284 (1906).
 SWIFT, H. H.: Physiol. Zool. **23**, 169 (1950).
 SWIFT, H. H.: In: "The Nucleid Acids", Vol II. Academic Press N. Y. S. 50.
 SWIFT, H. H. és E. M. RASCH: J. Histochem. Cytochem. **2**, 456 (1954).
 THORELL, B.: Studies on the formation of cellular substances during blood cel production. H. Kimpton, London 1947.
 UBERM F. M.: Am. J. Bot. **26**, 799 (1939).
 WALKER, P. M. B.: Ultraviolet Absorption Techniques In: Physical Techniques in Biological Res. III. 401 (1956).

I. táblázat

Nukleinsavak mennyiségi meghatározása az uv-mikrospektrofotometria segítségével

Sejtfajta	n	η^2	DNS $\times 10^{-12}g$	σM \pm	RNS $\times 10^{-12}g$	arány 265/280	kémiai DNS	RNS meghat.
Ember spermium " (R) thymus " (R)	35	10	3,28	0,086		1,80	2,7 3,4	—
	15	11	3,12	0,074	0,16	1,69	—	—
	26	55	7,29	0,059		1,56	6,8°	—
	34	30	6,80	0,24	0,48	1,57	7,5°	—
Bika spermium thymus " (R)	29	39	3,25	0,09		1,5	3,7 2,8	0,5
	21	33	6,85	0,11		1,75	6,4	
	27	35	6,55	0,16	0,30	1,79		
Nyúl spermium thymus	26	32	3,25	0,10		1,40	3,1 ×	
	26	50	5,75	0,15		1,58	5,3⊕ 7,2	
Patkány spermium thymus	18	14	3,11	0,19		1,31		
	19	25	6,05	0,08		1,60	6,60 6,05°	
Kakas spermium vörösvérsejt " (R)	24	10	1,59	0,05		1,70	1,26 1,10	0,09
	31	15	3,31	0,07		1,64	2,4 2,56	
	22	19	3,30	0,1	0,01	1,62	2,2	
Pisztráng spermium vörösvérsejt " (R)	24	8	2,52	0,07		1,75	2,5	
	21	32	5,61	0,20		1,86	4,8 5,3	
	21	29	5,46	0,23	0,15	1,36		
Rana temp. " (R)	22	37	9,15	0,33		1,46	8—9	
	21	42	8,85	0,33	0,30	1,54		
Bufo vir. spermium vörösvérsejt " (R)	20	37	5,43	0,18		1,31		
	26	50	12,88	0,33		1,54		
	25	52	12,12	0,29	0,76	1,40		

n = sejtszám
 (R) = 1 mg/ml, 37°, 3 óra ribonukleáze emésztés
 x = uv-spektrográffal nyert értékek
 ° = leukocyták értékei
 • = vese-értékek
 × = máj-értékek