

Metode autohistoradiografice în cercetarea biochimiei și fiziologiei celulare

Dr. Z. Uray

Lucrare efectuată în Secția de medicină nucleară, Cluj
(conducător: conf. T. Holan)

Atomii sau moleculele marcate introduse în organismul animal sănt metabolizate de către celule și se încorporează în structurile biologice în același mod ca și atomii sau moleculele inactive corespunzătoare. Prezența radioizotopilor se poate detecta în celulă, datorită acțiunii radiațiilor emise de aceștia, asupra emulsiilor fotografice sensibile, care sănt puse în contact cu țesuturile cercetate, prin diferite metode. În felul acesta, prin metoda autohistoradiografică (AHR) (4, 10, 13, 14, 28) se poate urmări, în intimitatea țesuturilor animale, localizarea substanței marcate și, în combinație cu metodele histochimice, metabolismul și căile ei de excreție. Prin aceasta se realizează un important pas în cunoașterea aprofundată a biochimiei și fiziologiei celulare și tisulare.

Principii fotografice. Emulsiile nucleare sănt alcătuite din cristale de AgBr, suspendate în gelatină, în concentrație de 90—95%, cristalele avînd un diametru de 0,2 μ (filmul Röntgen are o concentrație de AgBr de 30%, diametrul granulelor fiind de 0,5—5 μ). Există variante tipuri de emulsiile nucleare, dintre care amintim: NTA, NTB, NTB₂ și NTB₃ (Eastman, Kodak S.U.A., ultimele două fiind cele mai indicate pentru cercetările de biologie: AR-10 (Kodak Ltd-Anglia), Ilford G5 (Ilford Ltd-Anglia), Nikfi F, Nikfi R. (U.R.S.S.) etc.

Institutul de fizică atomică din București produce 3 tipuri de emulsiile nucleare: I.F.A. EN₁, I.F.A. EN₂ și I.F.A. ENF₁. Pentru autoradiografiile executate în instituția noastră utilizăm emulsiile I.F.A. EN₁ de sensibilitate medie, și I.F.A. EN₂, de sensibilitate ridicată, obținând rezultate foarte bune (7, 8, 9, 12, 16). Emulzia I.F.A. ENF₁ are o granulație foarte fină (0,07 μ) și o sensibilitate medie, fiind indicată pentru autohistoradiografie electronomicroscopică (19).

Metoda AHR se bazează pe proprietatea halogenurii de argint din emulzia fotografică, de a se reduce la argint metalic sub acțiunea radiațiilor ionizate incidente (1, 30). Electronii eliberați de radiațiile α și β din microcristalele de AgBr, fiind trecuți în banda de conduction, migrează

spre centrele de sensibilitate ale cristalelor, unde sunt captați. Ca urmare a creșterii densității de sarcină negativă în acele regiuni, are loc o deplasare a ionilor pozitivi de Ag din rețea și o reacție de neutralizare $\text{Ag}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}$ cu depunere de argint metalic. Deci particula ionizată, descompunând pe parcursul său halogenura de argint, lasă în emulsie o imagine latentă a urmei sale. Developarea are rolul de a transforma imaginea latentă în imagine vizibilă.

Argintul neutralizat de radiația incidentă catalizează o reacție de depunere masivă a argintului metalic, sub forma de granule vizibile. Fixarea imaginii se face prin spălare cu o soluție apoasă de tiosulfat de sodiu, care formează cu AgBr un complex solubil în apă, îndepărțind, astfel, halogenura neimpresionată.

Principii biologice. Metoda comportă, în mare, doi timpi importanți și anume: pregătirea histologică a preparatului și realizarea AHR. Factorii care asigură realizarea unei autoradiografii de calitate sunt mulți (7, 11, 17, 18, 25, 28). Desigur că, în primul rînd, este vorba de cunoașterea detaliată a tehnicii experimentului pe țesut viu, fiind deci necesară buna alegere a substanței chimice utilizate în experiment și a radioizotopului de marcare, în funcție de tropismul său chimic și de caracterele sale metabolice (8, 9, 12, 20). Este necesară o activitate suficientă pentru a obține o autoradiografie utilizabilă, dar nu prea mare, pentru a nu supradauga în țesutul cercetat, efectele radiobiologice ale acestuia. Modul și timpul util de sacrificare a animalului de experiență trebuie să țină cont, de asemenea, nu numai de necesitățile experimentului propriu-zis, de caracteristicile fizice și chimice ale substanței marcate, ci și de modificările histopatologice locale pe care le produc radioizotopii (17).

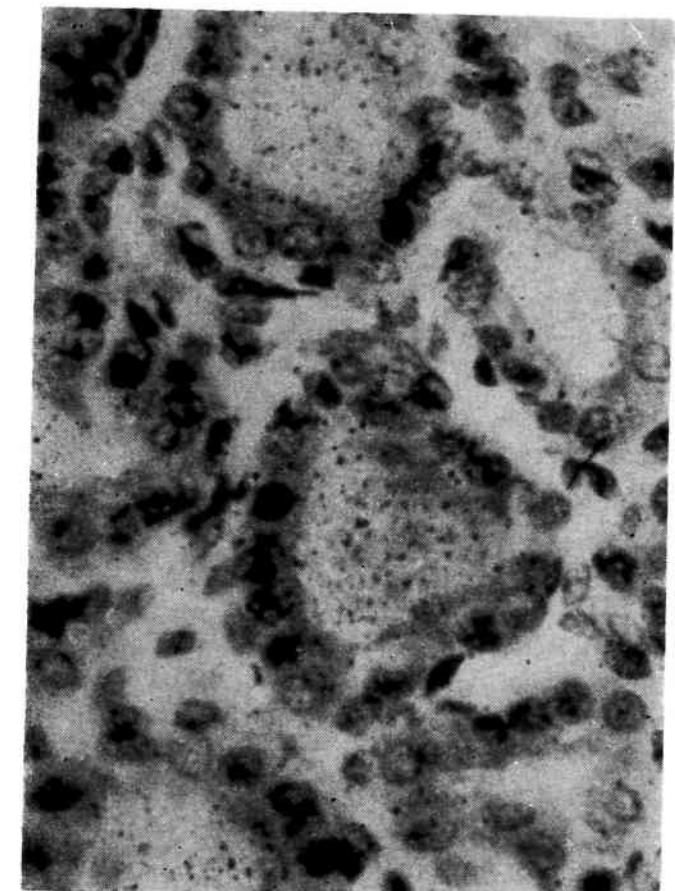


Fig. 1. — Tiroidă de șobolan. Autoradiografie executată cu emulsie lichidă I.F.A. EN₁, prin metoda îmbrăcării. Sursa radioactivă I^{131} ($\beta\text{-}\gamma$) injectat intraperitoneal, sub formă de Na I^{131} . Sacrificarea animalului la 24 de ore. Timp de expunere 18 zile. Postcolorare cu hematoxilină-eozină.

adăuga în țesutul cercetat, efectele radiobiologice ale acestuia. Modul și timpul util de sacrificare a animalului de experiență trebuie să țină cont, de asemenea, nu numai de necesitățile experimentului propriu-zis, de caracteristicile fizice și chimice ale substanței marcate, ci și de modificările histopatologice locale pe care le produc radioizotopii (17).

Procedee histologice. Metoda histologică va fi aleasă în funcție de scopul cercetării, în sensul că fiecare timp histologic, inclusiv colorarea, trebuie adaptat, atât țesutului pe care se lucrează, obiectivului urmărit în experiment, caracteristicilor fizice și chimice ale substanței marcate utilizate, cît și condițiilor deosebite, cerute de cel de al doilea timp al metodei, realizarea autoradiografiei (7, 11, 19). Reactivii folosiți în timpul fixării, deshidratării, incluzierii și al deparafinării, pot dizolva radioizotopul din țesutul cercetat, deteriorînd cantitativ și calitativ autora-

diografiile sau nepermittînd evidențierea histochimică a substanței ceritate. Astfel, la fixare, cloroformul dizolvă complexele lipidice ale cito-plasmei, formolul neutralizat (Baker) alterează structurile nucleare, glicogenul, fierul, guanina și ureea, nepermittînd aplicarea metodei pentru colorarea acizilor nucleici (verde metil-pironină) fiind, în schimb, un fixator bun pentru studiul grăsimilor și al lipoizilor; fixatorul Bouin + Masson dăriorează hematiile și mitocondriile, dar este indicat în cercetările topografice și de citologie generală, fiind un fixator general acceptabil (acizi nucleici, mucopolizaharide acide și neutre etc.) (29). Pentru izotopii solubili în apă se recomandă includerea în parafină, iar pentru substanțele marcate liposolubile, includerea în Carbowax (17) sau secțiuni la gheată (23, 24). Din experiența noastră a reiesit că una dintre cele mai bune metode, care ține cont de condițiile arătate mai sus, este metoda rapidă (7) care comportă următorii timpi: fixare în lichid Carnoy 15—30 minute sau Bouin—Masson 8—18 ore; deshidratare în două băi de acetonă a către 20 de minute, urmată de o baie intermedieră (xilol-acetonă-parafină în părți egale timp de 45 de minute, la 56°), apoi două băi de parafină (45—60 de minute la 56°) turnare în bloc, secționare [secțiuni de 5—7 μ grosime, cu suprafață perfect netedă; neregularitățile de suprafață dau artefacte, producînd autodeveloparea emulsiei (18), datorită tracțiunii la aceste niveluri și schimbării relației spațiale dintre țesut și emulsie]. Secțiunile se montează pe lame pregătite cu gelatină și se deparafinează în 3 băi de xilol și 3 băi de alcool 95% a către 15 minute.

În ultima vreme, în tehnica AHR (23, 24) se utilizează cu predilecție fixarea pieselor prin înghețare rapidă, la —170°, în izopentan răcit cu azot lichid. După fixare, variantele tehnicii histologice sunt multiple: după deshidratare chimică sau liofilizare, piesa se include în parafină; după fixare, țesutul se secționează în criostat la —20 pînă la 30° (secțiuni de 3—5 μ) se montează pe lamă și se deshydratează chimic (alcool, acetonă, butanol la —70° 1—24 de ore) sau prin liofilizare la —20°, cu un Vacuum de 1×10^{-5} mm Hg, 1—24 de ore. După uscare, urmează procesul de autoradiografie, lamele fiind expuse, în întuneric la —20°, în exicator.

După expirarea timpului de expunere și după developare, urmează postcolorarea secțiunii (7, 12), prin stratul de gelatină, cu coloranți uzuali ca hematoxilină-eozină (hematoxilină Mayer 8—10 minute, apă curgătoare 30 minute, eozină-eritrozină Romeis 10 minute) sau cu coloranți histochimici specifici. Postcolorarea are avantajul că evită spălarea izotopului din obiectul cercetat și împiedică reacția chimică dintre colorant și emulsie, care poate duce la developarea emulsiei (histochogramă). În afară de aceasta, procedeul fotografic decolorează mai mult sau mai puțin secțiunile precolorate, cu excepția colorației (17) cu eozină.

După colorare, lamele se montează obișnuit (după metoda rapidă) prin: două băi de alcool 95%, către 2—5 minute; o baie carboxilol 5 minute, clarefiere în xilol 5—10 minute și montare în balsam de Canada la 37°. În metoda „Stripping-film”, după postcolorarea lamelor, mulți autori folosesc, pentru îndepărtarea stratului de gelatină, o digestie enzimatică cu tripsină (10 mg tripsină cristalizată în 100 mg, tampon fosfat Sorenson, cu pH 7,6 la 37°), în soluție 0,01%, timp de 6—8 minute

(2). Reacția se oprește cu apă distilată. Lamele se usucă și se montează sau se examinează direct la imersie.

Tehnica autoradiografiei. În efectuarea autoradiografiilor, se folosesc mai multe metode tehnice și anume : metoda de contact (Apposition), metoda montării (Mounting), metoda cu emulsii peliculare (Stripping-film), metoda îmbrăcării (Coating), metoda cufundării (Dipping) și metoda inversării (Inverted coating), ultimele trei metode folosind emulsii nucleare lichide

Metoda de contact servește pentru localizarea aproximativă a substanței radioactive în interiorul țesutului. În acest procedeu, sursa tisulară și emulsia fotografică sunt ținute în contact prin presare. După un timp de expunere convenabil, filmul este îndepărtat și prelucrat. Această metodă se utilizează în special pentru probe de dimensiuni mari.

In metoda montării, proba este așezată direct pe suprafața emulsiei fotografice, unde rămîne fixată în tot timpul prelucrării fotografice și a colorării. Este o metodă foarte ușor de aplicat, dar are dezavantajul că preparatele histologice nu sunt atât de bune ca cele obținute prin celelalte metode (17). Etapele metodei sunt : montare, expunere, deparafinare, revelare și fixare, spălare, examinare la microscop cu contrast de fază sau, după spălare, colorare și montare.

Metoda cu emulsii peliculare folosește un film cu emulsie de 5 μ grosime, pe un strat protector de gelatină de 10 μ grosime. Această metodă este cea mai indicată pentru AHR cantitativă (3, 15) și, în același timp, în condiții optime, asigură o putere de rezolvare de 2 μ .

Tehnica. Montarea peliculei se face în următoarele etape : se degresează lamele ; pentru o bună aderență a secțiunii și a emulsiei, lamele sunt introduse în prealabil într-o soluție de gelatină 0,5% (gelatină 5 g, alaun de crom 0,5 g, apă ad 1 000 g) și apoi uscate. Se montează secțiunile pe lamă și se deparafinează. Pelicula fotografică, pusă pe o placă de sticlă, se taie cu ajutorul unei lame, la mărimea necesară, iar cu o pensetă se trage filmul de pe sticlă și se pune cu fața cu emulsie în apă distilată. Ladezlipirea emulsiei peliculare de pe lamă se constată un fenomen de luminiscență (triboluminescență), care mărește fondul general și care, în cazul dezlipirii treptate, produce linii cenușii pe autoradiografie (18). De aceea pelicula va fi trasă uniform și încet. Pentru o întindere perfectă și o aderență bună, fără bule pe lamă, în loc de apă distilată, este recomandabilă punerea peliculei pe suprafața unei soluții de gelatină 2% la 37° care conține și BrK 0,2%. În manipulările peliculei fotografice, trebuie avut în vedere faptul că, datorită presiunilor mecanice, locurile unde aceasta a fost atinsă se autodevelopează. După 2—4 minute de îmbibare, lama cu secțiunea activă se introduce în soluția de îmbibare și se ridică o dată cu pelicula. După aranjarea atentă a peliculei pe țesutul activ, lamele se usucă. După uscare, acestea sunt introduse în cutii speciale, închise ermetic, care conțin și substanțe higroscopice (CaCl, silicagel) și sunt puse în frigider, la 0—4°, ferite de umiditate ; aici se face expunerea.

Metoda cu emulsii lichide se folosește pentru autoradiografia secțiunilor histologice și a frotiurilor. În cazuri speciale obiectele foarte mici (celule separate, microorganisme, virusuri, macromolecule), se amestecă direct cu emulsia lichidă. Această metodă asigură cea mai bună putere de rezoluție.

Tehnica. Lamele se degresează și se acoperă cu un strat de gelatină; după uscare, se fixează piesa pe lamă și se deparafinează. Lama se introduce apoi din nou în soluția de gelatină, care formează, astfel, un strat protector, de $1-2 \mu$ grosime, care asigură aderența emulsiei pe lamă. Folosirea colodiului sau a soluției de plexiglas în locul gelatinei produce autodevelopări spontane la nivelul liniilor de tracțiune. În afară de aceasta, plexiglasul împiedică postcolorarea pieselor. După uscarea lamelor, emulzia proaspătă, păstrată tot timpul la $0-4^\circ$, ferită de umiditate, este încălzită la 37° pe baie de apă (încălzirea emulsiei peste 50° duce la autodeveloparea ei) și se diluează (10 ml emulzia + 1 ml soluție de finisare + 10 ml apă distilată). Compoziția soluției de finisare este: 75 ml alcool etilic 95% + 25 ml glicerină + 100 ml acetat de crom 1% (19) cu ajutorul unei pipete, se pune pe lamă o cantitate de emulzia astfel diluată, și se întinde peste secțiunea histologică cu o pensulă fină sau cu o baghetă de sticlă. Toate manipulările trebuie să decurgă la 37° , fapt pentru care este necesar ca instrumentele cu care se lucrează (pipete, vase, lame) să aibă aceeași temperatură. Lamele se usucă și apoi la expunere în frigidier, la $0-4^\circ$, în prezența substanțelor higroscopice. Mulți autori recomandă expunerea în atmosferă de CO_2 la 0° , ferită de umiditate și lumină.

In tehnica cufundării (Dipping), lama deparafinată și rehidratată se încălzește la 37° și se introduce, ținută în poziție verticală, în emulzia lichidă, încălzită la $37-38^\circ$ pe baie de apă. După 2-3 secunde lama se scoate, păstrându-se în poziție verticală, pentru a se scurge excesul de emulzia timp de (10 secunde la 37°). Se șterge apoi dosul lamei cu un tifon și se pune în poziție perfect orizontală la uscare (10-20 de minute). Lamele uscate sunt împachetate, ferite de umiditate, în atmosferă de CO_2 , și puse în frigidier la 5° , pentru expunere. Această metodă este foarte ușor de realizat, dind rezultate satisfăcătoare ; este cea mai recomandabilă pentru începători.

In tehnica inversării (Inverted coating method) secțiunile fixate și deshidratate (după fixare la temperatură joasă și dehidratare prin liofilizare) sunt acoperite cu un strat subțire de celoidină. Peste acesta se pune un strat subțire de emulzia lichidă ; se usucă și apoi se aşază la expunere. După terminarea timpului de expunere, se dezvoltă și se fixează autoradiografia, apoi preparatul se ridică de pe lamă cu ajutorul unei lame de ras și se întoarce cu 180° , în așa fel încât secțiunea histologică să ajungă la suprafața lamei. Preparatul se colorează în funcție de scopul urmărit și se montează.

În ultimul timp se folosește tot mai frecvent *metoda AHR cu strat dublu de emulzie*. Aceasta permite identificarea, pe aceeași secțiune, a înglobării și repartizării a două substanțe chimic diferite, marcate una cu un izotop emițător de radiații β de energie foarte mică ($H-3$ cu $E_{max.} = 0,018$ Mev), iar cealaltă cu un emițător β de energie mai mare ($C-14$ cu $E_{max.} = 0,156$ Mev. sau $S-35$ — cu $E_{max.} = 0,167$ Mev). După developarea primului strat de emulzia, la care apar imaginile ambelor substanțe marcate, lama se acoperă cu un nou strat de emulzia, separat de primul prin celoidină. După a doua developare apare imaginea repartizării izotopului cu radiații β mai puternice.

Este evident că toate metodele trebuie să respecte condițiile de cameră obscură. Cu emulziile nucleare I.F.A. se lucrează la un filtru

Agfa 117 sau 118, verde gălbui, distanța minimă între lama cu emulsie și lampă fiind de un metru (19).

Dintre metodele descrise, fiecare are avantajele și dezavantajele ei. Considerăm că pentru AHR cantitativă, este indicată tehnica cu emulsiile peliculare (*Stripping-film*). Pentru studiul repartizării celulare a izotopilor se folosește metoda cu emulsiile lichide (Coating), care asigură o putere de rezoluție mai bună, însă nu permite evaluarea cantitativă a autoradiogramelor.

Timpul de expunere depinde de tipul și energia radiațiilor emise de substanța marcată și de concentrația substanței radioactive incorporate în secțiunea cercetată. Există multe formule pentru calcularea timpului de expunere. În general, se admite că secțiunile care sunt făcute dintr-un organ cu concentrație tisulară de $0,2 \mu$ Curie Ag I^{131} , de $0,4 \mu$ Curie/g P^{32} , sau de $0,05 \mu$ Curie/g C^{14} necesită un timp de expunere de 15 zile (14). Timpul de expunere (t) se poate calcula, cu aproximare, după formula :

$$t \text{ (zile)} = \frac{T}{0,693} \log \frac{A_0}{A_0 - L}$$

în care A_0 este activitatea inițială în μ Curie a izotopului prezent în piesa respectivă, T este timpul de înjumătățire (în zile) al izotopului respectiv, iar L este cantitatea de izotopi, în μ Curie, dezintegrată în cursul expunerii.

Unii autori (17, 18) măsoară activitatea secțiunilor cu un contor Geyger-Müller, și, pe baza impulsurilor primite, determină timpul de expunere. De exemplu, pentru I^{131} , măsurând activitatea secțiunii cu un contor G.-M. cu fereastră terminală VAZ 310 la un numărător Vakutronik, la 100 impulsuri/min. este nevoie de o expunere de 2 săptămâni. Practica arată, însă, că cel mai bun lucru este ca, la diferite intervale de timp, să se dezlopte cîte o lamă, pentru orientare. Această metodă are avantajul că, datorită tropismului chimic pentru diferite celule sau formațiuni subcelulare, concentrația substanței radioactive din cadrul aceleiași secțiuni necesită diferite timpuri de expunere, iar materialul se poate prelucra diferențiat.

O informare în acest sens ne pot da autoradiografiile de contact făcute cu film Röntgen, care sunt ușor manipulabile și au o sensibilitate mai mare decît emulsiile nucleare. Cu ajutorul acestor filme, putem tatona timpul de expunere optim. Dacă acesta depășește timpul de 2 săptămâni, este necesară confectionarea unor autoradiografii de control, cu piese neradioactive (probe oarbe), pentru excluderea artefactelor, dat fiind faptul că emulsia își mărește fondul de înnegrire și își reduce claritatea în cursul expunerii, proporțional cu timpul de expunere (3).

Developarea autoradiografiilor se face în cameră obscură, respectând anumite condiții de timp, temperatură și pH. Developarea emulsiilor lichide și peliculare I.F.A. EN₁ și EN₂ se face în condițiile indicate de I.F.A. (19), cu mici modificări :

Compoziția revelatorului este : sulfit de sodiu 12 g, amidol 3 g, acid citric 1 g, BrK 0,5 g, apă ad 1 000 ml. Compoziția fixatorului : tiosulfat de sodiu 300 g, sulfit de sodiu 0,6 g, metabisulfit de potasiu 0,3 g, apă ad 1 000 ml.

În cadrul developării, o problemă pentru stratul de emulsie o constituie fazele apoase, în timpul cărora emulsia se înmoie și se poate deplasa pe suprafața preparatului. Pentru evitarea acestor deplasări în timpul spălărilor, este recomandabil, ca, după tratarea cu tiosulfat, înainte de a spăla în apă distilată, să se facă o trecere printr-o soluție

| Timpii revelării | Tempe- ratura (în °) | Timpul de prelucrare Emulsie | | Observații |
|-------------------|----------------------------|--|------------|------------------|
| | | Lichidă | Peliculară | |
| Îmbibare în apă | 5 | — | 1—2 | |
| Revelator rece | 5 | — | 2—3 | |
| Revelator | 18—22 | 5—7 | 5—15 | |
| Baie de oprire | | | | |
| Acid acetic 0,5 % | 18—22 | 1—2 | 2—5 | Se poate neglija |
| Baie de apă | 18—22 | 1 | 3—6 | |
| Fixator | 18—22 | De două ori timpul de clarificare (7—10 minute) | | |
| Spălare I | 18—22 | 1—2 | 2—4 | |
| Spălare II | 18—22 | 3—6 | 6—10 | Apă curgătoare |

de tiosulfat de sodiu 2% (18). Pentru evitarea deteriorărilor mecanice și pentru asigurarea developării în condiții optime a autoradiografiilor, utilizăm un dispozitiv propriu, care asigură developarea simultană a 40 de lame histologice (fig. 2).

Puterea de rezoluție este echivalentul cantității de detalii redate de imagine și este definită prin distanța minimă dintre două puncte de pe suprafața secțiunii, care emit radiații și care se pot distinge pe auto-

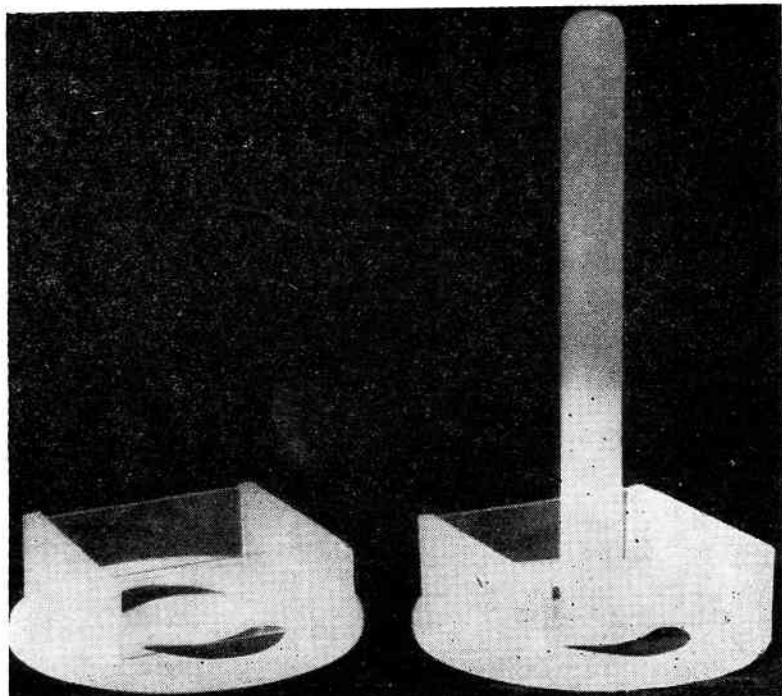
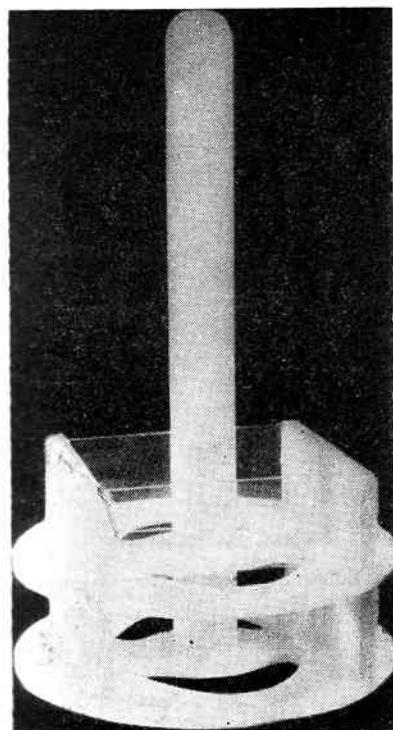


Fig. 2 (a și b). — Dispozitiv pentru developarea lamelor autohistoradiografice, confecționat din polimetacrilat de metil. El asigură prelucrarea fotografică simultană a 40 de lame histologice.

radiografii. Puterea de rezoluție este determinată de o serie de factori, dintre care amintim: relația spațială dintre sursa de radiații (secțiunea) și emulsia fotosensibilă, tipul și energia radiației ionizante, repartizarea substanței radioactive în țesut, caracteristicile emulsiei (concentrația de BrAg/diametrul granulelor, sensibilitatea limită la electroni, voal etc.) metoda și condițiile de expunere.

În cazul secțiunilor de 5 μ aplicând metoda cu emulsii peliculare și folosind ca element de marcare H³, puterea de rezoluție este de 2 μ ; în aceleași condiții cu C¹⁴ și S³⁵, puterea de rezoluție este de 3—5 μ .

A u t o h i s t o r a d i o g r a f i a c a n t i t a t i vă. Determinarea cantitativă a radioactivității din secțiunile biologice este bazată pe evaluarea efectului radiațiilor emise, asupra emulsiei nucleare (15, 30). Interacțiunea particulelor ionizante cu emulsia fotografică se evidențiază, fie prin precipitarea granulelor de argint (autoradiograma de contrast), fie sub forma apariției unor trasee (autoradiografii de traseu). În primul caz, evaluarea cantitativă se face prin numărarea granulelor pe unitatea de suprafață sau prin densitometria granulelor, în al doilea caz se numără traseele.

Densitometria se execută cu ajutorul microfotometrelor (6, 15) și citofotometrelor. Se proiectează imaginea mărită a ariei de cercetat, măsurându-se densitatea ei cu ajutorul unei celule fotoelectrice. Pentru evaluări densitometriche, cel mai bine se pretează AHR executată cu metoda de contact.

Numărarea granulelor este o metodă ușor realizabilă (15, 21). Pentru aceasta, se montează un micrometru în ocularul microscopului, cu ajutorul căruia se numără granulele de pe o unitate de suprafață. În cazul acestor măsurători, însă, grosimea emulsiei trebuie să fie uniformă. Eroarea metodei de $\pm 10\%$. În laboratoarele moderne utilizate, numărarea granulelor se execută cu numărătoare electronice. Se pot compara numai autoradiografii făcute strict în aceleași condiții tehnice. La AHR cantitativă, un rol important îl joacă cunoașterea și cercetarea fondului (*background*) (26). La autoradiografiile pregătite cu emulsie proaspătă, cu o tehnică histologică și autoradiografică perfectă, după developare se poate admite un fond de 10 granule /100 μ^2 — voal admisibil).

Posibilitățile cercetărilor AHR în biochimia celulară sunt nelimitate. Progresele radiochimiei au făcut posibilă marcarea celor mai variate molecule (baze purinice sau pirimidinice, hormoni, vitamine, enzime etc.), cu ajutorul cărora, folosind metoda AHR, se poate studia biochimismul intim al celulei.

Metoda AHR are însă, și unele dezavantaje, dintre care amintim următoarele: se pot folosi numai izotopii emițători de radiații α sau β moi, cu o putere de rezoluție bună; timpul experienței este relativ lung; metoda necesită frecvent doze suprafiziologice de radioizotopi (în medie de 0,5—5 μ Curie/g corp de animal) ceea ce reduce posibilitatea folosirii cercetărilor AHR în experimentul cronic (16, 27). În experimentul acut, însă această metodă s-a dovedit indispensabilă cercetărilor moderne de biochimie și fiziologie celulară.

În biochimia și patologia umană, datorită dozelor mari necesare, se lucrează pe culturi de țesuturi prelevate prin biopsie (20), substanțele

marcate fiind introduse în mediile de cultură ; după expirarea timpului de incubare, aceste ţesuturi se prelucrează autohistoradiografic sau, în caz de doze mari aplicate în scop terapeutic, prin biopsii de ţesut marcat *in vivo*.

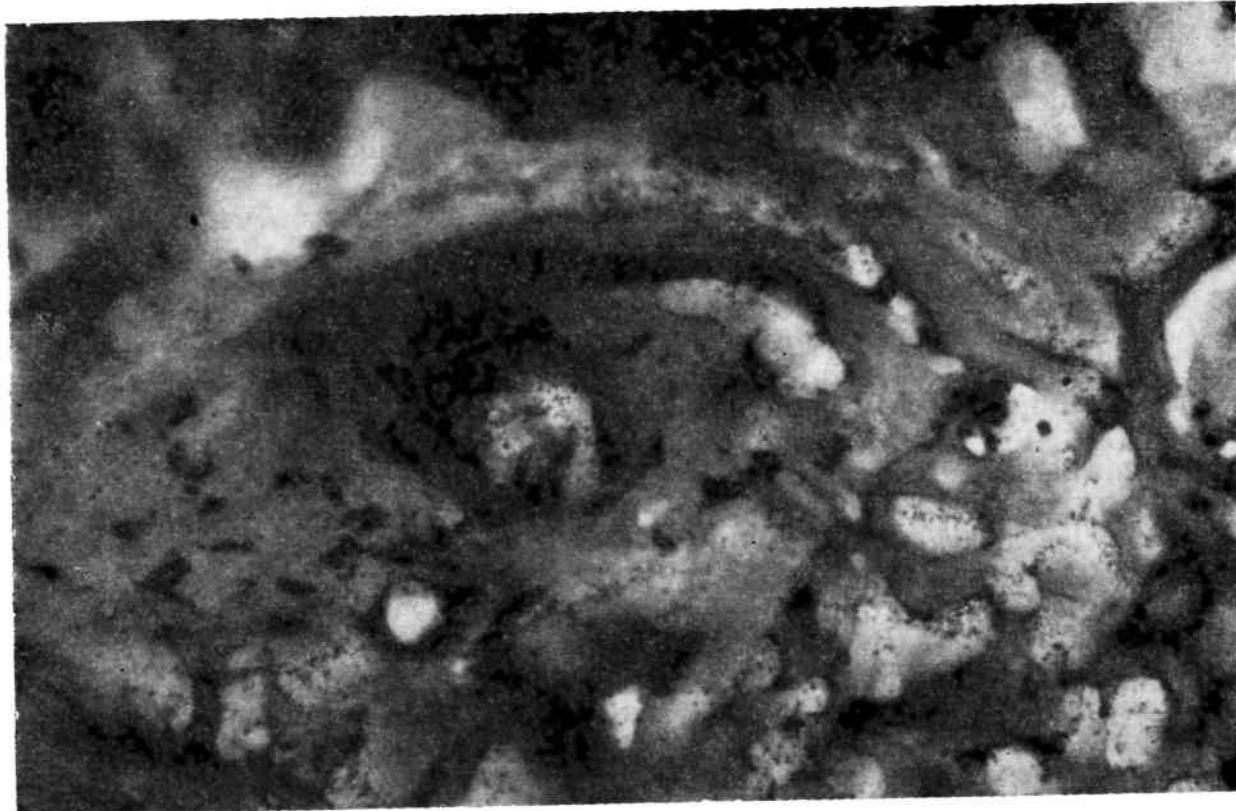


Fig. 3. — Piele umană (derm) prelevată prin biopsie : marcaj *in vivo*. Autohistoradiografie executată cu emulsie I.F.A. EN₂, prin metoda îmbrăcării. Sursa radioactivă : doza terapeutică de P³² (β) (500 μ Curie P³² per os la 60 kg greutate corporală. Biopsia prelevată la 24 de ore. Timp de expunere 60 de zile. Postcolorare : cu periodic acid-Schiff.

Metoda, relativ recentă, a fost pusă la punct și introdusă în cercetările de biochimie și fiziolologie, într-un timp foarte scurt. Utilizarea ei aduce acestor cercetări contribuții importante, metoda dovedindu-se un instrument util pentru cercetarea proceselor metabolice celulare și subcelulare.

B I B L I O G R A F I E

1. BASERGA R., NEMEROFF K. — Two emulsion radioautography, *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, vol. 10, p. 5.
2. BASERGA R., BANKS D.—A simple procedure for the destaining of stripping-film autoradiographs; *J. Pathol. Bacteriol.*, 1962, vol. 84, p. 239—241.
3. BASERGA R., NEMEROFF K. — Factors which affect efficiency of autoradiography with tritiated thymidine, *Stain. Technol.*, 1962, vol. 37, p. 1.
4. BAECKELAND, CHEVREMONT M. — L'histoautoradiographie, Quelques applications en biologie cellulaire animale, *Ext. Bull. Inst. Agr. Stat. Rech. (Gembloux)*, 1960, vol. II.
5. BELANGER L. F. — Method for routine detection of radiophosphates and other radioactive compounds in tissues, The inverted autograph, *Anat. Rec.*, 1950, vol. 107, p. 149—159
6. BERTOFF G., KRISTERSON L. — Microdensitometer for the evaluation of radioautograms, *Rev. Sci. Instr.*, 1961—1962, vol. 32, p. 11.

7. BOZAC A., URAY Z., BULBUC E., PAPILIAN V. V. — Contribuții la îmbunătățirea metodei autohistoradiografice, Conferința I de radiobiologie, București, 1964.
8. BOZAC A., BRIEF G., URAY Z., BULBUC E. — Efectul tisular al dozelor terapeutice de iod radioactiv asupra glandei tiroidă, Comunicare prezentată la U.S.S.M. Filiala Cluj, 1963.
9. BOZAC A., PAPILIAN V. V., DEREVENCO V., HOLAN T., URAY Z. — Modificări histopatologice renale observate consecutiv injectării neohidrinei Hg^{203} , Comunicare prezentată la U.S.S.M., Filiala Cluj.
10. BOYD G. A. — Autoradiography in biology and medicine, Acad. Press., New York, 1955.
11. DAVID L. J. — Radioautography. Principles and procedures, *J. Nucl. Med.*, 1963, vol. 4, p. 143—154.
12. DEREVENCO V., PAPILIAN V. V., URAY Z., BOZAC A., FARCAȘANU M. — Cercetări privind acțiunea unor substanțe neurotrope asupra funcției tirodiene la şobolan. Conferința de radiobiologie, București, 1964.
13. FITZGERALD P. J. — Radioautography its use in Cytology. In : Analytical Cytology, sub redacția R. C. Mellars Ed. Mc. Graw Hill, New York, 1955.
14. GHEORGHESCU B., BRASLA I. — Diagnosticul cu radioizotopi în clinică, Ed. medicală, București, 1964, p. 271—278.
15. GUIDOTTI G. — Principles of quantitative autoradiography ; (*Chicago*) *Med. Sch. Quart.*, 1963, vol. 20, p. 3.
16. HOLAN T., SZANTAI I., FARCAȘANU M., GHERMAN C. — Modificări de ordin morfologic și funcțional în țesutul tiroidian iradiat cu I^{131} , Simpozion de biofizică celulară, București, 1963.
17. *** — Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie. Diagnostik und Therapie, Ed. Springer, Berlin Göttingen-Heidelberg, 1961, vol. 1, p. 321—352.
18. MEDVECZKY L., PETER F., LAMPE L. — Az autoradiografia metodikájaval kapcsolatos néhány tapasztalat. *Kiserl. Orvostud.*, 1962, vol. 11, p. 49—55.
19. NICOLAE MARIETA — Autoradiografia cu emulsii nucleare, Ed. Acad. R.P.R., I.F.A., București, 1962, p. 15.
20. OEHLMERT W. — Durchführung und Anwendungsmöglichkeiten der autoradiographischen Methode in der Pathologie *Schweiz. med. Wsch.*, 1964, vol. 94, p. 1 009—1 015.
21. OSTROWSKI K., SAWICKI W. — Photomicrographic method for counting photographic grains in autoradiograms, *Exp. Cell. Res.*, 1961, vol. 24, p. 625—628.
22. OSTROWSKI K., BARNARD C. A., STOCKA Z., DIARZYNKIEWICZ — Autoradiophotographic methods in enzyme cytochemistry, *Exp. Cell. Res.*, 1963, vol. 31, p. 89—99.
23. PATRICH I., FITZGERALD N. B. — Dry Mounting Autoradiographic Technic for Intracellular Localisation Water-Soluble compounds in Tissue Sections, *Lab. Invest.*, 1961, vol. 10, p. 5.
24. REINHOLDS E., BELLOCH-ZIMMERMANN V., WIRTH CH. — Zur Methodik der Gefrierschnitt Mikroautoradiographie, *Experientia* 1960, vol. 16, p. 286.
25. SCHNEIDER G., MOUNER W. — Autoradiographische Untersuchung über dem Einbau von H^3 Cytidin in die Kerne einiger Zellarten der Mauss und über den Einfluss des Fixationsmittels auf die H^3 Aktivität, *Acta Histochem.* 1963, vol. 15, p. 171—181.
26. STILLSTROM J. — Grain Count Corrections in Autoradiography, *Int. J. Appl. Rad. Isotopes*, 1963, vol. 14, p. 113—118.
27. TAUGNER R., IRAVANI I., WINDEL K., ASLAM M. — Verteilung von Hg^{203} -Mersalyl und Hg^{203} -Chlormerodyn in der Niere, untersucht mit Hilfe der Gefrierschnitt-Autoradiographie, *Arch. exp. Pat. Pharm.*, 1963, vol. 244, p. 539—549.
28. TAYLOR I. H. — Autoradiography at the cellular level; Physical Technic in Biological Research,, vol. 3, Cell and Tissues, Acad. Press, New York, 1956.
29. *** — Tehnica Histopatologică, Ed. de Stat, București, 1953.

30. WEBB I. M. — The reaction of ionising particles with the photographic emulsion to produce the latent image; Manual for Autoradiography course, Oak-Ridge, Inst. of Nuclear Studies, Oak-Ridge Tenn, 1951.

Articol intrat în redație la 16.I.1965.

Indicele de clasificare : 616—008.9—092.18:539.17

RÉSUMÉ

Z. Uray — MÉTHODES AUTOHISTO-RADIOGRAPHIQUES DANS LA RECHERCHE DE LA BIOCHIMIE ET DE LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

L'auteur présente la méthode autohisto-radiographique, en exposant les différentes techniques utilisées et en décrivant leurs temps. À la lumière des données de la littérature et d'une expérience personnelle de plus de 2 ans, il apprécie au point de vue critique les résultats obtenus à l'aide des différentes techniques, et indique les meilleures solutions qui se détachent de son activité. On insiste sur l'utilité particulière de cette méthode dans la recherche approfondie de la biochimie et de la physiopathologie cellulaire et sous-cellulaire.

ZUSAMMENFASSUNG

Z. Uray — AUTOHISTORADIOGRAPHISCHE METHODEN BEI DER UNTERSUCHUNG DER ZELLBIOCHEMIE UND -PHYSIOLOGIE

Verf. beschreibt das Verfahren der Autohistoradiographie und gibt eine Übersicht der einzelnen angewandten Techniken und ihrer Arbeitsgänge. Er bewertet kritisch, im Lichte der Literaturangaben und der eigenen zweijährigen Erfahrung, die mit den einzelnen Techniken erhaltenen Ergebnisse und gibt die besten Lösungen an, die sich aus seiner Tätigkeit ergeben. Es wird die besondere Nützlichkeit dieses Verfahrens bei der eingehenden Erforschung der zellularen und subzellulären Biochemie und Pathophysiologie unterstrichen.

SUMMARY

Z. Uray — AUTOHISTORADIOGRAPHIC METHODS IN INVESTIGATIONS ON CELLULAR BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

The description is given of an autohistoradiographic method, reviewing the different techniques used and their stages. In the light of the data in literature and an experience of over 2 years, the author critically appraises the results obtained with various techniques and points to the best solutions found by him. Stress is laid on the particular utility of this method for detailed research on cellular and subcellular physiopathology and biochemistry.

РЕЗЮМЕ

З. Урай — АУТОГИСТОРАДИОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ КЛЕТКИ

Автор описывает аутогисторадиографический метод, делает обзор различных применяемых технических способов и их последующих фаз. На основании литературных данных и собственного 2-х летнего опыта, делается критическая оценка результатов, полученных при применении различных методов и указываются наилучшие решения, подсказанные собственной практикой. Подчеркивается особенная ценность этого метода для углубленного изучения клеточной и подклеточной биохимии и патофизиологии.

REFERAT

DESPRE ANGIORETICULOAMELE
SISTEMULUI NERVOS, P. Laffarg-
ne, M. Toga, Arch. Anat. Path., 1964,
vol. 12, nr. 3, p. 194—199

Pe un număr de 2 700 de tumori intracraiene, autorii relevă 6 cazuri de angiogeticuloame ale sistemului nervos (5 dintre ele cu localizări în cerebel și unul în măduvă), reprezentând 0,22% din numărul total amintit și 5% din tumorile fosei posterioare (140 de cazuri). Aceste tumori apar la vîrsta mijlocie, mai des la bărbat și au ca sediu topografic electiv, partea posterioară a emisferelor cerebeloase sau a vernixului, mai rar măduva sau bulbul și exceptional creierul. Macroscopic aspectul cel mai frequent este cel al unui chist mare cu conținut hematic și cu un nodul mural proeminind intrachistic; alteori este o masă compactă, de aspect angiomas, cu zone chistice. Histologic se deosebesc două tipuri principale: 1) imagini de blastem angioformator,

cu aspectul de rețea vasculară variabil de abundantă, într-o stromă bogată în fibre reticulinice, cu insule hematopoietice; 2) aspectul adult al tumorii, consecutiv transformării cavernoase a vaselor, cu edem al stromei și transformare lipocitară a histiocitelor. Adesea se observă o scleroză perivasculară și apoi difuză a stromei, cu tendință de condensare la periferia leziunii, fără a realiza o adevărată încapsulare, mugurii tumorali pătrunzînd în țesutul nervos fără limită netă.

La originea acestor tumori sunt celele mezoblastice fertile incluse în tubul neural în a treia lună de viață intrauterină, celule care au proprietatea de a forma vase, eritroblastii și reticulină. Poliglobulia observată în cazurile de hemangioblastoame se datorează acțiunii asupra măduvei osoase a unui hormon eritropoietic secretat de către celulele tumorale.

M. Nestor