

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Τομέας Βιοχημείας, Κυτταρικής - Μοριακής

Βιολογίας και Γενετικής

Β Ι Ο Λ Ο Γ Ι Α    Κ Υ Τ Τ Α Ρ Ο Υ

ΕΝΟΤΗΤΑ 7η

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕ ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ν.Μεσσίνη-Νικολάκη

Λ.Μαργαρίτης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυταραδιογραφία είναι τεχνική, που αποκαλύπτει με πολύ συγκεκριμένο τρόπο τη δυναμική φύση όλων των δομών των ζωντανών οργανισμών. Η ιδέα, βέβαια, ότι η ζωντανή ύλη ανανεώνεται συνεχώς αν και η δομή της εμφανίζεται σταθερή, δεν είναι κάτι νέο. Πολύ παλιότερα η άποψη αυτή είχε γίνει το αντικείμενο βιοχημικών ερευνών. Μέχρι όμως την εφαρμογή της μεθόδου της αυταραδιογραφίας καμμιά άλλη μέθοδος δεν κατέστη ικανή να εξηγήσει με τόσο άμεσο τρόπο, ότι η φανερή σταθερότητα της ζωντανής ύλης είναι στην πραγματικότητα μόνο η έκφραση μιάς ισορροπίας της ροής, των μορίων μέσα στα κύτταρα. Η αυταραδιογραφία, με τη χρήση ραδιοενεργών ισωτόπων, έκανε ορατή την ανανέωση των κυττάρων στα όργανα και την ανανέωση των μορίων στους ιστούς, στα κύτταρα και στα κυτταρικά οργανίδια και έριξε νέο φως στις σχέσεις κυτταρικής δομής και μεταβολισμού. Οι καινούργιες προοπτικές, που άνοιξαν με τα αποτελέσματα τεχνικών αυταραδιογραφίας, έφεραν κάποια αλλαγή στην ιδέα που επικρατούσε για την κυτταρική δομή. Η αυταραδιογραφία επίσης εβοήθησε πολύ την Ιστολογία και την Κυτταρολογία, προσδίδοντας σ' αυτές μιά περισσότερο ποσοτική διάσταση.

Η εποχή της ραδιενέργειας άνοιξε το 1896, όταν ο BEQUEREL παρατήρησε ότι οι φωτογραφικές πλάκες ενεργοποιούνταν, από μία μυστηριώδη ακτινοβολία του ουρανίου. Το 1925 ο LACASSAGNE και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η ακτινοβολία του πολωνίου, που είχε δοθεί σε παντικούς, μπορούσε να ανιχνευθεί σε φωτογραφικές πλάκες, που τις έφεραν σε επαφή με τομές διαφόρων οργάνων. Έτσι έπαιρναν χτυπητές εικόνες της κατανομής του πολωνίου, η διακριτική ικανότητα όμως ήταν πολύ φτωχή. Καλύτερη ανάλυση της αυτοραδιογραφικής εικόνας επιτεύχθηκε 20 χρόνια αργότερα, όταν, αντί της φωτογραφικής πλάκας, πάνω στις ραδιενεργές τομές, τοποθετήθηκε ζεστό υγρό φωτογραφικό γαλάκτωμα, στο σκοτάδι. Παρατηρήθηκε ότι το γαλάκτωμα δενόταν με τις τομές και μετά από κατάλληλη έκθεση και εμφάνιση, έδινε την "εικόνα" της κατανομής της ραδιενέργειας. Αργότερα, παρόμοιες "τεχνικές επικάλυψης" χρησιμοποιήθηκαν, για την ανίχνευση ραδιοισοτοπών, σε λεπτές τομές ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

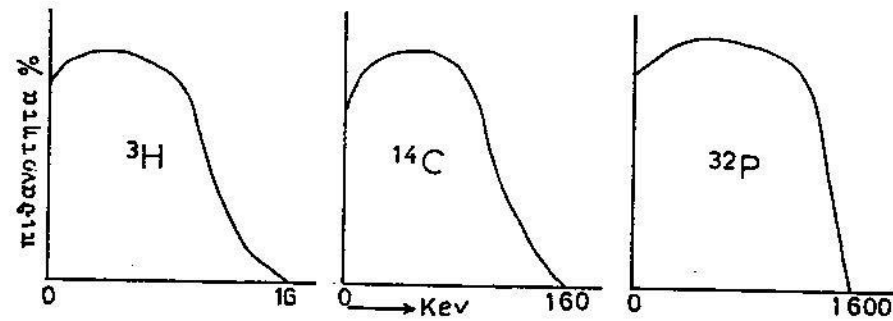
## II. ΡΑΔΙΟΙΣΟΤΟΠΑ

Ποιά είναι η θέση των ραδιοϊσοτοπών στη σύγχρονη βιολογία;

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές μέθοδοι της βιοχημείας και βιολογίας εξετάζουν μία κατάσταση του συστήματος κατά τη στιγμή της ανάλυσης. Στη ζωντανή ύλη όμως συμβαίνουν κάθε στιγμή χιλιάδες αντιδράσεις που η κάθε μία έχει διαφορετικό ρυθμό π.χ. ένα αμινοξύ μπορεί για λίγα λεπτά να ενσωματωθεί σε μία νερόμητη πρωτεΐνη που μετά από λίγο θα αποικοδομηθεί ενώ το ίδιο αμινοξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βιοσύνθεση μίας άλλης πρωτεΐνης. Το ίδιο συμβαίνει και με άλλα πρόδρομα μόρια όπως με τις βάσεις πυριμιδίνης, πυριμιδίνης των νουκλεϊκών οξέων, με τα μονοσάκχαρα των υδατανθράκων κ.ά. Αν υπήρχε μία διαδικασία να σηματοδοτούν τα πρόδρομα μόρια αυτά με κάποιο ανιχνεύσιμο τρόπο θα ήταν δυνατή η παρακολούθηση της βιοσύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων, των πρωτεϊνών, κ.λ.π. Η διαδικασία αυτή βρέθηκε ότι μπορεί να είναι η σήμανση με ραδιενεργά ισότοπα και ο ανιχνεύσιμος τρόπος να είναι η εκπομπή ακτινοβολίας (κυρίως σωματιδίων β) από αυτά τα σηματοδοτούμενα μόρια.

Τα πιο συνηθισμένα ισότοπα για σήμανση (LABELING) προδρόμων

μορίων είναι το τρίτιο ( $^3\text{H}$ ) ο άνθρακας ( $^{14}\text{C}$ ), και ο φωσφόρος ( $^{32}\text{P}$ ) με φάσματα ενεργείας σωματιδίων β ως εξής:



Τα σωματίδια β μπορεί να ανιχνευθούν με όργανα (π.χ. με μέτρηση των σπινθήρων που προκαλούν σε κατάλληλο υγρό (SCINTILLATION COUNTING) ή να εντοπιστούν από την επίδρασή τους πάνω σε υπερκείμενους κρυστάλλους βρωμιούχου αργύρου π.χ. φωτογραφικό φιλμ (αυτοραδιογραφία).

Στην τελευταία αυτή περίπτωση τα σηματοδοτούμενα βιομόρια μπορεί ή να βρίσκονται μέσα σε μικροσκοπικά παρασκευάσματα (π.χ. τομές κυττάρων) ή να έχουν διαχωριστεί με μία βιοχημική τεχνική (π.χ. ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων, χρωματογραφία σακχαρών κ.λ.π. ZACHARIUS ET AL., 1969, LIM ET AL., 1969).

Μετά από κατάλληλη χρώση (που μπορεί να γίνει και στο τέλος της διαδικασίας καμριά φορά), καλύπτεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με το γαλάκτωμα και αφήνεται για "έκθεση" (EXPOSURE) επί κατάλληλο χρονικό διάστημα (1-100 μέρες ανάλογα με την ειδική ραδιενέργεια του ραδιενεργού προδρόμου, το είδος του γαλακτώματος κ.ά.).

Ακολουθεί "εμφάνιση" (DEVELOPMENT) των κρυστάλλων του γαλακτώματος, που έχουν χτυπηθεί από την ακτινοβολία και παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

## IV. Εφαρμογή της μεθόδου.

α) Γενικά

Όπως είπαμε η αυτοραδιογραφία αποτελεί τεχνική που επιτρέπει

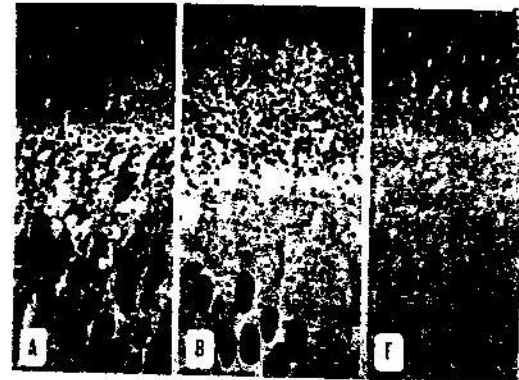
την εντόπιση και ποσοτική (ή ποιοτική) ανάλυση ειδικών μακρομορίων στα βιολογικά συστήματα. Στο σύστημα δίνονται ραδιενεργά πρόδρομα μόρια που έχουν επιλεγεί κατάλληλα για να ενσωματωθούν στα μακρομόρια που μας ενδιαφέρουν (εικ. 1).

Για σύντομο χρονικό διάστημα. (PULSE LABELING—σήμανση με παλμό) γίνεται η επώαση σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το κατάλληλο ραδιενεργό πρόδρομο μόριο (αμινοξύ, οργανική βάση, σάκχαρο κ.ά.) που χρησιμοποιείται από το βιολογικό σύστημα για τη βιοσύνθεση των μακρομορίων που θέλουμε να μελετήσουμε. Πολλές φορές και ιδιαίτερα όταν θέλουμε να παρακολουθήσουμε την παραπέρα πορεία του μακρομορίου που συντέθηκε αφήνουμε το σύστημα να επωασθεί σε θρεπτικό υλικό χωρίς ραδιενεργό πρόδρομο μόριο για κατάλληλο χρόνο (CHASE). (Πίνακας I, βλ. επίσης βιβλίο Κυτταρικής Βιολογίας, κεφ. 2.3).

Προκειμένου για μικροσκοπική αυτοραδιογραφία, μετά την ενσωμάτωση γίνεται χημική μονιμοποίηση των κυττάρων που τελικά είτε κάβονται σε τομές είτε απλώνονται σε μονοκυτταρικό στρώμα σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

Τεχνικές αυτοραδιογραφίας

Στόχος της αυτοραδιογραφίας είναι η παρακολούθηση σημασμένων ραδιενεργών ουσιών, σε όργανα και ιστούς. Η ραδιενεργή ουσία παρέχεται στον οργανισμό συνήθως σε διαλυτή μορφή. Η διαλυμένη ουσία (πρόδρομη ουσία) διανέμεται κατάπιν στον οργανισμό με την κυκλοφορία ή με διάχυση και ενσωματώνεται υπό μία μεταβλητή ή αμετάβλητη μορφή σε άλλες ενώσεις (προϊόντα), που με τη σειρά τους μπορεί να είναι διαλυτές ή αδιάλυτες. Π.χ. το χλωριούχο νάτριο παραμένει διαλυτό και η σχετική συγκέντρωσή του, στα υγρά του σώματος και στα κύτταρα μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση αυτοραδιογραφίας διαλυτών ενώσεων. Πρόδρομες ενώσεις λιπών ενσωματώνονται, αλλά το τελικό προϊόν είναι διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τη πορεία της συνηθισμένης ιστολογικής στερέωσης και εμποτίσης. Όταν σαν πρόδρομη ουσία χρησιμοποιείται ένα σημασμένο αμινοξύ, μόνο οι μεταβολίτες που ενσωματώνονται σε πρωτεΐνες παραμένουν αδιάλυτες κατά την πορεία της ιστολογικής ετοιμασίας του δείγματος και μπορούν να ανιχνευ-



Εικ. 1 Εφαρμογή της αυτοραδιογραφίας στη σύνθεση και έκκριση πρωτεϊνών (βλ. επίσης πίνακα 2. V). Ραδιοσήμανση κυττάρων (οδοντοβλαστών που παράγουν δεντίνη) με <sup>3</sup>H-Προ και λήψη του κατού μετά από 30' (Α), 4 ώρες (Β) και 30 ώρες (Γ). Διακρίνονται οι αυτοραδιογραφικοί κόκκοι να είναι αρχικά διάσπαρτοι στο κυτταρόπλασμα, στη συνέχεια να μετακινούνται προς τη μία πλευρά του κυττάρου, ενώ 30 ώρες αργότερα έχουν ήδη καταλάβει θέση έξω από αυτό (Γ). X1.000 (Από Weinstock και Leblond, J. Cell Biol. 60, 92, 1974).

Πίνακας I Διαγραμματική απεικόνιση των βημάτων που ακολουθούνται κατά την ανίχνευση σημασμένων (ραδιενεργών) βιομορίων.

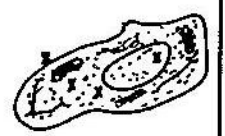
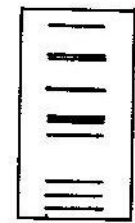
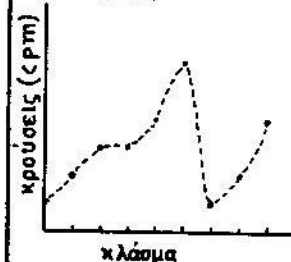
**ΒΗΜΑ 1ο ΠΑΛΜΟΣ:** Επώαση με ραδιενεργό πρόδρομο μόριο (π.χ. αμινοξύ) in vivo (με ένεση) ή in vitro (π.χ. με προσθήκη στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλέργειας) για συγκεκριμένο χρόνο ανάλογα με τη διάρκεια βιοσύνθεσης των μορίων που θέλουμε να μελετήσουμε.

**ΒΗΜΑ 2ο ΩΣΗ (CHASE):** Αντικατάσταση (εφ' όσον αυτό είναι επιθυμητό ή εφικτό) με ίδιο μη ραδιενεργό μόριο και επώαση για κατάλληλο χρόνο ανάλογα και με τη μεταβολική πορεία των ουσιών που θα ανιχνευτούν.

**ΒΗΜΑ 3ο ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ**  
Με (υπερ) φυγοκέντρηση-συλλογή κλάσμάτων-μέτρηση σε μετρητή ραδιενέργειας (liquid scintillation counter)

**ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ**  
Εξήρανση του ηλεκτώματος-φωτογραφική έκθεση-εμφάνιση

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ**  
Μονιμοποίηση-έγκλιση-τομές (ή επίστρωση των κυττάρων)-κόλληση με φωτογραφικό γαλακτωμα-έκθεση-εμφάνιση.



Μπορεί να συνδυαστεί με παραπέρα χαρακτηρισμό των κλάσμάτων

Οι ζώνες δείχνουν τη θέση (μοριακό βάρος ή ισοηλ. σημείο) πολυπεπτιδίων που χρησιμοποιήσαν το ραδιενεργό πρόδρομο μόριο κατά τη διάρκεια του παλμού

Οι αυτοραδιογραφικοί κόκκοι (X) που διακρίνονται με Φ.Μ. ή Η.Μ. δείχνουν τη θέση του μακρομορίου που συντέθηκε κατά τη διάρκεια του παλμού καθώς και την κατοική πορεία του.

τούν.

Έτσι μπορεί να μελετηθεί η κινητική της σύνθεσης και η παραπέρα πορεία των εκκρινομένων πρωτεϊνών.

Το βιολογικό υλικό επωάζεται στα ραδιενεργά αμινοξύ που βρίσκεται σε μεγάλη αναλογία στην πρωτεΐνη που συντίθεται (ο χρόνος παλμού επιλέγεται ανάλογα με το Μ.Β της πρωτεΐνης και άλλους παράγοντες) και στη συνέχεια γίνεται επάση χωρίς ραδιενεργό αμινοξύ (ώση) (ο χρόνος ώσης μπορεί να ποικίλλει· συνήθως κάνουμε μία σειρά από πειράματα για σταθερό χρόνο παλμού και διαφορετικούς χρόνους ώσης).

Γενικά, όταν μελετάται αδιάλυτο προϊόν, χρησιμοποιούνται τεχνικές στερέωσης του δείγματος. Τεχνικές διαλυτών ενώσεων χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό διαλυτών σημασμένων ουσιών, για τον καθορισμό της κινητικότητάς τους και για τον προσδιορισμό της σταθεράς διάχυσής τους.

Οι διάφορες τεχνικές που εφαρμόζονται κατά την αυτοραδιογραφία μπορούν να αναφερθούν κάτω από τους όρους μακρο-αυτοραδιογραφία, μικρο-αυτοραδιογραφία, και αυτοραδιογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ανάλογα με την επιθυμητή μεγένθυση.

Η μακροαυτοραδιογραφία αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμη μέθοδο για τη μελέτη της απορρόφησης, της κατανομής και του μεταβολισμού μιάς μεγάλης ποικιλίας ενώσεων στους οργανισμούς, όπως είναι π.χ. τα φάρμακα, οι ορμόνες και οι ουσίες ανάπτυξης μαζί με τα προϊόντα αποικοδόμησής τους. Αυτός ο τύπος αυτοραδιογραφίας απαιτεί ολοκληρωμένους οργανισμούς ή μέρη οργανισμών όπως είναι τα οστά ή τα φύλλα.

Στην περίπτωση της μακροαυτοραδιογραφίας γίνεται συνήθως ένεση σημασμένων μορίων, οπότε έχει μεγάλο ενδιαφέρον η δημιουργία αυτοραδιογραφήματος ολοκληρωμένου του ζώου:

α) για να δοθεί ακριβής πληροφορία για την κατανομή και θέση των μορίων που μελετώνται και των μεταβολιτών τους σε διάφορα χρονικά διαστήματα.

β) για να γίνει συσχέτιση της συσσώρευσης της ουσίας σ' ένα ορισμένο όργανο με τη δράση της, όταν πρόκειται για τοξική ουσία.

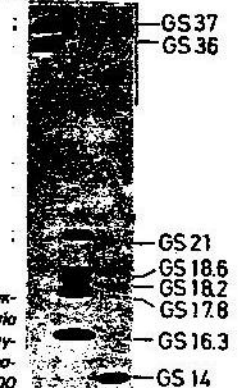
γ) για να εξαχθούν πληροφορίες για παραπέρα μελέτη σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο με λεπτομερέστερες τεχνικές.

Η μικροαυτοραδιογραφία διαφέρει από την μακροαυτοραδιογραφία

ως προς το μέγεθος του δείγματος. Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τομές του δείγματος, που έχουν πάχος 0.5μ -5μ και έχουν υποστεί ερπύτωση με ρητίνη ή παραφίνη. Οι τομές καλύπτονται με ένα στρώμα γαλακτώματος και μετά κατάλληλη έκθεση και φωτογραφική εμφάνιση παρατηρούνται στο φωτονικό μικροσκόπιο. Η ανάλυση αυτοραδιογραφίας φωτονικού μικροσκοπίου περιορίζεται από την διακριτική του ικανότητα.

Για λεπτομερέστερη ανάλυση της αυτοραδιογραφικής εικόνας πρέπει να χρησιμοποιηθεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, που επιτρέπει ταυτόχρονα και λεπτομερή παρατήρηση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων.

Ειδική περίπτωση αυτοραδιογραφίας αποτελεί η ανίχνευση της ραδιενέργειας με ειδικό φιλμ (π.χ. KODAK X-RAY FILM) υλικού που έχει αναλυθεί με τεχνική διαχωρισμού, π.χ. ηλεκτροφόρηση (βλ. Ενότητα 5). Έτσι, μετά το στέγνωμα του ηλεκτροφορήματος, αυτό "εκτίθεται" στο σκότος σε επαφή με το φιλμ. Ακολουθεί έκθεση-εμφάνιση όπως περιγράφεται παραπάνω και παρατήρηση των συστατικών (π.χ. ζωνών πρωτεϊνικών) που είναι ραδιενεργές:



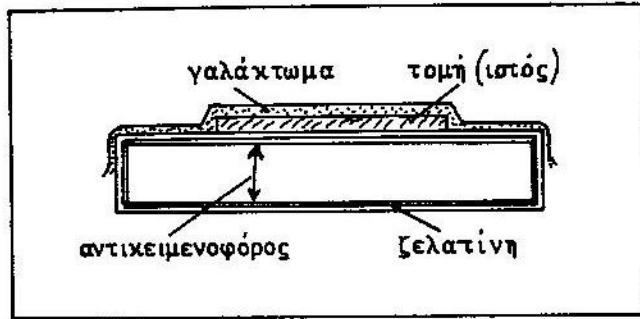
Εικ. 2 Αυτοραδιογράφημα μετά από ηλεκτροφόρηση SDS- πολυακρυλαμίδης σε κύτταρα που είχαν υποστεί *in vitro* ανάπτυξη παρουσία  $^3\text{H}$ -ρα. Το επίπεδο ηλεκτροφόρησης (Slab) έγινε σε διαβάθμιση συγκέντρωσης (gradient) 10-15% ακρυλαμίδης και παρατηρείται ο διαχωρισμός πρωτεϊνών με πολύ γεπτονικό μοριακό βάρη (GS14=14.000  $\text{daltons}$  κ.λπ.). Αρχή της μεθόδου

Τα στοιχεία της αρχής της αυτοραδιογραφίας εξάγονται από το απλό σχήμα (σχ. 1) της τεχνικής.

Μιά τομή ιστού, που περιέχει ραδιενεργό υλικό, τοποθετείται σε μιά αντικειμενοφόρα, καλύπτεται από ένα στρώμα φωτογραφικού γαλακτώματος και αφήνεται στο σκοτάδι για ορισμένο χρόνο (έκ-

θεση).

Μετά γίνεται φωτογραφική εμφάνιση, οπότε οι κόκκοι του βρωμιούχου αργύρου του γαλακτώματος, που προσβλήθηκαν από τη ραδιενεργά ακτινοβολία, ανάγονται σε μεταλλικό άργυρο, και γίνονται ορατοί, από το μαύρο χρώμα τους, στο φωτονικό μικροσκόπιο ή επειδή σκεδάζουν τα ηλεκτρόνια στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (βλ. \*Κυτταρική Βιολογία, σελ. 50).



Σχ. 1 : Διαγραμματική απεικόνιση αυτοραδιογραφήματος για φωτονικό μικροσκόπιο.

Η θέση των κόκκων αργύρου δείχνει τη θέση της παρουσίας ραδιενεργού υλικού στο δείγμα. Οι ραδιενεργές ουσίες, όπως είναι γνωστά, εκπέμπουν α-σωματίδια, β-σωματίδια ή ακτίνες γ. Σωματίδια α εκπέμπουν ισότοπα μεγάλου ατομικού βάρους, που χρησιμοποιούνται σπάνια στη βιολογική έρευνα. Η επίδραση, στα φωτογραφικά γαλακτώματα, των ακτίνων γ είναι πολύ μεγάλη. Για τους λόγους αυτούς, χρησιμοποιούνται συνήθως, στοιχεία που εκπέμπουν β-σωματίδια.

Η εκπομπή των σωματιδίων γίνεται προς όλες τις κατευθύνσεις και αφού τα μισά σωματίδια εκπέμπονται προς την πίσω πλευρά του δείγματος, η καλύτερη δυνατή απόδοση μπορεί να είναι 50%. Σε περίπτωση, που ένα πολύ λεπτό ραδιενεργό δείγμα χωρίζεται από το γαλάκτωμα, με ένα στρώμα μη ραδιενεργού υλικού, π.χ. μη ραδιενεργό κυτταρόπλασμα πάνω από ένα ραδιενεργό πυρήνα, το ποσοστό των

εκπεμπομένων β-σωματιδίων, που φθάνει στο γαλάκτωμα ελαττώνεται.

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Πυρηνικά γαλακτώματα

Τα πυρηνικά γαλακτώματα όπως λέγονται τα φωτογραφικά γαλακτώματα που χρησιμοποιούνται στην αυτοραδιογραφία διαφέρουν από τα κανονικά φωτογραφικά γαλακτώματα ως προς τη μεγάλη συγκέντρωση άλατος αργύρου που περιέχουν (περίπου 80%) και ως προς το μικρό μέγεθος των στοιχειωδών κόκκων (κόκκοι μικρότεροι των 0,3μm). (Πίνακας II).

Η σύστασή τους αντιστοιχεί σε μιά κρυσταλλική φάση βρωμιούχου και ιωδιούχου αργύρου, σε εναιώρημα σε πυκνό διάλυμα ζελατίνης που περιέχει άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο και άζωτο.

Επίσης είναι παρόν θείο και στη ζελατίνη και στην επιφάνεια των κρυστάλλων του βρωμιούχου αργύρου, σαν πρόσμιξη.

Όταν ένα σωματίδιο β "χτυπήσει" ένα κρύσταλλο τότε γίνεται μιά αλλαγή που μπορεί με κατάλληλο τρόπο να "μεγενθυθεί" και να μανιμοποιηθεί ώστε να είναι ανιχνεύσιμη οπτικά. Η αλλαγή αυτή οδηγεί στο σχηματισμό μιάς λανθάνουσας εικόνας (LATENT IMAGE) που η θεωρητική της βάση έχει μελετηθεί αρκετά (GURNEY AND MOTT 1938). Συγκεκριμένα, με την επίδραση της ακτινοβολίας σ'ένα κρύσταλλο, μετατρέπεται ένα ή περισσότερα ιόντα αργύρου σε άτομα, και μετά από επίδραση αναγωγικών μέσων (π.χ. υδροκινόνης) μετατρέπονται τα υπόλοιπα ιόντα του ίδιου κρυστάλλου σε άτομα μεταλλικού αργύρου, που έχει μεγάλη οπτική πυκνότητα. Κρύσταλλοι που δεν δέχτηκαν ακτινοβολία τελικά διαλύονται από ένα μανιμοποιητή (FIXER) υποθετικού νατρίου.

Το μέγεθος των κρυστάλλων που κυμαίνεται από 0,02- 0,5μ σε διάμετρο, παίζει αποφασιστικό ρόλο στη διακριτική ικανότητα του γαλακτώματος (ROGERS 1969), κι αυτό γιατί ο κρύσταλλος "μαυρίζει" ολόκληρος κατά την εμφάνιση, κι έτσι δεν μπορούμε να διαπιστώσουμε που πρωτοχτύπησε το σωματίδιο.

Το γαλάκτωμα, σε συνθήκες φωτογραφικών θαλάμων (με ελάχιστο ή καθόλου φωτισμό ασφαλείας) απλώνεται επάνω στο βιολογικό υλικό

τομή ή ολόκληρα κύτταρα ή μόρια) αφού υγροποιηθεί σε κατάλληλη θερμοκρασία και αραιώση, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πίνακας II: Χαρακτηριστικά πυρηνικών γαλακτωμάτων αυτοραδιογραφίας

Τύπος γαλακτώματος	Διάμετρος κρυστάλλων βρωμιούχου αργύρου	Διακριτικό όριο $\lambda$
GEVAERT NUC 370	0,07μ	700-900
ILFORD G5	0,27μ	2500
K2	0,20μ	1800-2200
L4	0,14μ	1200-1800
KODAK NTB 2	0,20μ	1800-2200
NTE	0,05μ	700-900

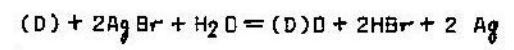
Σχηματισμός λανθάνουσας εικόνας

Η απορρόφηση ενέργειας, από το γαλάκτωμα, φωτονίων ορατού φωτός, ή κατά τη διάρκεια διόδου σωματιδίων, που προκαλούν ιονισμό, οδηγεί στην ελευθέρωση ηλεκτρονίων, από το δίκτυο των κρυστάλλων του γαλακτώματος. Τα ηλεκτρόνια αυτά, αν έχουν κατάλληλη κινητική ενέργεια, κινούνται μέσα στους κρυστάλλους και παγιδεύονται όταν φθάσουν σε μία μικρή ευαίσθητη κηλίδα θειϊκού αργύρου. Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου, αυξάνει το αρνητικό φορτίο της κηλίδας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έλξη μίας μικρής ποσότητας αργύρου σ' αυτή τη θέση, που δρα σαν καταλύτης, για περισσότερη απόθεση αργύρου κατά τη διάρκεια της φωτογραφικής εμφάνισης. Το στάδιο αυτό της πορείας της αυτοραδιογραφίας λέγεται σχηματισμός της λανθάνουσας εικόνας. Το μέγεθος της λανθάνουσας εικόνας ποικίλλει, ανάλογα με την ένταση της ακτινοβολίας.

Φωτογραφική εμφάνιση και στερέωση

Η φωτογραφική εμφάνιση, που είναι συνέχεια του σχηματισμού της λανθάνουσας εικόνας, εφαρμόζεται, για να μετατρέψει τους μικροκρυστάλλους του Α Β, που περιέχονται στη λανθάνουσα εικόνα, σε μεταλλικό άργυρο. Αυτό γίνεται με ένα διάλυμα που ονομάζεται εμφανιστής (αναγωγική ουσία π.χ. υδροκινόνη).

Αν D αντιστοιχεί στον εμφανιστή, η πορεία της εμφάνισης μπορεί να παρασταθεί με την αντίδραση:



Μόλις αρχίσει η εμφάνιση το πρώτο ηλεκτρόνιο, που αποτίθεται στην κηλίδα δημιουργεί ένα ηλεκτρικό πεδίο, ικανό να ελκύσει ή ακόμη να δημιουργήσει ένα διάμεσο ιόν αργύρου που ουδετεροποιεί το αρνητικό φορτίο του παγιδευμένου ηλεκτρονίου και συνεισφέρει σε μία προσθετική αύξηση της μεταλλικής κηλίδας της λανθάνουσας εικόνας. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι πλήρους αναγωγής του μικροκρυστάλλου του AgBr, και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία λεπτών νηματίων αργύρου, που εξωθούνται από το μικροκρυστάλλο κατά τη διάρκεια της εμφάνισης.

Μετά τη φωτογραφική εμφάνιση ακολουθεί η φωτογραφική στερέωση, που έχει σαν προορισμό τη διάλυση και απομάκρυνση του απρόσβλητου βρωμιούχου αργύρου. Συνήθως το διάλυμα της στερέωσης περιέχει ένα σταθεροποιητή και ένα σκληρυντή για τη ζελατίνα που παραμένει. Ακολουθούν πολλές εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν όλα τα χημικά κατάλοιπα.

ΣΤΟΧΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σαν βιολογικό υλικό θα χρησιμοποιηθούν ακρόρριζα από κρεμμύδι ή φασόλι και σαν ραδιενεργά υλικά ή τριτιωμένη θυμιδίνη ( $^3H-T$ ) (ραδιενεργό πρόδρομο σύνθεσης DNA). Για σύντομο χρονικό διάστημα θα γίνει επώαση των ακρόρριζων με  $^3H-T$  και μετά θα ακολουθήσει επώαση με μη ραδιενεργά θυμιδίνη, μονιμοποίηση, χρώση, κάλυψη με γαλάκτωμα (KODAK NTB, ή ILFORD L4), εμφάνιση και παρα-

τήρηση. Το DNA συντίθεται σε μία ορισμένη φάση (S) του μεσοφασικού πυρήνα. Έτσι, κύτταρα που τυχαίνει να συνθέτουν DNA κατά τη διάρκεια της επώασης με  $^3\text{H-T}$  θα εμσωματώσουν ραδιενέργεια στο νεόδμητο DNA. Αυτά τα κύτταρα θα περάσουν διαδοχικά στη φάση G<sub>2</sub>, στη φάση μίτωσης και στη φάση G<sub>1</sub> ανάλογα με το χρόνο ώσης (επώαση με μη ραδιενεργή θυμιδίνη).

Αντίθετα, κύτταρα που βρισκόντουσαν π.χ. στη φάση G<sub>1</sub> κατά τη διάρκεια του παλμού δεν θα έχουν DNA με ενσωματωμένη  $^3\text{H-T}$ .

Χρησιμοποιώντας διάφορους χρόνους ώσης μπορούμε κατά προσέγγιση να υπολογίσουμε τη διάρκεια των φάσεων μετρώντας της σηματοδωμένες μιτωτικές εικόνες. (βλ. "Κυτταρική Βιολογία", Α.Μαργαρίτης, σελ. 473).

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**A:** Αφήνουμε σπόρους να βλαστήσουν για λίγες μέρες έτσι που μόλις να φαίνονται τα ακρόρριζα. Μετά από άλλες 2-3 μέρες κόβονται τα ακρόρριζα και επωάζονται σε  $^3\text{H-T}$  (ειδική ραδιενέργεια 2C/μM\*, συγκέντρωση 10 μC/ml). Μετά από 10' ξεπλένονται σε νερό και επωάζονται σε μη ραδιενεργό θυμιδίνη (ώση) 20πλάσιας συγκέντρωσης για ορισμένο χρόνο. Ακολουθεί μονιμοποίηση σε διάλυμα αιθανόλης: οξεικού οξέος (3:1) για 12 ώρες και διατήρηση σε 70% αιθανόλη. Σ'αυτή την κατάσταση θα σας δοθούν ακρόρριζα με διάφορους χρόνους ώσης.

**B:** Διαβάστε προσεκτικά τις παρακάτω οδηγίες πριν αρχίσετε το πείραμα και υπογραμμίστε τα κρίσιμα σημεία. Εξοικειωθείτε με τη μέθοδο απλώματος (SQUASH) σε μη ραδιενεργά ακρόρριζα όπως θα σας δείχτει από τον υπεύθυνο της άσκησης.

\*Σημείωση : 1C = 1 Curie = ραδιενέργεια που προέρχεται από  $3,7 \times 10^{10}$  ατομικές διασπάσεις/sec  
1μC =  $10^{-6}$  Curie

**α) Προετοιμασία δείγματος**

Αρχίστε ξεπλένοντας γρήγορα τα ακρόρριζα σε απεσταγμένο νερό και κάντε υδρόλυση με 5N HCl για 15' σε μικρά δοχεία (ελευθέρωση αλδεϋδικών ομάδων από την δεοξυριβόζη). Ακολουθεί ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.

Τοποθετείτε ένα ακρόρριζο στο ένα άκρο μιάς αντικειμενοφόρου πάνω σε μιά σταγόνα χρωστικής - 0,5% μπλέ της τολουϊδίνης σε 1% υδατικό διάλυμα βορικού νατρίου - (στο άλλο άκρο της αντικειμενοφόρου γράψτε το όνομά σας και το χρόνο ώσης). Τοποθετείτε καλυπτρίδα πάνω στη ρίζα και ακουμπείτε την αντικειμενοφόρο σε μιά επίπεδη επιφάνεια και πιέζετε με τον αντίχειρα αφού πρώτα βάλετε πάνω από την καλυπτρίδα ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί, έτσι που να πλατύνει το ακρόρριζο. Χρειάζεται αρκετή πίεση για να γίνει ένα καλό άπλωμα (SQUASH). Ελέγξτε στο μικροσκόπιο αν τα κύτταρα είναι το ένα δίπλα στο άλλο και όχι το ένα επάνω στο άλλο. Ο έλεγχος πρέπει να γίνει γρήγορα ώστε να μη ξεραθεί ο ιστός.

Τοποθετείτε την αντικειμενοφόρο σε ξηρό πάγο ή σε κατάψυξη για 5', και μετά πολύ γρήγορα (σε 1'') αφαιρέστε την καλυπτρίδα με νυστέρι ή ξυραφάκι χωρίς να πειράξετε τα κύτταρα.

Ξεπλύντε με αιθανόλη (50% για 1' και 30% για 1') και μετά με απεσταγμένο νερό (για 1').

Μετά το στέγνωμα στον αέρα γίνεται προετοιμασία για το βούτηγμα στο γαλάκτωμα, ζεσταίνοντας τις αντικειμενοφόρους σε 42°C.

Αγακεφαλαίωση της διαδικασίας.

1. Ξέπλυμα με νερό
2. Υδρόλυση με HCl 5N για 15'
3. Ξέπλυμα με νερό
4. Τοποθέτηση ρίζας σε αντικειμενοφόρο σε μιά σταγόνα χρωστικής
5. Σκέπασμα με καλυπτρίδα - Άπλωμα (SQUASH)
6. Ξηρός πάγος ή κατάψυξη για 5'
7. Αφαίρεση καλυπτρίδας

- 8. Στέγνωμα στον αέρα
- 9. Προθέρμανση σε 40° C (για αυτοραδιογραφία) ή βάλσαμο του Καναδά και καλυπτρίδα (για παρατήρηση χωρίς 3H-T).

β) Προετοιμασία γαλακτώματος

Η κάλυψη των τομών θα γίνει με γαλάκτωμα KODAK τύπου NTB 2 χωρίς αραιώση ή ILFORD L4 σε αραιώση 1:1 με απεσταγμένο νερό. Όλη η εργασία από τη κάλυψη μέχρι την εμφάνιση γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο, σε απόλυτο σκοτάδι, ή με ελάχιστο, κατάλληλο φωτισμό.

Πριν αρχίσει η προετοιμασία του γαλακτώματος για κάλυψη, στο τραπέζι εργασίας του σκοτεινού θαλάμου συγκεντρώνονται όλα τα υλικά, που είναι απαραίτητα για την κάλυψη. Η θέση των αντικειμένων που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι γνωστή, γιατί όπως ήδη αναφέρθηκε όλη η μετέπειτα εργασία γίνεται ή σε απόλυτο σκοτάδι ή το φως, που επιτρέπεται είναι τόσο λίγο, ώστε να είναι πολύ δύσκολο να "δει" κανένας τα διάφορα αντικείμενα. Τα αντικείμενα αυτά είναι τα ακόλουθα:

1. Το μπουκάλι με το γαλάκτωμα
2. Ένα θερμοστατικό ρυθμιζόμενο υδατόλουτρο.
3. Γυάλινα ή πλαστικά δοχεία, όπου θα τοποθετηθεί το γαλάκτωμα για να λυώσει.
4. Σπάτουλα από πορσελάνη για τη μεταφορά του γαλακτώματος.
5. Γυάλινη ράβδος για την ανάδευση του γαλακτώματος.
6. Όρισμένη ποσότητα απεσταγμένου νερού, για την αραιώση του γαλακτώματος, αν χρειαστεί.
7. Μικρά ραφάκια, όπου θα τοποθετηθούν, υπό κλίση, οι αντικειμενοφόροι, μετά την κάλυψη, για να στεγνώσουν.
8. Πλαστικά κουτιά-θήκες αντικειμενοφόρων-φωτοστεγανά, για την αποθήκευση των αντικειμενοφόρων. Στο κάθε κουτί, στο ένα άκρο του απομονώνονται 4-5 θέσεις με μία αντικειμενοφόρο και στο χώρο που δημιουργείται τοποθετείται αφυδρωτικό (SILICA GEL), για την απορρόφηση της υγρασίας.
9. Μαύρο χαρτί ή αλουμινόχαρτο για το περιτύλιγμα των

κουτιών.

Το γαλάκτωμα που διατηρείται σε θερμοκρασία 4° C φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα περίπου, πριν χρησιμοποιηθεί. Παράλληλα, στο σκοτεινό θάλαμο ένα υδατόλουτρο θερμαίνεται στους 48° C. Το γαλάκτωμα μπαίνει στο υδατόλουτρο περισσότερο από μία ώρα για να "λιώσει". Κατά διαστήματα αναδύεται με μεγάλη προσοχή, γιατί κατά την ανάδευση δημιουργούνται εύκολα φυσαλίδες αέρα, που αποτελούν πρόβλημα κατά την κάλυψη.

γ. Κάλυψη με το γαλάκτωμα

Η κάλυψη μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: 1) με βούτηγμα των αντικειμενοφόρων στο γαλάκτωμα και 2) με τη βοήθεια δακτυλίου από σύρμα πλατίνας. Κατά την πρώτη περίπτωση οι αντικειμενοφόροι φέρονται ανά δύο σε επαφή με τις πλευρές που δεν έχουν ιστό, κρατιούνται από την άκρη και βουτιούνται στο γαλάκτωμα μέχρι να καλυφθεί ο ιστός. Κατόπιν ανασύρονται αργά, αποχωρίζονται οι δύο αντικειμενοφόροι και τοποθετούνται με κλίση (ως προς την κατακόρυφο) σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν.

Κατά το δεύτερο τρόπο, χρησιμοποιείται θηλειά (LODP) πλατίνας στερεωμένη οριζόντια στην άκρη μικρής ράβδου.

Η θηλειά που έχει διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από το πλάτος της αντικειμενοφόρου πλάκας, βυθίζεται στο γαλάκτωμα και στη συνέχεια ανασύρεται με προσοχή, οπότε, ένα λεπτό στρώμα από γαλάκτωμα σχηματίζεται στα εσωτερικά της θηλειάς (υμένας). Ακολουθεί τοποθέτηση, του υμένα από γαλάκτωμα που δημιουργήθηκε πάνω στην αντικειμενοφόρο, στο σημείο που υπάρχει ο ιστός.

Ο δεύτερος τρόπος κάλυψης είναι αναγκαίος σε περίπτωση των ηλεκτρονικού μικροσκοπίου γιατί έτσι επιτυγχάνεται κάλυψη με μία μόνο στρώση κόκκων γαλακτώματος.

Μετά το στέγνωμα, οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε κατάλληλα πλαστικά κουτιά, που καλύπτονται με αδιαπέραστο από το φως, περιτύλιγμα.



## δ) Έκθεση

Τα κουτιά που περιέχουν τις καλυμμένες με γαλάκτωμα αντικειμενοφόρους τοποθετούνται σε ψυγείο (4 C), για έκθεση, που διαρκεί 10-15 μέρες.

## ε) Φωτογραφική εμφάνιση

Μετά την κατάλληλη έκθεση, οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε ειδικό δοχείο χρώσεων και ακολουθούν τη διαδικασία της φωτογραφικής εμφάνισης, σε θερμοκρασία 18-20 C, ως εξής:

Εμφανιστής D 19 (KODAK)	4 λεπτά
Απεσταγμένο νερό	μερικά δευτερόλεπτα
Στερεωτής (KODAK FIXER)	10 λεπτά
Απεσταγμένο νερό	2 φορές από 4 λεπτά

Ακολουθεί στέγνωμα των αντικειμενοφόρων στον αέρα, προστίβεται βάλασμα του Καναδά καλυπτρίδα και παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο.

## ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Οι αντικειμενοφόροι με τα αυτοραδιογραφήματα παρατηρούνται στο φωτονικό μικροσκόπιο (μέχρι και μεγένθυση ελαιοκαταδυτικού φακού) για εντόπιση των κυτάρων που εμφανίζουν ραδιενέργεια στον πυρήνα (δηλ. έχουν ραδιενεργό DNA μετά τη χρησιμοποίηση της  $^3\text{H-T}$  κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου). Τι συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν; Δώστε τις παρατηρήσεις και τα σχόλια στον υπεύθυνο.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- BACHMANN L., AND SALPEGER, M.M. (1965): AUTORADIOGRAPHY WITH ELECTRON MICROSCOPE. LAB INVEST. 14 1401.
- BALANGER, L., AND LEBLOND, C. (1946): ENDOCRINOLOGY 39, 8.
- CARD, L.G. (1962): HIGH RESOLUTION AUTORADIOGRAPHY J.CELL BIOL. 15, 189.
- FEULGEN, R., AND ROSSENBECK, H. (1924): MIKROSKOPISCH - CHEMISCHER NACHWEIS EINER NUCLEINSAURE VON TYPUS DER THYMONUCLEINSAURE UND DIE DARAUFBERUHENDE ELEKTIVE FARBUNG ZELLKERNEN IN MIKROSKOPISCHEN PRAPARATEN. HOPPE - SEYL. 135, 203.
- GURNEV, R.W., AND MOTT, N.F. (1938): PROC. ROY. SOC. (LONDON) SER. A., 164, 151.
- LEVI, H. (1957): EXP. CELL RES. SUPPL. 4, 107.
- LEVINTHAL, C. (1957): BIOCKIM. BIOPH. ACTA. 23, 453.
- LIM, R., HUANG, J., AND DAVIS, G. (1969): AUTORADIOGRAPHY WITH ACRYLAMIDE GEL SLAB ELECTROPHORESIS. ANAL. BIOCH. 29, 48.
- PZYBYLSKI, R. (1961): ELECTRON MICROSCOPE AUTORADIOGRAPHY ELECTRON MICROSCOPY CELL RES. 24, 181.
- ROGERS, A. (1969): TECHNIQUES OF AUTORADIOGRAPHY ELSEVIER PUBLISHING Co., AMSTERDAM, LONDON, N.YORK.
- Μαργαρίτης, Α.Χ. (1985). ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ, Β' έκδοση. ΑΒΗ "Επτάλοφος", Α.Ε.