

A NEM-SPECIFIKUS ALKALIKUS FOSZFATÁZ FÉNY- ÉS
ELEKTRONMIKROSKÓPOS LOKALIZÁCIÓJA

Irta:

K á l m á n G y ö r g y

Doktori értekezés



Szeged

1968

B 5040



E 1.121

TARTALOM

I. BEVEZETÉS	1. oldal	
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4.	"
1. Fénymikroszkópos módszerek	4.	"
a/ Gömöri-féle módszer	4.	"
b/ A magreakció és a diffúzió kérdése	6.	"
c/ A különböző rögzítési eljárások és a paraffinos beágyazás hatása az enzimaktivitásra . . .	12.	"
d/ Az inkubáló oldat összetétele, pH-hatása, aktivátorok, inhibitorok	15.	"
e/ A Gömöri-reakción alapuló ritkán használt módszerek . . .	18.	"
f/ Azofestékes módszerek	20.	"
f/1. Szimultán kapcsolásos eljárások	21.	"
f/2. "Non coupling" azofestékes módszerek	23.	"
f/3. Utókapcsolásos eljárások	24.	"
2. Elektronmikroszkópos módszerek	25.	"
a/ Rögzítési eljárások	26.	"
b/ Közvetett vagy utókapcsolásos módszerek	28.	"
c/ Közvetlen kapcsolásos eljárás- sok	29.	"

III. A NEM-SPECIFIKUS ALKALIKUS FOSZFATÁZ
KIMUTATÁSÁVAL KAPCSOLATOS SAJÁT

VIZSGÁLATOK 32. oldal

1. A rögzítő szer és a rögzítés
körülményeinek megválasztása . . . 33. "

a/ Rögzítetlen anyagon végzett
kísérletek 33. "

b/ A rögzítő oldat pH-jának hatása
az enzimreakcióra 37. "

c/ A fixáló anyag megválasztása 40. "

2. Az elektrondenz fém kiválasztása 47. "

3. Az inkubálás kivitele; az ólom-
foszfát átalakítása ólomszulfiddá 52. "

4. A nem-specifikus alkalikus foszfa-
táz fénymikroszkópos kimutatása
különböző emlős állatok szöveteiben 56. "

5. A fénymikroszkópos kimutatás
eredményei 57. "

6. A nem-specifikus alkalikus
foszfátáz elektronmikroszkópos
kimutatása 81. "

7. Az elektronmikroszkópos kimutatás
eredményei 82. "

IV. ÖSSZEFOGLALÁS 100. "

V. IRODALOM 105. "

I. BEVEZETÉS

A foszfatázok felfedezése SUZUKI, YOSHIMA és TAKAHISHI /1907/ nevéhez fűződik, akiknek sikerült a rizskorpában kimutatni egy fermentet, amely a finból foszforsavat hasít le. Ugyanilyen foszfátésztert hidrolizáló enzimet talált állati szövetekben McCOLLUM és HART /1908/. Később ROBISON /1923/ megállapította, hogy a csontszövet is tartalmaz foszfatázt. Állításának alapja a következő egyszerű kísérlet volt: fiatal patkány csontjait belehelyezte bárium hexóz monofoszfátot tartalmazó oldatba, és néhány óra múlva báriumfoszfát csapadék képződése volt észlelhető, bizonyítva, hogy a csontszövetben egy, a foszfátészter hidrolizisét katalizáló ferment található.

A foszfatázoknak a különböző állati szövetekben való kimutatása után - amelyek során csak azt tudták meg, hogy az illető szövet tartalmaz-e vagy nem foszfatázt, arra viszont, hogy a szövetek mely sejtféleségéhez, illetve melyik sejt-alkotó elemhez

lokalizálódik ez az enzim, ebben az időben a biokémia még semmiféle magyarázatot nem tudott adni - megindultak a kísérletek a foszfatáz szöveti lokalizációjának a megállapítására. Ezzel kapcsolatban az első sikeres munkát ROBISON /1932/ végezte, aki a biokémiai kimutatásra alapozva, kidolgozott egy "hisztokémiai" eljárást. Vékony szövetdarabokat helyezett foszfátésztert és kalciumot tartalmazó lúgos oldatba, és az enzimműködés hatására felszabaduló foszforsav és a jelenlévő kalcium által alkotott csapadékot KÓSSA /1901/-féle ezüstözéssel, illetve purpurinnal festette. Így sikerült vizualizálnia az enzim lokalizációját a szövetekben. Az ily módon kimutatott enzim a mai elnevezés szerint a nem specifikus alkalikus foszfatáz volt. Ha a módszer alapelvét és lépéseit tekintjük, akkor megállapíthatjuk, hogy ez gyakorlatilag azonos a GÖMÖRI és TAKAMATSU által 1939-ben ajánlott, az alkalikus foszfatáz kimutatására szolgáló módszerrel. ROBISON módszere azonban feledésbe merült, s így GÖMÖRI-nek lényegében újra fel kellett fedeznie a hisztokémiai eljárást.

Ismertetendő vizsgálataim során a foszfatázok nem-specifikus alkalikus típusának fény- és elektronmikroszkópos kimutatásának kérdéseivel foglalkoztam. Céлом volt kialakítani egy olyan módszert, amely mind

fénymikroszkópos, mindpedig elektronmikroszkópos szinten egyaránt megbízható lokalizációt ad. Ennek kapcsán számos, különböző fajhoz tartozó emlős szövetét tanulmányoztam. Vizsgálataim alapján kitűnt, hogy megfelelő paraméterek alkalmazása esetén a direkt-kapcsolásos módszer mind optikai, mind elektrondenzitás szempontjából megfelelő eredményekhez vezet. Így lehetővé válik, hogy fény- és elektronmikroszkópia között közvetlen kapcsolatot teremtve, ezen enzim működési sajátosságait a makroszkópos biokémiától a szubmikroszkópos szövettanig akadálytalanul nyomon követhessem.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Fénymikroszkópos módszerek

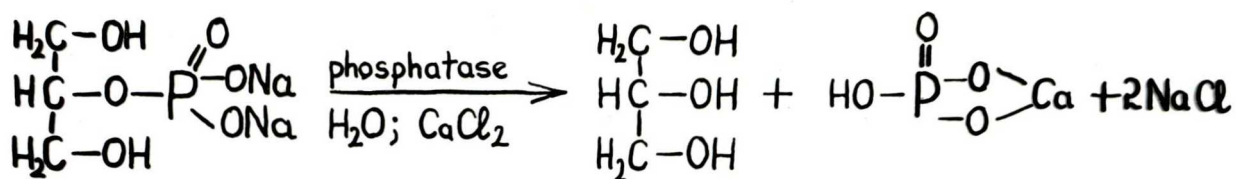
a/ GÖMÖRI-féle módszer

A foszfatázok hisztokémiájában, és mondhatni az egész enzim-hisztokémiában az igazi fellendülés csak a GÖMÖRI /1939/ és TAKAMATSU /1939/ által kidolgozott módszer közzlése után következett be. Egymástól függetlenül dolgozták ki eljárásukat, amelynek segítségével ki lehet mutatni a nem specifikus alkalikus foszfatáz/ Az irodalomban leggyakrabban alkalikus foszfatáz vagy alkalikus glicerofoszfatáz/alkoholban fixált, paraffinos metszetekben. GÖMÖRI először vizsgálatokat végzett annak megállapítására, hogy milyen károsodást szenved az enzim az alkoholos fixálás, a dehidráálás és az 56°C-on végzett paraffinos beágyazás alatt. A kísérletek eredményei alapján arra a következtetésre jutott, hogy az aktivitás demonstrálható alkoholos fixálás és paraffinba ágyazás után. GÖMÖRI a deparaffinált metszeteket Na-b-glicerofoszfát és kalciumklorid-

tartalmu oldatban inkubálta, amelynek pH-ját veronálnátriummal pH 9-re állította be ^x. Az inkubálás időtartama 2 óra. Az enzimaktiv helyeken létrejövő csapadék láthatóvá tételére kétféle eljárást használt.

Egyik a KÓSSA /1901/-féle ezüstözés, amikor a szintelen kalciumfoszfát csapadékban a kalciumot a metszetek ezüstnitrátos oldatban való fürdetésével lecserélik ezüst ionra, amely azután fény hatására fémezüstté redukálódik; ennek fekete színe jelzi az enzimaktiv területeket. A másik festési eljárásnál a kalciumot kobalttal helyettesítette, majd ammóniumpoliszulfiddal kezelte, amikor a szintelen csapadék helyén barnás-fekete kobaltszulfid keletkezik. A reakció menetét mutatja az 1. képlet.

^x GÖMÖRI hangsulyozza, hogy a megfelelő lugosság elérésére felesleges puffer-oldatot használni, elegendő a nátriumveronál /pH = 9,4/. Puffert csak abban az esetben érdemes alkalmazni, ha azt akarjuk megvizsgálni, hogy a pH változása milyen hatással van a reakcióra. Az viszont igen lényeges, hogy mind a puffer-oldatokat, mindpedig a más lugosító anyagokat úgy válasszuk meg, hogy azok ne képezzenek az inkubáló oldatban lévő anyagok egyikével sem oldhatatlan csapadékot.



1. képlet

Ezzel a metodikával GÖMÖRI szinte minden állati szövetet megvizsgált. Már itt meg kell azonban említeni, hogy a GÖMÖRI-reakció mondhatni állandó velejárója az u.n. magreakció /pontosabban: magfestődés/, és ezért később sokan bírálták, sőt némelyek kétségbevonták az e reakcióval nyert eredményeket /NOVIKOFF 1951, JOHANSEN és LINDERSTROM-LANG 1952/.

b/ A magreakció és a diffúzió kérdése

GÖMÖRI módszerének közlése után igen sok közlemény jelent meg, amelyekben kisebb-nagyobb módosításokat javasoltak a metodikával kapcsolatban. Az első lé-

nyeges és nehezen eldönthető probléma az volt, vajon melyik festési módszer vezet jobb eredményekhez: az ezüstös vagy a kobaltos eljárás. Ezzel szorosan összefüggő kérdés, hogyan lehet kiküszöbölni a GÖMÖRI-reakció "veleszületett" hibáját, a magreakciót. GÖMÖRI mindkét festési metodikát kipróbálta, de a használhatóságot illetően nem tesz közöttük különbséget. A későbbiekben többen, így BOURNE /1943, 1944/, DANIELLI /1946/, PEARSE /1961/, MARTIN és JACOBY /1949/, JOHNSON és KUGLER /1953/, BURGOS, DEANE és KARNOVSKY /1955/, PÓBALAKY /1962/ a kobaltos technikát vélték használhatóbbnak. GOETSCH, REYNOLDS és BUNTING /1952/, BURTON /1953/ szintén a kobaltos technikát ajánlják, és szerintük a magreakció elkerülhető, ha magasabb kalciumkoncentrációt alkalmaznak az inkubáló oldatban, és az inkubálást deparaffinátlan metszeteken végzik.

FREDRICSSON /1956/ is elkerülhetőnek véli a magreakciót kobalt használata esetén akkor, ha a fixálás és az inkubálás acetonos közegben történik. KABAT és FURTH /1941/, FEIGIN és WOLF /1953/, RUYTER és NEUMANN /1949/ szerint viszont az ezüstös technika alkalmazása a célszerűbb, mert szerintük a magreakcióért a legtöbb esetben a kobalt felelős. RUYTER /1952/ a patkány-duodenum kutikulájának foszfatáz-aktivitását

vizsgálva, arra a következtetésre jutott, hogy a MOE-féle effektus szintén csak a kobalt használatakor észlelhető ^x.

Míg a szerzők egy része a magreakcióért a kobaltot teszi felelőssé, addig a szerzők másik, nagyobb része a diffúzióval hozza azt kapcsolatba. A diffúzióval kapcsolatban felvetődik a kérdés, hogy mi diffundál? Itt a különböző szerzők véleménye igen

^x MOE /1953/ patkány-duodenum vizsgálatakor azt találta, hogy rövidebb inkubálás után a kutikula aktiv, és a metszet többi része nem festődik. 30 perces inkubáció után viszont meglepő módon a köztudomásuan erős foszfátáz-aktivitást mutató kutikula nem festődik, csak a hámsejtek apikális része. Hosszabb inkubáció után már csak a hám alatti struktúrák látszanak aktívnek. ROYTER /1952/ szerint ez azzal magyarázható, hogy a kobalt csak abban az esetben alkalmas a kimutatásra, ha a kalciumfoszfát koncentrációja egy bizonyos érték alatt van, tehát van egy küszöbérték, amely felett a kalcium nem cserélhető le kobalttal a kalciumfoszfát-csapadékban. Ezüsttel történő festések alkalmával a MOE-féle effektus nem észlelhető.

eltér egymástól. CHÉVREMONT /1953/, YOKOYAMA, STOWELL és MATHEWS /1951/, BARTER /1954/ vizsgálataik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az enzim diffundál. MOOG /1951/, MOE /1952/ és DOYLE /1950/ viszont megállapítja, hogy a kalciumfoszfát mozdul el a kicsapódás, azaz az enzimaktivitás helyéről. NADEL és WODINSKY /1955/ szerint az enzim és a kalciumfoszfát diffúziója egyaránt lehetséges. LEDUC és DEMPSEY /1951/ az enzim aktivátorát vélték mobilisnak. DANIELLI /1950/ kísérletesen bebizonyította, hogy a kalciumfoszfát a kicsapódás után már nem képes diffúzióra. MOOG /1951/ és MOE /1952/ pedig azon véleményüknek adnak kifejezést, hogy az enzim semmiképpen nem lehet felelős a diffúzió jelenségéért.

Végülis nem nyert bebizonyítást, hogy mi válik mobilissá a reakció folyamán. Talán nem is ez a lényeges, hanem az, hogy bizonyos körülmények között számolni kell vele, és az eredmények kiértékelésénél tudni kell, hogy a reakció enzimműködésnek, vagy éppenséggel diffúziónak az eredménye. Többen rámutattak, hogy amennyiben létrejöhet diffúzió, úgy az az inkubálás ideje alatt történik /RUYTER és NEUMANN 1949, GÖMÖRI 1951, NOVIKOFF 1951, HÉBERT 1950, DANIELLI 1946, MOE 1952, MARTIN és JACOBY 1949, JACOBY és MARTIN 1949/. Mivel a diffúzió az inkubáció alatt történik,

ezért annak mértéke egyenesen arányos az inkubálás időtartamával, tehát célszerű a körülményeket úgy megválasztani, hogy minél rövidebb ideig kelljen inkubálni. DANIELLI /1950/ szerint érdemes a kísérletek előtt a megfelelő inkubálási időtartamra nézve elővizsgálatokat végezni. A tapasztalat azt mutatja, hogy azoknak van igaza, akik az aspecifikus festődés okát az elnyújtott inkubálásban látják. Ha megfelelően előkezelt anyagot használunk és jól megválasztott reakcióidőt alkalmazunk, akkor a műtermék-képződés a legtöbb esetben elmarad.

A diffúzió elkerülésére más módszereket is ajánlanak, amelyek lényegében azonosak a magreakció kivédésére ajánlottakkal. Így FREDRICSSON /1952, 1956/, valamint GÖMÖRI és BENDITT /1953/ acetonos közegben való fixálást és inkubálást, RUYTER és NEUMANN /1949/ pedig deparaffinátlan metszetek inkubálását ajánlja.

A magreakcióval kapcsolatban GÖMÖRI /1951/, FEIGIN, WOLF és KABAT /1950/ azon véleményüknek adnak kifejezést, hogy a magfestődés nem minden esetben műtermék. Kétségtelen tény az, hogy az utóbbi időkben végzett vizsgálatok alapján, amelyek során ultracentrifugálással nyert magfrakción végeztek biokémiai alkalikus foszfatáz kimutatást, nem lehet kategorikusan kizárni a sejtmag foszfatáz-tartalmát. Ez az aktivitás

azonban sokszorta kisebb, mint amilyenre következtetni lehetne az egyes szerzők által produkált magfestődésből.

Áttekintve a diffúzióval és a magreakcióval kapcsolatos közleményeket, megállapítható, hogy a 40-es években és az 50-es évek legelején alkalmazott alkohol- és acetón-rögzítési, valamint beágyazási technikák, melyek óhatatlanul az enzim tekintélyes részét inaktiválják, /igy a magas foszfatáz-tartalmu anyagokat is úgy kellett kezelni, mint a kis aktivitással rendelkezőket, tehát hosszú inkubációs időket kellett alkalmazni, amely viszont a fokozottabb mütermékképződés lehetőségét hordja magában/ jóformán megoldhatatlan kérdés elé állították a foszfatáz-hisztokémiával foglalkozó kutatókat. Később, amikor áttértek a formalin-fixált fagyasztott, kriosztátos vagy fagyasztva-száritott metszetek vizsgálatára, ahol az enzimveszteség minimális, egyre kevesebben foglalkoznak a diffúzió kérdésével, mert az ily módon előkészített metszeteknél nincs szükség hosszú inkubálásra, és így a mütermékképződés lehetősége is elhanyagolható.

c/ A különböző rögzítési eljárások és a paraffinos
beágyazás hatása az enzimaktivitásra

Az enzimhisztokémia sarkalatos pontja a fixálás. Közismert, hogy minden rögzítési eljárás alkalmazásakor számolni kell az enzimaktivitás bizonyos mértékű csökkenésével. Nagyon lényeges tehát a fixálás módjának, időtartamának és hőmérsékletének gondos megválasztása, hogy az aktivitás-vesztesség minél kisebb legyen. GÖMÖRI /1939/ és TAKAMATSU /1939/ 24 órás, 80-90 %-os hideg alkoholos rögzítést ajánl. EMMEL /1946/ és DANIELLI /1946/ szerint sem károsítja az enzimet az ilyen hosszú ideig tartó fixálás. Ezzel szemben RICHTERICH /1952/ azt mondja, hogy a 24 órás rögzítés enzimvesztiséget okoz és meg kell nyújtani az inkubálási időt, amelynek veszélye ismeretes. KABAT és FURTH /1941/ az acetonos, EMMEL /1946/ és DANIELLI /1946/ a formalinos rögzítést is kipróbálta. Formalin-fixálás után lehetőség nyílt fagyasztott metszetek használatára, ami biztosította a kimutatási eljárás le rövidítését. MARTIN és JACOBY /1949/ szerint a formalin-rögzített, fagyasztott metszetek esetében már rövid inkubáció után is jelentkezik diffúziós mütermék, míg a paraffinos metszeteknél ugyanez nem tapasztalható. Habár a formalinos anyag esetében sokkal rövidebb időt

vesz igénybe a kimutatás, és nem kell számolni az-
zal az óriási aktivitás-veszteséggel, amely a paraf-
finos technikával jár - amelyre HERMAN és DEANE /1953/,
DOYLE /1948/, MAENGWYN-DAVIES és FRIEDENWALD /1950/,
STAFFORD és ATKINSON /1948/, valamint BARKA /1963/
munkáikban rámutattak -, mégis elég hosszú ideig in-
kább ez utóbbi, kevésbé "gazdaságos" technika volt a
divatos. Ebben talán közrejátszott CHANG és BEHRENBOM
/1956/, BARKA /1959/, GÖMÖRI /1952/ és DANIELLI /1953/
azon megfigyelése, hogy a paraffinos blokkban megőriz-
hető a szövet összes enzimaktivitása több éven keresz-
tül. Valójában ez a lényegen nem változtat, és semmi-
képpen nem teszi előnyösebbé a paraffinos technikát a
formol-rögzítés után alkalmazott fagyasztott metsze-
teken való kimutatással szemben. Ugyanis, míg egy szö-
vet eljut a paraffinba való beágyazottság állapotába,
addig az aktivitás 70-80, sőt BARKA /1953/ szerint 90
%-os károsodást szenved, és csak a fennmaradó néhány
százalékot őrizheti meg a paraffinos blokk.

Többen megkísérelték a paraffinos beágyazás-okozta
enzimkárosodást valamilyen módon csökkenteni. HILL és
TRAVILL /1963/ vákuumbéágyazással igyekezett a paraf-
fin hőmérsékletét csökkenteni, DALGAARD /1956/ pedig
azt hangsúlyozta, hogy csak akkor van veszteség az ak-
tívításban, ha a beágyazás hőmérséklete magasabb mint
53°C.

A fagyasztva-száritás után EMMEL /1946/, BARTER /1954/, valamint LANGERSTEDT és STENRAM /1950/, a freeze-substitutio után pedig NOVIKOFF, WOO-YUNG SHIN és DRUCKER /1960/, CHANG és HORI /1961/ mutatott ki alkalikus foszfatáz-aktivitást. Mindkét módszerrel gyakorlatilag azonos eredményeket lehetett elérni. PÓSALAKY /1960/ e két fixálási eljárás előnyét abban látja, hogy ezeknél a fixálás időtartama alatt nem történik diffúzió, míg a kémiai fixálásoknál ez megtörténhet.

Az alkalikus foszfatáz kimutatásánál ma a legelterjedtebb rögzítési eljárás a formalinos fixálás. Természetesen ez nem jelenti azt, hogy a formalin-fixálás után nem szenved az enzim károsodást./SELIGMAN, CHAUNGCHHEY és NACHIAS 1951/. Ennek mértéke azonban elenyészően kicsi a paraffinos technika alkalmazásakor észleltekhöz képest.

BARKA /1963/ szerint a különböző fixálási és beágyazási technikák között, az általuk okozott enzim-aktivitás csökkenést figyelembevéve, a sorrend a következő:

1. Friss fagyasztott metszet utófixálva hideg acetonban.
2. Hideg formalinos fixálás, fagyasztott metszetek.
3. Freeze-substitutio, fagyasztva száritás.
4. Alkoholos vagy acetonos fixálás után paraffin-beágyazás.

Legcélravezetőbb tehát a friss fagyasztott, utófixált, vagy a formol-fixált fagyasztott metszetek alkalmazása.

d/ Az inkubáló oldat összetétele, pH hatása, aktivátorok, inhibitorok

Az aktivitás kimutatási menetének fontos lépése az inkubáció. Ebben a fázisban működik ugyanis az enzim, amelynek következtében a szubsztrát hidrolizist szenved, és felszabadulnak a szubsztrát azon alkatrészei, amelyeket azután valamilyen módon láthatóvá lehet tenni. Az inkubáló oldat összetétele nagymértékben befolyásolja a végső eredményt, ezért összeállításánál gondosan ügyelni kell a Ca^{++} továbbá az esetleges aktivátor koncentrációjára, valamint a pH-ra. A szubsztrát optimális koncentrációja 0,1 - 0,3 M, a pufferé pedig 0,05 - 0,1 M /GÖMÖRI 1939/^x. A pH változása bizonyos határok között nincsen hatással az aktivitásra, csak a kalciumfoszfát savas pH melletti oldékonyságára való tekintettel kell a pH-t 9 körül tartani. RICHTERICH /1952/ és mások hangsúlyozzák, hogy a pH értékéről az inkubáció után is meg kell győződni, nehogy a valamilyen okból megváltozott pH hamis eredményekhez vezessen.

^x DOYLE /1953/ szerint a veronál gátló hatással van az enzimre.

Érdekes összefüggésre hívja fel a figyelmet ROSS, ELY és ARCHER /1951/, NEUMANN /1949/, valamint WACHSTEIN és MEISEL /1957/, akik kimutatták, hogy minél alacsonyabb a szubsztrát-koncentráció, annál közelebb esik a maximális aktivitás pH-ja a neutrális ponthoz. Ez a megállapítás azonban a gyakorlatban nem hasznosítható az alkalikus foszfatáz kimutatásánál, mivel függetlenül attól, hogy mi lenne az optimális pH az adott szubsztrát-koncentráció mellett, a kalciumfoszfát oldékonyságára való tekintettel az inkubáló oldat pH-jának 9 körül kell lennie.

A Ca^{++} megfelelő koncentrációban való jelenlétének szükségességéről a magreakció tárgyalásánál már volt szó. A magreakció kivédésén kívül szükséges az elegendő kalcium-mennyiség azért is, hogy ezáltal a felszabaduló foszfát-ionok minél gyorsabban le tudjanak reagálni. A Ca^{++} optimális koncentrációja GÖMÖRI /1951/ és NOVIKOFF /1951/ szerint 0,01 - 0,05 M, míg 0,1 M felett már gátolja az enzimet.

KABAT és FURTH /1941/, valamint BODANSKY /1936/ aktivátorként a magnéziumot ajánlja 0,1 M-os koncentrációban. Mg^{++} helyett a legtöbb esetben megfelel a mangán is /PEARSE 1961/. Az aktivátorok hatásmechanizmusa még tisztázatlan kérdés. EMERY és DOUNCE szerint /1955/ a májban van egy Mg által aktiválható, valamint egy nem

aktiválható alkalikus foszfatáz. RICHTERICH /1952/ és mások szerint a Mg^{++} jelenléte nem befolyásolja az eredményeket. HORE, ELVEHJEM és HART /1940/, továbbá CLOETENS /1941/ szerint a Zn^{++} is kifejthet aktiváló hatást 0,0001 M-os koncentrációban. SADASVIAN /1950, 1952/ vizsgálatai alapján megállapítja, hogy a cianid-ionok gátló hatása kivédhető lugos közegben Zn^{++} -kel, savas közegben pedig Mg^{++} -al. Inhibitorok tekintetében sem sokkal világosabb a helyzet. Két ismertebb inhibitor van: a cianid és a fluorid ionok, de ezek sem specifikusak. EMMEL /1946/ véleménye szerint a cianid gátol a bélben, míg a vesében nem. CLOETENS /1941/ a májban cianid-érzékeny, a vesében pedig fluorid-érzékeny alkalikus foszfatázt talált. Történtek vizsgálatok a sósav inaktiváló hatásával kapcsolatban is. EMMEL /1950, 1951/ megállapította, hogy a vesében lévő foszfatáz érzékenyebb a sósavval szemben, mint a bélben lévő és mindkettő esetében Mg^{++} jelenlétében fokozódik a sósav iránti érzékenység.

Az enzimaktivitás kimutatásakor kontroll metszetekkel való összehasonlítás alapján tudjuk megállapítani, hogy a festődés milyen mértékben az enzim működésének eredménye. Két ut kínálkozik kontroll metszetek készítésére: 1. szubsztrát nélkül inkubáljuk a metszeteket, 2. előre inaktivált metszeteket inkubá-

lunk a szabályos összetételű oldatban. Az inaktiválásra a nem specifikus alkalikus foszfatáz esetében a következő anyagok használhatók: 10 percig tartó 90°C-os desztillált vizes, 2-3 perces lugolos, 1-2 perces 5 %-os triklórecetsavas, 1-2 perces 10-15 %-os ecetsavas, 5-10 perces híg salétromsavas áztatás. A kétféle módon nyert kontroll metszetek természetesen más-más eredményre vezethetnek, mert míg az első esetben számítani lehet a diffúzióval és a spontán hidrolizissal, addig az utóbbiaknál az inaktiválásra használt kémiai ágens megváltoztathatja a szövetfőhárjék affinitását a reakcióban használt fémekhez..

e/ A Gömöri-reakción alapuló, ritkán használt
módszerek

Az itt felsorolásra kerülő metodikák nem terjedtek el a hisztokémiai gyakorlatban. Ennek oka részben az, hogy ezek kivitele lényegesen körülményesebb, másrészt az általuk nyert eredmények nem nyújtanak többet, vagy még annyit sem, mint a Gömöri-reakció. Megemlítésüket ezek ellenére az teszi indokolttá, hogy segítségükkel ki lehet mutatni a nem-specifikus alkalikus foszfatázt, és így mint módszert nem lehet kihagyni a felsorolásból. A kimutatás menetét illetően a kalciumfoszfát keletkezéséig nincs különbség a Gömöri-reakció és ezen módosított eljárások között; a kalciumfoszfát láthatóvá tétele, illetve észlelése azonban eltérő módon történik.

BÉLANGER /1951/ polarizációs mikroszkóppal, HANCOX és NICHOLAS /1954, 1956/ pedig fáziskontrasztberendezés segítségével vizsgálta a kalciumfoszfát elhelyezkedését. FEIGL /1946/ és WATERHOUSE /1951/ vizsgálatai alapján MOLNÁR /1952/ báriumot, ólmot és rodizonátot használt. A kalciumot ólommal vagy báriummal helyettesítette a kalciumfoszfátban, és ezeket festette rodizonáttal. Kielégítő eredményeket csak az ólommal kapott, míg a báriummal nyert eredmények teljesen használhatatlanok voltak. GÖMÖRI /1943/ a kalcium festésére az acridin vöröset, BOURNE /1943/ az alizarin vöröset ajánlja. DALGAARD /1948/, BARKA, SZALAI, PÓBALAKY és KERTÉSZ /1951, 1952/ rádióaktív izotóppal helyettesítették a kalciumot, és az izotóp sugárzásának mérése útján kvantitatív eredményeket kaptak. Említést érdemel még WACHSTEIN /1952/ módszere, amellyel elkülöníthető a szövetekben preformált kalcium által adott és az enzim aktivitásából eredő festődés. WACHSTEIN a metszeteket először kobaltos oldatban fürdeti, majd nátriumsulfiddal kezeli, amely után a szövetekben eleve jelenlévő kalcium már kobaltszulfid formájában tűnik elő fekete színben. Az inkubálást csak ezek után végzi, és a keletkező kalciumfoszfátot rubeánsavval festi, amely sárga színben tünteti fel az enzimaktív területeket. E módszer elvileg al-

kalmasnak látszik arra, hogy segítségével kiküszöböljük a szövetekben lévő kalcium zavaró hatását /az u.n. hibás pozitív reakciót/. Az eredmények kiértékelése viszont elég nehéz. A rubeánsav sárga színe nem tűnik ki élesen a háttérből, másrészt pedig igen bizonytalan az, hogy a reakció előtti szulfidozás mennyiben károsítja az enzimet. HALE /1951/ röntgensugarakkal vizsgálta a reakció különböző szakaszaiban keletkező csapadékok elhelyezkedését, így a kalciumfoszfát, a kobaltfoszfát és a kobaltszulfid lokalizációját. HALE szerint a különböző csapadékok azonos helyen foglalnak helyet, inkubáció közben tehát nem volt diffúzió.

f/ Azofestékes módszerek

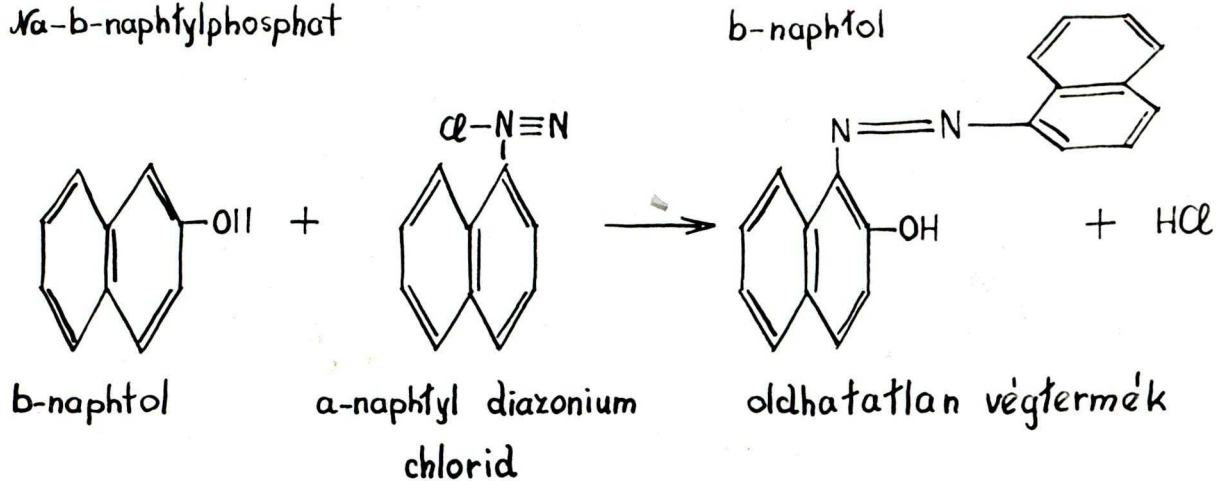
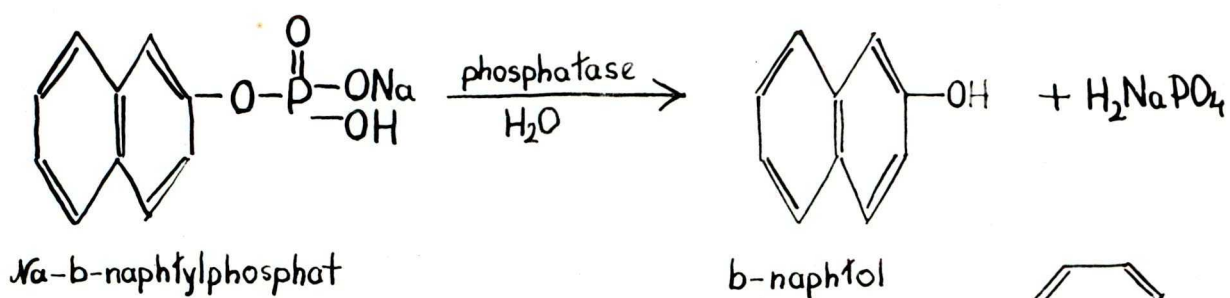
A Gömöri-típusú reakción alapuló módszerek alkalmazásakor a következő hibákra számíthatunk: 1. magreakció, amely a reakció folyamán használt fémek aspecifikus kötődéséből adódik; 2. diffúzió, amelyet az enzim, az aktivátor vagy a reakció köztitermékeinek elmozdulása okoz; 3. a szövetekben lévő kalcium megfestődése a reakció folyamán, amely a kiértékelést sok esetben megnehezíti. Mindezen hibalehetőségek kiküszöbölhetők az azofestékes módszerek alkalmazásával.

Az alkalikus glicerofoszfátáz kimutatására hasz-

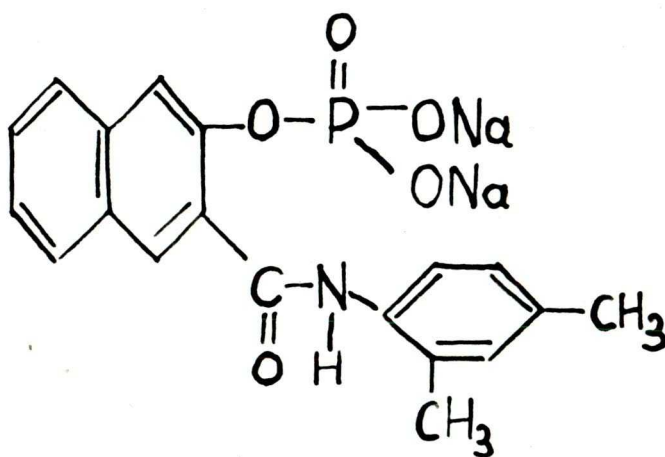
nált, eddig tárgyalt metodikáknál a látható, vagy valamilyen más módon érzékelhető végtermék képzése mindig a foszfátészterből felszabaduló foszforsavból történt. Az azofestékes módszereknél szubsztrátként aromás foszfátésztert használunk, amelyből az enzim - a foszforsav mellett - egy hidroxil-csoporttal rendelkező aromás gyököt szabadít fel; ez diazónium-sókkal kapcsolva színes, oldhatatlan csapadékot ad az enzim-aktív területeken.

f/1. Szimultán kapcsolásos eljárások

MENTEN, JUNGE és GREEN /1944/ használt először a hisztokémiában azofestékes technikát a nem-specifikus alkalikus foszfatáz kimutatására. Szubsztrátként naftilfoszfát-észtert használtak. A diazóniumsóval való kapcsolást az inkubáló oldatban szimultán végezték. A reakció menetét a 2. képlet mutatja. BURSTONE /1958 a, b/, valamint RUTENBURG /1958/ szintén az inkubáló oldatban végezte a kapcsolást, csak ők szubsztrátként szubsztituált naftol-észtereket alkalmaztak /pl. naftol-AS-foszfat, 3. képlet/. A hidrolízis után a lehasított szubsztituált naftolt Fast blue RR, Fast red RC, vagy más stabilizált diazóniumsóval kapcsolják.



2. képlet

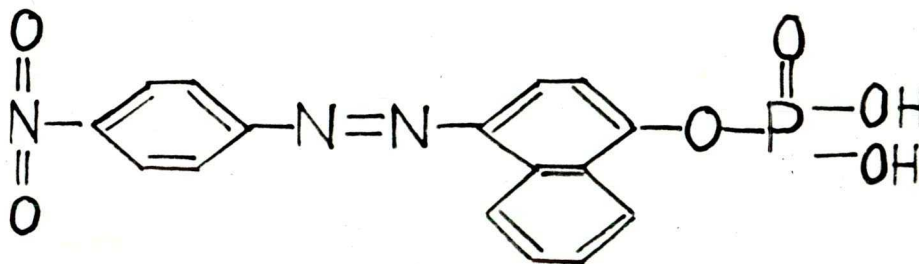


3. képlet



f/2. "Non coupling" azofestékes módszerek

LOVELESS és DANIELLI /1949/ szerint az azo-
kötéses reakciók kivételét nehézkessé teszik a
diazóniumsó bomlékonysága ^x, amely miatt azt min-
dig frissen kell készíteni a használat előtt, s
ami miatt az inkubáló oldat hőmérsékletének ala-
csónynak kell lennie, továbbá hogy a diazóniumsó
az inkubáló oldatban gátló hatást fejthet ki az
enzimre. E nehézségek kiküszöbölésére az általuk
szubsztituált szubsztrát, a p-nitrobenzene-azo-4-
-naftol-1-foszfát /4. képlet/ használatát ajánl-
ják, amelyet gyorsan hidrolizál az enzim, nincsen



4. képlet

^x Ebben az időben stabilizált diazoniumsók még nem álltak rendelkezésre.

gátló hatása, stabil /tehát 37°C-on lehet inkubálni/, és nincs szükség azo-kapcsolásra, mert a hidrolízis után közvetlenül oldhatatlan, színes csapadék válik ki.

f/3. Utókapcsolásos eljárások

DANIELLI /1946/ szubsztrátként Na-fenoltalein-foszfátot használt. A diazóniumsóval való kapcsolás nem az inkubáló oldatban, hanem kimosás után egy másik oldatban történik. Így egyrészt el lehet kerülni a diazóniumsó gátló hatását, másrészt az inkubálást is, és a kapcsolást is a megfelelő hőmérsékleten lehet végezni.

A különböző szerzők véleménye megoszlik a Gömöri-reakció, illetve az azofestékes módszerek értékét illetően. A Gömöri-típusú módszerek hívei közül LORCH /1947/ és YOKOYAMA, STOWELL és MATHEWS /1951/ szerint közepes vagy magas enzimszint mellett, nincs érzékenységi különbség a kétféle típusú reakció között; ezzel szemben alacsony enzimszint mellett a Gömöri-reakció használhatóbb, mert lényegesen érzékenyebb mint az azofestékes módszerek. Igen népes azon szerzők táborára, akik ugyan nem tagadják a Gömöri-típusú technikák használha-

tóságát, de inkább az azofestékes kimutatásokat javasolják /DOYLE 1948, LISON 1948, JACOBY és MARTIN 1949, MANHEIMER és SELIGMAN 1948, CORSI 1955, KISZELY és BARKA 1958, PÓBALAKY 1962, TANKA és KELLER 1962, RÓZSA 1964/.

Ujabban a már felsorolt szempontok mellett még egy szempontot kell figyelembe venni az egyes módszerek használhatóságát illetően. Döntő jelentőségű ugyanis, hogy melyik módszert lehet felhasználni elektronhisztokémiai célokra is. Ilyen szempontból, a hisztokémia mai állása szerint, egyértelműen a Gömöri-típusú módszerek mellett kell állást foglalni.

2. Elektronmikroszkópos módszerek

Az elektronmikroszkóp eredményes használatára a hisztológiában csak akkor kerülhetett sor, amikor a megfelelő vékonyságú metszetek előállítására lehetőség nyílt. Mai értelemben vett szubmikroszkópos szövettani vizsgálatokról ezért csak az 1950-es évek elejétől kezdve beszélhetünk /ultramikrotom/. A különböző szövetféleségek elektronmikroszkópos tanulmányozása még folyamatban volt, amikor már megindultak az elektronhisztokémiai vizsgálatok is. Míg a fénymikroszkópos kimutatásoknál a hangsúly azon van,

hogy a keletkezett végtermék mikroszkóp alatt látható /színes/ legyen, addig az elektronmikroszkópos vizsgálatoknál a végterméknek megfelelő elektrondenzitással kell rendelkeznie. Ezek előrebocsájtása után szinte természetes, hogy az első elektronhisztokémiailag kimutatott enzim foszfatáz /konkrétén: savanyu foszfatáz/ volt./SHELDON, ZETTERQUIST és BRANDES 1955/. A savanyu foszfatáz kimutatásánál ugyanis a keletkezett végtermék színes /fekete ólom-szulfid/ és egyben elektrondenz is, tehát egyaránt alkalmas a megfigyelésre mind fény-, mind elektronmikroszkópos szinten.

a/ Rögzítési eljárások

A vizsgálandó anyag előrögzítése döntő jelentőségű minden elektronhisztokémiai munkában. Az elektronhisztokémiában először használt rögzítő az osmium volt. SHELDON és munkatársai 1 %-os osmiumban rögzítettek néhány percig. BENNETT és LUFT /1959/ 2 %-os osmiumot s-collidin-nel pH 7,4-re pufferezve, MILLONIG /1961, 1962/ pedig foszfát-pufferrel beállított 1 %-os osmiumot ajánl. MILLER /1962/ és SABATINI, BENSCH és BARNETT /1964/ 0,067 M-os kakodilát pufferrel pH 7,4-re beállított 6,5 %-os glutáraldehiddel fixált. KAPLAN és NOVIKOFF /1959/ kalciumos formalint, HOLT és HICKS /1961/ 7,5 %-ban szukrosét tartalmazó foszfát-puffer-

rel pH 7,4-re beállított 4 %-os formalint, KARNOWSKY /1965/ pedig glutáraldehid és paraformaldehid keveréket használt rögzítőszerként. CHASE /1963/ véleménye szerint a kémiai fixálók vizes oldatban történő alkalmazása az enzim rögzítés-közbeni elmozdulását eredményezheti, ami hamis pozitív, vagy éppenséggel negatív reakcióhoz vezet; ennek elkerülésére a fagyasztva-száritásos módszer használatát részesíti előnyben.

Az elektronhisztokémiai vizsgálatok segítségével elég pontos adatok nyerhetők az enzim szöveti lokalizációjára vonatkozóan, a kapott eredményeket azonban fokozottabb óvatossággal kell kezelni. A fénymikroszkópos kimutatásoknál már ismertetett hibák /diffúzió, aspecifikus festődés/ ugyanis itt is felléphetnek, de mivel a nagyítás lényegesen nagyobb, sokszorta nagyobb a veszélye annak is, hogy az ilyen módon nyert helytelen eredményekből hibás következtetéseket vonjunk le.

Ugyanakkor számolni kell az elektronhisztokémiai módszerek saját hibáival is, amelyek közül legfontosabb az osmiumos utófixálás alkalmával bekövetkező dekolorizáció. Ennek lényege, hogy a posztfixáció alatt az osmium a már kialakult reakció végtermékét részben vagy egészben roncsolja, és ezáltal

helytelen negatív eredményeket kapunk. E jelenség észleléséről REALE és LUCIANO /1962, 1964/ számolt be először, de mi magunk is tapasztaltuk az osmium e károsító hatását a reakcióvégtermékre.

Itt rá kell mutatni, hogy az elektronhisztokémiában még nincsenek kialakult normák sem a metodikák, sem a nyert képek értékelését illetően. Az egyes szerzők igen különböző fixálási, inkubálási, beágyazási stb. eljárásokkal kísérleteznek, és így a kapott eredmények, is, természetesen, sokszor eltérnek egymástól. Tény az, hogy ezen a szinten két fontos követelményt kell szem előtt tartani. Egyik, hogy a reakció-végtermék a képződés helyén maradjon, tehát a lokalizáció pontos legyen, a másik - amelynek lényegesen nehezebb eleget tenni -, hogy az alapszerkezet tökéletesen megtartott legyen, azaz minél kisebb legyen a reakció-okozta szövetkárosodás.

b/ Közvetett, vagy utókapcsolásos módszerek

Az ilyen típusu metodikák lényege az, hogy az enzimaktiv területeken felszabaduló foszfát-gyök és az inkubáló oldatban lévő kalcium által képzett csapadékban a kalcium lecserélése az elektrondenz fém-mel nem az inkubálás alatt, hanem egy külön lépésben történik. A nem-specifikus alkalikus foszfatázt szub-

mikroszkópos szinten először BRANDES, ZETTERQUIST és SHELDON /1956/, valamint BRANDES és ELSTON /1956/ mutatták ki ily módon. A vizsgálandó anyagot 1 %-os osmiumban rögzítették, majd a Gömöri-féle oldatban inkubálták /glicerofoszfát, kalcium, alkalikus pH/. A kalciumot utólag helyettesítették ezüsttel. Az elektrondenz ezüstoffoszfát elhelyezkedése jelezte az enzimaktiv területeket. Az ilyen jellegű módszerek-nél meg kell említeni, hogy az elektrondenz fém másodlagosan történő kapcsolása esetében nincs biztosíték arra, hogy minden kalcium-ion lecserélődött a megfelelő fémmel, és ennek következtében - mivel a kalcium denzitása lényegesen alacsonyabb, mint az ezüsté - könnyen észlelhetünk hamis negatív reakciót. További problémát okoz a kalciumfoszfát oldékonysága, amely miatt a pH-t elég magasan kell tartani az inkubálás alatt, ami viszont a finomabb struktúrák károsodásához vezethet és nagymértékben megnehezítheti a pontos lokalizációt. Ha viszont alacsonyabb pH mellett végezzük a reakciót, akkor az esetleg kioldódott kalciumfoszfát okozhat hamis negatív reakciót.

c/ Közvetlen kapcsolásos eljárások

Itt az elektrondenz fém bekötése már az inkubálás ideje alatt megtörténik. A módszer kidolgozása

MÖLBERT, DUSPIVA és DEIMLING /1960/, valamint CLARK /1961/ nevéhez fűződik. Osmiumban rövid ideig fixált anyagot inkubáltak glicerofoszfát- és ólomnitrát-tartalmu oldatban pH 7,8 mellett, amelyet osmiumos posztfixálás, majd beágyazás követett. Ilyen körülmények között az ólom közvetlenül bekötődik a felszabaduló foszfát-gyökhöz. Így lehetőség nyílik arra, hogy a reakció menetét lerövidítsük, ami csökkenti a diffúzió veszélyét. Elkerülhetők továbbá a kicserélődéssel kapcsolatos hibák, és végül alacsonyabb pH használható, miáltal csökken az erősen lugos pH-okozta destrukció. Hasonló eljárást dolgozott ki HUGON és BORGERS /1966/, akik osmium helyett glutáraldehydet használtak előrögzítésre, minthogy szerintük az osmium bénítja az enzimet.

Meg kell jegyeznünk, hogy az alkalmazandó pH mértékét az határozza meg, hogy az ólom milyen koncentrációját akarjuk létrehozni az inkubáló oldatban. Lugos tartományban ugyanis az ólomnak csak egy bizonyos része marad oldatban, és pedig az adott pH értéknek megfelelő mennyiség. Minél lugosabb az oldat, annál kevesebb ólom marad oldatban. Tehát az inkubáló oldatba mért ólom mennyisége nem mindig azonos az inkubálás alatti koncentrációval.

Szimultán kapcsolásos eljárást dolgozott ki

CHASE /1963/, aki az elsődlegesen képződött kalcium-foszfátot tekinti a reakció végtermékének, és annak elhelyezkedését vizsgálta elektronmikroszkóp alatt. MIZUTANI és BARNETT /1965/ kalcium helyett kadmiumot helyezett az inkubáló oldatba, és a keletkező kadmium-foszfát-csapadék denzitását vizsgálta. Ezen két utóbbi módszernek nincs gyakorlati jelentősége az alkalmazott fémek alacsony denzitása és az inkubáló oldat magas pH-ja miatt. /Az egyik a kiértékelést teszi nehézkesé, a másik pedig az alapszerkezet destrukcióját okozhatja./ Nem tisztázott az sem, hogy a reakció végtermékében végülis milyen fém szerepel, mert ha alkalmaznak ólomcitrátos utófestést, akkor felmerül annak a lehetősége, hogy az alacsony denzitású fémek a citrátozás alatt lecserélődnek ólommal.

III. A NEM-SPECIFIKUS ALKALIKUS FOSZFATÁZ
KIMUTATÁSÁVAL KAPCSOLATOS
SAJÁT VIZSGÁLATOK

Az alkalikus foszfátáz kimutatásával kapcsolatos vizsgálatokat a Gömöri-típusú reakción alapuló módszerekkel végeztük. Olyan kimutatási eljárást óhajtottunk kiválasztani, illetve kikísérletezni, amelynek segítségével kifogástalan eredményeket lehet nyerni mind fény-, mindpedig elektronmikroszkópos szinten. Gyakorlatilag kifogástalan eredményeket biztosító fénymikroszkópos-hisztokémiai módszerek rendelkezésre álltak ugyan, mégis elengedhetetlen volt a fénymikroszkópos vizsgálatok elvégzése is. Abból az elvből indultunk ki ugyanis, hogy csakis azon eljárással nyert elektronmikroszkópos eredmények tekinthetők elfogadhatónak, amelyekkel fénymikroszkóposan is hibátlan lokalizációt lehet elérni. Más szóval, amikor egy-egy fénymikroszkópos metodikán kisebb-nagyobb változtatást eszközölünk a szubmikroszkópos szinten való alkalmazhatóság céljából, akkor a módosított eljárásnak továbbra

is használhatónak kell maradnia fénymikroszkópos szinten is. Amennyiben ez nem áll, vagy az ily módon kapott eredmények nem kielégítőek, úgy az ilyen eljárásokkal nem is kísérleteztünk elektronmikroszkóposan. Gyakorlatilag az elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt metodikák "hitelesítése" fénymikroszkópos szinten történik. Munkánk során a hisztokémiai reakció minden egyes lépésével kapcsolatban kísérleteket végeztünk, és az így kapott eredményeket az irodalomból ismert adatok kombinálásával igyekeztünk létrehozni egy, a célnak megfelelő fény- és elektronmikroszkópos hisztokémiai eljárást az aspecifikus alkalikus foszfatáz kimutatására.

1. A rögzítő szer és a rögzítés körülményeinek megválasztása

a/ Rögzítetlen anyagon végzett kísérletek

Annak érdekében, hogy a különböző fixáló anyagoknak enzimre és strukturára gyakorolt károsító hatását elkerüljük, kézenfekvő megoldásnak látszana a rögzítetlen anyag használata. Ami a rögzítés problematikáját illeti, ez lenne az ideális állapot. Az "ideális állapot" azonban más tudományágak kísérleteiben is elérhetetlen; így ez a hisztokémiában, és főleg

az elektronhisztokémiában is csak megközelíthető. Szubmikroszkópos vizsgálatoknál ugyanis a rögzítés elkerülhetetlen, mert a szövet elhalása után azonnal jelentkező bomlási folyamatok /autolizis/ olyan elváltozásokat okoznának, hogy az igen megnehezítené a kapott képeken a tájékozódást. Ha viszont az ideális állapot elérhetetlen, akkor arra kell törekednünk, hogy minél közelebb kerülhessünk hozzá, vagyis olyan rögzítési módot kell alkalmazni, amely az enzimaktivitás vonatkozásában a legkisebb destrukciót okozza, és amelynek segítségével viszonylag tökéletesen megtartott alapszerkezet nyerhető.

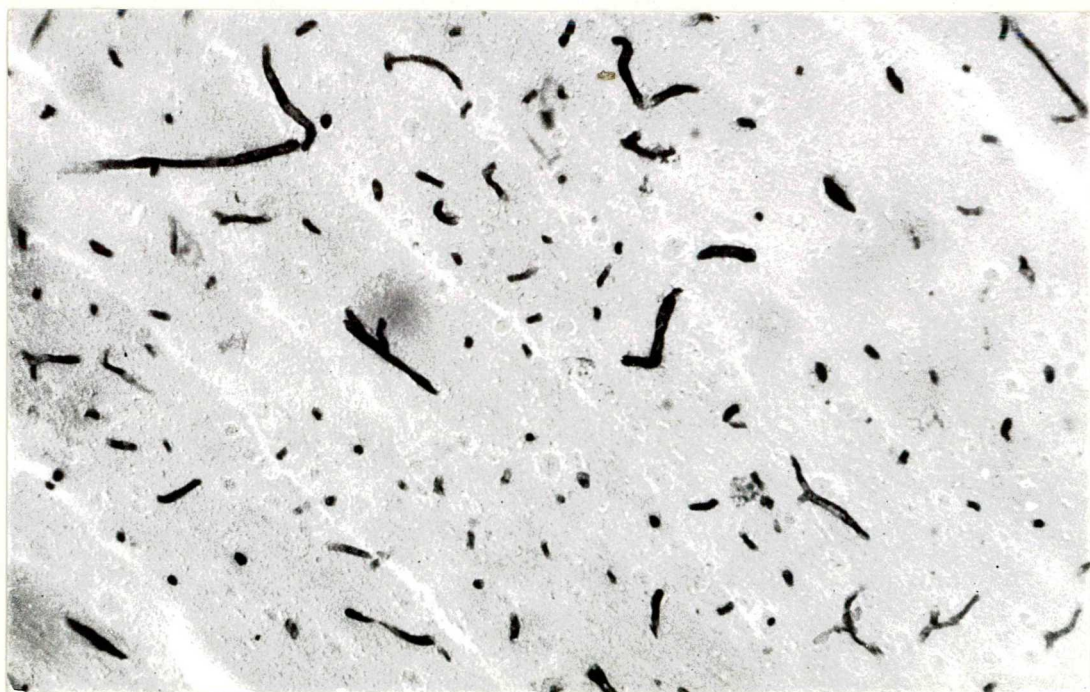
Amennyiben az elektronhisztokémiában a rögzítés elkerülhetetlen, úgy felmerül a kérdés, vajon mi a célja a nativ anyagon való kísérletezéseknek? Itt elsősorban arra szerettünk volna választ kapni, hogy mennyiben jogos a fénymikroszkópiában az idegenkedés a rögzítetlen anyagok használatától, és hogyan értékelhetők az ily módon nyert képek. A friss-fagyasztott anyaggal végzett munkák eredményei felhasználhatók továbbá a diffúzió, az aspecifikus fémkötődés stb. kérdéseivel kapcsolatban is.

Rögzítetlen anyagban már sokan kimutattak alkalikus foszfatáz-aktivitást: EGER 1950, BRANDES és ELSTON 1950, BURGOS, DEANE és KARNOVSKY 1955, MAENGWYN-

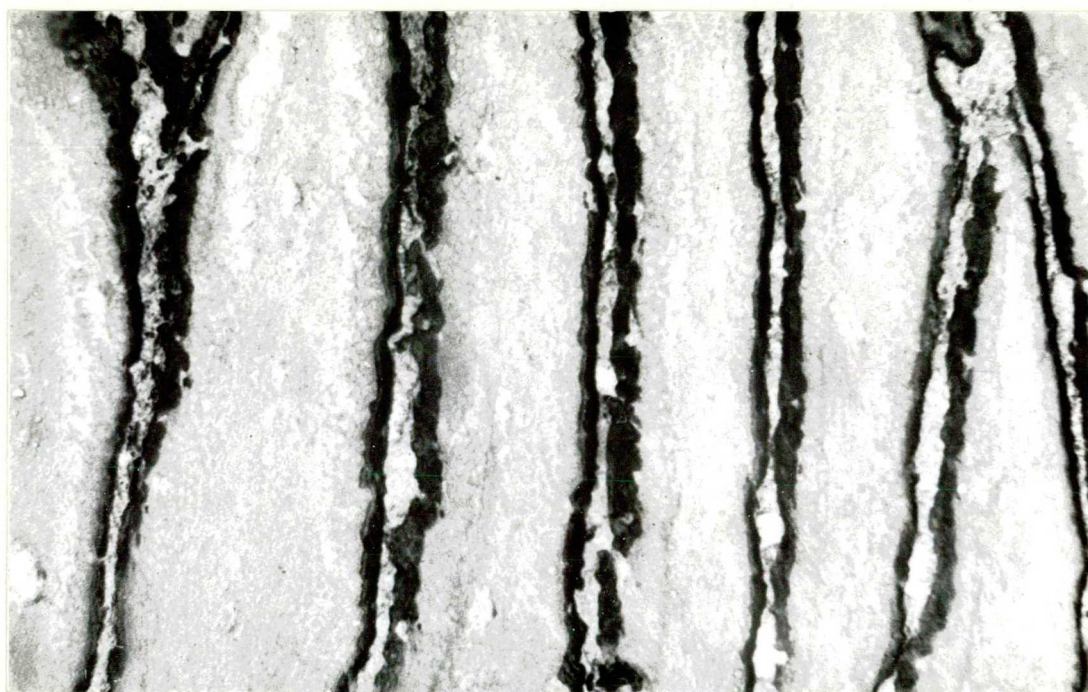
DAVIES és FRIEDENWALD 1950, RICHTERICH 1952, ROMANUL és BANNISTER 1962, WACHSTEIN 1955, WACHSTEIN és MEISEL 1957, stb. Ezen próbálkozások eredménnyel jártak és többen megemlítik, hogy nativ anyag használata alkal-mával lehet a legjobb eredményeket elérni. Ettől füg-getlenül kialakult egy olyan nézet, amely szerint az alkalikus foszfatáz kis molekulájú enzim lévén, hajla-mos a diffúzióra, és csak a kellően előkezelt /rögzi-tett/ anyagokon végzett kísérletek vezethetnek ered-ményre /WEGMANN 1966/.

A kérdés tisztázása érdekében friss fagyasztott anyaggal végeztünk kísérleteket. Patkány-vékonybélből és nagyagykéregből kriosztátos metszeteket készítet-tünk, és azokat felszárítás nélkül - tehát fizikai rögzítés sem volt! - inkubáltuk a Gömöri-féle glicero-foszfát-kalciumos oldatban, majd ólommal lecseréltük a kalciumot, és így vizsgáltuk az enzim lokalizáció-ját /1-2. ábra/. Az inkubálást szobahőmérsékleten és jól záró üvegedényekben végeztük; ezáltal sikerült el-kerülni az inkubáló oldat párolgását /bekoncentráló-dását/. Így tisztább felületű metszeteket kaptunk.

Vizsgálataink alapján kitűnik, hogy a nem-speci-fikus alkalikus foszfatáz ilyen körülmények között is tökéletesen kimutatható. A szükségesnél hosszabb in-kubálási idő esetében természetesen felléphetnek dif-



1. ábra. Patkány-nagyagykéreg. Friss-fagyasztott metszet. Gömöri-módszer. Inkubáció 10 perc. A kapillárisokban diffúzió-mentes reakció látható. x 180.



2. ábra. Patkány-vékonybél. Friss-fagyasztott metszet. Gömöri-reakció. Inkubáció 5 perc. Reakció a kutikulában. Műtermék nem észlelhető. x 500.

fúziós műtermékek, viszont ezek jól rögzített anyagokon is észlelhetők tulinkubálás alkalmával. A szükséges inkubálási idő nagymértékben lecsökken, ami érthető, mert az enzim szinte száz százalékban jelen van, és így nagyobb aktivitást képvisel.

/A nagyobb aktivitásu helyek DANIELLI /1946/ szerint rövidebb idő alatt reagálnak; a különböző előkezelések után az enzim kisebb-nagyobb károsodást szenved, amely elérheti a 80-90 %-ot is, aminek következtében hosszabb inkubálási időt igényelhet./ Diffúziót, magreakciót, vagy más aspecifikus festődést nem észleltünk.

b/ A rögzítő-oldat pH-jának hatása az enzimreakcióra

Számtalan vizsgálat történt annak megállapítására, milyen hatással vannak az enzimreakcióra a különböző előkezelési procedurák, így: a fixáló anyaga, hőmérséklete, a fixálás időtartama. Kísérleteket végeztek arra vonatkozóan is, hogy a reakció előtt alkalmazott kationok és anionok milyen hatást gyakorolnak az enzimre /FREIMAN 1956, 1962/. A rögzítő pH-jának esetleges hatását viszont - tudomásom szerint - nem vizsgálta senki. A kérdés felvetése indokolt, mert az enzimreakciók nagy többségénél a fixálás és

az enzim működésének optimális pH-ja nem esik egybe. Így az alkalikus foszfatáznál sem, ahol az inkubálás pH 7,8 - 9 között, a fixálás pedig pH 7 - 7,6 mellett történik. Amennyiben tehát a reakció kivitelénél a pH lényeges faktor, úgy valószínű, hogy a rögzítésnél alkalmazott pH is befolyásolhatja az eredményeket. Természetesen a pH hatása sokszorta kisebb mértékű az enzim-fehérjére, mint amilyen mértékű lehet az enzim aktivitására. A kérdés csak az, vajon a pH változtatásának ez a hatása a rögzítés alkalmával mennyiben észlelhető hisztokémiailag. Ennek eldöntésére kísérleteket végeztünk patkány-vesén és -májon. 4 %-os formalinból sorozatot készítettünk pH 7,25, 8,18 és 9,16 mellett. A pH beállítása Michaelis-puffer /PEARSE 1961/ segítségével történt. Két órás rögzítés után elvégeztük a Gömöri-féle enzimreakciót. A vese esetében nem találtunk különbséget sem a lokalizáció, sem pedig az intenzitás tekintetében. A máj vizsgálatakor ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy meglepően nagy különbségek vannak a lokalizációt illetően a különböző pH mellett rögzített anyagoknál. A pH = 7,25-nél rögzített anyagoknál a sejtmagok, pH = 8,18-nál a sinusok, a pH = 9,16-nál rögzítetteknél pedig az epekapillárisok és a sinusok egy része mutatott reakciót.

A kísérletek többszöri megismétlése után azonban kitűnt, hogy ezen lokalizációs különbségek csak részben erednek a fixáló anyag pH-jának változtatásából. Bár az esetek többségében az előbb említett különbségek voltak észlelhetők, sok esetben mindhárom pH mellett az epekapillárisok reagáltak, sőt az is előfordult, hogy egyáltalán nem kaptunk semmiféle reakciót. A máj alkalikus foszfatáz-aktivitásának kimutatása ugyanis elég labilis a Gömöri-módszerrel, ami nem a módszer használhatatlanságából ered, hanem onnan, hogy a kimutatás sikere nagymértékben függ a máj funkcionális állapotától. HOLMGREEN /1950/ tapasztalatai szerint a májban a foszfatáz-aktivitás napszakonként változik. Bár minket a dolog metodikai része foglalkoztatott inkább, kísérleteket végeztünk arra vonatkozólag is, melyik napszakban, milyen minőségű étkeztetés mellett, vagy éppenséggel éheztetés alkalmával lehet-e a májon a kimutatást standardizálni. A napszakonkénti vizsgálat és a különböző minőségű étrendek mellett sem tudtuk a patkány-májban a kimutatást minden esetben sikeresen végrehajtani. Tényként állapítható meg viszont az, hogy éheztetés hatására az epekapillárisok kitépődtek.

Tapasztalataink szerint tehát a rögzítő oldat pH-ja bizonyos határok között nem befolyásolja az enzim lokalizációját és aktivitását hisztokémiailag észlelhető módon. A májnál tapasztalt lokalizációs különbségek nem írhatók sem a különböző pH, sem pedig a metódika rovására. E kérdések végleges megoldása csupán biokémiai és hisztokémiai módszerek együttes alkalmazásával lesz lehetséges.

c/ A fixáló anyag megválasztása

A rögzítő anyagát mindig az alkalmazott metszetkészítési technika határozta meg. A paraffinos metszetek korszakában az alkohol- és acetón-rögzítés volt a leghasználatosabb; ennek szinte egyenes folytatásaként következett a beágyazás. Később, amikor a fagyasztott metszetek használata került előtérbe, akkor - mivel az alkohol vagy acetón után az anyag nagyon rosszul fagyasztható - a formalinos fixálás látszott célravezetőbbnek. Az utóbbi időkben a fizikai fixáló módszerek használata vált divatossá. Feltűnő, milyen széles skáláját alkalmazták a rögzítő szereknek ezzel az enzimmel kapcsolatban, és a legegyszerűbbtől, a rögzítetlen anyag használatától mennyire idegenkedtek és idegenkednek ma is. Ennek oka valószínűleg az, hogy a legtöbben túlzott jelentőséget tulajdonítottak a diffúciónak, mint a műtermékképződés lehetőségének. Ezek után szinte természetes, hogy egymásután születtek /"a diffúzió elleni küzdelem" jegyében/ a fixálás és a reakció kivitelével kapcsolatos módosítások.

Annál nagyobb gondot okoz a fixálás az elektronhisztokémiában. Eleinte az elektronmikroszkópiában egyébként jól bevált osmiumot alkalmazták. BARNETT

és TICE /1963/ szerint osmium előrögzítés után, blokkfixálás esetében létrejön egy külső tuldfixált réteg /enzimaktivitás itt már nem mutatható ki/, egy középső optimálisan rögzült, enzimaktiv rész, és egy belső fixálatlan réteg, amely szintén aktiv. Amennyiben ez igaz, úgy tág lehetőség nyílik arra, hogy különböző hibás végeredményeket kapjunk, ugymint hamis pozitív és hamis negatív reakciót, valamint az aspecifikusan kötődő fém által okozott műtermékeket /az ilyen fémkötődés csak fixálatlan területeken jön létre, és csak elektronmikroszkópos szinten okoz komoly problémát/. Az eredmény tehát végső soron attól függ, hogy a blokk melyik része került beágyazásra. E kérdéssel kapcsolatosan végzett kísérleteink menetét a táblázat mutatja. Eredményeink alapján az első és legfontosabb észlelés, hogy az osmium már egy perc alatt is komoly enzimdestrukciót okoz, hosszabb idő után pedig teljesen inaktivál. Ugyanezt tapasztalta HUGON és BURGERS /1966/ is. Márpedig, még kis blokkok esetében is, a normális rögzítéshez legalább tíz perc szükséges, amely idő alatt viszont az enzim szinte teljesen inaktiválódik. Az osmiumos rögzítés után az aspecifikus fémkötődés hasonló, ha nem nagyobb, mint a friss-fagyasztott anyagok esetében. A formalin-fixálás után aspecifikus ólomkötődés nem

1. táblázat

Fixálás	Inkubálás	Anyag	Eredmény
1 %-os osmium 5'	1 %-os ólomnitrát	Patkány vese, agy	Aspecifikus fémkötődés
1 %-os osmium 1'	Gömöri-mixtura	Patkány vese	Részleges inaktiválódás
1 %-os osmium 8'	Gömöri-mixtura	Patkány vese	Közel teljes inaktiválódás
1 %-os osmium 15'	Gömöri-mixtura	Patkány vese	Teljes inaktiválódás
4 %-os formalin 2 óra	1 %-os ólomnitrát	Patkány vese, máj, agy	Aspecifikus fémkötődés nem volt
Friss-fagyasztott	1 %-os ólomnitrát	Patkány vese, agy, máj	Aspecifikus ólomkötődés

volt észlelhető. Ezek után valószínűnek látszik, hogy az osmium lényegbevágóan más jellegű rögzítést ad, mint a formalin; osmium-fixálás után az anyag az aspecifikus ólomkötődést illetően úgy viselkedik, mint a fixálatlan anyag. Ugy látszik tehát, hogy a BARNETT és TICE által feltételezett, különböző mértékben fixálódott rétegek közül valójában csak kettő létezik: egy fixált, inaktív, és egy rögzítetlen, aktív réteg.

Ezen kísérletek elvégzése után arra a következtetésre jutottunk, hogy az osmiumos előrögzítés mindenképpen kerülendő. /Ujabban más enzimek, pl. cholin-

esterase elektronmikroszkópos kimutatásánál is használják az osmiumot, mint előrögzítőt /BARRNETT 1962/. Az osmiumos prefixálás itt is az ólomnak a membránokhoz való aspecifikus kötődését okozza, és az enzimműködésnek tulajdonított reakció is inkább osmium-okozta ólomaffinitás eredményének tekinthető! /

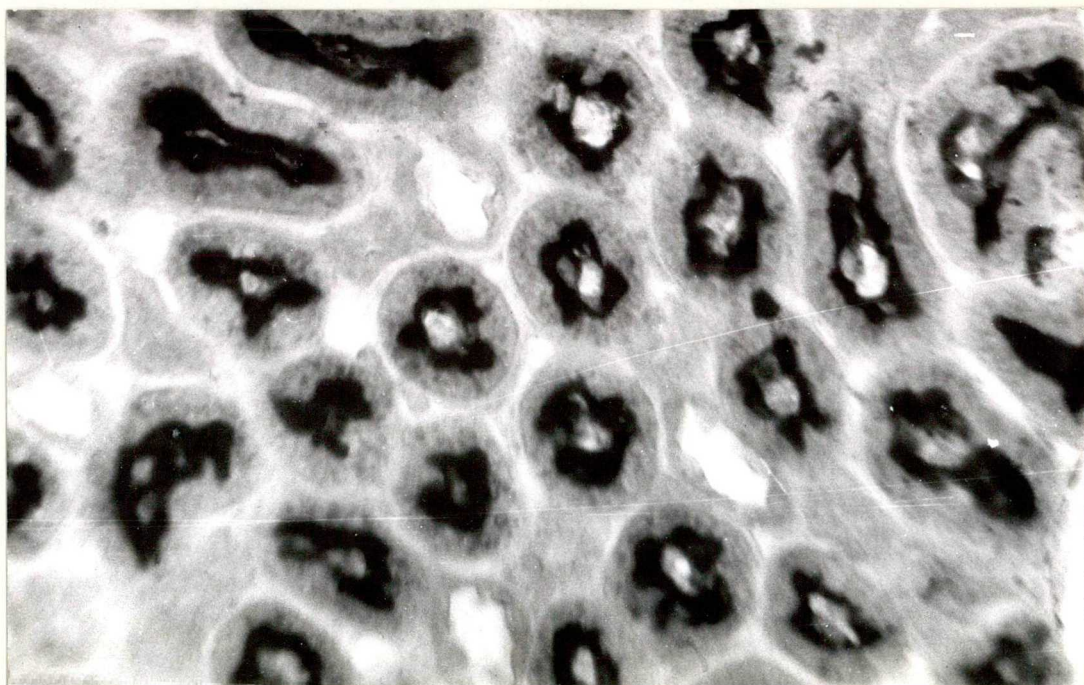
Az aspecifikus fémkötődés mértéke jelentősen függ az alkalmazott technikától. A közvetett kapcsolásos eljárások esetében ugyanis lényegesen kisebb a veszélye annak, hogy a helytelenül rögzített részeken az alkalmazott nehézfém bekötődjék, hiszen itt csak 2-3 percig van kapcsolatban a metszet a nehézfém-oldattal. Ezzel szemben a direkt kapcsolásos módszereknél az inkubálás ideje alatt kezdettől fogva a nehézfém oldatában van az anyag, tehát lényegesen nagyobb a veszélye annak, hogy az osmium-rögzített, vagy a kevésbé jól rögzített területeken műtermékjellegű festődés keletkezzék.

Az irodalmi adatok szerint és saját vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy a legmegfelelőbb rögzítés mind fény-, mind elektronmikroszkópos célokra a pH 7,4-7,8-ra pufferezett formalin; esetenként a formalin és a glutáraldehid keverékének használatával szintén jó eredmények érhetők el.

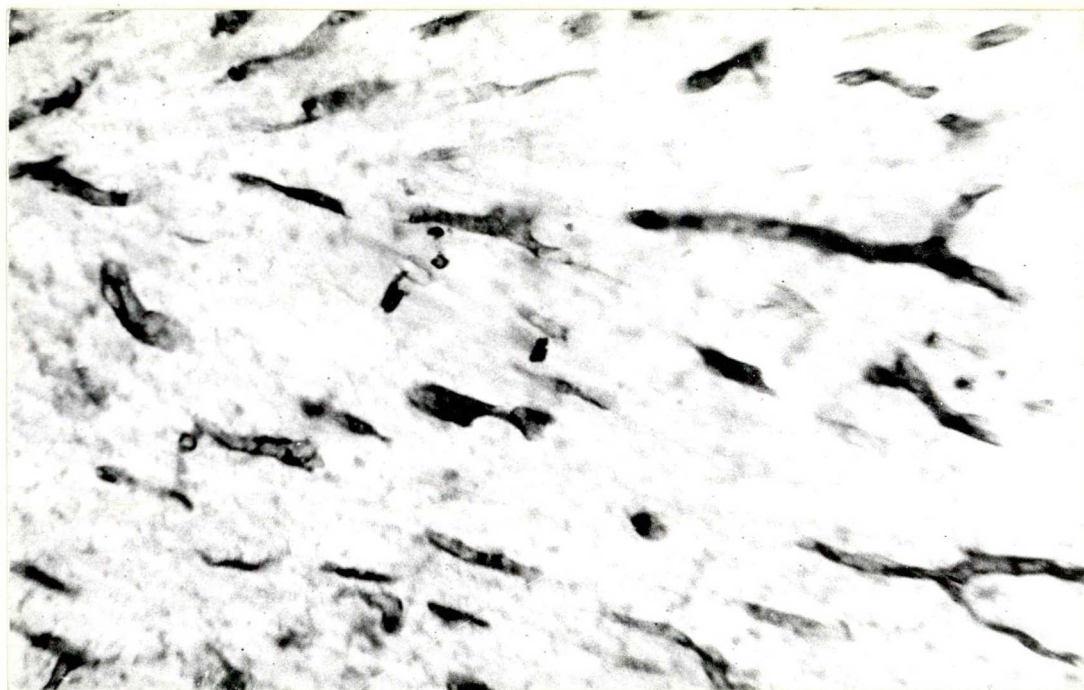
A rögzítés kivitelére két módozat kínálkozik: az immerziós és a perfuziós fixálási technika. Több szerző szerint a perfuziós módszerrel jobb eredmények

nyerhetők. Ezzel kapcsolatban fénymikroszkópos vizsgálatokat végeztünk /3-6. ábra/. Glutáraldehydes perfúzió után vizsgáltuk az alkalikus foszfatáz lokalizációját. Fénymikroszkóposan nem találtunk különbséget a kétféle módon fixált anyag között. Perfúziós rögzítés után viszont meg kellett nyujtani az inkubálási időket; valószínűleg azért, mert a perfúziós fixálás lényegesen erősebb, hatásosabb, mint az immerziós.

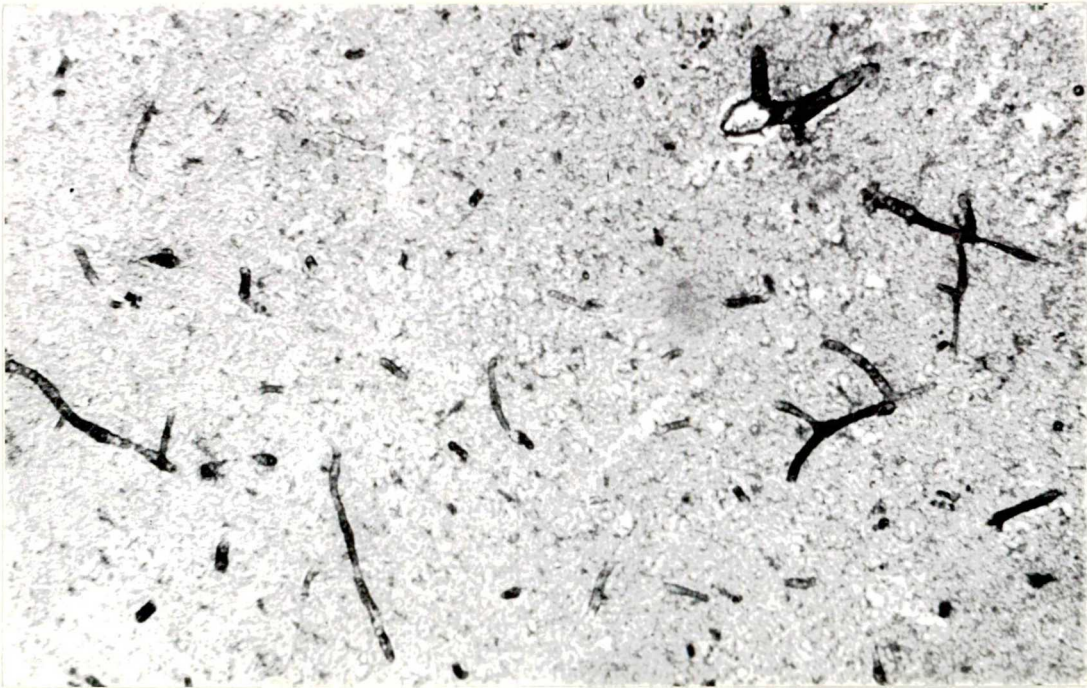
A perfúziós fixálás nagy előnye, hogy utána az anyag kivágása sokkal könnyebb; a megfelelő területet a fixált anyagon sokkal nyugodtabban megkereshetjük. Kiboncolhatjuk, mivel nem fenyeget annak a veszélye, hogy időközben megindul az alapszerkezetet károsító bomlási folyamat. Azokban az esetekben, amikor a megfelelő területrész kivágása nem okoz problémát, célszerűbb az immerziós technika alkalmazása; időveszteséggel nem jár a perfúzióval szemben, és - nem utolsó sorban - lényegesen egyszerűbb a kivitelezése. Mindkét esetben az állat halála után gyakorlatilag azonos idő múlva kerül kapcsolatba a felhasználásra kerülő szövet a fixáló anyaggal. Munkánk folyamán inkább az immerziós technikát részesítettük előnyben.



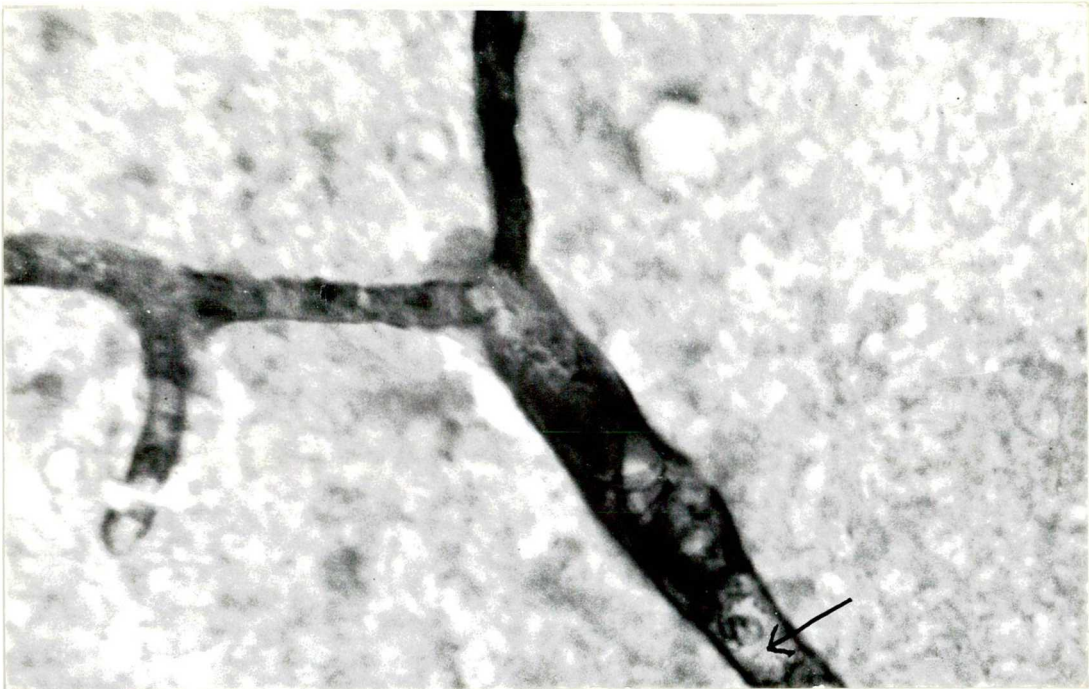
3. ábra. Patkány-vese. Perfúziós rögzítés, glutáraldehid. Gömöri-módszer. Inkubáció 50 perc. Reakció a kefeszegélyben. x 500.



4. ábra. Patkány-szívizom. Módszer u.a. mint a 3. ábra. Reakció a kapillárisokban. x 500.



5. ábra. Patkány-nagyagykéreg. Glutáraldehydes perfu-
ziós fixálás. Gömöri-módszer. Inkubálás 40
percig. A kapillárisok mutatnak reakciót.
x 180.



6. ábra. U.a. mint az 5. ábra. A nyíl egy endothel-
sejtmagra mutat. x 1200.

2. Az elektronrendez fém kiválasztása

Az elektronhisztokémiai vizsgálatok esetében az osmiumos utófixálás elkerülhetetlen. Ezesetben viszont számolni kell az osmium közismert dekolorizáló hatásával, amelynek következtében a képződött reakció-végtermék kioldódik a metszetből, ami hibás negatív eredményekre vezethet. Az osmiumnak a posztfixálás alkalmával jelentkező károsító hatását ma már eredményesen ki tudjuk védeni. Igen hatásosnak bizonyult ezen cél érdekében a direkt kapcsolásos eljárás alkalmazása. Feltételezhető, hogy priméren lényegesen stabilabban kötődik a fém, mint másodlagosan, és így az a későbbiekben hatásosabban ellen tud állni az osmium dekolorizáló hatásának. /Emellett a direkt kapcsolással el lehet kerülni a közvetett kapcsolásos eljárások egyik, a kalcium és az ólom kicserélődésének tökéletlen voltából adódó hibáját. Igen sokszor előfordul ugyanis, hogy ezen kicserélődés nem teljes, tehát nem minden kalcium-ion helyettesítődik ólom-ionnal, ami könnyen hamis negatív reakcióhoz vezethet./ Nagymértékben csökkenti a dekolorizáció veszélyét a BENNETT és LUFT /1959/ által javasolt kollidin-es osmium használata, amikor is 0,2 M-os kollidin-oldat és 2 %-os osmium-oldat 3:1 arányu keverékében végezzük az utórögzítést.

Ezek alapján a direkt kapcsolásos eljárások alkalmazása előnyösebb. Itt azonban újabb problémákkal kell szembenéznünk. Ebben az esetben ugyanis - a megfelelő denzitással rendelkező és fénymikroszkóposan is láthatóvá tehető - fém-ionnak az inkubáló oldatban kell jelen lennie, melynek következtében számol-

nunk kell a nehézfém és az inkubáló oldat egyes komponenseinek egymásra gyakorolt hatásával.

Az alkalikus foszfatáz szubmikroszkópos kimutatásakor, a direkt kapcsolásos eljárás alkalmazása esetében a következő nehézfémek használata jöhetett számításba: Pb^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Ag^{+} . A leggyakrabban használt fém ezek közül az ólom; az ólom jelenléte azonban különböző problémákat vet fel. Meglehetősen nagy befolyása van az eredményekre az ólom-só tisztasági fokának. A tisztasági foktól függetlenül eltérő eredményekre vezethet a különböző cégek által előállított készítmények használata /szennyezések?/. További problémát okoz, hogy az ólom rendkívül érzékeny a hisztokémiai laboratóriumokban gyakran jelenlévő kénhidrogén-gőzökre. Ilyenkor az inkubáló oldat hamar megzavarosodik, és a metszetek felületén szennyeződés rakódik le. Ennek elkerülése érdekében célszerű az inkubálást és a szulfidozást külön helyiségben végezni. A legnagyobb nehézséget az inkubáló oldat lugos pH-ja okozza; az ólom ugyanis lugos körülmények között eléggé korlátozott mértékű koncentrációban marad csak oldatban. /Ez a koncentráció függ egyrészt az ólom, másrészt a szubsztrát minőségétől, de az alkalmazott lugosító anyagtól is./ Az inkubáló oldat pontos ólom-koncentrációját nem tudjuk megha-



tározni, mert az oldat-készítésnél mindig képződik kisebb-nagyobb mennyiségű csapadék, amely részben a lúgos pH-nak, részben pedig a szubsztrát esetleges bomláskövetkeztében jelenlévő foszforsavnak köszönhető. Így az ólom bizonyos részét kénytelenek vagyunk ólomfoszfát vagy ólomhidroxid formájában kiszűrni. Az inkubáló oldat készítésénél tehát, a fentemlitett szempontokat figyelembe véve, az ólomnitrátot mindig főlőslegben alkalmazzuk. Attól függetlenül, hogy az adott lúgos pH mellett az ólomnak ugyanis csak egy bizonyos küszöbértéknyi mennyisége marad oldatban /tapasztalat szerint ez elegendő a megfelelő eredmények eléréséhez/, gondolnunk kell arra, hogy a szubsztrát esetleges bomlástermékeivel való reagálás /csapadék-képződés/ után legalább ennek a küszöbértéknek megfelelő mennyiségű ólom meg is maradjon az inkubáló oldatban.

Az ólom használatának ilyen körülményes volta késztetett bennünket arra, hogy más fémek alkalmazásával is kísérletezzünk. Ebből a szempontból az alkális foszfátáz kimutatásánál legelőször használt fémeket, a kobaltot és ezüstöt próbáltuk ki.

Az ezüsstel kapcsolatban hamarosan kiderült, hogy teljesen alkalmatlan elektronhisztokémiai célokra a direkt kapcsolásos eljárások alkalmazásakor. Lúgos pH mellett az ezüst teljes mértékben kicsapódik;

kizárólag az ammóniumhidroxiddal alkotott komplexe tartható oldatban lúgos körülmények között. Ez a vegyület viszont eleve olyan magas pH értéket ad, hogy a szubmikroszkópos struktúrák épen maradására nem lehetett számítani. Mindezek mellett az ezüst kötődése az ammóniás komplexben sokkal erősebb, mint az ezüst és a foszfát-gyök közötti kapcsolat, s így az ezüstnek a komplexből való felszabadítása foszfát-ionok hatására nem történhet meg. Ilyen körülmények között az ezüst még fénymikroszkóposan sem volt alkalmazható ^x.

A kobalt ezzel szemben igen jól tűri az alkalikus pH-t és maradéktalanul oldatban marad ilyen körülmények között. Denzitása is megfelelő mértékű. A kobaltos inkubáló oldat kristálytiszta marad. A felszabaduló foszfát gyökkel lereagál: kobaltfoszfát formájában kicsapódik. Sajnos, a kobalt direkt kapcsolásos formában már fénymikroszkópos szinten sem használható. Alkalmatlanságának oka ugyanaz, mint azt már az utókapcsolásos eljárásoknál is említettük: magfestődést eredményez.

^x

Utókapcsolásos formában /MOFFAT 1958/ az ezüst használható fénymikroszkópos szinten!

A bárium is jól oldatban marad lugos pH mellett, denzitása igen magas, fénymikroszkóposan használható /reagense a rodizonát, amellyel színes csapadékot ad/. Ennek ellenére direkt kapcsolásos módszerben nem tudtuk használni: már fénymikroszkóposan sem kaptunk vele eredményt. Ismerve azt, hogy a bárium és a rodizonát reakciója nem ad mindig jól lokalizálható végterméket, kísérleteket végeztünk arra vonatkozóan, vajon a bárium egyáltalán lereagál-e a hidrofoszfát-gyökkel. Amennyiben lereagál, de a rodizonáttal nem festődik kellően, úgy elektronmikroszkópban még mindig észlelni lehetne a bárium jelenlétét. Elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján azonban azt a következtetést kell levonnunk, hogy a bárium egyáltalán nem hajlandó reagálni a felszabaduló foszfát-gyökkel a szimultán kapcsolásos módszer körülményei között.

A különböző fémekkel végzett kísérletek világosan bebizonyították, hogy csak az ólom használható közvetlen kapcsolás esetében, ami egyben jelenti azt is, hogy vállalni kell az ezzel járó nehézségeket. Ha tehát megfelelő eredményeket akarunk kapni, úgy kellő elővigyázatossággal kell a reakció körülményeit megválasztani, az ólom-ionok oldatban-tartása miatti nehézségeket és az esetleges műtermék-képződés veszélyeit figyelembe véve.

3. Az inkubálás kivitele; az ólomfoszfát
átalakítása ólomszulfiddá

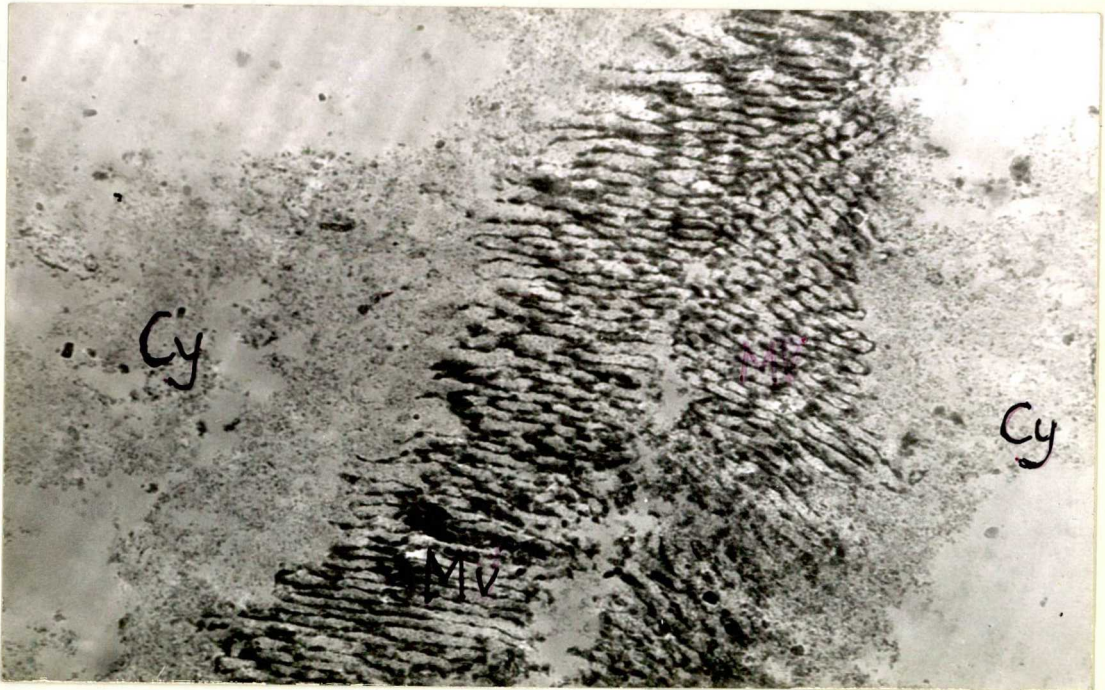
Szubsztrátként minden esetben MERCK-gyártmányú p.a. Na-b-glicerofoszfátot alkalmaztunk. A pH-t p.a. minőségű Na-veronállal 7,8-ra állítottuk be. Aktivátort nem alkalmaztunk. ^x A megfelelő tisztaságú ólom-nitrátot mindig legutoljára, cseppenként vittük az inkubáló oldatba, annak rázogatója közben. Amennyiben a vegyszerek megfelelő tisztaságúak voltak, úgy az inkubáló oldat legfeljebb enyhe opaleszkálást mutat. Az oldatot használat előtt szűrőpapíron átszűr-tük. Az inkubálást szobahőmérsékleten végeztük; így elkerülhető az inkubáló oldat betöményedése, és az ennek következtében létrejövő zavarosodás. /Ha ez bekövetkezik - pl. magasabb hőmérsékleten! -, úgy a bekonzentrálódás következtében lecsapódó ólom-hidroxid a metszetek felületére rakódik; ami azokat gyakorlatilag használhatatlanná teszi./ A laborató-riumban esetleg jelenlévő kénhidrogén-gőzök szennye-ző hatásának elkerülése érdekében az inkubálást zárt edényben végeztük.

^x

Fénymikroszkóposan semmi különbséget nem mutattak az aktivátorral és az anélkül kapott eredmények.

A direkt kapcsolásos módszereknél az inkubálás után az enzimaktiv területeken már ólomfoszfát csapadék van. A fénymikroszkópos észlelhetőség érdekében ezt színes csapadékká kell átalakítani, esetünkben fekete ólomszulfiddá. Az elektronhisztokémiában a csapadék denzitása biztosítja az enzimaktivitás észlelhetőségét; ezért itt felvetődik a szulfidozás elhagyásának lehetősége /az elektrondenz végtermék még a reakció első lépésében kicsapódik az aktiv területeken/. Sajnos, a szulfidozás elhagyása esetén az osmium-utórögzítés teljes dekolorizációt okoz: az ólomfoszfát nem mutat semmiféle ellenállást az osmium károsító hatásával szemben, s már néhány perces rögzítés után teljesen kioldódik. Ezzel szemben az ólomszulfid elég jól türi az osmiumos utókezelést, különösen direkt kapcsolásos eljárás és kollidin-osmiumos utófixálás esetében. A szulfidozás legegyszerűbb módja a fénymikroszkópiában használatos hig nátriumszulfidos vagy ammóniumpoliszulfidos kezelés. Az így nyert képek fénymikroszkóposan kielégítőek. Ha viszont ezeket a metszeteket szubmikroszkópos szinten vizsgáljuk, kitűnik, hogy az erősen lugos ammoniumszulfid az alapszerkezetet teljesen destruálja /7. ábra/.

Az alapszerkezet védelmének érdekében szükségessé vált a szulfidozás módjának megváltoztatása. Olyan kén-



7. ábra. Patkány-vese. Gömöri-reakció, közvetlen kapcsolásos eljárás ólom-ionokkal. Ammónium-poliszulfidos átalakítás. Az enzimreakció lokalizációja helyes: a reakció-végtermék a mikrobolyhok között foglal helyet. A poliszulfid azonban teljesen tönkretette az alapszerkezetet. MV: mikrovillusok; Cy: cytoplasma. x 16,000.

hidrogénés vagy szulfidos oldatot kellett előállítani, amelynek pH-ja közel van a neutrális ponthoz, de emellett elegendő kén-iont tartalmaz ahhoz, hogy az átalakítás tökéletes legyen. A cél elérésére többféle módszerrel kísérleteztünk.

1. Kipp-készülékben vasszulfidból és sósavból előállított kénhidrogént használtunk, amelyet vagy az inkubált, kimosott és tárgylemezre huzott metszet-

re közvetlenül ráfuvattunk, illetve a keletkezett kénhidrogént fiziológiás sósvizben felfogtuk, és az átalakítást ebben a gázzal telített oldatban végeztük. A nascens kénhidrogén-gáz és a kénhidrogénes víz pH-ja közel van a neutrális ponthoz, és így nem jelent veszélyt az alapstrukturára. A Kipp-készülék állandó üzemben tartása azonban meglehetősen körülményes; emiatt le kellett mondanunk arról, hogy a mindennapos munkánkban ezt alkalmazzuk.

2. Sokkal könnyebben kivitelezhető eljárást dolgozott ki LÁZÁR /1965/ a kénhidrogén fejlesztésére. A módszer lényege: 15 súlyrész ként, 7 súlyrész kovárdet és 25 súlyrész meleg paraffint összekeverünk; teljes kihülés előtt kb 1 cm^3 nagyságu golyócskákat formálunk belőle, amelyeket azután a szükségletnek megfelelően bármikor felhasználhatunk. Használatkor egy-egy golyót kémcsőben melegítünk, mikoris kénhidrogén-gáz fejlődik. Az így nyert gázt fiziológiás konyhasó-oldatban elnyeletjük, és a szulfidozást ebben az oldatban végezzük. Az oldat pH-ja közel van a neutrális ponthoz, s így minden kockázat nélkül alkalmazható elektronhisztokémiai célokra is.

3. Intézetünkben ujabban kidolgoztuk az ammónium-poliszulfid neutralizálását. A tömény oldatot 0,5 N ecetsavval közömbösítjük; a közömbösítés akkor teljes,

amikor a szulfid sötét sárga színe átcsap fehérbe. Természetesen ez nagy mennyiségű kén kicsapódásával jár együtt, de a maradék még mindig elegendő a foszfát-gyök kvantitatív lecseréléséhez. Az oldatot közömbösítés után szűrjük vagy centrifugáljuk.

Ezen utóbbi eljárás alkalmazása látszott a legelőnyösebbnek, mert kivitele rendkívül egyszerű és a vele kapott képek megfelelő minőségűek.

4. A nem specifikus alkalikus foszfatáz fény-
mikroszkópos kimutatása különböző emlős
állatok szöveteiben

Vizsgálati anyag:

Fehér patkány: vese, máj, vékonybél, pankreas,
nagyagykéreg, kisagy, szívizom,
ductus deferens, parotis.

Macska: vese, máj, vékonybél, pankreas,
nagyagykéreg, szívizom, kisagy,
uterus.

Kutya: vese, máj, vékonybél, pankreas,
nagyagykéreg, szívizom.

Az anyag kivétele az állatok elvéreztetése után történt.

Rögzítés 4 %-os neutrális formalinban 2 óráig.

Inkubálás a különböző szöveteknél más és más időtartammal, szobahőmérsékleten, a következő összetételű oldatban történt:

5 ml 1 %-os Na-b-glicerofoszfát,

2 ml 1 %-os ólomnitrát,

2 ml 2 %-os Na-veronál.

Kimosás többször váltott desztillált vízben.

Szulfidozás neutrálizált ammóniumpoliszulfid-oldatban.

Kimosás, majd lefedés kristályragasztóval.

Fénymikroszkóposan ezzel a módszerrel vizsgáltam a különböző állati szövetekben a nem specifikus alkalikus foszfatáz lokalizációját /8-4o. ábra/.

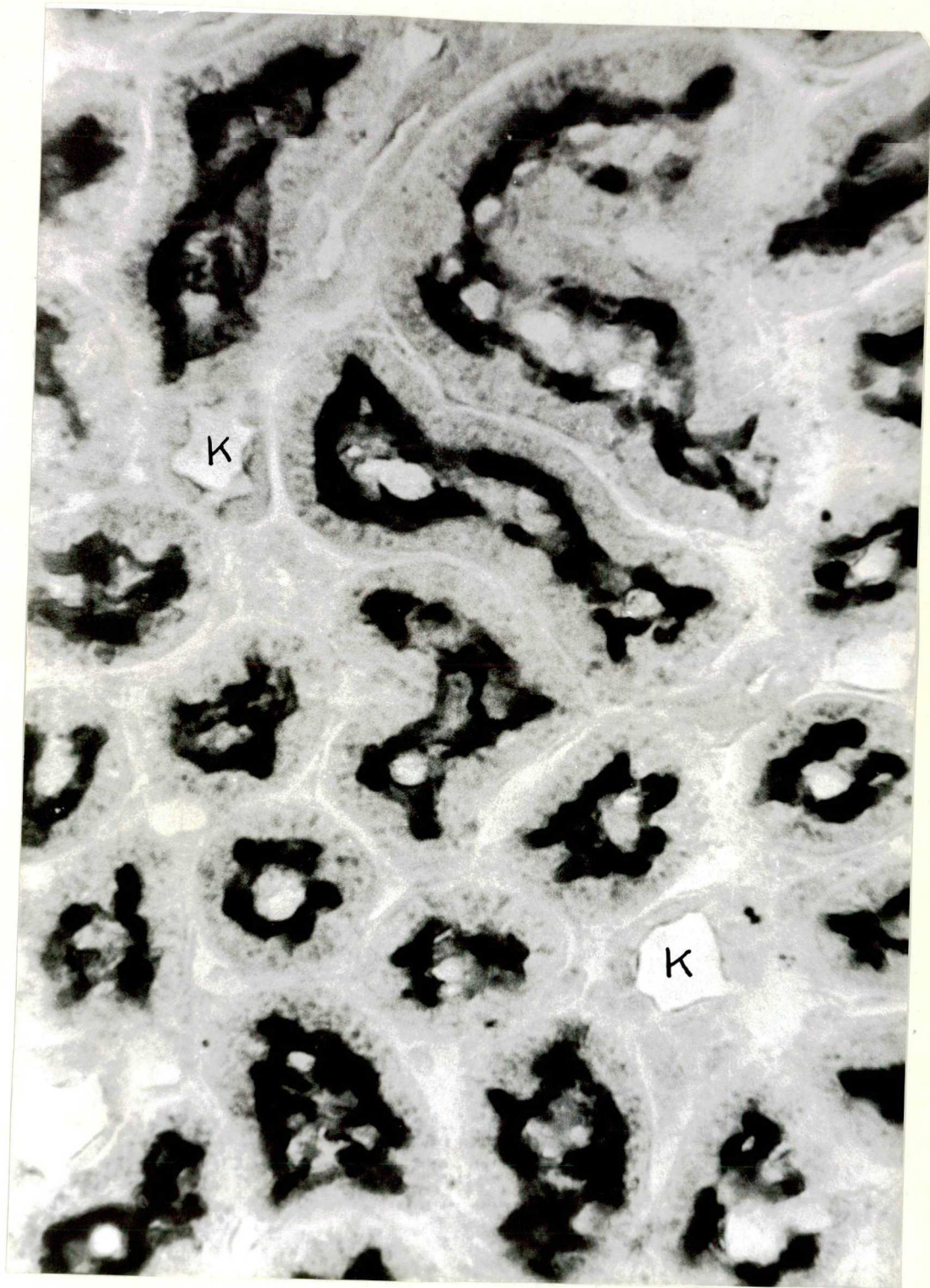
A kimutatási eljárás összeállításánál figyelembe vettük az elvégzett kísérletek eredményeit, és azok alapján igyekeztünk az optimális reakciómenetet kidolgozni.

5. A fénymikroszkópos kimutatás eredményei

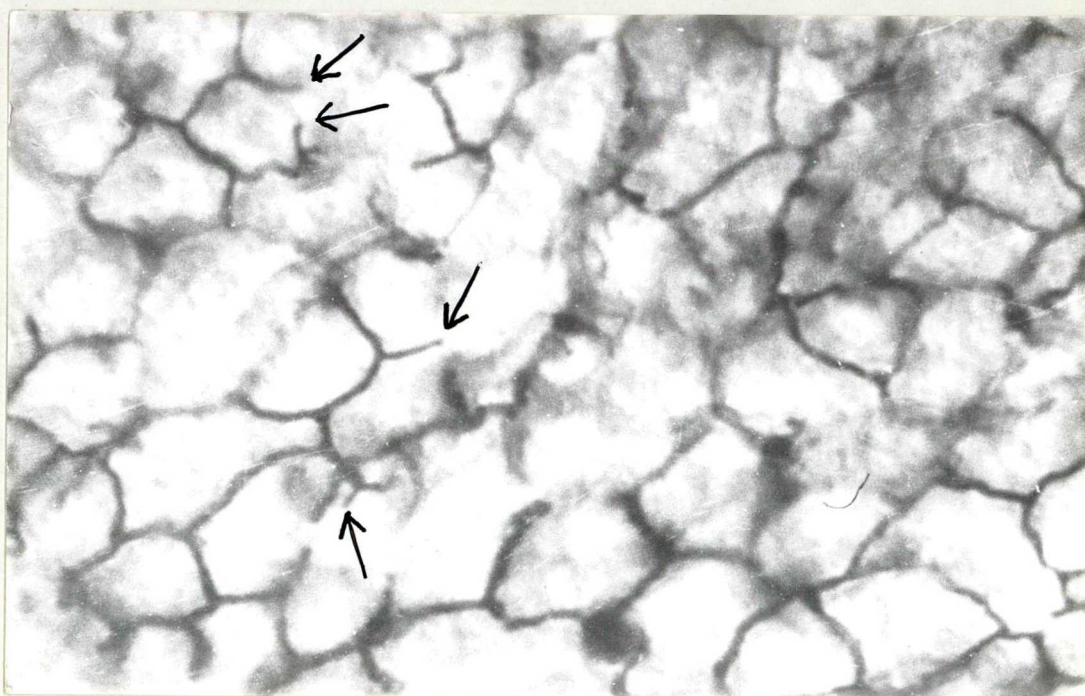
A fenti módszerrel kapott eredményeket összehasonlítottuk az irodalomban már jól bevált fénymikroszkópos kimutatási eljárások segítségével kapott képekkel, és ezáltal győződünk meg a módszer használhatóságáról. Az irodalmi adatok és saját vizs-

gálatti eredményeink alapján megállapítható, hogy az e módszerrel kapott eredmények a lokalizációt illetően azonosak a más módszerrel kapottakkal. Ezek alapján a módszer nyugodtan használható szubmikroszkópos szinten. Aspecifikus reakció vagy fémkötődés nem észlelhető: így nem kell tartani a helytelen lokalizációtól és a hamis pozitív vagy negatív reakciótól.

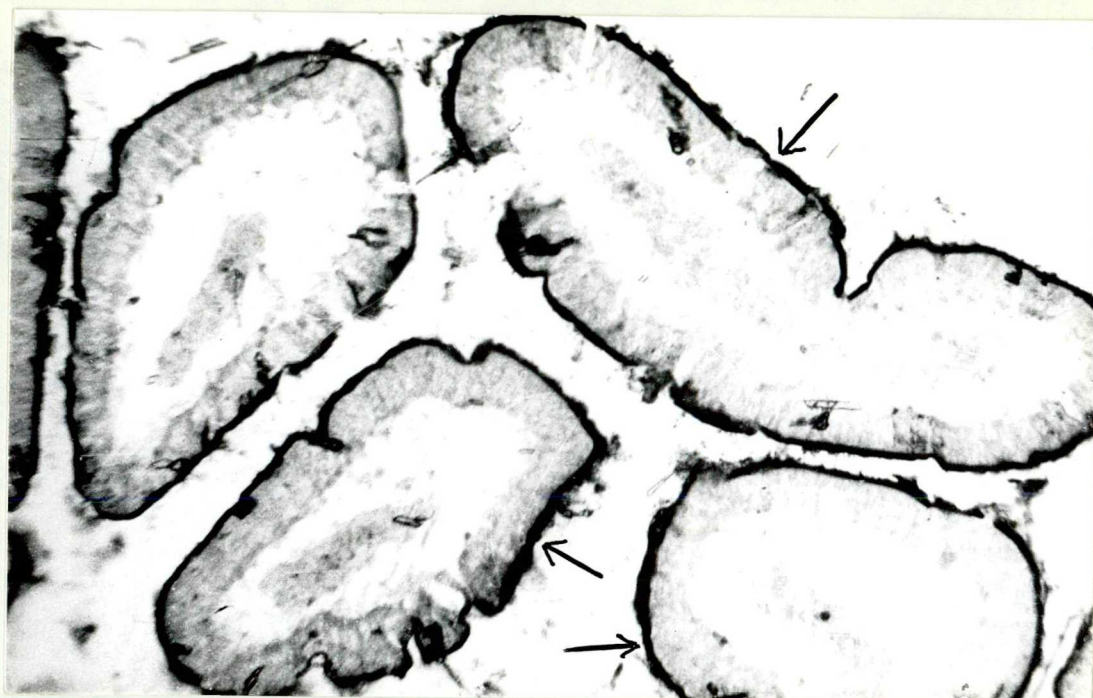
Eredményeink kiértékelése alapján állást tudunk foglalni a MOOG /1951/- és a MOE /1952/ -effektusokkal kapcsolatban. A két szerző által észlelt jelenség gyakorlatilag azonos. Vékonybél-kutikula alkalikus foszfátázának a Gömöri-féle kobaltos módszerrel való kimutatásakor azt tapasztalták, hogy ha a metszeteket a szükségesnél hosszabb ideig inkubálták, akkor a köztudottan magas aktivitású kutikulában nem kaptak reakciót, csak a sejtmag és a sejt bazális része festődött. Ezen jelenség okát MOE és MOOG az enzim, vagy más reakciótermék diffundálásában látja. RUYTER /1952/ szerint az effektus létrejöttéért a kimutatási módszerben szereplő kobalt a felelős. A kobalt ugyanis csak abban az esetben alkalmas a kimutatásra, ha a reakció folyamán keletkező kalciumfoszfát koncentrációja egy meghatározott küszöbérték alatt marad.



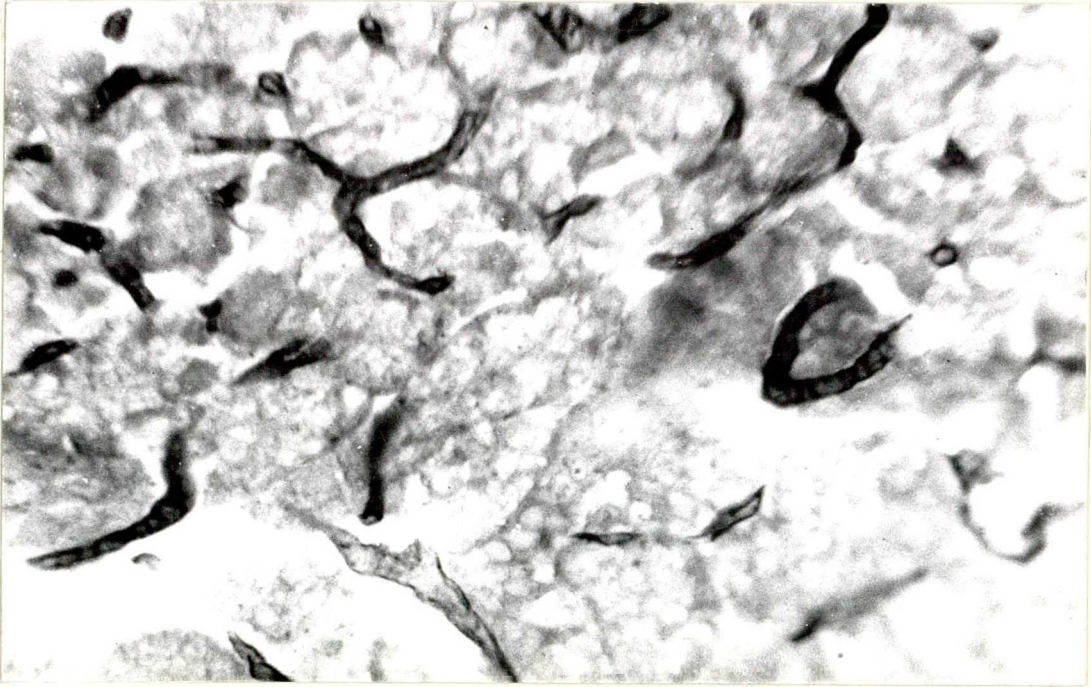
8. ábra. Patkány-vese. Inkubáció 20 perc. A kanyarulatok csatornák kefésegegye mutatja a reakciót.
K: kivezető csövek. x 600.



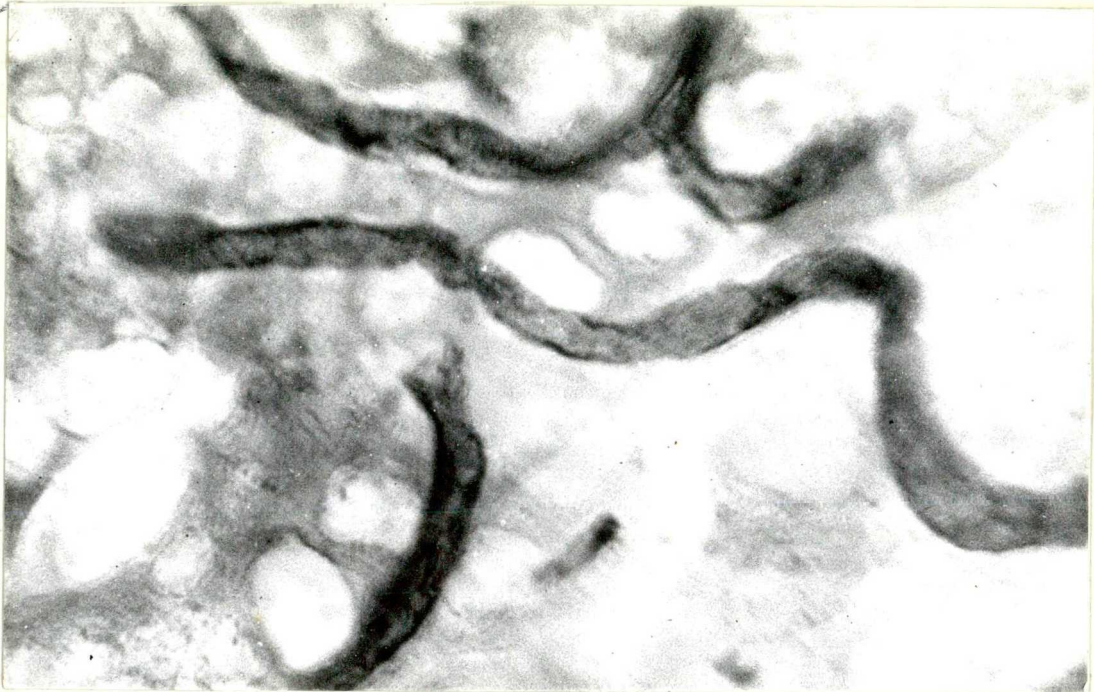
9. ábra. Patkány-máj. Inkubáció 15 perc. Enzimaktivitás az epekapillárisokban. Jellemzők az epekapillárisok vak végződése /nyilak/. x 500.



10. ábra. Patkány-vékonybél. Boholy-keresztmetszetek. Inkubáció 10 perc. Aktivitás a kutikulában /nyilak/. x 350.



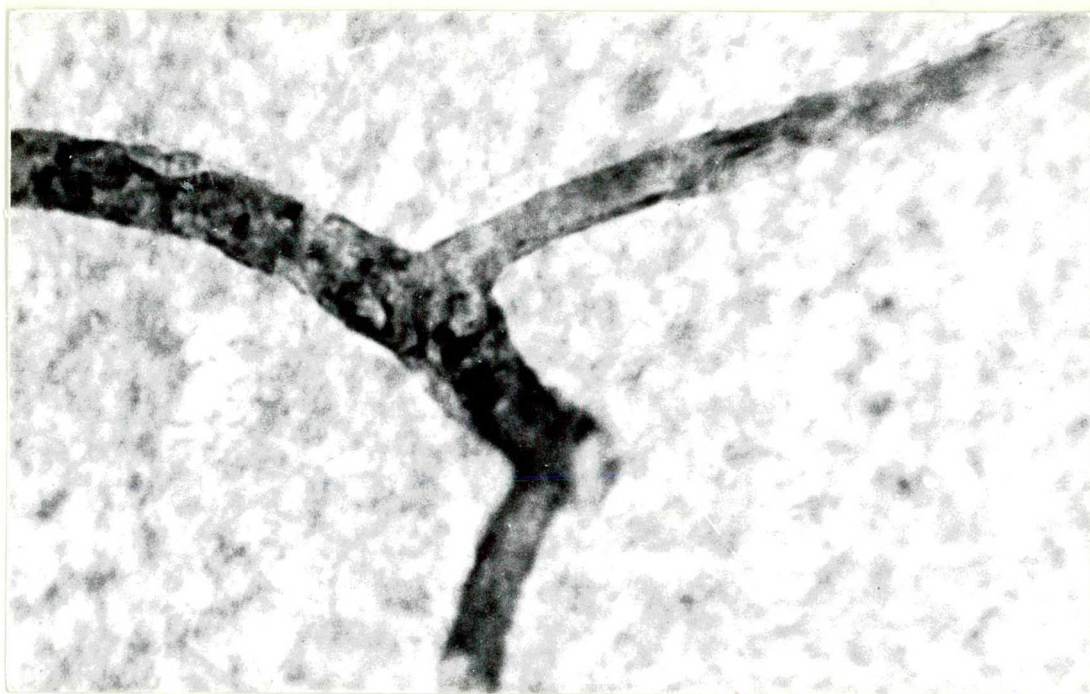
11. ábra. Patkány-pankreas. Inkubáció 30 perc. Aktivitást csak az érkapillárisok mutatnak. x 500.



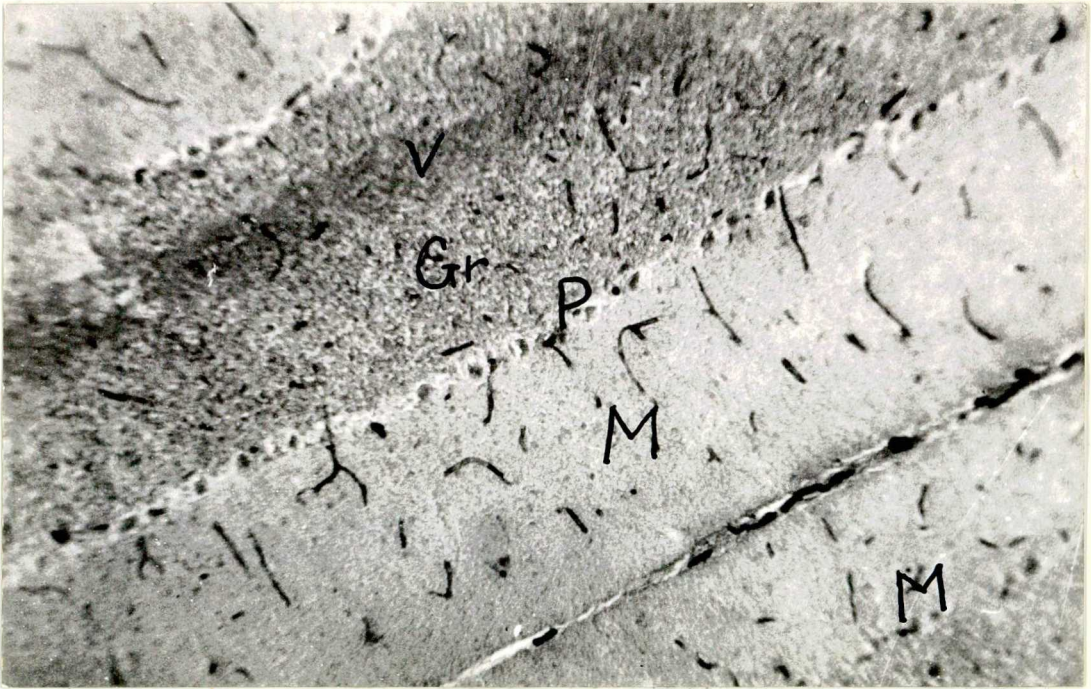
12. ábra. Patkány-pankreas. Inkubáció 30 perc. x 1100.



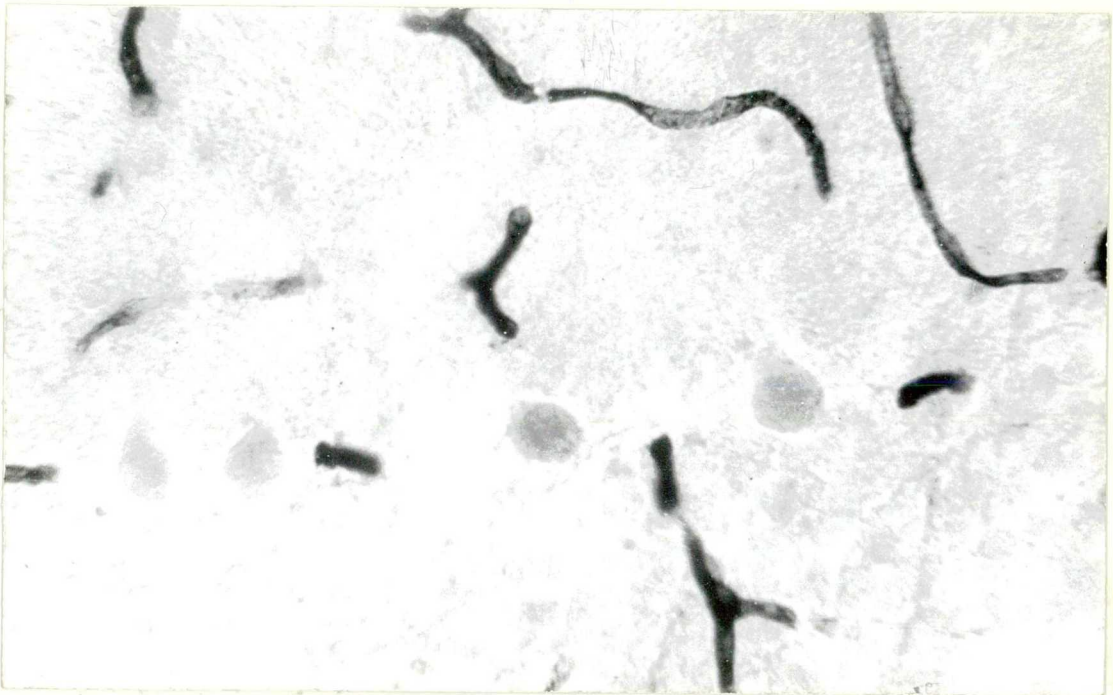
13. ábra. Patkány-nagyagykéreg. Inkubáció 30 perc.
Aktivitás a kapillárisokban. x 140.



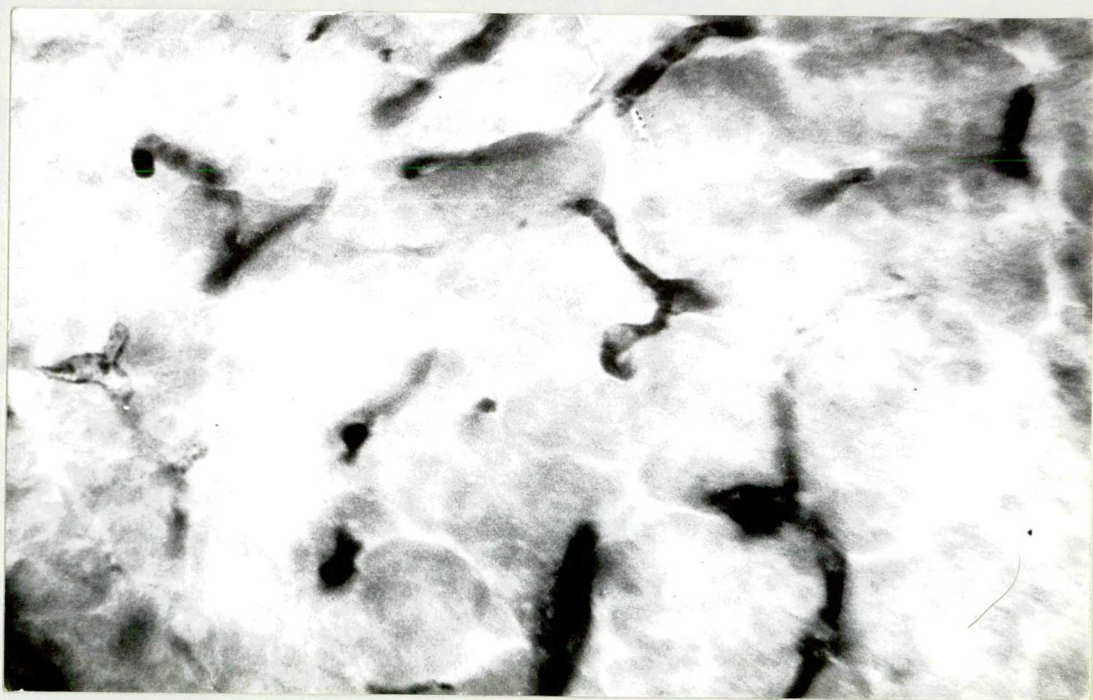
14. ábra. Patkány-nagyagykéreg. Inkubáció 30 perc.
x 1100.



15. ábra. Patkány-kisagy. Inkubáció 30 perc. Aktivitás látható a kéreg- és velőállomány kapillárisaiban, a pia mater ereiben, a Purkinje-sejtekben, a granuláris réteg egyes sejtjeiben és a velőállományban. M: stratum moleculare; P: Purkinje-réteg; Gr: stratum granulosum; V: velőállomány. x 140.



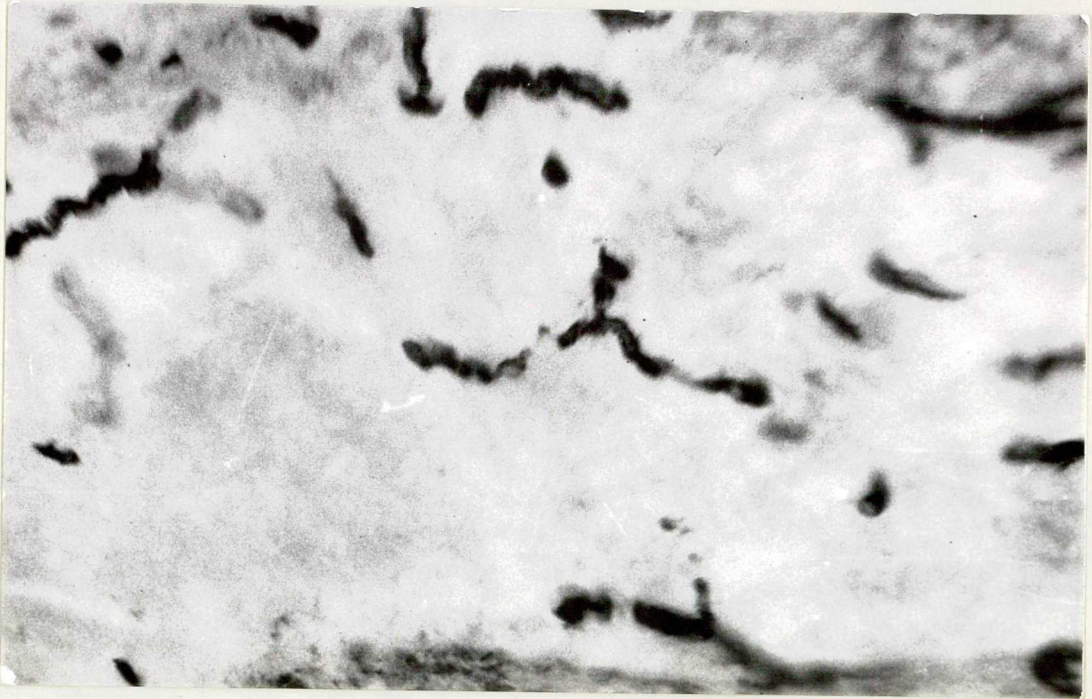
16. ábra. Patkány-kisagy. Inkubáció 30 perc. Kapilláris-reakció. x 600.



17. ábra. Patkány-parotis. Inkubáció 30 perc. Aktivitást csak az ér-kapillárisok mutatnak. x 500.



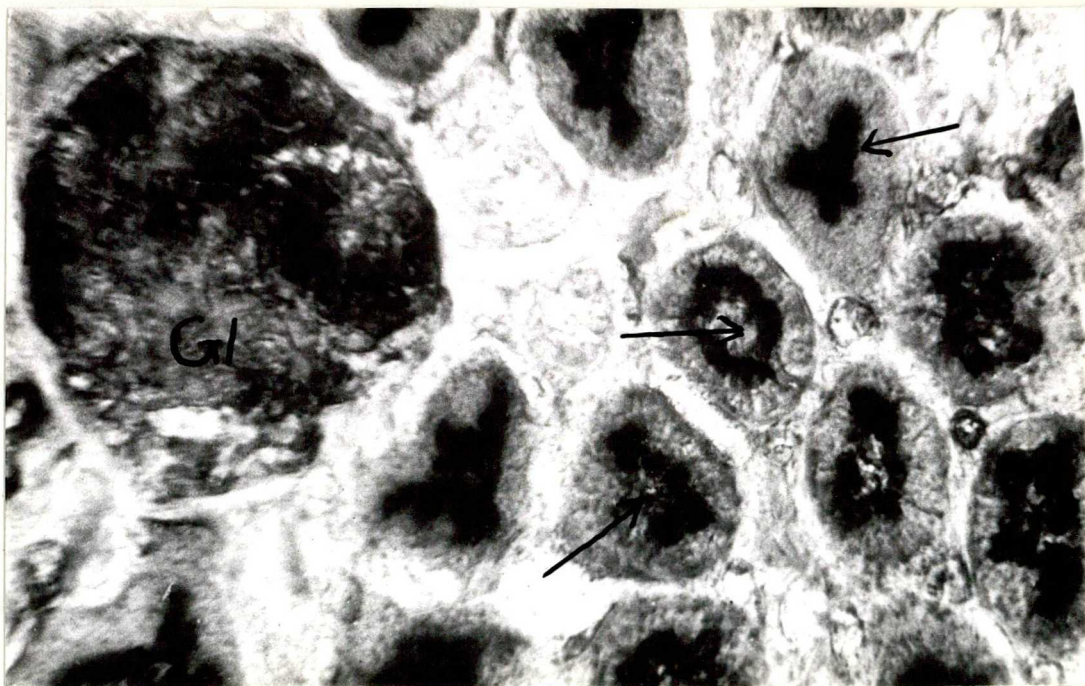
18. ábra. Patkány-szívizom. Inkubáció 40 perc. Aktiv kapillárisok. x 1100.



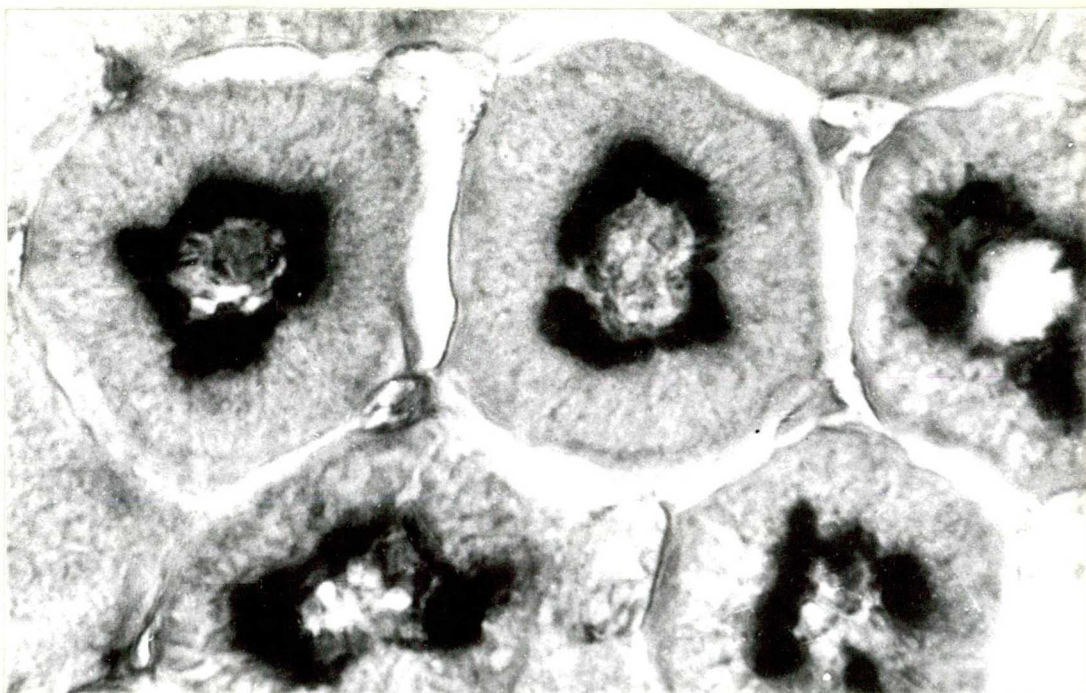
19. ábra. Patkány-ductus deferens. Inkubáció 30 perc.
Aktív kapillárisok. x 500.



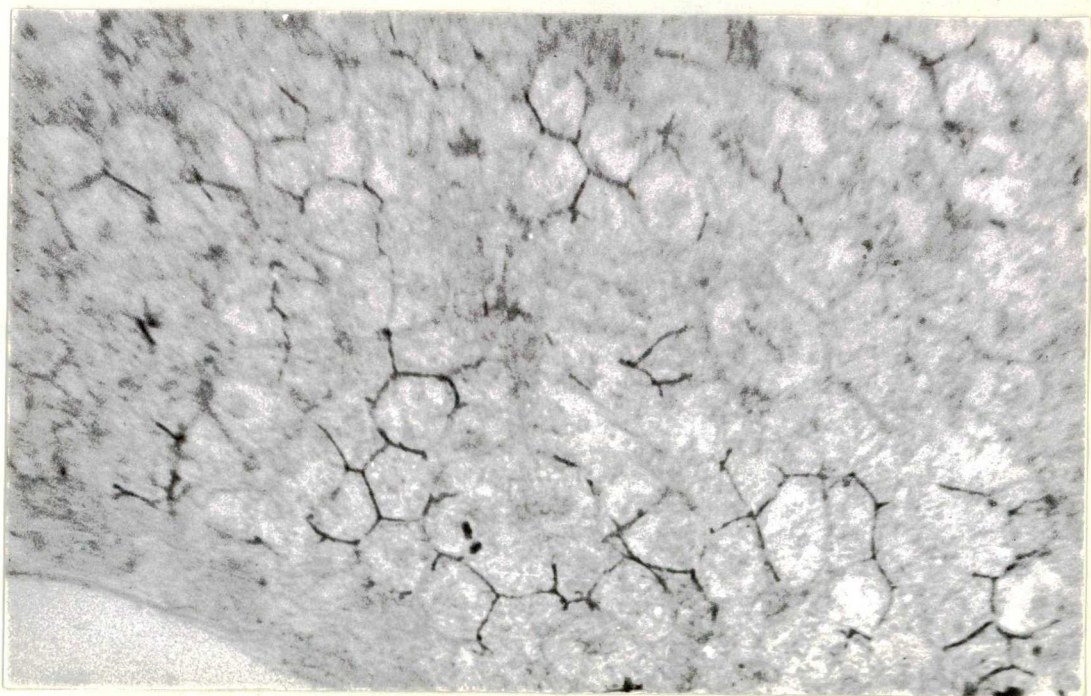
20. ábra. Patkány-ductus deferens. Inkubáció 30 perc.
A nyilak endothel sejtmagokra mutatnak. x 1100.



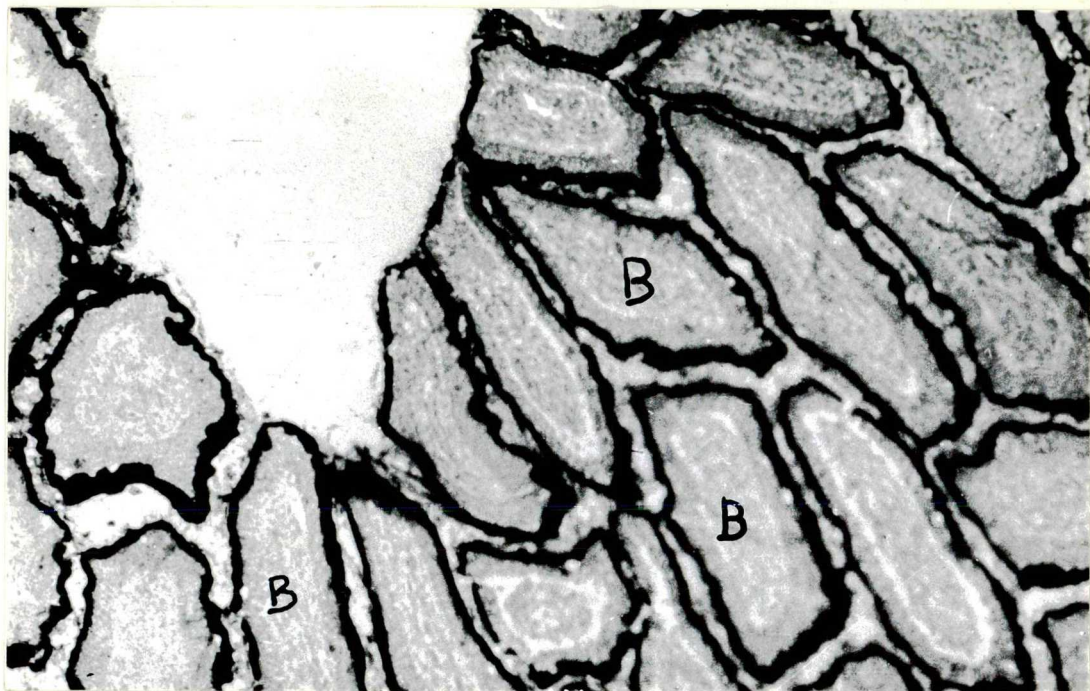
21. ábra. Macska-vese. Inkubáció 20 perc. A kanyarulat csatornák /nyílak/ kefeszegélye mellett aktivitást mutatnak a glomerulusok /Gl/ is. x 520.



22. ábra. Macska-vese. Inkubáció 20 perc. A kanyarulat csatornák kefeszegélye intenzív enzimaktivitást mutat. x 1000.

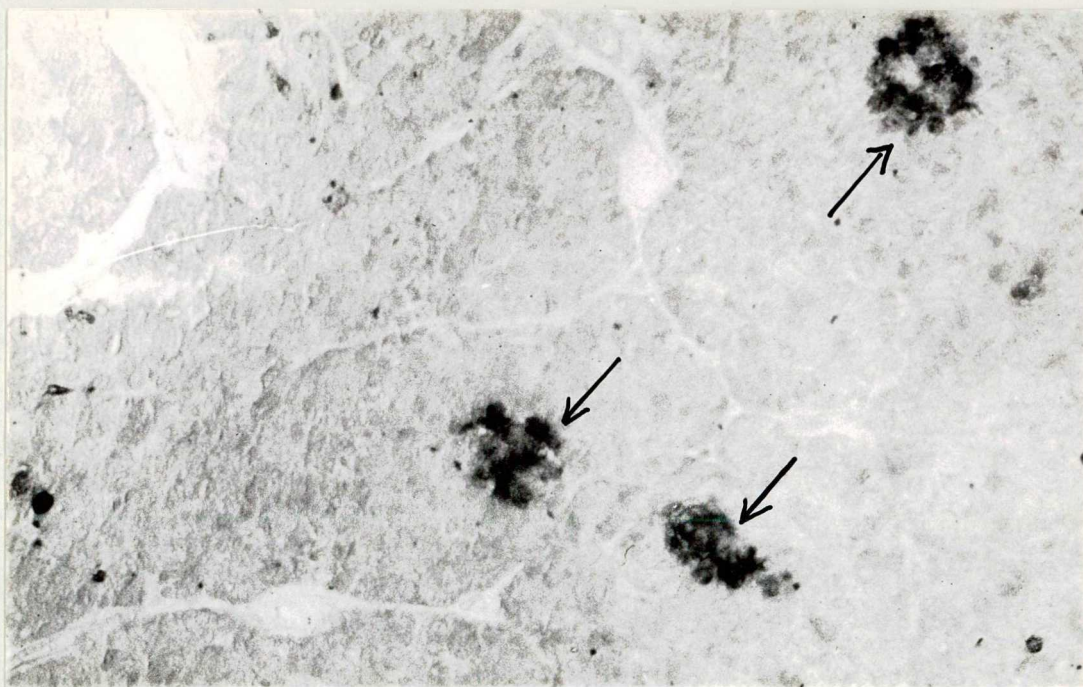


23. ábra. Macska-máj. Inkubáció 15 perc. Az epekapillárisok mutatnak aktivitást. x 520.

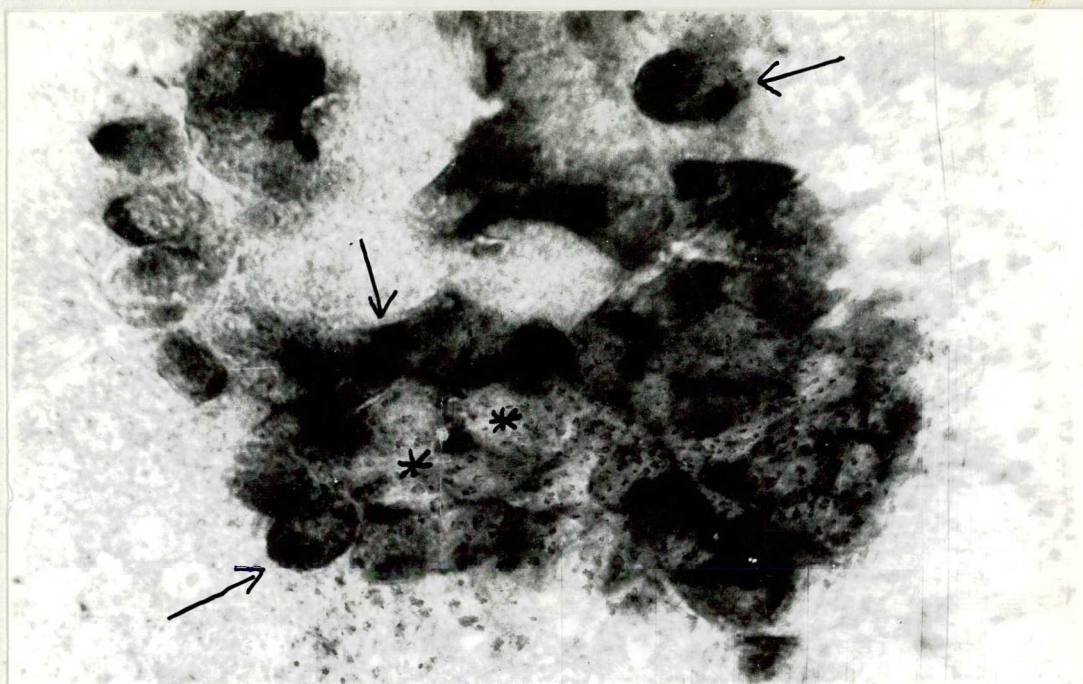


24. ábra. Macska-vékonybél. Inkubáció 10 perc. A kutikula aktív; a bélbolyhok /B/ stromája nem mutat reakciót. x 200.





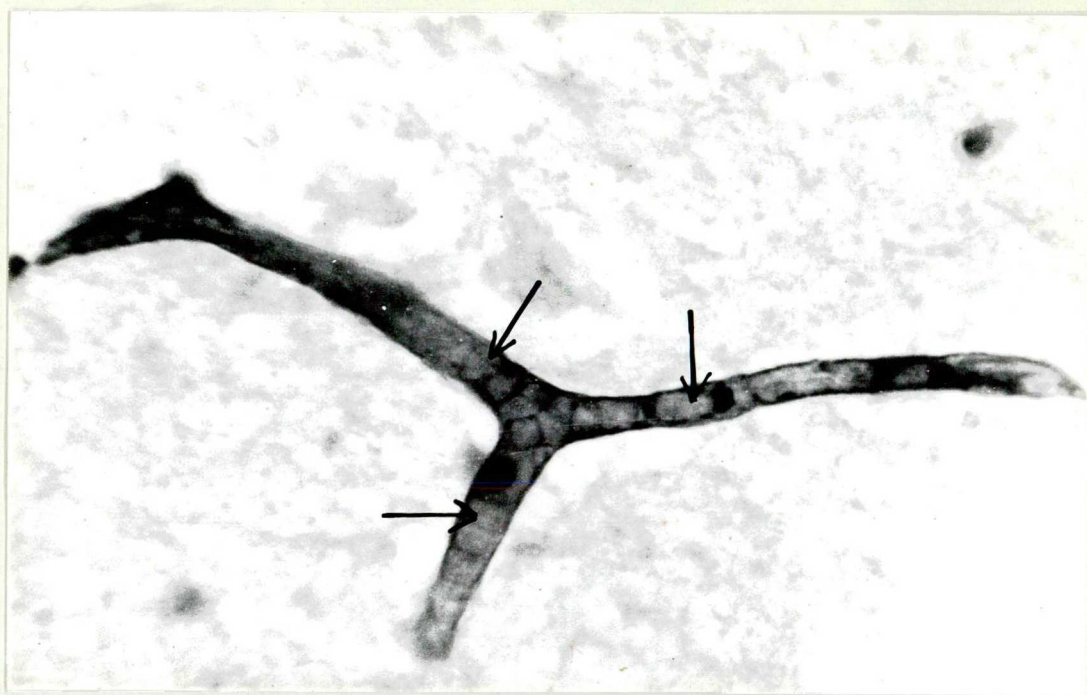
25. ábra. Macska-pankreas. Inkubáció 30 perc. Jól látható, hogy csak a Langerhans-szigetek aktívak /nyilak/. x 160.



26. ábra. Macska-pankreas. Inkubáció 30 perc. Nagyobb nagyítás mellett megfigyelhető, hogy a Langerhans-sziget egyes sejtjei intenzív aktivitást mutatnak /nyilak/, míg más sejtek /csillaggal jelölve/ jóformán inaktívak. x 1000.



27. ábra. Macska-nagyagykéreg. Inkubáció 30 perc.
Csak a kapillárisok mutatnak aktivitást.
x 140.



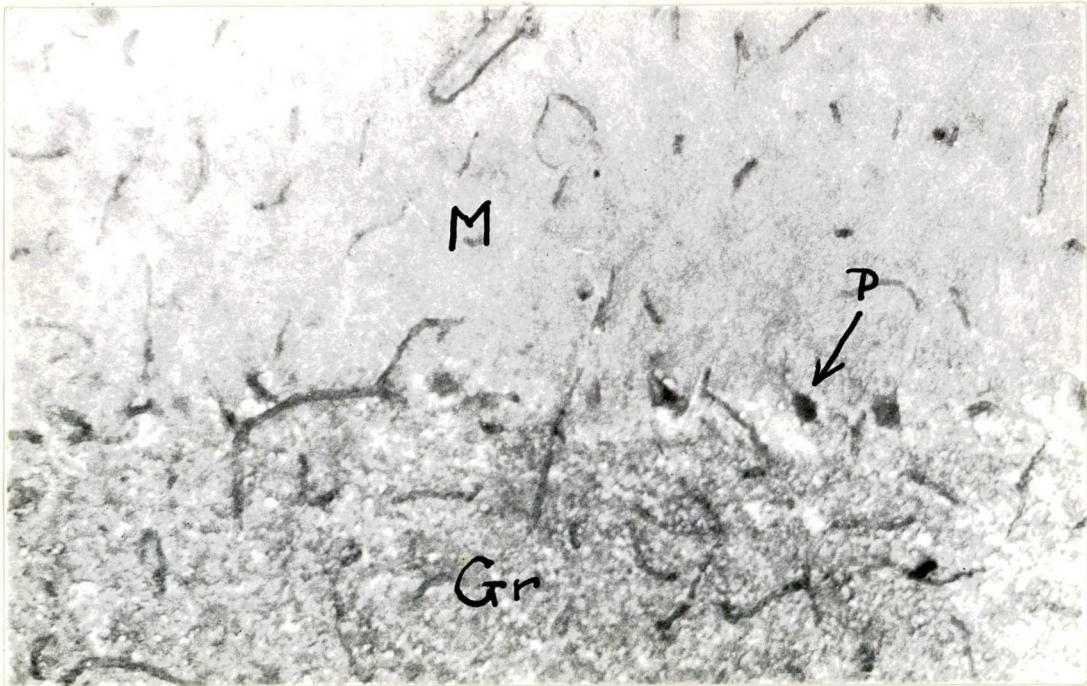
28. ábra. Macska-nagyagykéreg. Inkubáció 30 perc.
A nyilak endothel-sejtmagokra mutatnak.
x 1100.



29. ábra. Macska-szívizom. Inkubáció 45 perc. Enzim-
aktivitást a kapillárisok mutatnak. x 800.



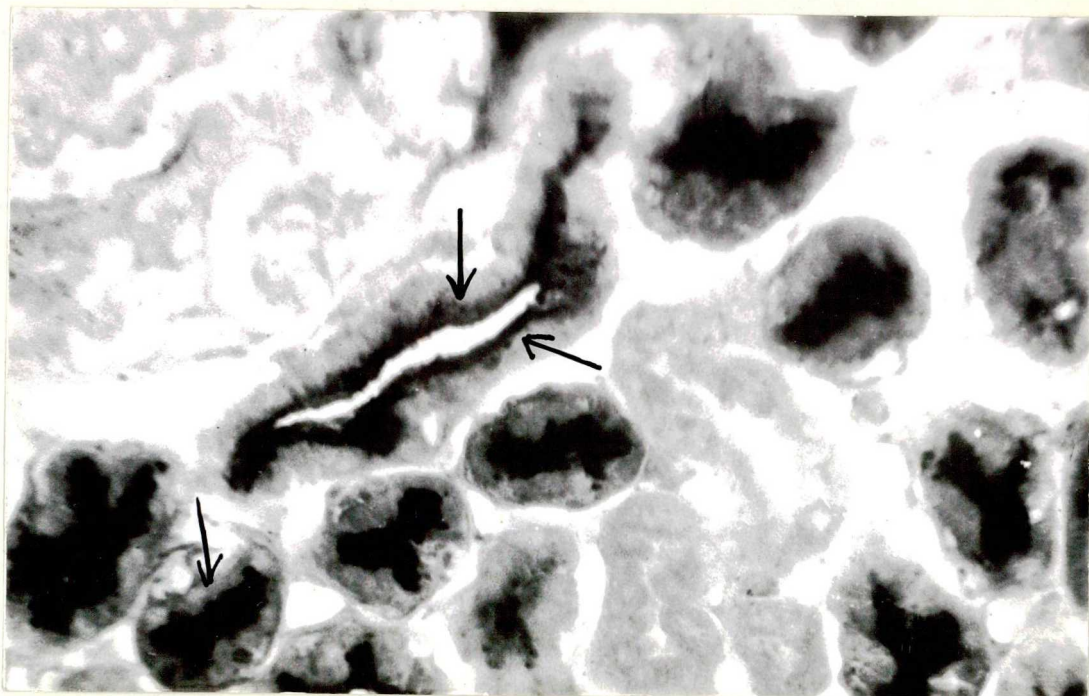
30. ábra. Macska-szívizom. Inkubáció 40 perc. x 2000.



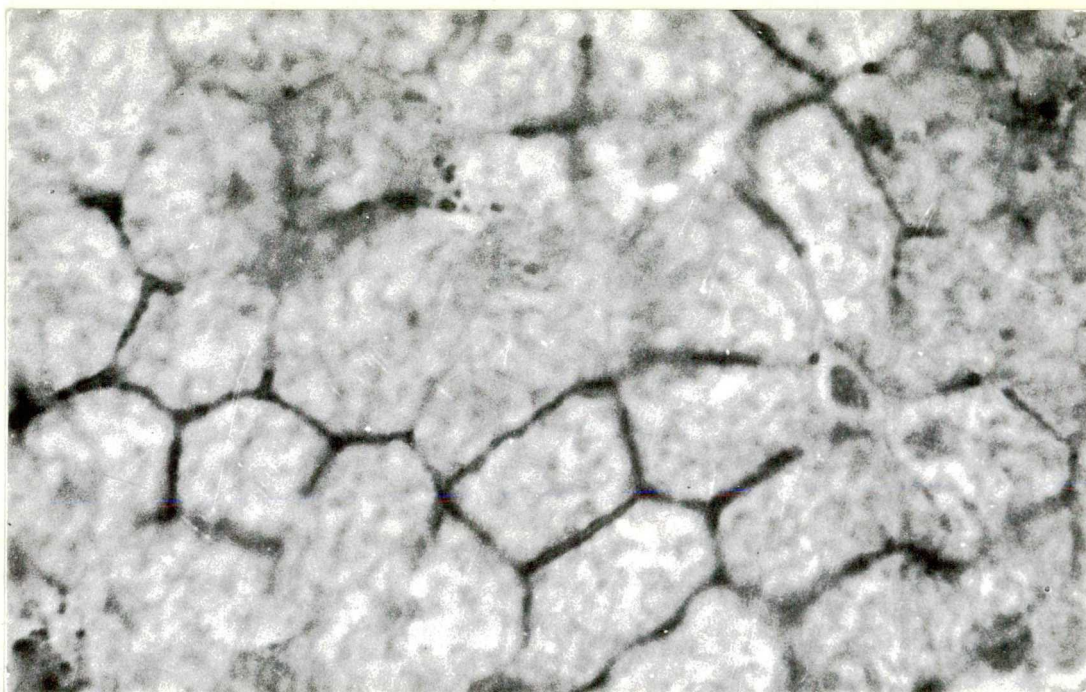
31. ábra. Macska-kisagy. Inkubáció 30 perc. Enzimreakció látható mind a molekuláris, mind pedig a granuláris rétegben elhelyezkedő kapillárisokban, valamint kismértékben a Purkinje-sejtekben és a granuláris réteg egyes sejtjeiben. M: stratum moleculare; P: Purkinje-sejt; Gr: stratum granulosum. x 160.



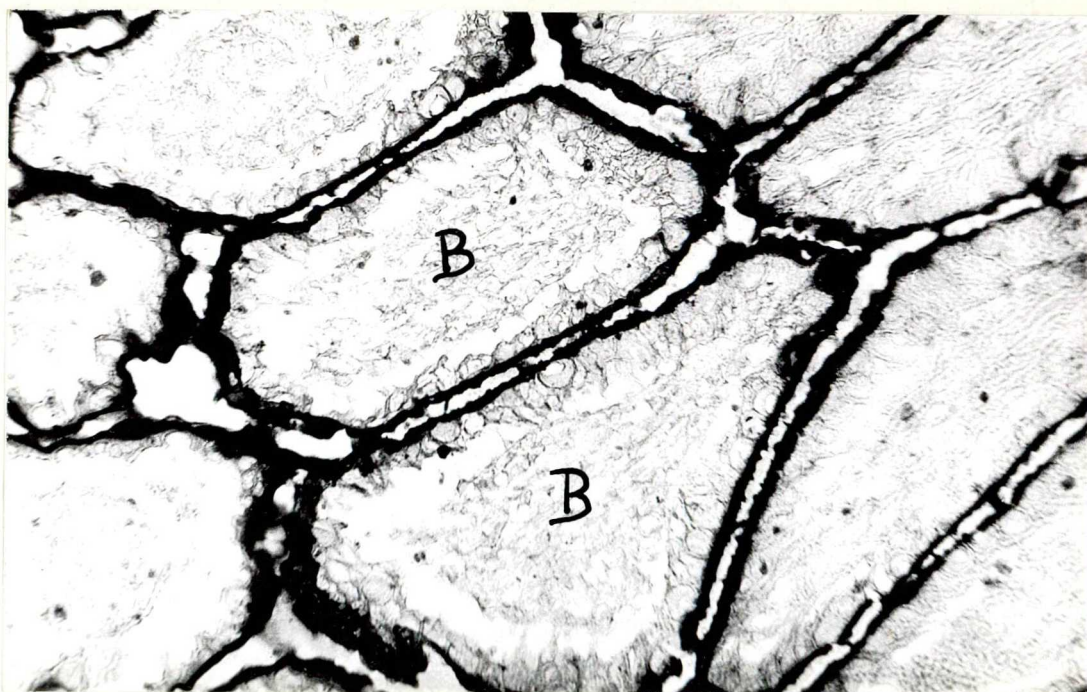
32. ábra. Macska-uterus. Inkubáció 60 perc. Aktivitás a kapillárisok falában található. x 1100.



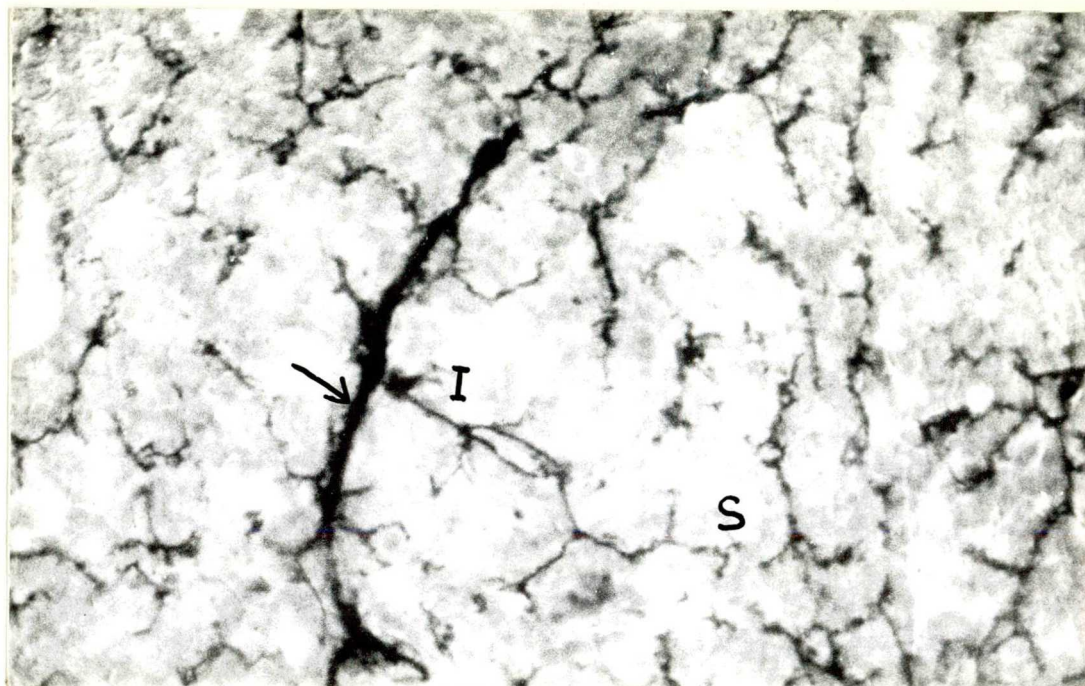
33. ábra. Kutya-vese. Inkubáció 20 perc. A kefeszegély /nyilak/ mutat aktivitást. x 500.



34. ábra. Kutya-máj. Inkubáció 15 perc. Az epekapillárisok rendelkeznek enzimaktivitással. x 1000.



35. ábra. Kutya-vékonybél, Inkubáció 10 perc.
A kutikula aktiv. B: bélbolyhok. x 200.



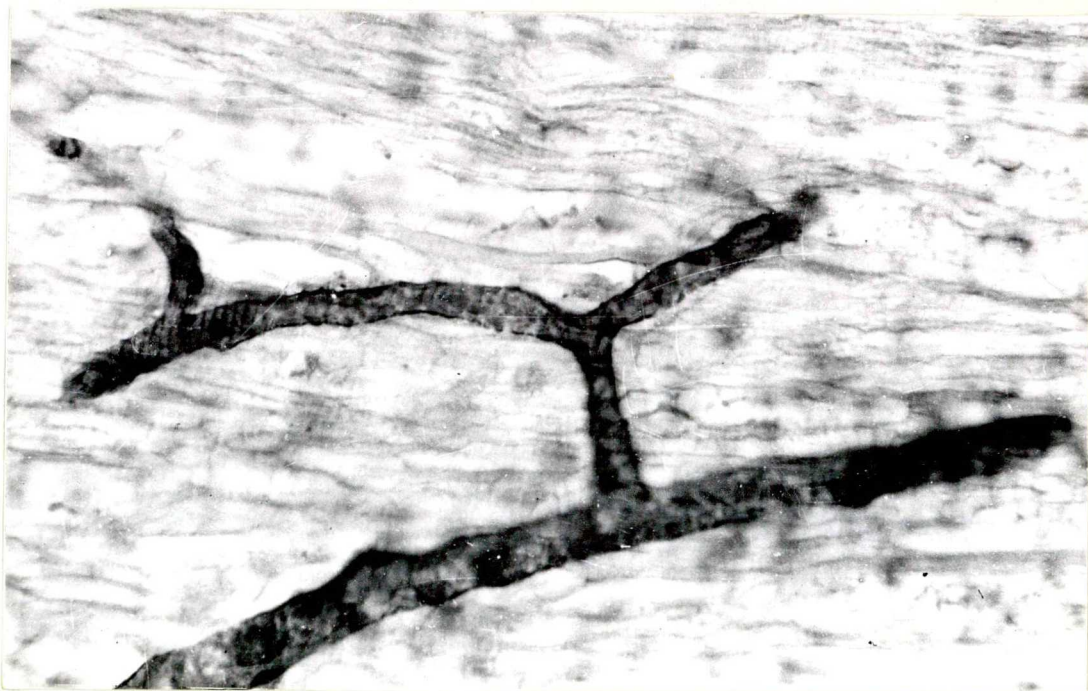
36. ábra. Kutya-pankreas. Inkubáció 20 perc. A szekréciós kapillárisok /S/, a ductus intercalarisok /I/, valamint a nagyobb kivezető csövek /nyíl/ mutatnak aktivitást. x 200.



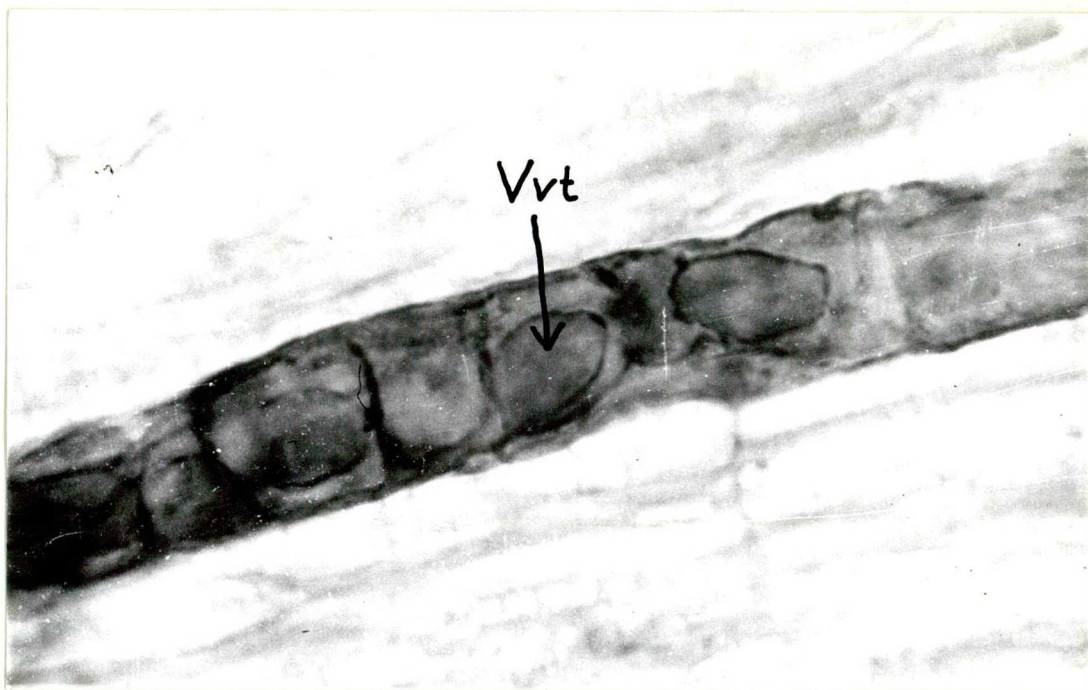
37. ábra. Kutya-nagyagykéreg. Inkubáció 30 perc.
A kapillárisok mutatnak reakciót. x 140.



38. ábra. Kutya-nagyagykéreg. Inkubáció 30 perc.
x 1100.



39. ábra. Kutya-szívizom. Inkubáció 40 perc. Aktivitás a kapillárisokban. x 700.



40. ábra. Kutya-szívizom. Inkubáció 40 perc. Vvt: vörösvértest a kapilláris lumenében. x 2000.

Mivel pedig a kutikula jelentős foszfatáz-aktivitással rendelkezik, a kalciumfoszfát koncentrációja gyorsan a kritikus érték fölé emelkedik, s így a kalcium nem cserélődik le kobaltra. Mindez nem észlelhető ezüst alkalmazása esetében. KASTRIKIN /1965/ szerint a MOOG-effektus lényege az, hogy a kritikus inkubációs idő eltelte után a legmagasabb aktivitásu helyeken, a szokványos reakciómenet esetén /kobalt- és szulfid-kezelés után/ nem kapunk reakciót, jóllehet interferencia-mikroszkóp segítségével a csapadékképződés megfigyelhető. A hatás okait vizsgálva megállapította, hogy a reakció folyamán kétféle csapadék képződésére van lehetőség. Keletkezhet egyrészt hidroxipatit $\text{Ca}_9/\text{PO}_4/6 \cdot \text{Ca}/\text{OH}/2/$, másrészt egy, KASTRIKIN által "rendellenes"-nek nevezett csapadék: $\text{Ca}_9/\text{PO}_4/6 \cdot 2\text{CaHPO}_4$. A kalciumnak kobalttal történő lecserélése csak abban a csapadékban lehetséges, amelyben van olyan kalcium, amely nincs közvetlen kapcsolatban a foszfáttal. Tehát a lecserélés csak a hidroxipatit csapadékban lehetséges, míg a "rendellenes" csapadékban, ahol minden kalcium-ion közvetlen kapcsolatban van a foszfáttal, ez a kicserélődés nem tud lejátszódni. A reakció folyamán először hidroxipatit keletkezik, és így 1-5 percnyi inkubálás után még kapunk festődést

a kutikulában; az inkubálást tovább folytatva viszont már a "rendellenes" csapadék keletkezik, amely ráarakódik az elsődlegesen keletkezett hidroxipatitra, és így megakadályozza a kalcium lecserélődését. A "rendellenes", tehát nem apatit jellegű csapadék képződését KASTRIKIN valamilyen fermentatív hatásnak tulajdonítja.

Noha KASTRIKIN nem tesz említést arra vonatkozóan, hogy a kétféle csapadék hogyan viselkedik más nehézfémekkel szemben, valójában az ő eredményeiből is az a következtetés vonható le, hogy a MOOG-effektus létrejöttéért a kobaltos technika felelős.

Saját vizsgálataink során, amennyiben a kobaltos metodikát alkalmaztuk, néhány perces inkubálás után mi is észleltük a MOOG-effektust. Ezzel szemben ólom használatakor sem a közvetlen, sem pedig az utókapcsolásos módszereknél nem tapasztaltuk a jelenség létrejöttét. A szükségesnél hosszabb ideig való inkubálás után is csak a tulinkubálás szokványos jelei voltak láthatók. /Az aktiv helyeken a reakció felerősödik, a lokalizáció eldurvul, az esetleges diffúzió következtében festődhetnek a szövetek nem aktiv részei is./ Tehát RUYTER vizsgálatai szerint az ezüst, saját megfigyeléseink sze-

rint pedig az ólom használata esetén kiküszöbölhető a MOOG-effektus. Ezeket figyelembe véve, igen nagy valószínűsége van azon feltevésnek, hogy a hatás létrejöttének oka a kobaltos technika. Ez nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a csapadékképződés a KASTRIKIN által feltételezett módon történik; úgy látszik azonban, hogy a Ca^{++} kicserélhetőségének korlátozott volta kizárólag a kobaltra vonatkozik.

Érdekes megfigyelésről számol be BOURNE /1944/, aki az alkalikus foszfatáz lokalizációját vizsgálta tengerimalac-vékonybélben. Azt tapasztalta, hogy a kutikulában a reakcióvégtermék bilamináris elhelyezkedést mutat. Később DEANE és DAMPSEY /1945/, HEBERT /1950/, MOE /1952/, JOHNSON és KUGLER /1953/, valamint JOHNSON /1954/ a különböző emlőszállatok vékonybélének vizsgálatakor hasonló jelenséget észleltek. A reakcióvégterméknek ilyen jellegű elhelyezkedését MOE és HEBERT diffúziós tényezőkkel magyarázza. JOHNSON /1954/ szerint a bilamináris lokalizáció a reakció utolsó lépésében /a szulfidozás alatt/ jön létre, és kialakulása az alkalmazott ammóniumpoliszulfid minőségétől függ. Háromféle poliszulfid-oldattal végzett kísérleteket, ugymint 1/ frissen készített /citromsárga színű, erősen kénhidrogén-szagu/, 2/ régebbi, több napos oldattal /sötétsárga, ammónia-szagu/, valamint 3/ mesterségesen "öregített" oldattal. Az első két poliszulfiddal dolgozva, bilamináris reakciót kapott. A mesterségesen "öregített" oldattal egységes reakciót kapott a kutikula teljes szélességében.

Vizsgálataink folyamán, amelyeket a kutya, macska és patkány vékonybelén végeztünk, soha nem észleltünk a kutikulában ilyen jellegű bilaminaris lokalizációt. Kísérleteket végeztünk a következő minőségű ammoniumpoliszulfid-oldatokkal:

- 1/ frissen készített oldat 1:10 arányban hígítva,
- 2/ több hónapos oldat 1:10 arányban hígítva,
- 3/ Kipp-készülékből nyert kénhidrogén a met-szetre közvetlenül ráfúvatva,
- 4/ Kipp-készülékből nyert kénhidrogén, elnyelve fiziológiás sóoldatban,
- 5/ Lázár-féle eljárással nyert kénhidrogén, elnyelve fiziológiás sóoldatban,
- 6/ frissen készült poliszulfid-oldat neutralizálva ecetsavval,
- 7/ több hónapos oldat neutralizálva ecetsavval.

Mindegyik oldat alkalmazásakor a kutikula teljes szélességében egyforma intenzitású reakciót kaptunk. Az inkubációs idők meghosszabbításával sem kaptunk bilaminaris reakciót, így tehát a diffúziós faktor is kizárható. Véleményünk szerint a bilaminaris lokalizáció és a MOOG-effektus szoros kapcsolatban van egymással. Mindkét jelenséget a kobaltos technika alkalmazásakor észlelték; a bilaminaris reakciót tehát úgy tekinthetjük, mint a MOOG-effektus kezdeti szakaszát. Minthogy saját vizsgálataink során az ólmos technikát alkalmaztuk, ennek megfele-

lően nem észleltük sem a MOOG-effektust, sem pedig a bilamináris lokalizációt ^x.

A különböző emlős állatok szöveteinek vizsgálatakor csak a macska-pankreas alkalikus foszfatázának kimutatásakor kaptunk az irodalomtól eltérő eredményeket. Ezzel a kérdéssel kapcsolatban viszont az irodalomban már eddig is vita folyt. GÖMÖRI /1941/, valamint GROSSMAN és WANG /1951/ szerint a macska-pankreas egyáltalán nem rendelkezik foszfatáz-aktivitással. Ezzel szemben WANG és GROSSMAN /1949/ a macska-pankreas kapillárisaiban és a ductus intercalarisokban talált reakciót. Mi a Langerhans-szigetek egyes sejtjeiben találtunk reakciót. Mivel a sziget sejtjeinek többsége reagál, feltételezhető, hogy

^x A "bilamináris reakció" ultrastrukturális szinten gyakorlatilag egyáltalán nem értelmezhető. A kutikula mikrovillusai között nem található olyan elektronmikroszkópos rétegezettség, mely az intervillusos térben elhelyezkedő alkalikus foszfatáz rétegezett reakciójáért felelőssé volna tehető. A "bilamináris reakciót" tehát minden bizonnyal a hisztokémiai artefaktumok csoportjába kell sorolnunk.

a beta-sejtek adják a reakciót. További vizsgálatok hivatottak tisztázni azt, hogy az alkalikus foszfatáz-aktivitás és a beta-sejtek működése hogyan hozható kapcsolatba egymással.

6. A nem specifikus alkalikus foszfatáz
elektronmikroszkópos kimutatása

Vizsgálati anyag:

Patkány-vese, máj, nagyagykéreg, szivizom, pankreas.

Rögzítés:

Bár fénymikroszkópos vizsgálataink során a formalinos és a glutáraldehides rögzítés után azonos eredményeket kaptunk, a kétféle rögzítő anyag használata nem vezet feltétlenül azonos eredményekre szubmikroszkópos szinten. A kérdés tisztázására vizsgálatokat végeztünk formalinban és glutáraldehidben rögzített anyagokon.

a/ 4 %-os formalin pH 7,4-re beállítva kakodilát puffer segítségével, 2 óra /41-47. ábra/.

b/ Formaldehid és glutáraldehid keveréke pH 7,4-re beállítva kakodiláttal, KARNOVSKY /1965/ szerint, 2 óra /48-56. ábra/.

Inkubáció: Azonos a fénymikroszkópos módszernél leírt módon /57. oldal/.

A reakció lefolytatása után szokványos módon szulfidozott metszeteket kollidines /2,4,6 trimetil-piridin/ osmium-oldatban utófixáltuk 30 percig /75 % 0,2 M-os kollidin, 25 % 2 %-os osmium/. Az utófixált anyagokat dehidráltuk, majd Durenpanba ágyasztuk. Metszeteket Reichert-ultramikrotommal készítettünk. Kontrasztfestés REYNOLDS /1963/ szerint történt. Az ultrametszeteket TESLA 242 D asztali elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk a József Attila Tudományegyetem Elektronmikroszkóp-Laboratóriumában /41-56. ábra/.

7. Az elektronmikroszkópos kimutatás eredményei

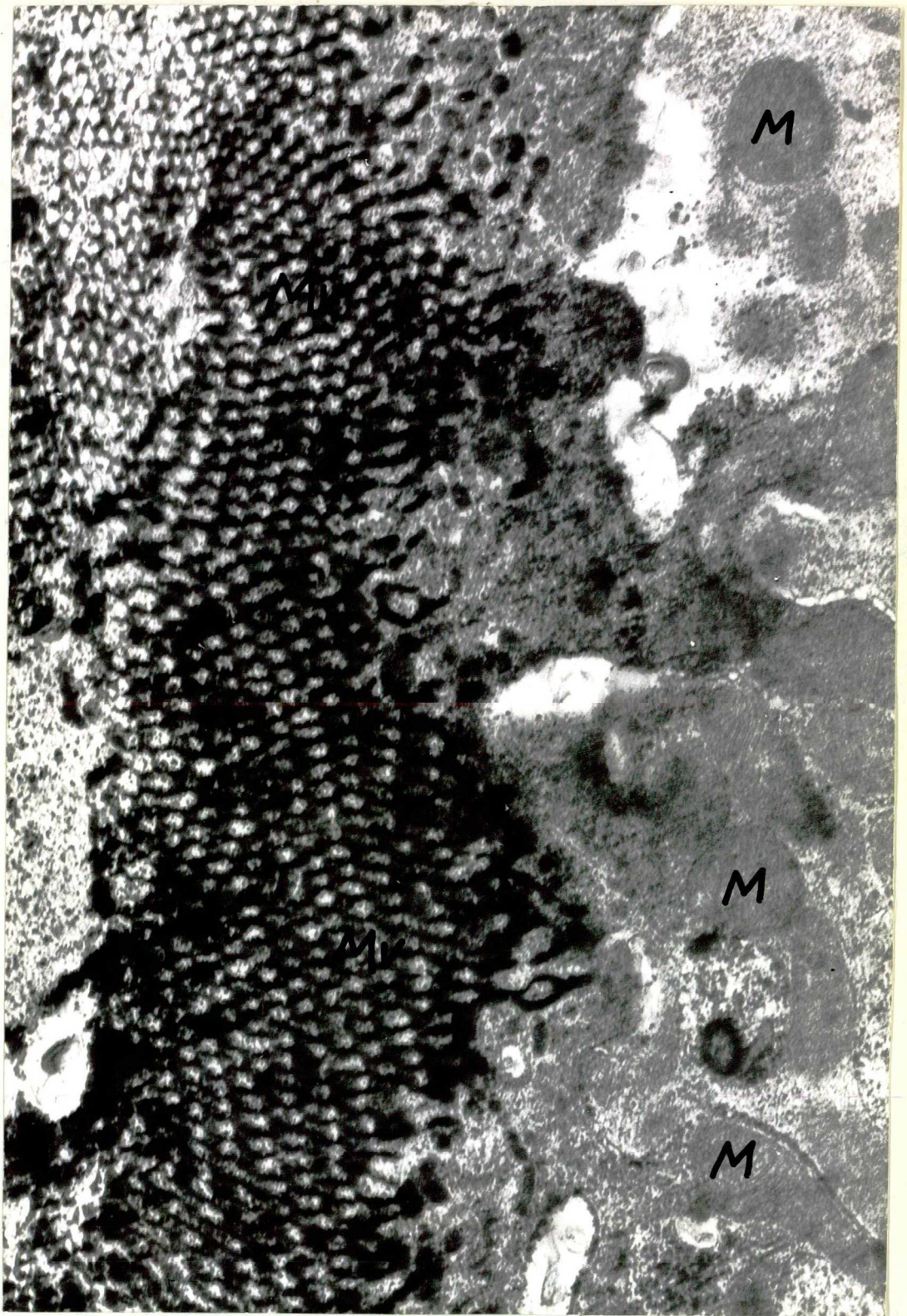
Vizsgálataink alapján kitűnt, hogy a direkt-kapcsolásos /ólmos/ módszer alkalmas az elektronmikroszkópos megfigyelésekre is. Aspecifikus membránfestődést, amely - irodalmi adatok szerint - az osmiumos előfixálás után igen gyakran található, nem észleltünk. Az enzim-lokalizációt illetően eredményeink azonosak az irodalmi adatokkal.

Elektronhisztokémiai vizsgálati eredményeinket összehasonlítva a közvetett kapcsolásos módszerek alkalmazása alapján leszűrt irodalmi adatokkal, megállapítható, hogy a közvetlen /direkt kapcsolásos/

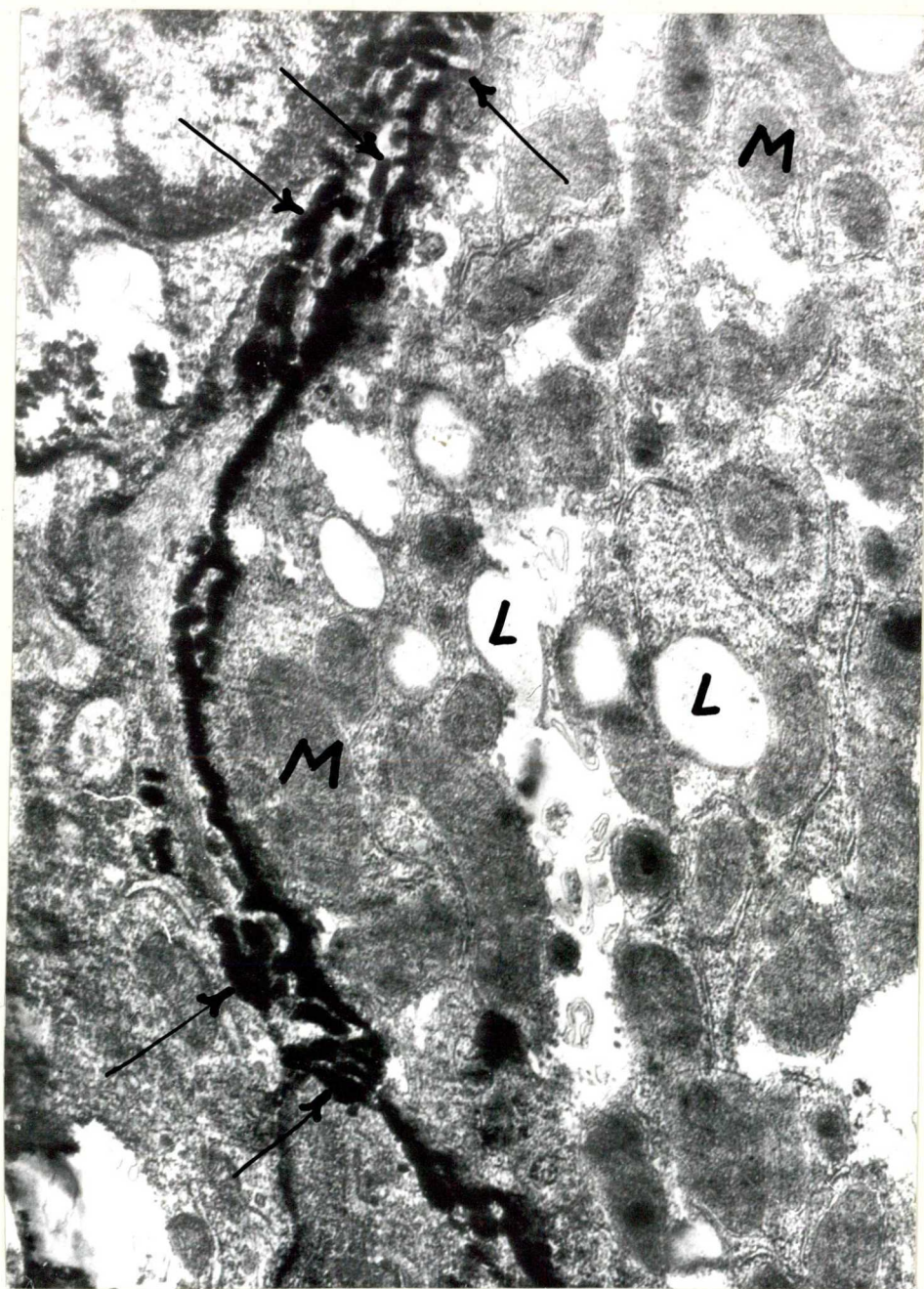
módszer alkalmazása a legtöbb esetben jobb eredményekhez vezet. Jelentősnek tartjuk azt a megfigyelésünket, hogy az aldehid-rögzítés után végzett direkt-kapcsolásos módszer esetén nem következik a sejtmembránok egyébként /különösen osmium-előfixálás után/ gyakran észlelhető, mütermék-jellegű festődése. A számunkra hozzáférhető irodalom tanúsága szerint májszövetben submikroszkóposan még nem mutattak ki alkalikus foszfatázt sem direkt, sem pedig közvetett kapcsolásos módszerrel /ez valószínűleg arra vezethető vissza, hogy fénymikroszkóposan sem vezet a kísérlet mindig eredményre/. Munkánk során sikerült a májszövet alkalikus foszfatáz-aktivitását elektronmikroszkóposan kimutatni az epekapillárisok falában /a mikrobolyhokban/. Az epekapilláris mikrobolyhai esetében a reakcióvégtermék nem a mikrovillusok között, hanem magukban a mikrovillusokban foglal helyet, szemben a vese kanyarulat csatornáinak kefeszegélye, illetve a vékonybélhámsejtek kutikulája esetében észlelhető intervillusos lokalizációval. Ennek a lokalizációs differenciának nyilván jelentős, funkcionális vonatkozásai vannak, amire nézve további vizsgálatok hivatottak választ adni.

A lokalizáció pontos meghatározhatósága szempontjából lényeges feladat a reakció kivitelénél az

alapszerkezet épségének a megtartása. Általánosan kezd az a nézet tért hódítani, hogy a glutáraldehides fixáló anyagok használata jobban garantálja az alapszerkezet épenmaradását, mint a formalinos fixálóké. Az ezzel kapcsolatos vizsgálataink ezt a nézetet nem támasztják alá. A kétféle fixálási mód után kapott eredmények között sem a lokalizációt, sem pedig az alapszerkezet megtartottságát illetően nem találtunk lényeges különbséget. Ugy véljük, hogy "szép" alapszerkezet elérése különben sem csak az alkalmazott rögzítőtől függ, hanem abban még jónéhány más tényező is közrejátszik: elsősorban a rögzítés hőfoka, időtartama, a rögzítő oldat pH-ja és iontartalma, valamint nem utolsósorban a fagyasztott metszetek készítésének technikai körülményei. Hogy az ezt követő lépések /az inkubáció hőfok- és időtartam-, a szulfidkezelés osmotikus és pH-viszonyai, stb/ milyen mértékben befolyásolják tovább az előrögzítés alkalmával többkevesebb sikerrel megőrzött alapszerkezetet, arra vonatkozólag értekezésünk egyes fejezeteiben részletesen kitértünk.



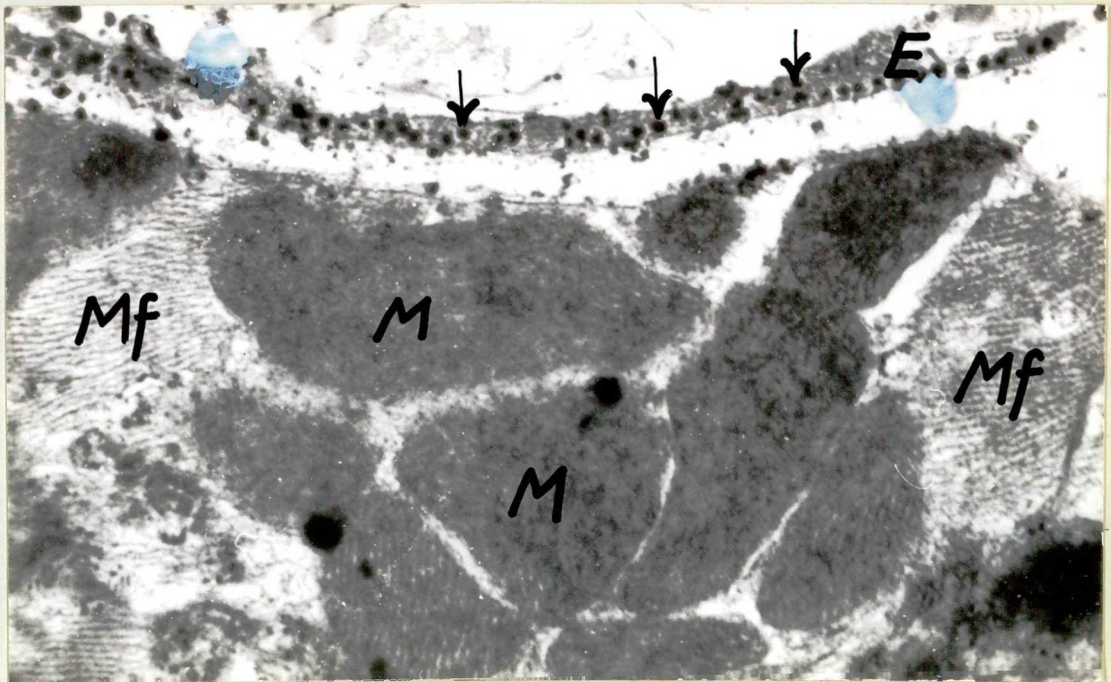
41. ábra. Patkány-vese. Formalin-fixálás. Direkt kapcsolásos eljárás. Inkubáció 20 perc. Reakció a kefeszegély mikrovillusai között. Mv: mikrovillusok. M: mitochondrium. x 35000.



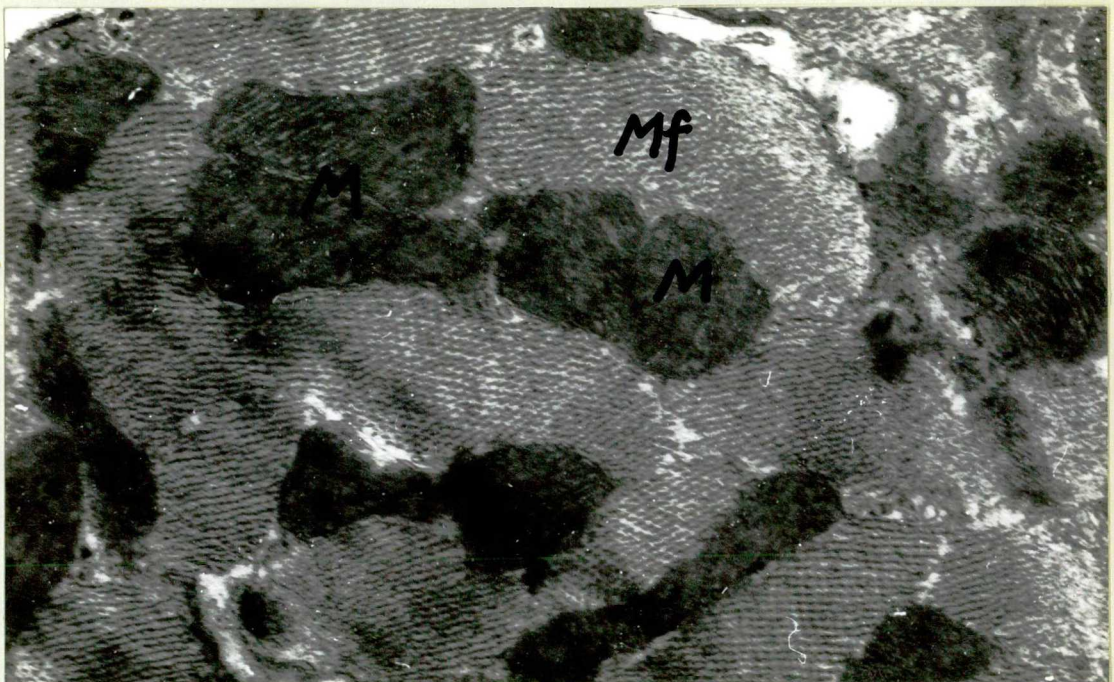
42. ábra. Patkány-máj. Formalin-rögzítés. Direkt kapcsolásos módszer. Inkubáció 30 perc. Nyilak az epekapilláris mikrobolyhaiban elhelyezkedő reakcióvégtermékre mutatnak. M: mitochondrium. L: lipoidcseppek. x 15000.



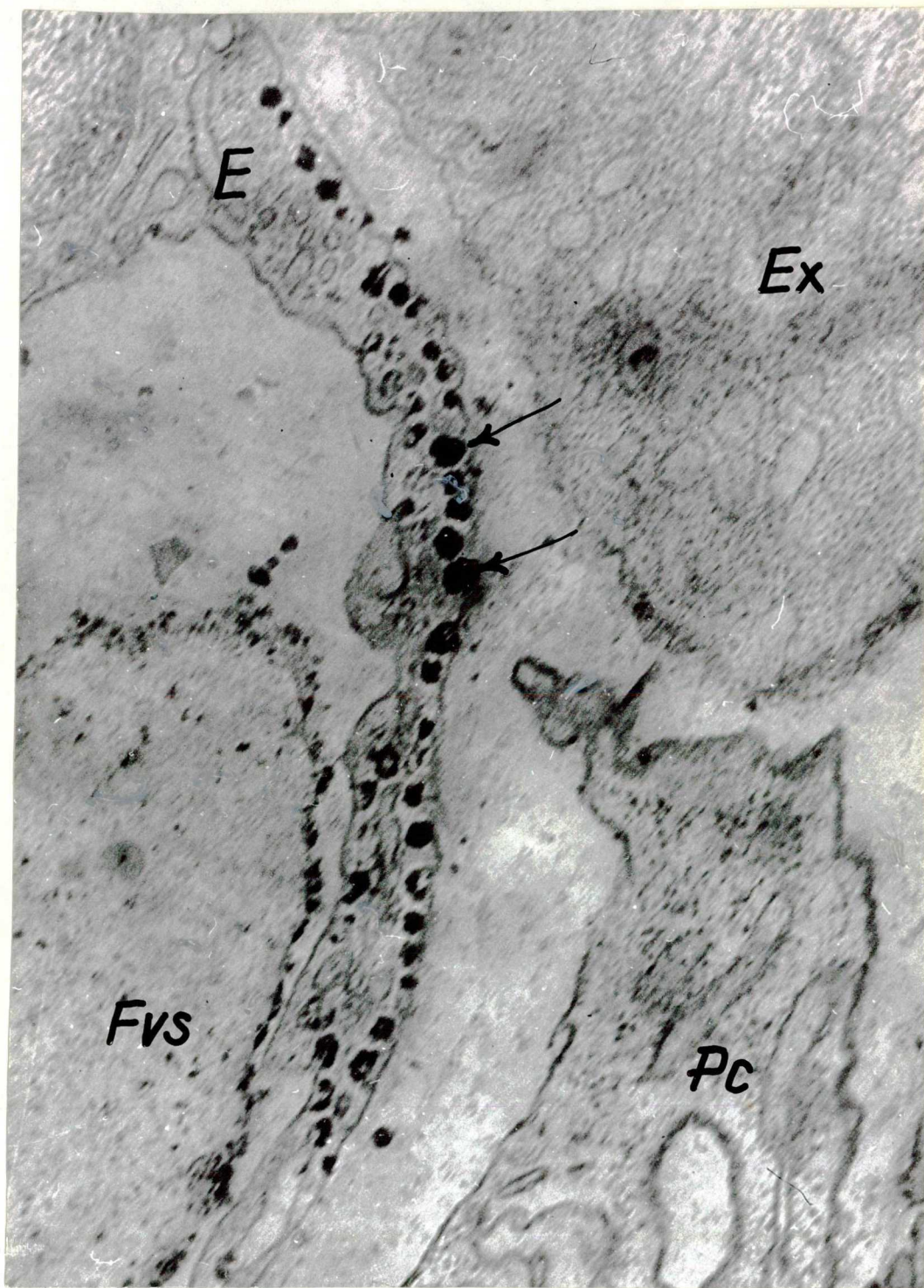
43. ábra. Patkány-nagyagykéreg. Formalin-fixálás. Közvetlen kapcsolásos módszer. Inkubáció 30 perc. Reakció az endothelsejt pinocytotikus vesiculumaiban, amelyekre a nyilak mutatnak. My: velőshüvelyű idegrostok. Gl: glia. BM: bazális membrán. E: endothel. M: mitochondrium.



44. ábra. Patkány-szívizom. Formalin-fixálás. Közvetlen kapcsolat. Inkubáció 30 perc. Nyilak a pinocitotikus vesiculumokban lévő reakcióra mutatnak. M: mitochondrium. Mf: myofilamentumok. x 20,000.



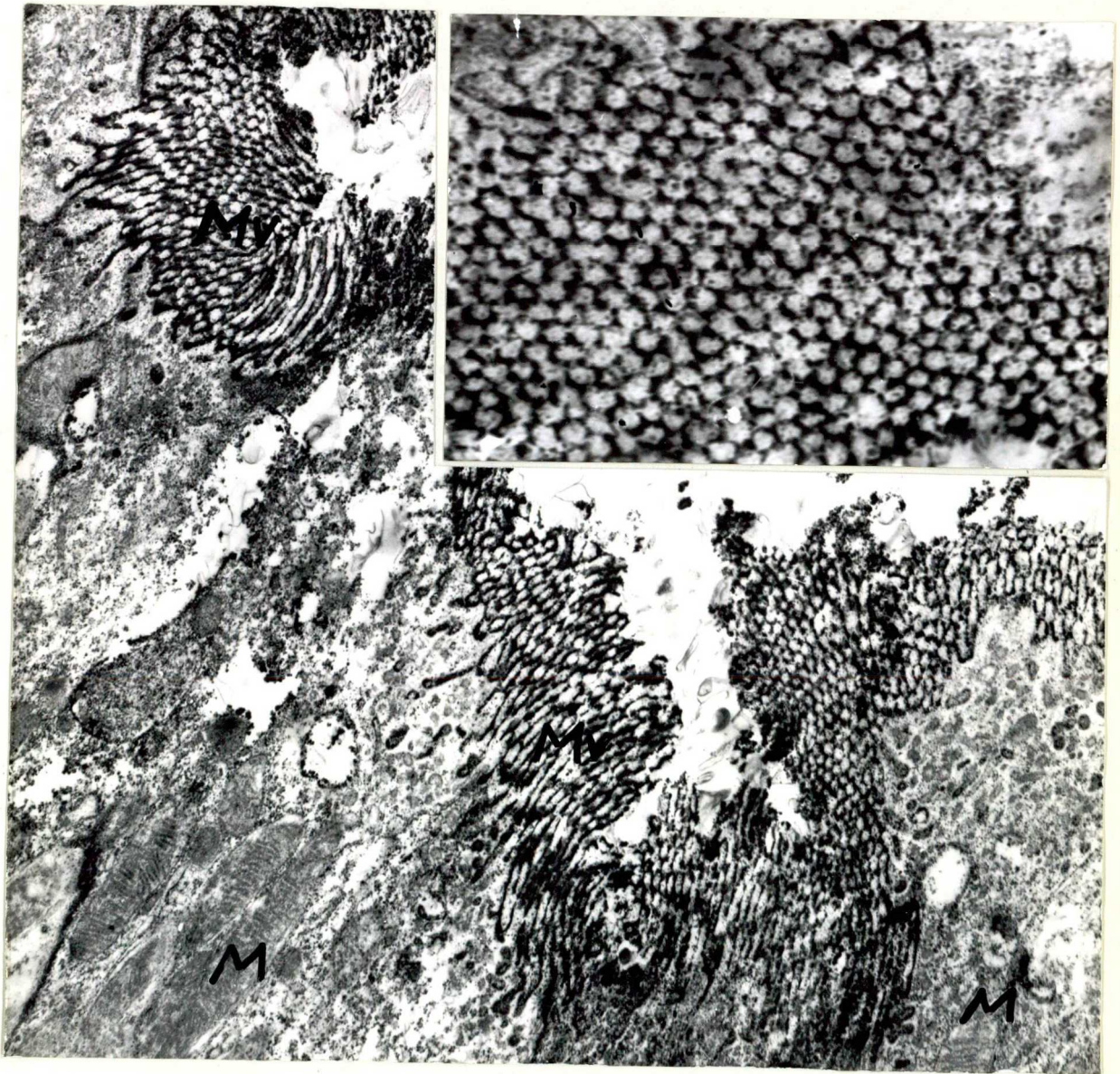
45. ábra. U.a., mint a 44. ábra. M: mitochondrium. Mf: myofilamentumok. x 20,000.



46. ábra. Patkány-pankreas. Formalin-fixálás. Direkt kapcsolásos eljárás. Inkubáció 20 perc. Reakció a pinocitotikus vesiculumban, a nyilak ezekre mutatnak. E: endothel, Ex: exokrin mirigysejt. Pc: pericita. x 18000.

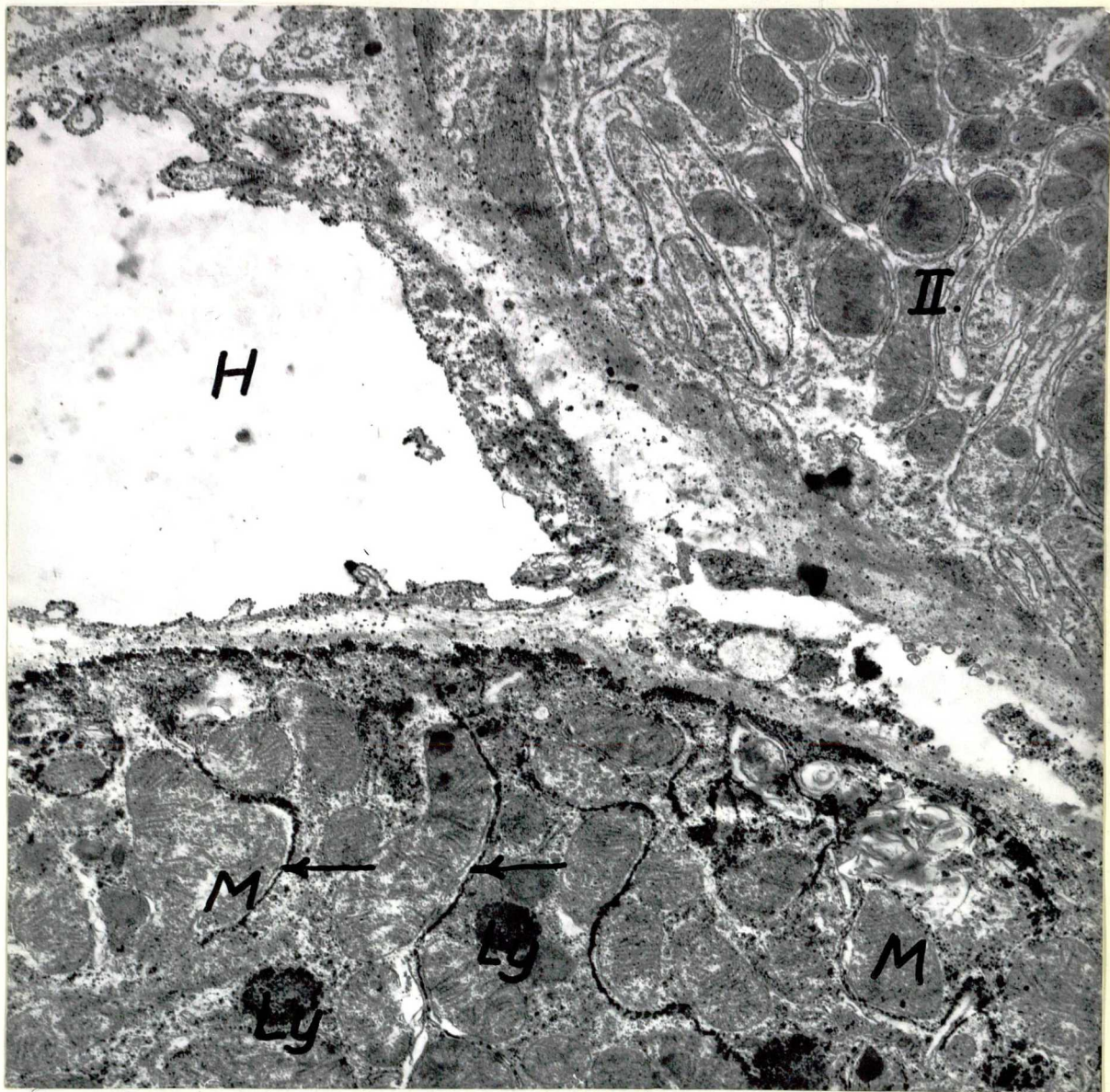


47. ábra. U.a., mint a 46. ábra. ER: ergastoplasma
/endoplasmás reticulum/. x 20,000.



48. ábra. Patkány-vese. Karnovsky-féle rögzítés. Direkt kapcsolásos módszer. Inkubáció 2p perc. Reakció a mikrovillusok között. Mv: mikrovillusok. M: mitochondrium. x 16000.

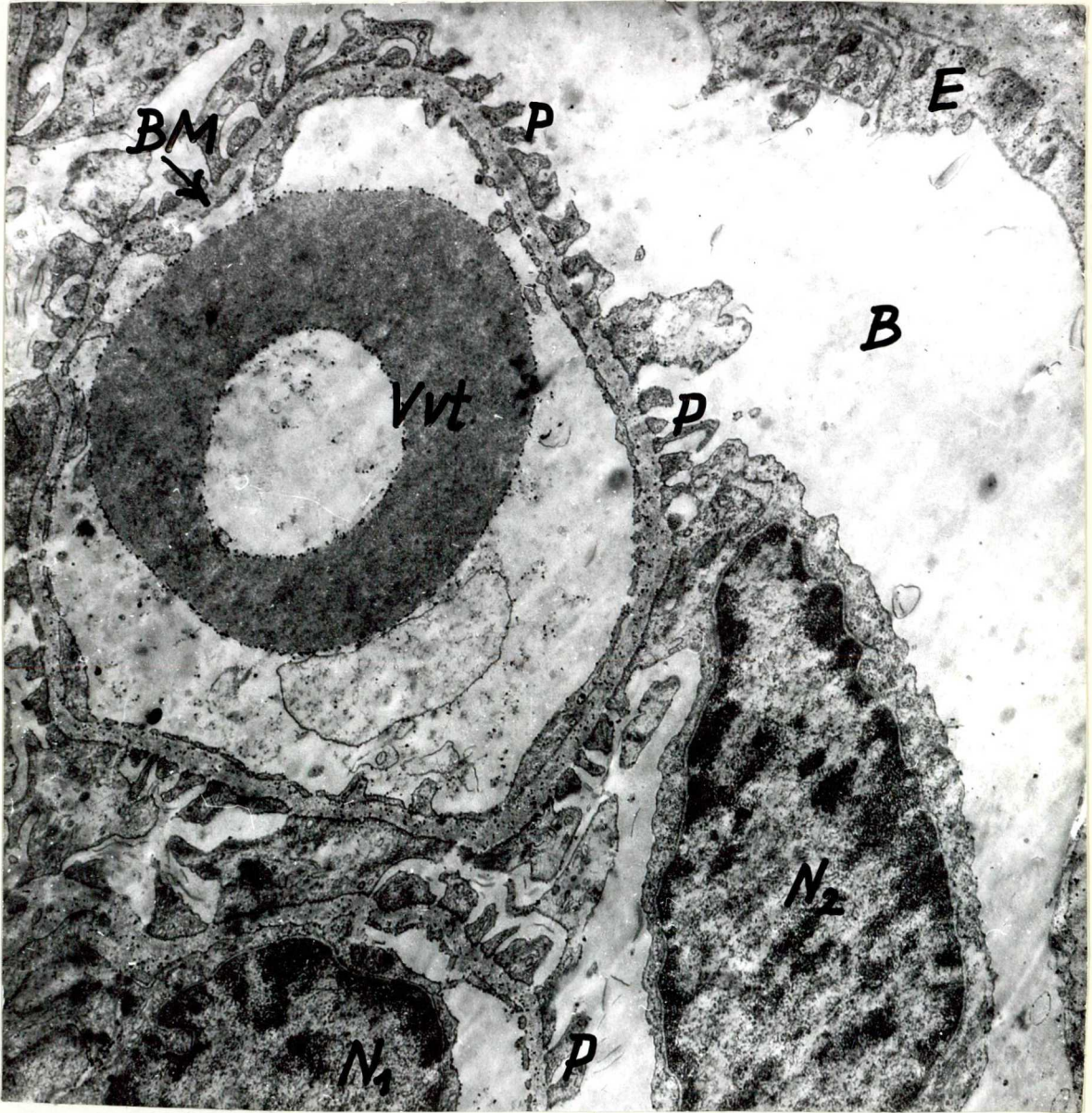
Betét: kefeszegély-részlet. Jól látható a reakcióvégttermék lépesméz-szerű elhelyezkedése a mikrovillusok között. x 45000.



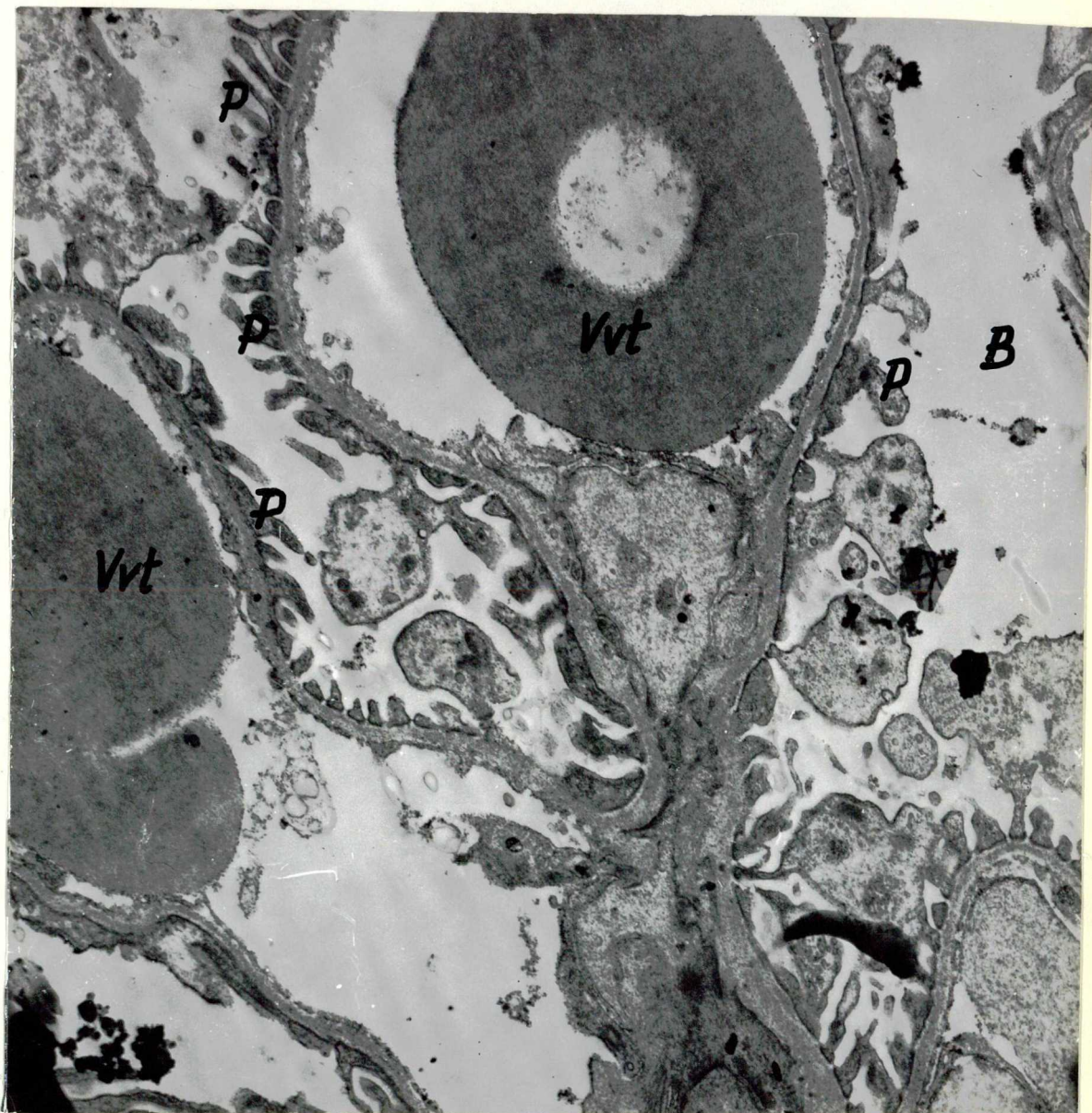
49. ábra. Patkány-vese. Módszer: azonos a 48. ábráéval. A nyilak az elsőrendű kanyarulat csatorna endoplasmás tubulusaiban lévő reakcióvégtermékre mutatnak /Jancsó-féle intracelluláris járatok?/. M: mitochondrium. Ly: lysosoma. H: Henle-kacs lumene. II: másodrendű kanyarulat csatorna hámsejtjének basalis része a basalis csikolatot alkotó óriás-mitochondriumokkal. x 16000.



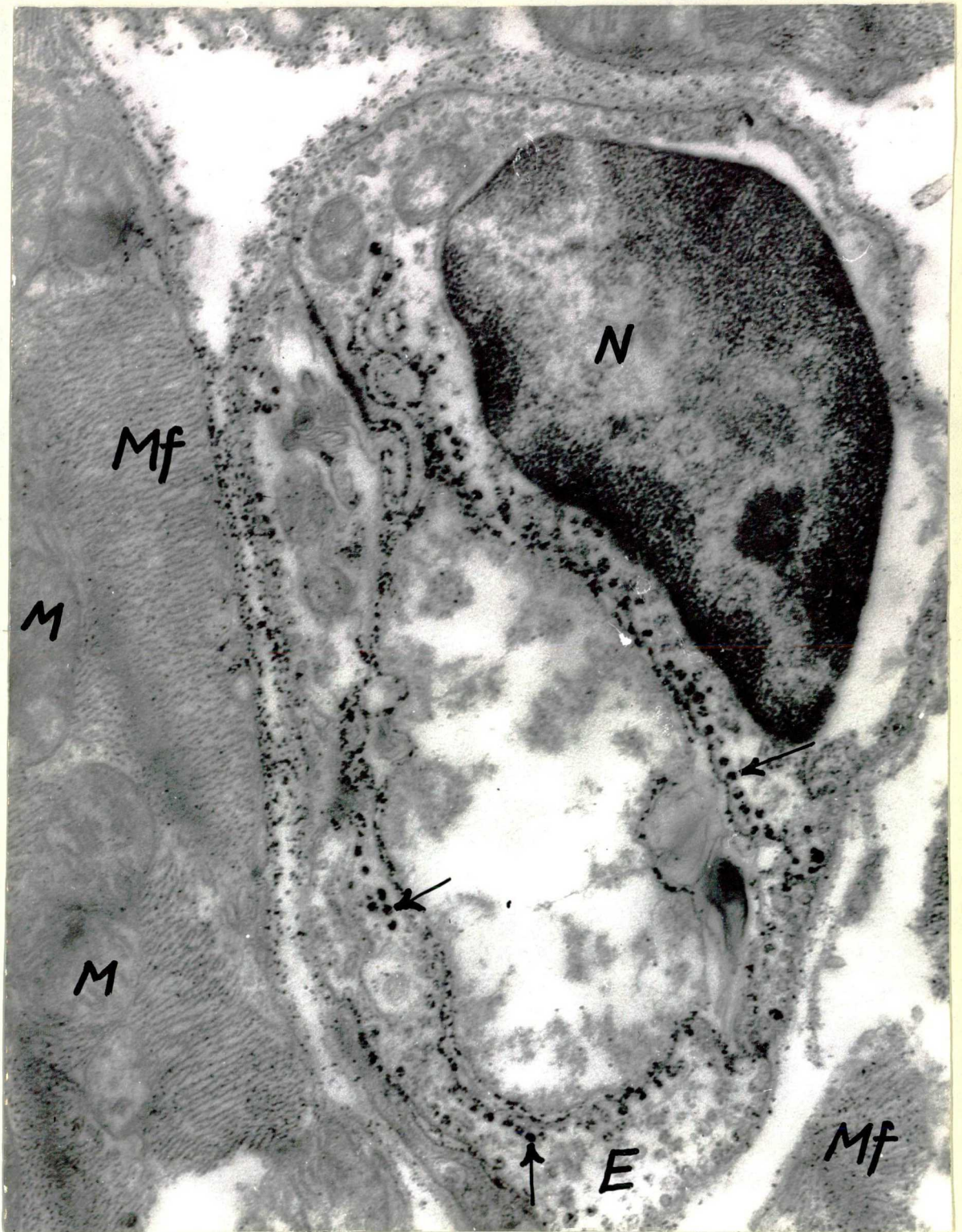
50. ábra. Patkány-vese. Módszer: u.a., mint a 48. ábrán. A nyilak az elsőrendű kanyarulat csatorna hámsejtjének endoplasmás tubulusaiban lévő reakcióvégtermékre mutatnak. H: Henle-kacs lumene. N: sejtmag. K: kivezető-cső. BM: basalis membrán. x 15000.



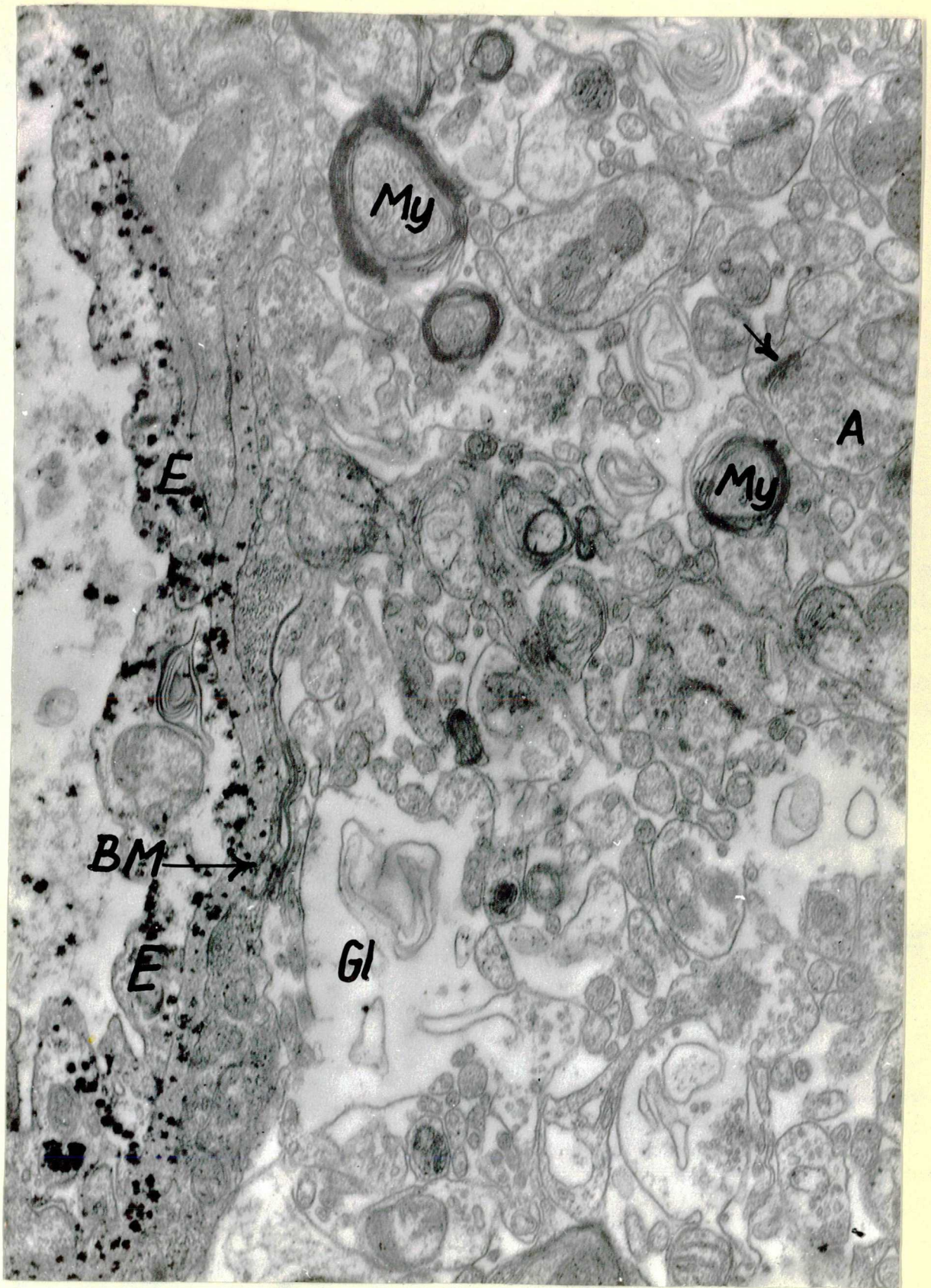
51. ábra. Patkány-vese. Módszer: u.a., mint a 48. ábrán. Glomerulus-részlet. Ezen a területen reakció nem található. B: Bowman-tok lumene. Vvt: vörösvértest a glomerulus kapillárisában. BM: basalis membrán. P: podocytá-nyulványok. N₁; N₂ : podocytá-magok. x 15000.



52. ábra. Patkány-vese. Módszer: u.a., mint a 48. ábrán. Glomerulus-részlet. B: Bowman-tok lumene. P: podocyta-nyulványok. Vvt: vörösvértest a glomerulus kapillárisában. x 15000.



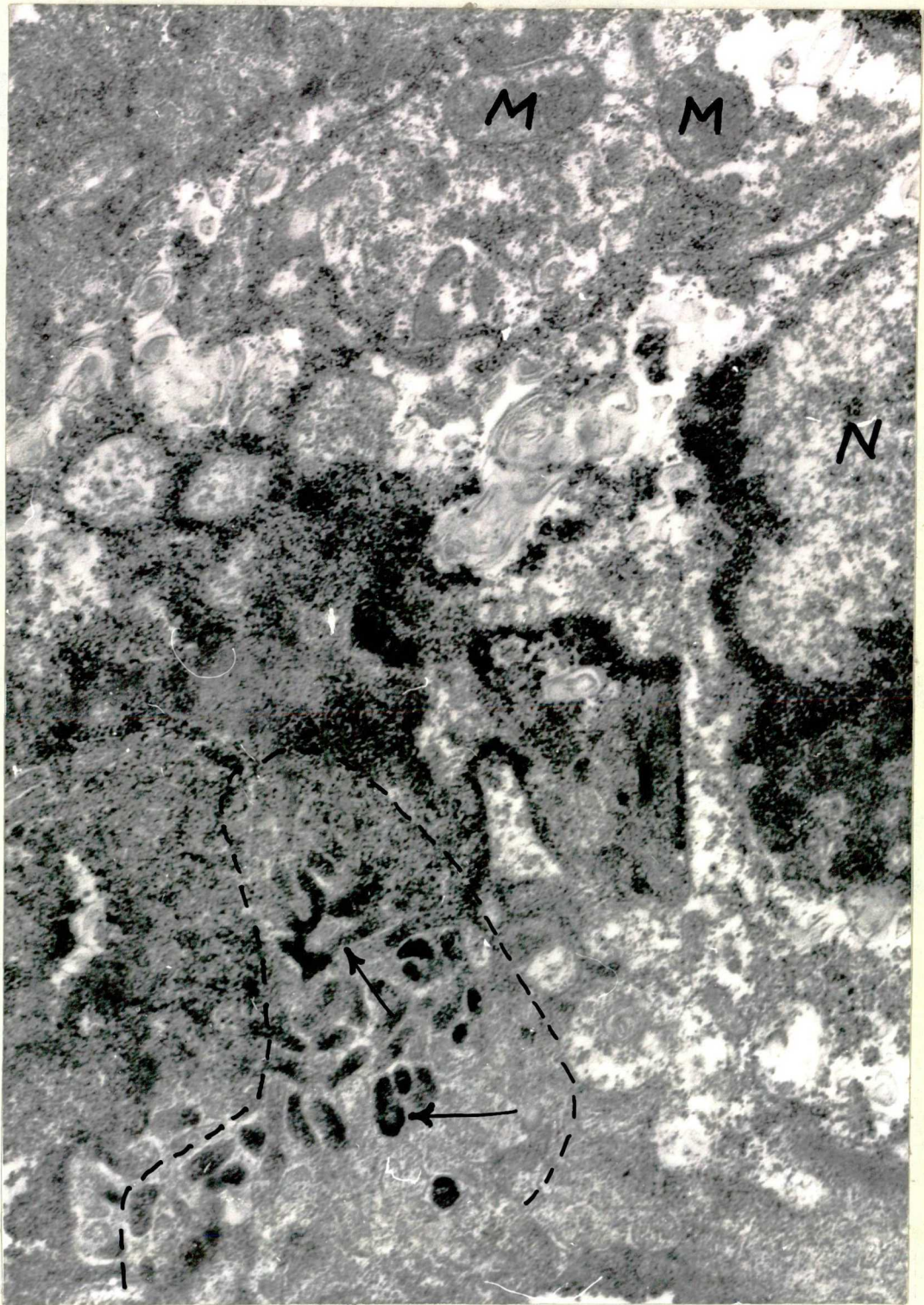
53. ábra. Patkány-szívizom. Karnovsky-féle glutáraldehides fixálás. Inkubáció 40 perc. Direkt kapcsolásos eljárás. A nyilak az endothel cytoplasmájában lévő pinocytotikus vesiculumban helyetfoglaló reakcióra mutatnak. N: endothel sejtmag. M: mitochondrium. Mf: myofilamentumok. x 20,000.



54. ábra. Patkány-nagyagykéreg. Karnovsky-féle fixálás. Közvetlen kapcsolásos módszer. Inkubáció 30 perc. E: endothel. My: velőshüvelyű idegrost. A: axon. BM: basalis membrán. Gl: glia. A nyíl egy szinapszisra mutat. Reakció a pino-cytotikus vesiculumban. x 20,000.



55. ábra. Patkány-máj. Karnovsky-féle fixálás. Direkt kapcsolásos módszer. Inkubáció 30 perc. L: lipoid-cseppek. M: mitochondrium. D: desmosoma. Szaggatott vonallal körülkerítve egy epekapilláris, amelynek mikrobolyhaiban látható a reakció. x 15000.



56. ábra. U.a., mint az 55. ábra. N: májsejt magja. Szaggatott vonallal körülkerítve egy epekapilláris, amelynek mikrobolyhaiban látható a reakció. M: mitochondriumok. x 15000.



IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkámban a nem specifikus alkalikus foszfatáz fény- és elektronmikroszkópos kimutatásának egyes kérdéseivel foglalkoztam. Olyan módszert igyekeztem összeállítani, amely egyaránt alkalmas az alkalikus foszfatáz mikroszkópos és szubmikroszkópos szinten való kimutatására. Célom elérése érdekében kísérleteket folytattam az enzim-kimutatás minden egyes lépésével kapcsolatban. A kísérleteim alapján összeállított direkt kapcsolásos módszert először fénymikroszkóposan ellenőriztem kutya, macska és patkány különböző szöveteiben. Miután meggyőződtem a módszer fénymikroszkópos használhatóságáról, azt változatlan formában alkalmaztam elektronmikroszkópos kimutatásra. Kísérleteim alapján a következőket lehet megállapítani:

1. Az alkalikus foszfatáz fénymikroszkópos kimutatásakor a fixálás nem elengedhetetlen. Friss-fagyasztott anyagon, megfelelő inkubációs idők alkalmazása esetében, nem keletkeznek diffúziós műtermékek. A kémiai fixálás elhagyásával elmarad a

különböző fixálók esetleges enzim-károsító hatása. Az ugynevezett fizikai rögzítési eljárások is okozhatnak zavarokat a lokalizációt illetően. Legajánlatosabb a kriosztát-metszetek használata, amelyeket felszárítás nélkül helyezünk az inkubáló oldatba. Maga a felszárítás is vezethet ugyanis műtermékekhez.

2. A kémiai fixálószerrek közül legelőnyösebbek az aldehid-rögzítők. A formlin- és a glutáraldehid-rögzítés után kapott eredmények nem különböznek egymástól sem fénymikroszkópos, sem pedig szubmikroszkópos szinten. Gazdaságosság szempontjából célravezetőbb azonban a megfelelően pufferezett formalin-oldat használata.

3. A perfuzió és az immerziós fixálás után kapott eredmények között nem találtunk különbséget sem fény-, sem pedig elektronmikroszkóposan. A perfuzió technika körülményes volta miatt, az esetek többségében mellőzhető, s csupán olyankor elengedhetetlen, amikor a vizsgálandó szövetterület megtalálása és kivágása hosszabb időt vesz igénybe.

4. Az osmiumos előrögzítés mindenképpen kerülendő nemcsak az alkalikus foszfátáz, hanem általában az enzimhisztokémia vonatkozásában. Az osmium,

erős oxidáló hatásának következtében, már néhány perc után is komoly enzimkárosodást okoz; emellett fokozza a membránok affinitását a nehézfémek iránt. Az osmium eme hatása különösen a közvetlen kapcsolós eljárásoknál okoz problémát, minthogy itt a szövet az inkubálás egész ideje alatt a nehézfém oldatában van, és így fokozottabb mértékben van lehetőség arra, hogy a membránoknak az osmium-okozta fokozott affinitása következtében létrejöjjön az aspecifikus membrán-festődés.

5. A rögzítő oldat pH-jának csak extrém esetekben van hisztokémiaailag észlelhető hatása. Bár a máj vizsgálatakor a különböző pH mellett rögzített anyagokon más és más eredményt kaptunk, ezeket nem tudtuk konzekvensen reprodukálni. /Feltételezhető, hogy a különbségeket nem a rögzítők pH-ja okozza, hanem azok inkább a máj funkcionális állapotától függenek./ Hogy a rögzítő pH-ja egyáltalán befolyásolja-e az aktivitás mértékét, az hisztokémiaailag nem, kizárólag biokémiai módszerekkel dönthető el.

6. Az alkalikus foszfátáz kimutatására a közvetlen kapcsolós eljárást tartom legcélravezetőbbnek. Ezzel elkerülhető a kalcium és kobalt esetleges, nem kvantitatív lecserélődése következtében

létrejövő hibás negatív reakció. Igen nagy a valószínűsége továbbá annak, hogy az elsődlegesen bekötődött, optikailag is láthatóvá tehető elektrondenz fém-ion kötése stabilisabb, mint a másodlagosan kapcsolt fémé. Az erősebben kötődött fém-csapadék eredményesebben tud a posztfixálás folyamán az osmium dekolorizáló hatásának ellenállni.

7. A fénymikroszkóposan láthatóvá tehető és egyben elektrondenzitással is bíró fémek közül az ólom bizonyult a legalkalmasabbnak. Bár más fémek /ezüst, bárium, kobalt/ is rendelkeznek ilyen tulajdonságokkal; ezek - mint az a vizsgálatok folyamán kiderült - elektronhisztokémiai célokra alkalmatlannak.

8. Az inkubáló oldat pH-jának beállításához elegendőnek bizonyult a veronál-nátrium alkalmazása.

9. Az inkubáció folyamán nem alkalmaztam aktivátorokat. Kísérletesen bebizonyosodott, hogy azok használatakor nem észlelhető változás az eredményekben.

10. Az osmiumnak az utórögzítés folyamán kifejtett dekolorizáló hatásának kivédésére igen alkalmasnak találtam a kollidines osmium használatát. Maga a közvetlen kapcsolás is ad bizonyos mértékű védelmet

az osmium "szintelenítő" /hibás negatív reakcióra vezető/ hatásával szemben. A direkt kapcsolásos módszer alkalmazása és a kollidines osmiumban történő utórögzítés szinte száz százalékos védelmet biztosít az osmium-dekolorizáció ellen.

11. Az ólomfoszfát ólomszulfiddá való átalakítása legkönnyebben és legcélszerűbben az ecetsavval neutralizált ammoniumpoliszulfid-oldattal történhet. Ez a közel neutrális kémhatású oldat nem jelent veszélyt az alapszerkezetre. Ugyancsak jó eredményekre vezet a Lázár-féle eljárással előállított kénhidrogén oldat használata is. A két szulfidozási eljárás közül azért esik a választás inkább a neutralizált poliszulfid-oldattal történő módszerre, mert ennek kivitelezése lényegesen egyszerűbb.

12. Formalin- vagy glutáraldehides fixálás, direkt kapcsolásos alapon történő hisztokémiai reakció, kollidines utófixálás és ecetsavval neutralizált ammoniumpoliszulfiddal történő szulfidozás után kapott fény- és elektronmikroszkópos hisztokémiai eredmények kifogástalanok mind a lokalizációt, mind pedig az alapszerkezet megtartottságát illetően.

V. IRODALOM

- BARADI A.F., BRANDES D.:
Electron microscopic localization
of alkaline phosphatase in papilla
foliata.
J. Histochem. Cytochem. 11, 815-817,
1963.
- BARDEN H., LAZARUS S.S.:
Histochemical characteristics of
adenosine triphosphate dephosphorylating
enzymes in rabbit pancreas.
J. Histochem. Cytochem. 11, 578-589,
1963.
- BARKA T.: A foszfatázok hisztokémiai kimutatása.
KOVACH Arisztid: A kísérleti orvos-
tudomány vizsgáló módszerei. V. kötet.
Akadémiai Kiadó, Budapest 1959.
- BARKA T., ANDERSON P.J.:
Histochemistry. Theory, practice and
bibliography.
Hoeber, New-York, Evanston, London 1963.
- BARKA T., SZALAY S., PÓBALAKY Z., KERTÉSZ L.:
Quantitativ histochemiai phosphatase
meghatározás radioaktiv ólom felhasz-
nálásával.
Kisérlet. Orvostud. 3, 48-54, 1951.
- BARKA T., SZALAY S., PÓBALAKY Z., KERTÉSZ L.:
Quantitative histochemical determination
of phosphatase by means of radioactive
lead.
Acta Anat. 16, 45-53, 1952.

- BARNETT R.J.: Ultrastructural histochemistry of normal neuromuscular junctions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 135, 27-34, 1966.
- BARNETT R.J., TICE L.W.:
The use of the electron microscope as a tool for the investigations of problems in cytochemistry.
First International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 1963.
- BARTER R.: Diffusion of alkaline phosphatase to characteristic intracytoplasmic sites of activity.
Nature /Lond./ 173, 1233-1234, 1954.
- BÉLANGER L.F.: Detection of phosphatase activity in polarized light following glycerophosphate incubation.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 77, 266-269, 1951.
- BENNETT H.S., LUFT J.H.:
S-collidine as a basis for buffering fixatives.
J. biophys. biochem. Cytol. 6, 113-114, 1959.
- BODANSKY O.: The effect of A-amino acids and magnesium on the activity of kidney and intestinal phosphatases.
J. biol. Chem. 115, 101-110, 1936.
- BOURNE G.: The distribution of alkaline phosphatase in various tissue.
Quart. J. exp. Physiol. 32, 1-19, 1943-44.
- BOURNE G.H.: Cytology and cell physiology.
Second edition. Calarendon Press.
Oxford 1951.
- BOURNE G.H.: Some observations on the localization of phosphatases in the brush borders of intestinal epithelial cells.
VIII.th. International Congress for Cell Biology. Leyden 1954.
Excerpta Medica, 8, 1662, 1954.

- BRANDES D., ELSTON R.N.:
An electron microscopical study of the
histochemical localization of alkaline
phosphatase in the cell wall of *Chlorella*
vulgaris.
Nature /Lond./ 177, 274-275, 1956.
- BRANDES D., ZETTERQVIST H., SHELDON H.:
Histochemical techniques for electron
microscopy: Alkaline phosphatase.
Nature /Lond./ 177, 382-283, 1956.
- BURGOS M.H., DEANE H.W., KARNOVSKY M.L.:
Histochemical and chemical evidence for
more than one phosphomonoesterase.
J. Histochem. Cytochem. 3, 103-121, 1955.
- BURSTONE M.S.: Histochemical comparison of naphthol-AS
substrates using frozen-dried tissues.
J. Histochem. Cytochem. 6, 87-88, 1958.
- BURSTONE M.S.: Histochemical comparison of naphthol-AS
phosphates for the demonstration of
phosphatases.
J. nat. Cancer Inst. 20, 601-616, 1958.
- BURTON J.F.: The histological demonstration of
alkaline phosphatase activity in human
endometrium.
Brit. J. exp. Path. 34, 159-163, 1953.
- CHANG J.P., BERENBOM M.:
Effect of storage on the enzyme activity
of paraffin-embedded tissue.
Exp. Cell Res. 10, 228-230, 1956.
- CHANG J.P., HORI S.H.:
The section freeze-substitution technique:
I. method.
J. Histochem. Cytochem. 9, 292-300, 1961.

- CHASE W.H.: The demonstration of alkaline phosphatase activity in frozen-dried mouse gut in the electron microscope. J. Histochem. Cytochem. 11, 96-101, 1963.
- CHÉVERMONT M., FIRKET H.: Alkaline phosphatase of the nucleus. Int. Rev. Cytol. 2, 261-288, 1953.
- CLARK L.Jr.: The localization of alkaline phosphatase in tissues of mice, using the electron microscope. Amer. J. Med. 109, 57-84, 1961.
- CLARK S.L.: Alkaline phosphatase of the small intestine studied with electron microscope in suckling and adult mice. Anat. Rec. 139, 216-216, 1961.
- CLOETENS R.: Eigenschaften der alkalischen Phosphatasen II. mit verschiedenen M_2 und der M_2 freien Apophosphatase. Biochem. Z. 310, 42-53, 1941.
- CORSI A.: Observations on the histochemical localization of alkaline phosphatase in the rat liver. Arch. Sci. biol. 39, 233-240, 1955.
- CSILLIK B., FÖLDI M.: A nyirokpangás hisztokémiája és hisztofizikája. Akad. Kiadó, Budapest 1965.
- DALGAARD J.B.: Tracers phosphatase determination in tissue sections. Nature /Lond./ 162, 811-811, 1948.
- DALGAARD J.B.: Preservation of phenylphosphatase activity during paraffin embedding. J. Histochem. Cytochem. 4, 14-16, 1956.

DANIELLI J.F.: A critical study of techniques for determining the cytological position of alkaline phosphatase.
J. exp. Biol. 22, 110-117, 1946.

DANIELLI J.F.: Cytological demonstration of alkaline phosphatase.
Nature /Lond./ 165, 762-763, 1950.

DANIELLI J.F.: Cytochemistry. A critical approach.
J. Wiley & Sons. Inc. New-York 1953.

DANIELLI J.F.: Phosphatases and other enzymes considered in relation to active transport and functions of fibrous protein structures.
Proc. roy. So. B. 142, 146-154, 1954.

DEANE H.W.: Cytological survey of phosphatases in mammalian liver, pancreas and salivary glands.
Amer. J. Anat. 80, 321-359, 1947.

DEANE H.W., DEMSEY E.W.:
The localization of phosphatases in the Golgi region of intestinal and other epithelial cells.
Anat. Rec. 93, 401-417, 1945.

DOYLE W.L.: Effects of dehydrating agents on phosphatases in the lymphatic nodules of the rabbit appendix.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 69, 43-44, 1948.

DOYLE W.L.: Quantitative evaluation of Gömöri histochemical preparations.
Science, 111, 64-65, 1950.

DOYLE W.L.: Quantitative histochemistry of phosphatases.
Int. Rev. Cytol. 2, 249-260, 1953.

EGER W., GELLER H.F.:

Zum Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatase in der Leber am nativen Gefrierschnitt.
Virchows Arch. path. Anat. 322, 645-661, 1952.

EMERY A.J., DOUNCE A.L.:

Intracellular distribution of alkaline phosphatase in rat liver cells.
J. Biophys. biochem. Cytol. 1, 315-330, 1955.

EMERY A.J., DOUNCE A.L.:

Studies of two types of alkaline phosphatase in nuclei isolated from the livers of fed and fasted rats by a modification of the Behrens technique.
J. biophys. biochem. Cytol. 1, 331-338, 1955.

EMMEL V.M.:

The intracellular distribution of alkaline phosphatase activity following various methods of histologic fixation.
Anat. Rec. 95, 159-176, 1946.

EMMEL V.M.:

Effect of HCl on alkaline phosphatase in kidney and intestine. Histochemical and quantitative study.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 75, 114-117, 1950.

EMMEL V.M.:

The effect of magnesium sulfate on acid inactivation of renal and intestinal alkaline phosphatase.
Science, 113, 267-268, 1951.

FEIGIN J., WOLF A., KABAT E.:

A histochemical studies on tissue enzymes. VI A. Difficulty in the histochemical localization of alkaline phosphatase in nuclei.
Amer. J. Path. 26, 647-659, 1950.

FEIGIN J., WOLF A.:

Artifactual nuclear staining in the Gömöri method for demonstrating alkaline phosphatase differing mechanism with the cobalt and silver visualization technics.
Lab. Invest. 2, 115-123, 1953.

FEIGL F.:

Quantitative analysis by spot tests.
3rd English edition. Elsevier Publ.
Co. New York-Amsterdam 1946.

FREDRICSSON B.: A modification of the histochemical method for demonstration of alkaline phosphatase in which the nonspecific reactions and the diffusion phenomena are reduced.
Anat. Anz. 99, 97-106, 1952.

FREDRICSSON B.: A modification of the histochemical method for demonstration of alkaline phosphatase in which the diffusion phenomenon is reduced.
Experientia /Basel/, 8, 139-139, 1952.

FREDRICSSON B.: The distribution of alkaline phosphatase in the rat lung.
Acta Anat. 26, 246-256, 1956.

FREDRICSSON B.: Alkaline phosphatase in the Golgi substance of intestinal epithelium.
Exp. Cell Res. 10, 63-65, 1956.

FREIMAN D.G.: Metal activation of alkaline phosphatase and 5-nucleotidase.
Lab. Invest. 5, 338-347, 1956.

FREIMAN D.G., GOLDMAN H., KAPLAN N.:

Histochemical studies on the effect of anions on alkaline phosphomono-esterase activity.
J. Histochem. Cytochem. 10, 520-527, 1962.

- GLICK D.: Techniques of histo- and cytochemistry.
Interscience Publ. Inc. New York 1949.
- GOETSCH J.B., REYNOLDS M., BUNTING H.:
Modification of Gömöri method for
alkaline and acid phosphatase
avoiding artefact staining of nucleus.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 80,
71-75, 1952.
- GÖMÖRI G.: Microtechnical demonstration of
phosphatase in tissue sections.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 42,
23-26, 1939.
- GÖMÖRI G.: Distribution of phosphatase in normal
organs and tissues.
J. Cell. Comp. Physiol. 17, 71-83,
1941.
- GÖMÖRI G.: Calcification and phosphatase.
Amer. J. Path. 19, 197-207, 1943.
- GÖMÖRI G.: Histochemical specificity of
phosphatases.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 70, 7-11,
1949.
- GÖMÖRI G.: Further studies on the histochemical
specificity of phosphatase.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 72, 449-
450, 1949.
- GÖMÖRI G.: Sources of error in enzymatic
histochemistry.
J. Lab. clin. Med. 35, 802-809, 1950.
- GÖMÖRI G.: Alkaline phosphatase of cell nuclei.
J. Lab. clin. Med. 37, 526-531, 1951.

- GÖMÖRI G.: Microscopic histochemistry.
Principles and Practice.
The University of Chicago Press,
Chicago 1952.
- GÖMÖRI G., BENDITT E.P.:
Precipitation of calcium phosphate
in the histochemical method for
phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 1, 114, 1953.
- GROSSMAN M.I., WANG C.C., WANG K.J.:
Alkaline phosphatase correlation of
histochemical demonstrability in
pancreatic tissue with presence in
pancreatic juice.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 78, 310-311,
1951.
- HALE A.J.: Historadiographic identification of
alkaline phosphatase.
Biophys. Biochem. Cytol. 11, 488-492,
1961.
- HANCOX N.M., NICHOLAS E.:
Phase-contrast microscopy of the Gömöri
reaction for alkaline phosphatase.
Nature /Lond./ 173, 951-962, 1954.
- HANCOX N.M., NICHOLAS E.:
Phase-contrast microscopy of the Gömöri
reaction for alkaline phosphatase.
Acta Anat. 26, 302-317, 1956.
- HÉBERT S.: Les phosphatases alcalines de l'intestin.
Étude histochimique expérimentale.
Arch. Biol. /Paris/ 61, 235-289, 1950.
- HERMAN E., DEANE H.W.:
Comparison of the localization of
alkaline glycerophosphatase, as demonstrated
by the Gömöri-Takamatsu method, in frozen
and in paraffin sections.
J. cell. comp. Physiol. 41, 201-223, 1953.

HILL M.F., TRAVILL A.A.:

Rapid fixation and paraffin embedding
for localizing alkaline phosphatase.
Stain Technol. 38, 263-264, 1963.

HOLMGREN HJ., SVANBORG A.:

Variations of the acid and alkaline
phosphatase activity in the livers of
white rats during the 24-hours period.
Acta med. scand. 137, 187-197, 1950.

HOLT S.J., HICKS M.:

Studies of formalin fixation for
electron microscopy and cytochemical
staining purpose.
J. biophys. biochem. Cytol. 11, 31-45,
1961.

HORE E., ELVEHJEM C.A., HART E.B.:

The effect of zinc on alkaline
phosphatases.
J. biol. Chem. 134, 425-442, 1940.

HUGON J., BORGERS M.:

Submicroscopic localization of the
alkaline phosphatase activity in the
duodenum of the rat.
Exp. Cell Res. 45, 698-701, 1967.

HUGON J., BORGERS M.:

Direct lead method for the electron
microscopic visualization of alkaline
phosphatase activity.
J. Histochem. Cytochem. 14, 429-431,
1966.

JOHANSEN G., LINDERSTROM-LANG K.:

Liberation, diffusion and precipitation
of phosphate in the Gömöri test.
Acta med. scand. 140, Suppl. 266, 601-
613, 1951-52.

JOHNSON F.R.:

Bilaminar distribution of alkaline
phosphatase in the intestine and kidney.
Proc. roy. Soc. B. 142, 169-170, 1954.

JOHNSON F.R., KUGLER J.H.:

The distribution of alkaline phosphatase in the mucosal cells of the small intestine of the rat, cat and dog. J. Anat. /Lond./ 87, 247-257, 1953.

JACOBY F.:

Differences in localization by histochemical means of alkaline phosphatase within the same organ of different experimental animals. J. Physiol. /Lond./ 105, 19-19, 1946.

JACOBY F.:

The pancreas and alkaline phosphatase. Nature /Lond./ 158, 268-269, 1946.

JACOBY F., MARTIN B.F.:

The histochemical test for alkaline phosphatase. Nature /Lond./ 163, 875-876, 1949.

KABAT E.A., FURTH J.:

Histochemical studies of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. Amer. J. Path. 17, 303-318, 1941.

KAPLAN S.E., NOVIKOFF A.B.:

The localization of adenosine-triphosphatase activity in rat kidney, electron microscopic examination of reaction product in formol calcium fixed frozen section. J. Histochem. Cytochem. 7, 295-296, 1959.

KARNOVSKY M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.

J. Cell Biol. 27, 137A-138A, 1965.

KASTRIKIN N.F.: Über den Moogschen Effekt bei der Gomori-schen Kobalt-Methode für alkalische Phosphatase. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 160, 940-943, 1965.

KISZELY Gy., BARKA T.: Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia. Medicina Kiadó, Budapest 1958.

KISZELY G., PÓBALAKY Z.: Microtechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. Akadémiai Kiadó, Budapest 1964.

KÓSSA J. von: Beitr. path. Anat. 29, 163-202, 1901. Cit.: PEARSE A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied. J. & A. Churchill, Ltd. London 1961.

LAGERSTEDT S., STENRAM K.: Selective alkaline phosphatase activity within the epithelial of the small intestine and kidney in rat. Acta anat./Basel/, 10, 348-362, 1950.

LÁZÁR J.: Kénhidrogén gáz száraz uton történő előállítása. Eü. Közl. 5, 1965.

LAZARUS S.S.: Demonstration of glucose-6-phosphatase in mammalian pancreas. Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 101, 819-822, 1959.

LEDUC E.H., DEMPSEY E.W.: Activation and diffusion as factors influencing the reliability of the histochemical method for alkaline phosphatase. J. Anat. /Lond./ 85, 305-315, 1951.

- LISON L.: Histochemical research for phosphatases.
Critical survey.
Bull. Histologie Appl. Technique Microsc.
25, 23-41, 1948.
- LORCH J.: Note on the cytological localization
of alkaline phosphatase.
Quart. J. micr. Sci. 88, 159-161, 1947.
- LOVELESS A., DANIELLI J.F.:
A dye phosphate for the histo- and
cytochemical demonstration of alkaline
phosphatase, with some observations
on the differential behaviour of
nuclear and extranuclear enzymes.
Quart. J. micr. Sci. 90, 57, 1949.
- MAENGWYN-DAVIES G.D., FRIEDENWALD J.S.:
Histochemical studies of alkaline
phosphatase in tissues of rat using
frozen sections; substrate specificity
of enzymes hydrolyzing poly-glycol-
monophosphate esters, hexese
diphosphate, and b-naphtylphosphate.
J. cell. comp. Physiol. 36, 421-459,
1950.
- MANHEIMER L.H., SELIGMAN A.M.:
Improvement in the method for the
histochemical demonstration of
alkaline phosphatase and its use in
a study of normal and neoplastic tissues.
J. nat. Cancer Inst. 2, 181-199, 1948.
- MARTIN B.F., JACOBY F.:
Diffusion phenomenon complicating the
histochemical reaction for alkaline
phosphatase.
J. Anat. /Lond./, 83, 351-363, 1949.
- McCOLLUM, E., HART B.:
J. biol. Chem. 4, 497, 1908.
Cit.: SUMNER B., MIRBACK K.: The Enzymes.
Acad. Press, New York 1950.

- MENTEN M.L., JUNGE L., GREEN M.H.:
A coupling histochemical azo-dye
test for alkaline phosphatase in the
kidney.
J. biol. Chem. 153, 471-477, 1944.
- MILLER F.:
Acid phosphatase localization in
renal protein absorption droplets.
Proc. 5th. Int. Congr. Electron
Microscopy. Ed. Breese, S.S.Jr. Vol.2.
New York, Acad. Press, 1962.
- MILLONIG G.:
Advantages of a phosphate buffer for
 OsO_4 solutions in fixation.
J. appl. Physiol. 32, 1637, 1961.
- MILLONIG G.:
Further observations on a phosphate
buffer for osmium solutions in
fixation.
Proc. 5th. Int. Congr. Electron
Microscopy. Ed. Breese, S.S.Jr. Vol.2.
New York, Acad. Press, 1962.
- MIZUTANI A., BARNETT R.J.:
The structural demonstration of
phosphatase activity at pH 9.
Nature /Lond./ 206, 1001-1003, 1965.
- MOE H.:
On the histochemical demonstration of
alkaline glycerophosphatase and its
dependence on the incubation times.
Studies on the duodenum and jejunum
of the cat and mouse.
Anat. Rec. 112, 217-237, 1952.
- MOFFAT D.B.:
Distribution of alkaline phosphatase
and periodic acid-Schiff positive
material in the same section.
Stain Technol. 33, 225-228, 1958.
- MOOG F.:
The functional differentiation of the
small intestine. II. The differentiation
of alkaline phosphomonoesterase in the
duodenum of the mouse.
J. exp. Zool. 118, 187-207, 1951.

- MOOG F.: Nondiffusibility of phosphatase in fixed tissue.
Science, 114, 109-109, 1951.
- MOLNAR J.: The use of rhodizonate in enzymatic histochemistry.
Stain Technol. 27, 221-322, 1952.
- MÖLBERT E., DUSPIVA F., DEIMLING O. von:
Die histochemische Localisation der Phosphatase in der Tubulusepithelzelle der Mäuseniere in electronmikroskopischen Bild.
Histochemie, 2, 5-22, 1960.
- MÖLBERT E., DUSPIVA F., DEIMLING O. von:
The demonstration of alkaline phosphatase in the elektron microscope.
J. biophys. biochem. Cytol. 2, 387-390, 1960.
- NADEL E.M., WODINSKY J.:
Dissimilarity in alkaline phosphatase staining reactions of ceratohyaline.
J. Histochem. Cytochem. 3, 339-341, 1955.
- NEUMANN H.: Dependence of the pH optimum of the phosphomonoesterase I on the substrate concentration and on inhibitors and activators.
Biochem. biophys. Acta, 3, 117-124, 1949.
- NEWMAN W., KABAT E.A., WOLF A.:
Histochemical studies on tissue enzymes. V. A difficulty in enzyme localization in the acid range due to selective affinity of certain tissues for lead: its dependence on pH.
Amer. J. Path. 26, 489-503, 1950.

- NOVIKOFF A.B.: The validity of histochemical phosphatase methods on the intracellular level.
Science, 113, 320-325, 1951.
- NOVIKOFF A.B., WOO-YUNG SHIN, DRUCKER J.:
Cold acetone fixation for enzyme localization in frozen sections.
J. Histochem. Cytochem. 8, 37-40, 1960.
- PALADE G.E.: A study of fixation for electron microscopy.
J. exp. Med. 95, 285-298, 1952.
- PEARSE A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied.
J. & A. Churchill Ltd. London 1961.
- PÓBALAKY Z.: A mélyhűtés alkalmazása a hisztokémiában.
Biol. Közl. 8, 179-188, 1960.
- PÓBALAKY Z.: Módszer és értékelhetőség kérdése az enzimek hisztokémiai vizsgálatában.
Morph. és Ig. Orv. Szle, 2, 217-226, 1962.
- REALE E., LUCIANO L.:
Influence du tétroxyde d'osmium dans la démonstration de la phosphatase alcaline non spécifique avec la méthode de Gomori.
Acta anat. /Basel/ 50, 389-389, 1962.
- REALE E., LUCIANO L.:
A probable source of errors in electron histochemistry.
J. Histochem. Cytochem. 12, 713-715, 1964.

- REYNOLDS E.S.: The use of lead citrate at high pH as an elektronopaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. 17, 208-212, 1963.
- RICHTERICH W.: Der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase: kritische Bemerkung zur Methode, Technik und Interpretation der Resultate.
Acta anat. /Basel/ 15, 243-259, 1952.
- ROBISON R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification.
Biochem. J. 17, 286-293, 1923.
- ROBISON R.: Ergebn. Enzymforsch. 1, 280, 1932.
Cit.: BOURNE G.H.: Cytology and cell physiology. Clarendon Press, Oxford 1951.
- ROMANUL F.C.A., BANNISTER.R.G.: Localized areas of high alkaline phosphatase activity terminal arterial tree.
J. Cell. Biol. 15, 73-84, 1962.
- ROMANUL F.C.A., BANNISTER R.G.: Localized areas of high alkaline phosphatase activity in endothelium of arteries.
Nature /Lond./ 195, 611-612, 1962.
- ROSS M.H., ELY J.O., ARCHER J.G.: Alkaline phosphatase activity and pH optima.
J. biol. Chem. 192, 561-568, 1951.
- RÓZSA Gy., SÓTONYI P.: Az alkalikus phosphatase Gömöri-féle histochemiai kimutatásának értékeléséről.
Morph. és Ig. Orv. Szle, 4, 193-197, 1964.

- RUTENBURG A.M., BARNETT R.J., TSOU K.C., MONIS B., TEAGUE R.: Histochemical demonstration of alkaline phosphatase activity by a simultaneous coupling technic using naphthol-AS phosphate.
J. Histochem. Cytochem. 6, 90-92, 1958.
- RUYTER J.H.C.: Histochemically detectable alkaline phosphatase in the cuticular border of the epithelium of small intestine.
Acta anat. /Basel/ 16, 209-220, 1952.
- RUYTER J.H.C., NEUMANN H.:
A critical examination of the histochemical demonstration of the alkaline phosphomonoesterase.
Biochim. biophys. Acta, 3, 125-135, 1949.
- SABATINI D.D., BENSCH K.G., BARNETT R.J.:
Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.
J. Cell. Biol. 17, 19-58, 1963.
- SABATINI D.D., MILLER F., BARNETT R.J.:
Aldehyde fixation for morphological and enzyme histochemical studies with the electron microscope.
J. Histochem. Cytochem. 12, 57-71, 1964.
- SADASVIAN V.: Arch. Biochem. 28, 100, 1950.
Cit.: PEARSE A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied.
J. & A. Churchill, Ltd. London 1961.
- SADASVIAN V.: Nature of phosphatase activity.
Nature /Lond./ 169, 418-419, 1952.
- SELIGMAN A.M., CHAUNCHEY H.H., NACHLAS M.M.:
Effect of formalin fixation on the activity of five enzymes of rat liver.
Stain Technol. 26, 19-23, 1951.

- SHELDON H., ZETTERQVIST H., BRANDES D.:
Histochemical reactions for elektron
microscopy-acid phosphatase.
Exp. Cell Res. 2, 592-596, 1955.
- SOLYMOSS B.: A hajszálerek alkaliás phosphatase
aktivitásáról.
Kisérl. Orvostud. 2, 167-172, 1950.
- STAFFORD R.O., ATKINSON B.W.:
Effect of acetone and alcohol fixation
and paraffin embedding on activity acid
and alkaline phosphatase in rat tissue.
Science, 107, 279-281, 1948.
- SUZUKI U., YOSHIMA Y., TAKAHISHI M.:
J. Coll. Agr. Tokyo. Imp. Univ. Bull.
7, 503, 1907.
Cit.: SUMNER B., MIRBACK K.:
The Enzymes. Academic Press, New York
1950.
- TAKAMATSU H.: Histochemische Untersuchungen der
Phosphatase und deren Verteilung in
verschiedenen Organen und Geweben.
Trans. Soc. Path. Jap. 29, 492-498,
1939.
- TANKA D., KELIER M.:
Arilésztetek substantivitásának
vizsgálata. Hydrolytikus enzyme azo-
kapcsolásos kimutatása.
Morph. és Ig. Orv. Szle, 2, 226-230,
1962.
- WACHSTEIN M.: Renal phosphatase in choline deficiency.
Arch. Path. 38, 297-304, 1944.
- WACHSTEIN M.: Dithioamide for the simultaneous
demonstration of preformed calcium
and alkaline phosphatase.
Stain Technol. 27, 338-338, 1952.

WACHSTEIN M.: Histochemical staining reactions of the normally functioning and abnormal kidney.
J. Histochem. Cytochem. 3, 246-270, 1955.

WACHSTEIN M., BESEN M.: Electron microscopic localization of phosphatase activity in the brush border of the rat kidney.
J. Histochem. Cytochem. 11, 447, 1963.

WACHSTEIN M., MEISEL E.M.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi.
Amer. J. clin. Path. 27, 13-23, 1957.

WACHSTEIN M., ZAK F.G.: Intracellular bile canaliculi in the rabbit liver.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 72, 234-236, 1949.

WANG K.J., GROSSMAN M.I.: Histochemical study of alkaline phosphatase in tissue prepared by the freezing-drying method.
Anat. Rec. 104, 79-87, 1949.

WATERHOUSE D.F.: Histochemical detection of barium and strontium.
Nature /Lond./ 167, 358, 1951.

WEGMANN R.: Discussió megjegyzés.
New trends in basic lymphology.
Symposium Charleroi. 1966. Experientia suppl. 14, 169, 1967.

YOKOYAMA H.O., STOWELL R.E., MATHEWS R.M.: Evaluation of histochemical phosphatase techniques.
Anat. Rec. 109, 139-159, 1951.

