ДОСЛІДЖЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ МІКРОФОТОМЕТРІЇ РАДІОАВТОГРАФІВ

В. І. Малюк, Л. М. Ліберман

Інститут геронтології АМН СРСР; Інститут зоології АН УРСР, Київ

Нами раніше [8] були викладені принципи мікрофометричного методу в кількісній авторадіографії і показана можливість фотометрувати слідові автографи з допомогою мікрофотометра МФ-2. У цій статті викладені результати дослідження чутливості і точності методу — факторів, що визначають вибір оптимальних умов мікрофотометрії автографів. Оптимальний режим фотометрії, природно, передбачає швидкість і безпомилковість встановлення необхідної ділянки тканини, що найпростіше досягається на пофарбованому препараті. У зв'язку з цим розглянуто також умови фотометрії забарвлених автографів.

Беручи емульсію проявленого автографа у вигляді розчину, по аналогії з абсорбційним аналізом розчинів, можна ввести поняття абсолютної чутливості методу [13], під якою мають на увазі мінімальну кількість фотометрованого срібла, що виявляється при даних умовах фотометрії. Тоді чутливість методу визначають масою фотометрованого срібла m. В раніше опублікованій нашій статті було показано, що $m = \frac{1}{\kappa} \overline{D}S$, де $\overline{D}$ — середня оптична щільність автографа, S — фотометрована площа, k — інтегральний коефіцієнт ослаблення.

Порівняємо чутливість методу при фотометрії контрольних і слідових автографів за нашими і деякими літературними даними (див. таблицю).

Значення оптичних щільностей D і площ фотометрованих ділянок S для контрастних і слідових автографів

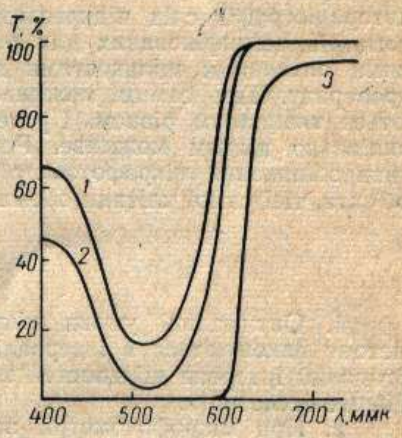
Тип автографів	Збільшення	D, в од. оптичної щільності	Середні значення D од. оптичної щільності	S, $мк^2$	Джерело даних
Контрастні	30 ×	не вказано	—	2700	(4)
	30 ×	0,2—0,8	0,3	не вказано	(7)
	не вказано	0,3—0,8	0,5	не вказано	(10)
	180 ×	0,03—1,5	0,4	200	(14)
	не вказано	0,1—0,7	0,4	не вказано	(15)
Слідові	140×	0,005—0,03	0,02	500	(9)

На підставі значень D і S таблиці були обчислені показники чутливості m. Підрахунки дозволили зробити висновок, що при фотометрії слідових автографів чутливість методу на порядок вища, ніж при фотометрії контрастних за однакових збільшень і на 1,5—2 порядки вища, коли їх досліджують при малих збільшеннях.

Відносна помилка вимірювання m на два порядки вища при фотометрії слідових автографів. Цей висновок не можна вважати несподіваним; беручи до уваги величини оптичних щільностей, він вимагає великої кількості вимірювань для досягнення заданої точності досліду. Водночас, хоч вимірювання низьких оптичних щільностей і пов'язані з відомим збільшенням випадкових помилок, інформація, одержана з допомогою цього методу на слідових автографах, може мати як самостійне значення, так і використовуватися для вирішення питання про доцільність додаткового аналізу того самого матеріалу (тих же автографів) більш трудомісткою методикою візуального підрахування зернин.

Для методу мікрофотометрії автографів досягнення оптимальних умов можливе лише з деякою втратою чутливості внаслідок збільшення щільності до таких показників, яким відповідають неістотні похибки. Порівняння результатів фотометрії контрастних і слідових автографів показує, що ці умови мають виконуватися при величинах відносних помилок $\frac{\Delta\bar{D}}{\bar{D}}$, які не перевищують 10% і спостерігаються при $\bar{D} \geqslant 0{,}02$. Збереження достатньої чутливості методу і ефективної розрішальної здатності автографа можливе при середніх щільностях близько 0,1.

Правильне визначення тривалості експозиції емульсії над препаратом пов'язане з цілим рядом труднощів, зумовлених гетерогенним розподілом ізотопу, в тканинах, тривалістю його циркуляції в організмі, відмінністю характеристик ядерних емульсій тощо. Окремі спроби, здійснені для визначення точних критеріїв тривалості експозиції [3], не привели до бажаних результатів. На практиці необхідну експозицію доводиться визначати на підставі емпіричної візуальної оцінки пробних препаратів, які готують додатково до основної серії і проявляють почережно з невеликими інтервалами [6, 14, 15, 16]. Можна твердити, що розглянуті характеристики оптимального режиму мікрофотометрії дозволяють здійснювати вибір найбільш ефективних експозицій за об'єктивною оцінкою оптичної щільності автографа.



Спектри пропускання (по вертикалі) 0,01%-ного (*1*) і 0,05%-ного (*2*) водних розчинів азорубіну *C* в 5%-ному водному розчині сірчанокислого алюмінію ($d = 1$ *см*) і світлофільтра *RG* = 2 (*3*).

Визначення оптимальних умов методу припускає виключення систематичних помилок. Систематична помилка $I_р$, зумовлена світлорозсіянням на оптиці мікрофотометра, враховується з допомогою відомого прийому [8]. Її величина автоматично виключається зміщенням нуля відліку на величину $I_р$. Звичайно вимірювання світлових потоків при мікрофотометрії автографів здійснюється скануванням не по фону (контрольна ділянка препарату), а по його вільному місцю, де відсутнє належне тканинне середовище. Систематичної помилки, яка виникає при цьому, легко уникнути, вимірявши пропускання фону. Для цього слід нанести емульсію на серію зрізів досліджуваного органа та зафіксувати її, не проявляючи; після цього заключити. З урахуванням цієї помилки середнє пропускання автографа $T = \frac{T_1}{T_ф}$ [1, 2], де T_1 — пропускання автографа щодо вільної ділянки препарату, $T_ф$ — пропускання фону.

Пофарбований автограф — це двокомпонентна система, одним компонентом якої є зерна відновленого срібла, а другим — комплекс, утворений барвником з тканинним середовищем. Відомо, що колоїдні розчини деяких металів, у тому числі й срібла, виявляють різко виражене вибіркове поглинання у видимій частині спектра. Зі збільшенням розмірів частинок d значення коефіцієнта поглинання ($k_п$) зменшується, максимум поглинання розширюється і змішується в бік більшої довжини хвиль λ. При близьких значеннях d і λ поглинання стає малоселективним [10]. Слабка залежність $k_п$ від λ в даному методі взагалі неістотна, оскільки вимірювання здійснюються за ідентичних умов. Ця обставина дозволяє фотометрувати перший компонент пофарбованого автографа (зерна відновленого срібла) як в інтегральному, так і в фільтрованому світлі. Тканинне середовище пофарбованого автографа є домішкою, від поглинання якої можна звільнитися з допомогою світлофільтра. Вибір барвника, який у даному методі необхідний лише для виявлення досліджуваної ділянки препарату, а також відповідного світлофільтра, визначається відносною чутливістю методу.

Відносна (концентраційна) чутливість методу фотометрії матиме максимальне значення при фотометрії у червоній області видимої ділянки спектра (600—750 *ммк*), що випливає із графіка розподілу енергії у спектрі випромінювання лампи розжарювання і спектральної чутливості селенового фотоелемента.

Тому оптимальні умови фотометрії забарвлених автографів будуть додержані при використанні барвників і світлофільтрів, прозорих у згаданій області спектра.

Для дослідження автографів можна використати, наприклад, азорубін *C* і світлофільтр *RG*-2 (НДР), характеристики яких показані на рисунку. Як видно з графіків, поглинання барвника в даних концентраціях практично неістотне в області пропускання світлофільтра. Проте, в препараті концентрація барвника може досягати

таких значень, при яких його пропускання стає менше 100%. У цих випадках поглинання зв'язаного барвника можна уникнути, вимірявши пропускання забарвленого тканинного середовища (контроль).

Світлофільтр слід встановити перед світлоприймачем. Чутливість приладу можна підвищити кількома шляхами: 1) з допомогою фотоелектрооптичного підсилювача [5], 2) заміною фотоелемента на фотопомножувач або вакуумний фотоелемент з дальшим підсиленням, 3) використанням вихідного приладу високої чутливості.

Підсумовуючи результати проведеного дослідження, слід відзначити, що метод мікрофотометрії при правильному його проведенні може з успіхом використовуватися в кількісній авторадіографії. Об'єктивність, достатня чутливість і точність мікрофотометрії, забезпечувана нею висока швидкість одержання інформації — це основні переваги запропонованого методу перед візуальним підрахуванням зернин при аналізі вмісту радіоактивних індикаторів у тканині.

Критично оцінюючи можливості мікрофотометрії як одного з методів кількісної авторадіографії слід підкреслити головний її недолік. Чутливість серійних мікрофотометрів, модифікованих для роботи з автографами, навіть на об'єктах з оптимальними оптичними щільностями дозволяє фотометрувати лише відносно великі площі препарату. Тим самим можливості мікрофотометричного дослідження поки обмежуються тканинним рівнем. Проте поширення цього методу на клітинний рівень принципіально цілком можливе. Розв'язання цього завдання відкриває широкі перспективи зближення мікрофотометрії з цитофотометрією і надалі — вивчення того самого об'єкта, тієї самої клітини обома методами.

Висновки

1. Оптимальні умови мікрофотометрії автографів щодо чутливості і точності методу виконуються в інтервалі середніх оптичних щільностей від 0,02 до 0,1 од. *D*. Згаданий інтервал щільностей може служити об'єктивним критерієм визначення радіаційних експозицій.

2. При мікрофотометрії забарвлених автографів вибір барвника і відповідного світлофільтра визначається необхідністю досягнення максимальної відносної чутливості методу.

Література

1. Агроскин Л. С.— Цитология, 1965, 7, 265.
2. Агроскин Л. С., Бродский В. Я., Груздев А. Д., Королев Н. В.— Цитология, 1960, 3, 337.
3. Бойд Дж. А.— Авторадиография в биол. и мед., М., 1957.
4. Грачева Н. Д., Лыкова Г. С., Фунштейн Л. Ф., Щербань Э. И.— Пособие по гистоавтографии, Л., 1960.
5. Грибанов В. А., Черняховский Ф. П.— Приборы и техн. экспер., 1964, 6, 119.
6. Жинкин Л. Н.— В кн.: Радиоактивные индикаторы в гистологии, Л., 1959, 68.
7. Зайдель А. Н.— Основы спектрального анализа, М., 1965.
8. Малюк В. И., Либерман Л. Н.— Цитология и генетика, 1967, 1, 4, 37.
9. Перумова Н. Д.— ДАН СССР, 1956, 107, 1, 171.
10. Савостьянова М. В.— Успехи физич. наук, 1939, 22, 1.
11. Шишловский А. А.— Прикладная физич. оптика, М., 1961.
12. Belager L.— J. Histochem. and Cytochem., 1958, 6, 146.
13. Boström H., Odeblad E. Friberg H.— Arch. Biochem., Biophys., 1952, 38, 283.
14. Gross J., Bogoroch R., Nadler N., Leblond C.— Am. J. Roentgenol., 1951, 65, 420.
15. Harbens E.— In: Handbuch der Histochemie, Stuttgart, 1958, 1, 400.
16. Léblond C., Copriva B., Messier B.— In: Histochemistry and Cytochemistry. Proc. 1 st. Intern. Congr., L.— N. Y.— Paris, 1963, 1.

Надійшла до редакції
17.VIII 1968 р.