

신장 조직내 납에 대한 Timm sulphide silver method의 적용

김승필 김영호

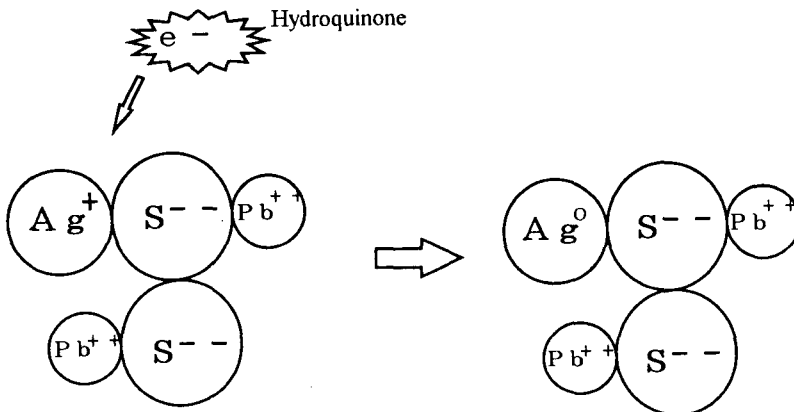
계명대학교 의과대학 중앙전자현미경실

1.서론

납은 산업장에서 흔히 쓰이는 중금속으로 용도가 다양해짐에 따라 일상생활에서 날이 갈수록 많이 취급하게 되었고 인체 흡수의 기회가 많아져 각종 질환뿐만 아니라 잔류로 인한 지속적인 장애를 유발함으로써 납화합물은 큰 공해물질의 하나로서 문제시 되고 있다.

1958년 Timm에 의해 조직내 중금속의 검출이 용이해지면서 많은 연구가진 행되었고 그 방법도 발전되어 왔다. 조직중의 납을 증명하는법은 Vandeputte (1990), Russo(1988)등이 실험했고 Timm의 변법이 계속 연구되어 왔지만 납을 조직중에서 확실하게 볼 수는 없을가 라는 의문은 계속되었다.이제 소개하고자 하는것은 조직에 축적되어 있는 납을 sulphide silver method로 증명 하는 것이다.

sodium sulphide로 관류 또는 조직을 침지하여 조직내의 납이 황과 결합한 화합물로 변화하고 여기에 현상액 중에 포함되어 있는 은이온이 배위결합의 형태로 부착되게 되는데 hydroquinone이 전자를 공급함으로써 비로소 가시화 되는 것이다.



Timm sulphide silver reaction

2. 실험방법

1) Perfusion of material for epon embedding

5ml의 0.1% sodium sulphide/0.15M phosphate buffer(pH 7.4)를 복대동맥을 통해 관류하고 2.5%glutaraldehyde/phosphate buffer를 3분동안 관을 통해 흘리고 0.1% sodium sulphide 용액을 250ml/7분의 속도로 관류시킨다. 신장을 적출하여 1-2mm의 두께로 잘라 2.5% glutaraldehyde에 1시간 고정하고 0.15M phosphate buffer 로 수세하고 탈수과정을 거쳐 epon embedding을 하는데 45°C이하에서 48-72시간 동안 열중합 시킨다. 0.5% gelatin으로 coating된 slide에 후박절한 절편을 올리고 건조시킨 다음 gelatin coating하여 현상과정을 거쳐 적당한 부위를 초박절하여 nickel grid에 올려 현상을 한다.

2) Immersion technique for biopsy

통상적인 시료 제작과정을 거쳐 45°C에 열중합된 epon block을 초박절하여 nickel grid에 올리고 0.5% sodium sulphide 용액에 10분간 침지하여 충분히 수세하고 현상 과정을 거친다.

3) 현상액

A. Crystalline gum arabic 1 kg을 2L의 deionized water에 녹임. 5일 후 gauze로 filter (냉동시키면 6개월 사용 가능함).

B. Citrate buffer: 25.5 g의 citric acid H₂O + 23.5 g sodium citrate 2H₂O/D.W 100 ml

C. Reducing Agent: 0.85 g hydroquinone/15 ml D.W

D. Silver ion supply: 0.11 g의 silver lactate/15 ml D.W (어두운 곳에 보관)

현상준비: A 60 ml, B 10 ml, C 15 ml, D 15 ml

(A,B,C는 섞고 D는 사용직전에 첨가)

4) Development(현상)

A. 후박절

암실에서 slide를 놓고 위에 현상액을 덮어서 실온에서 30~60분현상

B. 초박절편은 gelatin coating slide에 현상액을 방울 방울 놓고 nickel grid를 방울안에 넣는다. 실온에서 30~60분간 시행한다.

현상 후 A는 40°C running tap water에 45분 (gelatin제거) 후 D.W로 씻고 Toluidine blue로 대조 염색한 후 검경. B는 D.W로 충분히 씻고 이중전자염색을 한다음 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

5) 주의

전체과정에서 osmium tetroxide는 쓰지않는다.

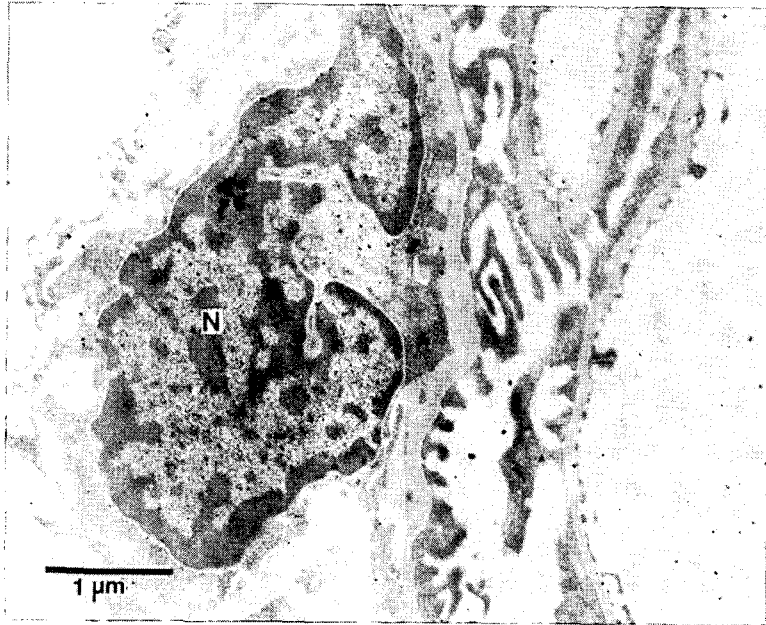
Brain과 같은 연한조직은 Formvar등 지지막을 쓴다.

관류시 혈액을 완전히 제거하지 않으면 반응이 잘 일어나지 않는다.

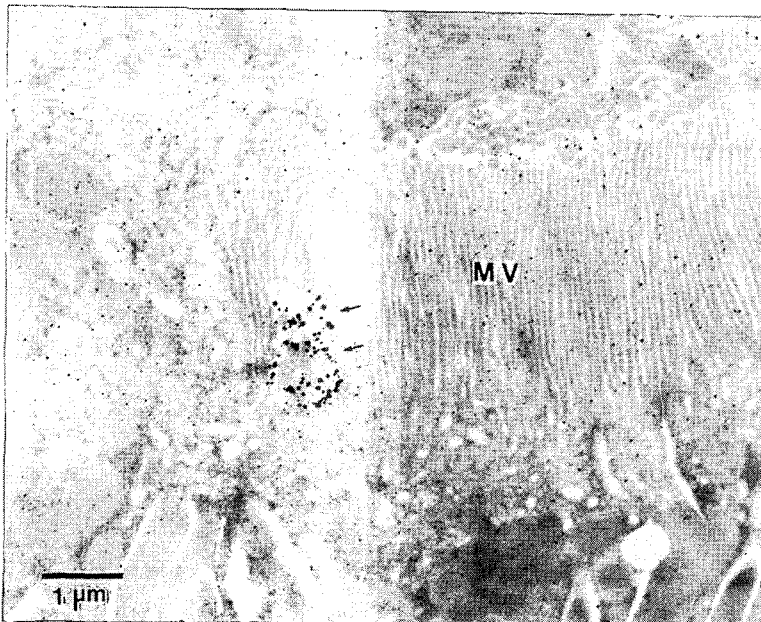
현상액 제조시 빛에 노출이 심하면 안된다.

5시간 이상 고정하거나 60°C이상에서 열중합하면 silver 염색력 저하된다.

대부분의 중금속 실험에 이용가능 (Cu,Fe,Zn,Co,Ni,Hg,Cd,Pb,As,Bi,Tl,Au,Ag 등:Hemoglobin이나 mitochondria의 cytochrome에 있는 Fe는 반응하지 않는다. 화학적인 결합이나 공간배치가 sulphide 이온이 금속과 반응하는 것을 방해하기 때문이다)



Eight weeks after oral administration of lead acetate. Many lead particles are found in the nucleus. N:nucleus



Eight weeks after oral administration of lead acetate. A lump of lead granules without membrane-bounded(arrows) is seen between the microvilli (MV) of the proximal tubular cells