

for intracellular recording by a number of authors⁵⁻⁷. Electrodes with resistance under $5 M\Omega$ have very wide tips and are not normally used for that purpose, due to electrophysiological evidence of cell damage.

Electrophysiological properties of embryonic chick heart cells *in vitro* were studied, using electrodes prepared as described here, and it was verified that they caused no significant damage to the cells⁸.

The present findings are in good agreement with the notion that avoiding heating under 40°C preserves better the electrodes during the filling procedure^{4,9}. However, when selection is made according to the resistance, the boiling method also yields adequate electrodes.

It is concluded that the usual selection of microelectrodes based on DC resistance measurements gives reliable information about adequacy of the recording device, regardless of the filling procedure. This statement is not likely to be exact if geometry and wall thickness of the tips are variable. These factors, however, tend to be similar when manufacturing procedure and materials are standardized.

Résumé. Une méthode pour vider et examiner des microélectrodes de verre au microscope électronique est décrite. On a trouvé une corrélation entre le diamètre

du bout et la résistance électrique. Le diamètre de l'extrémité des électrodes dépend du procédé de remplissage et les meilleurs résultats sont obtenus par la méthode de TASAKI modifiée.

G. M. OLIVEIRA CASTRO¹¹ and R. D. MACHADO

*Instituto de Biofísica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brazil),
23 August 1968.*

⁵ W. L. NASTUK and A. L. HODGKIN, *J. Cell. comp. Physiol.* **35**, 39 (1950).

⁶ S. WEIDMANN, *J. Physiol.* **118**, 348 (1952).

⁷ R. H. ADRIAN, *J. Physiol.* **133**, 631 (1956).

⁸ G. M. OLIVEIRA-CASTRO, *Aspectos fisiológicos de células cardíacas embrionárias in vitro*, D. Sc. Thesis, Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (1968).

⁹ K. FRANCK and M. C. BECKER, in *Physical Techniques in Biological Research* (Academic Press, New York 1964), vol. 5, chapter 2.

¹⁰ The authors wish to thank Dr. A. PAES DE CARVALHO and Dr. C. E. CHALLICE for their helpful criticism of the manuscript.

¹¹ Present address: Department of Physiology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, 630 West 168 Street, New York, N.Y. 10032, USA.

Détermination quantitative de la radioactivité sur coupes autoradiographiques

Une méthode assez couramment employée pour obtenir des données quantitatives en partant des sections autoradiographiques faites sur l'animal entier consiste dans la mesure du noircissement du film par un microdensimètre, suivie d'une comparaison avec un standard¹⁻³.

Dans le cas où une mesure quantitative plus précise est nécessaire, il est préférable de mesurer la radioactivité de la source même⁴. Dans des travaux précédents, d'ULLBERG par exemple, on cite l'emploi du compteur GM sans fenêtre ou à fenêtre mince pour la mesure directe des portions coupées en partant des sections autoradiographiques⁵.

Dans cette communication, nous désirons décrire une méthode quantitative de mesure de la radioactivité en partant des sections autoradiographiques et faire quelques considérations sur les problèmes qui y sont liés.

Méthode. On coupe les portions des sections autoradiographiques, dont on veut faire la détermination quantitative, avec un bistouri et à l'aide d'un binoculaire stéréoscopique capable d'un agrandissement à 50 (Wild M5 4888).

On introduit les portions coupées dans des flacons de scintillation et on les solubilise avec de l'hydroxyde de hyamine (1 M dans le méthanol) ou avec d'autres produits ayant la capacité de solubiliser les tissus, tels que, par exemple, le «Nuclear Chicago Solubiliser» (NCS) (0,6N dans le toluène). La quantité de hyamine ou de NCS capable de solubiliser dans un temps relativement court (quelques dizaines de minutes) 1 cm² de coupe de l'épaisseur de 30 μ est d'environ 0,3 ml.

Une fois les portions autoradiographiques solubilisées, on ajoute le liquide scintillant (20 ml de toluène + PPO + POPOP), on mesure la radioactivité (appareil Beckman LS-200 B) et on corrige enfin le «quenching» avec la méthode du standard externe. Dans la Figure 1 on peut observer la dépendance de l'efficacité du comptage de la

quantité d'hyamine ajoutée, c'est-à-dire de la surface de coupe à solubiliser.

Le ruban adhésif transparent employé comme support des coupes, qui ne se solubilise pas, a une influence presque nulle sur l'efficacité du comptage en scintillation liquide. Si on ajoute dans un flacon de scintillation contenant un standard d'activité connue jusqu'à 20 cm² de ruban adhésif transparent, on a des variations de comptage qui

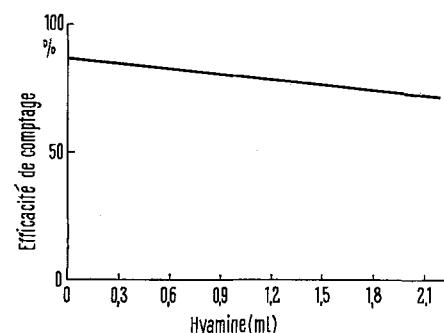


Fig. 1. Efficacité de comptage en fonction de la quantité d'hyamine ajoutée.

¹ A. W. ROGERS, *Techniques of Autoradiography* (Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1967), p. 314.

² S. ULLBERG, *Biochem. Pharmacol.* **9**, 29 (1962).

³ L. HAMMARSTRÖM et S. ULLBERG, *Nature* **212**, 708 (1966).

⁴ S. ULLBERG, Proc. Second U.N. Int. Conf. Peaceful Uses At. Energy, Geneva, **24**, 248 (1958).

⁵ R. SÖREMARK et S. ULLBERG, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* **8**, 192 (1960).

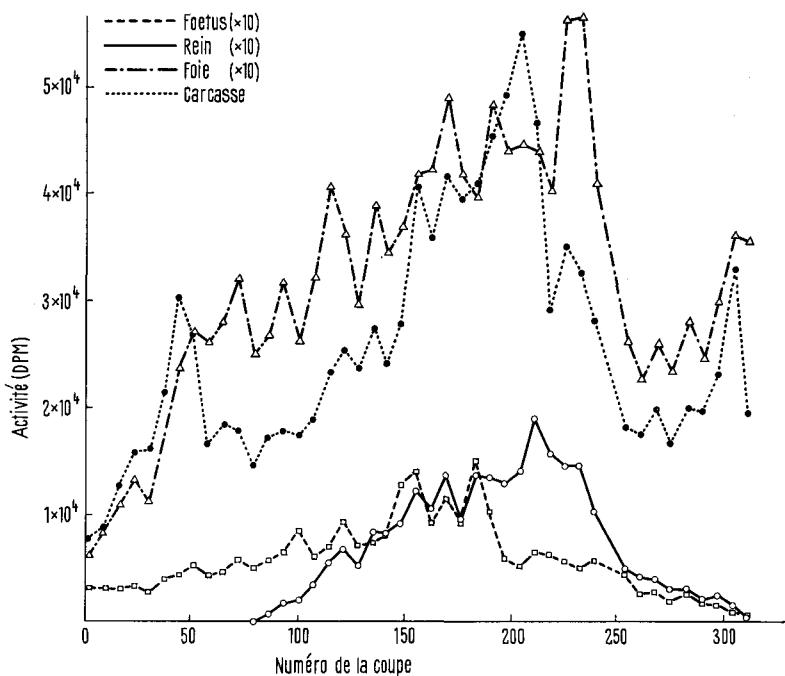


Fig. 2. Distribution de la radioactivité en fonction du numéro de la coupe.

ne dépassent pas le 1%. Pour 30 cm^2 de ruban adhésif, la diminution du comptage est de l'ordre de 1-2%, mais il faut observer que les surfaces des coupes sont en général inférieures à cette valeur.

Exemple d'application de la méthode décrite. La méthode décrite a été employée pour la détermination quantitative de la radioactivité dans les principaux organes et dans les foetus de coupes d'une souris gestante, sacrifiée une heure après administration par voie orale de $18,5 \mu\text{C}$ d'un médicament marqué au C^{14} . Dans la Figure 2 on observe, en abscisse, le numéro de la coupe de l'animal et, en ordonnée, la radioactivité correspondante, telle qu'on l'obtient avec la technique décrite dans le paragraphe 2. Il faut noter que toutes les coupes faites sont reportées en abscisse, mais que la radioactivité a été mesurée sur un certain nombre d'entre eux seulement. Les sections reportées sur le graphique correspondent globalement à une épaisseur de 1 cm. Elles ont été coupées sur une souris d'une épaisseur de 3,78 cm, dans la zone comprise entre 0,54 et 1,54 cm, à partir du côté droit.

On peut observer la courbe correspondant à un rein, à un foetus, au foie et au restant de la coupe, après prélevement de ces trois organes. Dans le cas où l'on veut, pour un organe, connaître non seulement la radioactivité relative à une section, mais sa radioactivité globale, on peut procéder à une intégration, par exemple par trapèzes, de la courbe correspondant à cet organe. Dans le cas particulier, on a déterminé la radioactivité au niveau d'un foetus, pour savoir quel pourcentage de la radioactivité administrée s'y est localisée. On a trouvé un pourcentage de 0,4%.

Discussion. La méthode décrite pour des déterminations quantitatives à partir des sections autoradiographiques contenant C^{14} , H^3 , S^{35} , etc. présente, par rapport à des méthodes telles que l'emploi du compteur GM, tous les avantages que la scintillation liquide offre dans le comptage des émetteurs β faibles⁶. La précision globale de la méthode est essentiellement déterminée par des variations dans l'épaisseur des coupes (variations estimées $\pm 1 \mu$ pour le microtome employé: microtome à glissières Jung Hn40) et par la précision subjective avec laquelle

l'expérimentateur coupe sous le binoculaire les organes des sections autoradiographiques respectives.

La mesure de la radioactivité en elle-même, compte tenu de la correction du «quenching» apportée, introduit de faibles erreurs, et en tous cas facilement déterminables. La méthode décrite peut être utilisée non seulement pour l'évaluation quantitative de la distribution de la radioactivité sur chaque coupe, mais aussi pour la détermination de l'activité totale retrouvée dans les différents organes. La précision globale de la mesure de distribution de la radioactivité dans chaque coupe peut être évaluée en observant les fluctuations de la radioactivité retrouvées dans des coupes successives (Figure 2).

Toutefois, la précision sur la valeur de la radioactivité totale retrouvée dans les différents organes est sensiblement meilleure, à cause de la compensation partielle des erreurs expérimentales qui s'est produite pendant le processus d'intégration numérique. Par conséquent la méthode décrite s'avère particulièrement satisfaisante lorsqu'on veut établir un bilan de la répartition du médicament, en même temps que l'on effectue sur les coupes autoradiographiques une étude détaillée de la localisation du médicament⁷.

Summary. A method for the quantitative determination of radioactivity on autoradiographic sections by using the liquid scintillation counting technique is described.

M. STROLIN-BENEDETTI

*Laboratoire du Métabolisme des Médicaments,
Ecole de Médecine de l'Université,
Genève (Suisse), 9 décembre 1968.*

⁶ M. STROLIN-BENEDETTI, Communication présentée au «1° Corso sulle applicazioni della scintillazione in fase liquida alla ricerca medico-biologica», Istituto «Mario Negri», Milano, février (1968).

⁷ L'auteur est reconnaissant au Professeur B. GLASSON, directeur du laboratoire où ce travail a été effectué, et remercie Mlle J. HEYMANN pour son assistance technique.