

Eine Methode zur autoradiographischen Darstellung hydrophiler Substanzen in biologischem Material

GOTTFRIED WERNER, HELGA WERNER, PEDRO G. BOSQUE und JOSÉ CARRERES QUEVEDO

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie
(Leiter: Priv.-Doz. Dipl.-Chem. Dr. G. WERNER) Frankfurt/Main

Frau E. PATZIG in Verehrung und Dankbarkeit gewidmet

(Z. Naturforsch. 21 b, 238—242 [1966]; eingegangen am 15. Oktober 1965)

Mit der beschriebenen autoradiographischen Methode lassen sich auch niedermolekulare hydrophile Substanzen, die mit Radioisotopen markiert sind, darstellen. Einige Beispiele zeigen die Leistungsfähigkeit des Verfahrens.

Für den autoradiographischen Nachweis von Radioisotopen-markierten Substanzen, die in wasserunlöslicher Form auf bestimmte Organstrukturen verteilt sind, eignen sich die beschriebenen Methoden (Lit. s. l. c.¹) ausgezeichnet. Diese gebräuchlichen Verfahren versagen aber, wenn die inkorporierten markierten Stoffe wasserlöslich in Geweben vorliegen, und dann infolge der Anwendung hydrophiler Lösungsmittel während der Anfertigung und Präparation histologischer Organschnitte im Gewebe disloziert oder von dort sogar herausgelöst werden.

Wir haben uns seit mehreren Jahren mit diesem Problem des autoradiographischen Nachweises kleiner hydrophiler Moleküle beschäftigt²⁻⁶ und möchten im folgenden unsere Methode beschreiben, mit der es nun möglich ist, auch niedermolekulare wasserlösliche Radioisotopen-markierte Stoffe in Gewebeschnitten nachzuweisen und bestimmten Strukturelementen zuzuordnen. Es sollen auch einige Beispiele für die Leistungsfähigkeit des beschriebenen Verfahrens gegeben werden.

Material und Methodik

Folgende Tritium-markierte Substanzen fanden Verwendung:

Atropin-T: polytop-markiert mit Tritium. Eigene Herstellung oder von Fa. The Radiochemical Centre, Amersham/England.

γ-Amino-buttersäure-[α,β-T]: in α- und β-Stellung mit Tritium markiert. Hersteller: Institut für Med. Isotopenforschung der Universität Köln.

Glutaminsäure-[β,γ-T]: in β- und γ-Stellung mit Tritium markiert. Hersteller: Institut für Med. Isotopenforschung der Universität Köln.

Serotonin-T: HOC₈NHC₂T₄NH₂. Hersteller: Fa. Volk, Skokie/Chicago/Ill./USA.

5-Hydroxy-tryptophan-T: polytop-markiert. Hersteller: The Radiochemical Centre, Amersham/England.

Di-isopropyl-fluor-phosphat-T (DFP): [(CT₃)₂CHO]₂F·P:O. Hersteller: Fa. New England Nuclear Corp., Boston/USA.

Für die Vorbereitung des tierischen Organ-Materials zur autoradiographischen Exposition haben wir sowohl die „Gefriertrocknungs-Methode“ (GT-Methode) als auch die „Gefrierschnitt-Methode“⁷ (GS-Methode) mit speziellen Varianten angewendet.

Gefriertrocknungs-Methode

Dem Tier wurde der Isotopen-markierte Stoff appliziert, nach Tötung die Organe entnommen und kleine Anteile dieser in Isopentan von -160°C gebracht, das bei dieser Temperatur zähflüssig ist. Hierauf übertragen wir die gefrorenen Organteile in auf -30 bis -40°C gekühlte Glasröhrchen, in denen sich im Vakuum entgastetes Paraffin befand. Die Röhrchen wurden nun an eine Vakuum-Glasapparatur angeschlossen, sofort evakuiert (10^{-3} Torr) und 3–4 Tage (je nach Größe der Organstücke) unter dauerndem Evakuieren darin belassen. Die Temperatur des Bades, in das die Röhrchen eintauchten, erhöhten wir von anfänglich -30°C allmählich bis auf Zimmertemperatur am

¹ A. G. E. PEARSE, *Histochemistry Theoretical and Applied*, S. 741 u. 953, I. & A. Churchill, Ltd., London 1961.

² G. WERNER, Sixth Int. Congress of Biochemistry, New-York 1964; Abstracts S. 458.

³ P. G. BOSQUE u. G. WERNER, Second Int. Congress of Histo- and Cytochemistry, Frankfurt/Main 1964, S. 188–189; Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

⁴ G. WERNER, P. G. BOSQUE u. J. CARRERES QUEVEDO, C. R. assoc. anatom. [Nancy], 1964, Madrid, S. 1869.

⁵ G. WERNER, P. G. BOSQUE u. J. CARRERES QUEVEDO, C. R. assoc. anatom. [Nancy], 1964, Madrid, S. 1871.

⁶ G. WERNER, P. G. BOSQUE u. J. CARRERES QUEVEDO, Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol. Biol. [1965], im Druck.

⁷ R. TAUGNER, H. HOLE, G. GRIGOLEIT u. U. WAGENMANN, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. 234, 330 [1958].

4. Tage. Sodann wurde das Paraffin in den Röhren durch Eintauchen in ein Wasserbad zum Schmelzen gebracht. Die trockenen Organstückchen sinken nun in das Paraffin ein und werden eine halbe Stde. bei 65 °C darin belassen, dann ausgegossen und nach dem Erstarren die Paraffinblöcke mit dem Mikrotom geschnitten.

Die Paraffinschnitte (Dicke ca. 15 μm) werden auf Objektträger gebracht, die mit Chromalaun-Gelatine präpariert worden waren, und mit einer Teflon-Platte fest angedrückt. Hierauf bleiben die Schnitte einige Zeit auf dem Strecktisch (37 °C) und werden entweder sofort mit der Photoemulsion in Kontakt gebracht oder vorher auf folgende Weise mit absolutem Xylol entparaffiniert:

Das Lösungsmittel wird mehrmals auf den Schnitt getropft* und mit einer Glas- oder Kunststoff-Kapillare, an der das Vakuum einer Wasserstrahlpumpe gelegt ist, jeweils wieder abgesaugt. Diese Entparaffinierung sollte unter einem gut belüfteten Abzug vorgenommen werden. Die entparaffinierten trockenen Schnitte, die sehr brüchig sind, werden nun bis zum Bedecken mit der Photoemulsion erschütterungsfrei in üblichen Objektträgerkästen (möglichst aus Kunststoff) aufbewahrt. Am zweckmäßigsten ist es jedoch, wenn nach dem Entparaffinieren die Schnitte sofort mit der Photoemulsion überdeckt werden, um Aufnahme von Wasser aus der Luft auszuschließen.

Gefrierschnitt-Methode

Die entnommenen Organe werden — in bestimmten Fällen nach vorherigem Einfrieren in Isopentan bei -160 °C — mit Hilfe von CO₂-Schnee auf Gefrier-Tische (Kryostat-System Dittes-Duspiva) aufgefroren und sodann in einem verschweißten Polyäthylen-Beutel, der vor dem Austrocknen schützen soll, mehrere Stdn. im Kryostaten bei -30 °C aufbewahrt.

Schnitte von ca. 12 μm Dicke werden in üblicher Weise im Kryostaten (-30 °C) hergestellt und dort auf vorgekühlte Objektträger gebracht. Gestreckt und befestigt werden eventuell die Gefrierschnitte dadurch, daß man mit einem angepreßten Finger den Objektträger auf einige Grad über 0° bringt und so den Schnitt kurz „antaut“**; er liegt jetzt dem Objektträger plan auf und haftet dadurch dort auch gut. Versuche mit Hexan-Paraffin den Schnitt zu strecken⁸, brachten keine besseren Ergebnisse.

Erforderlich ist es jedoch, daß die Luft im Kryostaten möglichst trocken ist und auch während des Schnei-

dens bleibt. Es ist zu vermeiden, daß durch die Arm-durchführungen des Kryostaten warme Außenluft eindringt (Polsterung der Arme durch Schaumgummi), da sich dadurch Wasserdampf auf den Schnitten kondensieren könnte, wodurch Ortsverlagerungen wasserlöslicher Substanzen möglich wären.

Die Schnitte werden nun mehrere Stdn. im Kryostaten aufbewahrt, damit sie möglichst trocken werden. Das Herausnehmen aus dem Kryostaten sollte so geschehen, daß die Objektträger an jener Stelle, an der der Schnitt haftet, mit einem Finger oder einer kleinen Heizbank auf Zimmertemperatur gebracht werden. Durch diese Maßnahme soll vermieden werden, daß bei dem Herausnehmen aus dem Kryostaten Kondenswasser auf dem Organschnitt sich bilden kann.

Herstellung der Photoemulsions-Schichten

Wir verwendeten für unsere autoradiographische Darstellung die Photoemulsion Ilford G 5. Diese wurde vor dem Ausstreichen mit dest. Wasser 1:1 verdünnt und mit Hilfe eines Thermostaten bei 45 °C gehalten. Für das Ausstreichen der Photoemulsion benutzten wir PVC-Platten, auf die wir 2 cm breite und 20 cm lange Streifen einer mit Haftstoff präparierten Filmunterlage*** aufbrachten und entlang der Ränder mit Tesafilm festklebten. Nun wird auf die erste Bahn der Filmunterlage ein Tropfen der auf 45 °C erwärmten Emulsion gebracht und diese sofort mit Hilfe der abgerundeten schmalen Kante eines Objektträgers gleichmäßig ausgestrichen. Nach einiger Übung ist die „Ausbeute“ an gleichmäßig beschichteten Folien befriedigend. Nach dem Trocknen werden die vom Tesafilm befreiten Folien in ca. 2·2 cm große Stücke geschnitten und die inhomogen beschichteten Stücke verworfen.

Autoradiographische Exposition

Die mit Emulsion bedeckten, möglichst trockenen⁺ Filmplättchen werden mit der Schichtseite auf die auf Objektträgern befindlichen Organschnitte gelegt, mit einem zweiten ca. 4 cm kürzeren Objektträger bedeckt und sodann mit einer Klammer zusammengepreßt (Abb. 1). Die Präparate verwahrt man nun, zusammen mit einem Silica-Gel-gefüllten (um Trockenheit zu gewährleisten) Leinensäckchen, in den gebräuchlichen Objektträger-Kästen. Diese werden in Licht-undurchlässige Beutel gehüllt und im Kühlschrank bei +5 °C aufbewahrt.

* Es ist zu vermeiden, daß das Xylol sich auf dem gesamten Objektträger ausbreitet und so eventuell eine radioaktive Verseuchung des Objektträgers verursacht, wenn lipophile Substanzen in Lösung gegangen sein sollten.

** Es überraschte, daß durch das kurzzeitige „Antauen“ der Schnitte meist keine Dislokationen verursacht wurden, da anscheinend die Zellpermeabilität nicht wesentlich geschädigt worden war. Befindet sich die markierte Substanz jedoch extracellulär, z. B. im Darmlumen (Abb. 3) oder den Sammelröhren der Niere (Abb. 5 a, b), so sind bei Anwendung der GS-Methode Verschmierungen zu erwarten.

⁸ R. TAUGNER u. U. WAGENMANN, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **234**, 336 [1958].

*** Zu beziehen durch: Fa. Wolfgang Brandt, 6 Frankfurt/Main, Schäfergasse 20.

⁺ Es empfiehlt sich, sowohl den Emulsions-beschichteten Film als auch die Organschnitte vor dem Zusammenpressen in einem Trockenschrank mit möglichst niedriger Luftfeuchtigkeit (ca. 10% relativ) aufzubewahren und auch die Luft im Arbeitsraum mit einem Entfeuchtungsgerät zu trocknen bis auf ca. 30% rel. Feuchtigkeitsgehalt.

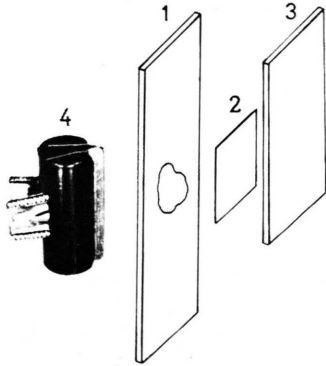


Abb. 1. Komponenten und Anordnung der autoradiographischen Exposition. 1: Objektträger mit Organschnitt; 2: Folie mit Photoemulsion bestrichen; 3: Kurzer Objektträger; 4: Klammer.

Abb. 3 a, b. Autoradiogramm (a) und HE-gefärbter GT-Schnitt * , (b) vom Dünndarm einer Maus nach i.p.-Injektion einer wäßrigen Lösung von 1 mg polytop-markiertem Atropin-sulfat-T ($400 \mu\text{C}$); Tötung 10 Min. nach Injektion; Exposition 4 Wochen; 112 : 1. — DI = Darminhalt; LK = Lieberkühn'sche Krypten; L = Zentrales Lymphgefäß. * Alle nach der GT-Methode hergestellten Organschnitte dieser Untersuchung (Abb. 3 bis 9) wurden vor der autoradiographischen Exposition oder der histologischen Färbung mit absol. Xylol entparaffiniert.

Abb. 4 a, b. Autoradiogramm (a) und HE-gefärbter GT-Schnitt (b) des Dickdarmes einer Maus nach i.p.-Injektion einer wäßrigen Lösung von 0,54 mg γ -Aminobuttersäure- $[\alpha, \beta\text{-T}]$ ($1360 \mu\text{C}$); Tötung 400 Min. nach Injektion; Exposition 6 Wochen; 103 : 1. — D = Schleimdrüsen-Zellen; DI = Darminhalt.

Abb. 5 a, b, c. Autoradiogramme (a, b) von GT-Nierenschnitten (c) — HE-gefärbt — der Maus nach i.p.-Injektion einer wäßrigen Lösung von 0,55 mg polytop-markiertem Atropin-sulfat-T ($220 \mu\text{C}$); Tötung 10 Min. nach Injektion; Exposition 5 Wochen; a = 15 : 1; b und c = 112 : 1. — SR = Sammelrohr; P = Papille; G = Glomerulus.

Abb. 6. Autoradiogramm der Niere (GT-Methode) einer Maus, der i.p. eine wäßrige Lösung von 0,19 mg ($1250 \mu\text{C}$) polytop-markiertem 5-Hydroxy-tryptophan-T injiziert wurde; Tötung 2 Stdn. nach der Injektion; Exposition 18 Wochen; 56 : 1. — P = Papille; R = Rinde.

Abb. 7. Autoradiogramm (GT-Methode) einer Speicheldrüse (Glandula submandibularis) der Maus nach i.v.-Injektion einer wäßrigen Lösung von 0,55 mg polytop-markiertem Atropin-sulfat-T ($220 \mu\text{C}$); Tötung 5 Min. nach Injektion; 42 : 1; Exposition 4 Wochen.

** Zu beziehen von der Fa. Wolfgang Brandt, 6 Frankfurt/Main, Schäfergasse 20 (Nr. 3298).

*** 1 l Wasser — 2,2 g Metol — 144,0 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 8,8 Hydrochinon — 130,0 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ — 4,0 g KBr.

Photographische Entwicklung der Autoradiogramme

Um zu verhindern, daß sich Wasser auf Schnitt oder Film kondensiert, müssen die bei $+5^\circ\text{C}$ gelagerten Präparatekästen zum Temperaturengleich in verpacktem Zustand einige Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, bevor die Präparate den Kästen entnommen werden.

Die vom Organschnitt wieder getrennten exponierten Filme werden in Gestelle⁺⁺ aus Edelstahl (wie sie für die Entwicklung von Zahn-Filmen Verwendung finden) eingehängt, sodann mit einem Entwickler folgender Zusammensetzung⁺⁺⁺ 4 Min. behandelt, anschließend fixiert und zunächst in fließendem Leitungswasser und danach einige Zeit in dest. Wasser gelagert. Bei der anschließenden Trocknung* muß auf Staubfreiheit geachtet werden.

Die Emulsion haftet während des Entwicklungsvorganges genügend fest auf der Unterlage; ein Ablösen wurde bei Verwendung der präparierten Filmunterlage nicht mehr beobachtet.

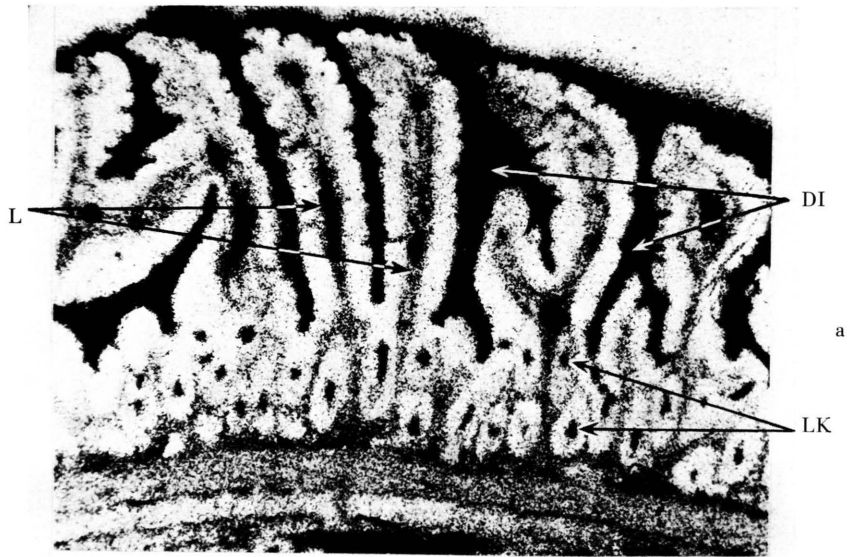
Abb. 8 a, b. Autoradiogramm (a) und GT-Schnitt (b) eines Lymphknotens vom Magen der Maus (HE-Färbung) nach i.p.-Injektion einer wäßrigen Lösung von 0,27 mg Serotonin-T (1 mC); Tötung 135 Min. nach Injektion; Exposition 17 Wochen; 41 : 1. — B = Blutgefäß; LF = Lymphfollikel; MS = Marksinus; RS = Randsinus; LMS = Lymphmarkstränge.

Abb. 9 a, b, c, d. Autoradiogramm (a, c) und GT-Schnitt (b, d) — HE gefärbt — von der Lunge einer Maus nach i.p.-Injektion von 0,06 mg ($500 \mu\text{C}$) Diäso-propyl-fluorphosphat-T (DFP-T) gelöst in Propylglykol; Tötung 20 Min. nach Injektion. Exposition 6 Wochen. — BR = Bronchien; S = Schleimhaut. Vergrößerung: a und b 41 : 1, c und d 400 : 1.

Abb. 10 a, b, c, d, e. Autoradiogramme (a, b, d) und Gefrier-Schnitt der Medulla oblongata (c, e) von der Ratte (gefärbt mit Toluidinblau) nach intrathekalen Injektion (in Chloralhydrat-Narkose) einer wäßrigen Lösung von 0,17 mg Glutaminsäure-T ($340 \mu\text{C}$); Tötung 3 Stdn. nach Injektion; Exposition 10 Wochen; a) vor Exposition in Wasser getaucht; b) vor Exposition nicht mit hydrophilen Lösungsmitteln behandelt; c) Toluidinblau-Färbung; 41 : 1; d, e) Ausschnittsvergrößerung von den Abb. 10 b und c; 143 : 1. — NO = Nuclei olivaris; A = Arterie bzw. Arteriole; G = Glia.

Abb. 11. Autoradiogramm der Medulla spinalis (Rückenmark) von der Ratte nach intrathekalen Injektion einer wäßrigen Lösung von 0,17 mg Glutaminsäure-T ($340 \mu\text{C}$); Tötung 3 Stdn. nach der Injektion; Gefrierschnitt; Exposition 10 Wochen; 56 : 1. V = Vorderhorn (Columna anterior); H = Hinterhorn (Columna posterior); C = Graue Commissur (Commissura grisea); FL = Funiculus lateralis; FP = Funiculus posterior.

* Wir benutzen dazu ein Trocken-Gerät der Fa. Kindermann & Co. GmbH., Ochsenfurt/Main.



Abbn. 3 a und b

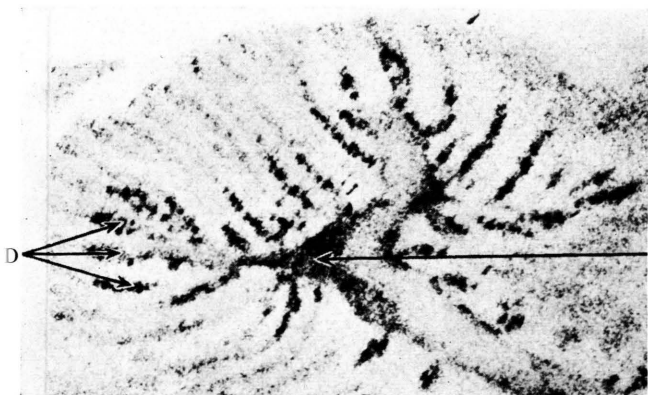


Abb. 4 a



Abb. 4 b

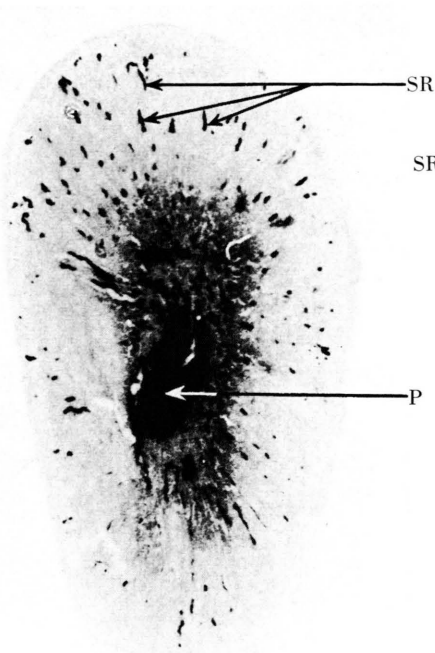


Abb. 5 a

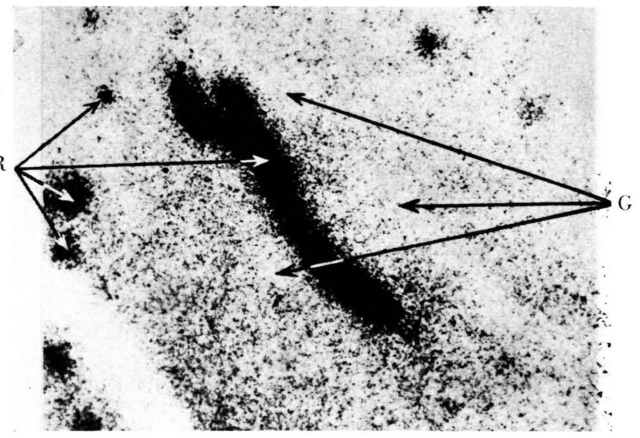


Abb. 5 b

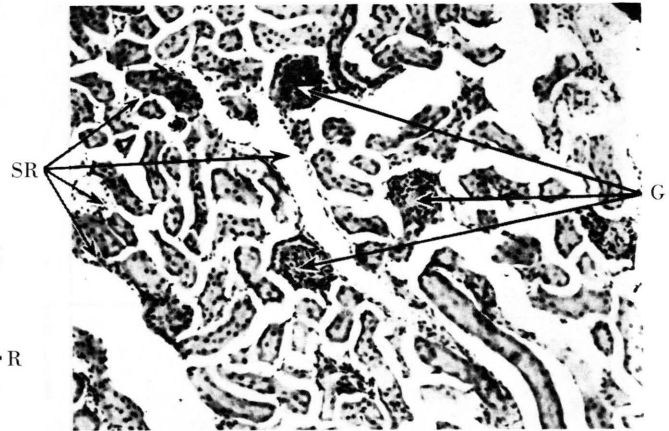


Abb. 5 c



Abb. 6

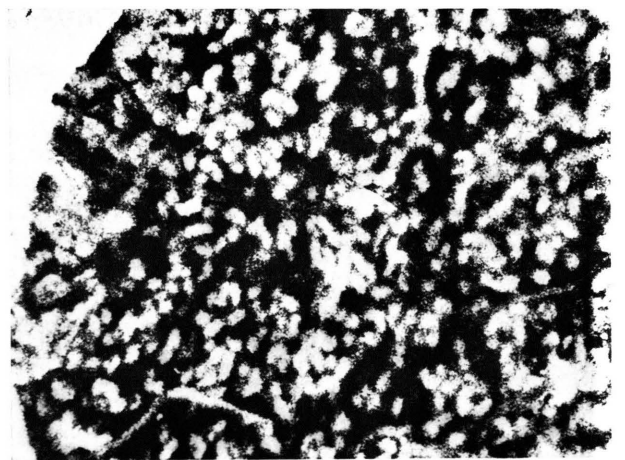


Abb. 7

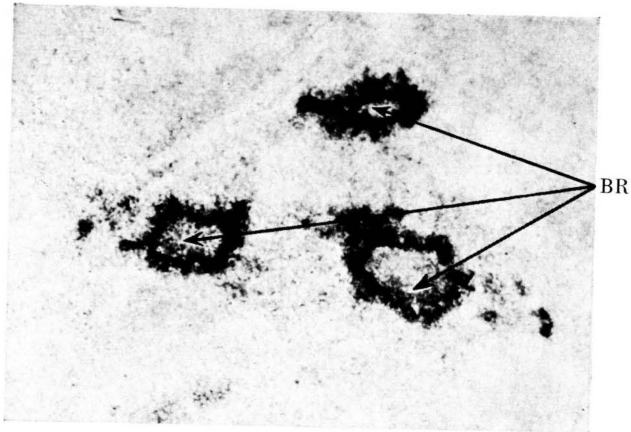


Abb. 9 a

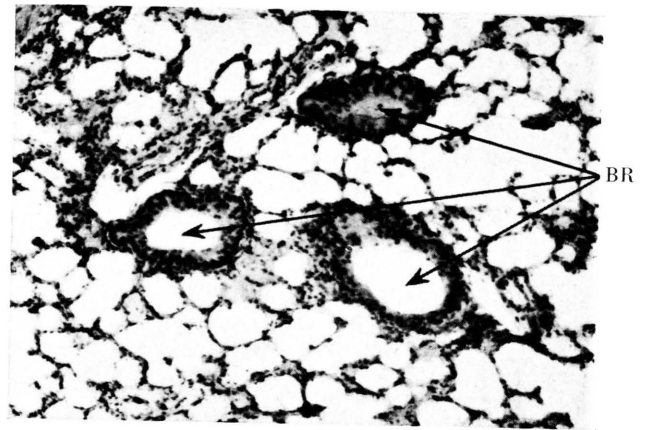


Abb. 9 b

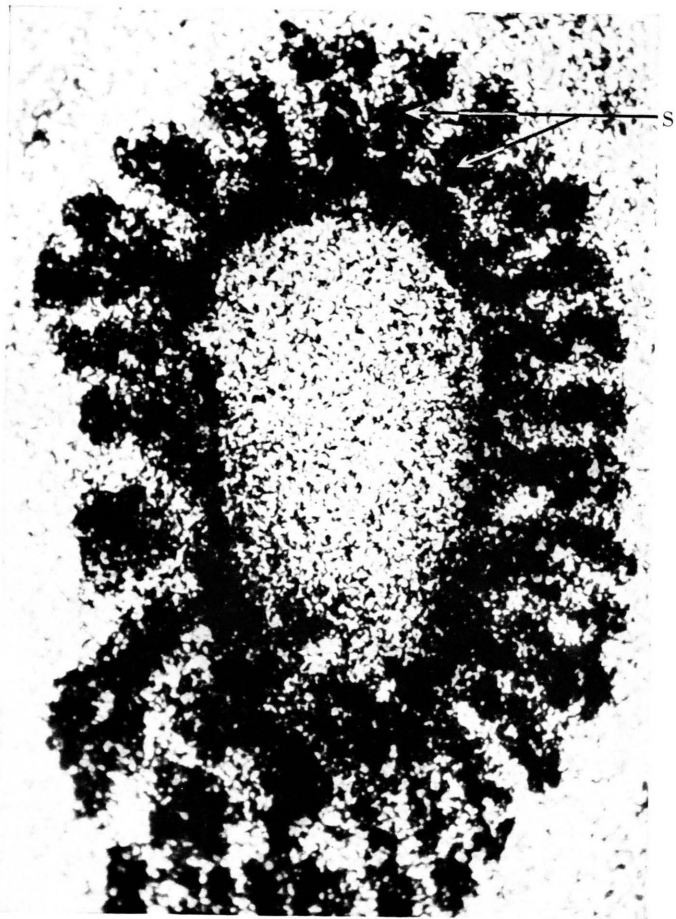


Abb. 9 c



Abb. 9 d

Abb. 8 a

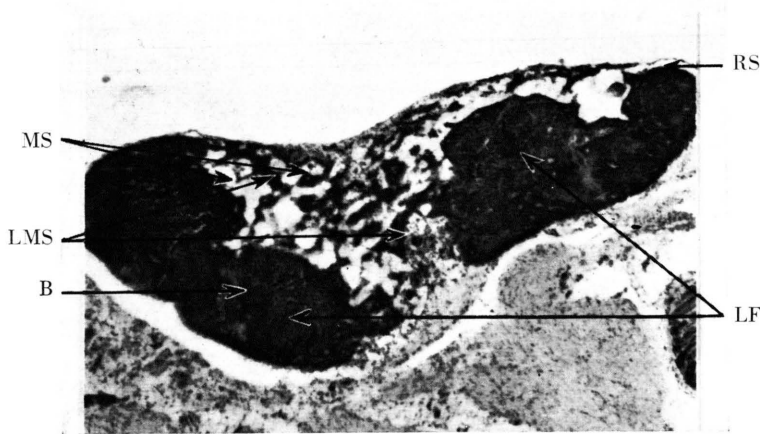
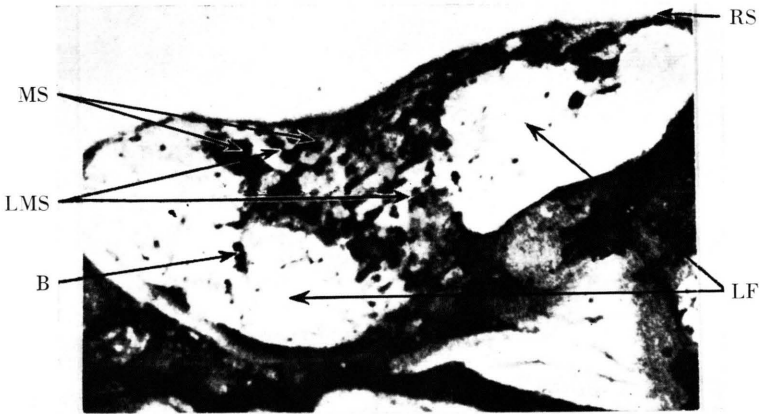


Abb. 8 b

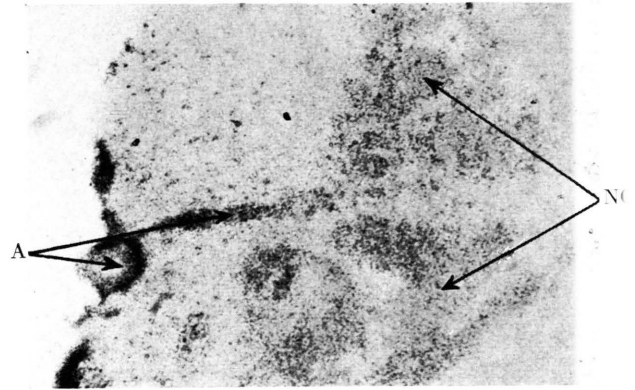


Abb. 10 a



Abb. 10 b

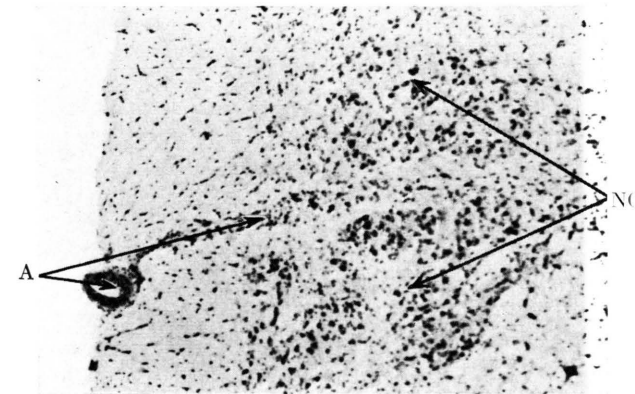


Abb. 10 c

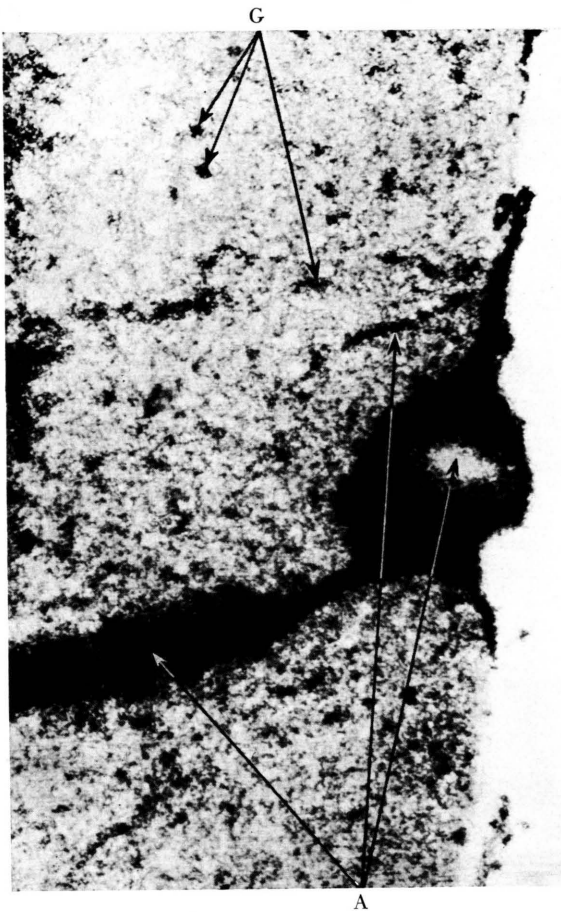


Abb. 10 d

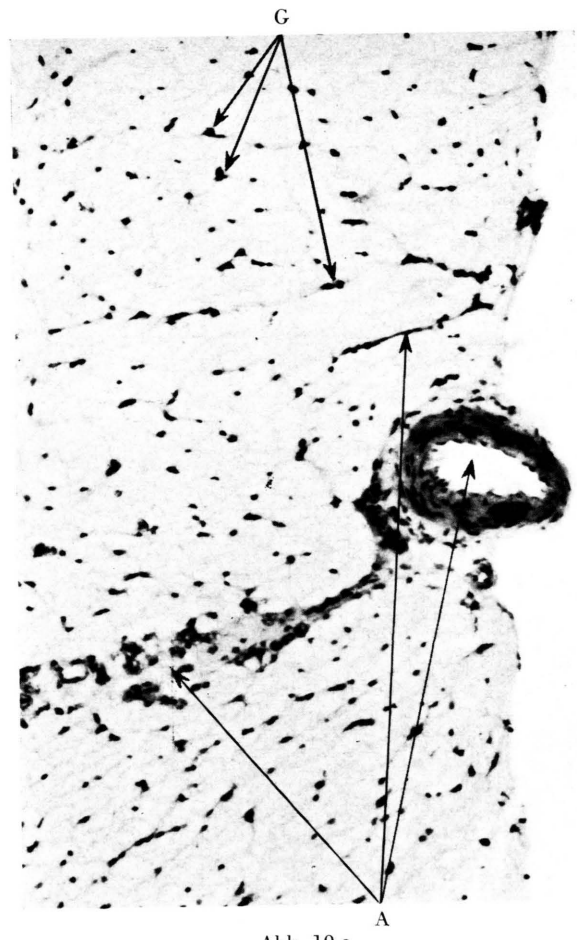


Abb. 10 e

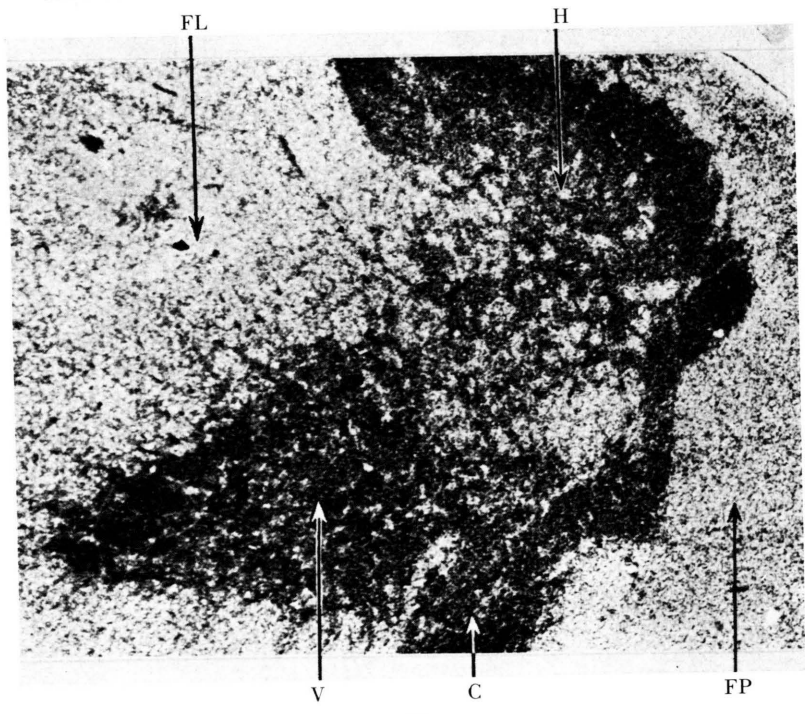


Abb. 11

Histologische Färbung der Schnitte

Da die trockenen, entparaffinierten Schnitte sich – ebenso wie beim Entparaffinieren – auch beim Färbvorgang oft von der Unterlage lösen und dann „abschwimmen“, müssen die Färbungen in horizontaler Lage des Objektträgers ausgeführt werden. Die optimale Färbung der Schnitte zur Differenzierung der Strukturen ist deshalb schwierig, weil die Überführung der *trockenen* Schnitte in die verschiedenen Lösungsmittel – zum Zwecke der Färbung – es mit sich bringt, daß die Schnitte manchmal zerreißen und Spalten bekommen. Es kommt aber bei unserer Methode nur darauf an, autoradiographischen Schwärzungen auf dem Film, Strukturen im gefärbten Schnitt zuordnen zu können; d. h. die Strukturen brauchen nur als solche erkennbar zu sein; die histologische Darstellung braucht keinen Anspruch auf erste Qualität zu erheben.

Die im Kryostat hergestellten Gefrierschnitte bereiten keine besonderen Schwierigkeiten bei dem Färbvorgang.

Zuordnung von autoradiographischen Film-Schwärzungen an histologisch dargestellte Organstrukturen

Für den mikroskopischen Vergleich von autoradiographisch gewonnenen Schwärzungen der Photo-Emulsion und histologisch-gefärbten Organschnitten bieten sich zwei Möglichkeiten an:

1. Übereinanderlegen von gefärbtem Schnitt und autoradiographischem Bild und eventuell Einbetten in Canadabalsam **.
2. Betrachtung von Autoradiogramm und Schnitt im Vergleichsmikroskop *** oder auf zwei Mikroskop-Bildschirmen ****.

Am zweckmäßigsten für Routine-Untersuchungen erwies sich eine Anordnung mit zwei Bildschirmen, die auf zwei mit Binokulartuben versehenen Mikroskopen montiert waren. Mit dieser Einrichtung läßt sich in einfacher und befriedigender Weise eine autoradiographische Filmschwärzung einer bestimmten histologischen Struktur zuordnen (Abb. 2).

Relative quantitative Aussagen über die an bestimmten Organ-Strukturen gebundene Radioaktivität sind natürlich nur dann möglich, wenn die Silbergranula der Autoradiogramme isoliert voneinander vorliegen, somit noch auszählbar sind, und bestimmte Strukturen noch nicht den maximalen Schwärzungsgrad erreicht haben. In vielen Fällen mit starken Aktivitäts-Unterschieden in den Strukturen sind jedoch jene Organ-Elemente mit schwachen Aktivitäten erst dann autoradiographisch darstellbar, wenn an anderen Strukturen bereits der maximale Schwärzungsgrad erreicht ist.

Bezüglich der streng quantitativen Aktivitätsbestimmungen auf Autoradiogrammen unter Berücksichtigung der verschiedenen, von der Massendichte abhängigen β -Selbstabsorption bestimmter Zell- und Organ-elemente sei auf die Untersuchungen von MAURER⁹ hingewiesen.

** Entelan (Merck) hat sich dafür nicht bewährt.

*** Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.

**** Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ. od. Fa. E. Leybold's Nachfolger, 5 Köln-Bayental, Bonnerstr. 504.

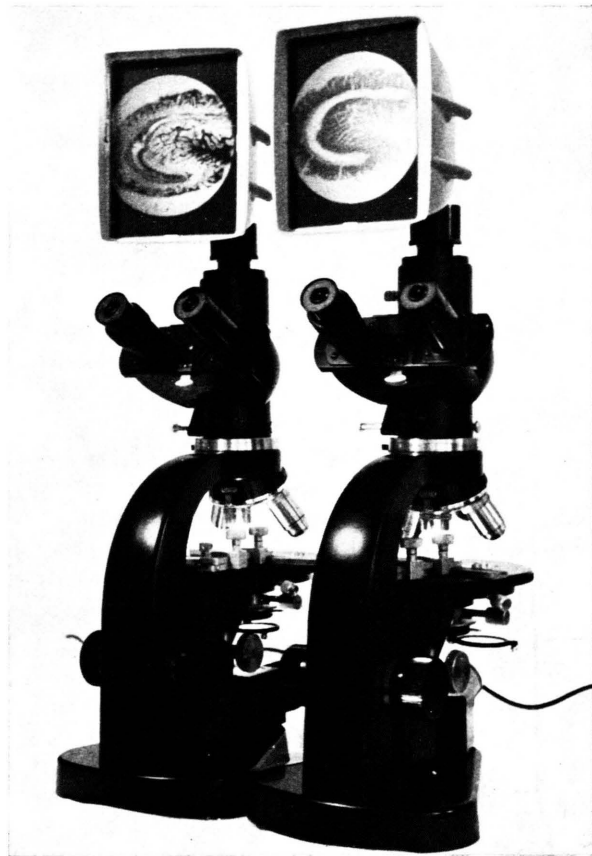


Abb. 2. Anordnung für den mikroskopischen Vergleich der autoradiographisch erhaltenen Film-Schwärzungen (links) mit den histologisch dargestellten Organstrukturen (rechts) desselben Schnittes.

Ergebnisse

Die Abb. 3 a * zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Dünndarm einer Maus nach Gabe von polytop-markiertem Atropin-sulfat-T und Abb. 3 b zum Vergleich den diesem Autoradiogramm zugrunde liegenden, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt. Der Darminhalt (D.I.) ist als stark radioaktiver Untergrund zu erkennen, von dem sich die Zotten deutlich als „negative“ Strukturen abheben. Es ist gut zu sehen, daß der radioaktive Darminhalt auch in die sogenannten „Lieberkühnschen Krypten“ (LK) eingedrungen ist, die sich deshalb im Querschnitt als schwarze Punkte auf dem Autoradiogramm darstellen. Die Schwärzung der zentra-

⁹ W. MAURER, Second Int. Congress of Histo- and Cytochemistry, Frankfurt/Main 1964; Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, S. 42.

* Abbn. 3 – 11 s. Tafel S. 240 a – e.

len Achsen der Zotten ist der morphologische Nachweis der Resorption des Atropins und seiner Metaboliten durch das zentrale Lymphgefäß der Zotten.

In den Abbn. 4 a, b sind Autoradiogramm (a) und HE-gefärbter Schnitt (b) des Dickdarmes einer Maus dargestellt, die γ -Aminobuttersäure- $[\alpha, \beta\text{-T}]$ i.p. injiziert wurde. Die Schleimdrüsen-Zellen (D) sowie der in das Darm-Lumen abgeschiedene Schleim (DI) zeigten starke Radioaktivität.

In den Autoradiogrammen (Abbn. 5 a, b) fallen vor allem die starken Aktivitäten an jenen Strukturen der Niere einer Maus (nach i.p.-Injektion von Atropin-sulfat-T) auf, die man als Sammelröhren (SR) in der mikroskopischen Anatomie bezeichnet. Ebenfalls die Papille (P) zeigt starke Radioaktivität, während die Glomeruli (G) [Abbn. 5 b, c] die Blutgefäße und die anderen Struktureinheiten eine wesentlich geringere Radioaktivität besitzen. Es ist daraus zu schließen, daß die Sammelröhren, denen erst seit kurzem eine aktive Funktion zugeschrieben wird, entweder die Fähigkeit besitzen, Atropin bzw. Metaboliten aktiv auszuscheiden oder Wasser rückzuresorbieren.

Die Abb. 6 gibt ein Autoradiogramm eines GT-Nierenschnittes einer Maus wieder, der 5-Hydroxytryptophan-T injiziert worden war. Auffällig hier die reiche Strukturierung des autoradiographischen Bildes im Verhältnis zum Autoradiogramm der Niere (Abbn. 5 a, b), in dem nach Inkorporierung von Atropin-T nur die Sammelrohre sich darstellen.

Eine der Speicheldrüsen der Maus, nämlich die Glandula submandibularis, besteht aus mukösen und serösen Anteilen. Auf Abb. 7 ist das Autoradiogramm von dieser Drüse einer Maus dargestellt, der Atropin-T i.v. injiziert worden war. Die histologische Analyse erbrachte den Nachweis, daß die serösen Zellen eine starke Anreicherung von radioaktiver Substanz zeigten, während die mukösen Azini keine Radioaktivität enthielten.

Die Abb. 8 a zeigt das Autoradiogramm und Abb. 8 b den HE-gefärbten Schnitt vom Lymphknoten des Magens einer Maus nach i.p.-Injektion von Serotonin-T. Radioaktivität ist vor allem im Sinus-System (MS und RS) des Lymphknotens und in den Blutgefäßen (B) zu finden. Die Lymphfollikel (LF) und die Lymphmarkstränge (LMS) sind völlig ohne radioaktive Substanzen.

Die Abbn. 9 a, b, c, d zeigen, daß vornehmlich in den Epithelzellen der Bronchien-Schleimhaut (S)

der Maus Radioaktivität gebunden wurde, nachdem dem Tier Diiso-propyl-fluorphosphat-T (DFP-T) i.p. injiziert worden war. Alveolen und andere Strukturen der Lunge sind fast ohne Radioaktivität. Es ist bekannt, daß es unter der Einwirkung von DFP zu starker Kontraktion und Verschleimung der Bronchien kommt.

In den Abbn. 10 a, b, c, d, e sind zwei G-Schnitte (c, e) vom Hirn (Nucleus olivaris) einer Ratte und drei Autoradiographien (a, b, d) abgebildet nach intrathekalen Gabe von Glutaminsäure-T. Der dem Autoradiogramm Abb. 10 a zugrunde liegende Schnitt ist vor der Exposition kurze Zeit in Wasser getaucht worden, während der Schnitt c, von dem das Autoradiogramm b stammt, nicht mit hydrophilen Lösungsmitteln in Berührung gebracht worden war. Es ist in Abb. 10 b zu erkennen, daß im Nucleus olivaris (graue Substanz) die Neuronen starke Radioaktivität besitzen. Ebenfalls stark radioaktiv sind die Gliazellen in der „weißen Substanz“ und die Wand der Blut-Kapillaren und größeren Gefäße, während die myelinisierten Achsenzylinder eine geringere Aktivität zeigen. Das Autoradiogramm Abb. 10 a läßt erkennen, daß infolge des Eintauchens des Schnittes in Wasser vor der Exposition, die Radioaktivität nahezu völlig herausgelöst wurde.

Die Abb. 11 zeigt das Autoradiogramm von einem Gefrierschnitt durch das Rückenmark einer Ratte, der Glutaminsäure-T intrathekal injiziert worden war. Stark radioaktiv erscheint die „graue Substanz“, die vornehmlich aus Neuronen besteht, während die „weiße Substanz“ (Gliazellen und myelinisierte Achsenzylinder) eine bedeutend geringere Aktivität besitzt.

Auf die in diesen Untersuchungen gefundenen Verteilungen der Radioaktivität nach Gabe verschiedener Tritium-markierter Verbindungen wird in gesonderten Publikationen näher eingegangen und eine Deutung gegeben werden.

FRAU MARIA-LUISA RODRIGUEZ, Ärztin, Frl. MEIKE SCHMIDT, biol.-chem.-techn. Assistentin, und Herrn Ing. KARL-HEINZ SCHMIDT danken wir für gewissenhafte technische Assistenz bei den vorliegenden Untersuchungen.

Wir danken für die finanzielle Förderung dieser Untersuchungen durch Mittel des „Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung“ und durch ein Auslands-Forschungs-Stipendium der „Juan March-Stiftung“ (Spanien) an Prof. Dr. D. P. G. BOSQUE und Dr. J. CARRERES Quevedo.