

16. Herrmann, R.: Physikalische Grundlagen der Mikroskopphotometrie, Vortrag Bioanalytika 1970 München; siehe diese Z. 252, 81 (1970).
17. Hillman, R. S.: J. Clin. Invest. 48, 443–453 (1969).
18. Inoue, S., Sato, H.: Science 136, 1122–1124 (1962).
19. Konev, S. V.: Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids. New York: Plenum Press 1967.
20. Lomakka, G.: Acta Histochem., Suppl. 6, 303–304 (1965).
21. Mayor, H. D.: Intern. Rev. Exp. Pathol. 2, 1–45 (1963).
22. Mitchison, J. M., Passano, L. M., Smith, F. H.: Quart. J. Microsc. Sci. 97, 287 (1956).
23. Müller, W.: Diss. Nr. 4272, Eidgen. Techn. Hochschule Zürich 1968.
24. Pernis, B., Chiappino, A., Kelus, A. S., Gell, P. G. H.: J. Exp. Med. 122, 853–876 (1965).
25. Ploem, J. S.: Z. Wiss. Mikrosk. 68, 130–142 (1967).
26. Prenna, G., Bianchi, U. A.: Riv. Istochim. Norm. Patol. 12, 667–676 (1964).
27. Rigler, R.: Acta Physiol. Scand. 67, Suppl. 267 (1966).
28. Ritzen, M.: Thesis. Stockholm: P. A. Norstedt and Söner 1967.
29. Rogers, A. W.: Techniques of autoradiography. Amsterdam: Elsevier Publ. Comp. 1967.
30. Rotman, B., Papermaster, B. W.: Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 134 (1966).
31. Ruch, F.: Introduction into quantitative cytochemistry (G. L. Wied, edit.), pp. 281–294. New York-London: Acad. Press 1966.
32. — Introduction into quantitative cytochemistry (G. L. Wied, edit.), pp. 549–554. New York-London: Acad. Press 1966a.
33. — Z. Wiss. Mikrosk. 64, 453–468 (1962).
34. — Bosshard, U.: Z. Wiss. Mikrosk. 65, 335–341 (1963).
35. Sernetz, M., Thaer, A.: Vortrag Bioanalytika 1970 München; siehe diese Z. 252, 90 (1970).
36. — J. Microscopy 91, 43–52 (1970).
37. Thaer, A.: J. Microscopy 89, 237–250 (1969).
38. — Proceedings of the Tenovus Symposium on Cytology Automation, Cardiff/Wales 24.–25. Sept. 1968, pp. 189 to 196. Edinburgh: Livingstone 1970.
39. Udenfriend, S.: Fluorescence assay in biology and medicine. New York-London: Acad. Press 1962.
40. West, S. S.: Methoden und Ergebnisse der Zytrophotometrie, S. 135–153 (Verh. d. Ges. f. Histochemie). 9. Symposium 1963; edit. W. Sandritter, u. G. Kiefer. Acta Histochem. Suppl. VI (1965).
41. Wied, G. L.: Introduction into quantitative cytochemistry (G. L. Wied, edit.), pp. 559–600. New York-London: Acad. Press 1966.

Dr. A. Thaer
Battelle-Institut
D-6000 Frankfurt a.M., Postfach 900160

Z. Anal. Chem. 252, 84–89 (1970)

© by Springer-Verlag 1970

Auflichtphotometrie von Mikroautoradiogrammen für quantitative Einbaustudien an Einzelzellen*

P. DÖRMER und W. BRINKMANN

Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, München,
Assoziation mit EURATOM (Leiter Prof. Dr. W. Stich)

Eingegangen am 23. Mai 1970

Incident Light Photometry of Micro Autoradiograms for Quantitative Incorporation Studies with Single Cells. By means of micro-autoradiography incorporation studies of labelled compounds can be performed at the cellular level. The procedure described here aims at determining the amount of substances in terms of moles, incorporated into single cells.

¹⁴C is used as a label, since in contrast to tritium, the influence of β -self-absorption of this isotope is negligible. Every autoradiograph is exposed together with a standard consisting of ¹⁴C-methacrylate. Hereby the relation of grain density to radioactivity in an autoradiograph is given. Grain counts are performed in an incident light microphotometer which makes use of the linear relationship between silver grain number and amount of light reflected by the grains. Therefore, measurements are performed in an integrating manner. The usual transmitted light is available for selecting the labelled cells for measurement.

* Studie im Rahmen des Assoziationsvertrages EURATOM-GSF für Hämatologie Nr. 031641 BIAD.

All photometer readings are converted into digital values, and are punched on a tape for further processing in a computer. By comparing the standard grain densities with the grain counts over the cells the absolute radioactivity in a cell is calculated. The specific activity of the labelled compound is used then to evaluate the incorporated amount in terms of moles. Examples of incorporation rates of ^{14}C -thymidine into different maturation stages of human erythroid bone marrow cells are given.

Zusammenfassung. Durch die Mikroautoradiographie sind Einbaustudien markierter Verbindungen in einzelne Zellen möglich. Hier wird ein Verfahren unter Zuhilfenahme der mikroskopischen Auflichtphotometrie beschrieben, das die Bestimmung in einzelne Zellen eingebauter Substanzen in Mol erlaubt.

Zur Markierung werden ^{14}C -Verbindungen benutzt, da ^{14}C im Gegensatz zu Tritium in Mikroautoradiogrammen einem vernachlässigbaren Fehler der β -Selbstabsorption unterliegt. Jedes Autoradiogramm wird mit einem ^{14}C -Methacrylat-Standard zusammen exponiert, so daß die Beziehung zwischen Schwärzung und Radioaktivität bekannt ist.

Das Ausmessen der Schwärzung über Standard und Zellen erfolgt mikroskopphotometrisch im Auflicht. Dabei wird von der linearen Beziehung zwischen Silberkornzahl und der von ihr im Auflicht reflektierten Lichtmenge Gebrauch gemacht. Deshalb haben die Messungen integrierenden Charakter. Die wechselweise Umschaltung auf Durchlichtbeobachtung ermöglicht die Auswahl der markierten Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten.

Alle Messungen werden digital umgewandelt und auf Lochstreifen gestanzt zur Weiterverarbeitung durch einen Elektronenrechner. Aus dem Vergleich der Reflexionsintensität über dem Standard und über den einzelnen Zellen läßt sich die absolute Radioaktivität in den Zellen berechnen, und aus dieser mit Hilfe der spezifischen Aktivität der ^{14}C -Verbindungen die Menge in Mol. Beispiele unterschiedlicher Thymidin-Einbaugeschwindigkeiten in verschiedene Reifeklassen des menschlichen erythropoetischen Knochenmarks werden gegeben.

Einleitung

Ein Mikroautoradiogramm besteht aus einem Objektträger, aus einer darauf haftenden markierten Probe und aus einer über der Probe befindlichen Kernspuremulsion. Wegen seiner geringen Zerfallsenergie wird Tritium in markierten Verbindungen bevorzugt. Hierbei lassen sich mikroskopisch die in der Kernspuremulsion nach Exposition und Entwicklung entstandenen Silberkörner den Strukturen in cellulärer Größenordnung gut zuordnen.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, aus der Zahl der durch Tritiumverbindungen gebildeten Silberkörner Rückschlüsse auf den relativen Einbau in einzelne Zellen zu gewinnen. In einer systematischen Studie von Maurer u. Primbsch [9] wurde jedoch gezeigt, wie sehr solche Ergebnisse alleine durch die β -Selbstabsorption in den Proben verfälscht werden können.

Die Grenzschicht eines histologischen Gewebsschnittes, aus der beim Tritiumzerfall noch ein nennenswerter Beitrag zur Schwärzung der Kernspuremulsion erwartet werden kann, liegt nach diesen Autoren bei 3 μm . Bei Zellausstrichen fungiert die über den Kernen befindliche Cytoplasmaschicht bereits als wirksamer Absorber. Sie ruft alleine durch ihre Dickenschwankung von Zelle zu Zelle einen Standardfehler von rund 20% hervor [8]. In dieser Studie an ausgestrichenen Leberkernen lag der Koeffizient der β -Selbstabsorption zwischen 0,56 und 0,2.

Quantitative ^{14}C -Autoradiographie an Ausstrichmaterial

1. Die β -Selbstabsorption

Für quantitative Einbaustudien an Einzelzellen dürfte Kohlenstoff-14 ein günstiger Kompromiß aus morphologischer Zuordnungsmöglichkeit der Silberkörner zur Strahlenquelle einerseits und Berechtigung zur Vernachlässigung der β -Selbstabsorption andererseits sein. Die Verteilung der interferometrisch und planimetrisch ermittelten Flächendichten von 817 ausgestrichenen und Methanol-fixierten Leberkernen zeigt Abb. 1. Die mittlere Flächendichte liegt bei 0,072 mg/cm^2 . Nach den Daten von Maurer u. Primbsch [9] entspricht diese Flächendichte einer Dicke des histologischen Gewebsschnittes von 3 bis 4 μm . Durch Ausmessen elektronenmikroskopischer Querschnitte solcher Leberkerne [8] ergibt sich jedoch eine mittlere Dicke von nur 0,94 μm . Das bedeutet, daß die Zellen beim Ausstreichen sehr schnell an den Objektträger antrocknen und dabei um ihr Flüssigkeitsvolumen auf den Objektträger hin schrumpfen.

In Ausstrich-Autoradiogrammen liegen demnach Proben in der Form von flachen Scheiben vor, deren Dicke im Hinblick auf die Geometrie der Strahlenverteilung vernachlässigbar ist. Baserga u. Malamud [1] geben für Kunststoffolien, deren spezifische

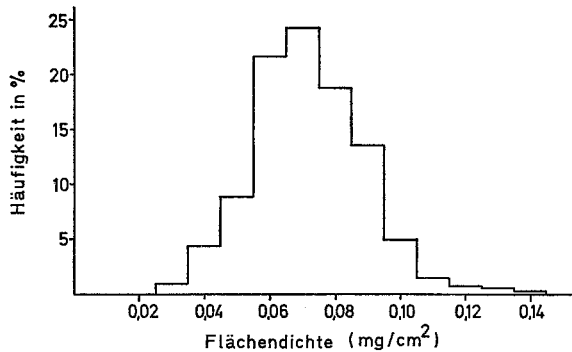


Abb.1. Flächendichten von 817 Leberkernen der Ratte in Ausstrichpräparaten nach Methanolfixation. Der Mittelwert liegt bei $0,072 \text{ mg/cm}^2$

Dichte etwa der des nassen Gewebes entspricht, eine Dicke von $16 \mu\text{m}$ an, durch die gerade 50% der ^{14}C -Zerfälle absorbiert werden. Da trockenes, fixiertes Gewebe, wie es in den Autoradiogrammen gewöhnlich verwendet wird, eine geringere spezifische Dichte als nasses Gewebe hat, ergibt eine Abschätzung, daß bei den im Ausstrichmaterial gefundenen Flächendichten mit einer ^{14}C - β -Selbstabsorption von weniger als 10% zu rechnen ist. Damit wird, wie in einer früheren Studie auch experimentell gefunden wurde [5], der Fehler durch die ^{14}C - β -Selbstabsorption vernachlässigbar.

2. Geometrie der Strahlenverteilung

Abb.2 zeigt die gemessene Verteilung der Silberkorn-dichte über und außerhalb eines ^{14}C -Thymidin- (^{14}C -TdR-)markierten menschlichen Erythroblastenkerns. Ein nicht unerheblicher Teil der Silberkörner findet sich außerhalb des Kernes. Wenn die Kerndurchmesser gegen Unendlich streben, wird der Anteil der Silberkörner über den Kernen gegen 100% streben. Eine Sättigungskurve für zunehmende Kerndurchmesser ist daher zu erwarten. Das Experiment

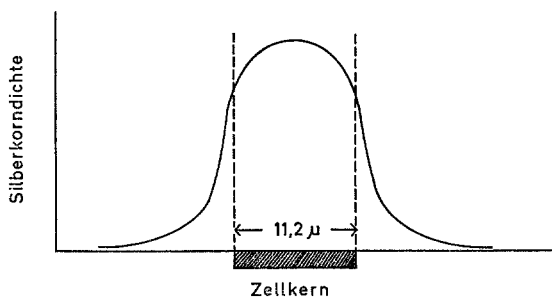


Abb.2. Verteilung der Silberkorn-dichte über und außerhalb eines isoliert liegenden, ^{14}C -TdR-markierten Erythroblastenkerns im Ausstrichpräparat mit einem Kerndurchmesser von $11,2 \mu\text{m}$

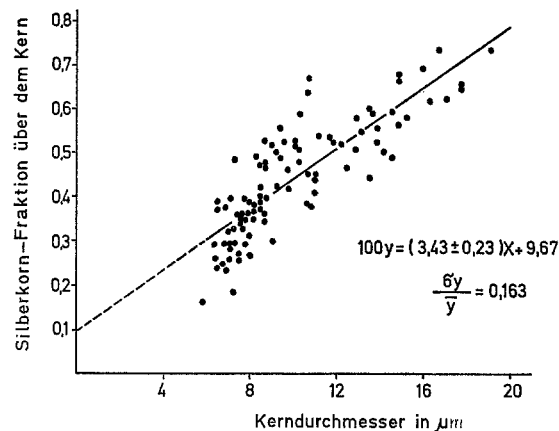


Abb.3. Beziehung zwischen der Größe ^{14}C -TdR-markierter ausgestrichener Erythroblastenkerne und der über den Kernen befindlichen Fraktionen aller von den jeweiligen Kernen aus entstandenen Silberkörner

(Abb.3) entspricht im wesentlichen dieser Erwartung. Die Kerndurchmesser von ausgestrichenen Säugerzellen liegen in der Größenordnung zwischen 6 und $18 \mu\text{m}$. Für diesen Bereich wurden die Meßwerte einer linearen Regression zugeordnet. Hierbei ergibt sich für den Einzelwert ein einfacher Streubereich von $16,3\%$. Werden 100 Messungen durchgeführt, so hat der Mittelwert noch einen Standardfehler von $1,6\%$.

Es besteht zwar die Möglichkeit, alle von einer Zelle ausgehenden Silberkörner zu zählen oder zu messen, doch liegen die Zellen auch in den Ausstrichen meist so dicht beieinander, daß sich ihre Radien der Strahlenreichweite überschneiden. Deshalb ist es meist von Vorteil, nur die Silberkörner direkt über dem Kern oder der Zelle zu zählen oder zu messen, und mit Hilfe des jeweiligen Durchmessers des Meßfeldes und der Regression der Abb.3 die Gesamtsilberkornzahl zu berechnen.

3. Auflicht-Silberkornphotometrie

Die visuelle Zählung der Silberkörner ist eine mühselige und ungenaue Prozedur. Exponiert man nur bis zu einer geringen Silberkorndichte, um visuell gut auszählen zu können, sind möglicherweise über potentiell markierten Zellen noch keine Silberkörner nachweisbar. Entscheidet man sich für eine höhere Silberkorndichte, werden die visuelle Zählung schwieriger und der Fehler durch die Ermüdung beim Zählen größer. Zahlreiche Versuche mikroskop-photometrischer Silberkornzählungen in Mikroautoradiogrammen sind deshalb unternommen worden. Für die in der Einzelzell-Autoradiographie gegebenen Bedingungen hat sich die Photometrie im Auflicht als günstiges Verfahren erwiesen [7, 12]. Ein großer Vorteil liegt in der

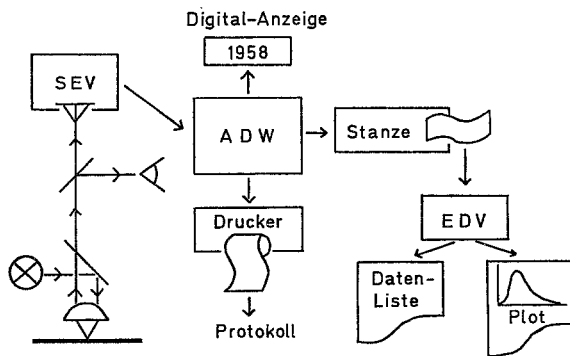


Abb.4. Erfassung und Verarbeitung der vom Mikroskop-Auflicht-Photometer gelieferten Daten. Abkürzungen: SEV = Sekundär-Elektronen-Vervielfacher; ADW = Analog-Digital-Wandler; EDV = Elektronische Datenverarbeitung

Linearität der Beziehung zwischen der Zahl der Silberkörner und der von ihnen remittierten Lichtmenge. Deshalb kann im Gegensatz zur Absorptionsphotometrie integrierend gemessen werden.

Das von uns verwendete Auflicht-Mikroskop-photometer wurde in früheren Arbeiten ausführlich beschrieben [4,7]. Es besteht optisch aus einer kombinierten Durchlicht-Auflicht-Einrichtung, so daß die Zellen im Durchlicht nach morphologisch-cytologischen Gesichtspunkten ausgesucht, und ihre Silberkörner dann im Auflicht gemessen werden können. Es besteht sowohl beleuchtungsseitig als auch meßseitig die Möglichkeit einer variablen Ausblendung der zu messenden Objektdetails unter Sicht des Auges. Der Meßfehler liegt niedriger als bei der visuellen Zählung [7]. Die Meßdaten werden digital umgewandelt und auf Lochstreifen gestanzt (Abb.4). Ihnen können 8 verschiedene Gruppenzeichen zugeordnet werden. Bei der elektronischen Datenverarbeitung ist daher die Identifizierung und separate Behandlung von 8 verschiedenen Datengruppen, z.B. in Form verschiedener Zellarten, möglich.

4. Standardisierung

Die erhaltenen Digitalwerte einzelner markierter Zellen sind zunächst nur Relativwerte für die eingebauten Mengen einer markierten Verbindung. Die Möglichkeit bietet sich an, auf jedem Autoradiogramm einen radioaktiven Standard mitzuexponieren. Zunächst sind über die Meßwerte der Standards möglicherweise unterschiedliche Filmschichtdicken verschiedener Autoradiogramme erkennbar und korrigierbar. Hierin besteht eine Fehlermöglichkeit der ^{14}C -Autoradiographie. Nur Emulsionen, wie z.B. der Strippingfilm AR10 der Fa. Kodak, die eine ange-

nähert konstante Schichtdicke auf einem Autoradiogramm gewährleisten, sind geeignet.

In einer Versuchsreihe kann jedes Autoradiogramm mit Standard individuell lange exponiert werden, da die Standardschwärzung eine Bezugsgröße zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener Autoradiogramme bietet. Das während der Exposition gefürchtete Fading bedarf bei der Verwendung von Standards ebenfalls keiner Berücksichtigung. Andererseits erlaubt der Vergleich der Standardschwärzung mit der Schwärzung über den Zellen eine Berechnung der Radioaktivität in den einzelnen Zellen. Aus der spezifischen Aktivität der benutzten markierten Verbindung läßt sich dann die in die einzelne Zelle eingebaute Menge in Mol berechnen. Dabei gilt folgende Beziehung:

$$\text{Eingebaute Menge} = A \cdot \frac{C \cdot D}{B \cdot E} [\text{Mol}].$$

A Lichtwert aller von einer Zelle aus entstandenen Silberkörner;

B mittlerer Lichtwert der Standardschwärzung;

C pro Messung erfaßtes Standardvolumen;

D Standardaktivität pro Volumen;

E spezifische Aktivität der markierten Verbindung.

Frühere, in der Tritium-Autoradiographie unternommene Versuche einer quantitativen Autoradiographie mit Standards stammen von Ritzén [10,11]. Unsere Standards bestehen aus ^{14}C -Polymethyl-Methacrylat, das mit einem Ultramikrotom zu etwa $5\text{ }\mu\text{m}$ dicken Plättchen geschnitten wird. Die exakte Dicke jedes Plättchens wird interferometrisch ermittelt. Die Standardplättchen sind neben unmarkierten Referenzplättchen auf Deckgläser aufgeklebt. Letztere sind durch eine fortlaufende Nummer gekennzeichnet. Je ein Deckgläschen wird auf einem Objektträger befestigt und dann gemeinsam mit den zu untersuchenden Zellen unter Film gebracht und exponiert. Nach der Entwicklung und Fixation wird das Deckgläschen vorsichtig unter dem noch nassen Film herausgelöst, so daß es für neue Autoradiogramme zur Verfügung steht.

Ergebnisse

In einer Versuchsserie mit 5 Objektträgern wurden je 50 ^{14}C -TdR-markierte polychromatische Erythroblasten des Menschen gemessen. Die Expositionszeiten und die mittlere Silberkorngröße der einzelnen Objektträger variierten. Die mittlere Silberkorngröße ist in gewissem Umfang über die Entwicklungsdauer variabel. Sie entscheidet über die Lichtmenge, die pro Silberkorn bei der Auflicht-Photometrie remittiert wird.

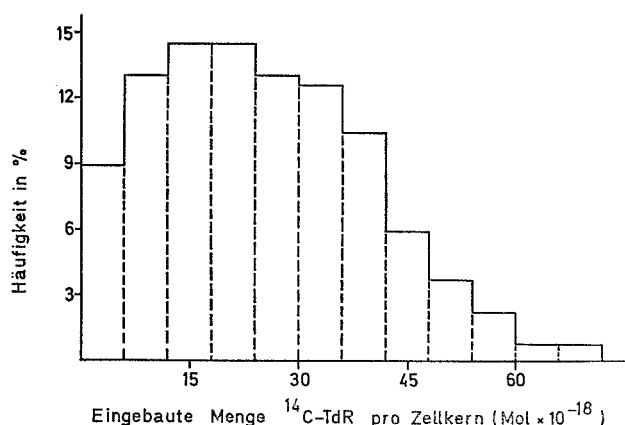


Abb. 5. Häufigkeitsverteilung der ^{14}C -TdR-Einbauwerte in 270 polychromatischen Erythroblasten des Menschen. Der Einbau lief während einer 12minütigen Inkubation mit ^{14}C -TdR, wie anderswo beschrieben [2], ab

Umgerechnet in inkorporierte Menge ^{14}C -TdR wiesen die Mittelwerte der einzelnen Objektträger einen einfachen Streubereich von 10,2% des Mittelwerts aller 5 Objektträger auf. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die polychromatischen Erythroblasten morphologisch nur unscharf gegen die wesentlich stärker markierten basophilen Erythroblasten abgegrenzt sind. Dadurch ist die Auswahl der Zellen auf den einzelnen Objektträgern möglicherweise ungleich gewesen, was zur Größe des Fehlers wesentlich beigetragen haben kann.

Die Häufigkeitsverteilung der Einbauwerte pro Einzelzelle (Abb. 5) ähnelt einer sehr breiten logarithmischen Normalverteilung. Zu diesem Ergebnis kann über das Fehlerfortpflanzungsgesetz der methodisch bedingte Fehler des Einzelwerts abgeschätzt werden, der rund 20% beträgt. Er setzt sich aus dem Meßfehler von rund 3%, dem errechneten Standardfehler von 10,2% und dem Fehler bei alleiniger Messung der Silberkörner über dem Kern und Rückrechnung auf die Gesamtsilberkornzahl von 16,3% zusammen. Offensichtlich ist demnach die breite Streuung der Häufigkeitsverteilung nur zum geringeren Teil methodisch bedingt und beruht zum größeren Teil tatsächlich auf stark unterschiedlichen Einbauwerten von ^{14}C -TdR in die DNS einzelner Zellen.

Aus der pro Zellkern eingebauten Menge von ^{14}C -TdR geht hervor, daß die quantitative Autoradiographie Mengen in der Größenordnung von 10^{-18} Mol oder 10^{-15} g zu erfassen vermag. Durch die mikroskopische Interferometrie oder Absorptions-Photometrie sind dagegen Stoffmengen nur in der Größenordnung von 10^{-12} g faßbar.

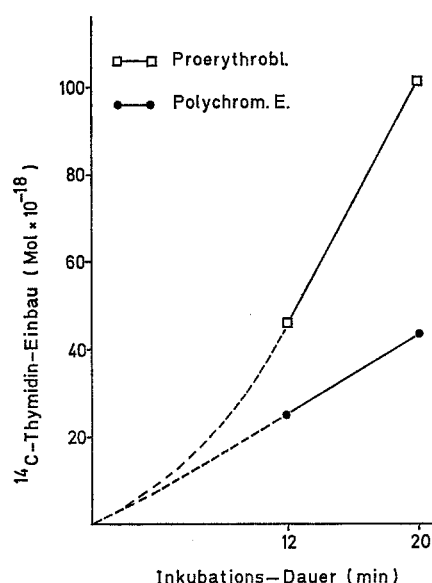


Abb. 6. Inkorporation von ^{14}C -TdR in die DNS verschiedener menschlicher Erythroblasten-Reifungsstufen während einer Kurzinkubation

Durch quantitative Einbaustudien über die Zeit kann geprüft werden, ob verschiedene Zellarten des Knochenmarks während einer Kurzinkubation mit ^{14}C -TdR und Amethopterin [2, 6] eine normale DNS-Synthese wie in vivo aufrechterhalten. Die mit der „Markierten-Mitose-Methode“ ermittelte DNS-Synthesedauer normaler menschlicher Knochenmarkszellen in vivo beträgt 13–14 h [14]. Der Thymingehalt einer menschlichen diploiden Zelle kann errechnet werden:

DNS-Menge $6,8 \cdot 10^{-12}$ g

Molares Basenverhältnis:

A/T/G/C = 10:10:6,4:6,4

Thyminmenge $6,3 \cdot 10^{-15}$ Mol

(DNS-Menge aus [13], Basenverhältnisse aus [3], Daten für Thymus-Lymphozyt).

Aus der in einem Inkubationsintervall von 8 min (Abb. 6) in die DNS eingebauten Menge von ^{14}C -TdR läßt sich somit die Zeit berechnen, die eine Zellart benötigen würde, um den gesamten diploiden Thymingehalt der DNS aus angebotenen ^{14}C -TdR zu synthetisieren.

Aus den Mittelwerten der Ergebnisse (Abb. 6), die von der Inkubation des Knochenmarks einer hämatologisch gesunden Frau stammen, berechnet sich für die Proerythroblasten eine Synthesedauer von 15,1 h. Damit lief in vitro eine in ihrer Geschwindigkeit etwa normale DNS-Synthese dieser Zellart ab, die nur von angebotenen ^{14}C -TdR Gebrauch macht. Für die polychromatischen Erythroblasten ergäbe

sich jedoch eine Synthesedauer von 46,5 h. Es kann vorläufig nur vermutet werden, daß diese Zellart, für die in vivo ebenfalls eine DNS-Synthesedauer von 13–14 h gefunden wurde [14], entweder trotz Amethopterinblockade weiter unmarkiertes Thymidin-Monophosphat synthetisieren kann, oder daß die DNS-Synthese durch die Wirkung des Amethopterins beeinträchtigt wird. Analoge Verhältnisse haben wir auch in den verschiedenen erythropoetischen Reifeklassen der Ratte gefunden [6].

Anhang — Diskussionsfragen

W. Göhde: Wir haben eine Apparatur entwickelt, mit der es möglich ist, cytophotometrisch 1000 Messungen/sec auszuführen. Wenn man nun die Silberkörner vorzugsweise in den Zellen entwickeln könnte, ließen sich diese Messungen mit dieser Methode automatisch sehr schnell ausführen. Sehen Sie Möglichkeiten dazu?

Antwort: Versuche, Zellen mit photographischer Emulsion zu imbibieren, sind tatsächlich unternommen worden (Literatur bei A. Niklas u. W. Maurer: Autoradiographie, in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl. Bd. II, S. 734–773. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955). Wegen der unterschiedlichen Trockengewichtskonzentrationen einzelner Zellen und Zellarten, und wegen des damit verbundenen unterschiedlichen Aufnahmevermögens von Emulsion dürfte eine quantitative Erfassung der Radioaktivität in den Zellen auf diese Weise jedoch schwierig sein.

W. Göhde: Bei Ausstrichen sind die Zellen sehr flach (0,5–1,5 μm). Nun könnte man aber auch so vorgehen, daß man die Zellen nach Fixierung in der Kernspuremulsion suspendiert. Bei Verwendung von Strahlern mit hohem LET würden sich die Silberkörner dann vorzugsweise in der Zelle befinden, und die Auswertung könnte mit dem Impulscytophotometer erfolgen.

Antwort: Die quantitative Autoradiographie wird von uns anstelle der viel einfacheren Szintillationszählung deshalb

angewendet, weil eine morphologische Zuordnung der Radioaktivität zu den einzelnen Zelltypen erforderlich ist, wie z.B. Proerythroblasten oder basophile Erythroblasten. In dieser Hinsicht wird das Impulscytophotometer wohl keinen Ersatz bieten können. Sicherlich wäre es aber durchaus interessant, methodische Untersuchungen in der von Ihnen skizzierten Richtung zu unternehmen.

Literatur

1. Baserga, R., Malamud, D.: *Autoradiography. Techniques and application*, 1. Aufl. New York-Evanston-London: Haper & Row 1969.
2. Brinkmann, W., Dörmer, P., Muschalik, P.: *Blut* **19**, 529 (1969).
3. Chargaff, E.: In: *The nucleic acids*, Vol. I, Ch. 10 (E. Chargaff and J. N. Davidson, eds.). New York: Academic Press 1955.
4. Dörmer, P.: *Leitz Mitt. Wiss. Techn.* **4**, 74 (1967).
5. — Brinkmann, W.: *Acta Histochem., Suppl.* **VIII**, 163 (1968).
6. — — In: *IAEA proceedings in "In vitro procedures with radioisotopes in medicine"*, p. 59. Wien: International Atomic Energy Agency Press 1970.
7. — — Stieber, A., Stich, W.: *Klin. Wschr.* **44**, 477 (1966).
8. — Reichart, B., Huhn, D.: *Z. Zellforsch.* **86**, 559 (1968).
9. Maurer, W., Primbsch, E.: *Exp. Cell Res.* **33**, 8 (1964).
10. Ritzén, M.: *Exp. Cell Res.* **45**, 250 (1967).
11. — *Acta Physiol. Scand.* **69**, 1 (1967).
12. Rogers, A. W.: *Exp. Cell Res.* **24**, 228 (1961).
13. Sandritter, W., Müller, D., Gensecke, O.: *Acta Histochem.* **10**, 139 (1960).
14. Stryckmans, P., Cronkite, E. P., Fache, J., Flidner, T. M., Ramos, J.: *Nature* **211**, 717 (1966).

Dr. P. Dörmer
Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlenforschung
D-8000 München 15, Landwehrstraße 61