

relation entre la non expression des anomalies du bec et des pattes induites par le bidrin et l'apport de nicotinamide. Toutefois, dans nos expériences, que ce soit avec le parathion ou le bidrin, la nicotinamide n'a révélé aucun effet antitératogène au niveau des structures vertébrales et il en est de même chez l'embryon de poulet⁴. A l'inverse, après emploi de la pralidoxime, les anomalies axiales (parathion et bidrin) sont très atténuées ou absentes alors que les déformations du bec et des membres (bidrin) demeurent pratiquement inchangées, du moins sur le plan phénotypique. Ces faits traduisent l'existence d'une pluralité dans le déterminisme des effets tératogènes induits par les organophosphorés.

Etant donné d'une part, les propriétés pharmacologiques respectives des esters phosphoriques et de la pralidoxime sur la jonction neuro-musculaire^{1, 14, 15} et

d'autre part, les effets tératogènes observés après des injections tardives de parathion^{4, 17}, il est probable que les déformations de l'axe vertébral observées après des traitements aux organophosphorés sont en rapport avec une modification profonde de la physiologie du système cholinergique. Cette interprétation est étayée par les résultats obtenus avec la toxine botulique¹⁸ et divers cholinomimétiques^{19, 20} qui engendrent également des anomalies de l'axe vertébral.

¹⁷ R. MEINIEL, C. r. Soc. Biol., Paris 167, 459 (1973).

¹⁸ P. D. F. MURRAY and D. B. DRACHMAN, J. Embryol. exp. Morph. 22, 349 (1969).

¹⁹ E. D. BUEKER and W. S. PLATNER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 539 (1956).

²⁰ W. LANDAUER, Teratology 12, 125 (1975).

Elektronenmikroskopisch-cytochemische Untersuchungen an glycerinierter Flugmuskulatur von *Locusta migratoria* L. Die Eisencolloidreaktion und Alcianblaubindung

Electron Cytochemical Studies on Glycerinated Flight Muscle of *Locusta migratoria* L. The Colloidal Iron Reaction and Alcian Blue Binding

K. ALLMANN¹

Fachbereich Biologie der Universität Konstanz, Postfach 7733, D-775 Konstanz (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 27. Dezember 1975.

Summary. Structural material reacting with colloidal iron and, particularly, after deamination binding with Alcian blue, can be demonstrated by means of the electron microscope in the sarcomeres of glycerinated locust flight muscle, especially in the I-bands. These metal bindings are eliminated by blocking reactions for acidic anionic groups, but not by hydrolytic enzymes.

In einer früheren elektronenmikroskopischen Untersuchung über die Eisen-III-Bindung in glycerinierter und myosinextrahierter, aldehydfixierter Flugmuskulatur von *Locusta migratoria* L. wurde unter Verwendung von Ammoniumeisen-III-sulfat als Ferridonator in den Flugmuskul-I-Bändern ferriphiles Strukturmaterial nachgewiesen². Inzwischen wurden in Säuger-, Frosch- und Fischmuskulatur Strukturmaterial vom Proteoglykantyp³ und in Insektenflugmuskel-I-Bändern und Z-Scheiben «C»-Filamente bzw. Strukturmaterial noch nicht bekannter Zusammensetzung identifiziert⁴. Im Hinblick auf diese Befunde wurde eine elektronenmikroskopische Charakterisierung des ferriphilen Strukturmaterials in *Locusta*-Flugmuskulatur mit Hilfe von Metallbindungs- und Spezifizierungsreaktionen versucht.

Material und Methode. Teile von Fibrillenfragmentpräparationen³ und Kryostatschnitte von kurz- und lang-glycerinierter indirekter *Locusta*-Flugmuskulatur wurden nach Aldehydfixierung mit Eisencolloidreagenz (Ammoniumferriglycerat)⁵ oder mit 0,1%- bzw. 1%-Alcianblau 8GX⁶ in 0,025 M Acetatpuffer, pH 4,6, ohne und mit MgCl₂-Zusätzen (in 0,2 M-Stufen bis zu einer Molarität von 1,0 M MgCl₂) nach der Methode der «Critical Electrolyt Concentration (CEC)» behandelt⁷. Als Aldehydfixative dienten 2,5%-Glutaraldehyd bzw. 4%-Formaldehyd in 0,1 M Phosphat- oder Cacodylatpuffer, pH 7,2, für die AB-Bindung auch in 0,025 M Acetatpuffer, pH 4,6 (Fixierungszeiten: 30 min und 2 h). Die AB-Inkubation wurde daneben noch gleichzeitig mit der Glutaraldehydfixierung vorgenommen⁸, ferner auch mit der Formolfixierung (obige Fixative, 0,1 bzw. 1% an AB-8GX). Zur Spezifizierung der für die Eisen- bzw. Cu-Phthalocyanin-Bindung verantwortlichen elektronega-

tiven Gruppen von Gewebepolyanionen wurden Teile des (ohne AB-Zusatz) fixierten Muskelmaterials folgenden Behandlungen zur Eliminierung der Metallbindung unterworfen: Blockierung der sauren Gruppen durch Methylierung (Veresterung⁹ und Alkylierung^{10, 11}) und Cetylpyridiniumchlorid-Behandlung¹²; Inkubationen mit

¹ Fräulein E. WELCKER danke ich für die fototechnischen Arbeiten und Frau P. ALLMANN für die Betreuung der Insektenzucht.

² K. ALLMANN, Cytobiologie 3, 282 (1971).

³ W. J. DOUGHERTY, J. Histochem. Cytochem. 17, 36 (1969). – W. J. DOUGHERTY und M. M. LEE, J. Ultrastruct. Res. 37, 1 (1970).

⁴ J. AUBER und F. COUTEUX, J. Microsc. 2, 309 (1963). – N. GARAMVÖLGYI, J. Ultrastruct. Res. 13, 409 (1963). – K. TROMBITÁS und A. TIGYI-SEBES, Acta biochim. biophys. hung. 9, 243 (1974) und 10, 83 (1975). – J. D. SAIDE und W. C. ULLRICK, J. molec. Biol. 79, 329 (1973) und 87, 671 (1974).

⁵ J. F. RINEHART und S. K. ABUL HAJ, Arch. Path. 52, 189 (1951). – J. H. HARDIN und S. S. SPICER, J. Cell Biol. 48, 368 (1971).

⁶ Alcian Blue 8GX = AB.

⁷ H. F. STEEDMAN, Q. Jl microsc. Sci. 91, 477 (1950). – J. E. SCOTT und J. DORLING, Histochemie 5, 221 (1965). – G. STERBA und G. WOLF, Histochemie 17, 57 (1969). – J. E. SCOTT, Histochemie 32, 191 (1972).

⁸ O. BEHNKE und T. ZELANDER, J. Ultrastruct. Res. 31, 424 (1970).

⁹ E. R. FISHER und R. D. LILLIE, J. Histochem. Cytochem. 2, 81 (1954).

¹⁰ J. Y. TERNER, J. Histochem. Cytochem. 12, 504 (1964).

¹¹ G. GEYER, Acta histochem. 14, 284 (1962).

¹² G. QUINTARELLI, J. E. SCOTT und M. C. DELLOVO, Histochemie 4, 86 (1964). – J. E. SCOTT und J. DORLING, Histochemie 5, 221 (1965).

Tris-Puffer niedriger Ionenstärke¹³, mit 0,1 N HCl¹⁴, ferner mit Nukleasen, Trypsin, Hyaluronidase und Neuraminidase. Teile der fixierten Muskelpräparationen wurden zur Intensivierung der AB-Bindung durch Proteindesaminierung^{7, 14, 15} und zur Prüfung der elektronenoptischen Anwendbarkeit dieser Methode zur Erzielung eines verstärkten Cu-Kontrastbildes einer Desaminierung¹⁶ unterworfen. Teile aller Muskelpräparationen wurden mit OsO₄ nachfixiert¹⁷. Nach Epon-Einbettung¹⁸ wurden Ultradünnabschnitte unkontrastiert und kontrastiert (Pb-Citrat¹⁹, 2% Uranylacetat, Doppelkontrastierung) bei 60 und 80 KV elektronenmikroskopisch ausgewertet.

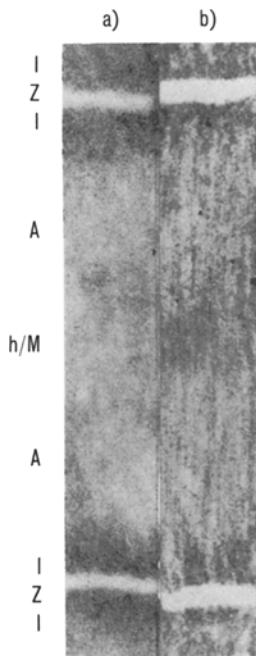


Fig. 1. Sarkomerausschnitte von langglycerinierter *Locusta*-Flugmuskulatur (Fibrillenfragmentpräparation; 20000×): a) nach Ammoniumferriglycerat-Behandlung; b) nach Desaminierung, Alcianblau 8GX-Behandlung und Pb-Schiffkontrastierung.

Ergebnisse. Nach Fe-Colloidbehandlung von aldehydfixierten Fibrillenfragmenten relaxierter, glycerinierter Flugmuskulatur findet man im reinen Fe-Kontrastbild partikuläre Fe-Ablagerungen prinzipiell in allen Querstreifenzenen der Flugmuskelsarkomere, jedoch in unterschiedlicher Verteilungsdichte (Figur 1, a). Sehr dicht sind die Fe-Partikel in den I-Bändern lokalisiert; in den an die Z-Streifen angrenzenden I-Bandzonen, also im Bereich der Insertion der «C»-Filamente und der Aktinfilamente in der Z-Scheibe, sind sie häufig zu kompakten Aggregaten mit einem Durchmesser von etwa 120–200 Å verdichtet (Figur 2, a). Viel weniger dicht und fast homogen in feiner Form sind die Partikel (Durchmesser etwa 15–30 Å) in den A-Bändern, zum Teil mit einer schwachen Verdichtungszone im Bereich der h/M-Region anzutreffen. Die Z-Streifen erscheinen bei schwächerer Vergrößerung elektronenoptisch leer, bei stärkerer Vergrößerung sind in diesen Feinpartikeln in relativ geringer Dichte identifizierbar (Figur 2, a). Die Schnittnachkontrastierung mit Uranylacetat bewirkt bei etwa gleichbleibender Partikeldichte und schwacher Ankontrastierung der Z-Streifen nur eine geringfügige Kontrastintensivierung. Eine Schnittkontrastierung mit Bleicitrat, ebenso in geringerem Umfang die OsO₄-Nachfixierung, führen unter Darstellung des üblichen Kontrastbildes der glycerinierten Flugmuskelsarkomere zu einer erheblichen Verminderung der Feinpartikelzahl bzw. -dichte (Figur 2, b).

Die Behandlung mit Alcianblau-8GX liefert sowohl in Kombination mit als auch anschliessend an Aldehydfixierung elektronenoptisch ein schwaches, fast homogenes Cu-Kontrastbild der Flugmuskelsarkomere, in dem

¹³ G. QUINTARELLI, Histochemie 2, 356 (1961).

¹⁴ G. QUINTARELLI, J. E. SCOTT und M. C. DELLOVO, Histochemie 4, 99 (1964).

¹⁵ K. ALLMANN, in Vorbereitung.

¹⁶ R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry* (McGraw-Hill Company, New York 1965).

¹⁷ G. MILLONIG, J. appl. Phys. 32, 1637 (1961).

¹⁸ J. H. LUFT, J. biophys. biochem. Cytol. 9, 409 (1961).

¹⁹ J. H. VENABLE and R. COGGESHALL, J. Cell Biol. 25, 407 (1965).

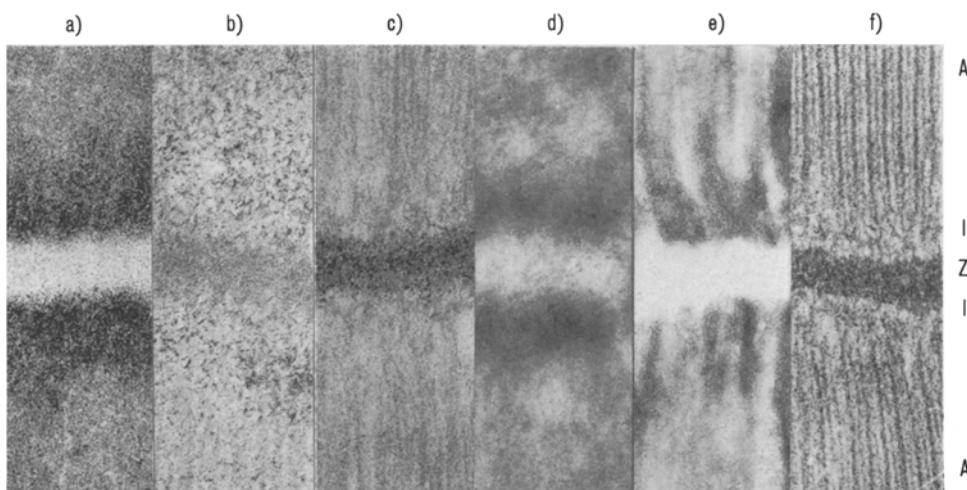


Fig. 2. I/Z/I-Sarkomerenregionen von langglycerinierter Flugmuskulatur (56000×): a) nach Ammoniumferriglycerat-Behandlung; b) wie a), mit OsO₄-Nachfixierung; c) nach Methylierung, Ammoniumferriglycerat und OsO₄-Nachfixierung; d) nach kombinierter Formolfixierung mit Alcianblauzusatz; e) nach Formolfixierung, Desaminierung, Alcianblau-Behandlung und kurzer Pb-Schiffkontrastierung; f) Strukturkontrolle-Fibrillenfragmentpräparation (ohne Fe- oder Cu-Behandlung), OsO₄-Nachfixierung und Pb-Schiffkontrastierung.

ausser einer I-Bandverdichtungszone kaum Strukturmerkmale erkennbar sind (Figur 2, d). Die Gründe hierzu sind neben dem geringen Elektronenstreuvermögen des Kupfers offenbar eine relativ geringe AB-Bindung im reaktiven Strukturmaterial infolge sterischer Anlagerungsbehinderung der grossen Cu-Phthalocyaninmoleküle durch Proteinaminogruppen, wie sie lichtmikroskopisch im Falle anderer Gewebe festgestellt wurde^{7,12}. Eine auf die Aldehydfixierung folgende Desaminierung bewirkt nämlich auch bei der glycerinierten Flugmuskelfibrille eine verstärkte AB-Bindung und somit elektroenoptisch sowohl eine Intensivierung als auch eine stärkere Differenzierung des Cu-Kontrastbildes¹⁵. Eine deutlich verstärkte AB-Bindung tritt in den I-Bändern und in der h/M-Region nach einer Desaminierungszeit von 2 bis 3 h bei 20°C bzw. von 18 bis 20 h bei 2°C ein. Die Bleicitrat-Schnittkontrastierung verstärkt dieses elektroenoptische Bild der Cu-Verteilung, wobei nach einfacher Formolfixierung eine Abschwächung des Z-Bandkontrastes in Abhängigkeit von der Kontrastierzeit infolge von Materialextraktion durch das alkalische Kontrastiermedium eintritt (Figuren 1, b und 2, e). Das alcianophile Strukturmaterial setzt am Z-Streifen an und erstreckt sich über das I-Band. Nach Desaminierung sind Aus-

läufer bis in den Anfangsbereich des benachbarten A-Bandes erkennbar (Figur 2, d und e). Die Uranylacetat-Schnittkontrastierung, ebenso die OsO₄-Nachfixierung, ergeben das Kontrastbild der glycerinierten Flugmuskelfibrille unter Darstellung der leicht gequollenen Filamente und der Z-Streifen.

Durch Methylierung werden beide Metallbindungsreaktionen in den I- und A-Bändern licht- und elektroenmikroskopisch völlig eliminiert, während in den Z-Streifen der positive Ausfall der Fe-Colloidreaktion im Fe-Kontrastbild zwar abgeschwächt wird, aber selbst bei langer Methylierungsdauer erhalten bleibt und durch OsO₄-Nachfixierung sogar verstärkt erscheint (Figur 2, c). Die Cetylpyridiniumchlorid-Behandlung blockiert die AB-Bindung in allen Sarkomerenzenen fast völlig. Dagegen führen Inkubationen mit hypotonischem *Tris*-Puffer, mit 0,1 N HCl oder hydrolytischen Enzymen zu keiner eindeutigen Abnahme der Metallbindungen; der partielle tryptische Abbau liefert ein AB- und Fe-Colloid-positives Muskelfragmentgerüst und die extensive Trypsinierung ein ungeordnetes, das gleiche Metallbindungsvermögen zeigendes Netzwerk, bestehend aus einer matrixartigen Masse, in welche die Mitochondrienstränge eingelagert sind.

Chemical Modification of Genetic Damage from Continuous Irradiation in Mice

A. K. BAJRAKOVA, T. PANTEV, I. T. NIKOLOV and I. M. RUPOVA

Institute of Radiobiology and Radiation Hygiene, P.O. Box 673, Sofia (Bulgaria), 6 August 1975.

Summary. It has been demonstrated that Adeturon (S-2-aminoethyl-iso-thiuronium adenosine triphosphate) showed a marked protective effect against translocations induction in mice germ cells after chronic γ -or neutron-irradiation.

Studies of the antiradiation potential of Adeturon (S-2-aminoethyl-iso-thiuronium adenosine triphosphate) have shown this compound to be highly effective in terms of integral measures of radiation damage¹⁻³. As it was further found that this compound is clearly able to protect germ cell heritable structures in the case of acute radiation exposures⁴, and to have low toxicity when given daily for a 3-week period (unpublished data), we were led to extend this line of inquiry to continuous irradiation.

In the present work spermatogonial irradiation effects were assessed cytologically by determining chromosome translocation rates in primary spermatocytes – a test of high significance in studying radiation response of premeiotic germ cell stages.

Materials and methods. Male H mice aged 3.5 months were given continuous exposure to a 900-rad mean total dose of ²²⁶Ra γ -rays at 1.0 ± 0.2 rad/h. C57BL males of the same age were exposed to a plutonium-beryllium source of 4.1 MeV neutrons at a rate of 0.08 ± 0.02 rad/h, receiving a mean total dose of 30 rad. Half the animals in each irradiation group were injected i.p. with daily Adeturon doses of 300 mg/kg body wt. in 0.5 ml aqueous solutions.

Three months following irradiation, the animals were killed to prepare testis slides by the method of EVANS et al.⁵. From each animal, 200–300 diakinesis-metaphase-I primary spermatocytes were examined. At this stage of spermatogenesis, 20 bivalents are normally formed. Chromosome translocations (symmetrical interchanges) are manifest as ring (R) or chain (C) multivalents.

Results. The Table shows the results of cytogenetic analysis in primary spermatocytes from mice given chronic γ -rays or neutrons, with or without daily Adeturon administration. 8-month-old untreated controls showed no chromosome translocations. Chronic 900-rad γ -rays produced translocations, amounting, as scored in primary spermatocytes, to 1.35%. The anomalies observed were exclusively quadrivalent rings and chains, in 1:2 ratio. With daily Adeturon administration, recovery of translocated cells fell to 0.60% ($0.01 < p < 0.02$).

For 30 rad chronic neutron exposure, the translocated cell frequency observed was 1.17%. Adeturon treatment reduced this genetic damage to 0.32% ($p \sim 0.005$). In this case also, the only forms of translocation observed were ring and chain quadrivalents.

Discussion. It is well known that a determining factor in modifying genetic response to a particular radiation dose is the time distribution of this dose. Studies of this point have clearly shown the amounts of chromosome translocations to diminish with decrease in γ -^{6,7} or X-ray⁸ dose rates. Our figure of 1.35% for translocated cell yield also indicated low dose-rate-irradiation to be quite inefficient in producing translocations. This effect has mostly been related to the possibility of repair of premutational changes in chromosomes, with a resulting reduction in the likelihood of interchange occurrence, though other factors also seem to be involved^{6,9}.

It has lately been shown that acute genetic damage may be effectively reduced by radioprotective compounds, applied singly^{4,10,11} or in mixtures^{12,13}. In the case of prolonged exposures, however, even established antira-