(Aus dem Lektorat für Fluoreszenzmikroskopie der Hochschule für Bodenkultur, Wien)

Bemerkungen zur Vitalfluorochromierung mit Akridinorange

Von FRANZ DANGL, Wien

Mit 4 Abbildungen

Die Akridinfarbstoffe, denen auch die medizinisch wichtigen Substanzen Trypaflavin, Atebrin, Coriphosphin und Rivanol angehören, sind auf das Akridin zurückzuführen.

Das als Fluorochrom dienende Akridinorange wurde von BENDER 1889 aus dem asymmetrischen Dimethyl-m-phenylendiamin aufgebaut und findet technologische Anwendung zur Färbung tannierter Baumwolle (Abb. 1).

Es hat basischen (kathodischen) Charakter, im dissoziierten Zustande ist der fluoreszierende Anteil als Kation vertreten.

Eine einfache Erkennungsmöglichkeit des kathodischen Charakters eines Fluorochroms ist in der Tüpfelreaktion (Kapillarprobe) gegeben, die von Friedrich GOPPELSRÖDER 1889 begründet, von F. FEIGL weiter ausgebaut und von LIESEGANG 1943 speziell für die Untersuchung von Fluorochromen empfohlen worden war.

Eine wäßrige Lösung des zu prüfenden Fluorochroms mit einem p_H-Wert zwischen 3 und 7 wird auf ein Blatt Filterpapier aufgetropft und sofort die kapillare Ausbreitung derselben unter gefiltertem ultraviolettem Licht (Analysenquarzlampe) beobachtet. Liegt das Fluoreszenzlicht nicht im blauen Spektralbereich, so kann auch Blaulicht zur Erregung herangezogen werden. Der fluoreszierende Anteil der Lösung breitet sich kapillar wesentlich langsamer aus als das Lösungsmittel Wasser. Daher ist am Filterpapier ein stark fluoreszierender Kern mit einem nichtfluoreszierenden Wasserrand an der Peripherie zu beobachten, wie in der tieferstehenden Abbildung zu erkennen ist (Abb. 2).

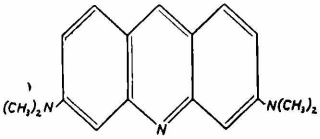

Abb. 1. Akridinorange.

Abb. 2. Tüpfelreaktion kathodischer Fluorochrome.

Die größte Bedeutung kommt der Kennzeichnung eines beobachteten Farbwertes zu, da rein beschreibende Angaben vielfach zu Widersprüchen führen.

Auch durch die Heranziehung der Ostwaldschen Farbwerte wird keine befriedigende Lösung erzielt, da für unser Auge nur der Kollektiveindruck der im Druck verteilten Pigmente zur Wahrnehmung gelangt. Spektroskopische Ausmessungen stellen hier wohl den einzig gangbaren Weg dar.

Besondere Beachtung verdient das jeweilige Verhalten des angewandten Fluorochroms.

Da derzeit bereits eine größere Anzahl von Veröffentlichungen über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unter Anwendung des Farbstoffes Akridinorange vorliegen, dürften einige zusätzliche Bemerkungen über das Verhalten desselben berechtigt sein, dies um so mehr, als parallel mit Fluoreszenzerscheinungen im allgemeinen photodynamische Wirkungen auftreten, worauf unter anderen bereits H. v. TAPPEINER, O. RAAB, J. GICKLHORN und P METZNER hinweisen.

Im Vergleich zu den Farbwertsangaben S. STRUGGERs wurden an reinen Akridinorangelösungen (Akridinorange von Dr. G. GRÜBLER, Leipzig, in aqua bidestillata) Messungen mit dem Spektralphotometer von KÖNIG und MARTENS durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Wolfram-Punktlampe. Bei jeder Messung, die von 10 zu 10 ÅE erfolgte, wurde sowohl mit dem ungefilterten Licht dieser Lampe als auch bei Zwischenschaltung einer zweiprozentigen Natriumnitritlösung als UV-Sperrfilter der jeweilige Extinktionswert ermittelt. Dadurch konnten charakteristische Fluoreszenzbanden auf einfache Art und Weise festgestellt, darüber hinaus aber auch die Wirkung fluoreszenz-

Akridinorange in wässeriger Lösung (nach STRUGGER)

Konzentration	Eigenfarbe	Fluoreszenz	Bemerkungen
1 : 100.000	gelb 2 ea	laubgrün 23 ia	
1 : 50.000	gelb 2 ga	laubgrün 23 na	entspricht annähernd der Konzentration im lebenden Plasma
1 : 10.000	gelb 2 pa	laubgrün 24 na	
1 : 5000	gelb 3 na	gelb pc grünlich	
1 : 1000	kreß 4 pa	gelb 3 na	
1 : 500	kreß 5 pa	kreß 4 na	
1 : 100	kreß 6 na	rot 7 pc	entspricht der Konzentration im toten Plasma

löschender Einflüsse, z. B. der wasserlöslichen Anteile des Glases der Aufbewahrungsgefäße, beobachtet werden. Über die Fluoreszenzlöschung liegen unter anderem auch eine Reihe von Untersuchungen ausländischer Forscher, vor allem F. M. PEKERMANNs aus dem Institute WAWILOWs, vor.

Die von STRUGGER als „Konzentrationseffekt" bezeichnete Farbänderung läßt sich auf diesem Wege meßtechnisch genau verfolgen. Sowohl über die Verlagerung der Fluoreszenzbanden als auch deren Löschung bei verschiedenen Konzentrationsstufen und bei Alterung der Lösung wird in einer gesonderten Veröffentlichung genauer berichtet.

Über diese allgemein bekannten Eigenschaften fluoreszierender Farbstoffe hinaus ist wohl das lichtelektrische Verhalten derartiger Substanzen außerordentlich interessant.

Wird eine Akridinorangelösung in einer Elektrolysenzelle mit gleichartigen Platinelektroden der Belichtung ausgesetzt und ein empfindliches Galvanometer angelegt, so lassen sich Photoströme in der Größenordnung von 10^{-8} bis 10^{-7} A feststellen. Diese Erscheinung läßt sich wohl als Becquerel-Effekt zweiter Ordnung deuten, über den bereits J. LIFSCHITZ und S. B. HOOGHOUDT, Chr. WINTER und andere berichteten.

Es ist nun zweifellos von größtem Interesse, daß sich der durch die vorerwähnte Elektronenabspaltung ausbildende Strom unterschiedlich verhält, wenn bei gleichbleibenden Elektroden reduzierende oder oxydierende Flüssigkeiten vorliegen. Es wird, wie sich bei Modellversuchen erwiesen hat, Anode und Kathode wechselweise vertauschbar, wenn die oberwähnten Faktoren gegeben sind.

Es ist somit denkbar, daß die Annahme einer vorgegebenen statischen Ladung an Membranen lediglich auf Grund eines Fluoreszenzbildes unter Berücksichtigung dieser Umstände einer Revision unterzogen werden muß.

Da photodynamische Effekte, die ja bekanntlich sogar zu Krankheitserscheinungen führen, durch die Energieeinstrahlung bei der Fluoreszenzerregung ausgelöst werden können, ist bei Vitaluntersuchungen mit möglichst energiearmer, also langwelliger Erregerstrahlung zu arbeiten. Es sind übrigens auch Fälle bekannt, wo durch Einwirkung fluoreszierender Substanzen heilende Einflüsse auftreten, worauf z. B. M. HECHT-ELEDA hinweist.

Der Vorgang der Löschung bestimmter Fluoreszenzbanden erschließt ein weites Feld derzeit noch unerkannter meßtechnischer Möglichkeiten. Es sei in dieser Hinsicht auf die Untersuchungen J. C. LEVADITIs über das fluoreszenzmäßige Verhalten von Bact. coli als Funktion des Alters der Bakterien hingewiesen, weiters auf das Auftreten periodischer Schwankungen des prozentualen Anteiles der grün fluoreszierenden Zellen an Hefekulturen, die Herr Dr. F. BÖHNEL in Zusammenarbeit mit dem Verfasser am Hygienischen Institut der Universität Wien feststellen konnte.

Die umstehenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen LEVADITIs und BÖHNELs. Es ist weiters zu erwarten, daß eine mathematische Untersuchung derartiger Kurven, z. B. nach den hypothetischen Ansätzen der Differentialgleichungen nach VERHULST, GOMPERTZ, VOLTERRA und anderen, neue Erkenntnisse bei der Auswertung derartiger Beobachtungen mit sich bringt (Abb. 3 und 4).

Über die mathematische Seite dieses Komplexes wird in einer gesonderten Veröffentlichung ein Überblick gegeben.

Auf Grund der vorgebrachten Tatsachen darf wohl die Vermutung ausgesprochen werden, daß eine genaue meßtechnische Verfolgung verschiedener Stoffwechselprozesse mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zu neuen Erkenntnissen führen wird.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

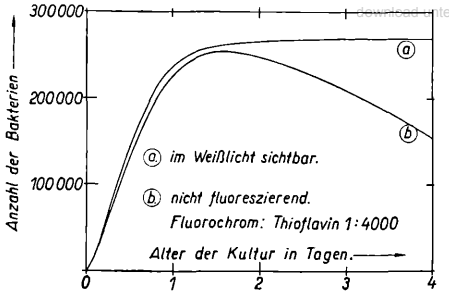

Abb. 3.

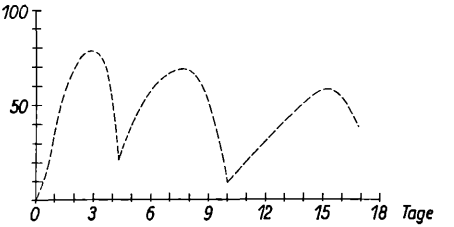

Abb. 4.

Abb. 3. Abhängigkeit des Fluoreszenzvermögens vom Alter der Bakterienkultur. (Nach LEVADITI).

Abb. 4. Abhängigkeit des Fluoreszenzvermögens von Saccharomyces cerevisiae vom Alter der Kultur. Ordinate: perzentueller Anteil der grün fluoreszierenden Zellen, bezogen auf die jeweilige Gesamtzahl.

Summary

In the paper entitled "Comments on the Colouration of Living Specimens with Acridine Orange" the author gives a detailed study of the physical behaviour of acridine dyes. This study is based on the findings of a number of scientists working in the same field. In the course of experiments undertaken by the author, the quenching of fluorescence was observed in detail by measuring its extinction with the aid of a König-Martens spectral-photometer. The phenomena of electronic emission was created by passing a ray of visible light through the solution which consisted of water (H_2O) and acridine orange 1:1000. This phenomena is classified as the Becquerel effect, second degree.

It is evident from the above that new aspects must be taken into consideration when living specimens, dyed with acridine orange, are studied under the fluorescence microscope.

Literatur

Bender, DRP. 59.179, DRP. 67.609, DRP. 68.908. — *Bommer S.*, Über sichtbare Fluoreszenz bei Menschen. Acta derm.-vener. **10** (1929): 253, 391. — *Dangl F.*, Ein vorteilhafter Spezialobjektträger für fluoreszenzmikroskopische Vitaluntersuchungen. Mikroskopie **4** (1949): 188—189. — *Ehrlich R.*, Untersuchung von toten und lebenden Bakterienzellen durch Färbeverfahren. Milchwiss. (Nürnberg) **4**, H. 8 und 9. — *Gicklhorn J.*, Über den Einfluß photodynamisch wirksamer Farbstofflösungen auf pflanzliche Zellen und Gewebe. Sitzber. Ak. Wiss., Wien 1914. — *Goppelsröder F.*, Über Kapillaranalyse und ihre verschiedenen Anwendungen sowie über das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen. Mitt. k. k. Techn. Gew.-Mus. Wien, Sect. Chem. Gew. (1888): 86—114; (1889): 14—49. — *Haitinger M.*, Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1938. — *Hecht-Eleda M.*, Zur kombinierten Trypaflavininjektions- und Höhensonnenbehandlung. Strahlenther. **30** (1928): 391—394. — *Leonhardtsberger F.* und *Pakesch F.*, Eigen-, Vital- und Intravitalfluoreszenz der Blutzellen. Wr. Z. inn. Med. **31** (1950): 8. — *Levaditi J. C.*, La Microscopie en Fluorescence des virus et des bactéries. Biol. méd. (Fr.) **35** (1946). — *Liefschitz J.* und *Hooghoudt S. B.*, Untersuchungen über den Becquerel-Effekt. Z. physik. Chem. **128**. — *Metzner P.*, Zur Kenntnis der photodynamischen Erscheinungen. Biochem. Z. **128** (1924). — *Meyer zu Schweicheln*, Über Vitalfärbung von Gonokokken. Arch. Derm. **183** (1942/43): 464. — *Pekerman F. M.*, Concentration Quenching of Fluorescence of Dyes in Solution in the Presence of foreign Quenchers. C. R. l'ac. Sciences URSS. **52** (1946): 767—769. — *Raab O.*, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Biol. **39** (1900): 524. — *Strugger S.*, Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. u. H. Schaper, Hannover 1949. — *v. Tappeiner H.*, Über die Wirkung von Phenylchinolin und Phosphinen auf niedere Organismen. Arch. klin. Med. (1895): 56. — *Tappeiner* und *Jodlbauer*, Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. F. C. Vogel, 1900. — *Tchan Y. T* et *Augier J.*, A l'Etude de la Variation de la Fluorescence avec l'Age des Bactéries. Ann. Inst. Pasteur, Par., **76** (1949), 4: 374—376. — *Winter Chr.*, Über den Becquerel-Effekt. Z. physik. Chem. **145**.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: 5

Autor(en)/Author(s): Dangl Franz

Artikel/Article: Bemerkungen zur Vitalfluorochromierung mit Akridinorange. 140-142