

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 157264 B

(21) Patentansøgning nr.: 2824/80

(22) Indleveringsdag: 30 jun 1980

(41) Alm. tilgængelig: 11 mar 1981

(44) Fremlagt: 27 nov 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 10 sep 1979 IT 25568/79

(51) Int.Cl.<sup>4</sup> G 01 N 33/52  
C 12 Q 1/06

(71) Ansøger: \*E.N.I. ENTE NAZIONALE IDROCARBURI; Piazzale E.Mattei 1; Rom, IT

(72) Opfinder: Ivo \*Giannini; IT, Vittorio \*Baroncelli; IT

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Middel til undersøgelse af biologiske væv og/eller væsker

(56) Frømdragne publikationer

US pat. nr. 3899297, 4094745  
Andre publikationer. B. Romeis: Mikroskopische Technik,  
16. udgave 1968, side 185-93.

(57) Sammendrag:

2824-80

Til undersøgelse af biologiske væv og/eller væsker anvendes et middel bestående af:

- a) et farvestof valgt blandt xanthen-, azin-, oxazin- eller acridinrækkerne, eller blandt vandopløselige farvestoffer af "diaz" rækkerne eller triphenylmethan
- b) et medium, der er foreneligt med det biologiske væv og/eller væske,
- c) et stof, der er i stand til hurtigt at deexcitere farvestofmolekylerne, når det møder dem (dvs. en støddonor).

Ved hjælp af midlet opnås, at biologiske væv og/eller væsker kan undersøges ved en fremgangsmåde, ved hvilken prøven med stof, der skal undersøges, efter behandling med midlet udsættes for belysning med en første stråle pulsllys derefter gennemlyses med en anden stråle monochromatisk lys, hvis udgående intensitet registreres og analyseres som funktion af tiden.

Herved kan individuelle celler i biologiske væv og/eller væsker karakteriseres og det både automatisk og på blot få sekunder.

Opfindelsen angår et særligt middel, der er vel-  
egnet til undersøgelse af biologiske væv og/eller  
væsker, dvs. til at kontrollere tilstedeværelsen  
af særlige indholdsstoffer i dem, af den type, der  
indeholder et farvestof valgt blandt xanthen-, azin-,  
5 oxazin- eller acridinfarvestofferne eller vandopløse-  
lige diazofarvestoffer eller triphenylmethan-farve-  
stoffer i en koncentration af hele midlet på  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M,  
og en vandig, fysiologisk saltopløsning, som er  
isotonisk og forenelig med det biologiske væv og/eller  
10 væske. Den angår også anvendelsen af det nævnte  
middel til undersøgelse af biologiske væv og/eller  
væsker. Til fuldstændig forståelse af den omhandlede  
opfindelses område og hensigt er det fordelagtigt  
at betragte visse almene begreber, der udgør det  
15 teoretiske grundlag for det betragtede område.

Når et stof absorberer synligt eller ultraviolet  
lys, er det kendt, at en elektron deri går fra dens  
grundtilstand til en exciteret "singlet" tilstand.

Derpå kan der forekomme intersystematiske over-  
20 gange med dannelsen af metastabile "triplet" tilstande,  
hvor elektronen forbliver fangede, indtil deexcitering  
finder sted ved en stødproces (ved sammenstød med et  
andet molekyle) eller ved lysudsendelse (phosphorescens)  
eller ved andre processer, der alle er relativt langsom-  
25 me.

Disse fænomener bestemmes let hos forskellige  
kategorier naturlige og syntetiske farvestoffer.

En fremgangsmåde der er alment anvendt til  
studium og kvantitativ bestemmelse af disse fænomener  
30 er den såkaldte flash-fotolysemetode, hvori prøven  
der indeholder det stof, der skal undersøges, udsættes  
for strålingen fra en pulsluskilde (flash), der bringer  
et diskret antal farvede molekyler i den exciterede  
elektrontilstand.

35 De ovennævnte processers forløb observeres ved  
at bestemme prøvens absorption af en kontinuert mono-  
chromatisk lysstråle, idet denne registreres mod tiden  
af et passende elektronisk apparat (oscilloskop etc.).

Denne type fremgangsmåde har de senere år gennemgået betydelige fremskridt med hensyn til større følsomhed, der kan opnås ved at anvende pulserede lasere som exciteringskilden.

Det er ikke kendt at anvende fremgangsmåder af den ovennævnte type til at studere og karakterisere biologiske væv og/eller væsker med den bemærkelsesværdige undtagelse af det tilfælde, hvori vævet, der undersøges, indeholder en stor mængde fotosensitivt naturligt stof som i tilfældet med pigmenterne fra chlorofylfotosyntese, rhodopsin og carboxyhæmoglobin.

I denne henseende undergår flashlyset i tilfældet med et væv, der kun er let farvet, fortrinsvis diffusionsprocesser fremfor absorption. Imidlertid kan vævet farves med syntetiske farvestoffer som det er kendt fra observationsmetoder med optisk mikroskop. I denne henseende betyder det faktum, at det lykkes farvestoffet at farve et væv, at det på en eller anden måde bindes til det.

Der er imidlertid mindst to grundlæggende problemer ved anvendelse af flash-fotolyseteknikker i denne sammenhæng i prøver med stærke diffusionsvirkninger.

For det første, eftersom de bundne farvestofkoncentrationer er temmelig små, har det været tvivlsomt om der kunne opnås signifikante signaler ved denne fremgangsmåde. For det andet var det ikke tidligere forudsigeligt, at signaler der stammer fra absorptionskarakteristika i farvestoffets metastabile tilstande ville være forskellige i tilfældet med et farvestof, der er bundet til et særligt væv, fra de der stammer fra molekyler i opløsning eller er bundet anderledes.

Der kendes forskellige fremgangsmåder til undersøgelse af biologiske materialer ved farvning, bestråling og måling af spektraldata.

Fra US patentskrift nr. 3.899.297 kendes en fremgangsmåde til karakterisering af organiske,

kemiske forbindelser under anvendelse af biologisk farvning. Ved denne fremgangsmåde udsættes den kemiske forbindelse samtidig for en blanding af mindst 2 forskellige farvestoffer, som bindes til den kemiske forbindelse med forskellige bindingsenergier. Dernæst exciteres en spektralreaktion i den farvede forbindelse ved bestråling, og denne reaktion observeres ved mindst to forskellige bølgelængdebånd i spektret, til opnåelse af forskelle i bindingsintensiteter, der er karakteristiske for denne forbindelse.

I US patentskrift nr. 4.094.745 beskrives en fremgangsmåde til hurtig farvning af mikroorganismer med fluorochrome farvestoffer for at gøre dem synlige ved U.V.-bestråling og betragtning under mikroskop. Ved denne fremgangsmåde modificeres farvestofreceptorstederne i mikroorganismer ved behandling med fosfat, hvorefter der farves med fluorochromfarvestof, der bindes til receptorstederne via fosfatbindeled. Ved denne fremgangsmåde kan man uspecifikt tælle mikroorganismer og desuden skelne levende fra døde organismer.

I B. Romeis, Mikroskopische Technik, 16. udgave, 1968, side 185-93, gives en oversigt over metoder til farvning af levende væv og celler med henblik på observation i mikroskop. De omtalte elektive farvemethoder, dvs. farvning af bestemte væv, bygger på at visse farvestoffer under visse betingelser bindes til bestemte væv. Disse metoder er derfor besværlige og ofte ikke særlig nøjagtige.

Der er således behov for en hurtig og effektiv fremgangsmåde til karakterisering af de individuelle celler, der er tilstede i et væv eller en væske, ved hvilken de ovennævnte problemer i forbindelse med flash-fotolysemetoden undgås.

Det har nu overraskende vist sig at dette opnås ved at fremstille addukter af det pågældende indholdsstof i det biologiske væv og/eller væske med et farvestof, der er syntetisk eller

i det mindste ikke til stede i fysiologiske væsker eller opløsninger, ved at bringe en prøve, der skal undersøges, i kontakt med midlet ifølge opfindelsen, der er ejendommeligt ved, at det også indeholder et stof, der når det møder farvestofmolekylerne er i stand til hurtigt  
5 at deexcitere dem (quencher), og som består af kaliumiodid, natriumiodid eller et salt af et paramagnetisk overgangsmetal, idet denne forbindelse foreligger i en koncentration på 0,01 til 0,2M.

Som anført består præparatet, der danner adduktet med det fysiologiske indholdsstof af: a) et farvestof  
10 valgt blandt azin, oxazin, acridin- eller xanthenrækkerne eller blandt visse vandopløselige farvestoffer fra "diazo"-rækken eller triphenylmethan, b) et medium, der er foreneligt med det fysiologiske indholdsstof, og som  
15 består af en vandig opløsning, der indeholder forskellige salte såsom NaCl, CaCl<sub>2</sub> og lignende i en koncentration, således at det er isotonisk med den fysiologiske komponent (0,1 til 1 vægt%) og andre komponenter i små andele, såsom glucose, pufferblandinger etc.,  
20 der er tilsat for at betinge de tilstedeværende cellers vitalitet, idet mediets pH kan variere i en vis grad omkring neutral (fra pH 4,5 til pH 9,5), og idet der kan tilsættes små mængder organiske opløsningsmidler for at forøge farvestoffets opløselighed, samt c) en quencher  
25 (dvs. som forårsager hurtig deexcitering af farvestofmolekylerne, når de to molekyler støder sammen), der kan være kalium- (eller natrium-)iodid (fra 10<sup>-2</sup> til 0,2 M), eller saltet af et paramagnetisk overgangsgruppemetal (fra 10<sup>-2</sup> til 0,2 M Co, Fe, Ni, valgt i form af CoCl<sub>2</sub>  
30 eller lignende), muligvis i nærværelse af et chelaterende stof såsom ethylendiaminotetraeddikesyre (EDTA).

Midlet, der er anført ovenfor, anvendes til at udføre en undersøgelsesmetode for biologiske væv og/eller væsker.

Denne fremgangsmåde består i, at prøven med stof, der skal undersøges, først behandles med præparatet, derefter udsættes det resulterende stof for stråling med en første stråle pulsllys, derefter gennemlyses den således behandlede prøve med en anden stråle monochromatisk lys, og derefter analyseres den udgående optiske intensitet af denne sidste som funktion af tiden.

Det har på denne måde vist sig, at de signaler, der stammer fra absorptionen af metastabile tilstande i farvestofmolekyler, der er bundet i de celler, der skal undersøges, er afgjort forskellige i amplitude og/eller tidsvariation fra de, der stammer fra molekylerne i opløsning eller fra andre celler.

Det lykkes derved ved fremgangsmåden at karakterisere de individuelle celler, der er til stede i vævet.

Denne fremgangsmåde har vist sig særlig egnet til at undersøge gærcellekulturer, til at skelne døde celler fra levende celler, og gærcellerne fra bakterieceller samt ved den kvantitative analyse af blodleucocyter.

Fremgangsmåden er på den ene side i stand til at give automatiske målinger (der blot tager nogle få sekunder) som erstatning for lange og besværlige rutineprocedurer, der er nødvendige i tilfældet med optisk mikroskopi. Den er også i stand til at angive karakteristika, der ikke kan skelnes med øjet, angående farvestoffets specifikke molekulære vekselvirkning med nogle af celleindholdsstofferne.

Den kan derfor anvendes til undersøgelser, der for nuværende ikke kan udføres, eller som kun er mulige under anvendelse af meget mere komplicerede fremgangsmåder. Især er det let at forudse dens anvendelse ved tumordiagnose på grund af muligheden for kvantitativt at bestemme DNA-farvestofvekselvirkningen.

Figurfortegnelse

5           Fig. 1 viser som et eksempel et diagram af  
apparatet, der er blevet anvendt ved disse undersøgelser.

          Fig. 2 er en graf, der viser resultatet af  
en måling af antal døde celler ved hjælp af et middel  
ifølge opfindelsen angivet ved den transiente absorption  
10 som funktion af tiden.

          Fig. 3 er en graf, der viser amplityden som  
funktion af antallet af døde celler ved en måling  
som nævnt i forbindelse med fig. 2.

          Fig. 4 er en graf, der viser resultatet af  
15 en måling af DNA-mængden i væv under anvendelse af et  
middel ifølge opfindelsen, angivet ved amplityden  
som funktion af tiden.

          Fig. 5 er en graf, der viser amplityden som  
funktion af DNA-indholdet ved målingen nævnt i forbind-  
20 else med figur 4.

          Fig. 6 er en graf, der viser resultatet af  
en måling af monocytantal i blod under anvendelse af  
et middel ifølge opfindelsen. Grafen viser amplityden  
som funktion af tiden.  $\Delta V$  er proportional med mono-  
25 cyttallet.

          Fig. 7 er en graf, der viser resultatet af  
en måling af leucocytantallet i blod under anvendelse  
af et middel ifølge opfindelsen. Grafen viser amplityden  
som funktion af tiden og bredden af trinnet svarende  
30 til excitationen af tripletttilstanden i farvestof-  
fet har korrelation til leucocytantallet.

I fig. 1 er  $S_1$  en kviksølvlampe, og  $S_2$  er en laserstråle.  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  og  $L_4$  er kvartslinser.  $M_1$  og  $M_2$  er spejle, og  $D_1$  og  $D_2$  er faststofdetektorer, der registrerer laserpulsen. MC er en højlysstyrkes monochromator. S angiver prøvens placering, og PM er en fotomultiplikator. Filtre og blændere er udeladte af hensyn til overskueligheden.

Den pulserede lysstråle blev opnået fra en Nd-laser, nemlig en kommerciel YAG (Chromatix mod. 10 1000), der udsender lyspulser på 0,1 til 0,5 mJ med ca. 150 ns længde og med en gentagelsesfrekvens på ca. 50 Hz.

Laserfarven er variabel fra blå ( $\lambda = 473$  nm) til nær infrarød. Observationsstrålen blev fremstillet med en passende filtreret højtrykskviksølvlampe. Begge strålerne blev fokuseret i et område af prøven med ca. 0,2 mm's diameter, således at der blev dannet en vinkel på ca.  $15^\circ$  mellem dem. Prøvecellen var 2 mm tyk. Lysen fra lampen passerede gennem en monochromator med stor åbning og blev ført til en fotomultiplikator (Philips XP 1113). Det elektriske udgangssignal fra fotomultiplikatoren blev registreret kontinuert som middelværdien og blev også ført til en forforstærker med et båndpas mellem 0,5 kHz og 30 MHz og derpå forstærket, registreret på et digitalt lager og lagret i en lille computer (LABEN 70).

Signalet, der blev opnået fra en enkelt puls, blev registreret og adderet til det fra hundreder analoge pulser. Således blev der opnået en signalmiddelværdi, hvori støjen var reduceret med en faktor på mere end 10 i forhold til det signal, der fremkommer fra en enkelt puls. Eftersom pulsernes gentagelsesfrekvens var relativt høj, blev resultatet af målingen opnået på blot nogle få sekunder. Oplagringen i computeren gjorde reproduktion og behandling af signalet mulig under anvendelse af magnetbånd, plottere osv.

Det lagrede signal indeholder en betydelig mængde data, såsom absorptionens amplitude ved forskellige

observationsbølgelængder og dens variation med tiden.

Hvis denne amplitude er  $V(\lambda, t)$ , er det i almindelighed muligt at fastlægge  $\lambda$  og  $t$  således, at:  
 $V(\lambda_0, t_0) = k_1 + k_2 n_c$ , hvor  $n_c$  er antallet af  
 5 celler, der er relevante til formålet, og  $k_1$  og  $k_2$  er konstanter, der kan opnås ved en kalibrering, dvs. ved at indføre en prøve med kendt sammensætning i apparatet.

#### Eksempel 1

Undersøgelse af cellekulturer. Vitalitetsundersøgelse.

10 Fremgangsmåden anvendes på gærkulturer af Saccharomyces-typen, såsom Saccharomyces lactis, Saccharomyces fragilis eller lignende.

Undersøgelsen giver et kvantitativt mål for antallet af døde celler, der er til stede under gæringen.

15 Eksperimentelt:

Celleprøven, der skal undersøges blandes med en blanding, der indeholder  $10^{-4}$  Trypan Blue sammen med, for hver liter, 0,1 g  $\text{NaN}_3$ , 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  indstillet til pH 7,2 med KOH, og 8,76 g NaCl. Der tilsættes  $\text{CoCl}_2$   
 20 til en endelig koncentration på  $10^{-2}$  M i nærværelse af en ligeså stor koncentration EDTA. Blandingen omrøres i nogle få minutter og måles derpå med apparatet, der er beskrevet ovenfor.

Prøven belyses i en 2 mm celle under anvendelse  
 25 af den pulserede laser ved  $\lambda$  659 nm, og absorptionsvariationerne ved  $\lambda = 405$  og 435 nm observeres efter et mikrosekunds forsinkelse fra laserpulsens. Kalibrering er nødvendig for at måle den observerede amplitude imod laserpulsens amplitude, den optiske indstilling  
 30 osv. Til dette formål anvendes en suspension, hvori gærcellerne tælles og derpå alle dræbes ved kogning i nogle få minutter.

Resultater:

I fig. 2 angiver ordinaten den transiente absorption (i mV) observeret ved  $\lambda = 435$  nm, når en suspension, der indeholder delvist dræbte Saccharomyces lactis celler og Trypan Blue, udsættes for pulseret strå-

ling ved  $\lambda$  659 nm som beskrevet ovenfor. Abscissen angiver tiden i mikrosekunder ( $\mu$ s).

I fig. 3 angiver ordinaten den transiente amplitude (i mV) observeret efter 1  $\mu$ s fra begyndelsen af 5 laserpulsens. Abscissen angiver det procentvise indhold af døde celler i suspensionen aflæst på konventionel vis, dvs. ved tælling med optisk mikroskop.

Korrelationen er meget god og muliggør, at antallet af døde celler kan måles automatisk på blot 10 nogle få sekunder. Den opnåelige følsomhed kan variere omkring 100 til 1000 celler/ $\text{mm}^3$ , dvs. mindre end 1% af den totale population, der er til stede i gæringsvæsken.

#### Eksempel 2

Undersøgelse af cellekulturer.

15 Forurening med forskellige stammer.

Det samme middel, der blev anvendt til reaktionsblandingen i eksempel 1, og som indeholder Trypan Blue, muliggør, at forskellige typer celler i en gæring kan skelnes. For to forskellige gær af *Saccharomyces* 20 typen har transienten, der observeres ved  $\lambda = 435$  nm, en forskellig variation med tiden, f.eks. er halveringstiden (dvs. det tidsrum, hvori den transiente amplitude reduceres med en faktor 2) 2,3  $\mu$ s for *Saccharomyces lactis* og 1,7  $\mu$ s for *Saccharomyces fragilis*.

25 Der observeres ingen transient hos døde bakterieceller af *Arthrobacter* typen. Fremgangsmåden er derfor velegnet til at undersøge gærforurening i bakteriekulturer eller til at skelne mellem forskellige gær. Til dette formål udtages prøven, der skal analyseres, alle 30 cellerne, der er til stede, dræbes ved kogning i nogle få minutter, prøven behandles derpå med blandingen, der indeholder farvestoffet, og derefter udføres målinger af amplituden og henfaldstiden for den registrerede transient ved  $\lambda = 435$  nm, når prøven belyses med pulser 35 med  $\lambda = 650$  nm.

10  
Eksempel 3

Måling af DNA mængden, der er til stede i væv.

5 Fremgangsmåden er egnet til kvantitativ måling af nucleinsyrer, der er til stede i humane celler. Til denne undersøgelse blev der anvendt hvide blodceller i forskellige præparater.

10 Prøver, der indeholder forskellige celler med let målelige mængder DNA, opnås fra epariniseret humant blod ved kendte fremgangsmåder, der omfatter centrifugering i en Ficoll-gradient. En lineær Ficoll-gradient fra 18 til 15% anvendes, cellerne, der er lagdelt på gradienten, centrifugeres i 5 minutter ved 50 x g og i 7 minutter ved 250 x g. Der opnås forskellige bånd, der, når de renses, indeholder lymfocytter, monocytter 15 og granulocytter med små mængder røde blodlegemer. De således opnåede hvide celler tælles og analyseres på strips med et mikroskop under anvendelse af sædvanlige metoder. Dette muliggør, at der kan udføres en kvantitativ bedømmelse af det DNA, der findes i prø- 20 ven, eftersom det gennemsnitlige indhold af chromatin i hver type celle er kendt.

De forskellige opnåede fraktioner farves både separat og sammenblandet i kendte andele.

25 For at farve dem centrifugeres cellerne og suspenderes i en opløsning, der indeholder  $5 \times 10^{-5}$  M acridinorange i en fysiologisk opløsning, der indeholder 0,05 M phosphatpuffer ved pH 7,2 og som også indeholder  $10^{-2}$  M  $\text{CoCl}_2$  og  $10^{-2}$  M EDTA.

30 Den opnåede suspension pulsbelyses under anvendelse af det tidligere beskrevne apparat ved en bølglængde mellem  $\lambda = 473$  og  $\lambda = 532$  nm.

Den observeres med kontinuert lys ved  $\lambda = 435$  nm.

Den samme procedure følges for en prøve, der indeholder de samme reagenser men uden farvestoffet. 35 Denne sidste operation er nødvendig eftersom små tilstedeværende mængder carboxyhæmoglobin kunne bidrage til den transiente absorption.

Transienten, der opnås under anvendelse af prø-

ven uden farvestoffet, subtraheres fra den der opnås med den fuldstændige blanding til opnåelse af resultatet, der er vist i fig. 4.

Ordinaten angiver transientens amplitude (i mV) og abscissen tiden i  $\mu$ s.

Den transiente absorptionsvariation observeres ved  $\lambda = 435$  nm under belysning af en suspension, der indeholder humane granulocytter og acridinorange ved  $\lambda = 532$  nm som beskrevet tidligere.

Pulsens amplitude 1  $\mu$ s efter belysning med laseren er proportional med prøvens DNA-indhold som vist i fig. 5. I denne figur vises transientens amplitude (i mV) som funktion af DNA-indholdet (udtrykt som mg/l) for forskellige typer celler, nemlig lymfocytter og monocytter i forskellige forhold, eller monocytter alene, eller granulocytter alene, eller udelukkende leucocytter.

Prøverne indeholder variable mængder erythrocytter og stammer fra forskellige donorer.

Det faktum, at denne proportionalitet opnås for forskellige indhold af forskellige celler, der er indsamlet fra forskellige individer, gør det sandsynligt, at fremgangsmåden også med tillid kan anvendes til biologisk væv af anden oprindelse såsom epitelvæv etc.

Målingen af DNA-indholdet sammen med målingen af antallet af celler, der er til stede i vævet kunne være væsentlig ved den tidlige diagnose af cancer tilstande.

#### Eksempel 4

Karakterisation af leucocytter i humant blod.

Fremgangsmåden anvendes til blodprøver, der er blevet gjort ikke-klumpende.

Fremgangsmåden giver en kvantitativ bedømmelse af det totale antal leucocytter og antallet af granulocytter, monocytter og lymfocytter.

Eksperimentelt.

En prøve humant veneblod, der er blevet gjort

ikke-klumpende med heparin i en koncentration på 0,1 til 0,2 mg/ml blod, eller med natrium-EDTA i en koncentration på 1 mg/ml, tilsættes en 3,5% opløsning af dextran (molvægt 250.000) indtil en endelig koncentration på 1,5%, blandingen holdes derpå i en termostat ved 37°C i 20 minutter. Den øverstliggende væske fjernes, hvilken væske indeholder de hvide celler og ca. 1% af de røde celler, og der tilsættes destilleret vand for at sænke saltkoncentrationen til 0,25 ‰ (tusinde-

10 dele). Efter nøjagtig 30 sekunder genoprettes den isotonske karakter ved tilsætning af 3,5 ‰ vandig NaCl.

Cellerne opsamles ved centrifugering ved 400 g (tyngdeacceleration) i 5 minutter og opslemmes derpå i vandig 0,9% NaCl eller fosfatpuffer pH 7,1, 0,1 M i et sådant rumfang, at antallet af lymfocytter er omkring 8000 pr. mm<sup>3</sup>. Udvindingen af leucocyterne er ca. 95% med en procentvis sammensætning, der ikke kan skelnes fra blods, de røde celler, der bliver tilbage, findes i et forhold på ca. 1:1 med de hvide celler.

20 Målingerne udføres på 200 mikroliter cellesuspension i en celle med 2 mm's optisk vej, hvortil der tilsættes farvestof og en støddonor; cellerne kan være fikserede forinden.

Mere specielt er de følgende indfarvningstekniker blevet anvendt.

25

Til cellesuspensionen sættes CoCl<sub>2</sub>-EDTA-støddonoren plus Brilliant Green i en endelig koncentration på henholdsvis 10<sup>-2</sup> og 9 x 10<sup>-4</sup> M. En anden indfarvningsteknik er at fikserer cellerne med ethanol ved en endelig koncentration på 12 ‰ (tusindedele). Efter 1 minut tilsættes CoCl<sub>2</sub>-EDTA og Brilliant Cresyl Blue i en endelig koncentration på henholdsvis 10<sup>-2</sup> og 5 x 10<sup>-5</sup> M. En tredje indfarvningsteknik, der viste sig anvendelig, er som den anden der er beskrevet her, men 35 farvestoffet er Nile Blue ved 8 x 10<sup>-5</sup> M.

De således opnåede prøver belyses derefter med det pulserede lasersystem, der er beskrevet i den indledende del af denne beskrivelse, ved  $\lambda = 659$  nm og ob-

serveres med monochromatisk lys ved  $\lambda = 435$  nm og derefter  $\lambda = 547$  nm. Med to forskellige indfarvningsteknikker kan der således opnås fire forskellige transienter, hvis karakteristika er således, at de korreleres med de størrelser, der skal måles.

Resultater:

Observationen af de således behandlede blodprøver korreleres med det der opnås med de konventionelle metoder, dvs. ved mikroskopiske observationer af helblodsstreger.

I fig. 6 og 7 er der som eksempel anført nogle få sådanne transienter. Nærmere viser fig. 6 amplituden i mV, som observeret ved  $\lambda = 547$  nm, i prøven, der var farvet med Brilliant Cresyl Blue og fikseret med ethanol, abscissen viser tiden i  $\mu$ s. Amplituden  $\Delta V$  som målt i figuren mellem toppen og værdien efter lang tid er proportional med det totale antal monocytter. Det bør bemærkes, at i dette eksempel er tilstedeværelsen af Co-EDTA væsentlig for at bestemme ophøret af signalerne, der kommer fra andre celler eller fra de frie farvestoffer. Fig. 7 viser transienten, som observeret ved  $\lambda = 435$  nm, i prøven, der var farvet med Brilliant Green (ordinaten er i mV og abscissen i  $\mu$ s som i det foregående tilfælde). Bredden af det trin, der svarer til excitationen af triplettilstanden i farvestoffet, der formodentlig er bundet til den cellulære kerne, som observeret på mikroskopet, kan korreleres godt med det totale antal leucocyter.

Henfaldets udvikling er endvidere tofaset, som det ses i figuren. Det hurtige trin, der bekvemt måles både ved  $\lambda = 435$  nm og  $\lambda = 547$  nm, er, endeligt, proportionalt med antallet af lymfocytter. Således er alle de tre uafhængige parametre (antallet af lymfocytter (l), antallet af monocytter (n) og antallet af granulocytter (g)) blevet bestemt, idet det totale antal leucocyter (n) er lig med summen af de tre, dvs.  $n = l+m+g$ .

Det bør bemærkes, at kun en lille del af den information, der er indeholdt i de registrerede kurver

for de observerede transienter er blevet anvendt til disse bestemmelser, og den uafhængige observation af triplettilstandenes henfaldstider og forholdene mellem amplituderne ved forskellige  $\lambda$ -værdier er til rådighed 5 til at udføre undersøgelser af anden art, såsom f.eks. at indikere tilstedeværelsen af patologiske celler.

## P A T E N T K R A V

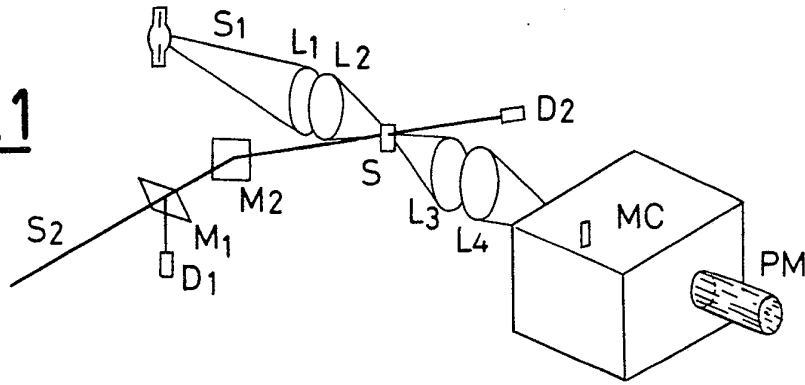
1. Middel til undersøgelse af indholdsstoffer  
10 i biologiske væv og/eller væsker indeholdende:  
a) et farvestof valgt blandt xanthen-, azin-, oxazin- eller acridinfarvestofferne eller vandopløselige diazofarvestoffer eller triphenylmethan-farvestoffer i en koncentration af hele midlet på  $10^{-5}$ - $10^{-4}$ M, og  
15 b) en vandig, fysiologisk saltopløsning, som er isotonisk og forenelig med det biologiske væv og/eller væske, k e n d e t e g n e t ved, at det også indeholder et stof, der, når det møder farvestofmolekylerne, er i stand til hurtigt at deexcitere dem  
20 (quencher), og som består af kaliumiodid, natriumiodid eller et salt af et paramagnetisk overgangsmetal, idet denne forbindelse foreligger i en koncentration på 0,01 til 0,2M.

2. Anvendelse af midlet ifølge krav 1 til  
25 undersøgelse af biologiske væv og/eller væsker.

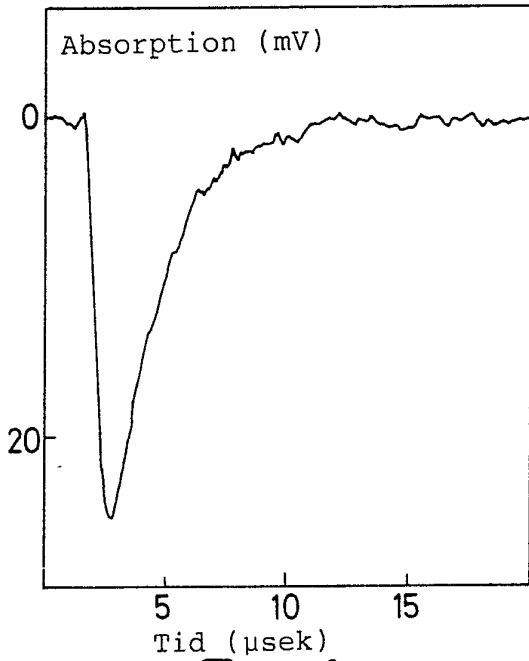
30

35

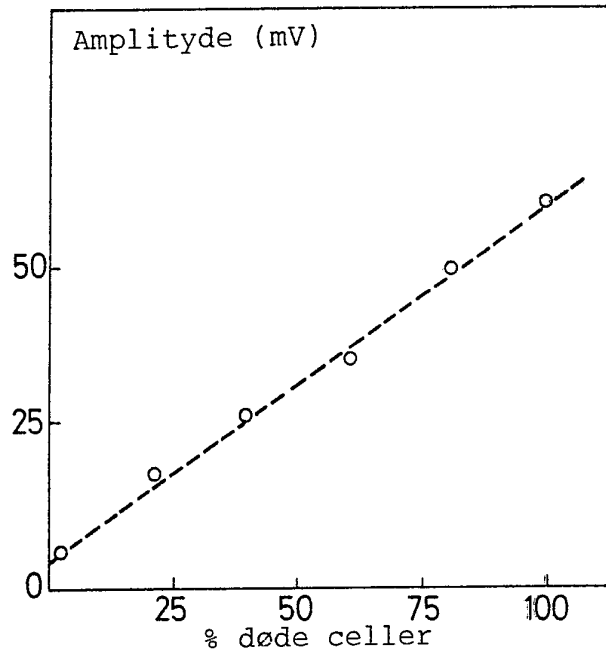
**Fig. 1**



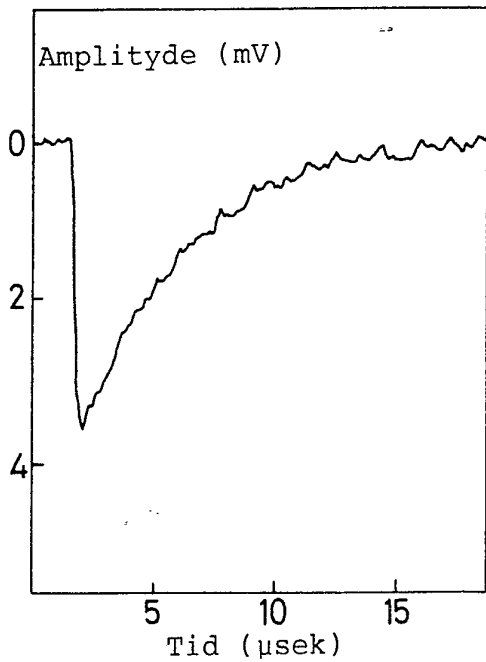
**Fig. 2**



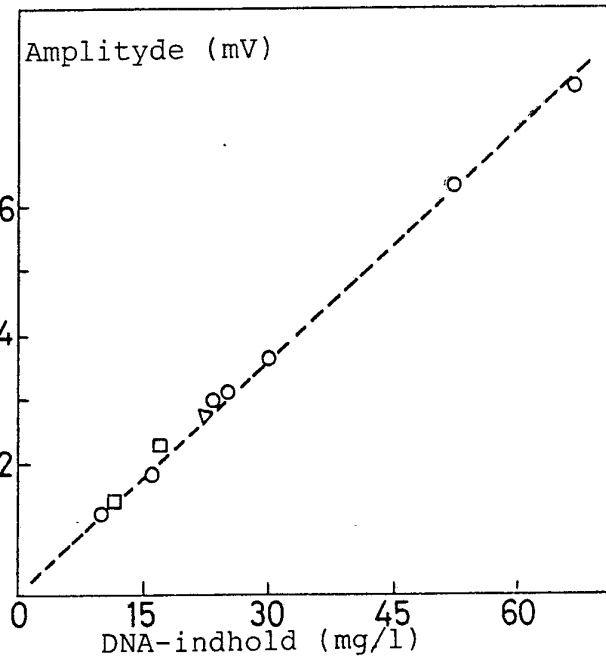
**Fig. 3**



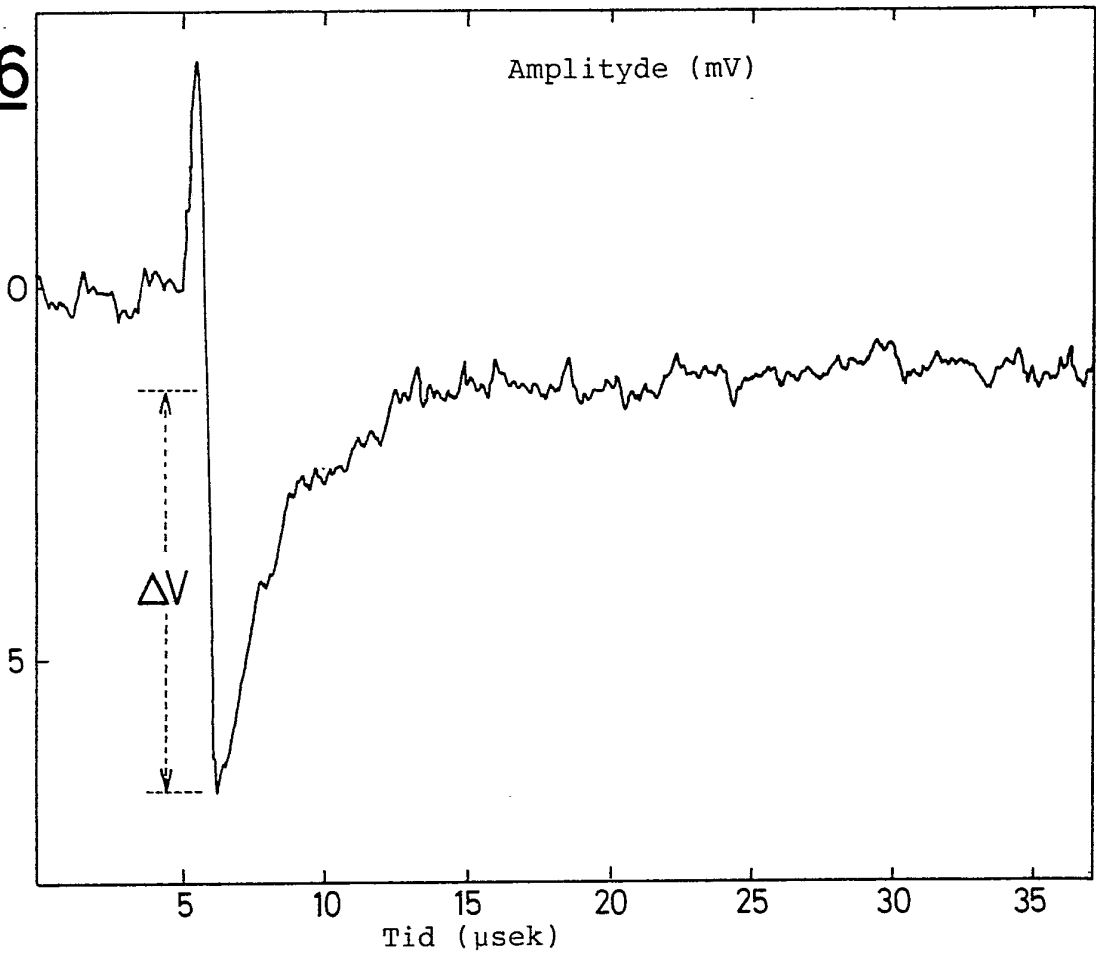
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig.6**



**Fig.7**

