

## Alizarinkomplexon — Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau

Der zeitliche Ablauf von Wachstum, Umbau und Heilung des Knochens wird mit konventionellen histologischen Techniken nur unvollkommen erfasst. Intravital verabreichte Fluorochrome können aber die Dynamik der Anbauvorgänge erschliessen. Diese Markiersubstanzen werden bei der Knochenbildung eingebaut und sind später aufgrund ihrer Fluoreszenz sichtbar. In Alizarinkomplexon ist ein neues Fluorochrom gefunden worden, das die Reihe der bisher bekannten Substanzen (Tetracyclin<sup>1</sup>, Alizarinrot-S<sup>2</sup>, Porphyrine<sup>3</sup>, Fluoresceine,<sup>4</sup> Calceinblau<sup>5</sup> und Xylenolorange<sup>6</sup>) ergänzt.

3 g Alizarinkomplexon (1,2-Dihydroxy-anthrachinon-3-methylen-iminodiessigsäure)<sup>7</sup> wurden unter gleichzeitiger Zugabe von 2 g NaHCO<sub>3</sub> in 100 ml Wasser gelöst. Kaninchen und Ratten erhielten diese Lösung in einer Dosierung von 10–30 mg/kg s.c. oder i.p., die Kaninchen auch langsam i.v. An Hunden und Schafen fand bei gleicher Dosierung allein die intravenöse Applikationsart Verwendung; Mäuse erhielten 300 mg/kg peroral. Unentkalkte Knochen und Zähne dieser Tiere gelangten frisch und nach Methacrylateinbettung zur Verarbeitung. Die 50–100 µm dicken Sägeschnitte sind in Hellfeld- und Fluoreszenztechnik untersucht worden. Die Prüfung der akuten i.v. Toxizität<sup>8</sup> der Substanz fand an Mäusen und die Bestimmung des Einflusses auf das Knochenwachstum an Kulturen embryonaler Hühnerfemora<sup>9</sup> statt.

Nach Verabreichung von Alizarinkomplexon zeigten Präparate von Knochen und Dentin schon makroskopisch rot angefärbte Zonen. Mikroskopisch trat der Farbstoff als feine rote Linie in neugebildeten Osteonen, im peristalen und endostalen Knochen wie auch im Dentin in Erscheinung. Diese Stellen zeigten beim Bestrahlen mit ultraviolettem oder blauem Licht eine tiefrote Fluoreszenz. Die Markierung war nach Dosen von 20–30 mg/kg Körpergewicht sowohl in Hellfeld- wie auch Fluoreszenzmikroskopie deutlich sichtbar. Die Fluoreszenz erschien nach i.v., i.p. und s.c. Injektion gleich intensiv, während perorale Gaben von 300 mg/kg nur eine schwache Intensität hervorriefen. Die Prüfung der akuten i.v. Toxizität ergab bei Mäusen eine LD 50 von 170 mg/kg. Mikroskopisch und mikroradiographisch liessen sich bei einer Dosierung von 20–30 mg/kg keine Veränderungen der Strukturen nachweisen.

Die Fluoreszenz von Alizarinkomplexon war nach dreimonatiger Aufbewahrung der Knochenproben in Aethanol

(40–100%) und in Formaldehydlösung (4%) wenig verändert, nach Lagerung in tiefgefrorenem und gefriergetrocknetem Zustand unverändert. Aufbewahrung in Xylool oder in monomerem Methylmethacrylat führte nach einmonatiger Einwirkung zu einem deutlichen Nachlassen der Fluoreszenz. Die Resistenz gegen Chemikalien und Erregerlicht ist aber bei Alizarinkomplexon besser als z.B. bei Tetracyclinen.

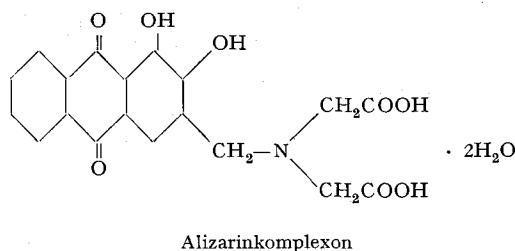
Alizarinkomplexon ist ein neues Fluorochrom zur Markierung verkalkender Gewebe im Tierversuch. Es unterscheidet sich von Alizarinrot-S und Haematoporphyrin, den bisher verwendeten roten Fluorochromen, durch intensivere Fluoreszenz. Alizarinkomplexon kann somit in einer relativ niedrigen Dosierung verwendet werden. Das Verhältnis zwischen nötiger Dosis und LD 50 ist bei Alizarinkomplexon günstiger als bei Alizarinrot-S und Haematoporphyrin (siehe Tabelle). In Untersuchungen an Gewebekulturen embryonaler Hühnerfemora zeigten die zur Markierung nötigen Dosen eine geringere Verminde rung des Wachstums als Alizarinrot-S und Haematoporphyrin<sup>9</sup>.

Die tiefrote Fluoreszenzfarbe von Alizarinkomplexon hebt sich im allgemeinen gut von den anderen Fluorochromen ab. Der Unterschied zu Haematoporphyrin ist schwach, während jener zu Xylenolorange und Alizarinrot-S deutlich ist. Alizarinkomplexon eignet sich für Anwendungen, die eine lange Betrachtungs- und Belichtungszeit oder Sichtbarkeit im Hellfeld bedingen. Wir verwenden Alizarinkomplexon zusammen mit Tetracyclin, Calcein, Calceinblau und Xylenol orange zur polychromen Sequenzmarkierung<sup>16</sup>.

**Summary.** Alizarin complexone is a red fluorochrome bonding to calcifying tissues. Its doses needed for labelling have less toxicity than those of Alizarin red S or Hematoporphyrin. Alizarin complexone is suitable for use alone, or in combination with Tetracycline, Calcein, Calcein blue and Xylenol orange for polychrome sequential labelling of bone or dentin.

B. A. RAHN und S. M. PERREN

*Laboratorium für experimentelle Chirurgie,  
Schweizerisches Forschungsinstitut,  
CH-7270 Davos (Schweiz), 4. August 1971.*



Fluorochrom	Dosis mg/kg	LD 50 i.v. mg/kg
Alizarinkomplexon	20–30	170
Alizarinrot-S	25 <sup>10</sup> –100 <sup>11</sup>	70 <sup>14</sup>
Haematoporphyrin	300 <sup>12</sup>	350 <sup>14</sup>
Tetracycline	25 <sup>13</sup> –50 <sup>12</sup>	120–200 <sup>15</sup>

<sup>1</sup> R. A. MILCH, D. P. RALL und J. E. TOBIE, *J. Bone Jt. Surg.* 40-A, 897 (1958).

<sup>2</sup> W. H. HARRIS, *Nature, Lond.* 188, 1038 (1960).

<sup>3</sup> L. COUTELIER, A. DHEM und A. VINCENT, *Bull. Acad. r. Méd. Belg.* 3, 675 (1963).

<sup>4</sup> H. K. SUZUKI und A. MATHEWS, *Stain Technol.* 41, 57 (1966).

<sup>5</sup> B. A. RAHN und S. M. PERREN, *Experientia* 26, 519 (1970).

<sup>6</sup> B. A. RAHN und S. M. PERREN, *Stain Technol.* 46, 125 (1971).

<sup>7</sup> Herkunft: Siegfried AG, CH-4800 Zofingen.

<sup>8</sup> Die Toxizitätstests wurden in zuvorkommender Weise von der Firma Siegfried durchgeführt.

<sup>9</sup> B. A. RAHN, H. FLEISCH, R. MOOR und S. M. PERREN, *Europ. Surg. Res.* 2, 137 (1970).

<sup>10</sup> K. F. ADKINS, *Stain Technol.* 40, 69 (1965).

<sup>11</sup> D. A. N. HOYTE, *J. Anat.* 94, 432 (1960).

<sup>12</sup> S. OLERUD und G. L. LORENZI, *J. Bone Jt. Surg.* 52-A, 274 (1970).

<sup>13</sup> L. MODIS, M. PETKO und I. FÖLDES, *Acta morph. hung.* 17, 157 (1969).

<sup>14</sup> Unveröffentlichte Daten aus dem Laboratorium für experimentelle Chirurgie, Schweizerisches Forschungsinstitut, Davos.

<sup>15</sup> N. A. KUCK und G. S. REDIN, *J. Pharm. exp. Ther.* 129, 350 (1960).

<sup>16</sup> Diese Studie wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Kredit Nr. 3.203.69).