

# BAKTERIÁLIS SEJTFAL ÉS MEMBRÁN POLISZACHARIDOK ULTRASTRUKTÚRÁJA ÉS VÁLTOZÁSAI A FAGOCITÓZIS SORÁN

FISCHER JÁNOS és EMŐDY LEVENTE

POTE Kórbontani Intézet és POTE Mikrobiológiai Intézet, Pécs

Mecsnyikov alapvető kutatásai óta a fagocitózis intenzíven kutatott területe a biológiának. Részletes ismeretek állnak rendelkezésünkre a fagocitózis folyamatának különböző morfológiai fázisairól, biokémiai történéseiről, a baktériumok és egyéb partikulumok endocitózisáról, a felvett anyagok intracelluláris lebontásáról (DE DUVE 1963; COHN és mtsai 1963, HAHN 1972). A sejtmembránok és a bakteriális sejtfalak poliszacharid struktúrái különböző biokémiai vizsgálatok alapján ugyancsak meglehetősen jól ismertek (GHUYSEN 1968, KELEMEN és ROGERS 1971, COSTERTON és mtsai 1974, VAN BEEK és mtsai 1975, OGATA és mtsai 1976), morfológiai téren viszont a poliszacharidok molekuláris orientációjáról — megfelelő módszer hiányában — igen hiányosak ismereteink.

Az általánosan alkalmazott PAS reakció és elektronmikroszkópos megfelelői csak a cukorkomponensek jelenlétére utalnak, a finom szerkezet vizsgálatára azonban nem alkalmasak.

Intézetünkben a cukorkomponensek lineáris orientációjának kimutatására kifejlesztett topo-optikai reakció, az ABT reakció (aldehid-biszulfit-toluidinkék; ROMHÁNYI és mtsai 1975) új lehetőséget nyitott a cukorkomponensek ultrastrukturális organizációjának tanulmányozásában. Mint arra korábbi közleményeinkben rámutattunk az ABT reakció optikai analízise segítségével a mikrobiális poliszacharid sejtfalak és tokok ultrastrukturája igen mélyrehatóan vizsgálható. A sejtfal és tokpoliszacharidok eltérő optikai jellegéből arra következtettünk, hogy míg a baktérium tokpoliszacharidok a sejtfelszínnel párhuzamos rendezettségűek, addig a tok nélküli baktériumok sejtfalaiban a poliszacharidok reagáló OH csoportjai többségükben a sejtfalra merőleges radiális elrendeződésben vannak jelen (FISCHER és EMŐDY 1976, FISCHER és ROMHÁNYI 1976). Sarjadzógombák sejtfalaiban mindkét irányú poliszacharid komponens együttes jelenlétét kimutattuk (FISCHER 1976). Módszerünket REID és mtsai (1973) vizsgálataira alapozva továbbfejlesztettük az O-acil-gyököt viselő vicinális glikol csoportok molekuláris orientációjának tanulmányozására, mely újabb morfológiai differenciálási lehetőséget biztosít a baktérium sejtfalak tanulmányozásában. Az említett módszerek lehetővé

teszik a cukorkomponensek ultrastruktúrájának elemzését a fagocitózis során mind a bakteriális sejtfalak, mind a leukociták poliszacharid komponenseinek vonatkozásában.

### Anyag és módszer

Különböző tokos (*Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*) és tok nélküli (*B. cereus*, BCG) baktériumokat vizsgáltunk. A liofilezett BCG törzset fiz. NaCl oldatban reszuszpendáltuk, a többi baktérium esetében 24 órás véres agar, ill. agar tenyészet lemosásával állítottuk elő a megfelelő csíraszámú ( $10^9$ ) szuszpenziót, ugyancsak fiz. NaCl oldattal.

*Fagocitózis in vivo*: A baktérium szuszpenzióból 1–2 ml-t patkány hasüregébe fecskendeztünk. Kontrollként cukormentes anyagokat (latex,  $TiO_3$ , carbo medicinalis) is fagocitáltattunk. A beadást követően 5 perc, 30 perc, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 72 óra múlva 10 ml fiz. NaCl befecskendezésével és azt követő leszívásával exszudátumot vettünk. A hasúri exszudátumot tárgylemezre ülepítettük, száradás után formalingőzben fixáltuk.

*Fagocitózis in vitro*: A vizsgálathoz izolált, Parker-oldatban  $3 \times$  mosott humán leukocitákat használtunk, a sejteket  $37^\circ C$ -on inkubáltuk.

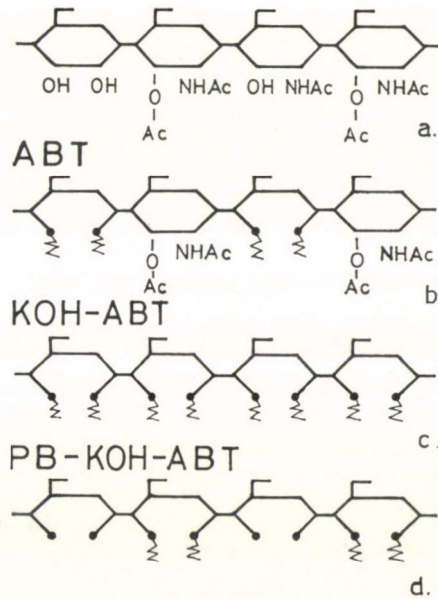
ABT (aldehid-biszulfit-toluidinkék) reakciót, a vicinális OH és amino-OH csoportok szelektív topo-optikai reakcióját a cukorkomponensek lineáris orientációjának tanulmányozására, a korábbi közleményekben leírtak szerint végeztük (ROMHÁNYI és mtsai 1974, 1975, ROMHÁNYI és MOLNÁR 1974). A készítményeket 30 percig 1%-os perjódsavval, majd telített Na-biszulfittal kezeltük, ezt követően pH 1,0-es toluidinkékkel festettük (0,05% toluidinkék N/10 HCl-ben oldva). A metakromáziás festési effektust K-ferricianiddal stabilizáltuk (ROMHÁNYI 1963), majd a készítményeket gumiarabikummal fedtük (1a–b. ábra).

*KOH-ABT reakció*: Az enyhe lúgos hidrolízis a PAS reakciót humán nyákokban felerősíti (REID 1973). A reakció lényegét REID behatóan elemezte, a vizsgálatai szerint a KOH 0,5%-os oldata 70%-os alkoholban a nyákok vicinális OH csoportjain levő O-acil gyökök hasítása révén szabadabbá teszi azokat, egy — az előkezelést követő — PAS reakció számára. A bakteriális sejtfalak biokémiai vizsgálatában ugyancsak ismeretes, hogy az enyhe lúgos hidrolízis az O-laktil, O-laktil-peptid csoportokat eliminálja a mukopeptidről (GHUYSEN 1968). A fenti ismeretekre alapozva a bakteriális sejtfalak vizsgálata során az ülepített fixált sejteket, keneteket a szelektív topo-optikai ABT reakció előtt 0,5% KOH (70%-os alkoholban oldva) oldattal kezeltük 30 percig (1c ábra).

*PB-KOH-ABT reakció* (Perjódsav-borohidrid-KOH-ABT): Az O-acil gyököket viselő vicinális OH csoportok szelektív kimutatására — REID és mtsai (1973) PB-KOH-PAS reakciójának módosítása. A szabad vicinális OH



csoportokat 60 perc perjódsvavas oxidáció után 1%-os vizes Na-borohidriddel visszaredukáltuk (CRAIG 1974), így kizártuk azokat az ismételt perjódoxidációból. Ezt követően KOH-ABT reakciót végeztünk, így kizárólag az O-acil csoportok által blokkolt, de KOH-val felszabadítható vicinális OH csoportok festődnek (1c. ábra). A módosított PB-KOH-ABT reakció után a glikogén és az ugyancsak intenzív ABT reakciót adó szöveti bazálmembránok nem rea-



1. ábra. A poliszacharidok alkalmazott topo-optikai reakcióinak vázlatos ismertetése. a) Sématis poliszacharid lánc vicinális OH, amino-OH és O-acil-OH csoportokkal. b) A poliszacharid lánc orientált festékkötése *ABT reakció* után. A vicinális OH és amino-OH csoportok perjódsvavas hatására dialdehidekké oxidálódnak, majd Na-biszulfit telített oldatában biszulfidot addicionálnak. A poliszacharid láncon így képzett, sűrűn elhelyezkedő erősen negatív gyökök képesek a toluidinék pH 1,0-es oldatából a festékmolekulák orientált megkötésére. A festékmolekulák orientációja a poliszacharid láncokra merőleges, ezért az orientált festékkötések által indukált kettőtörés a poliszacharid láncok hosszára negatív jellegű (ROMHÁNYI és mtsai, 1975). c) *KOH-ABT reakció*: Enyhe lúgos hidrolízissel a poliszacharid láncokon levő O-acil kötések lehasíthatók, OH csoportokká alakíthatók. Ezért a lúgos kezelést követő ABT reakció a felszabaduló vicinális OH, amino-OH csoportok arányában intenzívebbé válik. Sémánkon valamennyi monoszacharid festékmolekulákat köt. d) *PB-KOH-ABT reakció*: A poliszacharidok szabad vicinális OH és amino-OH csoportjaiból perjódsvavas képzett dialdehid csoportok Na-borohidriddel redukálva kizárhatók az ismételt perjódsvavas oxidációból. A PB (perjód-borohidrid) kezelést követő KOH-ABT reakció ezért szelektív az eredetileg blokkolt, de lúgos hidrolízissel felszabadítható O-acil-OH csoportokra

gálnak. A módszer az O-acil csoportot viselő vicinális OH csoportok lineáris orientációjának vizsgálatára alkalmas.

*Emésztések:* A készítményeket az ABT reakcióval reagáló glikogén esetenkénti zavaró hatásának kiküszöbölése végett deszt. vízben oldott 2 mg/ml

diasztázzal (Serva) emésztettük 37 °C-on 2—3 óráig. Az esetleges maszkírozó fehérjekomponensek eltávolítására a topo-optikai reakciók előtt tripszin kezelést alkalmaztunk 37 °C-on 2 órás időtartammal 2 mg/ml tripszin (Serva) pH 8,3-as foszfátpufferes oldatával.

A specifikus topo-optikai reakciók után az optikai analízist Leitz Ortholux polarizációs mikroszkóppal és Köhler kompenzátorokkal végeztük.

## Megfigyelések

### I. Baktérium sejtfalak:

1. *Poliszacharid tokkal nem rendelkező baktériumok*: A *B. cereus* sejtfala az ABT reakciót követően intenzív bazofil festődést és erős kettőtörést mutat, 30—45 nm útkülönbséggel. A kettőtörés a sejtfelszínre vonatkoztatva *pozitív*, hasonlóan más toknélküli baktériumokhoz (FISCHER és EMÓDY 1976), mely optikai jelleg a sejtfelszínnel párhuzamos festékmolekula orientációra és ezért a sejtfalban radiálisan esetleg helikálisan rendezett reagáló vicinális OH csoportokra, illetve poliszacharid struktúrára enged következtetni (2 a—c. ábrák). Az említett baktériumok sejtfalain a KOH-ABT reakció után jelentős változást nem észleltünk, a kettőtörés kismértékben csökkent.

A PB-KOH-ABT reakció után azonban azt találtuk, hogy a *Bacillus cereus* sejtfalának festődése lecsökkent, ugyanakkor a kettőtörés optikai jellege a sejtfelszínre vonatkoztatva *negatívvá* vált (3 a—c. ábrák). Ezen optikai jelleg a felszínre merőleges festékmolekula orientációra utal, amiből az O-acil gyököket viselő vicinális OH csoportok lineáris, sejtfelszínnel párhuzamos molekuláris orientációjára következtethetünk, ellentétben a sejtfal zömét alkotó szabad vicinális glikolsoportok molekuláris orientációjával (4. ábra).

A sejtfal-alkotó poliszacharidok eme kétirányú lineáris rendezettségét korábban élesztőgombák sejtfalaiban azok savas, ill. lúgos hidrolízise után sikerült igazolnunk (FISCHER 1977). Hasonló sejtfallal párhuzamos (PB-KOH-ABT reakció) és sejtfalra merőleges (ABT reakció) poliszacharid orientációt mutatnak a *Saccharomyces* sejtfalak a két reakció egybevetése után is.

2. *Mycobaktériumok*: Kivételt képez az elmondottak alól a BCG, ill. *Mycobaktérium tuberculosis* (FISCHER 1976), mely ABT reakció után erős bazofil festődést és hosszra *negatív* kettőtörést mutat 8—10 nm útkülönbséggel, mely festődési és kettőtörési effektus KOH-ABT reakcióval jelentősen fokozható (30 nm útkülönbség). A festődés és kettőtörés PB-KOH-ABT reakció után gyengébb, a kettőtörés ugyancsak hosszra negatív volt. A felszínre negatív optikai jelleg a korábban említett baktériumokkal ellentétben arra enged következtetni, hogy sejtfaluk alkotásában zömmel a sejtfelszínnel párhuzamos lineáris poliszacharidok vesznek részt. Hasonlóan felszínre negatív



kettőstörésűek a *Streptomyces griseus* hifái, szemben a humán szövetek közt kimutatott felszínre pozitív kettőstörésű *Actinomyces* hifákkal (FISCHER és EMŐDY 1976).

3. *Poliszacharid tokkal rendelkező baktériumok* közül a *Diplococcus pneumoniae* és a *Klebsiella aerogenes* vizsgáltuk. Az ABT reakciót követően a tokpoliszacharidok erősen metakromáziásan festődnek és intenzív, felszínre *negatív* kettőstörést (pozitív szferit) mutatnak, ami az elmondottak alapján a sejtfelszínnel párhuzamos lineáris vicinális glikolokra utal. A KOH-ABT reakció az esetek többségében a festődés intenzitását és a kettőstörés erősségét jelentősen fokozta. Ugyancsak intenzív reakciót észleltünk *Diplococcus pneumoniae* esetében PB-KOH-ABT reakció után, a kettőstörés ez esetben is felszínre negatív jellegű volt.

## II. A bakteriális sejtfalak optikai effektusának változásai a fagocitózis során

1. *Poliszacharid tokkal nem rendelkező baktériumok*: *Bac. cereus* a patkány hasüregbe juttatva az oltás után 30 perccel már tömegesen található a neutrofil leukocitákban. Az extracellulárisan levő baktériumok festődése és kettőstörése változatlan, hosszra pozitív jellegű. Az intracelluláris baktériumok sejtfalainak festődése és kettőstörése fokozatos csökkenést mutat. A fagocitózis 1—2. órájában a neutrofil leukocitákban erősebben és gyengébben festődő és kettőstörő baktériumok láthatók (5. ábra). Az optikai analízis során az erősebben festődők továbbra is a sejtfelszínre pozitív, míg a gyengébben festődők a sejtfelszínre negatív kettőstörésűeknek bizonyultak (6. ábra). 4—5 óra múltán a sejtekben a topo-optikai reakciókkal baktérium már nem volt kimutatható, viszont a neutrofil leukociták sejtfelszínei egyre erősödő festődési effektust mutattak, mely effektus elemzésére a következő fejezetben térünk ki.

2. *BCG törzs fagocitózisa*: időben elnyújtottabb mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. A baktériumok 1—2 óra múltán megjelennek a leukocitákban, de 24 óra múltán is található baktériumok extracellulárisan is. A sejtfalak festődése intracellulárisan kis mértékben csökken és mind a festődésük, mind kettőstörésük granulás jellegűvé válik. A neutrofil leukociták sejtfelszínének igen erős ABT reakciója ugyanakkor korábban, már a fagocitózis 2. órájában jelentkezik (7. ábra).

3. *Poliszacharid tokkal rendelkező baktériumok*: Az eredetileg ABT reakció után erős felszínre negatív (pozitív szferit) (35—40 nm útkülönbség) kettőstörést mutató *Diplococcus pneumoniae* (8. ábra) és *Klebsiella aerogenes* (9. ábra) már a patkány hasüregébe való befecskendezést követő első harminc percben elveszti eredeti kettőstörését, a festődés intenzitása jelentős mértékben csökken, majd fokozatosan valamennyi baktérium még extracellulárisan felszínre pozitív kettőstörésűvé válik (útkülönbség 20—25 nm). A hasúri sejtek környezetében extracellulárisan elhelyezkedő pozitív kettőstörésű baktériumok



sejtfalai szélesebbnek, fellazult szerkezetűnek, radiálisan filamentózusnak látszik (8. ábra). A fagocitózis 1—2. órájában igen sok baktérium látható mind intra-, mind extracellulárisan. Intracellulárisan a felszínre pozitív kettőstörésű baktériumok festődési effektusa és kettőstörése tovább csökken, mozaikossá válik. A fagocitózis 4—5. órájában a neutrofil sejtek felszíne az egyéb baktériumok fagocitózisa utáni helyzetnek megfelelően intenzív ABT reakciót ad. A sejtekben mozaikos, helyenként igen gyenge festődésű, de ismét felszínre negatív kettőstörésű bakteriális sejtfalmaradványok figyelhetők meg.

### III. *A neutrofil leukociták sejtfelszíneinek topo-optikai reakciói*

Közismert, hogy a kiérett neutrofil leukociták nagy mennyiségben tartalmazznak glikogént (GHATRON és mtsai, 1975), továbbá, hogy a leukociták fagocitotikus aktivitása glikogén-tartalmukkal egyenesen arányos (GOLODENKO és BELOGUROVA, 1974). E jelenséget a fagocitáló sejtek igen intenzív glikolitikus tevékenységével hozzák összefüggésbe (LANTOS 1965). Kimutatott, hogy a glikolízis gátlásával a leukociták fagocitózisa gátolható, és hogy a fagocitáló sejtek glikogén tartalma is csökken (FREIBLIN 1961). Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a neutrofil leukociták ABT és különösen KOH-ABT reakciója a fagocitózis során nem hogy csökken, hanem jelentős mértékben fokozódik, és a fagocitózis 4—6. órájában éri el a maximumot. Ilyenkor a sejtek felszínén igen intenzív festődési és kettőstörési effektus látható (11. ábra). A kettőstörés optikai jellege a sejtfelszínre vonatkoztatva pozitív (negatív szferit), ami radiálisan orientált vicinális glikol csoportok jelenlétére utal. (Megjegyezzük, hogy a szöveti gyulladáshoz kapcsolódó reakciókban a neutrofil leukociták intenzív PAS reakciója közismert.) Hasonló erősségű festődést és kettőstörést észleltünk  $\text{TiO}_3$ , szénpor, ill. latex bevitele után 4—5. óra múlva, ami ellene szól annak, hogy ezen cukorkomponensek az intracellulárisan lebontott bakteriális sejtfal poliszacharidok degradációs termékei volnának. A KOH-ABT reakció után észlelt sejtfelszíni festődési és kettőstörési effektus diasztáz rezisztensnek bizonyult, a festődés 2 órás diasztáz emésztés után csak kismértékben csökkent. PB-KOH-ABT reakció után, mely a szabad vicinális OH csoportokat a reakcióból kizárja — így a glikogén reakcióját is megszünteti — a sejtfelszínnek továbbra is intenzív festődését tapasztaltuk, erős, a sejtfelszínre pozitív jellegű kettőstöréssel, szép zöld polarizációs színekkel (12. ábra). E reakció a sejtfelszíni cukorkomponensekben O-acil gyökök jelenlétére enged következtetni.

Tripszin emésztést követő KOH-ABT reakció után a neutrofil leukociták festetlenek maradtak, mely eredmény glikoprotein molekulák jelenléte mellett szól. Tekintve, hogy a tárgyalt membráneffektus az in vitro fagocitózis 4—6. órájában,  $3 \times$  mosott humán leukocitákon is jelentkezik, ez ezen glikoprotein struktúra endogén eredetére utalhat.



### Következtetések

A vizsgálatokban alkalmazott topo-optikai reakció, — az ABT reakció — igen hasznos és érzékeny módszernek bizonyult a mikrobiális sejtfal- és tokpoliszacharidok ultrastruktúrájának morfológiai elemzésében. Minthogy az ABT reakció — az orientált festékkötés által indukált kettőtörési effektus révén — a cukorkomponensek lineáris orientációjának kimutatására alkalmas, segítségével a reagáló vicinális OH és amino-OH csoportok térbeli molekuláris orientációja az optikai analízis révén elemezhető (ROMHÁNYI és mtsai 1975). E tekintetben az ABT reakció valamennyi korábban cukor kimutatására alkalmazott morfológiai módszer felett áll, érzékenysége az elektronmikroszkópos vizsgálatok határait is felülmúlja. Mint arra korábban rámutattunk, az ABT topo-optikai reakció a mikrobiális sejtfalak ultrastrukturális differenciálására, a sejtfal és tokpoliszacharidok morfológiai elkülönítésére is alkalmas a két poliszacharid molekuláris rendezettségének különbözősége alapján (FISCHER és EMÖDY 1976).

Az ABT reakció kiegészítése KOH-ABT, PB-KOH-ABT reakciókkal, valamint különböző enzimátikus előkezelésekkel, a cukorkomponensek ultrastruktúrájának finomabb morfológiai jellemzését teszik lehetővé. Segítségükkel a mikrobiális sejtfalakat és tokokat alkotó poliszacharid komponensek térbeli orientációja a komplex sejtfalon belül tanulmányozható, melyről ismereteink ez ideig modellkísérletekre (KELEMEN és ROGERS 1971) és különböző hipotézisekre szorítkoztak. Az alkalmazott topo-optikai reakciók segítségével a *Bacillus cereus* sejtfalaiban a cukorkomponensek két- — egymással ellentétes — irányú rendezettségét tudtuk kimutatni, és igazolni, hogy míg a sejtfelszínre merőleges vicinális OH csoportok szabadok az ABT reakció számára, addig a sejtfelszínnel párhuzamosan orientált poliszacharid struktúra O-acil gyökökben gazdag, az ABT reakció előtt blokkolt, viszont szelektíven tanulmányozható PB-KOH-ABT reakció után. A fagocitózis során jelentkező felszínre negatív kettőtörés az ABT reakció után ugyanezen felszínnel párhuzamos poliszacharid struktúrát jelezheti, és egyúttal ezen cukorkomponensek nagyobb rezisztenciájára is utalhat.

A tokos baktériumok tok poliszacharidjai nagymértékben védik a baktériumokat a fagocitózistól. Ezen baktériumok bekebelezésének előfeltétele a baktériumsejtek opszonizációja. Az opszonizációban antitestek (melyek Fc része a leukociták sejtfelszíneivel, Fab része a bakteriális tok poliszacharid antigéndetermináns csoportjaival reagál) és komplement faktorok (C<sub>3</sub>) vesznek részt (HAHN 1972).

Vizsgálatainkban a poliszacharid tokkal rendelkező *D. pneumoniae* és *Klebsiella aerogenes* tokpoliszacharidok eredeti, a felszínre negatív kettőtörésének a patkány hasüregében bekövetkezett inverziója (pozitívvá válása), mely a sejtfalak változásának egész korai, finom ultrastrukturális jele, esetleg az em-



lített faktorok hatására következhet be. Ennek igazolása további célzott vizsgálatokat igényel.

További tisztázásra váró probléma a neutrofil leukociták sejtfelszíneinek a fagocitózis hatására bekövetkező igen intenzív KOH-ABT és PB-KOH-ABT reakciója.

Vizsgálataink arra utalnak, hogy ezen felszaporodó poliszacharid komponens nem glikogén (PB-KOH-ABT reakcióval is reagál, diasztáz rezisztens), molekuláris orientációja a sejtfelszínre merőleges. Tripszinnel való emésztetősége glikoprotein voltára enged következtetni, az *in vivo* kísérlet pedig endogén képződésre utalhat. A jelenség mindenestre nem idegen, hiszen a legkülönbözőbb szöveti sejtek: vírus transzformált fibroblasztok, transzformált limfociták és különösen daganatsejtek esetében a biokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy sejtmembránjaikban a cukorkomponenseknek mind mennyisége (VAN BEEK és mtsai 1975, MARYKOWSKY és mtsai 1974), mind azok molekulásúlya jelentős emelkedést mutat (OGATA és mtsai 1976).

Tekintve, hogy vizsgálataink a sejtfal és membránpoliszacharidok ultrastruktúrájának elemzése tekintetében úttörő jellegűek, fő törekvésünk a módszerek és az azok nyújtotta ultrastrukturális vizsgálati lehetőségek bemutatása és nem az egyes konkrét problémák mélyreható elemzése volt.

#### IRODALOM

1. COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., WIENER, Edith: The cytoplasmic granules of phagocytic cells and the degradation of bacteria. Ciba Foundation Symposium of Lysosomes. Churchill London 126—144 (1963).
2. COSTERTON, J. W., INGRAM, J. M., CHENG, K. J.: Structure and function of the cell envelope of Gram negative bacteria. *Bact. Rev.* **38**, 87—110 (1974).
3. CRAIG, S. A.: Sodium borohidride as an aldehyde blocking reagent for electronmicroscope histochemistry. *Histochemistry* **42**, 141—144 (1974).
4. DEDUVE, C.: The lysosome concept. Ciba Foundation Symposium of Lysosomes. Churchill, London 1—31 (1963).
5. FISCHER, J.: Demonstration of microorganisms in tissues by the ABT and KOH-ABT topo-optical reactions. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* **24**, 203—214 (1976).
6. FISCHER, J.: Optical polarization reveals different ultrastructural molecular arrangement of polysaccharides in the yeast cell walls. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.* **28**, 49—58 (1977).
7. FISCHER, J., EMŐDY, L.: Molecular order of carbohydrate components in cell walls of bacteria, fungi and algae according to the topo-optical reaction of the vicinal OH groups. *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.* **23**, 97—108 (1976).
8. FISCHER, J., ROMHÁNYI, Gy.: Baktériumok és gombák kimutatása szövetekben topo-optikai aldehyd-bisulfit-toluidinkék (ABT) reakcióval. *Morph. Ig. Orv. Szle.* **16**, 137—144 (1976).
9. FREIBLIN, I. Sz.: Izmenenyije fagocitárnoj aktivnosztyi i nyekatorüje citokinescszkih reakcij leukocitov peritoneálnává exudata morszkih szvinok v processze immunizáciji. *Bjuleteny experimentálnoj biologija i medicinii* **9**, 80—83 (1961).
10. GHARTON, G., OBSON, I., DAHLQUIST, A.: Determination of the glycogen content in single neutrophil leucocytes using a micromodel of leucocyte glycogen. *J. Histochem. Cytochem.* **23**, 59—64 (1975).
11. GHUYSEN, J. M.: Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bact. Rev.* **32**, 425—464 (1968).



12. GOLODENKO, M. A., BELOGUROVA, A. F.: O szootuzsenyii mezdu fagocitárnoj aktivnosztju neutrofilov foszfatazami i hoderzsányiem v nyik glikogena pri nyekatorüh infekcionüh zabolebanyiah. *Patol. fiziol. Exp. Ter.* **1**, 71–72 (1974).
13. HAHN, H. von: Mechanismus der antibakteriellen Phagocytose. 6. Deidesheimer Gespräch. Knoll AG. Ludwigshafen/Rhein 68–81 (1972).
14. KELEMEN, M. V., ROGERS, H. J.: Three-dimensional molecular models of bacterial cell wall mucopeptides (Peptidoglycans). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 992–996 (1971).
15. LANTOS, T.: A fagocitózis vizsgálatának néhány újabb eredménye különös tekintettel az egysejtűekre. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **7**, 341–359 (1965).
16. MARIKOVSKY, Y., INBAR, M., DANON, D., SACHS, L.: Distribution of surface charge and concanavalin A binding sites on normal and malignant cells. *Exptl. Cell Res.* **89**, 359–367 (1974).
17. OGATA, Sh., MURAMATSU, T., KOBATA, A.: New structural characteristic of the large glycopeptides from transformed cells. *Nature (Lond.)* **259**, 580–582 (1976).
18. REID, E. P., CULLING, F. A., DUNN, W. L.: Saponification induced increase in the periodic acid-Schiff reaction in the gastrointestinal tract: Mechanism and distribution of the reactive substance. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 473–482 (1973).
19. ROMHÁNYI, Gy.: Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. *Acta Histochem. (Jena)* **15**, 201–233 (1963).
20. ROMHÁNYI, Gy., DEÁK, Gy., FISCHER, J.: Aldehyde-bisulfite-toluidine blue (ABT) staining as a topo-optical reaction for demonstration of linear order of vicinal OH groups in biological structures. *Histochemistry* **43**, 333–348 (1975).
21. ROMHÁNYI, Gy., MOLNÁR, L.: Optical polarization indicates linear arrangement of rhodopsin oligosaccharide chain in rod disc membranes of frog retina. *Nature (Lond.)* **249**, 486–488 (1974).
22. ROMHÁNYI, Gy., MOLNÁR, L., NÉMETH, Á.: Ultrastructural differences in cell membranes of erythrocytes, myeloid and lymphoid cells as shown by topo-optical reactions. *Histochemistry* **39**, 261–276 (1974).
23. VAN BEEK, W. P., SMETS, L. A., EMMELOT, P.: Charged surface glycoprotein as a marker of malignancy in human leukaemic cells. *Nature (Lond.)* **253**, 457–460 (1975).