

TOPO-OPTIKAI REAKCIÓK ELŐNYEI AZ ALVEOLÁRIS GÁZCSERE-HATÁRFELSZÍN MEMBRÁNSTRUKTÚRÁINAK VIZSGÁLATÁBAN

NÉMETH ÁRPÁD és KALÁSZ VERONIKA

Pécsi Orvostudományi Egyetem Kórbonctani Intézete, Pécs

A vér-gáz határfelszín, másrészt az ide vezető makroszkópos és mikroszkópos járatokat bélelő celluláris valamint extracelluláris komponensek által kialakított határfelszín megismerésében — a hagyományos fénymikroszkópos leleteken túl — az elektronmikroszkópos analízis nyújtott új információkat. Ezen fény- és elektronmikroszkópos adatok szerint a tüdőben kb. 40 különféle sejttípus található, többségükben jól körülhatárolt funkciókkal és jellegzetes morfológiai képpel. Emellett az egyre fejlődő funkcionális, biokémiai és morfológiai módszerekkel az alveolusok belső felszínén és a légutakban speciális, extracelluláris felszíni zónákat lehetett felismerni, melyek foszfolipid és mukoprotein komponensei fontos szerepet játszanak a tüdő normális működésében [1, 3, 11, 12, 13, 14, 20, 26, 27, 30, 42, 52, 53].

E komponensek feladata az emlőstüdő sajátos alveoláris felépítéséből eredő nagy felületi feszültség kiküszöbölése, melyet NEERGARD elméleti számítások alapján már 1929-ben feltételezett [38].

Az alveoláris felületi feszültséget csökkentő foszfolipidek forrásaként MACKLIN 1954-es közlése óta [34] egyre több adat a II. típusú alveoláris hámsejteket vagy granuláris pneumocytaikat jelöli meg, az autoradiográfiás leletek [2, 17, 18, 31], másrészt az izolált alveoláris hámsejtek kultúráin végzett vizsgálatok alapján [32, 51].

Az alveoláris határfelszín lipid komponensei mellett glikoproteinekből álló, hidratált, extracelluláris hipofázis jelenlétét az elektronmikroszkópos hisztokémiai leletek bizonyították [23, 29, 34].

A broncho-alveoláris rendszer perifériás zónájának újabb elektronmikroszkópos morfológiai leletei jól demonstrálták a határfelszín egyes építő elemeit [4, 10, 26], melynek még szemléletesebb összefüggő képét a térhatású elektronmikroszkóp mutatta meg látványosan [24, 25, 33].

Saját vizsgálatainkban az utóbbi évek folyamán a ROMHÁNYI [45, 46, 47, 48, 49] által leírt topo-optikai reakciókat alkalmaztuk a mukociliáris és gázcsere határfelszín szerkezetének felderítésére, ill. a felületi feszültséget csökkentő, ún. surfactans lipidek alveoláris jelenlétének kimutatására [40, 41].

Ennek jelentőségét a mindennapos csecsemő-patológia leleteik igazolják, ugyanis az újszülöttkori halálozásban döntő szerepet játszó idiopathiás respira-

tios distress syndroma (IRDS) és a hyalin membrán betegség (HMB) kialakulásában fontos szerepet tulajdonítanak a koraszülött csecsemőtüdők bio-kémiai, valamint strukturális éretlenségének, elsősorban a felszínaktív alveoláris lipidek hiányának [3, 4, 6, 7, 9, 16, 21, 37].

A rutin patohisztológiában rendelkezésre álló lehetőségekkel a defektus mértékének morfológiai megítélése bizonytalan vagy lehetetlen. A polarizációs mikroszkópos módszerek bevezetésével gyors, egyszerű és megbízható út kínálkozik a tüdőszövet szerkezetlemeinek vizsgálatára.

Anyag és módszer

I. *A módszertani vizsgálatokhoz* 200—250 g-os felnőtt patkányok tüdőit használtuk. Nembutal narkózisban — a hasi aorta átvágását követő elvéreztetés után — a tüdőt az artéria pulmonális felől előbb fiziológiás sóval, majd pH 7,0-es, 0,15 M-os foszfát pufferben oldott, 10%-os formaldehiddel, máskor pH 7,0-es, 0,15 M-os kakodilát pufferben oldott, 2,5%-os glutáraldehiddel perfundáltuk. Esetenként a rögzítő oldatot közvetlenül, intrabronchiálisan adtuk a kollabált tüdőbe. 6—12 óras fixálás után az anyagok egy részéből fagyasztott metszeteket készítettünk, más részüket paraffinba ágyasztuk.

A tracheo-bronchiális, mukociliáris hámsejtek izolált vizsgálatára a kísérleti állatok légúti nyálkahártyájából vett kaparék keneteit használtuk. A keneteket pH 7,0-es kakodilát pufferben oldott, 5%-os glutáraldehidben, 4 °C-on, 1 óráig rögzítettük, majd — öblítés után — elvégeztük az alábbiakban leírt festési eljárásokat.

Festési eljárások:

1. A rögzítés után készített 10—20 μm vastag fagyasztott metszeteket vízből tárgylemezre vettük fel, majd — festés nélkül — különböző hidrofíl médiumokkal (gumiarábikum, glicerol, telített fruktóz) fedtük.

2. *A fagyasztott metszeteket* pH 2,0—pH 7,0-es pufferben oldott, 0,1%-os toluidinkékkel két percig festettük, majd — itatás után — nedves állapotban 2%-os káliumferricianid/2%-os káliumjodid 1/7 arányú keverékével stabilizáltuk, és a stabilizáló oldatot tartalmazó gumiarábikummal fedtük [45].

3. További *fagyasztott metszeteken* — a szénhidrát komponensek vicinális —OH csoportjainak szelektív optikai kimutatására — aldehid-biszulfit-toluidinkék (ABT) reakciót végeztünk ROMHÁNYI és mtsai [49] módszere szerint.

4. *Fagyasztott metszeteket* 0,1%-os klorpromazin oldattal (EGYT, Bp.) 10 percig kezeltük, desztillált vízzel öblítettük, majd 0,1%-os vizes eozin oldattal 2 percig festettük, desztillált vízben öblítettük és klorpromazint tartalmazó gumiarábikummal fedtük [50]. A korábbi adatok szerint így — a ne-

gatív sejtfelszíni komponensek jelenlétéhez kötött — orientáltan elhelyezkedő *klorpromazin-eozin töltéstransfer komplex* alakul ki.

5. A leírt festési eljárásokat megfelelő módon rögzített és paraffinba ágyazott tüdők metszetein is elvégeztük. Ezen vizsgálatokkal — a paraffinba ágyazás procedúrájának lipidextraháló hatását kihasználva — a lipidmentes struktúrák optikai reakcióinak vizsgálatára nyílt lehetőség.

6. A kísérleti állatok tüdejéből 2,5%-os glutáraldehid vagy 1%-os ozmiumtetroxid fixálást követően Durcupan (Fluka) beágyazás, ill. elektronmikroszkópos feldolgozás is történt.

7. Emellett a pH 7,0-es toluidinkékkal festett, ozmiumtetroxiddal utófixált fagyasztott metszetek elektronmikroszkópos feldolgozásával is kísérleteztünk a toluidinék precipitációs festés ultrastrukturális lokalizációjának megismerése céljából.

II. *A csecsemőtüdők* patológiás elváltozásainak tanulmányozására boncolási anyagból származó — a halál után 6—12 órával kivett — tüdöket, ill. egyes esetekben 600—800 g-os késői abortusz magzatok tüdejét dolgoztuk fel, a fent leírt módszerekkel.

A boncolási anyagból származó csecsemőtüdők légúti váladékát kenetekben feldolgozva egyszerű módszerrel tájékozódhattunk a broncho-alveoláris váladék felszínaktív foszfolipid tartalmáról; ugyanis a jelenlevő surfactans lipidek festetlenül — glicerollal vagy más hidrofil médiummal lefedve — intenzíven kettőstörő lipidmyelinfigurákat produkálnak.

A glutáraldehid fixált kenetek pH 7,0-es toluidinék festését követően pedig a levált csillós hámsejtek, ill. ezek csillószerkezetének izolált vizsgálatára nyílt lehetőség.

A metszetek és kenetek polarizációs mikroszkópos analízisét Leitz Ortholux polarizációs mikroszkóppal végeztük, a kettőstörés jellegét és mértékét Köhler-kompensátor használatával állapítottuk meg.

Az ultravékony metszeteket — uranilacetát-ólomcitrát kontrasztszítás után — Tesla BS-242 B és BS-613 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Eredmények

Vizsgálataink alapján az alábbiakban demonstráljuk az ép patkánytüdő metszetek topo-optikai reakciói által nyújtott képet, majd bemutatjuk a csecsemőtüdőkön nyert eddigi leleteinket.

I. Az aldehid-fixált fagyasztott, festetlen metszeteket, hidrofil médiummal lefedve, polarizációs mikroszkópban az alveoláris citomembránok mérsékelt aktivitása mellett elsősorban a granuláris pneumociták lipid zárványai produkálnak intenzív granuláris kettőstörést, amely nagyobb nagytással

radier pozitív szferiteknek bizonyul (1a ábra). A kettőtörés ugyanazon sejtekben mutatkozik, amelyek a Berg-féle [5] koffein benzpirén fluorokrom lipid festéssel szelektíven reagálnak (1b. ábra). Ezen sejtek megfelelnek az elektronmikroszkópban mikrovillózus felszínű, lamelláris citoplazmazárványokat tartalmazó alveoláris granuláris pneumocitáknak, vagy más néven II. típusú alveoláris hámszöveteknek (1c ábra).

A toluidinkékkel festett fagyasztott metszetekben intrabronchialis vagy érperfüziós rögzítési eljárástól függően, kissé eltérő optikai megjelenést tapasztalunk, azonban mindkét esetben elsősorban a celluláris membránok intenzív optikai reakciója tűnik szembe, mely különösen jól azonosítható az érintőlegesen metszett alveoláris falak kapilláris-hálózatának megfelelően, és jóval erősebb a festetlen citomembránok kettőtörésénél (2a, b ábra).

Aldehyd-biszulfit-toluidinkék (ABT) reakcióval az alveoláris-kapilláris bazális membránok szelektív optikai reakcióját — intenzív, hossza negatív jellegű kettőtörését — találtuk, mely a lipidmentes, paraffinba ágyazott anyagok metszeteiben is megfigyelhető, és a bazális membrán cukorkomponensek nagyfokú orientációjára utal (2c ábra).

A gázcsere-határfelület kb. $0,6 \mu\text{m}$ vastag zónájának endotéliális, bazális membrán és epitéliális elemei elektronmikroszkópos felvételeken jól megfigyelhetők. Az alveolusokban, általában véletlenszerűen, lamelláris vagy tubuláris myelin-halmazok is felismerhetők (2e ábra).

A klorpromazin-eozin töltés-transzfer komplex festést követően a formaldehyd-gőzzel felfújtt, vagy légtartó állapotban fixált tüdő metszetében elsősorban az alveoláris határfelület (3a, b ábra), perfúziós rögzítés esetén pedig emellett a tágult kapilláris belső felszín szelektív reakciója is — a felszínre vonatkoztatva pozitív jellegű kettőtörése is — szembevetődik (3c, d, e, f ábra). Az optikai reakció a metszetek előzetes metilálásával, a savanyú csoportok blokkolása által megszüntethető.

Az aldehyd fixált, fagyasztott metszetek pH 7,0-es toluidinkék festése után az alveoláris belső felszín viszonylag szelektív kettőtörése tűnik szembe (4a ábra). A toluidinkékkel festett metszetek utólagos ozmiumtetroxid fixálását követő elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatják, hogy az alveoláris belső felszíni lipid-film, valamint az extracelluláris tubuláris fosfolipid komponensek és a granuláris pneumociták lipid-zárványainak elektronelnyelő képessége fokozódott, feltehetően a megkötött toluidinkék ozmofiliája, valamint a stabilizáló hatású káliumferricianid-káliumjodid finom kötődése miatt. Ily módon az epitéliális felszíneken az alveoláris gáztérrel érintkező, a hipofázist befedő surfactans lipid-film elektronmikroszkóposan szelektíven demonstrálható (4b, c, d ábra).

A tüdő fagyasztott, festetlen metszeteiben — a tracheo-bronchis mukociliáris felszínnek megfelelően intenzív optikai reakció, a nyálkahártya síkjára vonatkoztatva pozitív jellegű kettőtörés mutatkozik, mely feltehetően

a csillókat határoló citomembrán foszfolipid molekuláinak azonos irányú orientációjából származik (5a, b ábra).

Beágyazott metszeteken — feltehetően a ciliáris membránok lipidkomponenseinek kioldódása miatt — ez a jelenség megszűnt (5c ábra). A paraffinos metszeten elvégzett ABT reakció a felszíni dehidratált nyákfilm és a ciliáris zóna elkülönült kettőtörését adja (5d ábra).

A toluidinkék festett, fagyasztott metszetekben a celluláris komponensek és a nyákfelszín enyhe festődése mellett a csillós hámsejtek ciliáris zónájának szelektív optikai reakcióját találjuk (6a, b ábra). A nyálkahártyáról vett kaparék festetlen keneteiben a 4—5 nm útkülönbséget adó, minimális csillókettőtörés pH 7,0-es toluidinkék festéssel kb. tízszeresére felerősíthető, amely a csillók hosszára negatív, additív optikai reakciót jelent. A degenerált csillós felszínnek kettőtörése lényegesen csökkent, vagy megszűnt (6c, d ábra).

II. Az eddig bemutatott vizsgáló módszereket boncolási anyagból származó csecsemőtüdők analizésére felhasználva a következőket találtuk:

A kiérett újszülött tüdőben a fent leírt optikai eljárásokkal megfigyelhető az alveoláris granuláris pneumociták tömeges lipid-zárvány tartalma, különösen a nem légzett csecsemőknél (7a, b ábra).

A halál után 2—6 órával boncolt csecsemők tüdejében a fagyasztott metszetek toluidinkék festése jól kapillarizált alveolusfalakat mutat, megtartott membrán ultrastruktúrával (7c, d ábra). A tracheobronchiális váladék keneteiben a levált ciliáris hámsejtek csillói pH 7,0-es toluidinkék festés után intenzív és szelektív kettőtörést produkálnak (7e, f ábra).

Hasonló esetről a fagyasztott vagy beágyazott metszet klorpromazin-eozin festésével a kapillarizált alveolus határfelszín mindkét oldalán intenzív kettőtörés mutatkozik, jól orientált megtartott extracelluláris negatív sejt-felszíni zónára utalva (8a, b, c, d ábra).

Nagyfokban éretlen, 600—800 g-os, késői abortuszmagzatok tüdejének vizsgálatából megállapítható, hogy az öthónapos magzat alveoláris köbhámsejtjeiben intenzív ABT reakciót adó glikogén tömeg van jelen (9a ábra).

Fluorokrom lipid-zárványok még nem láthatók (9b ábra). Hasonló korú, Rh-konstelláció miatt hydrops foetus universalis tüneteivel világra jött, éretlen koraszülött magzat tüdejében a kiérett csecsemőtüdőkre emlékeztető lipid-zárványok mutathatók ki az alveoláris hámsejtekben (9c, d ábra).

A normális, tüdőkárosodást nem szenvedett újszülött tüdő fagyasztott metszetében az alveoláris hámsejtek surfactans lipid szekreciója polarizációs mikroszkóppal jól demonstrálható (10a, b ábra).

Az idiopathias respiratios distress syndroma tüneteinek között meghalt csecsemő tüdejében hematoxin-eozin festéssel atelektaziát és a tágult duktus alveolárisokban hyalinmembrán kialakulását találjuk (10c ábra). Az alveoláris hámsejtekben lipid kettőtörés nem látható, az optikai analízis csupán a hyalinmembrán kettőtörő kristályos bilirubin tartalmát mutatta (10d ábra).

Amíg hyalinmembrános csecsemőtüdőkben pneumocita lipid-zárvány egyáltalán nem, vagy alig mutatható ki, mukoviscidozisos csecsemőtüdő fagyasztott metszetében, az alveoláris hámsejtek mellett, a légutakban szabadon is, igen nagy tömegben találtunk intenzív kettőstörést mutató lipid-depozitumokat (10e, f ábra).

A csecsemőtüdők tracheo-bronchialis váladékának kenetekben történő feldolgozása során szembetűnő volt, hogy a kiérett, nem károsodott tüdőből származó váladék kenetei nagy tömegben tartalmaztak — myelin-figurák és szferitek formájában — radier pozitív kettőstörést mutató foszfolipid-komponenseket (11a, b ábra), ugyanakkor az IRDS tünetei között meghalt csecsemők nagy többségében a tracheo-bronchialis váladék kettőstörést mutató lipid-komponenseket nem tartalmazott. Az esetek többségében csak kritályos bilirubin depozitumok és hematoidin-kristályok voltak megfigyelhetők a nyák és a celluláris komponensek mellett (11c, d ábra).

Megbeszélés

Az emlőstüdő alveolusainak belső felületi feszültségét csökkentő felszínaktív anyag kémiai összetételét a broncho-alveolaris mosófolyadék biokémiai analízise tisztázta, melyből megállapítható volt a telített palmitinsavat tartalmazó lecitin elsődleges szerepe [7, 9, 28, 30, 53]. A foszfolipidek alveoláris jelenlétét speciális lipid-hisztokémiai reakciókkal is megkísérelték bizonyítani [15]; az ún. trikomplex lipid fixálási eljárás azonban az alveoláris felszínen durva, homogén csapadékot produkál és finom elektronmikroszkópos analízisre nem használható [22]. Az alveoláris komplex extracelluláris réteg és a felszíni lipid-film elektronmikroszkópos kimutatásában az ozmium-gőz fixálás bizonyult a legmegfelelőbbnek [26].

ROMHÁNYI és mtsai [46, 47, 48] korábbi vizsgálataiból ismert, hogy a topo-optikai reakciók előnyösen használhatók az indirekt ultrastrukturális szerkezet analízisekben. Ezek a reakciók speciális lehetőséget teremtettek a fibrilláris biológiai struktúrák és a különböző membránok szerkezetének felderítésében, ill. reaktív csoportjaik orientációjának megismerésében [45, 49].

I. Az emlőstüdőkre vonatkozó vizsgálatainkból megállapítható, hogy a polarizációs mikroszkóp festetlen metszetekben elsősorban a granuláris pneumociták lipid-tartalmának megítélésében hasznos.

A toluidinkék festés elsősorban a celluláris membránkomponensek állapotának megítélésében jelent segítséget. Az alveolusokat határoló kapilláris hálózat intenzív kettőstörése kísérletesen előidézett odemában vagy más patológiás tüdőelváltozásoknál, a folyamat korai fázisában, jelentősen lecsökken.

Az ABT reakció, a cukorkomponensek, ill. glikopeptidek vicinális-hidroxi-csoportjainak topo-optikai reakciója [49], az alveoláris-kapilláris bazális membránok szelektív kimutatását tette lehetővé.

A tracheo-bronchialis nyálkahártyafelszín toluidinkék festéssel, valamint ABT reakcióval végzett analízise a felszíni nyák-film rendezettségéről és a ciliáris zóna állapotáról, ill. ezek egymáshoz való viszonyáról ad jól használható információt.

Klorpromazin-eozin festéssel az alveoláris és kapilláris felszíni glikokalix negatív glikoprotein komponenseinek szelektív kimutatására nyílik lehetőség. Az optikai reakció intenzitása alapján ezen komponensek orientációjáról, reaktivitásáról is információt nyerhetünk.

A fagyasztott és beágyazott metszetek topo-optikai reakcióit összehasonlítva megállapítható, hogy

a) a citomembránok orientált festődése magas pH-jú toluidinkékkel — a membrán-lipidek jelenlétét és molekuláris rendezettségét feltételezi (paraffinba ágyazott anyagok metszetein nem értékelhető). ROMHÁNYI [47] szerint a festett citomembránok optikai anizotrópiájának növekedése a festék interkaláció eredménye, egyértelműen a membrán-lipidkomponensek függvénye.

b) Ezzel szemben a bazális membrán és a nyákfilm ABT reakciója a poliszacharidok molekuláris rendjétől függő, a lipid-extrahált metszetekben is vizsgálható.

c) A klorpromazin-eozin töltés-transzfer komplex a sejtfelszíni negatív gyökök sűrűségétől és rendezettségétől függő, de a lipidmentes sejtmembránok belső rendjét is tükröző topo-optikai reakció. Ez azért is figyelemre méltó, mert a klorpromazin önmagában a lipid-membránokhoz való nagyfokú affinitásáról és interkalációs készségéről ismert [46].

A pH 7,0-es toluidinkékkel festett metszetek utólagos ozmiumtetroxid fixálása lehetőséget nyújt az alveoláris extracelluláris zóna és a granuláris pneumociták lipid-zárványainak jobb megőrzésére. Ez a komplex finomabb hisztokémiai reakciót ad mint a korábban leírt trikomplex fixálás [22] vagy a rutheniumvörös festés [23] és a Hale-reakció [1, 29].

II. A csecsemőtüdőkre vonatkozó leletekből megállapítható, hogy a patológus számára hozzáférhető boncolási anyagból a formaldehid fixált, fagyasztott, festetlen tüdőmetszetek polarizációs mikroszkópos vizsgálatával az alveoláris hámsejtek lipid-szekréciójáról megfelelő információ nyerhető, a zárványok ugyanis az autolízissel szemben viszonylag rezisztensek. Ezt az idevonatkozó elektronmikroszkópos vizsgálatok is igazolják [19, 44].

Finomabb membránszerkezet-analízis — a fent leírt topo-optikai reakciókkal — csak a halál után 1—2 órával boncolt, friss csecsemőtüdőkben megvalósítható.

A csecsemőtüdők surfactans-lipid produkciójára vonatkozó leleteink egyik érdekessége, hogy az elektronmikroszkópos adatok ellenére — melyek

szerint a 12—24 órát élő hyalinmembrános csecsemőtüdőkben a hyalinmembrán mögött az alveoláris hámsejtek tömeges lipid-zárvány felhalmozódása észlelhető [4, 21] — polarizációs mikroszkóppal a hyalinmembrános csecsemőtüdőkben kettősentörő lipid-zárvány csak elvétve mutatható ki.

Ez arra utal, hogy az ilyen esetekben termelődő foszfolipid minőségileg eltérő, kóros, vizes fázisban nem hidratálódó, membránokat nem képező állapotban van jelen.

A másik érdekesség, hogy tömeges vörösvérttest szétesés (Rh-konstelláció, hematoma, suffúziók) mellett — a gestációs koruk és testsúlyuk alapján nagyfokban éretlen — koraszülöttek tüdejében tömeges lipid-szekréció tapasztalható, feltehetően a dekompozícióból származó lipid-szubsztrátum kínálat *indukciós hatásaként*.

A mukoviscidózis mellett talált tömeges bronchoalveoláris lipid szaporulat valószínűleg a kóros nyák jelenléte által okozott bronchus-clearance csökkenés, ill. alveoláris lipid-retenció eredménye [39].

ABT reakcióval az éretlen csecsemőtüdőben az alveoláris-kapilláris bazális membrán-rendszer hiánya mellett a mirigyacinusokra emlékeztető perifériás járatok hámsejtjeiben tömeges glikogén tartalom észlelhető, amely alapvetően glikolízisre épülő sejtmetabolizmus fennálltára utal [31, 32].

A kiérett csecsemőtüdőkben a klorpromazin-eozin töltéstranszfer komplex egyenletesen intenzív topo-optikai reakciót ad a kapilláris és alveoláris felszíneken egyaránt. Az éretlen vagy beteg tüdőben viszont e reakció megszűnése vagy egyenetlensége is bizonyítja a súlyos szubmikroszkópos szerkezetkárosodást.

Az utóbbi évek vizsgálataiból ismert, hogy a magzat intrauterin életének utolsó harmadában az amniocentezissel nyert magzatvíz foszfolipid tartalmának, ezen belül lecitin/szfingomyelin arányának meghatározásával az idiopathias respiratios distress syndroma veszélye előre jelezhető [6, 16, 28, 35, 36]. Hasonlóan diagnosztikus értékű a megszületett csecsemők garatváladékának biokémiai elemzése is [8, 53]. Ezen kórjelző laboratóriumi leletek — az anyai steroid profilaxis indikálásával — a magzati tüdő kiérésének serkentését [17, 31, 37, 51], megszületett csecsemők esetében pedig a korai beavatkozás lehetőségét biztosítják.

A biokémiai lipid meghatározás laboratóriumi felkészülést és több órát igényel, ezzel szemben a garatváladék keneteinek polarizációs mikroszkópos elemzése néhány perc alatt elvégezhető; és mint kiegészítő vizsgálómódszer gyors, korai kórjelző értékkel bírhat a koraszülöttek IRDS veszélyeztetettségének megítélésében.

A bemutatott módszertani eljárások, a topo-optikai reakciók fénymikroszkópos dimenzióban teremtenek sokoldalú lehetőséget a mukociliáris és gázcseré határfelületén indirekt, ultrastrukturális vizsgálatára, melyekkel

a patológiás tüdőelváltozásokat befolyásoló farmakológiai hatások is megfelelően analizálhatók, és az elektronmikroszkópos vizsgálatok mellett jól kiegészítik a funkcionális, valamint a biokémiai adatokat.

Összefoglalás

A polarizációs mikroszkópia — a ROMHÁNYI és mtsai által kifejlesztett indukált optikai reakciókkal, az ún. topo-optikai reakciókkal kiegészítve — sokoldalú, indirekt, hatékony, szubmikroszkópos vizsgálómódszerré vált. Lehetőségeit az emlődüdre, ill. a patológiás csecsemőtüdőkre vonatkozó vizsgálatunk eredményei is bizonyítják:

1. Hidrofil médiummal lefedett, fagyasztott, festetlen metszetekben alkalmas, az alveoláris granuláris pneumociták surfactans lipid-produkciójának megítélésére, a lipid-zárványok kettőtörése alapján.

2. A toluidinkék festés, az ABT reakció és a klorpromazin-eozin töltéstransfer komplex optikai analízise a vér-gáz határfelületét felépítő szerkezeti elemek — extracelluláris alveoláris felszínnek, citomembránok, bazális membránok — strukturális organizációjáról és patológiás elváltozásairól tájékoztat.

3. A toluidinkék precipitációs festés — a festékkötő membránstruktúrák ozmofiliájának fokozásával — az alveoláris surfactans lipidek és a pneumociták lipid-zárványainak stabilitását eredményezi az elektronmikroszkópos feldolgozás során.

4. A csecsemőtüdők lipid-tartalmának morfológiai megítélése és a határfelületi membránok károsodásának polarizációs mikroszkópos vizsgálata nagy segítséget jelenthet — a perinatalis halálokként leggyakrabban szereplő — IRDS hátterének felderítésében.

5. Az újszülött garatváladék kenetének optikai analízise egyszerű, rutin eljárásként alkalmazható a surfactans hiányos állapot, ill. az IRDS veszélyeztetettség korai, gyors előrejelzésére.

IRODALOM

1. ADAMSON, L. Y. R., BOWDEN, D. H.: The surface complexes of the lung: A cytochemical partition of phospholipid surfactant and mucopolysaccharide. *Am. J. Path.* **61**, 359–376 (1970).
2. ASKIN, F. B., KUHN, C.: The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab. Invest.* **25**, 260–268 (1971).
3. AVERY, M. E., MEAD, J.: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *J. Dis. Childh.* **97**, 517–523 (1959).
4. BALIS, J. U., DELIVORA, M., CONEN, P. E.: Maturation of postnatal human lung and the idiopathic respiratory distress syndrome. *Lab. Invest.* **15**, 530–546 (1966).
5. BERG, N. O.: A histological study of masked lipids. *Acta path. microbiol. Scand. Suppl.* **40**, 192 (1951).

6. BHAGWANANI, S. G., FAHMY, D., TURNBULL, A. C.: Prediction of neonatal RDS by estimation of amniotic-fluid Lecithin. *Lancet* **i**, 159–162 (1972).
7. BLEYL, U.: Pathomorphologie und Pathogenese des Atemnotsyndroms. *Verhandl. der Deutsch. Ges. für Pathol.* (55. Tagung). 39–79 (1971).
8. BLUMENFELD, Th. A., DRISCOLL, J. M., STANLEY JAMES, L.: Lecithin : sphingomyelin ratios in tracheal and pharyngeal aspirates in respiratory distress syndrome. *J. Ped.* **85**, 403–407 (1974).
9. BOUGHTON, K., GONDY, G., GAIRDNER, B.: Hyaline membrane disease II. Lung lecithin. *Arch. Dis. Childh.* **45**, 311–320 (1970).
10. BURRI, P. H.: The postnatal growth of the rat lung. *Anat. Rec.* **180**, 77–98 (1974).
11. CALLAS, G.: A new fixation technique for the electron microscope study of pulmonary surfactant. *Anat. Rec.* **180**, 457–464 (1974).
12. CLEMENTS, J. A.: Surface tension of lung extracts. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* **95**, 170 (1957).
13. CLEMENTS, J. A., HUSTEAD, R. F., JOHNSON, R. P., GRIBETZ, I.: Pulmonary surface tension and alveolar stability. *J. Appl. Phys.* **16**, 444–450 (1961).
14. COLACCIO, G., BUCKELEW, A. R., SCARPELLI, E. M.: Protein and lipid-protein fractions of lung washings: chemical characterisation. *J. Appl. Phys.* **34**, 743–749 (1973).
15. DERMER, G. B.: A method for the visualisation of pulmonary surfactant in the light microscope. *Arch. Intern. Med.* **127**, 415–420 (1971).
16. DEWHURST, C. J., HARVEY, D. R., DUNHAM, A. M., PARKINSON, C. E.: Prediction of RDS by estimation of surfactant in the amniotic fluid. *Lancet* **i**, 1475–1477 (1973).
17. McDOUGALL, J., SMITH, K. J. F.: The development of the human type II. pneumocyte. *J. Path.* **115**, 245–251 (1975).
18. ETHEERTON, J. E., CONNING, M.: Early incorporation of labelled palmitate into mouse lung. *Experimentia* **27**, 554–555 (1971).
19. FINLAY, J. M., PAPADIMITRIOU, J. M.: The autolysis of neonatal pulmonary cells in vitro: an ultrastructural study. *J. Path.* **111**, 125–134 (1973).
20. GARCIA, A., NEWKIRK, J. D., MAVIS, R. D.: Lung surfactant synthesis: A Ca^{++} -dependent microsomal phospholipase A_2 in the lung. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **64**, 128–135 (1975).
21. GIESEKING, R.: Elektronenmikroskopische Befunde beim Atemnotsyndrom. *Verhandl. der Deutsch. Ges. für Pathol.* (55. Tagung) 22–39 (1971).
22. GIL, J.: Effect of tricomplex fixation on lung tissue. *J. Ultrastruct. Res.* **40**, 122–131 (1972).
23. GRONIEWSKI, J., BICZYSKOVA, W.: The extraneous coat of lung alveoli. *Lab. Invest.* **20**, 430–436 (1969).
24. GRONIEWSKI, J., WALSKI, M., BICZYSKOVA, W.: Application of scanning electronmicroscope for studies of the lung parenchyma. *J. Ultrastruct. Res.* **38**, 473–481 (1972).
25. GRONIEWSKI, J., WALSKI, M.: Scanning electron microscopic studies on the bronchiolla ciliated epithelium. *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.* **18**, 30–32 (1973).
26. GRONIEWSKI, J., WALSKI, M.: Vapour fixation as a method for demonstrating alveolar lining layer in biopsy samples of the lung. *Folia Histochem. Cytochem.* **11**, 317–318 (1973).
27. IMRE, S.: Alveolaris surfactant. *Orvosképzés* **46**, 39–43 (1971).
28. JACKSON, R. W., GARLAND, B. A., ANDERSON, D.: Amniotic fluid phospholipids and fetal lung maturity. I. Assessment of various methods of determining lecithin and sphingomyelin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **121**, 1095–1099 (1975).
29. KALIFAT, S. R., DUPNY-COIN, A. M., DELARUE, J.: Demonstration ultrastructurale de polysaccharides dont certains acides dans le film de surface de l'alveole pulmonaire. *J. Ultrastruct. Res.* **32**, 572–589 (1970).
30. KIKKAWA, Y., MOTOYAMA, E. K., GLUCK, L.: Study of the lungs of fetal and newborn rabbits. *Am. J. Path.* **52**, 177 (1968).
31. KIKKAWA, Y., KAIBARA, M., MOTOYAMA, E. K., OZOLES, M. M., COOK, C. D.: Morphologic development of fetal rabbit lung its acceleration with cortisol. *Am. J. Path.* **64**, 423–442 (1971).
32. KIKKAWA, Y., YONEDA, K., SMITH, F., PACKARD, B., SUZUKI, K.: The type II. epithelial cells of the lung II. Chemical composition and phospholipid synthesis. *Lab. Invest.* **32**, 295–301 (1975).
33. KUHN, C., FINKE, E. H.: The topography of the pulmonary alveolus: scanning electron microscopy using different fixations. *J. Ultrastruct. Res.* **38**, 161–173 (1972).
34. MACKLIN, C. C.: The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes. *Lancet* **i**, 1099–1104 (1954).

35. MORVAY, J., PÁL, A., FARKAS, M.: A lecithin/sphingomyelin arány quantitativ meghatározása magzatvízben a praenatalis respirációs distress syndroma megítélésére. Magyar Nőorvosok Lapja **38**, 33–38 (1975).
36. MYERS, J. L., HARELL, M. J. P., HILL, F. L.: Fetal maturity: Biochemical analyses of amniotic fluid. Am. J. Obstet. Gynecol. **121**, 961–967 (1975).
37. NATHAN, D. M.: The respiratory distress syndrome and glucocorticoid treatment: The case for enzyme induction. Mount Sinai J. Med. **42**, 150–166 (1975).
38. NEERGARD, K. V.: Neue Auffassungen über Atemmechanik. Z. exper. Med. **66**, 373 (1929).
39. MC NARY, W. F., SOMMERS, S. C.: The extreme density of inclusions found in the alveolar cells of a child with mucoviscidosis. — Cit. in Science **145**, 1192–1193 (1964).
40. NÉMETH, A.: A polarization microscopic study of granular pneumocytes and alveolar interface in rat lung. Acta Morph. Acad. Sci. hung. **22**, 115–127 (1974).
41. NÉMETH, A.: Demonstration of the pulmonary alveolar lipid membrane structures and granular pneumocytes by polarization and fluorescence microscopy. Acta histochem. **51**, 164–171 (1974).
42. PATTLE, R. E.: Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Nature **175**, 1125–1126 (1955).
43. PATTLE, R. E., THOMAS, L. C.: Lipoprotein composition of the film lining the lung. Nature **189**, 844 (1961).
44. PATTLE, R. E., SCHOCK, C., CREASEY, J. M.: Postmortem changes at electron microscopy level in the type II cells of the lung. Br. J. exp. Path. **55**, 221–227 (1974).
45. ROMHÁNYI, G.: Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatische Reaktion. Acta Histochem. **15**, 201–233 (1963).
46. ROMHÁNYI, Gy.: A citomembránok ultrastruktúrájáról. MTA Biol. Oszt. Közl. **11**, 127–149 (1968).
47. 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).
48. ROMHÁNYI, Gy., MOLNÁR, L.: Optical polarisation indicates linear arrangement of rhodopsin oligosaccharide chain in rod disk membranes of frog retina. Nature **249**, 486–488 (1974).
49. 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).
50. ROMHÁNYI Gy.: A biológiai membránok ultrastruktúrájáról optikai analízisek tükrében. MTA Biol. Oszt. Közl. **18**, 1–19 (1975).
51. ROUNDS, D. E., BOUCHER, J., BALIS, R. F.: Corticosteroid stimulation of surfactant production by rat type II pneumocytes in vitro. J. Cell Biol. **63**, 290 a/580, Abstr. (1974).
52. TYLER, W. S., PANGBORN, J.: Laminated membran surface and osmiophile inclusions in avian lung epithelium. J. Cell Biol. **20**, 157–164 (1964).
53. VINIC, B., HAMOSH, M., BLUNDA, M., HAMOSH, P.: Effect of ventilation on uptake of ³H-palmitate by isolated perfused rat lung. J. Cell Biol. **63**, 359 a/718, Abstr. (1974).
54. WELLER, P. H., JENKINS, P. A., GUPTA, J., BAUM, J. D.: Pharyngeal lecithin/sphingomyelin ratios in newborn infants. Lancet **i**, 12–14 (1976).