

Institut für Pathologische Anatomie der Medizinischen Universität, Pécs  
(Vorstand: Prof. GY. ROMHÁNYI)

## HISTOCHEMISCHE UND POLARISATIONSMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SUBMIKROSKOPISCHEN STRUKTURBEDINGUNGEN DER ANILINREAKTION DER KOLLAGENEN FASERN

K. VISZLÓY und M. NÉMETH-CSÓKA

(Eingegangen am 2. Februar 1960)

Unter den Methoden, die sich zur Untersuchung der submikroskopischen Strukturen anisotroper Beschaffenheit eignen, sind besonders jene Verfahren hervorzuheben, bei welchen farblose Komponenten oder Farbstoffmoleküle an eine anisotrope Struktur orientiert adsorbiert werden, wodurch die ursprüngliche Doppelbrechung des Substrates verstärkt, abgeschwächt oder umgewandelt wird. Mit diesen Reaktionen hat sich W. J. SCHMIDT [12] eingehend befaßt, und hat sie nach KOHLSCHÜTTER als topochemische Reaktionen bezeichnet. Die Bindungsart an das Substrat kann bei den verschiedenen Komponenten bzw. Strukturen von der physikalischen Adsorption bis zur chemischen Bindung variieren.

Es können zweckmäßig zwei Gruppen der in topochemische Reaktion tretenden Stoffe unterschieden werden, und zwar farblose Komponenten und Farbstoffe. Je nach der submikroskopischen Ablagerungsweise der Farbstoffe auf das Substrat kann man zwei Typen der Färbung unterscheiden: eine isotrope und eine anisotrope. Der spezielle Typ der Färbung, der durch orientierte Farbstoffanlagerung an eine anisotrope Struktur gekennzeichnet ist, wurde von ROMHÁNYI [10] — im Gegensatz zu der gewöhnlichen (isotropen) Färbung mit nicht orientierter Farbstoffanlagerung — als anisotrope Färbung bezeichnet und ihre Bedeutung für die submikroskopische Strukturforschung erörtert. Isotrope und anisotrope Färbung können polarisationsmikroskopisch unterschieden werden.

Mit den anomalen Farben, die bei geordneter Farbstoffanlagerung bei polarisationsmikroskopischer Untersuchung zu beobachten sind, hat sich in letzter Zeit BREWER [1] eingehender befaßt. Die topochemischen Reaktionen sind meistens weitgehend strukturspezifisch, was durch ihre mikrostrukturelle Entstehungsbedingungen erklärbar ist. Die orientierte Anlagerungsfähigkeit des Substrates und der assoziierenden Komponente ist weitgehend von Struktur- und stereochemischen Verhältnissen abhängig. So stellt z. B. die EBNERsche Phenolreaktion eine für die kollagenen Fasern weitgehend kennzeichnende topochemische Reaktion dar, bei welcher eine durch die spezifische Mikrostruktur des Kollagens bedingte orientierte Bindung des Phenols zustande kommt,

wodurch die ursprünglich positive Doppelbrechung der kollagenen Fasern in eine negative umgewandelt wird. Dieser Erscheinung liegen spezifische mikrostrukturelle Bedingungen zugrunde. So wird es verständlich, daß die Phenolreaktion für die kollagenen Fasern ebenso kennzeichnend ist, wie z. B. die elektronenmikroskopisch nachweisbare charakteristische Querstreifung bzw. das Röntgendiagramm der kollagenen Fibrillen oder der chemisch nachweisbare hohe Hydroxyprolinegehalt des Kollagens. Schon EBNER untersuchte mehrere Phenolderivate, um festzustellen, in welchem Grade diese mit dem Kollagen eine dem Phenol ähnliche topochemische Reaktion ergeben.

Als erste haben W. J. SCHMIDT [12] und KÜNZEL und SCHWANK [6] darauf hingewiesen, daß die mit Formalin fixierten kollagenen Fasern nach Bedeckung mit Anilin eine negative Doppelbrechung wechselnder Stärke aufweisen. Bei unseren Untersuchungen gingen wir aus der Beobachtung von ROMHÁNYI [11] aus, nach welcher die elastischen Fasern bei Einschließung in Anilin eine kräftige negative Doppelbrechung zeigen, wogegen die kollagenen Fasern meistens nur eine Herabsetzung ihrer positiven Doppelbrechung erfahren, oder manchmal schwach negativ werden. Die kollagenen Fasern zeigen also bei der Anilinreaktion, deren mikrostrukturelle Grundlagen nicht bekannt sind, ein quantitativ sehr wechselndes Verhalten (NÉMETH-CSÓKA [13]).

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, die submikroskopischen Bedingungen der Anilinreaktion der kollagenen und elastischen Fasern mit histochemischen Methoden zu analysieren. Es wurde polarisationsoptisch quantitativ verfolgt, wie Blockierungs- bzw. Substitutionsreaktionen an den verschiedenen reaktiven Seitengruppen des Kollagens die Stärke der Anilinreaktion beeinflussen, um in dieser Weise indirekt eine Antwort auf die Frage zu erhalten, welche Seitengruppen im submikroskopischen Strukturgefüge des Kollagens für die orientierte Anlagerung des Anilins entscheidend sind.

#### Material und Methode

Als Untersuchungsobjekt wurden Haut, Aorta und Achillessehne von in verschiedenem Alter verstorbenen Personen, und die Sklera und Kornea des Kalbes verwendet. Das Versuchsmaterial wurde in neutralem Formalin, Alkohol, Carnoy- und Zenkerscher Mischung fixiert und in Paraffin eingebettet. Bei den entparaffinierten Schnitten wurden folgende histochemische Blockierungsreaktionen angewendet.

1. Azetylierung nach McMANUS und CASON [9], wobei sowohl primäre Aminogruppen wie auch alkoholische Hydroxylgruppen durch Azetylierung blockiert werden.

2. Benzylierung nach DANIELLI [2]; es werden ebenfalls primäre Amino- und alkoholische Hydroxylgruppen blockiert.

3. Isolierte Blockierung bzw. Entfernung der primären Aminogruppen nach drei verschiedenen Methoden.

a) Nach vorangehender Azetylierung wurden die Schnitte 24 Stunden hindurch mit M/100 NaOH hydrolysiert, wodurch die an die alkoholischen Hydroxylgruppen gebundenen Azetoxylgruppen hydrolysiert werden. Es werden hierdurch also die Hydroxylgruppen wieder freigemacht, wogegen die azetylierten primären Aminogruppen weiterhin blockiert bleiben (N-Azetylderivate).

b) Isolierte N-Azetylierung. Zur Erreichung einer isolierten Azetylierung der Aminogruppen haben wir bei den histologischen Präparaten die präparative Methode von GUSTAVSON

[3] angewendet. Die Azetylierung geschieht hier mit einer abgekühlten, halbgesättigten wässrigen Na-Azetatlösung. Die Schnitte wurden in dieser Lösung 24 St. lang im Eisschrank gehalten. Dann wurde, im abgekühlten Zustande und bei Umrührung der Lösung, bis Erreichung einer 10%igen Konzentration, Essigsäureanhydrid zugegeben. Diese Prozedur dauerte etwa 1/4 St., während welcher jede Minute das pH der Lösung kontrolliert und mit NaOH (10%) bei pH 8,0 gehalten wurde. Nachher wurden die azetylierten Schnitte in fließendem Wasser gewaschen.

c) Desaminierung nach VAN SLYKE. Die Schnitte wurden in folgender Lösung 12 St. behandelt: 6 g Na-nitrit, 40 ml dest. Wasser, 5 ml Eisessig. Kontrollschnitte wurden gleichfalls 12 St. in 12%iger Essigsäure gehalten.

Die isolierte Blockierung der Hydroxylgruppen wurde nach vorangehender Desaminierung durch Azetylierung erreicht. Die Präparate wurden vorher nach VAN SLYKE desaminiert und dann nach der üblichen Methode azetyliert. Nach diesem Verfahren waren also im Eiweißgerüst nur O-gebundene Azetylgruppen (O-Azetyl-derivate) vorhanden.

Blockierung der Säureradikale ( $\text{COOH}$ ,  $\text{PO}_4$ ) durch Methylierung nach LILLIE [8]. Die Kontrollschnitte wurden nur mit Methanol bzw. mit n/10 HCl behandelt. Bei dieser Methode werden die Carboxyl- und Phosphatgruppen blockiert. Nebst dieser Wirkung findet nach KANTOR und SCHUBERT [5] auch eine Desulfurierung der sauren Mukopolysaccharide statt.

#### *Polarisationsmikroskopische Untersuchung:*

*Phenolreaktion.* Die entparaffinierten Schnitte wurden in einer 50%igen Mischung von Phenol in Canadabalsam eingeschlossen.

*Anilinreaktion.* Am Anfang unserer Untersuchungen haben wir die entparaffinierten Präparate nach Bedeckung mit reiner Anilinbase untersucht. Bei diesem Verfahren haben wir an den verschiedenen Bindegewebsfasertypen keinen einheitlichen optischen Effekt beobachtet.

Nach Mischung des Anilins mit verschiedenen diffusionshemmenden Komponenten (Tween 80, Ol. cedri, Terpeneol) fanden wir, daß bei Einschließung der Präparate in einer 50%igen Mischung von Anilin und Canadabalsam die kollagenen Fasern meistens keinen Umschlag ins Negative aufwiesen. Unsere Beobachtungen beziehen sich nur auf solche Präparate, welche auf diese Weise hergestellt wurden.

#### *Polarisationsoptische Analyse:*

Stärke und Charakter der Doppelbrechung der kollagenen Fasern wurden in den Kontrollschnitten und in den Präparaten nach den verschiedenen histochemischen Blockierungsreaktionen mit verdrehbaren Glimmerkompensatoren (nach KÖHLER—BRACE) bestimmt.

## Befunde

Tabelle I zeigt, daß die verschiedenen kollagenen Fasern bei Einschließung in Anilin-Canadamischung ein quantitativ unterschiedliches optisches Verhalten aufweisen. Während die kollagenen Fasern der Cutis bei der Anilin-

Tabelle I

Quantitatives optisches Verhalten einiger Kollagenfasern bei der Anilinreaktion  
Die Zahlen bedeuten Gangunterschiede in Millimikron

Typen der Kollagen-Fasern	Im Canadabalsam	Anilinreaktion
Kollagenfasern der Aortenadventitia...	28	3
Kollagenfasern der Aortenmedia .....	12	7
Korneafasern .....	3,3	∅
Sklerafasern .....	23,5	-9,4

Tabelle II

Optisches Verhalten der Kollagenfasern der Cutis nach verschiedenen Blockierungsreaktionen

Art der Behandlung	Canada	Anilin	Phenol	Resorzin-fuch-sinfärbung
Unbehandelt .....	+	+	—	∅
Benzoyliert .....	+	—	—	+++
Totalazetyliert .....	+	—	—	+++
O-azetyliert .....	+	—	—	++
N-azetyliert .....	+	+	—	+++
Desaminiert .....	+	+	—	+
Methyliert .....	+	+	—	∅

+: positive Doppelbrechung  
—: negative Doppelbrechung

Tabelle III

Quantitative Daten des optischen Verhaltens einiger kollagene Faserntypen nach Azetylierung

Typen der Fasern	Unbehandelt		Tot. Az.	N-az.
	Canada	Anilin		
Kollagene Fasern der Cutis ....	28	3	-28	27
Kollagene Fasern der Aortenadventitia .....	12	7	-17	15
Korneafasern .....	3,3	∅	-11,8	0,3
Sklerafasern .....	23,5	-9,4	-26,2	9

Tabelle IV

*Optische Effekte einiger Anilinhomologe auf die kollagenen Fasern der Cutis*

	Unbehandelt	Azetyliert
Toluol .....	15,1	18,4
50% para-Bromanilin .....	13,1	5,7
50% Chinolin in Toluol .....	19,2	3,7
50% Methylpyridin .....	4,9	— 4,9
50% Anilin .....	7,7	— 8,6
50% Pyridin .....	—4,9	—20,4

reaktion nur eine Herabsetzung ihrer ursprünglichen positiven Doppelbrechung erfahren, zeigen die Korneafasern und die kollagenen Fasern der Aortamedia nur eine Senkung etwa bis zur Isotropie: die Sklerafasern aber einen kräftigen Umschlag ins Negative. Tabelle II zeigt das Verhalten der kollagenen Fasern der Cutis nach verschiedenen Blockierungsreaktionen. Man bemerkt, daß die kollagenen Fasern bei Benzoylierung, Totalazetylierung und in O-azetylierten Präparaten (Abb. 1, 2) in Anilin-Canadamischung eine negative Doppelbrechung d. h. eine verstärkte Anilinreaktion aufweisen. Dagegen zeigen die kollagenen Fasern in N-azetylierten Präparaten keine verstärkte Anilinreaktion, sind deshalb bei Einschließung in Anilin-Canadamischung optisch

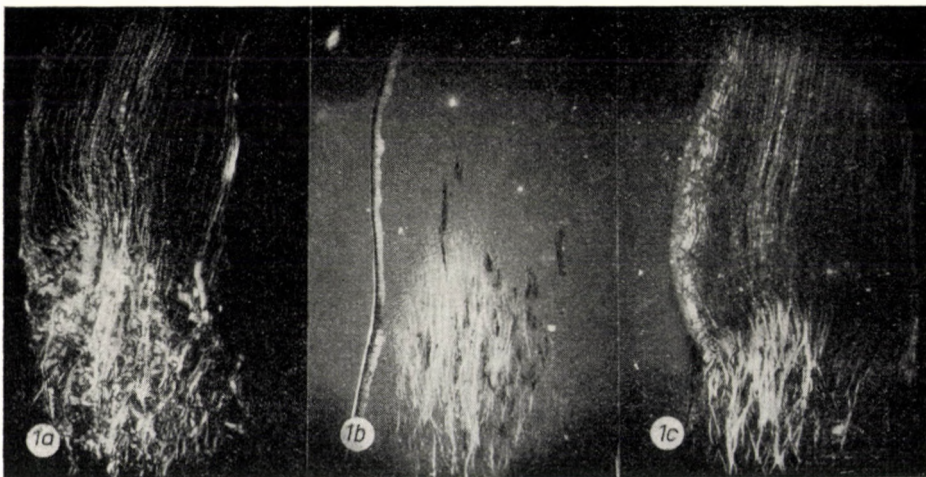


Abb. 1. Polarisationsmikroskopisches Bild der Kornea-Skleragrenze.

a) bei Phenolreaktion negativ doppelbrechende Sklera- und Korneafasern. b) Anilinreaktion. Die Sklerafasern zeigen eine kräftige negative Doppelbrechung, wogegen die Korneafasern optisch isotrop erscheinen. c) Anilinreaktion nach Azetylierung. Jetzt weisen die Korneafasern infolge der verstärkten Anilinreaktion eine starke negative Doppelbrechung auf

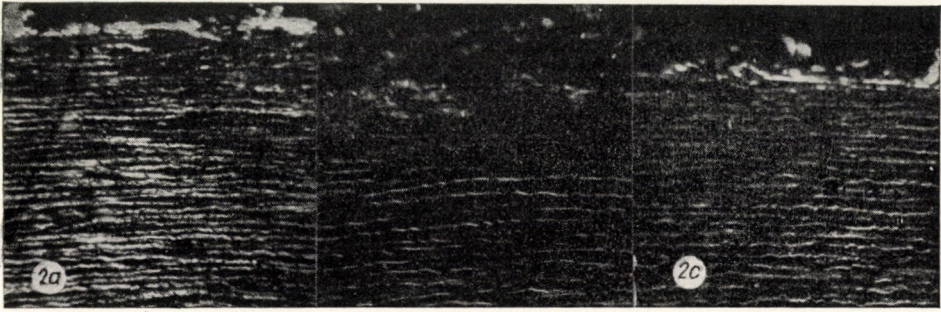


Abb. 2. Polarisationsmikroskopisches Bild der Aortaadventitia und Media.

a) Phenolreaktion. Kollagene Fasern der Adventitia und Media zeigen eine starke negative Doppelbrechung. b) Anilinreaktion. Die kollagenen Fasern der Adventitia zeigen eine schwache negative Doppelbrechung; in der Media weisen nur die elastischen Fasern eine in bezug auf ihre Länge negative Doppelbrechung auf. Mukoide kollagene Fasern der Media nähern sich der Isotropie. c) Anilinreaktion nach Azetylierung. Man sieht die verstärkte Anilinreaktion der Adventitiefasern und in der Media erscheinen jetzt zwischen den elastischen Fasern negativ doppelbrechende kollagene Fasern

positiv. Desaminierung und Methylierung hatten keinen Einfluß auf die Anilinreaktion der kollagenen Fasern. Aus Tabelle II ist ersichtlich, daß die Phenolreaktion der kollagenen Fasern durch die angewandten Blockierungsreaktionen nicht beeinflusst wurde. Tabelle III enthält einige quantitative Daten über die Änderung der Anilinreaktionsfähigkeit bei verschiedenen Typen der kollagenen Fasern. Es zeigt sich wieder, daß bei der Anilinbehandlung in N-azetylierten Präparaten keine der kollagenen Fasertypen eine negative Doppelbrechung aufweist.

Zum Vergleich wurden auch einige strukturell dem Anilin verwandte Komponenten auf ihre Reaktionsfähigkeit mit kollagenen Fasern in Kontrollpräparaten und nach verschiedenen Blockierungsreaktionen untersucht. Die erhobenen Befunde wiedergibt Tabelle IV. Pyridin verursacht schon am unbehandelten Kollagen eine schwache negative Doppelbrechung. Man sieht weiterhin, daß die anisotrope Reaktionsfähigkeit auch dieser Komponente mit kollagenen Fasern nach Azetylierung gesteigert wird.

### Besprechung

Die Anilinreaktion zeigt an den verschiedenen Fasern wechselnde Stärke. Die quantitativen Unterschiede der Anilinreaktion bei den verschiedenen kollagenen Fasern bzw. elastischen Fasern könnten zunächst mit der Annahme erklärt werden, daß in den verschiedenen Fasertypen zwar dieselben Strukturkomponenten, aber in verschiedener Menge, vorhanden sind. Andererseits dürfte die Ursache dieser Erscheinung auch darin liegen, daß die anisotrope Anilinreaktion z. B. bei den elastischen Fasern durch stereochemische Verhältnisse

und bestimmte Seitengruppen am Molekülgerüst begünstigt bzw. bei den kollagenen Fasern in verschiedenem Grade gehemmt wird.

Unsere Befunde sprechen für diese letztere Annahme, denn wir fanden, daß nach Azetylierung der Schnitte — also nach Blockierung bestimmter reaktiver Seitengruppen — die topochemische Anilinbindefähigkeit der kollagenen Fasern bedeutend erhöht wird. Die entscheidende Rolle der reaktiven Seitengruppen bei gewöhnlicher Färbung biologischer Substrate ist von langer her bekannt. So spielen z. B. die Säuregruppen bzw. deren pH-abhängiger Dissoziationsgrad bei Färbung mit sauren Farbstoffen eine wichtige Rolle.

Es ist bekannt, daß z. B. die Blockierung der sauren Seitengruppen durch Methylierung die Basophilie völlig auslöscht. Die gesteigerte Anilinreaktion des Kollagens nach Azetylierung ist daher nur ein spezieller Fall der »Färbung«, wobei die chemische Änderung an den reaktiven Seitengruppen die orientierte Anlagerung des Anilins am submikroskopischen Strukturgefüge des Kollagens erleichtert.

Durch die Herstellung von Derivaten mit isolierter Blockierung der Hydroxylgruppen bzw. Aminogruppen (O-Azetylierung, bzw. N-Azetylierung), wie dies aus Tabelle II hervorgeht, könnte nachgewiesen werden, daß für die Steigerung der Anilinreaktion der kollagenen Fasern nur die Azetylierung an den Hydroxylgruppen entscheidend ist. Isolierte Aminoazetylierung hat auf die Anilinreaktion der kollagenen Fasern keinen wesentlichen Einfluß. Ebenso verursachte die Desazetylierung der O-azetylierten Präparate durch alkalische Hydrolyse eine Herabsetzung der gesteigerten Anilinreaktionsfähigkeit. Die Annahme, daß das Vorhandensein freier Hydroxylgruppen am submikroskopischen Strukturgefüge der kollagenen Fasern mit den Bedingungen der topochemischen Anlagerung des Anilins zusammenhängt, ist daher naheliegend. Zur Erklärung dieser mikrostrukturellen Erscheinungen können wir von einer Beobachtung GUSTAVSONS [4] am azetylierten Kollagen ausgehen. GUSTAVSON beobachtete nämlich, daß sich einige pflanzliche Gerbstoffe an das azetylierte Kollagen besser anlagern können, als an das unbehandelte. Zur Erklärung dieser Erscheinung nimmt GUSTAVSON an, daß durch die Blockierung der Hydroxylgruppen, welche sonst mit benachbarten Carbonylgruppen an Wasserstoffbrückenbildungen teilnehmen, unkomensierte Carbonylgruppen entstehen, und eine neuartige Bindung bestimmter Stoffe am submikroskopischen Strukturgerüst des Kollagens ermöglichen.

Wir können die Änderungen der orientierten Assoziationsfähigkeit des Anilins am Kollagen vor und nach Azetylierung, auf Grund der Beobachtungen von GUSTAVSON, wahrscheinlich folgendermaßen erklären: Die Hydroxylgruppen (des Hydroxyprolins) im Strukturgefüge des Kollagens nehmen mit benachbarten Carbonylgruppen an der Bildung von Wasserstoffbrücken teil.

Es sind also nur relativ wenige unkomensierte Carbonylgruppen vorhanden, weshalb die orientierte Anlagerungsfähigkeit des Anilins schwach ist.

Mit der Blockierung von Hydroxylgruppen wird eine Anzahl von unkompen-  
sierten Carbonylgruppen am submikroskopischen Strukturgefüge des Kolla-  
gens frei, womit dann die optisch gesteigerte Anilinreaktionsfähigkeit ver-  
bunden ist. Auf die Bindungsart von Anilin an die Carbonylgruppe können  
keine näheren Aussagen gemacht werden. Zwar hat KÜNZEL [7] für die Bin-  
dungsart von aromatischen Ringen, z. B. des Phenols auf das Kollagen Was-  
serstoffbindungen angenommen, es ist jedoch fraglich, ob das Anilinmolekül  
in derartige Bindungen eingehen kann. Wir haben in der schematischen

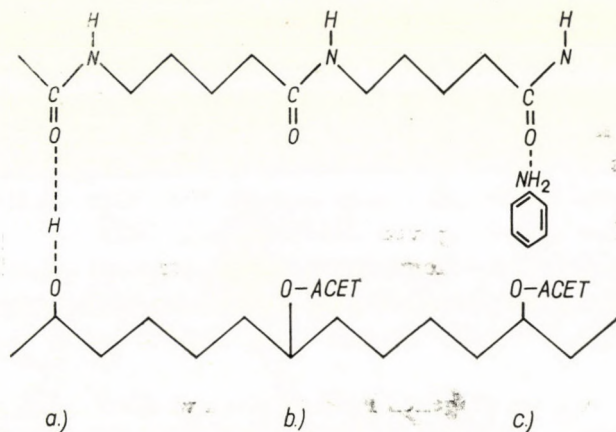


Abb. 3. Schema der verschiedenen Beziehungen von Peptidbindungen und OH-Gruppen benachbarter Polypeptidketten im Kollagen.

- a) In unbehandeltem Zustande bestehen Wasserstoffbrücken zwischen den genannten Gruppen; b) nach O-azetylierung werden die Wasserstoffbrücken gespalten; c) die frei gewordenen CO-Gruppen ermöglichen eine orientierte Anlagerung von Anilin

Zeichnung der Abb. 3 die orientierte und reversible Anlagerung des Anilins an das Kollagen durch eine nicht wohl definierte Bindungsart durch die Aminogruppe gezeichnet.

#### Zusammenfassung

Es wurde mit histochemischen Blockierungsreaktionen die Frage untersucht, welche reaktiven Seitengruppen am submikroskopischen Strukturgefüge des Kollagens bei der orientierten Assoziationsfähigkeit des Kollagens für Anilin entscheidend sind. Durch die polarisationsoptische Analyse des optischen Verhaltens der kollagenen Fasern nach verschiedenen Blockierungsreaktionen wurde gefunden, daß Azetylierung oder Benzoylierung die Anilinreaktion der kollagenen Fasern verstärkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei dieser Erscheinung die Blockierung der Hydroxylgruppen entscheidend ist, denn die Verstärkung der Anilinreaktion der kollagenen Fasern konnte nur in O-azetylierten Präparaten beobachtet werden, wogegen die isolierte Azetylierung der Aminogruppen (N-azetyl-derivate) auf die Stärke der Anilinreaktion keinen Einfluß hatte.

Es wird angenommen, daß bei der O-azetylierung die, sonst an Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen teilnehmenden Peptidgruppen frei gemacht werden, durch welche die gesteigerte Fähigkeit zur orientierten Assoziation des Anilins ermöglicht wird.



## LITERATUR

1. BREWER, D. B.: 1957. Differences in the Fine Structure of Collagen and Reticulin as Revealed by the Polarising Microscope. *J. Path. Bact.* **74**, 371. — 2. DANIELLI, J. F., zit. A. G. E. Pearse: 1954. *Histochemistry*. Churchill, London. — 3. GUSTAVSON, K. H.: 1956. *The Chemistry and Reactivity of Collagen*. Academic Press, New York. — 4. GUSTAVSON, K. H.: 1957. Interchain Bond between Hydroxy and Keto-imid Groups in Connective Tissue. *Blackwell, Oxford*, S. 192—198. — 5. KANTOR, T. G., SCHUBERT, M.: 1957. A Method for the Desulfatation of Chondroitin Sulfate. *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 152. — 6. KÜNZEL, A., SCHWANK, M.: 1940. Die Bindung von Phenolen und Phenolnovolack an Kollagen. *Collegium*. 489. — 7. KÜNZEL, A. in W. GRASSMANN: *Handbuch der Gerbereichemie 1944*. Springer, Wien, Bd. I., Teil 1., S. 519. — 8. LILLIE, R. D.: 1954. *Histopathological Technic and Practical Histochemistry*. Blakiston, London. — 9. McMANUS, J. F. A., CASON, J. E. zit. Pearse, A. G. E.: 1954. *Histochemistry*. Churchill, London. — 10. ROMHÁNYI, GY.: 1956. Anisotrop festődési reakciók jelentősége szubmikroszkópos szövettani vizsgálatokban. *Magy. Kém. Lapja*, **11**, 270. — 11. ROMHÁNYI, G.: 1955. Über die submikroskopische Struktur der elastischen Fasern. *Acta morph. hung.* **5**, 311. — 12. SCHMIDT, W. J.: Der Wandel der optischen Anisotropie bei topemischen Reaktionen histologischer Strukturen. Bericht der Oberhessischen Gesellschaft für Naturwiss. und Heilkunde zu Gießen. *Ntw. Abt.* **23**, 56. — 13. NÉMETH-CSÓKA, M.: 1956. Untersuchungen über die feinere Struktur der elastischen Fasern bei pathologischen Gefäßveränderungen. *Acta morph. hung.* **6**, 327.

## ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЛЛАГЕНОВОЙ СТРУКТУРЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ПОМОЩИ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО МИКРОСКОПА

K. ВИСЛОИ и М. НЕМЕТ-ЧОКА

При помощи гистохимических реакций блокады авторы рассматривали вопрос, какие реактивные боковые группы в подмикроскопической структуре коллагена играют решающую роль в деле ориентированной ассоциативной способности коллагена в отношении анилина. Поляризационно-оптическим анализом оптического поведения коллагеновых волокон авторы обнаружили, что ацетилирование или бензоилирование усиливает анилиновую реакцию коллагеновых волокон. Далее авторы наблюдали, что при этом явлении решающую роль играет блокада гидроксильных групп, потому что усиление анилиновой реакции наступало только в О-ацетилированных препаратах. Изолированное ацетилирование аминогрупп (производные N-ацетила) не оказывало действия на степень анилиновой реакции. Авторы предполагают, что при О-ацетилировании освобождаются пептидные группы, которые в других случаях образуют с гидроксильными группами соединения с водородом. В результате этого становится возможным повышение способности к ориентированной ассоциации с анилином.

## HISTOCHEMICAL AND POLARISATION-MICROSCOPIC INVESTIGATIONS INTO THE SUBMICROSCOPIC STRUCTURE OF COLLAGEN

K. VISZLÓY und M. NÉMETH-CSÓKA

Histochemical blocking reactions have been applied to determine in the submicroscopic structure of collagen the reactive side groups involved in the oriented association with aniline. Polarisation-microscopic analysis of the optical behaviour of the collagenous fibres after different blocking reactions revealed that the aniline reaction was enhanced by acetylation or benzoylation. It was further found that a blocking of the hydroxyl groups played a decisive role in this phenomenon, since it was solely in O-acetylated preparations that the aniline reaction became more intense, while isolated acetylation of the amino groups (acetyl N derivatives) had no effect. It is assumed that on O-acetylation, peptide groups are released which, otherwise, participate in the formation of hydrogen bridges together with hydroxyl groups, and that it is by these peptides that the capacity for oriented association with aniline is increased.

Dr. Kocsárd VISZLÓY, Pécs, Dischka Győző u. 5. Hungary

Dr. Mihály NÉMETH-CSÓKA, Pécs, Megyei Kórház, Akác u. 1. Hungary.