

Zur quantitativen polarisationsmikroskopischen Darstellung von Kollagen Typ I und Typ III an histologischen Paraffinschnitten

S. Ogbuihi, Z. Müller und P. Zink

Gerichtlich-medizinisches Institut der Universität Bern, Bülhstrasse 20, CH-3012 Bern, Schweiz

Quantitative Polarizing Microscopy for the Evaluation of Collagen Types I and III in Paraffin-Embedded Sections

Summary. The industrial dye Solophenyl Red 3 BL (Ciba-Geigy) dissolved in a saturated aqueous solution of picric acid has proved suitable for differentiating between collagen types I and III in histological sections. When examined under polarization microscopy, type I fibers are radiant orange while type III fibers are green. Using 5 μm paraffin sections, an optimal staining procedure was determined: sections were first stained with Resorcin Fuchsin for elastic fibers and with Celestin Blue/Mayer's Hematoxylin for nuclear structures. The staining was then completed with 0.1 g Solophenyl Red/100 ml saturated aqueous solution of picric acid for 60 min at a pH value of 1.25. It was shown that the dye stained collagen selectively. With the aid of a photomultiplier, the spectral distribution of a series of lung sections adequately stained according to the optimized procedure was carried out using a monochromator and an interference filter, respectively. Both methods yielded identical peaks at 590 nm for the orange colored light of collagen type I and 490 nm for the green light of collagen type III. Application of appropriate filters permitted the intensity of the orange and green light at 590 nm and 490 nm to be measured. Long postmortem intervals did not affect the measured values. Quantitative inferences on the ratio of collagen I to collagen III could then be deduced from the ratio of the intensity of orange to green light. This index I/III is often applied in the diagnosis of discrete fibrotic changes in various organs.

Key words: Collagen types I and III, selective histological stain – Collagen, quantitative polarizing microscopy

Zusammenfassung. Der Textilfarbstoff Solophenyl Rot 3 BL (Ciba-Geigy) in gesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung ist zur histologischen Unterscheidung von Kollagen I und III geeignet. Im polarisierten Licht leuchten die Kollagen-I-Fasern orange und die Kollagen-III-Fasern grün. An 5 μ dicken Paraffinschnitten der Lunge hat sich folgende optimale Färbemethode bewährt: zuerst färben mit Resorcin-Fuchsin zur Darstellung der elastischen Fasern, dann mit Celestin Blau/Mayer's Hämalaun zur Kerndarstellung. Anschließend 0.1 g Solophenyl Rot/100 ml gesättigter wäßriger Pinkrinsäurelösung, Färbezeit 60 min, pH-Wert 1,25. Der Farbstoff färbt Kollagen selektiv. Mit einem Monochromator und einem Interferenzverlauffilter wurde unter Anwendung eines Photomultipliers die Spektralverteilung der Polarisationsfarben ermittelt. Mit beiden Verfahren fanden sich Peaks bei 590 nm für die orange polarisierenden Kollagen-Typ-I- und bei 490 nm für die grün polarisierenden Typ-III-Fasern. Durch Filter läßt sich die Intensität des orangen bzw. grünen Lichts messen. Fäulnisvorgänge beeinflussen die Meßwerte nicht. Aus dem Verhältnis der Lichtintensitäten ergibt sich das Mengenverhältnis von Kollagen I zu III. Dieses Verhältnis ist ein Index, der für die Beurteilung vor allem von diskreten fibrosierenden Vorgängen in verschiedenen Organen verwendet wird.

Schlüsselwörter: Kollagen Typ I und III, selektive histologische Färbung mit Solophenyl Rot – Kollagen, quantitative Polarisationsmikroskopie

Einleitung

Die Hauptkomponente des faserigen Bindegewebes bei reparativen, reaktiven oder primär pathologischen Veränderungen stellt das Kollagen mit seinen Typen I und III dar (Bradley et al. 1975; Fietzek und Kühn 1976; Huang 1977; Minor 1980; Leblond und Wright 1980; Bateman et al. 1981). Die Mengenverhältnisse der beiden Kollagentypen sind für die Orthologie eines jeden Gewebes charakteristisch. Verschiebungen treten bei pathologischen Vorgängen auf, z.B. Zunahme des Typ III auf Kosten von Typ I bei Ehlers-Danlos-Syndrom oder Osteogenesis imperfecta und Zunahme des Kollagen Typ I auf Kosten von Typ III bei fibrosierenden Veränderungen wie Pneumokoniosen, idiopathischen Lungenfibrosen, fibrosierender Alveolitis, Leberzirrhose oder Vernarbungen.

Bei groben Veränderungen bereitet die lichtmikroskopische Beurteilung im allgemeinen keine Schwierigkeiten. Hingegen ist bei diskreten Veränderungen und bei längeren postmortalen Liegezeiten die Unterscheidung zwischen echten Fibrosierungen und präexistenten Bindegewebsfasern oft schwer. Eine quantitative Erfassung der Kollagentypen am histologischen Schnittpräparat würde derartigen Unsicherheiten entgegenwirken und so eine objektivere Beurteilung der fibrosierenden Prozesse ermöglichen. Es wird deshalb in der vorliegenden Arbeit eine selektive, normierte und reproduzierbare histologische Methode zur Quantifizierung der relativen Mengen des Kollagens I und III, auch nach längeren postmortalen Intervallen, vorgestellt.

Material und Methode

Vorbereitung der Schnitte

Serien von 5 μ dicken Paraffinschnitten aus 3 \times 2 cm großen Gewebsblöcken formalinfixierter Lunge wurden zunächst wie folgt gefärbt:

1. Entparaffinierte Schnitte kurz abspülen in 70%igem Alkohol.
2. In Resorcin-Fuchsin (nach Weigert) verdünnt 1:1 mit 70%igem sauren Alkohol (1% konz. HCl in 70%igem Alkohol) für 24 h bei Zimmertemperatur färben.
3. Mit 70%igem Alkohol mehrmals abspülen, bis Spüllösung klar ist. Anschließend mit Aqua dest. spülen.
4. Celestinblau (2,5 g Eisenammoniumalaun in 50 ml Aqua dest. lösen, 0,25 g Celestin Blau B (Sigma) dazugeben und 3 min kochen. Abkühlen, filtrieren und 7 ml Glycerin dazugeben). 5 min bei Zimmertemperatur färben.
5. In Leitungswasser mehrmals abspülen, anschließend mit Aqua dest. abspülen.
6. In Mayer's Hämalaunlösung (Merck) 5 min bei Zimmertemperatur färben.
7. In Leitungswasser abspülen.
8. Kurz differenzieren in 70%igem sauren Alkohol.
9. Unter Leitungswasser ein paar Minuten bläuen lassen.
10. In Aqua dest. abspülen.

Optimierung der Solophenyl-Rot-Färbung

Anschließend wurden die vorbehandelten Präparate in einer Versuchsreihe mit verschiedenen Konzentrationen von Solophenyl Rot 3 BL (Ciba-Geigy) in gesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung unter verschiedenen pH-Bedingungen und Färbezeiten gefärbt (Tabelle 1). Pro Versuch wurden 5 Schnittpräparate verwendet.

Prüfung der Farbstoff-Bindung

Die gefärbten Schnittpräparate wurden jeweils zweimal 30 s in 0,01 N HCl eingetaucht, ungedeckt luftgetrocknet und auf farbige Polarisation hin mikroskopisch kontrolliert. Mit 2,5 ml 0,1 N NaOH wurden die Präparate direkt von den Objektträgern in die Meßküvetten des Spektrophotometers (Pye-Unicam U SP 8 – 100 UV) quantitativ (mit Skalpellen) transferiert. Der Inhalt einer jeden Meßküvette wurde eluiert, indem die Proben zunächst mit Ultraschall ca. 15 s zerkleinert wurden, anschließend 30 min bei 37°C inkubiert und 10 min zentrifugiert wurden, so daß ein klarer Überstand vorlag. Die Absorption des klaren Überstandes wurde gegen 2,5 ml gesättigter Pikrinsäurelösung spektrophotometrisch bei dem experimentell bestimmten Absorptionsmaximum des Farbstoffes Solophenyl Rot 3 BL (540 nm) gemessen.

Prüfung der Spezifität

Zur Prüfung der Spezifität des Farbstoffes für Kollagen wurden die farbstoffbindenden Gruppen des Kollagens blockiert, nämlich die Aminogruppen des Lysin und Hydroxylysin und die Guanidylgruppen des Arginin. Schnittserien wurden mit Resorcin-Fuchsin und mit Celestinblau-Mayer-Hämatoxylin wie oben beschrieben behandelt. Vor der Färbung mit Solophenyl Rot (0,1 g/100 ml, 60 min, pH 1,25) wurden die Schnitte mit NaNO₂ für 24 h bei Zimmertemperatur inkubiert zur Blockierung der Aminogruppen (6 g NaNO₂ + 5 ml Essigsäure + 35 ml Aqua dest.). Eine weitere Serie von Schnitten wurde zusätzlich für 24 h bei Zimmertemperatur mit einer 40%igen Lösung von Acetanhydrid in wasserfreiem Pyridin zur Blockierung der Sulfonsäuregruppen inkubiert. Nach Eluation und Vorbereitung wie oben beschrieben wurden die Absorptionswerte gemessen. Vergleichspräparate wurden als Kontrolle für 24 h bei Zimmertemperatur in Aqua dest. belassen, anschließend mit Solophenyl Rot gefärbt, eluiert und spektrophotometriert. Um die Vollständigkeit der Eluation zu kontrollieren, wurden die faserigen Sedimente sämtlicher Proben mit gekreuzten Polarisatoren mikroskopiert.

Tabelle 1. Experimentelle Färbungen mit Solophenyl Rot 3 BL (Ciba-Geigy) in gesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung

Konzentration von Solophenyl Rot 3 BL in Pikrinsäure (g/100 ml)	Zeit (min)	pH
0,05	60	natürlicher pH der Farbstofflösung in Pikrinsäure: 2–2,5
0,075	60	
0,10	60	
0,125	60	
0,15	60	
0,175	60	
0,1	30	2
0,1	40	2
0,1	45	2
0,1	50	2
0,1	55	2
0,1	60	2
0,1	65	2
0,1	70	2
0,1	75	2
0,1	80	2
0,1	90	2
0,1	60	3,0 (eingestellt durch
0,1	60	2,70 tropfenweise Zugabe
0,1	60	2,5 von 0,1 N NaOH
0,1	60	2,25 bzw. 5 N HCl)
0,1	60	2,0
0,1	60	1,75
0,1	60	1,5
0,1	60	1,25
0,1	60	1,0

Spektralverteilung des polarisierten Lichts

Unter den experimentell ermittelten optimalen Bedingungen (Farbstoffkonzentration, Färbzeit und pH-Wert) wurde eine weitere Serie von 10 ähnlichen Lungenschnitten angefertigt und mit gekreuzten Polarisatoren bei Objektivvergrößerungen von $\times 25$ und $\times 40$ mikroskopiert. Die Spektralverteilung des gesamten farbigen polarisierten Lichts wurde jeweils an 5 verschiedenen Stellen des subpleuralen, interlobulären und peribronchovaskulären Interstitiums zuerst mit einem Monochromator (Instrumatic B 204, range 190–990 nm) und dann mit einem Interferenzverlauffilter (S 200 Schott) ermittelt. Die mikropolarimetrischen Messungen wurden mit einem Photomultiplier (RCA Typ 4832, sensitiv zwischen 200–900 nm) über ein Mikrovoltmeter (Keithley Typ 177 Mikrovolt DMM) vorgenommen. Als Lichtquelle

diente die Halogenlampe FCR 12 V, 100 W eines Leitz Orthoplans bei Trafoeinstellung 11 Volt.

Anwendung bei längeren postmortalen Liegezeiten

Unfixierte Hautstreifen mit subcutanem Bindegewebe sowie Gewebstücke aus den Lungen wurden bis zu 24 Tage bei Zimmertemperatur belassen. In Abständen von 4 Tagen wurden Proben entnommen, in Formalin fixiert und nach der beschriebenen Methode gefärbt. Haut mit subcutanem Bindegewebe sowie Gewebstücke aus der Lunge einer Leiche mit einer Liegezeit von ca. 4,5 Wochen wurden ähnlich aufgearbeitet und ausgewertet.

Ergebnisse

1. Bei der Mikroskopie der histologischen Präparate ohne Polarisation traten die elastischen Fasern deutlich dunkelbraun hervor. Daneben fanden sich in geringerer Menge andere dünne Fasern, die ungefärbt waren und sich nur wenig von der Umgebung abhoben. Der größere Teil der Faserelemente erschien schwach ziegelrot. Die Kerne zeigten deutliche dunkle Kernmembranen und Chromatingerüste. Unter gekreuzten Polarisatoren leuchteten die vorher ziegelrot erscheinenden Fasern teils orange und teils grünlich. Die dunkelbraunen elastischen Fasern sowie die dünneren Fasern blieben als solche erkennbar und polarisierten nicht.

2. Während alle Präparate eine deutliche farbige Polarisation vor der Elution mit 0.1 N NaOH aufwiesen, zeigten die faserigen Sedimente nach Elution und Zentrifugieren keine Polarisation mehr. Die dunkelbraunen elastischen Fasern blieben in den Sedimenten deutlich zu erkennen. Sämtliche anderen Fasern waren blaß und farblos. Die an den histologischen Präparaten gebundenen Farbstoffmengen waren somit vollständig eluiert. An der Farbstoffbindung waren also nur die ziegelrot gefärbten, farbig polarisierenden Fasern beteiligt, nämlich die Kollagen-Typ-I- und Typ-III-Fasern.

3. Nach der Desaminierung mit NaNO_2 zeigte sich eine Verminderung der gebundenen Farbstoffmenge um 84% (Abb.1). Nach zusätzlicher Blockierung der Guanidylgruppen durch Acetylierung wurde die Farbstoffbindung vollstän-

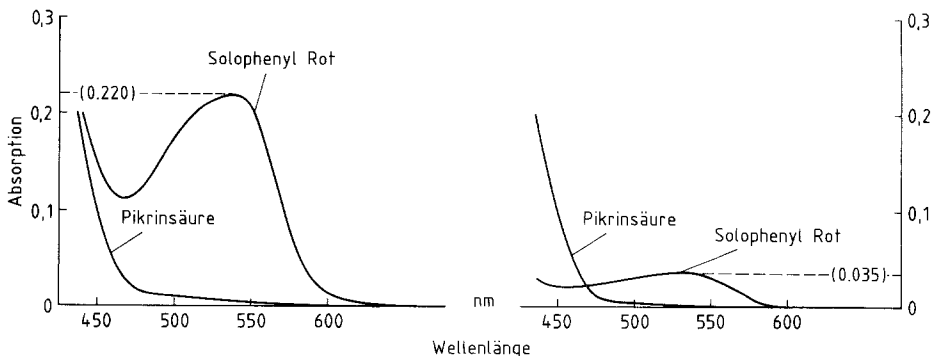


Abb. 1. Absorptionskurve des eluierten Solophenyl Rot: (links) aus einem optimal gefärbten Schnittpräparat und (rechts) aus einem nach Desaminierung gefärbten Schnittpräparat. Reduzierung der Absorptionswerte um 84% (von 0,220 auf 0,035)

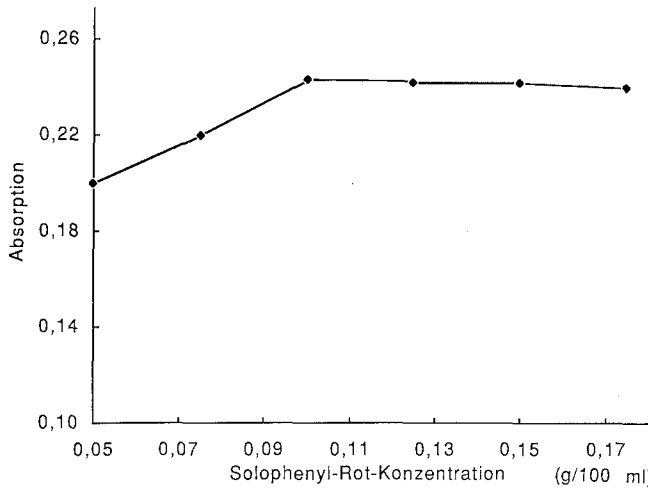


Abb. 2. Konzentration des Solophenyl Rot: Abhängigkeit der Farbstoffbindung von der Farbstoffkonzentration. Bei 0,1 g/100 ml ist eine Absättigung mit dem Farbstoff deutlich erkennbar

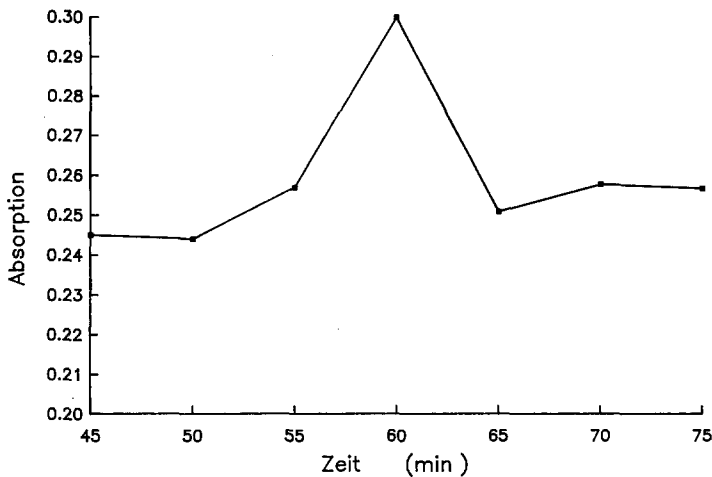


Abb. 3. Färbezeit: Abhängigkeit der Farbstoffbindung von der Färbezeit – eine Zeit von 60 min erwies sich als optimal

dig aufgehoben. Hingegen zeigten die mit Aqua dest. behandelten Kontrollpräparate keine Verminderung der Farbstoffbindung. Die Verminderung bzw. Aufhebung der Farbstoffbindung nach Ausschaltung der farbstoffbindenden Gruppen des Kollagens belegt die Spezifität des Solophenyl Rot 3 BL für Kollagen am histologischen Paraffinschnitt. Die Menge des aus den histologischen Präparaten eluierten Farbstoffes wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 540 nm bestimmt. Da der Farbstoff in niedrigen Konzentrationen vorlag, gilt das Lambert-Beersche Gesetz mit Proportionalität zwischen Lichtintensität und Farbstoffbindung. Die Farbstoffmenge steht somit in direktem Verhältnis zu dem Gehalt an Kollagenfasern, welche den Farbstoff gebunden haben.

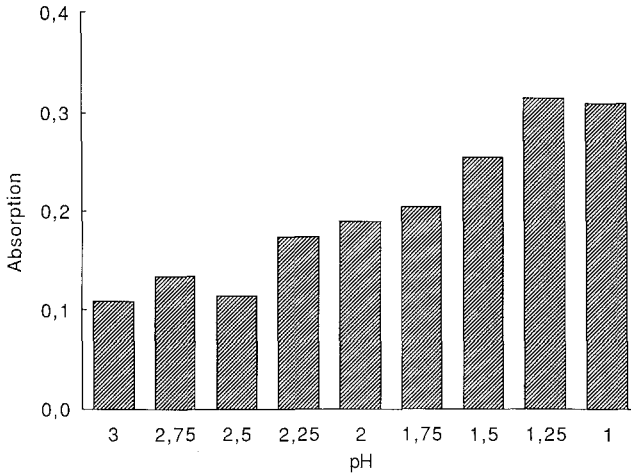


Abb. 4. pH-Wert: Abhängigkeit der Farbstoffbindung vom pH-Wert – maximale Farbstoffbindung bei pH 1,25

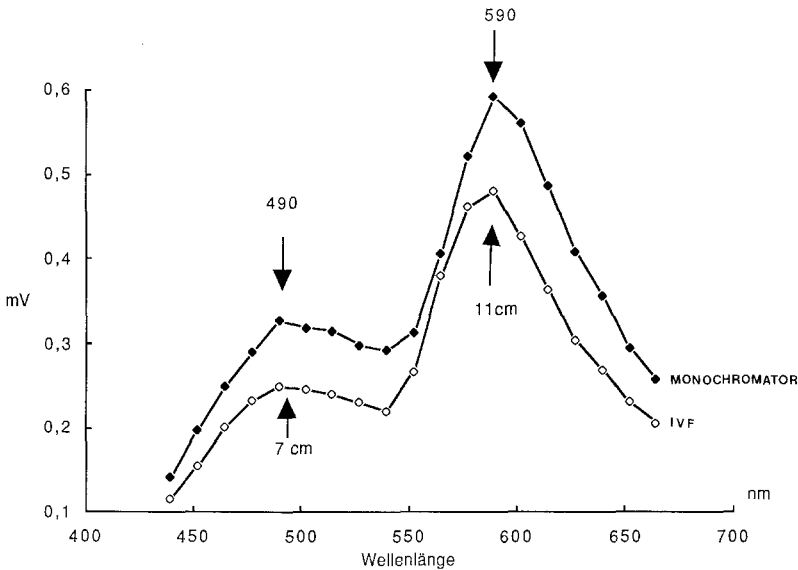


Abb. 5. Spektralverteilung des gesamten polarisierten Lichtes bei optimal gefärbten Schnittpräparaten. Zwei Meßverfahren – Monochromator und Interferenzverlauffilter – ergeben identische Peaks: bei 490 nm für die grüne Polarisation des Typ-III-Kollagens und bei 590 nm für die orange Polarisation der Typ-I-Kollagenfasern

4. Die optimale Farbstoffbindung der gleich großen und aus dem gleichen, relativ homogenen Gewebsblock stammenden Schnittpräparate unter verschiedenen Konzentrationen von Solophenyl Rot 3 BL fand sich bei einer Solophenyl-Rot-Konzentration von 0,1g/100 ml gesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung (Abb. 2).

5. Bei den verschiedenen Färbezeiten erwies sich 60 min als optimal (Abb. 3).

6. Der optimale pH-Wert lag bei 1,25 (Abb. 4).

7. Die Spektralverteilung des farbigen polarisierten Lichts ergab mit zwei getrennten Verfahren und bei Messungen an verschiedenen Stellen übereinstimmende Peaks bei 590 nm für die orange Polarisation des Typ-I-Kollagens und bei 490 nm für die grüne Polarisation des Typ-III-Kollagens (Abb. 5).

8. Die Spektralverteilung des polarisierten Lichts in den Präparaten aus den Hautstreifen mit längeren Liegezeiten zeigte ebenfalls zwei getrennte Peaks bei 490 nm und bei 590 nm. Die längeren postmortalen Intervalle hatten die farbige Polarisation der Kollagenfasern nicht beeinflusst.

Nach diesen Ergebnissen läßt sich die Vorschrift für die Färbung (siehe „Vorbereitung der Schnitte“ 1–10) mit folgenden Schritten fortsetzen und abschließen:

11. Frische Lösung von Solophenyl Rot 3 BL (Ciba-Geigy) in gesättigter wäßriger Pikrinsäure (0,1 g/100 ml) kalt zubereiten. pH-Wert auf 1,25 durch tropfenweise Zugabe von 0,1 N NaOH bzw. 5 N HCl einstellen.

12. Präparate 60 min färben.

13. Zweimal je 30 s abspülen mit 0,01 N HCl.

14. Entwässern in Alkoholreihe, klären in Xylol und mit Eukitt eindecken.

Diskussion

Mit der Picro-Sirius-Färbung gelang die polarisationsoptische Differenzierung von Kollagen-Typ-I- und Typ-III-Fasern am histologischen Schnittpräparat (Junqueira 1979). Der Farbstoff Sirius Red Supra verstärkt die natürliche schwache Anisotropie des Kollagens um das Mehrhundertfache; die Typ-I-Fasern leuchten im polarisierten Licht rot und die Typ-III-Fasern grün auf. Diese Eigenschaft machten sich einige Untersucher zunutze, um die Verteilung von Kollagen in verschiedenen Gewebsarten darzustellen, manchmal in Kombination mit quantitativen optischen Techniken, wie z.B. der optischen Diffraktometrie (Junqueira et al. 1979a; Montes et al. 1980; Dziedic-Goclawska et al. 1982; Rozycka et al. 1982). Die Ergebnisse stimmten mit den Befunden immunhistochemischer und biochemischer Analysen überein (Gabbiani et al. 1976; Remberger et al. 1975; Hurst et al. 1977; Huang 1977; Madri und Furtmayr 1980).

Der in der vorliegenden Arbeit angewendete Farbstoff Solophenyl Rot 3 BL verstärkt, wie der Farbstoff Sirius Red Supra, die schwache natürliche Anisotropie des Kollagens und differenziert die Polarisationsfarben in ein deutliches Orange für Typ-I- und Grün für Typ-III-Kollagen. Solophenyl Rot 3 BL ist ein Polyazofarbstoff der Textilindustrie (Molekulargewicht 1241, Länge des Moleküls 51,1 Ångström). Wie der Farbstoff Sirius Red Supra (Molekulargewicht 1347, Moleküllänge 46 Ångström) besitzt Solophenyl Rot 3 BL sechs Sulfonsäuregruppen. Anders als Sirius Red Supra und der ähnliche Farbstoff Direct Red (ICI) zeigte Solophenyl Rot keinen störenden Hintergrund. Zusätzlich schien die Löslichkeit etwas besser. Die Basis der Farbreaktion ist bei diesem Farbstoff die Bindung der Sulfonsäuregruppen an den Aminogruppen von Lysin und Hydroxylysin sowie an den Guanidylgruppen des Arginin – Komponenten der Dreikettenspirale des Kollagens.

Die für dieses Verfahren entscheidenden Polarisationsfarben sind von der Dicke der Fasern abhängig (Perez-Tamayo und Montfort 1980); während das Kollagen Typ I in dicken Faserbündeln zu finden ist, tritt das Kollagen Typ III reichlich in den dünnen Reticulumfasern auf. Es handelt sich bei diesen extrazellulären Formen des Kollagens um zwei genetische Typen mit unterschiedlicher Antigenpezifität und unterschiedlichen Aggregationsmustern der Fibrillogenese. Diese Eigenschaften sind durch die primäre Struktur der Polypeptide in den Monomeren bestimmt (Bornstein et al. 1966; Fietzek und Kühn 1976). Die Merkmale – Antigenpezifität und Aggregationsmuster – ermöglichen ihrerseits die Entwicklung von Nachweismethoden: die Antigenpezifität für die immunhistochemischen Methoden und die fibrilläre Aggregation für die polarimetrischen Methoden.

Das Ziel der verschiedenen Nachweismethoden ist letztendlich, das Mengenverhältnis zwischen Kollagen Typ I und Typ III in verschiedenen Geweben zu bestimmen, damit auch diskrete pathologische Verschiebungen erkennbar werden. Dieser Index I/III ist z.B. bei einer Osteogenesis imperfecta von 5,9 für normales Knochengewebe auf 1,8 herabgesetzt, bevor die Krankheit klinisch apparent wurde (Hill und Harper 1984). Bei verschiedenen mit leichteren und z.T. unklaren Fibrosierungen einhergehenden Lungenveränderungen sind entsprechende charakteristische Verschiebungen des Index I/III festgestellt worden (Crystal et al. 1978; Madri und Furthmayr 1980; Reiser und Last 1981).

Die Verschiebungen des Index I/III wurden bisher immunhistochemisch oder nach chemischer Extraktion des schwer löslichen Kollagens bestimmt. Solche Methoden sind aufwendig und wegen Störungen oder Verlust der Antigenpezifität nach längeren postmortalen Intervallen in der forensisch-pathologischen Diagnostik problematisch (Seyer et al. 1976; Gabbiani et al. 1976; Hurst et al. 1977; Minor 1980; Madri und Furthmayr 1980; Laurent et al. 1981; Chan und Cole 1984). Während sich die immunhistochemischen und biochemischen Methoden der chemischen Extraktion des Kollagens bedienen, begnügen sich die polarimetrischen Verfahren mit der Darstellung der extrazellulären Faseraggregation in situ (Junqueira et al. 1979a u. b; Dziedic-Goclawska et al. 1982; Rozycka et al. 1982). Es war nun zu prüfen, ob und inwieweit die polarimetrischen Methoden störanfällig sind oder fehlerhafte Werte liefern. Zunächst ergaben Reihenversuche, daß postmortale Liegezeiten bis zu 4 Wochen die Auswertbarkeit der histologischen Schnitte nicht beeinträchtigen. Als ein möglicher Störfaktor kam das Elastin in Frage. Es ist bekannt, daß das Elastin genauso wie das Kollagen ein extrazellulär unlösliches Protein ist, welches bei der Fibrillogenese ebenfalls durch Aggregation und „Cross-links“ stabilisiert wird. Die intrazellulären Vorstufen sind – wie die des Kollagens – löslich und sind mit C- und N-terminalen Gruppen versehen (Bailey 1978). Wegen dieser Ähnlichkeiten in Biosynthese und intra- sowie extrazellulärem physikalisch-chemischen Verhalten, und weil auch das Elastin eine natürliche schwache Anisotropie besitzt (Fietzek und Kühn 1976; Bailey 1978), stellt sich die Frage nach einer etwaigen Beteiligung der elastischen Fasern an der Polarisation. Um die Selektivität des Solophenyl Rot 3 BL für Kollagen behaupten zu können, muß die Miterfassung der elastischen Fasern ausgeschlossen werden. Es ist zwar bekannt, daß amphoterische Farbstoffe in Pinkrinsäurelösung bei niedrigen pH-Werten

das Kollagen selektiv anfärben (Müller und Chytil 1966; Constantine und Mowry 1968), jedoch ist die Schärfe der Selektivität von dem Farbstoff abhängig. Solophenyl Rot 3 BL ist als Farbstoff in der Histologie bisher unbekannt. Ob dieser Farbstoff in Pinkrinsäurelösung, wie hier angewendet, die elastischen Fasern oder Teile davon mit anfärbt, konnte mikroskopisch zunächst nicht ohne weiteres entschieden werden. Deshalb wurden die elastischen Fasern mittels Resorcin-Fuchsin so gefärbt, daß sie auch während der Polarisationsmikroskopie dunkelbraun erkennbar blieben. Es stellte sich heraus, daß die elastischen Fasern in der Solophenyl-Rot-Färbung nicht polarisieren. Damit ist eine wichtige Anforderung an eine Färbmethode zur polarimetrischen Quantifizierung von Kollagenfasern erfüllt.

Das Kollagen ist bei der beschriebenen Färbmethode mit Solophenyl Rot abgesättigt. Dies ließ sich durch Reihenversuche mit Variation von Farbstoffkonzentration, Färbezeit und pH-Wert belegen. Der Nachweis der Absättigung erfolgte durch Eluation und spektralphotometrische Messung der Farbstoffmengen an den Schnittreihen, wobei die Vollständigkeit der Eluation jeweils mikroskopisch kontrolliert wurde.

Die polarisationsoptische Bestimmung des Index Kollagen I/III mit der Solophenyl-Rot-Färbung erfordert die quantitative Messung der Mengenverhältnisse von Kollagen I und III am histologischen Schnitt. Nachdem davon ausgegangen werden kann, daß Solophenyl Rot das Kollagen selektiv anfärbt und daß die Kollagenfasern auch mit dem Farbstoff abgesättigt sind, entsprechen die spektrophotometrisch ermittelten Absorptionswerte der Menge an Kollagenfasern, da wir uns im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes bewegen. Die durch den gebundenen Farbstoff entstandene leuchtend farbige Polarisation wies spektralanalytisch zwei Peaks auf (Abb. 5), für Kollagen III bei 490 nm und für Kollagen I bei 590 nm. So kann mit entsprechenden Filtern und einem geeigneten Photomultiplier die Intensität des polarisierten Lichts für die beiden Farben getrennt gemessen werden.

Die polarimetrischen Meßwerte sind demnach quantitativer Ausdruck der Menge der farbig polarisierenden Kollagenfasern. Der Index I/III läßt sich mit dieser Methode bestimmen und erlaubt Rückschlüsse auf etwaige fibrosierende Prozesse, auch bei diskreten Veränderungen und nach längeren Leichenliegezeiten – ein entscheidender Vorteil in der forensisch-pathologischen Diagnostik.

Literatur

- Bailey AJ (1978) Collagen and elastin fibres. *J Clin Pathol [Suppl]* 31:49–58
- Bateman ED, Turner-Warwick M, Adelman-Grill BC (1981) Immunochemical study of collagen types in human fetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax* 36:645–653
- Bornstein P, Kang AH, Piez KA (1966) The limited cleavage of native collagen with chymotrypsin, trypsin and cyanogen bromide. *Biochemistry* 5:3803–3812
- Bradley K, McConnel-Breul S, Crystal RG (1975) Collagen in the human lung. *J Clin Invest* 55:543–550
- Chan D, Cole WG (1984) Quantitation of type I and type III collagen using electrophoresis of alpha chains and cyanogen bromide peptides. *Anal Biochem* 139:322–328
- Constantine VS, Mowry RW (1968) Selective staining of human dermal collagen – an analysis of standard methods. *J Invest Dermatol* 50:414–418

- Crystal RG, Fulmer JD, Baum BJ, Bernardo J, Bradley KH, Bruel SD, Elson NE, Fells GA (1978) Cells, collagen and idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 155: 199–224
- Dziedic-Goclawska A, Rozycka M, Czyba JC, Moutier R, Lenczowski S, Ostrowski K (1982) Polarizing microscopy of picosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. *Basic Appl Histochem* 26: 227–239
- Dziedic-Goclawska A, Rozycka M, Czyba JC, Sawicki W, Moutier R, Lenczowski S, Ostrowski K (1982) Application of the optical Fourier transform for analysis of spatial distribution of collagen fibres in normal and osteopetrotic bone tissue. *Histochemistry* 74: 123–137
- Fietzek PP, Kühn K (1976) The primary structure of collagen. *Int Rev Connect Tissue Res* 7: 1–60
- Gabbiani G, Le Lous M, Bazin S, Delauney A (1976) Collagen and myofibroblasts of granulation tissue: a chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 21: 133–145
- Hill RG, Harper E (1984) Quantitations of types I and III collagen in human tissue samples and cell cultures by cyanogen bromide peptide analysis. *Anal Biochem* 141: 83–93
- Hurst DJ, Kilburn KH, Baker WM (1977) Normal newborn and adult human lung collagen – analysis of types. *Connect Tiss Res* 5: 117–125
- Huang TW (1977) Chemical and histochemical studies on human alveolar collagen fibres. *Am J Pathol* 86: 81–93
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani R (1979a) Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem* 11: 447–455
- Junqueira LCU, Montes GS, Krisztan RM (1979b) The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell Tissue Res* 202: 453–460
- Laurent GJ, Cockerill P, McAnulty RG, Hastings JRB (1981) A simplified method for quantitation relative amounts of type I and type III collagen in small tissue samples. *Anal Biochem* 113: 301–312
- Leblond CP, Wright GM (1980) Intercellular localization of the precursors of type I collagen as shown by immunoperoxidase and immunoradioautographic techniques. *Acta Histochem Cytochem* 13: 23–34
- Madri JA, Furthmayr H (1980) Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 11: 353–366
- Minor RR (1980) Collagen metabolism. A comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *Am J Pathol* 98: 227–280
- Montes GS, Krisztan RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourao PAS, Junqueira LCU (1980) Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry* 65: 131–141
- Müller J, Chytil F (1966) *Farbstoffe in der mikroskopischen Technik*. Verlag der tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag
- Perez-Tamayo R, Montfort I (1980) The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. *Am J Pathol* 100: 427–442
- Reiser KM, Last JA (1981) Pulmonary fibrosis in experimental acute respiratory disease. *Am J Respir Dis* 123: 58–63
- Remberger K, Gay S, Fietzek PP (1975) Immunohistochemical characterization of collagen in liver cirrhosis. *Virchow's Arch [A]* 367: 231–240
- Rozycka M, Lenczowski S, Sawicki W, Baranska W, Ostrowski K (1982) Optical diffraction as a tool for semi-automatic quantitative analysis of tissue specimens. *Cytometry* 2: 244–248
- Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH (1976) Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 57: 1498–1507