

(Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut an der Militär-Medizinischen Akademie zu Leningrad. — Vorstand: Prof. Dr. A. Moissejew.)

## Chemisch-spektroskopische Eigenschaften des Malariapigmentes.

Von

Dr. M. Glasunow.

(Eingegangen 17. August 1924.)

Im Laufe der Malaria beobachtet man im menschlichen Organismus eine Ablagerung zweier grundverschiedener Arten von Pigmenten; eines von ihnen, das nicht spezifisch ist und bei allen Erkrankungen die mit Zerstörung der Erythrocyten einhergehen vorkommt, gehört zur Gruppe der Hämosiderine: das andere, für Malaria besondere und kennzeichnende, ist durch die Lebenstätigkeit des Malariaparasiten gebildet; es ist immer amorph und *nie* krystallinisch, von schwarzer oder braunschwarzer Farbe: es findet sich im Blutstrome, innerhalb roter und weißer Blutzellen und frei, vorzugsweise jedoch in den Zellen des reticulo-endothelialen Systems eingeschlossen. Die Epithelzellen enthalten es *nie* mals.

In der Literatur finden wir für dieses Pigment verschiedene Benennungen: die älteste und am meisten eingebürgerte „*Melanin*“ ist vermutlich von *Meckel* eingeführt und wird bis zur letzten Zeit von den Forschern angewandt, die sich der histio-chemischen Eigenschaften der Pigmente als Kriterium bedienen. *Askanazy*<sup>1)</sup> nennt es „*Hämamelanin*“, um seine hämoglobinogene Abstammung zu betonen. Es ist ganz regelrecht und verständlich, daß in bezug auf das Malaria-pigment die Anwendung des Wortes „*Melanin*“ von den modernen Forschern ganz vermieden wird, denn unter den „*Melaninen*“ versteht man jetzt in der pathologischen Anatomie resp. Chemie eine verhältnismäßig scharf begrenzte Gruppe von Pigmenten, die infolge ihrer chemischen Eigenschaften, insbesondere ihrer Zerfallsprodukte, eine ganz gesonderte Stelle einnehmen.

Viel seltener wurden andere Namen wie „*Plasmodiin*“, „*Hämozoin*“ angewandt.

Eine große Zahl von Arbeiten ist der Erklärung der chemischen, insbesondere der histio-chemischen Eigenschaften des Malaria-pigmentes (M.P.) gewidmet, doch viele von diesen Arbeiten haben jetzt keinen

Wert infolge der Verwechselung des M.P. mit den Hämosiderinen [Stieda<sup>2</sup>] u. a.], ganz abgesehen von den offensichtlichen Irrtümern: so beschreibt z. B. Ewing<sup>3</sup>) vier Arten von Pigmenten, welche bei Malaria vorkommen; in seinem Materiale handelte es sich zum Teil wahrscheinlich um Formolniederschläge (die „beste“ Fixation nach Ewing ist 5—10 proz. Formalin).

Laut Huecks Tabelle der Pigmente (Krehl-Marchands Handbuch 1921) kann man folgende histio-chemischen Kennzeichen des M.P. festlegen:

1. *Löslichkeit*: a) wässrige und alkoholische Laugen; b) alkoholische Säuren.

2. *Unlöslichkeit*: a) wässrige Säuren; b) Fett-Lipoid-Lösungsmittel.

3. *Entfärbarkeit*: durch Oxydationsmittel.

4. *Unfärbbarkeit*: durch basische und Fett-Lipoid-Farbstoffe.

5. *Nicht osmierbar*: durch  $\text{OsO}_4$ .

6. *Silberreduktion*: negativ.

7. *Eisenreaktionen*: mit gewöhnlichen Eisenreagenzien negativ.

Verschiedenheit von:

1. *Hämosiderin*: 1a, 2a, 3, 7.

2. *Hämatoïdin*: 3, negative Gmelinsche Probe.

3. *Melanine*: 1b, 5, 6.

4. *Abnutzungspigmente*: 1a, 1b, 6 [zu 4 s. Lubarschs<sup>4</sup>) Berichtigungen].

Es bleibt nur die Verwechslung mit dem Formolpigmente übrig, die unvermeidlich ist, da alle histio-chemischen Eigenschaften des ersten und des zweiten zusammentreffen (s. Huecks Tabelle und unten spektroskopische Eigenschaften).

Die oben angeführten Eigenschaften des M.P. geben doch keine Andeutungen über die chemische Natur desselben. Nur durch die chemisch-analytischen Untersuchungen konnte man die chemische Natur des M.P. erklären oder wenigstens der Lösung dieser Aufgabe näher kommen, doch, soweit mir bekannt, hat noch niemand solche Untersuchungen vorgenommen.

Desto bedeutender und ausschlaggebender waren Carbones<sup>5</sup>) Untersuchungen [von Ascoli<sup>6</sup>), Brown<sup>7</sup>) und Seyfarth<sup>8</sup>) bestätigt] über die spektroskopischen Eigenschaften des M.P.

Die Ergebnisse von Browns Untersuchungen waren die folgenden:

1. Alkalische Lösung des M.P.: ein Streifen genau an D, sich nach links verbreitend.

2. Saure Lösung des M.P.: derselbe Streifen, mit deutlicher Verschiebung in den roten Teil des Spektrums.

3. Durch Stokes Gemisch reduzierte Lösung des M.P.: zwei Streifen im Grün: der linke ist breiter und deutlicher.

4. Lösung des extrahierten M.P. in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.: zwei Streifen: ein schmaler und blasser links von D, der andere, breitere zwischen D und E.

Folglich haben wir:

in der ersten Lösung: *das alkalische Hämatin*;  
 in der zweiten Lösung: *das saure Hämatin*;  
 in der dritten Lösung: *das Hämochromogen*;  
 in der vierten Lösung: *das Hämatoporphyrin*.

Zum Schluß muß ich bemerken, daß nach *Schaudinn* [zit. nach *Mühlens*<sup>9</sup>] das M.P. doppelbrechend ist.

Zur Zeit meines Aufenthaltes in Buchara hatte ich die Möglichkeit zur Sammlung eines verhältnismäßig großen pathologisch-anatomischen Materials von Malariakranken. Der größte Teil desselben war für meine Zwecke untauglich, da er in 10 proz. Formalin fixiert war, der andere aber (25 Fälle), der in *Orth's* Gemisch fixiert wurde, diente als Material für diese Arbeit. [An meinem Material hatte ich mehrmals Gelegenheit gehabt, mich von der Richtigkeit der Meinung *Verocays*<sup>10</sup>), daß in den mit *Orth's* Gemisch fixierten blutreichen sogar teils blutdurchtränkten Organen sich niemals die Formolniederschläge vorfinden, überzeugen zu können: dies hat seine Erklärung in dem Antagonismus zwischen den oxydierenden Eigenschaften der Chromsäure resp. chromsauren Salzen und den reduzierenden Eigenschaften des Formalins.]

Die histio-chemischen Untersuchungen des M.P. wurden von mir an Gefriermikrotom-, teils an den aufgeklebten Paraffinschnitten ange stellt.

Hinsichtlich der Löslichkeit in den Laugen (wässerigen und alkoholischen) und alkoholischen Säuren, Unlöslichkeit in den wässerigen Säuren und Fett-Lipoid-Lösungsmitteln, Unfärbarkeit durch basische und Fett-Lipoid-Farbstoffe und den spektroskopischen Eigenschaften des M.P. (spektroskopische Untersuchungen wurden nach *Browns* Methode durchgeführt) bestätigen meine Ergebnisse die Angaben der Literatur.

Nach *Unnas* Verfahren (Carbolfuchsin oder polychromes Methylenblau mit Tannindifferenzierung), welches nach *Unnas* Meinung nur hämatogene Pigmente färbt, bleibt das M.P. ungefärbt.

$\text{HNO}_3$  conc. zerstört das M.P. sehr schnell,  $\text{HCl}$  conc. und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. lösen es nicht;  $\text{CH}_3\text{COOH}$  conc. löst es bei der Erwärmung sehr schnell.

Als neue noch unerwähnte Eigenschaft erschien die *Löslichkeit* des M.P. in den organischen Lösungsmitteln basischen Charakters — *in Anilin, Pyridin und 4 proz. Chinin-Chloroform*. Die Lösungsgeschwindigkeit ist klein — die winzigen Körnchen verschwinden im Laufe von 3—5 Tagen, große Körner in 8—14 Tagen. Hämosiderin, Pigment melanotischer Gewächse und Abnutzungspigment sind in diesen Mitteln unlöslich, das Formolpigment löst sich ebenso schnell wie das M.P.

Die negative Eisenreaktion war eine der kennzeichnendsten Eigentümlichkeiten des M.P. Im Jahre 1911 berichtete *Brown*<sup>7</sup>) über die Möglichkeit, durch den Ersatz der wässerigen Lösung der Säure durch

die alkoholische eine positive Reaktion zu bekommen. *Hueck*<sup>12)</sup>, der die von ihm modifizierte Turnbull-Reaktion angewandt hatte, sah mehrmals das Erscheinen blauer Ringe um die Körner des M.P. herum, deutete dies aber als durch den Zusatz von Hämosiderin bedingt. *Brown*, welcher diese Erwiderung vorausgesehen hatte, extrahierte das Hämosiderin durch die 2 proz. COOH-COOH-Lösung (bei der 12 stündigen Einwirkung) — die Eisenreaktion (Fe-R.) wurde nichtsdestoweniger positiv. *Browns* Ergebnisse wurden von *Seyfarth* (l. c.) und *E. Mayer*<sup>13)</sup> bestätigt, demgegenüber war es *Charu Chandru Basu*<sup>14)</sup>, welcher mit denselben Methoden arbeitete, nicht gelungen, die positive Fe-R. zu bekommen. Nach *E. Mayer* ist der Mißerfolg des letzten durch zu langes resp. zu kurzes Verweilen in alkoholischer Säure resp.  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  verursacht.

Die Möglichkeit des Erhaltens der positiven Fe-R. am M.P., mit der Vorbedingung der Anwendung der schwachen alkoholischen Säuren und  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  als Lösungsmittel, ist für mich nicht klar. Das wäre nur dann möglich, wenn die angewandten  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  und HCl ( $\text{HNO}_3$ ) alc. nicht nur lösen, sondern auch die Moleküle mit Befreiung des Eisens zerlegen würden. Nur in diesem Falle wäre das jetzt freigewordene Eisen imstande, mit  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu reagieren. Es ist doch bekannt, daß  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  das M.P. nur zum Hämochromogen reduziert, welch letzteres auch unfähig ist, die übliche Fe-R. zu geben. HCl( $\text{HNO}_3$ ) alc. sind nur Lösungsmittel (s. Lehr- und Handbücher der physiologischen und pathologischen Chemie). Wenn man dazu bedenkt, daß die organische Chemie zum Zwecke der Zerstörung des Hämatins sehr starke Oxydations- und Reduktionsmittel anwendet, so ist es sehr schwer, eine Möglichkeit der Zerstörung des M.P. durch schwache alkoholische Säuren resp.  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  sich vorzustellen.

Demnach, wenn die Angaben *Browns*, *Seyfarths* und *E. Mayers* von der Möglichkeit des Erhaltens der positiven Fe-R. am M.P. richtig sind, so haben wir außer der Lösung auch noch die Aufspaltung, oder wir haben fehlerhafte Ergebnisse, die durch unvollkommene Extraktion des Hämosiderins bedingt sind. Diese letzte Vermutung ist immer ins Auge zu fassen, denn *E. Mayer*, welcher die positive Fe-R. nach 12 stündiger Einwirkung der COOH-COOH sehr oft bekam, war nicht imstande, dieselbe nach der Verlängerung dieser Frist bis zu 16—18 Stunden zu bekommen.

Hier haben wir zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: die erste, daß COOH-COOH nach 16—18 stündiger Einwirkung das M.P. zerlegt und das freigewordene Eisen auszieht — diese Vermutung ist im hohen Maße unwahrscheinlich. Meine Versuche in dieser Richtung zeigen, daß sogar die konzentrierten Lösungen der COOH-COOH keine Veränderungen des M.P. verursachen. (Fehlen der positiven Fe-R. nach

24—48stündiger Einwirkung der COOH-COOH auf das evaperierte M.P. und das gewöhnliche spektroskopische Bild des M.P., das nach dieser Behandlung in 0,04 proz. KOH alc. gelöst wurde).

Die zweite Möglichkeit, in der unvollkommenen Extraktion des Hämosiderins bei der 12stündigen Einwirkung der COOH-COOH bestehend, ist wahrscheinlicher, insbesondere wenn man sich dessen erinnert, daß *E. Mayer* mit denselben Methoden keine positive Fe-R. am endoglobulär befindlichen M.P. und Formolpigmente (F.P.) bekommen konnte. Nach seiner Meinung kann sogar die negative Fe-R. des F.P. als differential diagnostisches Merkmal (nicht unbedingten Wertes) gegenüber dem M.P. dienen.

Indessen ergeht aus den histio-chemischen und spektroskopischen Eigenschaften des F.P. die hohe Wahrscheinlichkeit, daß das F.P. und das M.P., nach ihrer chemischen Struktur, sehr nah, wenn nicht ganz identisch sind. [Das F.P. ist: nach *Minakow*<sup>15)</sup> — bei der Fixation in den schwachen Lösungen des Formalins — Methämoglobin, in 10 proz. — saures Hämatin, nach *Puppe*<sup>16)</sup> — saures Hämatin, nach *Heile*<sup>17)</sup> — Hämatin (bei der Einwirkung des Formalins auf das frische Blut) — Hämochromogen (angefaultes Blut), nach *Haurowitz*<sup>18)</sup> — Käthämoglobin, d. h. eine Kolloidverbindung des  $\alpha$ -Hämatins und der durch Reagentienwirkung mehr oder weniger veränderten Proteinkomponente des Blutfarbstoffes.]

Bei der Entscheidung dieser Frage ist es notwendig, noch eine Möglichkeit nicht aus dem Auge zu lassen, nämlich, daß die Produkte der Einwirkung des  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  und der  $\text{HCl}(\text{HNO}_3)$  alc. auf das sich *in substantia* und in den Schnitten befindliche Pigment verschieden von denen sein können, die das Pigment in der Lösung enthalten, was bei der Überführung des Hämatins in das Hämatoporphyrin ganz klar erscheint: das letzte ist nur bei der Einwirkung der  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. auf das Pigment *in substantia* zu bekommen.

Um das nachzuprüfen, wurde von mir das M.P., mit 0,04 proz. KOH alc. ausgezogen, mit destilliertem Wasser gewaschen und der Einwirkung des  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  und der  $\text{HCl}$  alc. ausgesetzt, die Lösungen dann spektroskopisch und mit Hilfe der Berlinerblaureaktion geprüft. Im ersten Falle —  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  — war nur das Spektrum des Hämochromogens zu sehen, bei dem längeren Stehen das Spektrum eines Gemisches von Hämochromogen mit alkalischem Hämatin, im zweiten — ( $\text{HCl}$  alc.) — Spektrum des sauren Hämatins. Die Reaktion mit  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  war im letzten Falle negativ; es war unmöglich dieselbe in der  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -Lösung durchzuführen.

Es scheint mir, daß diese Ergebnisse die Unaufspaltbarkeit des M.P. in  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  und  $\text{HCl}$  alc. bestätigen.

Fe-R. an dem in den Schnitten befindlichen M.P. war von mir nach den Methoden *Brown-Seyfarth* geprüft, mit dem Unterschiede, daß ich

die Extrahierung des Hämosiderins durch die 2 proz. *COOH-COOH* auf 24 Stunden verlängert hatte — in keinem meiner Fälle war es mir gelungen, die positive Fe-R. zu bekommen. (Die Möglichkeit eines zu langen resp. zu kurzen Verweilens in dem Lösungsmittel ist ausgeschlossen.)

Also halte ich die Ergebnisse *Browns*, *Seyfarths* und *E. Mayers* für irrig. Den Grund dieses Fehlers sehe ich in der unvollkommenen Extraktion des Hämosiderins, welches, sehr dicht mit M.P. vermischt, in den Zellen des reticulo-endothelialen Systems vorkommt.

Als stichhaltiger betrachte ich ein anderes Verfahren, das maskierte Eisen frei zu legen — das ist die Methode der Oxydation, welche zum ersten Male, zwar nicht in der Beziehung zum M.P., von *Brown*<sup>19)</sup> vorgeschlagen wurde. Unter der Wirkung des  $H_2O_2$  (Perhydrol, Katarol) entfärbt sich das M.P. sehr schnell. *Brown*, der diesen Vorgang mikroskopisch betrachtet hatte, bemerkte, daß diesem Prozesse nicht eine Entfärbung, wie es bei Melaninen der Fall ist, sondern eine Lösung des M.P. zugrunde liegt. *Seyfarth* bestätigt das.

Bei der Einwirkung des  $H_2O_2$  auf das extrahierte M.P. (*in substantia*) bemerken wir eine fast augenblickliche Entfärbung desselben und eine Überführung des M.P. in die Lösung, welche ganz klar und vollständig farblos ist. Die Reaktion der Entfärbung ist irreversibel — es war mir nicht gelungen, das entfärbte Pigment durch reduzierende Mittel zu entwickeln.

Die Methoden der Oxydation zur Aufspaltung des Hämatins sind in der organischen Chemie stark verbreitet. *Küster*<sup>20)</sup> sagt, daß „schon geringe Mengen von Sauerstoff hinreichen, um in saurer Lösung Hämatinsäure zu bilden, allerdings in geringer Menge“, d. h. bei der Oxydation des Hämatins haben wir es mit einem Zerfall des Moleküls mit Freilegung des Fe zu tun.

Aber auch mit dieser Methode gelang es mir nicht, eine positive Fe-R. am M.P. zu bekommen — im Schnitte löst sich das M.P. deutlich, doch weder  $K_4Fe(CN)_6$  noch KCNS gaben eine positive Fe-R. (Hämosiderin wurde vorläufig durch 2 proz. *COOH-COOH* [24 Stunden] entfernt.)

Um jede Möglichkeit technischer Fehler auszuschließen, habe ich die Wirkung des  $H_2O_2$  auf das aus der 0,04 proz. KOH-alc.-Lösung ausgedampfte M.P. überprüft, einige Tropfen 10 proz. HCl zur Lösung hinzufügend. Es ist unmöglich, die Berlinerblaureaktion in der mit aktivem O gesättigten Mitte anzustellen, da die reine Fe-freie Perhydrolösung mit  $K_4Fe(CN)_6$  sich stark grünlich färbt. Um den aktiven O zu entfernen, habe ich Manganumperoxyd ( $MnO_2$ ) angewandt, welches als Katalysator wirkt und vollständig unlöslich in Wasser resp. Perhydrol ist.

Die Lösung des M.P. nach der Wirkung des  $MnO_2$  blieb farblos und klar — aber die Proben mit  $K_4Fe(CN)_6$  und KCNS waren wiederum

negativ ausgefallen. Inzwischen war die Zerstörung des M.P. unter der Wirkung des  $H_2O_2$  sehr tief gegangen, denn spektroskopisch war die Lösung inaktiv.

Zum Schluß des Abschnittes über die Eisenreaktionen am M.P. muß ich sagen, daß die von *Brown* und *Seyfarth* vorgeschlagenen Methoden sich nicht rechtfertigen.

Meine Bestrebungen, das M.P. durch Reduktionsmittel zu entfärbten, waren erfolglos: es ist möglich, daß das von mir angewandte Mittel (Ac. pyrogallicum 10 proz.) zu schwach war; andere mehr aktive Mittel waren zu eingreifend, um sie zu histio-chemischen Zwecken anwenden zu können.

In keinem meiner Fälle habe ich doppelbrechende M.P.-Körnchen gesehen. *Kaiserling*<sup>21</sup>), der auch die Doppelbrechung des M.P. bestreitet, sieht die Fehlerquelle *Schaudinns* in der unvollkommenen seitlichen Verdunkelung des Präparates: infolgedessen gab es Bedingungen, analog denen der Dunkelfeldbeleuchtung.

Wie aus der Literatur ersichtlich ist, sind die chemischen und spektroskopischen Eigenschaften des M.P. ganz übereinstimmend mit denen des Hämatins. Als ein sehr wichtiger Beweis der *zweifellos hämatinogenen Natur des M.P.* erschien mir die Möglichkeit, die Häminkristalle aus dem M.P. zu bekommen. *Die amorphe Masse des* durch 0,04 proz. KOH alc. aus der Malariamilz extrahierten M.P. *gibt typische Teichmannsche Krystalle*. Die Methode ist die in der Histologie gewöhnlich gebrauchte; es ist besser, doch anstatt NaCl NaJ zu benutzen.

Die erhaltenen Krystalle hatten eine typische charakteristische Form der Häminkristalle, mit allen ihren histio-chemischen Eigenschaften, von schwarzer und braunschwarzer Farbe (Einfluß des J) und von verschiedenen Ausmaßen (Länge von 8 bis 25  $\mu$ , Breite von 1,45 bis 7  $\mu$ ).

Die physiologische Chemie unterscheidet einige Arten von Hämatinen. Welcher Art das M.P. ist, steht noch unaufgeklärt. Am wahrscheinlichsten wäre es zum „Verdauungshämatin“ zu zählen. Eine der Eigenschaften des letzteren ist die Fähigkeit, unter der Wirkung der HCl conc. sehr leicht Häminkristalle zu bilden. Doch konnte ich mit Hilfe der HCl. conc. keine Häminkristalle aus dem ausgedampften M.P. bekommen — es ist aber nicht auszuschließen, daß unter der Wirkung der Lauge noch unbekannte Änderungen in der Struktur des M.P. vorkommen können, entsprechend denen des Hämatins, welches aus Häm in unter Einwirkung der Lauge zu bekommen ist, und das unfähig bleibt, aufs neue die Häminkristalle zu bilden. Sogar unter der Wirkung der  $CH_3COOH + NaCl$  [*Küster*<sup>22</sup>]).

Es sei mir gestattet, Herrn Prof. Dr. *Dobiasch* (Vorstand des Physischen Laboratoriums der M.-M. Akademie) und Herrn Prof. Dr. *M. Iljin*

(Vorstand des Physiologisch-Chemischen Laboratoriums der M.-M. Akademie), meinen verbindlichsten Dank auszusprechen, dem ersten für seine höchst liebenswürdige Übernahme der spektroskopischen Untersuchungen und dem zweiten für sein ständiges Entgegenkommen mit sachkundigen Ratschlägen.

### Literaturverzeichnis.

- <sup>1)</sup> *Askanazy*, Aschoffs Lehrbuch der pathologischen Anatomie. 1919. —
- <sup>2)</sup> *Stieda*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **4**. 1893. — <sup>3)</sup> *Ewing*, Journ. of the exp. med. **6**. 1901—1905. — <sup>4)</sup> *Lubarsch*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **239**. 1922. — <sup>5)</sup> *Carbone*, zitiert nach *Brown*; *Ascoli*. — <sup>6)</sup> *Ascoli*, Polyclinico sez. med. 1910. — <sup>7)</sup> *Brown*, Journ. of the exp. med. **13**. 1911. — <sup>8)</sup> *Seyfarth*, Verhandl. d. Dtsch. pathol. Ges. **18**. 1921. — <sup>9)</sup> *Mühlens*, Die Plasmodiden. 1921. — <sup>10)</sup> *Verocay*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **19**. 1908. — <sup>11)</sup> *Unna*, Schmorl, Pathol.-histol. Untersuchungsmethoden. — <sup>12)</sup> *Hueck*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **54**. 1912. — <sup>13)</sup> *Mayer, E.*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **240**. 1923. — <sup>14)</sup> *Charu Chandra Basu*, zitiert nach *E. Mayer*. — <sup>15)</sup> *Minakow*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **8**. 1897. — <sup>16)</sup> *Puppe*, Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. **37**, 17, 2. — <sup>17)</sup> *Heile*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **160**. 1900. — <sup>18)</sup> *Haurowitz*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **137**. 1924. — <sup>19)</sup> *Brown*, Journ. of the exp. med. **13**. 1911. — <sup>20)</sup> *Küster*, Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. I, Teil 8, Heft 2, S. 253. — <sup>21)</sup> *Kaiserling*, Berl. klin. Wochenschr. 1910, Nr. 47, S. 2157. — <sup>22)</sup> *Küster*, Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. I, Teil 8, Heft 2, S. 202 und 211—212.