

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Breslau
[Direktor: Prof. Dr. M. Staemmler].)

Vergleichende Untersuchungen zum Glykogennachweis im braunen und weißen Fett und in der Leber.

Von

Dr. med. habil. W. Eger.

Mit 4 Tabellen und 5 Abbildungen im Text (7 Einzelbildern).

(Eingegangen am 10. Juni 1942.)

Der eigentümliche Befund von Glykogen im Fettgewebe der Säugetiere unter bestimmten Bedingungen, zuerst von *v. Gierke*¹ beschrieben, hat zu mancherlei Untersuchungen Anlaß gegeben. Vor allem war es ein Hinweis dafür, daß das Fettgewebe nicht nur passiv Fett speichert, sondern sich aktiv am Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel beteiligt und bei der Umsetzung von Zucker in Fett eine bedeutende Rolle spielt. Die Grundlage zu dieser Ansicht brachten anatomische Untersuchungen. Danach entwickelt sich das Fettgewebe aus Primitivorganen und zeigt später einen feinhistologischen Aufbau nach Art eines reticuloendothelialen Gewebes, der dem Fettgewebe eine besondere Stellung im histologischen System zuweist und in diesem Gewebe ein Organ mit besonderer Tätigkeit vermuten läßt².

Diese Ansicht wurde weitgehend durch Stoffwechseluntersuchungen am isolierten Fettgewebe unterstützt. Man fand dabei unter bestimmten Versuchsbedingungen respiratorische Quotienten über 1 und schloß daraus auf eine Fettbildung aus Zucker im Fettgewebe selbst^{3, 4}. Damit kann es wohl heute als gesichert gelten, daß das Fettgewebe sich an der Umwandlung von Zucker in Fett aktiv beteiligt, vielleicht überhaupt die wichtigste Bildungsstätte des Fettes auf diesem Wege ist. Weitere Stoffwechseluntersuchungen von *Felix* und *Eger*⁵ und Fütterungsversuche von *Eger* und *Morgenstern*⁶ erbrachten auch einen Hinweis, welchen Weg nun der Zucker bei seiner Umwandlung in Fett nimmt⁷. Die ersten Untersucher bestimmten wieder die respiratorischen Quotienten nach Zugabe der Abbaustoffe des Zuckers am isolierten Fettgewebe, die anderen Untersucher stellten nach Fütterung dieser Abbaustufen die Glykogenbildung im Fettgewebe fest.

In Erweiterung und Verfolgung dieser Arbeiten sollten zunächst einmal die Beziehungen der Glykogenbildung im Fettgewebe zu den Nebennieren untersucht werden. Die Bedeutung der Nebennieren für

den Kohlehydratstoffwechsel braucht dazu nicht besonders hervor-gehoben zu werden. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird an anderer Stelle berichtet.

Bei diesen Arbeiten wurde Glykogen chemisch und histologisch nach verschiedenen Methoden zum Vergleich bestimmt. Zugleich wurde gewissermaßen als Indicator auch die Leber untersucht und Fragen angegangen, die bei der obenerwähnten Arbeit zusammen mit *Morgenstern*⁶ noch offen geblieben waren. Das Ergebnis dieses Teils der Experimente soll im folgenden dargestellt werden.

Bisher galten die *Bestsche* Carminfärbung und die Jodreaktion nach *Langhans* als die gebräuchlichen Methoden zur histologischen Darstellung von Glykogen im menschlichen und tierischen Gewebe. Von diesen beiden Methoden wird die Carminfärbung vorgezogen, vor allem deshalb, weil ihr Farbbild klarer ist als das der Jodreaktion und sie die letztere an Empfindlichkeit und Schärfe übertrifft⁸. Es haften aber doch der *Bestschen* Probe einige erhebliche Mängel an, die vor allem darin liegen, daß die Carminfärbung relativ unspezifisch ist. Außer Glykogen können damit Schleim, Fibrin, Granula der Mastzellen u. a. dargestellt werden.

Gegenüber diesen Nachteilen der *Bestschen* Glykogendarstellung soll nun eine neue von *Bauer*⁹ ausgearbeitete Methode eine wesentliche Verbesserung im histologischen Nachweis von Glykogen bringen. Im Gegensatz zu der offensichtlich auf einem physikalischen Prinzip beruhenden Carminfärbung handelt es sich bei der *Bauerschen* Methode um eine chemische Farbreaktion, der die *Feulgensche* Nuclealreaktion zugrunde liegt (*Wallraff* und *Beckert*¹⁰). Nach *Bauer*⁹ gelangen damit nur Polysaccharide, nämlich Glykogen, Stärke, Cellulose, Tunicin und Galaktogen zur Darstellung. Diese Polysaccharide geben mit fuchsinschwefeliger Säure eine intensive rotviolette Färbung, wenn das Untersuchungsmaterial vorher am Stück oder Schnittpräparat mit Chromsäure behandelt wurde. Die Farbreaktion beruht wie bei der *Feulgenschen* Färbung auf einer Aldehydreaktion. Durch Behandlung mit Chromsäure soll das Glykogen dahingehend verändert werden, daß es wasserunlöslich wird und Aldehydgruppen an ihm auftreten, die mit fuchsinschwefeliger Säure die Farbreaktion geben.

In eingehenden Untersuchungen prüften *Wallraff* und *Beckert*¹⁰ die Spezifität der *Bauerschen* Reaktion und fanden heraus, daß eine Reihe von Substanzen, die ihrer Natur nach offenbar Eiweißkörper darstellen, ebenfalls sich nach *Bauer* färben. So gaben Schleim, *Zona pellucida* der Eizelle, atretische Eifollikel, Kolloid der Schilddrüse und Hypophyse, *Hassalsche* Körperchen des Thymus, hyaliner Knorpel und Fibrin die Reaktion, deren Ausfall aber auch hier von der vorherigen Behandlung mit Chromsäure abhängig war.

Mit diesen Untersuchungen erfuhr der Wert des *Bauerschen* Glykogennachweises eine erhebliche Einschränkung. Die Reaktion war also nach dieser Richtung hin der *Bestschen* Probe keineswegs überlegen. Immerhin bestand die Möglichkeit, daß die *Bauersche* Färbung noch empfindlicher als die *Bestsche* ist und vielleicht noch Glykogen zur Darstellung bringt, das chemisch nicht mehr erfaßt werden kann. Diese Frage war zu klären.

Zugleich war nachzuprüfen, wie weit die *Bauersche* Reaktion eine Mengenabschätzung des Glykogens aus dem histologischen Schnitt im Vergleich zum chemischen Nachweis und zur Carminfärbung zuläßt. Es sollten damit Untersuchungen von *Holmquist*¹¹ nachgeprüft und vielleicht erweitert und verbessert werden. Dieser Untersucher hatte durch gleichzeitigen chemischen und histologischen (*Bestsche* Färbung) Nachweis von Glykogen gezeigt, daß man bei einer zentro-acinären fleckförmigen Ablagerung von Glykogen in der Leber aus dem histologischen Schnitt einen Gehalt von etwa 2%, bei einer diffusen Ablagerung von etwa 4% ablesen könne.

Material und Methodik.

Bei der Versuchsanordnung hielt ich mich an die früheren Experimente. Die Ratten im Gewicht von etwa 150 g wurden 4 Tage auf Hunger gesetzt, dann mit Kohlehydraten gefüttert und nach 8 Stunden getötet. Um gleichmäßige Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden abgesehen von gleichmäßiger Fütterung und Haltung der Tiere nur Männchen verwandt, die Kohlehydratfütterung nach dem Hunger immer zur selben Zeit morgens 9 Uhr begonnen und der Versuch nach 8 Stunden beendet. So konnten die Fehlerquellen, die im Geschlecht der Tiere oder im Tagesrhythmus des Leberglykogens^{11, 12, 13} liegen, ausgeschaltet werden.

Um die Versuche möglichst zu variieren und unterschiedlichen Glykogengehalt zu erzielen, wurden verschiedene Zuckerarten verfüttert und in 3 Versuchsgruppen außerdem Vitamin B₁ (pro Tier 2,6 mg), Laktoflavin (pro Tier 0,8 mg) und Vitamin C (pro Tier 32 mg) den Ratten zugeführt. Die in den Tabellen mit A bezeichneten Tiere erhielten Reisstärke, die B-Tiere Traubenzucker, die C-Tiere Rohrzucker, die D-Tiere Fruchtzucker und die E-Tiere Milchzucker. Das Vitamin wurde in Lösung zur Hälfte am Abend vor der Fütterung und zur anderen Hälfte am Morgen 1 Stunde vor der Fütterung subcutan oder intraperitoneal verabreicht. Auf die Bedeutung insbesondere des Vitamin B₁ für den Kohlehydratstoffwechsel brauche ich nicht näher einzugehen (s. dazu *Stepp, Kühnau, Schroeder*¹⁴). Bei diesen Experimenten stand auch nicht so sehr die Frage des Einflusses dieser Vitamine im Vordergrund, als der Gesichtspunkt, einen möglichst wechselnden Glykogengehalt im Fettgewebe und in der Leber zu erzielen.

In Vorversuchen war zunächst die Frage aus früheren Experimenten zu klären, warum bei reiner Traubenzuckerfütterung in der Regel nur Spuren oder gar kein Glykogen im weißen Fett der Ratte nach Hungerzustand auftritt. Diese merkwürdige Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen von *Richter*¹⁵ und *Fels*¹⁶, die denselben Befund im besonderen auch nach intraperitonealer Zufuhr von Traubenzucker erhoben. In den früheren Experimenten hatte ich immer die Sondenfütterung angewandt. Bei den jetzigen Vorversuchen konnte ich das frühere Ergebnis nach Sondenfütterung nur bestätigen. Dagegen sah ich, wenn die Tiere einer Spontanaufnahme von Zuckerbrei überlassen wurden, in der Regel eine

Tabelle 1. Glykogenbildung bei Fütterung verschiedener Zuckerarten.

Tier	Weißes Fett			Braunes Fett			Leber		
	%	hist.		%	hist.		%	hist.	
A 1	0,18	+	(+)	1,66	+++	(+++)	1,96	++	(++)
A 2	0,30	+	(+)	1,99	++	(++)	2,47	++	(++)
A 3	0,83	++	(++)	3,01	+++	(+++)	5,66	+++	(+++)
A 4	0,47	+	(+)	4,56	++	(++)	5,01	++	(++)
Durchschnitt	0,44			2,8			3,8		
B 1	0,41	++	(++)	2,3	+++	(+++)	1,99	+++	(+++)
B 2	0,03	0	(0)	1,34	++	(++)	3,37	++	(++)
B 3	1,44	+++	(+++)	2,38	+++	(+++)	5,44	+++	(+++)
B 4	0,39	++	(++)	6,28	+++	(+++)	2,94	++	(++)
B 12	0,05	0	(0)	2,15	++	(++)	4,9	++	(++)
B 13	0,10	0	(0)	0,96	++	(++)	0	+	(+)
Durchschnitt	0,4			2,57			3,72		
C 1	0,13	0	(0)	2,29	+++	(+++)	1,12	+++	(+++)
C 2	0,04	0	(0)	0,38	++	(++)	1,26	+++	(+++)
C 3	0,16	0	(0)	1,11	++	(++)	3,14	++	(++)
C 4	0,17	+	(+)	2,93	+++	(+++)	5,27	+++	(+++)
Durchschnitt	0,12			1,68			2,7		
D 1	0,02	0	(0)	0,57	+	(+)	1,50	+++	(+++)
D 3	0,11	0	(0)	1,16	++	(++)	5,46	++	(++)
D 4	0,06	0	(0)	0,72	++	(++)	2,9	+	(+)
Durchschnitt	0,06			0,82			3,29		
E 1	0,07	0	(0)	0,26	0	(0)	0,25	0	(0)
E 2	0,05	0	(0)	0,21	0	(0)	0,37	+	(+)
E 3	0,17	0	(0)	0,71	+	(+)	1,04	+	(+)
E 4	0,10	0	(0)	0,33	0	(0)	0,97	+	(+)
Durchschnitt	0,1			0,38			0,66		

reichliche Glykogenbildung im weißen Fett. Wenn also in den früheren Versuchen⁸ kein Glykogen im Fettgewebe bei Traubenzuckerfütterung aufgetreten war, so mußte die Ursache in der künstlichen Zufuhr des Zuckers zu suchen sein. Dieser Befund soll im Zusammenhang mit anderen Beobachtungen und den Beziehungen zu den Nebennieren an anderer Stelle näher erörtert und ausgeführt werden. Jedenfalls ließ ich nun in den Hauptversuchen die Tiere immer spontan Zucker aufnehmen und beobachtete bei Beginn des Versuches an der Freßlust der Ratten und bei der Sektion an der Füllung des Magens und Dünndarms, ob eine Zuckeraufnahme stattgefunden hatte. Nach 4tägigem Hunger und bei lebenskräftigen Tieren war immer eine genügende Nahrungsaufnahme festzustellen.

Tabelle 2. Glykogenbildung bei Fütterung verschiedener Zuckerarten und Zugabe von Laktotflavin.

Tier	Weißes Fett		Braunes Fett		Leber	
	%	hist.	%	hist.	%	hist.
A 6	0,40	+ — 0 (+) + — 0 (+)	1,58	++ (+++) ++ (+++)	5,18	+ + (+++) (+ + +)
A 8	0,70	++ (+++) + (+++)	1,06	+++ (+++) ++ (+++)	4,69	+ (+++) + (+++)
Durchschnitt	0,55		1,32		5,25	
B 6	0,38	++ (+) + (+)	2,58	++ (+++) + (+++)	4,88	++ (+++) + (+++)
B 8	0,29	+ + (+++) + — 0 (+++)	0,86	+ (0) + (0)	8,5	+++ (+++) + (+++)
Durchschnitt	0,33		1,72		6,69	
C 6	0,24	+ (0 — +) + (+ — 0)	0,95	+ (+) + (+)	8,45	+++ (+++) + (+++)
C 8	0,16	+ — 0 (0) + — 0 (0)	1,00	++ (+) + (+)	7,96	+++ (+++) + (+++)
Durchschnitt	0,30		0,97		8,2	
D 6	0,13	0 (0) 0 (0)	0,57	++ (+++) ++ (+++)	3,46	+ (+++) + (+++)
D 8	0,16	0 (0) 0 (0)	0,66	++ (+++) + (+++)	0,41	0 (0) + — 0 (0 — +)
Durchschnitt	0,14		0,61		1,93	
E 6	0,26	+ — 0 (+ — 0) + — 0 (+ — 0)	0,39	++ (+++) ++ (+++)	1,11	+ (+) + (+)
E 8	0,09	0 (0) 0 (0)	0,41	0 (0) 0 (0)	0,67	0 (0) 0 (0 — +)
Durchschnitt	0,17		0,40		0,89	

Die Glykogenbestimmung wurde nach *Pflüger* durchgeführt, nach dem Hydrolysieren das Glykogen als Zucker nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt. Bei der *Best-*schen Färbung hielt ich mich an die Vorschrift von *Schmorl*¹⁷, bei der *Bauerschen* Reaktion an die Vorschriften von *Bauer*⁹ und die Richtlinien, die *Wallraff* und *Beckert*¹⁰ bei der Aufarbeitung ihres Materials anwandten. Für die Abschätzung der Glykogenmenge aus dem histologischen Schnitt legte ich absichtlich eine möglichst feine Abstufung zugrunde, um eben diese Verhältnisse und ihre Möglichkeit nachzuprüfen. So bedeutet bei der tabellarischen Auswertung

0 — + Glykogen ganz vereinzelt, in einzelnen Zellen Spuren,
 + — 0 verstreut über den ganzen Schnitt Spuren,
 + in allen Teilen des Schnittes deutlicher Nachweis.
 ++ reichliche Menge,
 +++ sehr reichlich.

Tabelle 3. Glykogenbildung bei Fütterung verschiedener Zuckerarten und Zugabe von Vitamin B₁.

Tier	Weißes Fett			Braunes Fett			Leber		
	%	hist.		%	hist.		%	hist.	
A 5	0,78	++	(+)	2,68	++	(+++)	7,97	++	(+++)
		+	(+)		++	(+++)		++	(++)
A 7	0,70	++	(++)	0,60	++	(+++)	6,54	+++	(+++)
		+	(++)		++	(+++)		+	(+++)
Durchschnitt	0,74			1,64			7,26		
B 5	0,27	+	(+)	3,27	++	(+++)	8,25	++	(++)
		+-0	(+)		++	(++)		+	(+++)
B 7	0,75	++	(++)	1,38	++	(++)	3,43	+	(++)
		+	(++)		++	(++)		+	(+++)
BB 1	0,10	0—++	(0)	0,33	++	(+++)	3,50	++	(++)
		0	(0)		++	(+++)		++	(+)
BB 2	0,07	0	(0)	0,42	+	(++)	2,81	+	(+)
		0	(0)		+	(+)		+	(+)
BB 4	0,17	+-0	(+-0)	2,73	++	(++)	4,72	++	(++)
		+-0	(+-0)		++	(++)		+	(+)
BB 5	1,08	++	(++)	4,51	0		6,18	++	(++)
		++	(++)		0			+	(++)
BB 6	0,43	++	(++)	3,82	+++	(+++)	3,55	+	(+)
		++	(++)		+++	(+++)		+	(+)
Durchschnitt	0,42			2,51			4,65		
C 5	0,22	++	(+)	1,4	+	(+)	6,97	+	(+)
		+	(+)		+	(+)		+	(+)
C 7	0,16	+-0	(0—+)	0,67	++	(++)	6,24	++	(++)
			(0—+)		++	(++)		+	(++)
Durchschnitt	0,18			1,03			6,60		
D 5	0,16	+-0	(0—+)	1,1	+	(+)	1,41	+	(++)
		+-0	(0—+)		+	(+)		++	(+)
Durchschnitt	0,16			1,1			1,41		
E 5	0,14	0	(0)	0,90	++	(+)	1,07	+	(+)
		0—+	(0)		+	(+)		+	(+)
E 7	0,07	0	(0)	0,39	+-0	(0)	1,27	+	(+-0)
		0	(0)		0	(0)		+	(+-0)
Durchschnitt	0,10			0,65			1,17		

Gelegentlich wurden ++++ gegeben, wenn mir die Menge ganz besonders reichlich erschien. Die Abschätzung wurde natürlich ohne Kenntnis der chemischen Werte vorgenommen. In den nachfolgenden Tabellen stehen die geschätzten Werte der *Bests*chen Färbung oben, die *Bauers*chen Werte darunter. Die in Klammern gesetzten Werte bedeuten eine erneute Abschätzung nach Beachtung besonderer technischer Einzelheiten, die sich im Verlauf der Untersuchungen ergaben.

Sie sollen im Hauptteil besprochen werden. Eine kurvenmäßige Eintragung und Darstellung der Werte in Abb. 1 u. 2 soll den Überblick erleichtern und vor allem das Verhältnis der Werte in Leber, braunem und weißem Fett zueinander aufzeigen.

In Abb. 3 wurden zur bildlichen Darstellung und zum Vergleich die chemisch gefundenen Glykogenwerte der Leber jedes einzelnen Tieres und die aus dem Schnitt geschätzten Werte in Beziehung gesetzt. Ich ging dabei so vor, daß ich zunächst die chemischen Werte in Prozenten als schwarze Balken eintrug. Dann setzte ich in gestrichelten und hellen Balken die geschätzten Werte daneben und wählte für ein Plus in der Zeichnung eine mittlere Balkenhöhe, die 7 mm, für 2 + natürlich dann das Doppelte betrug. Damit sollte gezeigt werden, ob die „morphologischen“ Blöcke in ihrer Höhe sich etwa parallel zu den chemischen Werten verhalten, ob eine Erhöhung der chemischen Werte auch höheren Schätzungen im mikroskopischen Bild entspricht und umgekehrt.

Tabelle 4. Glykogenbildung bei Fütterung von Traubenzucker und Zugabe von Vitamin C.

Tier	Weißes Fett		Braunes Fett		Leber	
	%	hist.	%	hist.	%	hist.
BC 1	0,18	+ (+) (+)	0,57	++ (+++) ++ (+++)	6,6	++++ (++++) ++++ (++++)
BC 3	0,84	+ (+) +	3,2	+ (++) +	6,4	+++ (++++) +++ (+)
BC 4	0,25	+ (+) +	3,07	+ (+++) +	5,31	+ (++++) +
BC 5	0,13	+ (+—0) +—0	0,53	++ (+++) +	4,64	+ (++) +
BC 6	0,30	+ (+) +	2,88	++ (+++) +	0,94	++ (++++) ++
Durchschnitt	0,37		2,02		5,06	

Besprechung der Ergebnisse.

Wenn man zunächst nur die chemisch gefundenen Werte betrachtet, so ist vor allem die außerordentliche Schwankung des Glykogengehaltes von Tier zu Tier sowohl innerhalb der ganzen Versuchsreihe wie innerhalb einer Versuchsgruppe bemerkenswert. Dieser Befund ist insofern nicht überraschend, als auch normalerweise in der Leber von Tier zu Tier außerordentliche Schwankungen bei ganz gleichen Bedingungen gefunden wurden^{11, 18, 19}. Diese Schwankung geht aus den Tabellen, noch besser aber aus der kurvenmäßigen Aufzeichnung der Werte hervor (Abb. 1 u. 2), betrifft nicht nur die Leber, sondern auch das braune und weiße Fett und beträgt in der Regel das 3fache des niedrigsten Wertes, häufig aber noch mehr. Solche Schwankungen wurden auch von *Hofmann* und *Wertheimer*²⁰ bei ihren Glykogenuntersuchungen am weißen Fett festgestellt. Die Höhe der Glykogenwerte in der Leber sind mitunter beträchtlich, aber nicht so hoch, daß sie etwas Ungewöhnliches

darstellten. So hat man bei anderen Säugetieren noch wesentlich höhere Werte gefunden.

Der Gehalt des weißen Fettes an Glykogen ist allgemein gering, gemessen am Gehalt der Leber und dem des braunen Fettes. Er ist auch gering im Vergleich mit Befunden, die in der Literatur erwähnt werden. So konnten *Hofmann* und *Wertheimer*²⁰ bis zu 6%, *Arndt*¹⁸ bis zu 7% nachweisen. Allerdings benutzten diese Untersucher bei ihren Experimenten Hunde und Meerschweinchen. Der wesentlich geringere Gehalt des weißen Fettes in den vorliegenden Versuchen kommt auch bei dem Vergleich der histologischen Schnittpräparate mit den von

*Arndt*¹⁸ veröffentlichten Abbildungen mikroskopischer Befunde zum Ausdruck. Die Ursache wird einmal in der Tierart¹⁸ zum anderen in der Anlage und Dauer des Versuches zu suchen sein.

Zum braunen Fett liegen keine geeigneten Vergleichsmöglichkeiten vor. Auffallend ist der hohe Glykogengehalt, der sich auch im histologischen Bild ausprägt, manchmal sogar den Gehalt der Leber übertrifft (Abb. 1 u. 2) und auch nach dieser Richtung dem braunen Fett eine schon

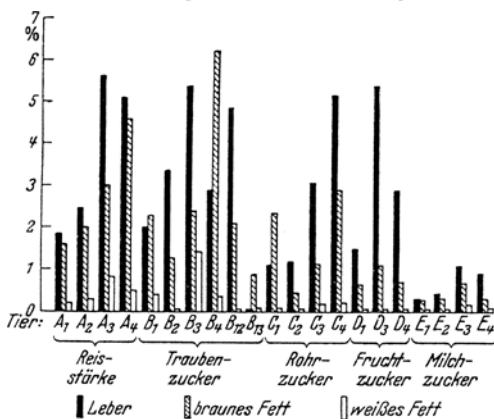


Abb. 1. Kurvenmäßige Darstellung der Glykogenwerte der einzelnen Tiere nach Fütterung mit verschiedenen Zuckerarten.

früher vermutete besondere Stellung im physiologischen Geschehen zuweist²¹.

Bestehen nun irgendwelche Beziehungen im Glykogengehalt der Leber zu dem des braunen und weißen Fettes unter diesen Versuchsbedingungen? Die beste Antwort dazu gibt die kurvenmäßige Aufzeichnung der Werte in Abb. 1 u. 2. Es läßt sich daraus keinerlei typisches Verhalten oder eine Gesetzmäßigkeit ablesen. Gelegentlich hat man den Eindruck, daß das Ansteigen der Werte in der Leber auch von einer Erhöhung des Glykogens im braunen und weißen Fett begleitet ist. Von einem regelmäßigen derartigen Verhalten kann nicht die Rede sein. Vor allem aber scheint mir die Gegenüberstellung der Werte folgendes zu zeigen. Man versuchte das Auftreten von Glykogen im Fettgewebe unter anderem damit zu erklären, daß bei hohem Kohlehydratangebot nach Hungerzustand zunächst die üblichen Speicher, also die Leber vor allem gefüllt würden und nach deren Füllung das Glykogen nun weiter an das Fettgewebe abgegeben wird. Nun läßt sich aus den Werten in keiner Weise ein bestimmter Sättigungsgrad der Leber ablesen,

über den hinaus erst eine Ablagerung im Fettgewebe erfolgt. Demgegenüber findet man sogar sehr häufig sehr hohe Leberwerte und einen geringen Gehalt im braunen und weißen Fett, ein anderes Mal niedrige Leberwerte und starke Füllung im braunen und weißen Fett. Die Ablagerung von Glykogen im Fettgewebe unter diesen Versuchsbedingungen ist also nicht von dem Füllungszustand der Leber abhängig.

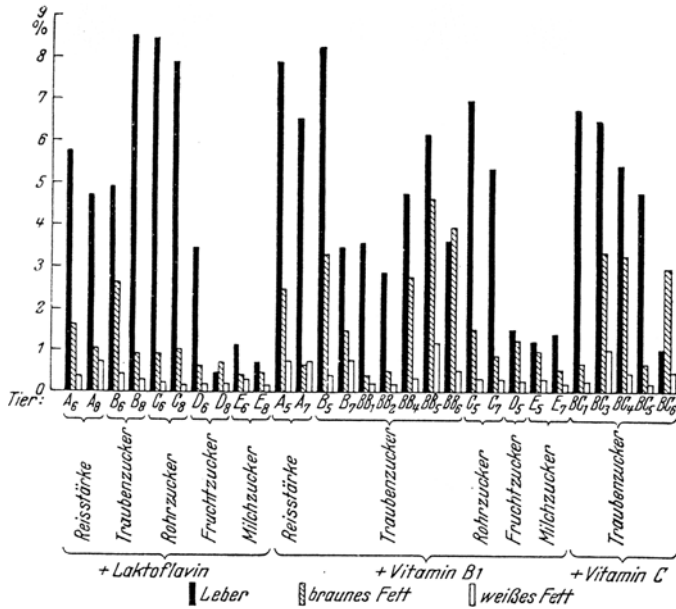


Abb. 2. Kurvenmäßige Darstellung der Glykogenwerte der einzelnen Tiere nach Fütterung mit Kohlehydraten und Zugabe verschiedener Vitamine.

Bei Betrachtung der Durchschnittswerte für die einzelnen Zuckerarten zeigt sich die bekannte Tatsache, daß Milchzucker ein schlechter Glykogenbildner ist. Ich brauche darauf nicht näher einzugehen, sondern nur für die vorliegende Arbeit hervorzuheben, daß diese geringe Neigung zur Glykogenbildung auch für das braune und weiße Fett gilt, im weißen Fett praktisch gar kein Glykogen gefunden wird, das braune Fett sich aber immerhin noch deutlich an der Glykogensynthese beteiligt.

Die Untersuchungen zur Glykogenbildung nach Vitamin B₁-, Laktoflavin- und Vitamin C-Zufuhr gewinnen insofern Bedeutung, als dem Vitamin B₁ eine besonders wichtige Rolle im Kohlehydratstoffwechsel zukommt und man behauptet, daß dieses Vitamin den Glykogengehalt in der Leber erhöhe²². Horn hat daraus wichtige Schlüsse für den Kohlehydratstoffwechsel im allgemeinen und für die Anwendung dieser Beobachtung auf klinische Maßnahmen im besonderen gezogen. Beim

Vergleich der nur mit Traubenzucker gefütterten Tiergruppe meiner Versuche ist nach Zugabe von Vitamin B₁ eine derartige Erhöhung des Glykogens für weißes und braunes Fett überhaupt nicht abzulesen, für die Leber recht unsicher. Denn bei der außerordentlichen Schwankung des Leberglykogengehaltes scheint mir bei Versuchsgruppen von 6 und 7 Tieren eine Steigerung des Durchschnittswertes von 3,7% auf 4,65% nicht viel zu besagen. (*Horn* arbeitete übrigens mit ebensolch großen Versuchsreihen an Ratten.) Man müßte dann schon mindestens Verdoppelungen auch im Durchschnittswert verlangen, um mit Sicherheit etwas sagen zu können. Mein Ergebnis steht in voller Übereinstimmung mit den Untersuchungen von *Edlund* und *Holmgren*²³, die ebenfalls bei Zufuhr von Vitamin B₁ keine sichere Glykogenzunahme in der Leber sahen.

Dasselbe gilt für die Tiergruppe, die mit Vitamin C behandelt wurde. Während bei weißem und braunem Fett ein Zurückbleiben des Durchschnittswertes gegenüber dem Normalwert gefunden wird, ist die Steigerung im Glykogengehalt der Leber auf 5,06% im Durchschnitt (gegenüber 3,7% normal) zu wenig, um bei der kleinen Tierzahl sichere Schlüsse aus dem Wert ziehen zu können.

Die Erhöhung des Glykogengehaltes der Leber ist nach Lactoflavin-gaben mitunter sehr erheblich, so daß man beim Vergleich der einzelnen Tiergruppen und Zuckerarten eine steigernde Wirkung dieses Vitamins annehmen möchte. Nun sind aber diese Versuchsgruppen für einen solchen Vergleich viel zu klein. Das Bild ändert sich sofort, wenn man einmal ohne Rücksicht auf die Zuckerart alle Normaltiere und alle jeweils mit Vitamin B₁ und Lactoflavin behandelten Tiere zusammenzählt und den Durchschnitt nimmt. Das ergibt einen Durchschnittswert

bei Normaltieren:

für weißes Fett = 0,22%, für braunes Fett = 1,65%, Leber = 2,83% (20 Tiere)

bei Tieren mit Vitamin B₁:

für weißes Fett = 0,32%, für braunes Fett = 1,38%, Leber = 4,21% (14 Tiere);

bei Tieren mit Lactoflavin:

für weißes Fett = 0,28%, für braunes Fett = 1,00%, Leber = 4,59% (10 Tiere).

Aus diesen Werten kann man auch für das weiße und braune Fett und für die Leber nach Gaben von Lactoflavin bei Berücksichtigung des oben Gesagten keine Steigerung des Glykogens mit Sicherheit ablesen.

Vergleich des chemischen und histologischen Glykogenachweises.

Beim Vergleich der Leistungsfähigkeit der chemischen mit der histologischen Methode — gemessen am Nachweis geringster Mengen — ergibt sich die bekannte Tatsache, daß die *Bestsche* Carminprobe der chemischen Bestimmung unterlegen ist (s. auch *Holm*²⁴ u. a.). Jedenfalls kann man mit dieser Färbung nie auch dann noch Glykogen finden, wenn der chemische Wert nur noch minimalste Spuren angibt, der

Glykogengehalt also praktisch gleich Null ist. Dasselbe gilt, wie die Tabelle ohne weiteres zeigt, für die *Bauersche* Reaktion. Sie ist also auch in dieser Beziehung der *Bestschen* Färbung nicht überlegen.

Wo liegt nun die unterste Grenze der Leistungsfähigkeit des histologischen Glykogennachweises? Zu dieser Feststellung wurden die zahlenmäßig noch größeren Untersuchungen mit herangezogen, die hier in dieser Arbeit nicht tabellarisch aufgeführt sind. Für die Berechnung des Durchschnittswertes wurde von 85 untersuchten Tieren beim braunen und weißen Fett und bei der Leber jeweils der chemisch bestimmte höchste Wert herausgesucht, bei dem histologisch sich nicht die geringste Spur von Glykogen fand, andererseits der chemisch niedrigste histologisch aber noch sicher positive Wert festgestellt. Alle nun in diesem Bereich liegenden, histologisch positiven (ganz gleich, ob bei *Best* oder *Bauer*) und histologisch negativen Werte wurden nun herausgesucht und der Durchschnitt für die positiven und negativen Fälle gebildet. So ergab sich:

für die Leber	in 13 pos. Fällen ein	Durchschnitt von	0,28 %
	in 4 neg. „ „ „	„	0,29 %
für weißes Fett	in 23 pos. „ „ „	„	0,15 %
	in 25 neg. „ „ „	„	0,09 %
für braunes Fett	in 24 pos. „ „ „	„	0,46 %
	in 23 neg. „ „ „	„	0,32 %

Nach diesen Untersuchungen liegt also für die Leber bei etwa 0,3% die untere Grenze des histologisch möglichen Glykogennachweises, für weißes Fett bei etwa 0,1% und für braunes Fett bei etwa 0,4%. Allerdings zeigen die Zahlen der positiven und negativen Fälle, wie unsicher der Nachweis in diesem Bereich ist. Das histologische Bild aber ergibt, daß es sich wirklich nur um Spuren handelt.

Welche histologische Methode sich zum Nachweis solcher Spuren besser eignet, sollen folgende Zahlen zeigen: Es fanden sich in der Leber bei *Bauer* 9mal Spuren ohne gleichzeitig nachweisbares Glykogen bei *Best*, in braunem Fett nur einmal Spuren bei *Bauer* und 2mal Spuren bei *Best* ohne jeweiligen Nachweis bei der anderen Färbung, in weißem Fett 7mal Spuren bei *Bauer* und 2mal Spuren bei *Best*. Danach ist für den Nachweis geringster Mengen von Glykogen die *Bauersche* Färbung besser. Worauf ist das zurückzuführen? Die *Bestsche* Färbung hat den Nachteil, daß sie Protoplasma, Zellgrenzen usw. mitfärbt und häufig stellenweise trotz sorgfältiger Ausführung Farbniederschläge und Verschmierungen gibt. So werden geringste Spuren von Glykogen durch solche Kunstprodukte überdeckt und sind auch bei kräftiger Gegenfärbung nicht sicher als Glykogen zu erkennen. Die *Bauersche* Reaktion zeigt diesen Mangel nicht. Sie färbt ganz distinkt und ausschließlich das Glykogen in Leber und Fettgewebe, so daß man also besonders am nicht gegengefärbten Schnitt mit größter Sicherheit auch geringe Glykogenspurten erkennen kann. Ich glaube, daß die größere Leistungs-

fähigkeit der *Bauerschen* Reaktion nur auf dieser Tatsache beruht, eine effektive Mehrdarstellung von Glykogen aber gegenüber der *Bests*chen Probe nicht vorliegt.

Bei der Abschätzung der Menge des Glykogens aus dem histologischen Schnitt ergaben sich zunächst Schwierigkeiten. Für die *Bests*che Carminfärbung stellte es sich im Verlauf der Untersuchungen heraus, daß das Farbgemisch — nach *Schmorl*¹⁷ im Winter 2 Monate haltbar — schon nach 4 Wochen eine erheblich geringere Ausbeute ergab. Durch verschieden lange und intensive Gegenfärbung konnte ebenfalls noch eine erhebliche Variation in der Intensität der Glykogenfärbung erreicht werden. Zu einer 2. Abschätzung wurden deshalb noch einmal alle Schnitte mit einer frisch hergestellten Farbe und mit einer zeitlich genau eingehaltenen Gegenfärbung angefertigt (s. Tabelle, Werte in Klammern). Diese 2. Schätzung ergab immerhin meist eine erstaunliche Übereinstimmung mit der ersten. Bei der *Bauerschen* Reaktion gestaltete sich die Auswertung noch schwieriger, da hierbei besonders ausgeprägt in der Leber eine eigentümliche intensiv gefärbte Randzone auftrat und im Inneren des Schnittes das Glykogen an Menge erheblich abnahm, fast spärlich zu finden war (vgl. Abb. 4). Auf diesen Befund werde ich noch unten weiter eingehen. Durch Wegfall der Gegenfärbung wurde die Randzone nicht ausgeglichen. Es trat aber nun das Glykogen im Inneren des Schnittes besser hervor und der Schnitt wurde besser auswertbar. Ich erzielte rein mengenmäßig eine Angleichung an die Werte bei *Best*, teilweise sogar eine Vermehrung (s. Tabellen, 2. Auswertung in Klammern).

Wichtig ist nun der Vergleich der chemischen Werte mit diesen geschätzten Werten. Es ergibt sich hier aus der Tabelle eine manchmal geradezu erstaunliche Diskrepanz zwischen geschätzten Werten und chemisch bestimmten. Anschaulich werden diese Verhältnisse bei einer kurvenmäßigen Aufzeichnung in Abb. 3 dargestellt, wo die chemisch gefundenen Werte der Leber in Vergleich zu den geschätzten gesetzt sind. Bei Beurteilung der Abb. 3 muß ich auf die im methodischen Teil dazu gemachten Ausführungen verweisen. Ich kann jedenfalls aus dem Verhalten der Werte zueinander keine einheitliche große Parallele zwischen dem Verlauf des chemischen Werte und den geschätzten sehen — wobei man gern einige Differenzen in Kauf nehmen würde —. Die Differenzen sind aber so häufig und schwankend nach beiden Seiten, daß man die Möglichkeit einer feineren mengenmäßigen Abschätzung des Glykogens aus dem Schnitt völlig ablehnen muß und nur von negativer, schwach positiver oder positiver Reaktion reden kann. Dieses Ergebnis ist besonders interessant mit Hinblick auf die Untersuchungen von *Holmquist*¹¹, der zeigte, daß man in der Leber bei centroacinärer fleckiger Ablagerung etwa einen Glykogengehalt von 2%, bei diffuser etwa 4% annehmen könne. Ich habe mein Material danach gesichtet

und fand bei einem Gehalt von 1,5—2,5% in der Leber 11mal diffuse und 5mal herdförmige Ablagerungen und 4mal eine herdförmige Ablagerung bei einem Gehalt über 2,5%. Diese Zahlen bestätigen das Ergebnis von *Holmquist*¹¹ in keiner Weise. Sondern sie zeigen, daß man auch aus der Form der histologischen Ablagerung nichts Sicheres über den Glykogengehalt der Leber aussagen kann.

Dasselbe gilt nach meinen Untersuchungen für das braune und weiße Fett. Darüber hinaus aber zeigen diese vergleichenden Untersuchungen, wie stark der optische Eindruck täuschen kann.

Zum Schluß müssen noch einige bemerkenswerte Unterschiede im färberischen Verhalten der *Bestschen* Probe und *Bauerschen* Reaktion

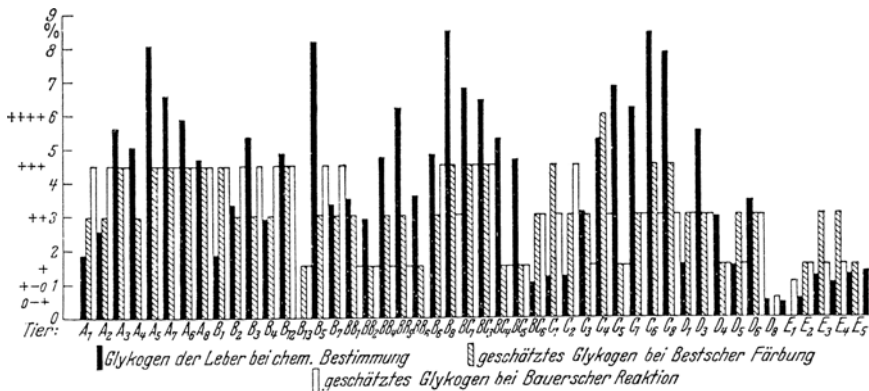
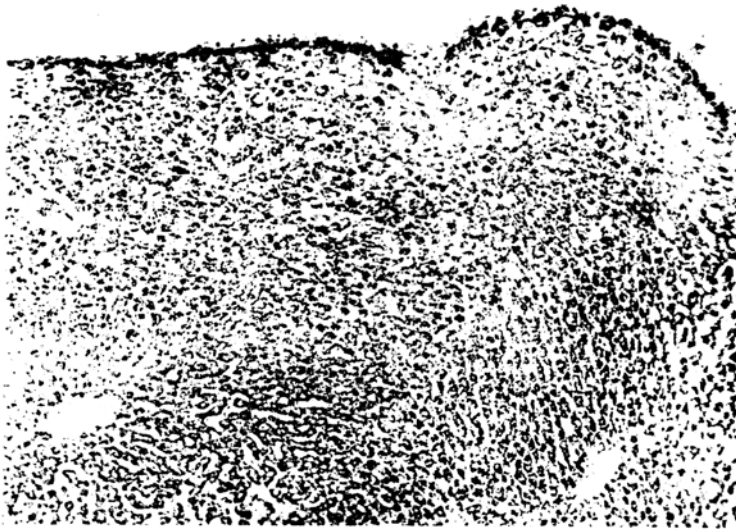


Abb. 3. Vergleichende kurvenmäßige Darstellung der Leberglykogenwerte bei chemischer Bestimmung und gleichzeitiger Abschätzung am histologischen Schnitt nach *Bestscher* und *Bauerscher* Färbung.

geschildert und erörtert werden*. Diese Unterschiede traten regelmäßig und besonders kraß an der Leber auf, wurden aber auch gelegentlich am braunen Fett, nie am weißen festgestellt. Es handelt sich zunächst bei der *Bauerschen* Reaktion um das Auftreten einer massiv und dicht gefärbten Randzone, die mit ziemlich scharfer Grenze in das außerordentlich glykogenarme Innere des Schnittes übergeht. Wenn man dann nur die *Bauersche* Färbung ansieht, hat man den Eindruck, daß die Leber nur am Rand in der Hauptsache subcapsulär Glykogen gespeichert hat, das Innere aber fast leer ist. Denselben Befund erhob *Kirsten*²⁵ bei einer Untersuchung des Glykogengehaltes an B₁-avitaminotischen Tauben. Er gibt davon eine Beschreibung, die ich wörtlich auf meine vorliegenden Rattenlebern anwenden kann: „In der

* Anmerkung: Auf solche Unterschiede im färberischen Verhalten der *Bestschen* und der *Bauerschen* Glykogenfärbung wurde ich zu gleicher Zeit im Laufe einer persönlichen Unterhaltung mit *Wallraff* aufmerksam gemacht, der mir bei dieser Gelegenheit auch glykogengefärbte menschliche Leberschnitte von einer im praktischen Teil bereits abgeschlossenen, aber noch nicht veröffentlichten Arbeit zeigte.



a



b

Abb. 4. Randzone der Leber. a Verhältnismäßig geringer Glykogengehalt der Randzone und Zunahme des Glykogens nach dem Inneren des Schnittes bei *Bestscher* Färbung. b Starker Glykogengehalt derselben Randzone und Abnahme des Glykogens nach innen bei *Bauerscher* Reaktion (gleiche Vergrößerung).

subcapsulären Randzone sind die mit auffallend kleinem Kern ausgestatteten Leberzellen mit Glykogen vollgepfropft (Abb. 4). Eine starke Glykogenanhäufung findet sich außer in der Randzone nur noch

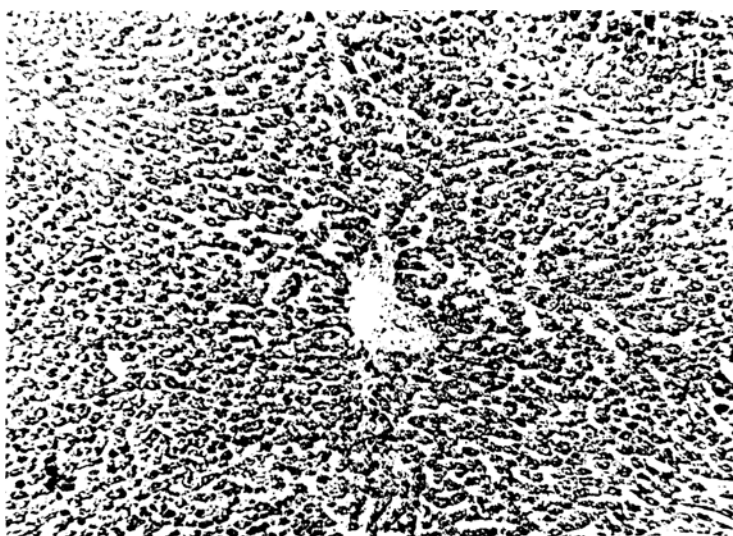
in einzelnen innerhalb der Leberläppchen verstreut liegenden Zellen und in solchen, die unmittelbar an Zentralvenen angrenzen. Letztere bilden in einigen Leberläppchen an gefärbten Schnittpräparaten infolge ihres reichen Glykogengehaltes rotviolette Zellkränze um die Zentralvenen. Schließlich fanden sich noch in vereinzelter Leberzellen wenige feine Glykogenkörner. Weitaus die Mehrzahl der Leberzellen aber ist nach der *Bauerschen* Reaktion völlig frei von Glykogen und besitzt ein wabiges Protoplasma.“ *Kirsten*²⁵ folgert aus diesem Befund einen geringen Glykogengehalt der Leber. Daß dieser Schluß nicht richtig ist, zeigt die *Bestsche* Probe, die *Kirsten* nicht vergleichend ausführte; denn dabei bietet sich nun mengenmäßig ein ganz anderes Bild. Man findet die Leber ganz gleichmäßig und dicht über den ganzen Schnitt hin mit Glykogen beladen. In der Randzone dagegen mit den auffallend kleinen Zellen ist bei dieser Färbung das Glykogen in der Regel wesentlich geringer nachweisbar, sowohl im Vergleich zum Inneren des Schnittes wie im Vergleich zur *Bauerschen* Reaktion (vgl. Abb. 4 u. 5). Daneben findet sich am äußersten Rand wieder ein schmaler dicht gefärbter Saum. Die Verhältnisse kommen in den Abb. 4 u. 5 gut heraus, bei denen man einmal die Randzone derselben Leber mit *Bestschem* Carmin, einmal nach *Bauer* gefärbt sieht, in der anderen Abbildung dasselbe Läppchen im Inneren eines Schnittes nach *Best* mit reichlich Glykogen, nach *Bauer* fast ohne Glykogen findet.

Dieser merkwürdige Befund führte mich zunächst dazu, einmal zu prüfen, ob zwischen beiden Färbungen sich gestaltliche Unterschiede in der Form und Art der Ablagerungen des Glykogens finden lassen. Der genaue Vergleich bei allen untersuchten Gewebsarten ergab dieselbe schollige Form des Glykogens in beiden Färbungen mit derselben Art der zelligen Speicherung.

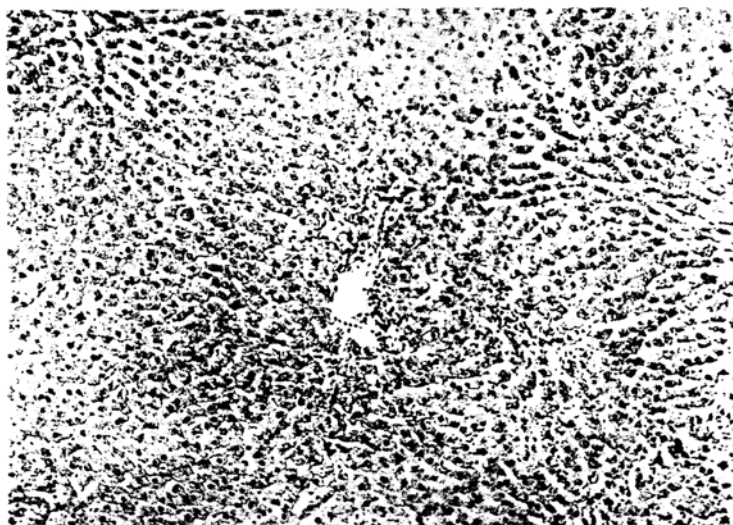
Die genauere Betrachtung der Leberschnitte bei *Bauerscher* Reaktion zeigt aber, daß sich im Inneren das Glykogen auch darstellt, nur ganz blaßrosa neben einzelnen intensiv roten Schollen angefärbt und bei kräftiger Gegenfärbung fast völlig überdeckt wird und schwer zu erkennen ist. Ich untersuchte deshalb alle Schnitte noch einmal ohne Gegenfärbung, testete sie aus und kam nun bei mengenmäßiger Abschätzung meist zu demselben Wert wie bei *Best*, öfter sogar zu höheren Werten.

Zur Erklärung dieser Randzone wies *Kirsten*²⁵ auf *Arndt*²⁶ und *Meixner*²⁷ hin, die bei Haussäugetieren und Menschen subcapsulär ebenfalls stärkere Glykogenansammlungen sahen und die Erscheinung auf besondere Kreislaufverhältnisse unter der Kapsel zurückführten. Ich habe meine sämtlichen Schnitte daraufhin systematisch durchgesehen und muß zugeben, daß dieses Randphänomen besonders schön und ausgeprägt subcapsulär auftritt, aber ohne Zweifel auch am freien Schnittende der Leber zu sehen ist. Auf Grund dieser Beobachtung

liegt es nahe, in dem Randphänomen ein Kunstprodukt zu vermuten. Man könnte annehmen, daß das Fixierungsmittel in die Randzone rasch



a



b

Abb. 5. Leberläppchen aus dem Schnittinneren a bei *Bestscher* Färbung mit starkem gleichmäßigen Glykogengehalt, b bei *Bauerscher* Reaktion mit geringem Glykogengehalt.

eindringt und das Glykogen sofort ausfällt, während im Inneren Abbauvorgänge am Glykogen weitergehen, bis auch hier das Fixierungs-

mittel diesem Vorgang Einhalt gebietet. Dieses hochpolymerisierte und rasch gefällte Glykogen der Randzone scheint nun besonders gut durch die *Bauersche* Reaktion zur Darstellung gebracht zu werden, während das im Inneren liegende schon im Abbau begriffene (niedriger polymerisierte?) Glykogen diese Reaktion nur noch schlecht gibt. Andererseits scheint nach dem vorliegenden Befund für die *Bestsche* Probe das schon im Abbau begriffene Glykogen zur Färbung gut geeignet.

Diese Erklärung soll nur einen Versuch darstellen. Weitere Untersuchungen werden die Verhältnisse klarlegen müssen. Man wird aber in der Vermutung eines Kunstproduktes dadurch bestärkt, daß in kleineren Leberstückchen und fast durchweg in den kleinen Stückchen des braunen Fettes, das histologisch meist denselben Gehalt an Glykogen, wie die Leber zeigt, die *Bauersche* Reaktion auch im Inneren kräftig ausfällt, allerdings ebenfalls mit Betonung der Randzone. Bei diesen kleinen Stückchen konnte also das Fixierungsmittel rasch das ganze Stück durchdringen und das Glykogen in der für die *Bauersche* Reaktion geeigneten Form fixieren. Im weißen Fett waren derartige Verhältnisse bei dem geringen Glykogengehalt nicht festzustellen.

Es soll noch ein anderer Befund kurz erwähnt werden, der nur im weißen Fett zu erheben war. Es fanden sich hier reichlich Mastzellen, die sich nach *Best* gut anfärbten und auch nach der Speichelprobe diese Färbung gaben. Nach *Bauer* fiel die Anfärbung negativ aus. Dieselbe Beobachtung teilte *Clara*²⁸ mit.

Zusammenfassung.

1. Der Glykogengehalt des weißen und braunen Fettes der Ratten nach Hunger und Wiederernährung ist von Tier zu Tier ebenso schwankend wie der Gehalt der Leber. Das braune Fett zeichnet sich durch besonderen Glykogengehalt gegenüber dem weißen Fett aus und erreicht manchmal Werte wie die Leber. Irgendwelche gesetzmäßigen Beziehungen im Glykogengehalt des weißen und braunen Fettes zu dem der Leber lassen sich nicht finden.

2. Bei Verfütterung einzelner Zuckerarten ergibt sich, daß der Milchezucker für das weiße und braune Fett entsprechend dem Verhalten zur Leber ein schlechter Glykogenbildner ist.

3. Durch Gaben von Vitamin B₁, Laktoflavin oder Vitamin C läßt sich im weißen und braunen Fett und in der Leber keine Steigerung des Glykogengehaltes erzielen.

4. Beim Vergleich der Leistungsfähigkeit des chemischen und histologischen Glykogennachweises wird gezeigt, daß der chemische Nachweis auch gegenüber der *Bauerschen* Reaktion wesentlich empfindlicher ist. Die untere Grenze für den histologisch möglichen Nachweis liegt in der Leber bei etwa 0,3%, im weißen Fett bei etwa 0,15% und im braunen Fett bei etwa 0,4%.

5. Für den histologischen Nachweis geringster Mengen ist die *Bauersche* Reaktion geeigneter, da sie elektiver und prägnanter färbt. Eine Mehrdarstellung von Glykogen durch diese Färbung gegenüber der *Bestschen* Probe tritt nicht ein.

6. Ein Vergleich der mengenmäßigen Abschätzung des Glykogens aus dem histologischen Schnitt bei der *Bauerschen* wie bei der *Bestschen* Färbung mit den chemisch gefundenen Werten ergibt derartige Fehler für die geschätzten Mengen, daß der histologische Nachweis auch für grobe mengenmäßige Glykogenbestimmungen völlig unzulänglich ist. Auch aus der Form der Ablagerung sind Anhaltspunkte für einen bestimmten Glykogengehalt nicht zu entnehmen. Man kann nach dem histologischen Schnitt lediglich von einer negativen, schwach positiven oder positiven Reaktion sprechen. Dieses Untersuchungsergebnis ist zugleich ein Beispiel dafür, welchen Fehlern der optische Eindruck unterworfen ist.

7. Das bei der *Bauerschen* Reaktion besonders am Leberschnitt auftretende „Randphänomen“ ist vermutlich ein Kunstprodukt. Dazu müssen noch weitere Untersuchungen beigebracht werden.

Schrifttum.

- ¹ Gierke, E. v.: Verh. dtsch. path. Ges. 1906, 182. — ² Wassermann: Ges. Morphol. u. Physiol. München 1933, S. 43. — ³ Henle, W. u. G. Scpinger: Arch. f. exper. Path. 180, 672 (1936). — ⁴ Felix, K. u. W. Eger: Dtsch. Arch. klin. Med. 182, 623 (1938). — ⁵ Felix, K. u. W. Eger: Dtsch. Arch. klin. Med. 184, 446 (1939). — ⁶ Eger, W. u. V. Morgenstern: Arch. f. exper. Path. 191, 76 (1938). — ⁷ Eger, W.: Verh. Ges. Verdgs- u. Stoffwechselkrkh., 14. Tagg 1938, 78. — ⁸ Romeis, B.: Taschenbuch der mikroskopischen Technik. München u. Berlin 1932. — ⁹ Bauer, H.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 33 (1933). — ¹⁰ Wallraff, J. u. H. Beckert: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 45, 510 (1939). — ¹¹ Holmquist, A. G.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 25, 30 (1931). — ¹² Holmgren, H.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 24, 632 (1931). — ¹³ Pfuhl, W.: Im Handbuch der mikroskopisch-anatomischen Forschung, Bd. V/2, S. 296, 319. 1932. — ¹⁴ Stepp, Kühnau, Schroeder: Die Vitamine. Stuttgart: Ferdinand Enke 1941. — ¹⁵ Richter, F.: Beitr. path. Anat. 86, 65 (1931). — ¹⁶ Fels, E.: Zbl. Path. 35, 177 (1924). — ¹⁷ Schmorl, G.: Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Leipzig: F. C. Vogel 1922. — ¹⁸ Arndt, H. J.: Beitr. path. Anat. 79, 69, 523 (1928). — ¹⁹ Hindemith, H.: Biochem. Z. 274 (1942). — ²⁰ Hofmann u. Wertheimer: Pflügers Arch. 217, 728 (1927). — ²¹ Eger, W.: Klin. Wschr. 1938 I, 1033. — ²² Horn, Z.: Klin. Wschr. 1941 I, 1032. — ²³ Edlund, X. u. H. Holmgren: Z. exper. Med. 109, 11 (1941). — ²⁴ Holm, K.: Virchows Arch. 254, 236 (1925). — ²⁵ Kirsten, J.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 50, 355 (1941). — ²⁶ Arndt, H. J.: Virchows Arch. 253, 254 (1924). — ²⁷ Meixner, K.: Beitr. gerichtl. Med. 1, 221 (1911). — ²⁸ Clara, M.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 47 (1940).