

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. WOLFGANG LAVES).

Histoenzymatische Untersuchungen an den Granulationen der weißen Blutkörperchen.

Von

WOLFGANG LAVES und KARL THOMA.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. August 1949.)

A. Einleitung.

Seit PAUL EHRLICH unterscheiden wir basophile, eosinophile und neutrophile Leukocyten, eine Einteilung, die auch heute noch eine der Grundlagen der morphologischen Diagnostik von Blutbildern darstellt. EHRLICH sah in der Färbung eine chemische Reaktion zwischen Farbstoff und Substrat und verfocht die Ansicht, daß die histologische einer chemischen Differenzierung der Leukocytengranula gleichzustellen sei.

Seit den grundlegenden Untersuchungen von MICHAELIS einerseits, BETHE, PISCHINGER und ZEIGER andererseits, wissen wir aber, daß den Begriffen der Acido-, Baso- und Neutrophilie nur relative Bedeutung zukommt. Die Farbbindung durch ein Substrat wird von einer Reihe von Faktoren beeinflußt und zwar der Lage seines Umladebereiches, dem Fixierungsmittel, dem Ladungscharakter des oder der verwendeten Farbstoffe, VAN DER WAALSchen Kräften, der chemischen Affinität des Farbstoffes zum Substrat (SCHEIBE) und der C_H der Farblösungen.

Wenn es gelingt, exakte Vorstellungen über den Einfluß aller dieser Faktoren zu erlangen, wird man dem von PAUL EHRLICH erstrebten Ziele, mit Hilfe von Färbungen auch Aufschlüsse über die chemische Konstitution eines Gewebs- oder Zellbestandteils zu erhalten, näherkommen. Vorläufig ist das jedoch nur in begrenztem Maße der Fall. Die Färbung allein kann daher eine chemische Analyse nicht ersetzen.

Im Gegensatz zu den großen Fortschritten auf dem Gebiete der Chemie der Blutfarbstoffe und der Bluteiweißkörper sind unsere Kenntnisse über den chemischen Aufbau der Granula der weißen Blutzellen noch gering. Nach NEUMANN beruhen die Schwierigkeiten ihrer chemischen Analyse vor allem auf der Gewinnung eines einheitlichen Ausgangsmaterials. Das ist durchaus einleuchtend, da es kaum möglich ist, nur eine einzelne Leukocytenart isoliert zu erfassen. Selbst im Eiter, den man im gewissen Sinne als Reinkultur bezeichnen kann, treten uns verschiedene Leukocytentypen, wie polymorphkernige Neutrophile, Lymphocyten, eventuell Monozyten, entgegen. Dazu kommt,

daß die Befunde an reinem Eiter oft durch Zerfallsprodukte der Zellen irreführend werden. Die Anwendung chemisch-analytischer Verfahren zur Untersuchung kleinster Zellbestandteile hat weiterhin den Nachteil, daß die Lokalisation der isolierten Verbindungen in der Zelle selbst zusätzlich geklärt werden muß. Die Histochemie brachte zwar wesentliche neue Erkenntnisse, doch sind die Methoden zur Analyse hochmolekularer Verbindungen vom Eiweiß- und Kohlenhydratcharakter noch weniger entwickelt. Aus diesem Grunde versuchten wir mit Hilfe eines indirekten Verfahrens, der *histoenzymatischen Hydrolyse*, tiefere Einblicke im chemischen Aufbau der Leukocytengranula zu erhalten.

B. Untersuchungsverfahren.

Wir ließen Fermente mit bestimmter Substratspezifität auf Blutzellen einwirken und verfolgten die eingetretenen Veränderungen im histologischen Äquivalentbild nach entsprechender Färbung. Auf diesem Wege erhält man zwar keine Ergebnisse im Sinne einer chemischen Analyse der von den Fermenten angegriffenen Zellbestandteile, doch hat das Verfahren den Vorteil, die Zuordnung des hydrolysierten Substrats zu bestimmten Verbindungsgruppen und gleichzeitig ihre Lokalisation in der Zelle zu ermöglichen. An sich wurden Enzyme insbesondere Trypsin und Pepsin, in der Histologie zur Schnittverdauung bereits seit langem verwendet. In neuerer Zeit fand eine ribonucleinsäurehydrolysierende Ribonuklease weitgehende Verwendung zu Kern- und Plasmastudien (BRACHET[Brachet-Test]). Von W. LAVES wurden Hyaluronidasen zum Studium von Gewebs- und Zellglykoproteiden in die histologische Technik eingeführt. Es erschien daher aussichtsreich, auch die Granula der weißen Blutzellen mit Hilfe von Fermenten näher zu untersuchen.

Das folgende Schema möge den Untersuchungsgang erläutern:

1. Herstellung der Ausstriche, Lufttrocknung und Fixierung,
2. Verdauung in gepufferten Enzymgemischen geeigneter C_H,
3. Abspülung und Färbung,
4. Mikroskopische Untersuchung.

Von jedem Präparat wurden unverdaute und verdaute Ausstriche vergleichend untersucht.

Material.

Zur Untersuchung gelangten Blut- und Knochenmarkausstriche vom Menschen (Normalblut, Blut von Fällen myeloischer und lymphatischer Leukämie), ferner von Kaninchen, Meerschweinchen und Pferden.

Fixierung.

Im allgemeinen wurden Objektträgerausstriche hergestellt, luftgetrocknet und mit absolutem Äthanol oder Methanol fixiert. Zur Untersuchung der verhältnismäßig leicht wasserlöslichen basophilen Granulationen hat sich die Fixierung

mit Formolalkohol nach SCHAFFER bewährt. Dabei war die Methylenierung des Substrates durch das Formol zu berücksichtigen. Bei den Verdauungsversuchen verlief die Hydrolyse erwartungsgemäß verzögert, was sich jedoch für die Verfolgung der Abbauvorgänge als durchaus erwünscht erwies.

Fermente.

Für die Hydrolysen wurden folgende Enzyme verwendet:

1. Trypsin und
2. Pepsin als gereinigte Präparate der Firma Merck, in Lösungen geeigneter Wasserstoffionenkonzentration,
3. Hyaluronidasen,
4. Ribonuklease nach BRACHET,
5. Arginase nach EDLBACHER.

Über die Fermente der Gruppe 3—5 seien nähere Angaben vorangeschickt.

Hyaluronidasen. CHAIN und DUTHIE hatten erstmals bemerkt, daß Hodenextrakt die Viscosität der Synovialflüssigkeit stark herabsetzt, wobei Glucuronsäure und N-Acetylglukosamin in äquimolaren Mengen entstehen. Sie schlossen auf ein Ferment, eine Mucinase, welches das Mucopolysaccharid der Gelenkschmiere (Hyaluronsäure) abbaut. Die Testis-Mucopolysaccharase wird auch als *Hyaluronidase* bezeichnet. Es handelt sich wahrscheinlich nicht um ein einheitliches Enzym. McCLEAN und HALE fanden nämlich, daß die Verflüssigung der Synovia durch Testisextrakte relativ rasch eintritt, der Nachweis von reduzierenden Gruppen jedoch erst viel später möglich ist. Sie schlossen daher auf einen Faktor, der das saure Mucopolysaccharid zuerst bis zu einer Di- oder Oligosaccharidstufe depolymerisiert (Depolymerase) und auf ein zweites Enzym, welches die Spaltung dieser Oligosaccharide in Glucuronsäure und N-Acetylglukosamin bewirkt (Hydrolase). Später konnte HAHN nachweisen, daß mit gereinigter Hodenhyaluronidase bei der Spaltung von Mucopolysacchariden keine Monosaccharide auftreten. HAHN fand als niedrigste Abbaustufen Disaccharide und entdeckte, daß die Fähigkeit, Oligosaccharide zu Monosacchariden abzubauen, durch ungereinigte Präparate leichter als durch gereinigte ausgelöst wird. Er nahm daher an, daß das zweite, hydrolysierende Enzym beim Reinigungsverfahren entfernt oder inaktiviert wird. Nach HADIDIAN und PIRIE erstreckt sich die Wirkung der Hodenhyaluronidase nur auf die Hyaluronsäure, nicht aber auf deren Ester, dagegen auch auf Chondroitinschwefelsäure (HUMPHREY). Ester der Hyaluronsäure sollen die mucolytische Wirkung der Stierhodenhyaluronidase hemmen, ohne selbst angegriffen zu werden. Außer der mucolytischen Wirkung hat das aus Hoden gewonnene Enzym die Eigenschaft, die Permeabilität des Hautgewebes zu erhöhen (Spreading effect, DURAN-REYNALS). Mucolytische Fermente in Bakterienautolysaten wurden zum erstenmal 1937 von MEYER-DUBOS und SMYTH beschrieben. Sie stellten Autolysate aus Pneumokokken und Streptokokken her, welche Glykoproteide hydrolysierende Enzyme enthielten. Auch diese setzten die Permeabilität der Haut für Bakterien und Farbstoffe herab. Es handelt sich um Mucopolysaccharasen, die Hyaluronsäure zu Monosacchariden (Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin) abbauen.

Von MEYER, HOBBY, CHAFFEE und DAWSON wurde ein mucolytisches Enzym aus hämolytischen Streptokokken, ferner aus Clostridium Welchii gewonnen, welches neben Stärke auch die sulfathaltigen, sauren Polysaccharide vom Typus der Chondroitinschwefelsäure und Mucoitinschwefelsäure angreift. Eine Hydrolyse von Polyschwefelsäureestern durch Hyaluronidase aus Clostridium Welchii wird nicht immer erzielt. Sie werden jedoch durch Enzyme aus Pneumokokken, Streptokokken und Clostridium perfringens verdaut. Ebenso wie für die Hoden-

Tabelle 1.

Enzyme	Substrate				
	Stärke	Hyaluron-säure	Poly-schwefel-säureester der Hs.	Chon-droitin-schwefel-säure	Mocoitin-schwefel-säure
Testishyaluronidase . . .	—	+	—	+	—
Clostridium perfringens					
Hyaluronidase . . .	—	+	+	+	—
Cl. Welchii Hyaluronidase	+	+	+ (?)	+	+

hyaluronidase kann man für das Enzym aus *Clostridium Welchii* annehmen, daß es aus einem Enzymgemisch besteht, von dem ein Bestandteil nur die Polysaccharide, ein anderer die Oligosaccharide angreift. Von dieser Hydrolase, welche im Gegensatz zur Hodenhyaluronidase immer — also nicht nur im unge reinigten Enzym — im Enzym aus dem Gasbranderreger *Clostridium Welchii* enthalten ist, wird auch Mucitin- und Chondroitinschwefelsäure angegriffen.

Zu den folgenden Versuchen wurde Hodenhyaluronidase, Enzym aus Gasbrandbacillen *Clostridium Welchii* (Fränkeltoxin III der Behringwerke) und Enzym aus *Clostridium perfringens* (Fränkeltoxin I der Behringwerke) verwendet. Die Hodenhyaluronidase wurde nach der Methode von McCLEAN in folgender Weise gewonnen.

Von einem Kilogramm frischer Stierhoden wurden alle nichtdrüsigen Anteile entfernt, das Mark durch den Fleischwolf gedreht, dünnbreiig verrieben und mit dem gleichen Volumen n/10 Essigsäure versetzt. Nach 24ständigem Stehen im Eisschrank wurde kolliert, mit der vierfachen Menge Aceton versetzt und filtriert. Der Filterrückstand wurde 2mal mit Aceton-Äther gewaschen und filtriert. Nach Trocknung wurde zum Gebrauch etwa 1 g Trockensubstanz mit 25 cm³ Wasser verrieben und filtriert (Lösung I).

Die weitere Reinigung des Präparates erfolgte durch 2maliges Filtrieren und Versetzen des klaren Filtrates mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung. Nach Entfernung des sich bildenden Niederschlages wurde die Lösung mit festem Ammoniumsulfat gesättigt, der Niederschlag abfiltriert, Filterrückstand samt Filterpapier in kleine Stücke zerschnitten und 24 Std im Cellonphanbeutel dialysiert. Aus dem Dialysat wurde die Hyaluronidase durch die 4fache Menge Alkohol gefällt, filtriert und getrocknet. Die Trockensubstanz war lange Zeit haltbar. Bei den Versuchen fand vor allem die Lösung I Verwendung.

Über die Wirkung der genannten mucolytischen Enzyme nach den bisherigen Forschungsergebnissen orientieren die Tabellen 1 und 2.

Ribonuclease. Während unsere Kenntnisse über die Mucopolysaccharasen im wesentlichen erst in den letzten 10 Jahren gesammelt wurden, sind Enzyme, welche die Nucleinsäuren spalten, schon erheblich länger bekannt. Als erster hat wohl der Botaniker Oes 1908 eine Nuklease zu Versuchen an pflanzlichen Zellkernen verwendet. Später hat VAN HERWERDEN planmäßige Versuche an Kernen tierischer

Tabelle 2.

Hydrolyseprodukte der Polysaccharide	Wirksame Fermentfraktion
Polysaccharide ↓ Disaccharide	Depolymerasen
↓ Glucuronsäure	Hydrolasen
N-Acetylglucosamin	

Zellen durchgeführt. Er benutzte dazu einen zunächst aus Pankreas, später einen aus Milz gewonnenen wenig spezifischen Extrakt. BRACHET ist es schließlich gelungen, ein spezifisch auf Ribonukleinsäuren wirkendes Enzym aus Pankreas zu gewinnen. Für unsere Versuche wurde das Enzym nach BRACHET in folgender Weise aus frischem Rinderpankreas hergestellt: Nach sorgfältiger Entfernung aller nichtdrüsigen Anteile wurde die Drüse fein zerkleinert und mit der $1\frac{1}{3}$ fachen Menge 0,1 n Essigsäure für 24 Std bei 37° im Thermostat aufbewahrt. Das Gemisch wurde dann 10 min gekocht und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde gegen Natronlauge neutralisiert und dann nochmals filtriert. Die so gewonnene Ribonuklease wurde nun noch 24 Std dialysiert. Falls die Fermentlösung sofort nach der Herstellung verwendet wird, kann die Dialyse unterbleiben.

Arginase. Arginase findet sich im Tierkörper in großen Mengen in der Leber, Niere, Milz, Muskulatur und im Blut. Ihre Wirkung ist auf Arginin gerichtet, doch greift Arginase auch eine Anzahl ähnlicher Guanidinderivate an. Das Ferment spaltet Arginin in Ornithin und Harnstoff. Zur Gewinnung diente frische Leber als Ausgangsmaterial. Diese wurde nach sorgfältiger Entfernung aller nichtdrüsigen Anteile fein zerkleinert und mit Quarzsand gut gemischt. Während des Zerreibens wurden allmählich 4 Teile Glycerin dazugegeben und die Masse durch ein Mulltuch gepreßt. Es resultierte ein dünnflüssiger Extrakt, der nach Verdünnung mit Glycerin (meist im Verhältnis 1:100) sofort gebrauchsfertig war. Außer Leberextrakten wurden auch solche von Milz und Niere hergestellt. Die Extrakte sind sehr lange Zeit haltbar. Ferner wurde ein gereinigtes Trockenpräparat nach EDLBACHER und SIMONS hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente ein Glycerinextrakt aus menschlicher Leber, der mit Wasser auf das Zehnfache verdünnt wurde. Die Menge wurde so gewählt, daß das Gesamtvolumen 250 cm³ betrug. Die Suspension wurde einer dreimaligen Voradsorption mit Tonerde C nach WILLSTÄTTER (je Kubikzentimeter Suspension 30 mg Tonerde), anschließend einer Voradsorption mit Kaolin (je 5 cm³ Suspension 0,69 g Kaolin) unterzogen. Die Adsorbate wurden verworfen. Nunmehr erfolgte die Hauptadsorption an eine größere Menge Kaolin, Elution mit Glykokollpuffer bei pH 9 und Fällung der Elution mit der 10fachen Menge Aceton. Die Ausbeute war nur sehr gering, die Aktivität des Präparates jedoch äußerst stark. 0,5 g des pulverisierten Fermentes wurden vor der Anwendung in 100 cm³ H₂O gelöst. Da das Trockenpräparat 30700 E je Gramm enthält, waren in der Lösung etwa 15000 E wirksamer Substanz enthalten.

Färbungen.

Es wurden folgende Färbungen angewendet: May-Grünwald-Giemsa, Methylenblau, Methylgrün-Pyronin, Eosin-Methylgrün, Triazid.

Die optische Beobachtung erfolgte in ungefärbten Präparaten mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens, in gefärbten Präparaten mit Ölimmersion. Von den wichtigsten Fällen wurden außerdem Schwarzweiß und Farbaufnahmen hergestellt.

Für die Peroxydasereaktion bewährte sich folgende Vorschrift:

Fixieren der Ausstriche mit einem Gemisch von 4 Teilen 95%igem Alkohol und einem Teil Formalin durch 3 min, Abspülen mit destilliertem Wasser, Färben durch 10 min mit einem Gemisch von 10 cm³ Alkohol (40%), dem 2—3 Tropfen 30%iges Perhydrol und einige Körnchen Benzidin zugesetzt werden.

Nach Abspülen mit destilliertem Wasser, Kontrastfärbung mit verdünnter Giemsalösung etwa 45 min, Abspülen und Abtrocknen.

Bei positivem Ausfall lassen sich in den Granulocyten gelbbraune körnige Niederschläge erkennen.

C. Untersuchungen und Befunde.

Zum näheren Verständnis der Untersuchungsergebnisse an den einzelnen Granulationen seien jeweils die wichtigsten bisherigen Mitteilungen der einschlägigen Literatur vorausgeschickt.

I. Die Blutmastzellen oder basophilen Leukocyten.

Im Jahre 1877 beschrieb EHRLICH Zellen mit metachromatischen und basophilen Granula, die er fast in allen Geweben, besonders im Bindegewebe und auch im Blut fand. Da er diese Zellen mit der Gewebsernährung in Verbindung brachte, nannte er sie Mastzellen. EHRLICH unterschied noch nicht zwischen histiogenen und hämatogenen Mastzellen. Ihr Zellkern ist strukturarm und infolge seines Mangels an Chromatin stets nur schwach gefärbt. Die Granula sind meist regelmäßig geformt, groß, sie wölben oft den Zelleib vor und sind stark basophil. Bei Färbung mit May-Grünwald-Giemsalösung erscheinen sie dunkelviolettblau bis malvenfarbig. Sie sind relativ leicht wasserlöslich, dagegen unlöslich in Alkohol, Äther und anderen Fettlösungsmitteln, sehr beständig gegen Säuren und Basen. Wie alle Zellen der myeloischen Reihe geben auch die Mastleukocyten eine positive Oxydase- und Peroxydasereaktion.

Beim Menschen kommen basophil getüpfelte Leukocyten im normalen Blut nur zu 0,5—1,0% vor. Eine erhebliche Vermehrung bis über 50% kann bei chronischer myeloischer Leukämie auftreten. Bei diesem Krankheitsbild soll auch nach Röntgenbestrahlung ein deutlicher prozentualer Anstieg der basophilen Leukocyten stattfinden.

Über die Herkunft der basophilen Leukocyten wurden zwei Ansichten lange Zeit mit großer Heftigkeit verteidigt. EHRLICH hielt sie für selbständige, aus dem Knochenmark stammende, den eosinophilen und neutrophilen ebenbürtige Leukocyten, die sich aus Myeloblasten über die Stufe der basophilen Myelocyten entwickeln. HEIDENHAIN sah demgegenüber die Basophilen als Degenerationsformen normaler Leukocyten an. Auch PAPPENHEIM und seine Schüler BENACHIO, KARDOS und PRÖSCHER hielten die basophilen Leukocyten für Degenerationsprodukte. Sie sollen nach diesen Autoren aus Lymphocyten im Blut entstehen. So will PRÖSCHER alle Übergänge vom normalen Lymphocyt zum typischen basophilen Leukocyt gesehen haben. Diese Anschauung wurde durch die Untersuchungen von BENACHIO und KARDOS gestützt, die im normalen Knochenmark keine Mastzellen oder Mastmyelocyten fanden. Die von diesen Autoren gefundenen, von ihnen für nicht einwandfrei basophil angesehenen Granulationen wurden für Vorstufen von eosinophilen und neutrophilen Granula gehalten. Demgegenüber sieht GODINI die von PRÖSCHER beschriebenen Übergangsprodukte von Lymphocyt zu basophilen Leukocyt als Kunstprodukte fehlerhafter Technik an.

WEIDENREICH trennte zwei Gruppen von Blutmastzellen:

1. Typus Mensch; ein Typ, der sich auch beim Kaninchen und anderen Tieren findet und aus degenerierten Lymphocyten entstanden sein soll, 2. Typus Meerschweinchen; das sind Mastzellen mit scharf segmentierten Zellkernen, die aus Mastmyelocyten im Knochenmark hervorgehen. Auch PAPPENHEIM unterschied die beiden Typen, bezeichnete jedoch die Mastzellen des Meerschweinchens als „unechte Mastzellen“ und hielt sie für nicht ausgereifte eosinophile oder neutrophile Leukocyten. Die „echten“ Mastleukocyten des Menschen und des Kaninchens sah er als degenerierte Lymphocyten an.

Demgegenüber vertrat MAXIMOW den EHRLICHSEN Standpunkt. Degenerierte Zellen fand er nirgends, wohl aber Mitosen in basophilen Leukocyten,

weshalb er diesen auch den degenerativen Charakter absprach. Den gleichen, heute allgemein als richtig angenommenen Standpunkt vertraten schon RINGEON und DOWNEY.

Die Frage, ob Unterschiede zwischen Blut und Gewebsmastzellen bestehen, wird verschieden beurteilt. Während TÜRK und LEVADITI eine Trennung hämatogener und histiogener Mastzellen ablehnten, werden von vielen anderen wie von NÄGELI und MAXIMOW erhebliche Unterschiede herausgestellt. Wahrscheinlich bestehen gewisse Beziehungen zwischen den Gewebs- und Blutmastzellen, eine Vermutung, die durch die Untersuchungen von ZIMMERMANN erhärtet wird, der feststellte, daß Tiere mit vielen Gewebsmastzellen normalerweise wenig Blutmastzellen besitzen. Umgekehrt findet man bei Tieren mit wenig Gewebsmastzellen relativ hohe Zahlen von Blutmastzellen. Ähnliche Beobachtungen machte GRAHAM.

Schließlich hob HOLMGREN 1937 die gute morphologische Übereinstimmung der Granulationen beider Zellarten hervor.

Über die *Funktion der Mastzellen* ist bisher wenig bekannt. EHRLICH und MAXIMOW glaubten, daß die Gewebsmastzellen bei den Ernährungsverhältnissen des Bindegewebes eine Rolle spielen.

Die basophilen Granula der hämatogenen Mastzellen werden von TÜRK für Stoffwechselprodukte gehalten. RINGEON meint, daß die basophilen Leukocyten als Phagocyten funktionieren und chemotaktisch seien. Er steht damit im Gegensatz zu GRAHAM, der sie für untätig hält. HAUSER will die Gewebsmastzellen an einem Aufbau mucoider Sekretstoffe beteiligt wissen. Da PER HEDENIUS alle metachromatischen Granula der Leukocyten bei akuten Eiterungen verstärkt fand, hielt er sie aktiv an der Toxin-Antitoxinbildung beteiligt. Zur gleichen Zeit stellten HOLMGREN und WILANDER fest, daß die histiogenen Mastzellen-Granula aus Polyestersehfelsäuren bestehen. Da durch die Untersuchungen von JORPES auch das aus Leber gewonnene Heparin als eine Polyestersehfelsäure erkannt wurde, glaubten nun HOLMGREN und WILANDER, daß die Gewebsmastzellen, die sie besonders häufig perivasculär fanden, die Aufgabe hätten, diesen gerinnungsverhindernden Stoff ins Blut abzugeben (Heparinocyten). Sie fanden in Organen, die mikroskopisch die meisten histiogenen Mastzellen enthielten, auch die höchsten Polyestersehfelsäurewerte.

Über die *chemische Zusammensetzung* der Mastzellengranula waren bis zu den Untersuchungen von HOLMGREN und WILANDER die verschiedensten Meinungen geäußert worden. EHRLICH glaubte, daß es sich bei den Granula um Eiweißkörper handle. ARNOLD hielt sie später für glykogenartig, da sie sich schwach mit Carmin färben ließen, was von STÄMMLER bestritten wurde. Allgemein abgelehnt wird die Annahme, daß es sich um Fettkörper handle. Auch für Volutin wurden die Mastzellengranula von einigen Forschern gehalten. (Volutin ist ein zuerst von dem Botaniker A. MEYER bei *Spirillum volutans* entdeckter Stoff der Bakterienzelle, der starke Basophilie und Säurefestigkeit zeigt.) Da man in Volutinkügelchen später Nucleinsäuren nachwies, untersuchte VAN HERWERDEN die basophilen Granula von Gewebs- und Blutmastzellen auf enzymatischem Wege mit einer Nuklease. Er konnte jedoch keine einwandfreien Ergebnisse erzielen. Bereits 1908 hatte WEIDENREICH festgestellt: Bei der Bildung der Granulationen scheint der Kern durch die Abgabe chromatischer Stoffe in das Plasma hervorragend mitbeteiligt. Ebenso meint METROWSKI, daß an dem Austritt von Kernsubstanz in das Protoplasma bei Mastzellen nicht mehr gezweifelt werden könne. PER HEDENIUS wiederum lehnt in neueren Untersuchungen das Vorkommen von Nucleinsäuren in den Granula der Mastleukocyten ab, da Nucleinsäuren keine Metachromasie geben. Da schon EHRLICH auf eine färberische Ähnlichkeit der Granula mit Knorpel hingewiesen hatte, wurde auch die Meinung vertreten, daß

in den Granula Chondroitinschwefelsäure enthalten sei. Histochemisch wollen WERMEL und SASSUCHIN in den basophilen Granula der Gewebsmastzellen Glykoproteide nachgewiesen haben.

W. LAVES konnte auf histoenzymatischem Wege zeigen, daß sich die Granula der Gewebsmastzellen durch Clostridium Welchii Hyaluronidase im Gewebschnitt hydrolysiert lassen, ein Befund, der eine weitere Stütze für die Auffassung von HOLMGREN und WILANDER bildet, da das Enzym Mucoitinschwefelsäureester angreift.

Eigene Untersuchungen.

Die Fixierung der Ausstriche erfolgte wegen der Wasserlöslichkeit der basophilen Granula mit Formolalkohol nach SCHAFFER. Zur Färbung wurde ausschließlich die May-Grünwald-Giemsa-Färbung angewandt. Diese Technik bewährte sich trotz der Bedenken, die MAXIMOW gegen die wasserhaltigen Farblösungen geltend machte. Vorversuche ergaben, daß sich die basophilen Granula auch nach mehrstündigem Aufbewahren der Ausstriche in Wasser gut darstellen ließen.

Untersuchungen am Kaninchenblut.

Im normalen Kaninchenblut kommen basophil granulierte Leukozyten zu etwa 4—6% vor. Es handelt sich zumeist um ziemlich große, fast ausschließlich mononucleäre Zellen mit schwach blaugrau gefärbtem Protoplasma. Die basophilen Granula sind von gleichförmiger Größe, ziemlich grobkörnig und unregelmäßig über den ganzen Zelleib verteilt. Nach PRÖSCHER läßt sich nun beim Kaninchen durch Injektion avirulenter Reinkulturen des Pockenvirus eine Veränderung des Blutbildes im Sinne einer basophilen Leukocytose erzeugen. Einem erwachsenen Kaninchen, welches zunächst 3% basophil granulierte Leukozyten bei 38% Lymphocyten und 59% neutrophilen und pseudoeosinophilen segmentkernigen Leukozyten besaß, wurden 1 cm^3 und am folgenden Tage nochmals $1/2 \text{ cm}^3$ einer avirulenten Reinkultur vom Pockenvirus in die Ohrvene injiziert. Während am darauffolgenden Tag die prozentuale Anzahl der basophilen Leukozyten nur 4% betrug, kam es am 5. Tag nach Versuchsbeginn zu einer basophilen Leukocytose von 15%. Die restlichen weißen Blutkörperchen bestanden jetzt zu 35% aus Lymphocyten und zu 38% aus pseudoeosinophilen und neutrophilen Leukozyten.

Im Stadium dieser Basophilie wurden nun zahlreiche Blutausstriche angefertigt und mit Formolalkohol fixiert. Die Ausstriche wurden für 15, 30, 60 und 90 min in FRÄNKELScher *Gasbrandbacillen-Hyaluronidase* (Fränkeltoxin I und III der Behringwerke) bei einer Temperatur von 36° eingebracht. Nach 15 min dauernder Enzymeinwirkung waren im gefärbten Präparat noch basophil granulierte Leukozyten zu finden, nach 30 min nicht mehr. Die neutrophilen Granula der segmentkernigen Leukozyten waren gleichfalls verdaut, nur die Lymphocyten zeigten sich unverändert. Die Auszählung des Blutbildes ergab jetzt: 40%

Lymphocyten und 60% segmentkernige Leukocyten ohne Granula. Unter den segmentkernigen, ungranulierten Leukocyten fanden sich nach Fränkeltoxineinwirkung 12% Zellen, die nach Größe und Beschaffenheit des Kernes als Blutmastzellen anzusehen waren. Im Gegensatz zu den anderen Leukocyten fanden sich in diesen Zellen helle Vacuolen, die in ihrer Größe den basophilen Granula entsprachen. In Kontrollversuchen, bei denen die fixierten Blutausstriche in Wasser eingebbracht wurden, traten erst nach $2\frac{1}{2}$ Std Auflösungserscheinungen an den basophilen Granulationen auf (Abb. 1a u. b).

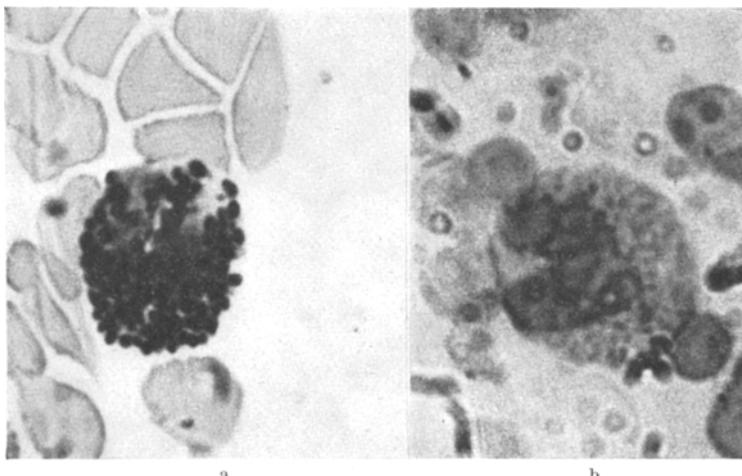


Abb. 1a u. b. Kaninchenblut. Basophilier Leukocyt. a normal; b nach Hydrolyse mit Cl. Welchii Hyaluronidase.

Gleichartige Versuche wurden mit *Testis-Hyaluronidase* angestellt. Die basophilen Granula der Blutmastzellen des Kaninchens zeigten auch nach 2 Std dauernder Verdauung noch keine Veränderungen. Die *neutrophilen Leukocytengranula* dagegen waren bereits nach 30 min vollständig hydrolysiert.

Untersuchungen mit *Ribonuklease* führten zu folgenden Befunden:

Die fixierten Blutausstriche wurden bei einem Temperaturoptimum von 60° 30, 60, 90 und 120 min in die aus Rinderpankreas frisch bereitete Enzymlösung gestellt. An den Zellkernen traten nach 30 min bereits erhebliche Auflockerungen auf, während die basophilen Granula jedoch noch erhalten waren. Nach 60 min zeigten auch diese Ablassung und Entrundung. Nach 90 min während der Verdauung ließ sich in nach MAY-GRÜNWALD-GIEMSA gefärbten Präparaten keine basophile Granulation mehr erkennen, während die Kernfärbung der segmentkernigen Leukocyten weitgehend abgeschwächt, zum Teil fast vollständig aufgehoben war, so daß nur noch ein schwachblauer Protoplasmasaum

resultierte. Es wurden nun von den gleichen Tieren Knochenmarkausstriche hergestellt, deren Behandlung derjenigen der Blutausstriche entsprach. Auch im Knochenmark fand sich eine Vermehrung der basophilen Leukocyten und Mastmyelocyten. Die Hydrolysen ergaben: Die basophilen Leukocyten und Myelocyten wurden durch Fränkeltoxin und Ribonuklease verdaut; Stierhoden-Hyaluronidase war unwirksam. Die neutrophilen Granula waren durch alle Mucopolysaccharasen, jedoch nicht durch Ribonuklease, angreifbar. An den Kernen des Knochenmarkes zeigten sich nach Verdauung mit Ribonuklease nur Veränderungen der Myelocyten und deren Abkömmlingen, nicht aber an den Zellkernen der lymphatischen Reihe (THOMA).

Untersuchungen am Meerschweinchenblut.

Auch am Meerschweinchen läßt sich eine experimentelle basophile Leukocytose erzeugen. Nach dem Vorschlag RINGEONS wurde dabei einem ausgewachsenen männlichen Meerschweinchen, welches bereits im Blut 2% basophile Leukocyten besaß, 1 cm³ artfremdes und zwar menschliches Serum, subcutan unter die Bauchhaut gespritzt. Im Gegensatz zu RINGEON, der nur im Knochenmark nicht aber im peripheren Blut eine basophile Leukocytose beschreibt, konnte bereits nach 2 Tagen auch im Blut ein Ansteigen der Blutmastzellen auf 11% beobachtet werden. Außerdem waren 31% Lymphocyten und 58% neutrophile und pseudoeosinophile Leukocyten zu finden.

Die Blutausstriche wurden mit Formolalkohol nach SCHAFFER fixiert. Nach Behandlung mit *Hodenhyaluronidase* zeigten nur die neutrophilen, nicht aber die basophilen Leukocytengranula Verdauungsscheinungen. Durch *Fränkeltoxin* wurden sowohl *basophile* als auch *neutrophile* Granula verdaut (Abb. 2a—c). Einen vom Kaninchenblut abweichenden Befund ergab die Verdauung mit *Ribonuklease*. Auch nach 2½ stündiger Hydrolyse, als die Kerne schon die stärksten Auflösungsscheinungen aufwiesen, konnte an den Körnchen noch keine Veränderung entdeckt werden. Mit Wasser behandelte Kontrollausstriche des Meerschweinchenblutes zeigten nach 3 Std noch keine Veränderungen.

Die gleichen Ergebnisse waren auch am Knochenmark des Meerschweinchens zu verzeichnen. Die basophile Leukocytose war hier so ausgeprägt, daß sich in jedem Gesichtsfeld mindestens 1, meistens mehrere basophile Leukocyten vorfanden.

Untersuchungen an Menschenblut.

Auf Schwierigkeiten stieß die Untersuchung der Mastzellengranula beim Menschen. Wegen ihrer geringen Zahl im Normalblut und der Seltenheit einer pathologischen Vermehrung mußte das Untersuchungsverfahren geändert werden.

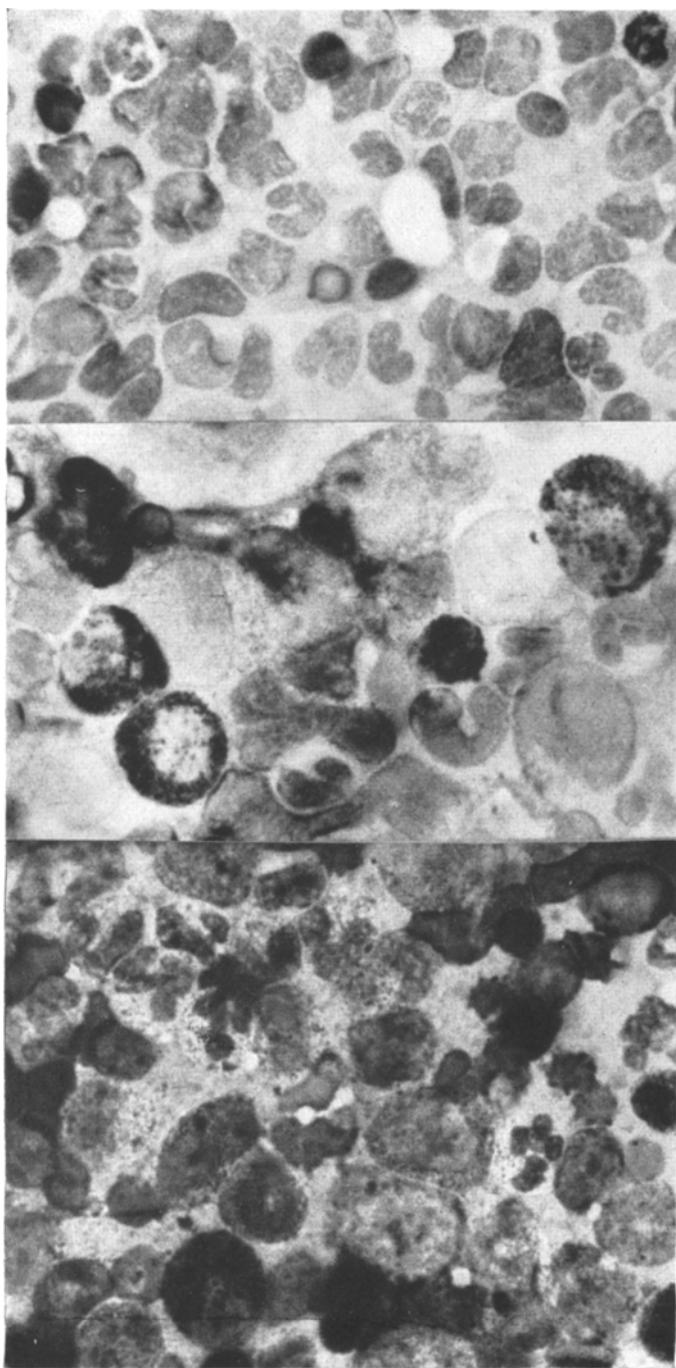


Abb. 2a-c. Knochenmark des Meerschenmarkens. a Normalausstrich; b Ausstrich nach Hydrolase mit Testis-Hyaluronidase. Die neutrophilen Granulationen sind nicht mehr nachweisbar, eosinophile und basophile erhalten; c Ausstrich nach Hydrolase mit Cl. perfringens-Hyaluronidase. An Stelle der Granulationen punktförmige Aufhellungen.

Ausstriche normalen Menschenblutes wurden mit Formolalkohol nach SCHAFFER fixiert und nach MAY-GRÜNWALD-GIEMSA gefärbt. Im Mikroskop wurde dann ein basophiler Leukocyt eingestellt und der Objektträger auf dem Objekttrichter befestigt. Es folgte eine kurze Entfärbung mit Salzsäure-Alkohol, Nachspülen mit Aqua destillata, Überschichten des Objektträgers mit Fermentlösung und Einstellen des Mikroskopes in den Thermostat. Es kamen die gleichen Enzyme zur Anwendung, wie bei den oben geschilderten Versuchen. Die basophilen Granula wurden durch Stierhoden-Hyaluronidase nicht angegriffen.

Wirksam waren jedoch Clostridium Welchii- und Perfringens-Mukopolysaccharasen, durch welche vor allem die basophilen, aber auch die neutrophilen Granula hydrolysiert wurden. Diese verhielten sich jedoch der Ribonuklease gegenüber noch zu einem Zeitpunkt resistent, als an den Kernen bereits deutliche Auflockerungen eingetreten waren.

II. Die eosinophilen Leukocyten.

Die eosinophilen Leukocyten kommen im normalen Blut bis zu 4% der weißen Blutkörperchen vor. Sie entstehen nach der heutigen Auffassung als Zellen des myeloischen Gewebes im Knochenmark, eine Ansicht, die durch Auffindung von Mitosen und Übergangsformen von Myelocyten zu polymorphkernigen Leukocyten begründet ist. Auffallend ist, daß die Eosinophilen nur zwei Kernsegmente besitzen, die Neutrophilen dagegen drei oder vier. Im Verein mit der Tatsache, daß sich im Protoplasma der Eosinophilen eine viel größere Körnchenmasse als in dem der Neutrophilen befindet, kommt KOMOCKI zu der Auffassung, daß bei der ersten Zellart Kernsubstanzen zur Bildung der Granula gebraucht werden. Ja, die eosinophilen Zellen sollen zerfallen, wenn der Kern infolge Bildung der Körnchen erschöpft ist.

Über die Funktion der eosinophilen Leukocyten ist nur wenig bekannt. WEIDENREICH hat bekanntlich die These verfochten, daß die eosinophile Granulation ein Umwandlungsprodukt des Hämoglobins sei. Auch KLEIN und SALTIKOW schlossen aus dem reichlichen Vorhandensein von eosinophilen Zellen in Blutzerfallsherden auf eine hämoglobinogene Natur der Granula. Ihrer Meinung nach phagocytieren die neutrophilen Granulocyten das aus den zerfallenden Erythrocyten freiwerdende Hämoglobin und werden dadurch zu eosinophilen Leukocyten. NEUMANN vermutet, daß die eosinophilen Granula in vivo wohl wichtige Speicherfunktionen zu erfüllen hätten, etwa beim Zu- und Abtransport von Eiweißkörpern und auch anderen Stoffen. Schließlich fand ihre Fähigkeit, CHARCOT-LEYDENSche Krystalle zu bilden, besondere Beachtung, da sie auf eine sezernierende Tätigkeit hinweist.

Über die chemische Natur der eosinophilen Granulation liegen zahlreiche Arbeiten vor, ja sie ist wohl die bisher bestuntersuchte Granulation. Das ist dem Umstand zu verdanken, daß ihre Isolierung verhältnismäßig leicht gelingt. Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß die Untersuchungen vor allem an Pferdeblut-Eosinophilen ausgeführt wurden. Es muß in Betracht gezogen werden, daß aber im chemischen Bau der eosinophilen Granulasubstanz wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tierarten bestehen, so daß die am Pferdeblut erhobenen Befunde nur mit äußerster Vorsicht in Vergleich zu denen menschlichen Blutes gesetzt werden können. Nach NEUMANN ist das Substrat

der eosinophilen Granula ein sehr komplizierter Körper, der aus folgenden Anteilen zusammengesetzt sein soll:

- a) Ein spezifischer nicht mit Hämoglobin identischer Farbstoff, der durch gründliche Wässerung des Ausgangsmaterials entfernt werden kann.
- b) Ein stickstoffhaltiger Anteil; der höchstwahrscheinlich eiweißartiger Natur ist. Der Stickstoffgehalt betrug sowohl nach PETRY als nach NEUMANN bis zu 14%, war allerdings starken Schwankungen unterworfen. Als Abbauprodukte wurden Tyrosin und Leucin gefunden.
- c) Ein Lipoid, welches einen beträchtlichen Teil des eosinophilen Granulums beansprucht.
- d) Schließlich wird von NEUMANN noch ein wechselnder Eisengehalt und auch eine gewisse Menge Hämoglobin postuliert.

Aus der Vielfalt der Untersuchungsergebnisse anderer Autoren, die in der Hauptsache an menschlichem Blut gewonnen wurden, sei folgendes noch in Kürze erwähnt:

EHRLICH lehnte den Eiweißcharakter der eosinophilen Granula ab. WEISS hielt die Körnchen dagegen für Eiweißkörper bestimmter Zusammensetzung. Er erhielt durch Vanillin-Schwefelsäure-Ferrisulfat eine violettblaue Färbung, die entsprechend der REICHL-MIKOSCHSchen Reaktion auf aromatische Aldehydkörper hinweist. Auch BERG und BRUNSWIK sahen durch die Ninhydrinreaktion die Anwesenheit von Eiweiß bestätigt. BLUMENTHAL und ROMIEU vermuten Vitellincharakter.

Besonders umfangreich ist die Literatur über den Fettgehalt der eosinophilen Granula. Das Lipoid ist mit den gebräuchlichen Farbstoffen nur unter besonderen Bedingungen darstellbar, es liegt in den Granulis vermutlich als Lipoproteid vor. SCHWARZ lässt zwei Möglichkeiten offen: Entweder führen die Zellen neben der eosinophilen Granulation Fetttropfen, oder die eosinophile Granulation kann unter Umständen Fettreaktion zeigen. Nach COMESSATI und ARNOLD ist das Fett entweder phagocytiert oder durch einen degenerativen Prozeß in der Zelle selbst entstanden. Während mit den üblichen Fettfärbemethoden sehr stark voneinander abweichende Resultate erzielt wurden, gelingt heute mit einer von GOLDMANN ausgearbeiteten Färbung der Lipoidnachweis regelmäßig. Auch GOLDMANN ist der Ansicht, daß es sich bei den eosinophilen Granula um einen Eiweiß-Lipoidkomplex handelt.

Außer Eiweiß und Fett sollen nach verschiedenen Autoren auch Kohlenhydrate am Aufbau der granulären Substanz beteiligt sein. So beobachtete bereits EHRLICH, daß sich nach Verwendung von Joddämpfen bestimmte granuläre Zellteile bräunen, wie es beim Glykogen der Fall ist. Da die Jodreaktion sowohl an das Protoplasma als an die Granula gebunden auftreten kann, so wird das Glykogenvorkommen in eosinophilen oder auch basophilen Leukocyten verschieden beurteilt. Seit ROMIEU wissen wir, daß auch die Lecithine eine positive Jodreaktion geben, so daß über den Kohlenhydratkomplex der Leukocyten nur sehr wenig Sichereres bekannt ist.

Ohne das Thema erschöpfend behandelt zu haben, ist aus der gegebenen Zusammenfassung wohl zu ersehen, daß die chemische Zusammensetzung der eosinophilen Leukocytengranulation besonders des menschlichen Blutes noch nicht völlig geklärt ist.

Eigene Untersuchungen.

Die eosinophilen Granula wurden an Sternalpunktaten ganz frischer Leichen studiert. Die prozentuale Verteilung der Blutzellen im Knochenmarkausstrich entsprach im allgemeinen derjenigen intravital gewonnener

Punktate. Der höhere Anteil eosinophiler Zellen — besonders ihrer Jugendformen — beruhte auf agonaler Ausschwemmung. Ferner benützten wir klinisches Material von Eosinophilien. Die Ausstriche wurden mit Äthylalkohol fixiert und nach MAY-GRÜNWALD-GIEMSA oder mit Eosin-Methylenblau gefärbt.

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, daß die eosinophile Granulation von den bisher angewandten Enzymen nicht angegriffen wurde. Es konnte sich also nicht um Polysaccharide bzw. Ribonukleotide handeln, wobei allerdings noch geprüft werden mußte, ob die genannten Substanzen nicht in geringerer Konzentration am Aufbau der Granula beteiligt sind (Abb. 3).

Wir gingen bei der enzymatischen Analyse dieser Granula von der Lage ihrer Umladebereiche aus. Färbt man Ausstriche nach MOMMSEN mit gepufferten Giemsalösungen, so läßt sich feststellen, daß ihr Umladebereich etwa bei p_{H} 11 liegt. Es handelt sich also um eine stark basische Substanz. Kam ein Eiweißkörper in Frage, so war die Annahme naheliegend, daß ein *Histon* vorliegen könnte, ein Proteid, das bekanntlich durch seinen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren, vor allem Arginin und Lysin, gekennzeichnet ist. Nach W. PAULI liegt der Umladebereich der Diaminodicarbonsäure Arginin bei p_{H} 9, der des Lysins bei p_{H} 9,9.

Zum Nachweis wurde *Arginase* benutzt. Die enzymatische Hydrolyse mit dem verdünnten Glycerinextrakt erfolgte 40 min bis zu 48 Std lang. Bei Verwendung des Leberextraktes zeigten sich die ersten Veränderungen an den eosinophilen Granula etwa nach 45 min. Die Körnelung war zwar fast durchwegs noch erhalten, jedoch ergab die Eosin-Methylenblaufärbung nicht mehr das leuchtende Rot, sondern mehr eine violette Farbtönung. Auch war die Zahl der Granula bereits geringgradig vermindert, das Protoplasma nicht mehr so dicht gekörnt, wie im Normalpräparat. Auffallend war, daß diese Befunde vor allem an den reifen Zellen hervortraten, während die Jugendformen ihren Farbcharakter beibehielten. Längere Enzymwirkung ließ die Unterschiede deutlicher werden. Nach 1—2 Std war eine völlige Umkehr des Ladungscharakters und der Farbbindung im Sinne einer Basophilie erreicht. Ein beträchtlicher Teil der Granula war also in Lösung gegangen,

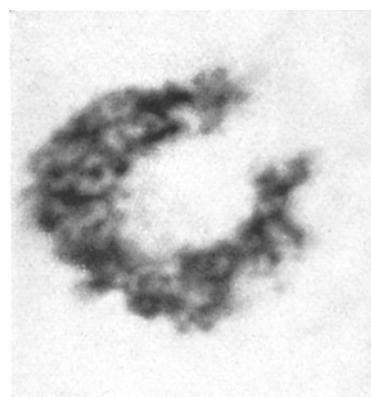


Abb. 3. Menschliches Blut. Ausstrichpräparat. Eosinophile Granulation nach Verdauung mit Trypsin elektiv erhalten.

der Rest adsorbierte basische Farbstoffe. Die jugendlichen eosinophilen Zellen wiesen nunmehr entsprechende Veränderungen auf, doch waren sie bei weitem nicht in dem Maße ausgeprägt wie an den ausgereiften Formen. Nach 6stündiger Verdauung war schließlich der optimale Wirkungseffekt erreicht. Selbst bei genauem Durchmustern der Blutpräparate konnte kein Eosinophiler mehr gefunden werden. Trotzdem ließen sich die Ausstriche noch gut differenzieren. Die Zellkerne wiesen zum Teil Verdauungsscheinungen auf, Plasma und Kern außerdem eine abgeschwächte Farbadsorption. Eosinophile Zellen waren lediglich an der Plasmaanordnung bzw. an der geringen Segmentzahl der Kerne zu diagnostizieren. Das Bild änderte sich auch nach 24stündiger und längerer Hydrolyse nicht weiter.

Orientierende Versuche mit Nieren- und Milzextrakten ergaben, daß die Wirksamkeit des Nieren- der der Leberextrakte entsprach. Das Milzenzym war dagegen weitaus weniger wirksam. Selbst nach 30stündiger Verdauung waren unveränderte eosinophile Granula noch nachweisbar.

Versuche mit gereinigter Arginase erbrachten keine neuen Gesichtspunkte. Hervorzuheben ist lediglich, daß auch die Granulationen der jugendlichen eosinophilen Zelltypen in gleicher Weise der Auflösung unterlagen, wie die der reifen Formen. Wir sahen also auch bei eosinophilen Promyelocyten und Myelocyten den Wechsel von Eosin- zu Methylenblauadsorption, die dauernde Verminderung der Zahl der Körnchen und letzten Endes die völlige Auflösung der granulären Substanz. Der einzige Unterschied gegenüber den Glycerinextrakten bestand im gleichzeitigen Ablauf der Verdauungsvorgänge an reifen Eosinophilen und ihren Vorstufen.

PETRY und NEUMANN hatten Untersuchungen an den eosinophilen Granula des Pferdeblutes durchgeführt. Auch wir glaubten, die Ergebnisse an Pferdeblutausstrichen weiter ergänzen zu können. Weder durch Glycerinextrakte noch durch gereinigte Arginase ließen sich jedoch trotz 48stündiger Hydrolyse Veränderungen der Granula hervorrufen. Daraus ergibt sich, daß offenbar auch diese Granula bei einzelnen Tierklassen durchaus nicht durch die gleiche Zusammensetzung gekennzeichnet sind.

III. Die neutrophilen Leukozyten.

Rund 70 % der weißen Blutkörperchen sind neutrophil. Die Entwicklungsreihe führt von den ungekörnten Myeloblasten über Promyelocyten zu den Stab- und Segmentkernigen des strömenden Blutes. Das charakteristische Merkmal dieser Gruppe ist die reichliche neutrophile Granulation in mehr oder weniger oxyphilem Protoplasma. Das Vorhandensein der Körnelung in lebenden zirkulierenden Zellen wird von verschiedenen Autoren überhaupt geleugnet. So behauptet DE MOULIN, die typische Granulation sei nichts anderes als ein Kogulationsprodukt, das erst beim Absterben der Zelle durch mechanische Reize

entstehe. Seitdem die Körnelung im Dunkelfeld in der lebenden Zelle sichtbar gemacht werden konnte, kann an ihrem präformierten Zustande nicht mehr gezweifelt werden.

Über die *Funktion* der neutrophilen Granulation ist wenig bekannt. Die Granula werden entweder als Sekretions- oder Degenerationsprodukte gedeutet. Ungewiß ist auch, ob die Oxydase- und Peroxydasereaktion an die granuläre Substanz gebunden ist.

Auch hinsichtlich der *chemischen Zusammensetzung* gibt es nur wenige hypothetische Feststellungen. Nach DECASTELLO-KRUKOFF entsteht die Körnelung aus karyogenen Fasern, die durch das Protoplasma schließlich abgeschnürt werden. Auch PAPPENHEIM beobachtete Sprossungen, die vom Chromatin aus in das Protoplasma ziehen und deren Verbindung mit dem Kern schließlich erlischt. Er folgert demgemäß, daß protoplasmatische Granulationen aus sich vom Kern loslösenden Stückchen Kernsubstanz, oder auch infolge Fragmentierung der Kernteile entstehen. Der negative Ausfall der FEULGENSCHEN Nucleareaktion wird mit zu geringer Konzentration der Nucleinstoffe im Granulum erklärt.

In ganz andere Richtung weisen die Untersuchungen KUTSCHERENKOS, der mit Thionin zuweilen eine metachromatische Färbung der Granulation beobachtete, die er für glykogenbedingt ansah. PER HEDENIUS hat ferner, ausgehend von der Feststellung LISONS, daß metachromatische Färbung eine spezifische Eigenschaft der Schwefelsäureester von Polysacchariden bilde, eine Vitalfärbungsmethode zum Nachweis metachromatischer Granula mitgeteilt. Er erhielt beim Bebrüten frisch entnommenen Zitratblutes mit Toluidinblau stets eine Metachromasie der neutrophilen Granulation. HEDENIUS legte sich weder auf eine bestimmte biologische Bedeutung der Körnchen fest, noch behauptete er ihre Identität mit Heparin. Er ließ vielmehr die Möglichkeit offen, daß die Granula neben dem Polysaccharidanteil Eiweiß und Fette enthalten können. Lipoide wurden inzwischen von GOLDMANN nachgewiesen.

Eigene Untersuchungen.

Die Technik der enzymatischen Hydrolyse entsprach dem für die basophilen Zellen angegebenen Vorgang. Als Untersuchungsmaterial dienten vornehmlich normale Blutausstriche, Sternalpunktate gesunder Personen, ferner solche von leukämischen Patienten. Fixierung mit Äthylalkohol, Färbung nach MAY-GRÜNWALD-GIEMSA. Bei einzelnen Präparaten erfolgte Hitzefixation und Färbung mit EHRLICHs Triazidgemisch. Außerdem wurde die Peroxydasereaktion an unverdauten und enzymbehandelten Präparaten vorgenommen. Es wurde mit orientierenden Versuchen mit Pepsin und Trypsin begonnen. Die Granula erwiesen sich Pepsin gegenüber als ziemlich resistent. Nach 30—45 min während der Verdauung waren sie meist noch darstellbar. Trypsin dagegen zerstörte Kernsubstanzen, Plasma und Granulation nach kurzer Einwirkungsdauer. Die Schichtseite des Objektträgers war nach Trypsinverdauung gleichsam abgewaschen; erhalten blieb lediglich die eosinophile Granulation (s. Abb. 3). Es wäre verfehlt, wollte man aus dem Erfolg der Pepsin- und Trypsinwirkung Schlüsse auf die neutrophile Granulation ableiten. Sowohl der Zellkern als das Zellplasma

enthalten Eiweißkörper, welche durch beide Fermente abgebaut werden können. Die durch die Hydrolyse der Proteine bedingte Auflockerung des Zellkomplexes läßt daran denken, daß auch Substanzen aus dem Zellverband gelöst werden, die in keiner Beziehung zur eigentlichen Fermentwirkung stehen. Außerdem war die Empfindlichkeit der Substrate gegenüber der alkalischen Reaktion der Enzymlösungen zu berücksichtigen. Hervorzuheben bleibt immerhin die nicht unbeträchtliche Resistenz der neutrophilen Körnelung gegenüber Pepsin.

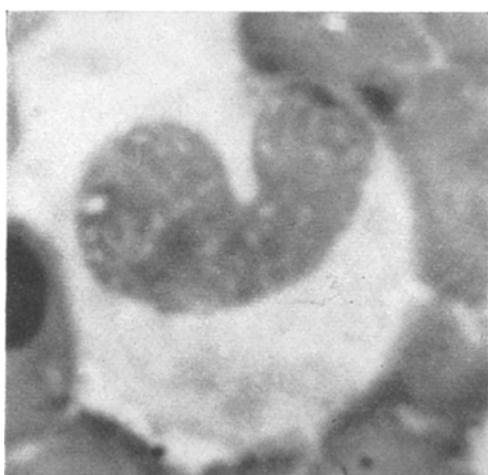


Abb. 4. Neutrophiler Leukocyt des menschlichen Blutes nach Hydrolyse mit Testis-Hyaluronidase. Granulation völlig hydrolysiert.

keine Anfärbung der neutrophilen Granulation mehr. Zum gleichen Ergebnis führten Untersuchungen mit den Fränkel-Kulturfiltraten. Analoge Befunde ergaben sich an Kaninchen- und Meerschweinchenblut. Die neutrophilen Granula des peripheren Blutes verhielten sich ebenso wie diejenigen ihrer Knochenmarksvorstufen (Abb. 4).

Die Verdauung mit *Ribonuklease* erschien aus dem Grunde wichtig, weil von verschiedenen Autoren der Übertritt chromatischer Stoffe in das Protoplasma postuliert worden war. Da sowohl in den Kernchromatinen als im Plasma der Blutzellen Ribonucleinsäuren vorkommen, bestand die Möglichkeit, daß auch die neutrophile granuläre Substanz Ribonukleotidcharakter besitzt. Diese Annahme fand jedoch durch die Versuche *keine* Bestätigung. Es muß zwar zugegeben werden, daß die Körnelung bei längerer Fermentwirkung aufgelöst wird, eine Erscheinung, die jedoch nur im Vergleich mit den am Kern und Plasma stattfindenden Veränderungen beurteilt werden darf. Es zeigte sich nämlich, daß die neutrophilen Granula erst zu dem Zeitpunkt keinen

Da die übrigen Enzyme, insbesondere Hyaluronidasen, die Zellstruktur selbst nach langer Einwirkung nicht angreifen, konnte man die in Erscheinung tretenden Veränderungen an den Granulis als spezifische Fermentwirkungen werten. Unter diesem Gesichtspunkt war der enzymatischen Hydrolyse mit den verschiedenen *Hyaluronidasen* erhöhte Bedeutung beizumessen. Bereits nach 30 min langer Hydrolyse mit Testis-Hyaluronidase erfolgte

Farbstoff mehr adsorbierten, als sich an Kern und Plasma eine deutlich abgeschwächte Basophilie bzw. bereits Auflöseerscheinungen im Sinne des „Brachet-Testes“ bemerkbar machten. Man kann von so labilen Gebilden wie den neutrophilen Körnchen kaum erwarten, daß sie der Einwirkung eines starken Enzyms bei einer Temperatur von 60° C längere Zeit ausgesetzt werden können, ohne Veränderungen zu erleiden.

Wesentlich erscheint noch das Verhalten der Peroxydasereaktion. Der charakteristische Farbniederschlag an den neutrophilen Körnchen trat nach Behandlung mit den *Hyaluronidasen* nicht ein, während die Reaktion mit den genannten Fermenten an den eosinophilen Granulis auch nach der enzymatischen Hydrolyse positiv ausfiel. Ebenso gaben in Wasser eingestellte Kontrollpräparate durchwegs die Reaktion.

Tabelle 3 möge in schematischer Weise die beobachteten Enzymwirkungen erläutern.

Tabelle 3. *Wirkung verschiedener Fermente auf die Granula der Leukocyten.*

Enzym	Granula		
	neutro- phile	eosino- phile	basophile
Pepsin	—	—	+
Trypsin	+	—	+
Testis-Hyaluronidase .	+	—	—
Cl. perfringens-Hyal- uronidase	+	—	+
Cl. Welchii-Hyaluro- nidase	+	—	+
Ribonuklease	—	—	(+?)
Arginase	—	+	—

Ergebnisse.

In den Untersuchungen hatte sich zeigen lassen, daß die *basophilen* Granula von Mensch, Meerschweinchen und Kaninchen durch Mukopolysaccharasen des *Clostridium perfringens* und *Welchii*, nicht aber durch Testis-Hyaluronidase hydrolysiert werden. Es ist daher anzunehmen, daß diese Granula einen *Polyschwefelsäureester* der *Hyaluronsäure* vom Typ einer *polymeren Mukotinschwefelsäure* enthalten.

Die Annahme HAHNS, Perfringens-Hyaluronidase würde die *Mucotinschwefelsäure* nicht angreifen, scheint zunächst zu unseren Befunden in Widerspruch zu stehen. Wahrscheinlich ist es aber von ausschlaggebender Bedeutung, ob die Mucoproteide in monomerer oder polymerer Form vorliegen. *Mucotin*- und *Chondroitinschwefelsäure* sind aber in ihrer monomeren Form *Oligosaccharide*.

In den Gewebsmastzellen hatten nun schon HOLMGREN und WILANDER, sowie W. LAVES *Mucotinpolyschwefelsäure* nachgewiesen. Da das *Heparin* gleichfalls eine derartige Verbindung darstellt, wurden die Gewebsmastzellen von HOLMGREN und WILANDER als *Heparinozyten* bezeichnet und als Bildungsstätten dieses physiologischen Antikoagulans angesehen. Obgleich unsere Befunde den Schluß nicht zu lassen, daß die *basophilen* Granula mit *Heparin* identisch sind, so

sprechen doch folgende von THOMA und WIERCINSKY mitgeteilten Versuche dafür, daß sie einen, die *Blutgerinnung verzögernden Körper* enthalten.

Extrakte aus Meerschweinchenknochenmark im Stadium der basophilen Leukocytose nach Injektion artfremden Serums verlängern im Quick-Test die Gerinnungszeit menschlichen Blutes proportional der Zahl der Basophilen im Ausgangsmaterial um 20—100%. Knochenmarkextrakte von Tieren ohne Basophile haben auf die Blutgerinnung keinen Einfluß.

Eine krankhafte Vermehrung dieser Granulocyten könnte mithin für eine besondere Blutungsbereitschaft durch Verzögerung der Blutgerinnung von Einfluß sein.

STREBEL und STEIGER haben nun den Fall eines Patienten beschrieben, der nach Entfernung einer Oberlidcyste heftige postoperative Blutungen bekam. Die Blutuntersuchung ergab eine Basophilie von 25%, allerdings wurden weder Thrombocytenzahlen, noch die Blutungs- bzw. Blutgerinnungszeiten angegeben, so daß die Ursache der starken Nachblutung nicht als völlig geklärt angesehen werden kann.

Bei Leukämien ist das Auftreten von heftigen Blutungen als eines der häufigsten Frühsymptome bekannt. Ob die bei jeder leukämischen Myelose auftretende Vermehrung der basophilen Leukocyten das Auftreten dieser Blutungen begünstigt, bleibe dahingestellt, da ja hier auch die Entwicklung der Thrombocyten geschädigt sein kann.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit den mucolytischen Enzymen führten die Untersuchungen mit Ribonuklease nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Während an den basophilen Granula von Mensch und Meerschweinchen auch nach längerer Enzymwirkung keine Veränderungen auftraten, zeigten die Granulationen des Kaninchenblutes eine gewisse Labilität. Es ist daher nicht auszuschließen, daß sie neben dem Polyschwefelsäureester auch Ribonucleinsäuren enthalten. Das gleiche dürfte auch für die basophilen Granula anderer Tierarten zutreffen. Die Konzentration ist aber offenbar zu gering, daß sich ihre Herauslösung durch die enzymatische Hydrolyse im Farbbild morphologisch nicht bemerkbar macht.

Die Versuche an der *neutrophilen Granulation* hatten zu dem Ergebnis geführt, daß sie nicht nur von der Fränkelbacillen-, sondern auch von der Stierhoden-Hyaluronidase angegriffen wird. Hodenhyaluronidase hydrolysiert Hyaluron- und Chondroitinschweifelsäure, nicht aber die Ester der Hyaluronsäure. Ganz abgesehen davon, daß die Wirkung der Hodenhyaluronidase sehr stark von der Reinheit des Enzyms abhängt, spielt sicher auch der Polymerisations- bzw. Veresterungsgrad des Substrates eine bedeutsame Rolle. Hochgereinigte Präparate besitzen eine gesteigerte depolymerisierende Aktivität. In unseren

Untersuchungen wurde aber ein verhältnismäßig ungereinigtes Präparat verwendet. Die rasche Wirkung desselben auf die neutrophilen Granula dürfte daher jedenfalls einem niedriger veresterten Polysaccharid, als in den basophilen Granula vorliegt, entsprechen.

Unsere Vermutung geht dahin, daß die neutrophilen Granula wahrscheinlich einen Schwefelsäureester der Hyaluronsäure enthalten. Hierfür läßt sich die Beobachtung von MEYER und CHAFFEE anführen, nach welcher sich nicht die Hyaluronsäure, wohl aber deren Schwefelsäureester mit Toluidinblau färben. Auch ist die Metachromasie der Neutrophilen schwächer als die der Basophilen.

Über die Aufgaben und das Schicksal der neutrophilen Granulation lassen sich vorläufig nur Vermutungen aussprechen. Bekanntlich finden sich im Plasma eine Reihe von Glykoproteiden, z. B. das Seroglykoid, das Haptoglobin, das Seromucoid, ferner ein krystallisierbares Mucoproteid (nach BADER und Mitarbeitern). Nach BLIX enthält das Seromucoid eine neutrale Polysaccharidkomponente. Als Bestandteil derselben wurde Glucosamin festgestellt. NILSSON sowie WEST fanden den Serumgehalt an Hexosamin bei febrilen Zuständen erhöht. Auch in den Fraktionen der Globuline sind kleine Mengen an Kohlenhydraten enthalten. Der Gesamtgehalt des Blutplasmas enthält etwa 0,18—0,26 % Kohlenhydrate, die an Euglobulin gebunden sind. Der eine von uns (W. LAVES) hat daher die Hypothese geäußert, daß die Granula der Neutrophilen und wahrscheinlich auch der Basophilen beim Zerfall der weißen Blutkörperchen in das Blutplasma übertragen und nach Lösung seinen Glykoproteidspiegel beeinflusse.

Für das Verhalten der neutrophilen Granulation unter pathologischen Bedingungen kommt einer Beobachtung von MÖLLENDORFF Bedeutung zu. Er fand eine Abnahme der Spezialgranula der Neutrophilen in Entzündungsherden. Aus den Arbeiten DURAN-REYNALS und McCLEAN wissen wir, daß eine große Anzahl pathogener Bakterien zur Mucopolysaccharasenbildung befähigt sind. Man nimmt an, daß die Hyaluronidase den Bakterien das Eindringen in das Gewebe und ihre Verteilung durch Hydrolyse der Hyaluronsäure des Bindegewebes im Körper erleichtert (Spreading effect). In Entzündungsherden, also an Sammelstätten polymorphkerniger Leukocyten, scheint nun auch die Polysaccharidsäure, die der neutrophilen granulären Substanz zugrunde liegt, intracellulär abgebaut zu werden, ein Vorgang, der sich auch *in vitro* reproduzieren läßt. Diese Erscheinung sei als weitere Stütze für den Hyaluronsäurecharakter der neutrophilen Granulation angeführt.

Die Hydrolyse der *eosinophilen Granula* durch Arginase spricht dafür, daß Histone einen wesentlichen Bestandteil derselben bilden. Histone nehmen eine Übergangsstufe zwischen den Protaminen und

den hochmolekularen Eiweißkörpern ein. Sie finden sich mit den Nucleinsäuren salzartig in den Zellkernen verbunden. In diesem Zusammenhang erscheint der Befund (THOMA) von Wichtigkeit zu sein, daß die Kerne der eosinophilen Leukozyten eine erhöhte Resistenz gegenüber Ribonuklease aufweisen. Im Verein mit der Tatsache, daß die eosinophilen Zellen meist nur aus zwei Kernsegmenten bestehen, wird die Annahme naheliegend, daß sie zur Bildung der Granula Kernsubstanz verbrauchen. Eine ähnliche Ansicht vertritt auch KOMOCKI. Wie oben beschrieben, zeigte es sich nun, daß die Granula nach Verdauung mit Arginase eine Umkehr ihres Ladungscharakters aufwiesen, wodurch ein Restsubstrat von elektronegativem Charakter in Erscheinung trat. Offenbar handelt es sich hierbei um Nucleinsäurebestandteile, die mit dem Histon verbunden sind. Die Acidophilie der eosinophilen Granula beruht also auf einem starken Überwiegen der basischen Histone. In guter Übereinstimmung damit würde die Feststellung von NEUMANN und PETRI stehen, die Leucin und Tyrosin in den Granulationen nachwiesen, Aminosäuren, die auch im Thymushiston gefunden worden sind.

Abschließend sei noch kurz auf das Verhalten der Oxydasen und Peroxydasen eingegangen. Bekanntlich ist es noch nicht völlig geklärt, ob diese Fermente im Plasma oder in den Granulationen lokalisiert sind. Wir fanden nun, daß der enzymatische Abbau der Granula mit dem Verschwinden der Oxydaseraktionen einhergeht. Ferner ergab sich, daß z. B. nach Hydrolyse mit Testishyaluronidase zwar die neutrophilen Granula und die von ihnen normalerweise gegebene Oxydaseraktion verschwand, daß sie aber an den nicht angegriffenen eosinophilen Granula erhalten blieb, Befunde, die für die granulagebundene Lokalisation dieser Häminfermente sprechen. Schließlich zeigten auch die Unterschiede in der enzymatischen Angreifbarkeit der Granula des menschlichen und des Blutes verschiedener Tieren, daß an Tiermaterial erhobene Befunde nur unter Vorbehalt auf menschliche Blutzellen übertragen werden dürfen.

Zusammenfassung.

Die mitgeteilten Untersuchungen sollten unter Anwendung histoenzymatischer Verfahren Beiträge zur Kenntnis der chemischen Bestandteile der Leukocytengranulationen liefern. Bei vorsichtiger Auswertung der Befunde können folgende Ergebnisse hervorgehoben werden:

1. Die Anwendung von Enzymen ermöglicht es, charakteristische Unterschiede zwischen den Granulationen aufzudecken. So wurde gefunden, daß die basophile Körnelung auf der Anwesenheit einer hochmolekularen Polysaccharidsäure vom Typus einer hochveresterten Mucoitinschwefelsäure beruht, der zum mindesten heparinähnliche

Eigenschaften zukommen. Die neutrophile Granulation enthält wahrscheinlich einen Hyaluronsäureester, während in den eosinophilen Granula die Anwesenheit eines Histonkörpers erwiesen werden konnte.

2. Es wurde weiterhin gefunden, daß die Granulationen der weißen Blutkörperchen von Tierart zu Tierart verschiedene Zusammensetzung aufweisen. So unterscheiden sich die basophilen Granula der Menschen von jenen des Kaninchens, die eosinophilen von denjenigen des Pferdes. Diese Befunde sind bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener Gattungen zu berücksichtigen.

3. Die Frage der Lokalisation von Oxydasen und Peroxydasen konnte dahin geklärt werden, daß diese Fermente Bestandteile der granulären Substanzen bilden.

Wir danken Herrn Professor Dr. H. SCHMIDT (Behringwerke, Marburg), für die uns liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellten Kulturfiltrate.

Literatur.

- ABDERHALDEN u. RONA: *Z. physiol. Chem.* **41**, 278 (1904). — BADER, SCHUTZ and STRACHEY: *Nature (Lond.)* **154**, 183 (1944). — BÄMAN-MYRBÄCK: Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941. — BARFURTH, D.: *Arch. mikrosk. Anat.* **25**, 305 (1885). — BERG, W.: *Pflügers Arch.* **195**, 543 (1922); **199**, 656 (1922). — BETHE, A.: *Biochem. Z.* **127**, 18 (1922). — BLIX: *Acta physiol. scand. (Stockh.)* **1**, 29 (1940). — BRACHET, J.: *Archives de Biol.* **53**, 207 (1942). — CARMINATI, V.: *Haematologica* **11**, 349 (1930). — CIACCIO, C.: *Zbl. Path.* **24**, 49 (1913). — CLAUDE, A., and F. DURAN-REYNALS: *J. of exper. Med.* **60**, 457 (1934). — DURAN-REYNALS, F.: *Ann. Inst. Pasteur* **57**, 597 (1936). — *J. of exper. Med.* **69**, 69 (1939). — EDLBACHER, S.: *Z. physiol. Chem.* **108**, 287 (1920). — EHRLICH, P.: *Arch. Anat. u. Physiol.*, Phys. Abt. **3**, 166 (1879). — *Z. klin. Med.* **1**, 533 (1880). — EULER, H. v.: *Chemie der Enzyme*, 3. Aufl. München 1927. — *Dtsch. med. Wschr.* **1948**, 266. — FLEISCHHACKER, H.: *Klinische Hämatologie*. Wien 1948. — GODINA, G.: *Haematologica* **24**, 847 (1942); **25**, 329 (1943). — GOLDMANN, J.: *Zbl. Bakter.* **112**, 445 (1929). *Virchows Arch.* **290**, 718 (1933). — HAHN, L.: *Biochem. Z.* **115**, 83 (1943); 318, 123 (1947). — HEDENIUS, PER.: *Acta med. scand. (Stockh.) Suppl.* **109**, 1 (1940). — VAN HERWERDEN, M. A.: *Arch. Zellforschg* **10**, 431 (1913). — *Anat. Anz.* **47**, 312 (1914). — HIRSCHFELD, H., u. A. HITTMAIR: *Klin. Wschr.* **1923**, 2173. — HOLMGREN, H.: *Z. Mikrosk.* **55**, 419 (1938). — *Anat. Anz.* **88**, 246 (1939). — HOLMGREN, H., u. O. WILANDER: *Z. mikrosk. anat. Forschg* **42**, 242 (1937). — HOWELL, W.: *Amer. J. Physiol.* **47**, 328 (1918). — JORPES, L.: *Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.)* **80**, 202 (1938). — JORPES, HOLMGREN u. WILANDER: *Z. mikrosk. anat. Forschg* **42**, 279 (1937). — KARDOS, E.: *Fol. haemat. (Lpz.)* **12**, 39 (1912). — KLEWITZ, F., u. E. KRIEGER: *Klin. Wschr.* **1923**, 1366. — KOMOCKI, W.: *Virchows Arch.* **248**, 21 (1924). — LANDOIS-ROSEMAN: *Physiologie des Menschen*, 23. u. 24. Aufl. Berlin-Wien 1943. — LAVES W.: *Histochemische Beiträge zum Glykoproteidproblem*, Verh. dtsch. Ges. für Pathologie 1948. — LAVES W., u. K. THOMA: *Histoenzymatische Untersuchungen an eosinophilen Leukocyten*, Verh. dtsch. Ges. für Pathologie 1949. — LEHNER, J.: *Erg. Anat.* **25**, 67 (1924). — LEWY, B.: *Z. klin. Med.* **40**, 59 (1900). — LIEBREICH, E.: *Beitr. path. Anat.* **62**, 71 (1916). — *Klin. Wschr.* **1924**, 194. — LILIENFELD, L.: *Z. physiol. Chem.* **18**, 473 (1894). — LISON, L.: *Archives de Biol.* **46**, 599 (1935). — LOELE, W.: *Erg. Path.* **24**, 1 (1931). — MAXIMOW, A.: *Beitr. path. Anat.* **35**, 93 (1903). — McCLEAN, D.: *J.*

of Path. **33**, 1045 (1930); **53**, 13 (1941). — MEIROWSKI, C.: Fol. Haemat. (Lpz.) **6**, 42 (1908). — MEYER, K., u. E. CHAFFEE: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **43**, 487 (1940). — J. of biol. Chem. **138**, 491 (1941). — MICHAELIS, L.: Arch. mikrosk. Anat. **94**, 580 (1930). — MÖLLENDORFF, W.v.: Münch. med. Wschr. **1923**, 933. — Z. Zellforschg **3**, 1 (1926). — MOMMSEN, H.: Fol. haemat. (Lpz.) **34**, 50 (1927). — Klin. Wschr. **1926**, 844; **1933**, 981. — MOULIN, A.: Arch. Zellforschg **17**, 397 (1923). NÄGELI, O.: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik, 5. Aufl. Berlin 1931. — NEUKIRCH, P.: Z. klin. Med. **70**, 251 (1910). — NEUMANN, A.: Biochem. Z. **148**, 524 (1924); **150**, 256 (1924). — Fol. haemat. (Lpz.) **32**, 166 (1926); **36**, 95 (1928). — NILSSON: Biochem. Z. **291**, 254 (1937). — PAPPENHEIM, A.: Fol. haemat. (Lpz.) **6**, 51 (1906); **9**, 572 (1910). Erg. inn. Med. **8**, 183 (1912). — PETRY, E.: Biochem. Z. **38**, 92 (1912). — Wien. klin. Wschr. **1908**, 1360. — PHILPOT, J.: Nature (Lond.) **141**, 283 (1938). — PISCHINGER, A.: Z. Zellforschg **3**, 169 (1926); **5**, 347 (1927). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl. München 1948. — SCHAFFER, J.: Zbl. Physiol. **21**, 258 (1907). — SCHILLING, V.: Fol. haemat. (Lpz.) **6**, 429 (1908). — SCHULTEN, H.: Klinische Hämatologie, 4. Aufl. Stuttgart 1948. — SCHWARZ-KARSTEN: Dtsch. med. Wschr. **1927**, Nr 43. — SCHWEIZER, R.: Anat. Anz. **79**, 96 (1934). — SEHRT, E.: Münch. med. Wschr. **1937**, 139. — STAEMMLER, M.: Frankf. Z. Path. **25**, 391 (1921). — SVENSSON, H.: Kolloid-Z. **90**, 141 (1940). — THOMA, K.: Histoenzymatische Untersuchungen an den Blutzellen. Verh. dtsch. Ges. für Pathologie 1948. — Z. Biol. **103**, 27 (1949). — Dtsch. med. Wschr. **1950**, 86. — TISELIUS, A.: Kolloid-Z. **83**, 129 (1938). — VOORHOEVE, H.: Klin. Wschr. **1937**, 420. — WALLBACH, G.: Fol. haemat. (Lpz.) **43**, 121 (1930). — WEIDENREICH, F.: Fol. haemat. (Lpz.) **5**, 35 (1908). — WEST: Trans. Assoc. amer. Physicians **51**, 230 (1936). — ZEIGER, K.: Z. Zellforschg **10**, 481 (1930). — Z. Mikrosk. **54**, 82 (1937). — ZIKES, H.: Zbl. Bakter. **57**, 21 (1922).

Prof. Dr. WOLFGANG LAVES, Institut für gerichtliche Medizin
der Universität München.