

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

Histochemischer Nachweis einer organischen Trägersubstanz im Hämosiderinpigment.

Von

WOLFGANG GOESSNER.

(Eingegangen am 29. November 1952.)

Die chemische Zusammensetzung des in körniger Form intracellulär abgelagerten Hämosiderinpigmentes ist, abgesehen von dem Eisengehalt, noch weitgehend unbekannt. Die bisherigen Untersuchungen erstrecken sich im wesentlichen auf die in der histochemischen Pigmentanalyse üblichen Teste, wie Verhalten gegenüber Lösungs- und Bleichungsmitteln, Silbersalzen, Fettfarbstoffen usw.¹⁻⁵.

Die bekannten wichtigsten Eigenschaften des Hämosiderins sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Es wird im allgemeinen angenommen, daß im Hämosiderinpigment das Eisen in einer lockeren organischen Bindung, wahrscheinlich an einen Eiweißkörper vorliegt^{3, 5-8}. Ein exakter Beweis dafür ist aber bisher auf histochemischem Wege noch nicht erbracht worden. Desgleichen ist die chemische Struktur der betreffenden organischen Substanzen noch nicht genauer charakterisiert. Bei der Untersuchung verschiedenen menschlichen Autopsie- und Biopsiematerials mit der Hotchkiss-McManus-Methode fiel uns eine mehr oder weniger starke rötliche Anfärbung etwa vorhandenen Hämosiderins auf. Allerdings war dieselbe bei intensiver Eigenfarbe des Pigmentes oft nur schwer zu erkennen.

Die Diskrepanz zu den Angaben LILLIES (s. Tabelle 1⁹) und die Vermutung, daß es sich um die Reaktion eines organischen Substrates

Tabelle 1. Bisher bekanntes mikrochemisches Verhalten des Hämosiderins.

| Reagens | Verhalten | Autor |
|------------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Säuren | löslich | HUECK ^{1, 2, 5} |
| Alkalien | unlöslich | HUECK |
| Fettlösungsmittel | unlöslich | HUECK |
| Bleichungsmittel | unverändert | HUECK |
| Eisenreaktion | stets positiv | HUECK |
| Basische Farbstoffe | { negativ | HUECK |
| | teilweise positiv | LILLIE ⁴ |
| Fettfarbstoffe | negativ | HUECK |
| Osmium | negativ | HUECK |
| Argentaffinität, AgNO ₃ | negativ | HUECK |
| Fluorescenz | negativ | POPPER ⁴ |
| Hotchkiss-McManus-Reaktion | negativ | LILLIE ⁹ |

im Hämosiderinpigment handeln könnte, gaben Veranlassung, diesem Befund weiter nachzugehen.

Bei der Suche nach einem günstigen Untersuchungsmaterial erwiesen sich die Milzen von Laboratoriumstieren (Maus, Ratte) als besonders geeignet. Bekanntlich wird in der Milz verschiedener Tiere, besonders in höherem Alter, oft in großer Menge Eisenpigment abgelagert^{10, 11}. Bei diesen Tieren ist auch normalerweise die Erythrophagocytose in der Milz sehr ausgesprochen, so daß zwischen Erythrocytenzerfall und Pigmentbildung ein kausaler Zusammenhang zu bestehen scheint. Wahrscheinlich können diese Eisenablagerungen als physiologisch angesehen werden, und es ist anzunehmen, daß dabei die Bedingungen, die zur Pigmentierung führen, einigermaßen konstant sind.

Material und Methodik.

Zur Untersuchung kamen Mäuse- und Rattenmilzen alter Tiere. Nach Fixierung in Alkohol 96% und neutralem Formalin 4% erfolgte Paraffineinbettung über Chloroform in der üblichen Weise.

Es kamen folgende Färbungen und histochemische Reaktionen zur Anwendung.

1. *Allgemeine Färbung*: Hämalaun und Hämalaun-Eosin.

2. *Basophilie und Metachromasie*: Wäßrige Toluidinblaulösung 1%, 10 min. Abspülen in dest. Wasser, Differenzieren in Alkohol 96%, Entwässern, Xylol, Balsam.

3. *Saurer Farbstoff zur Darstellung basischer Proteine*: Wäßrige Lichtgrünlösung 1%, 10 min Abspülen in dest. Wasser, Entwässern, Xylol, Balsam.

4. *Fettfärbung*: Gesättigte Sudanschwarzlösung in Alkohol 70%, 15 min. Kurz abspülen in Alkohol 50%, dest. Wasser, Glycerin.

5. *Eisenreaktion*: Berlinerblaureaktion nach WICKLEIN-FALKENBERG (siehe ROMEIS¹).

6. a *Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PJS)* nach McMANUS¹². b *Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach HOTCHKISS* (s. GLICK¹³).

7. *Chromsäure-Schiff-Reaktion nach BAUER* (s. ROMEIS¹). Es wurde mit Chromsäure 5% 1 Std behandelt.

8. *Kaliumpermanganat-Schiff-Reaktion nach CASELLA¹⁴*. Es wurde mit KMnO₄ 0,5% 15 min behandelt.

9. *Perameisensäure-Schiff-Reaktion nach LILLIE¹⁵*. Es wurde mit frisch hergestellter Perameisensäure 90 min behandelt.

10. *Eiweißreaktion*. Diazoniumreaktion (s. DANIELLI¹⁶). Behandeln der Schnitte mit frisch hergestelltem tetrazotiertem Benzidin oder o-Dianisidin in alkalischem Milieu bei 0—5° C. Wenn nötig, kann zur Farbintensivierung nach sorgfältigem Auswaschen an H-Säure weitergekuppelt werden. Bei dieser Methode reagieren vor allem die Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Tyrosin

11. *Extraktion des Eisens*: Oxalsäure 5%, 3 Std (ROMEIS¹, LILLIE⁴).

12. *Acetylierung (LILLIE⁹)*: Essigsäureanhydrid-Pyridin, Gemisch 4:6 24 Std bei Zimmertemperatur.

13. *Deacetylierung* (nach LILLIE⁹): Ammoniak 28% 2 Teile und Alkohol 100% 8 Teile 24 Std bei Zimmertemperatur.

14. *Lipoidextraktion*: Methanol-Chloroform, Gemisch 1:1 24 Std bei 60° C.

15. Fermentteste: a) Speichel 1 Std bei 37° C. b) Diastase 1% in dest. Wasser 1 Std bei 37° C. c) Hyaluronidase (BENGER), 1 mg (= 1000 Benger-Einheiten) auf 3 cm³ dest. Wasser, 24 Std bei 37° C. d) Pepsin 5 mg/cm³ 0,01 N HCl 1, 2, 4, 12 und 24 Std bei 37° C. e) Pancreatin 4 mg/cm³ 0,8% NaHCO₃ 30 min, 2 Std und 6 Std bei 37° C.

Die 6-, 12- und 24stündigen Verdauungen mit Pepsin bzw. Pancreatin erfolgten an nicht entparaffinierten Schnitten.

Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen.

Das Pigment liegt ausschließlich intracellulär, vor allem in den meist erheblich vergrößerten Reticulumzellen der roten Pula, weniger in den Sinusendothelen. Gelegentlich finden sich auch geringe Pigmentablagerungen in den Follikeln, meist in der Nähe der Zentralarterie ebenfalls in Reticulumzellen. Das Pigment zeigt nativ eine fein- bis grobgranuläre Beschaffenheit und je nach Größe der Pigmentkörner eine goldgelbe bis braune Farbe.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse der zuerst durchgeführten histochemischen Teste gibt Tabelle 2.

Tabelle 2. *Histochemisches Verhalten des Hämosiderinpigmentes.*

| Reagens | Befund |
|---------------------------------|--|
| Unbehandelt | gold- bis dunkelbraune Granula |
| Oxalsäure 5%, 3 Std | vollständig gelöst |
| Salzsäure 10%, 1 Std | teilweise gelöst |
| Perjodsäure 1%, 5 min | unverändert |
| Chromsäure 5%, 1 Std | unverändert |
| Kaliumpermanganat 0,5%, 30 min | gebräunt wie das übrige Gewebe |
| Eisenreaktion | positiv |
| Toluidinblau | keine Basophilie, keine Metachromasie |
| Lichtgrün | infolge Eigenfarbe des Pigmentes nicht sicher zu beurteilen |
| Sudanschwarz | negativ |
| Schiffs-Reagens, 20 min | negativ |
| PJS-Reaktion nach McMANUS | positiv |
| PJS-Reaktion nach HOTCHKISS | positiv |
| Bauer-Reaktion | angedeutet positiv |
| Casella-Reaktion | angedeutet positiv |
| Perameisensäure-Schiff-Reaktion | negativ |
| Eiweißreaktion | infolge Eigenfarbe des Pigmentes nicht sicher zu beurteilen |

Daraus ist zu ersehen, daß das Pigment eine positive Eisenreaktion gibt, aber keine Basophilie, Metachromasie und Sudanophilie erkennen läßt. Deutlich positiv ist die PJS-Reaktion in Form einer rotbraunen Färbung der Pigmentkörner. Die Bauer- und Casella-Reaktion ergeben dagegen nur einen angedeuteten rötlichen Schimmer. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion ist eindeutig negativ. Die bei den letztgenannten

Reaktionen zur Anwendung kommenden Oxydationsmittel allein haben keinen Effekt, abgesehen von dem Kaliumpermanganat, das zu einer diffusen Bräunung des Schnittes führt, die aber nach kurzer Behandlung mit Bisulfitlösung verschwindet. Der Ausfall der Eiweißreaktion ist infolge der Eigenfarbe des Pigmentes nicht eindeutig zu bestimmen.

Wichtig und für die weitere Untersuchung grundlegend ist die Tatsache, daß sich das Eisen ziemlich leicht mit Oxalsäure extrahieren läßt; nach 1stündiger Einwirkung der Säure ist es teilweise in Lösung gegangen und die Pigmentkörper sind nur noch hellgelb gefärbt, während nach 3 Std im allgemeinen völlige Lösung erfolgt ist. Die notwendige Zeitdauer der Säurebehandlung hängt von der Menge, Dichte und Größe der Pigmentkörper ab. Nach vollständiger Lösung sieht man am nativen ungefärbten bzw. nur mit einem Kernfarbstoff gefärbten Präparat in den vergrößerten Reticulumzellen an Stelle der Pigmentgranula kleine stärker lichtbrechende körnchenartige Gebilde, die im Phasenkontrastmikroskop deutlich darstellbar sind.

Als nächster Schritt wurde untersucht, welche histochemischen Reaktionen diese nativ ungefärbten Restgranula geben und ob sie sich mit einer der Methoden besonders deutlich darstellen lassen. Das Ergebnis dieser histochemischen Analyse ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Histochemisches Verhalten der Restgranula nach Oxalsäureextraktion.*

| Reagens | Befund |
|------------------------------|--|
| Unbehandelt | farblos, etwas stärker lichtbrechend, im Phasenkontrastmikroskop deutliche Granula |
| Eisenreaktion | negativ |
| Basophilie (Toluidinblau) | negativ |
| Metachromasia (Toluidinblau) | negativ |
| Saure Farbstoffe (Lichtgrün) | schwach positiv |
| Sudanschwarz | negativ |
| PJS-Reaktion nach McMANUS | positiv |
| PJS-Reaktion nach HOTCHKISS | positiv |
| Eiweißreaktion | schwach positiv |

Die Restgranula sind also eisennegativ und weder metachromatisch noch baso- oder sudanophil. Sie treten nach der PJS-Reaktion sehr deutlich als rotgefärbte Granula in Erscheinung, deren Lokalisation völlig mit dem primären eisenpositiven Pigment übereinstimmt. Die Eiweißreaktion ist schwach positiv, desgleichen färben sie sich mit Lichtgrün leicht an.

Aus den bis jetzt durchgeföhrten Untersuchungen ergibt sich also als wesentlicher Befund die positive Aldehydreaktion nach Perjodsäureoxydation am nativen Hämosiderin, die an einen unpigmentierten eisenfreien Restkörper gebunden ist, der nach Extraktion des Eisens mit Oxalsäure dargestellt werden kann.

Um diesen Befund weiter zu präzisieren, ist es notwendig, kurz auf die den einzelnen Reaktionen zugrunde liegenden chemischen Prozesse einzugehen.

Die nach der Perjodsäureoxydation auftretenden Aldehydgruppen leiten sich entweder von 2 benachbarten unsubstituierten Hydroxylgruppen, wie sie vor allem in Kohlenhydraten vorkommen oder von einer Hydroxylgruppe benachbart zu einer primären oder sekundären Aminogruppe ab. Chromsäure und Kaliumpermanganat greifen offenbar die gleichen Gruppen an, wobei Aldehyde entstehen, die allerdings bei längerer Einwirkung dieser Reagentien leicht wieder zerstört werden. Nach den Untersuchungen von LILLIE⁹ ist anzunehmen, daß die PJS-positiven Substanzen, die keine deutliche Bauer- und Casella-Reaktion geben, verhältnismäßig weniger reaktive Gruppen der obengenannten Art je Molekül enthalten.

Der Ausfall dieser Reaktionen am Hämosiderinpigment (s. Tabelle 2) spricht für das Vorhandensein eines Stoffes mit Reaktionsgruppen der eben dargestellten Art.

Im Gegensatz dazu werden mit Perameisensäure unter den histochemischen Bedingungen (nach LILLIE¹⁵) Äthylengruppen zu Aldehyden oxydiert, wahrscheinlich über Äthylenperoxyde; 1-, 2-Glykolgruppen werden dagegen nicht angegriffen. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion ist besonders beim Vorliegen höherer ungesättigter Lipoidverbindungen, wie sie z. B. im Ceroidpigment vorkommen, positiv (LILLIE¹⁵).

Perameisensäure kann nach den histochemischen Untersuchungen von PEARSE¹⁷, am Keratin auch Cystin zu Cysteinsäure (Alanin- β -sulfonsäure $\text{HO}_3\text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CO}_2\text{H}$) oxydieren, wobei wahrscheinlich als Zwischenstadium Alanin- β -sulfinsäure ($\text{HO}_2\text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CO}_2\text{H}$) auftritt. Letztere soll nach PEARSE auch zu einer positiven Reaktion mit der SCHIFFSchen Lösung führen können.

Der negative Ausfall der Perameisensäure-Schiff-Reaktion am Hämosiderinpigment spricht gegen das Vorliegen von Verbindungen der eben dargestellten Art.

Die Zahl der im Organismus vorkommenden Verbindungen, die die Voraussetzungen zu einer positiven PJS-Reaktion geben, ist verhältnismäßig groß. Es kommen im wesentlichen folgende Stoffgruppen in Betracht: Polysaccharide, Mukopolysaccharide, Glykoproteide, Glykolipoide (Cerebroside).

Zur genaueren Charakterisierung der PJS-positiven Substanz im Hämosiderin war deshalb die Anwendung weiterer histochemischer Verfahren einschließlich Fermentteste notwendig. Diese und die damit erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Das Verhalten bei der reversiblen Acetylierung bestätigt das Vorhandensein der obengenannten von der Perjodsäure angreifbaren

Tabelle 4. Einfluß verschiedener Reagentien und Enzyme auf den Ausfall der PJS-Reaktion am Hämosiderinpigment.

| Reagens | Befund |
|-------------------------------|--------------|
| Oxalsäure 5%, 3 Std | positiv |
| Salzsäure 10%, 1 Std | positiv |
| Acetylierung | negativ |
| Nach Deacetylierung | positiv |
| Methanol-Chloroformextraktion | positiv |
| Speichel | positiv |
| Diastase | positiv |
| Hyaluronidase | positiv |
| Pepsin | abgeschwächt |
| Pancreatin | abgeschwächt |

Gruppen. Nach Acetylierung mit Essigsäureanhydrid ist infolge der Substitution der Glykolgruppen die Oxydation zum Aldehyd nicht mehr möglich und es resultiert eine negative PJS-Reaktion. Nach Entfernung der Acetylgruppen kann die Oxydation zu Aldehyden wieder stattfinden und die Reaktion wird positiv.

Das Vorliegen von Glykolipoiden kann auf Grund der negativen Sudanschwarzfärbung am Paraffinschnitt (s. Tabellen 2 und 3) und des unveränderten Ausfalles der PJS-Reaktion nach Lipoidextraktion mit heißem Methanol-Chloroform ausgeschlossen werden.

Da weder Speichel- noch Diastasebehandlung einen Einfluß auf den Ausfall der PJS-Reaktion haben, ist dieselbe nicht auf das Vorliegen von Glykogen zurückzuführen.

Gegen das Vorhandensein eines Mukopolysaccharides spricht die unveränderte PJS-Reaktion nach der Hyaluronidasebehandlung, sowie die negative Metachromasie und Basophilie (s. Tabellen 2 und 3), die besonders die sauren Mukopolysaccharide auszeichnen.

Per exclusionem ist deshalb das Vorliegen eines *Glykoproteides* am wahrscheinlichsten, was durch die positive Eiweißreaktion und die Anfärbarkeit mit sauren Farbstoffen noch bestätigt wird.

Leider gaben die Versuche mit den proteolytischen Enzymen Pepsin und Pancreatin keine eindeutigen Ergebnisse. Nach längerer Fermenteinwirkung war die PJS-Reaktion an den Pigmentkörnchen zwar etwas abgeschwächt, wurde aber niemals völlig negativ. Es ist denkbar, daß sich das Substrat gegenüber proteolytischen Fermenten ziemlich resistent verhält, es ist aber auch nicht auszuschließen, daß durch die Fixierung die Fermentwirkung beeinträchtigt wird.

Diskussion der Ergebnisse.

Mit Hilfe histochemischer Methoden läßt sich im Gewebsschnitt an den Hämosiderinpigmentgranula nach Extraktion des Eisens eine Träger-

substanz zur Darstellung bringen. Bei dieser organischen Komponente handelt es sich auf Grund der histochemischen Analyse höchstwahrscheinlich um einen Glykoproteidkomplex.

Das Eisen liegt wohl in kolloidaler Form vor⁶⁻⁸. Nach den Untersuchungen von ASHER⁷ handelt es sich um kolloidales Ferrihydroxyd.

Als Speicherform des Eisens im Organismus ist in der letzten Zeit das Ferritin genauer untersucht worden und damit in den Vordergrund des Interesses gerückt, während das Hämosiderin, sicher zu Unrecht, mehr oder weniger in den Hintergrund trat.

Auf Grund unserer Befunde am Hämosiderin ergeben sich prinzipiell gesehene gewisse Parallelen zum Ferritin. Letzteres läßt sich durch Zusatz von Cadmiumsulfatlösung in Form brauner Kristalle im Gewebe zur Darstellung bringen. Auch aus dem Ferritin läßt sich das Eisen entfernen und es bleibt das farblose sog. Apoferritin übrig. Dies ist eine ziemlich homogene Substanz, die leicht in reiner Form darstellbar ist. Es handelt sich um ein typisches Protein, dessen Aminosäurezusammensetzung weitgehend bekannt ist. Auf Grund der vorliegenden Analysedaten ergibt sich kein Anhalt für das Vorliegen einer Kohlenhydratkomponeente im Apoferritin^{18, 19}.

Sowohl Hämosiderin als auch Ferritin bestehen also aus 2 Komponenten, dem Eisen und einem Eiweißkörper. Beide Anteile unterscheiden sich allerdings insofern, als das Hämosiderineisen eine positive Eisenreaktion (Berlinerblau) gibt, das Ferritineisen dagegen nicht und das Hämosiderin nach dem Ausfall der histochemischen Reaktionen wahrscheinlich ein Glykoproteid, das Ferritin nach der chemischen Analyse ein reines Protein enthält. Wieweit zwischen Ferritin und Hämosiderin Beziehungen bzw. Übergänge bestehen, müssen weitere Untersuchungen klären.

Entsprechend dem Apoferritin könnte die in den Hämosiderinpigmentgranula enthaltene PJS-positive Trägersubstanz als *Aposiderin* bezeichnet werden.

Dieser Begriff wurde allerdings schon von LILLIE⁴ für das braune, eisennegative Pigment, in das Hämosiderin unter Umständen nach Fixierung in saurem Formalin (p_H 3—4) umgewandelt wird und das wahrscheinlich auch in vivo entstehen kann, geprägt und wäre demnach in dem obengenannten Sinn zu erweitern.

Weiterhin erscheint es von gewissem Interesse, die Frage der Herkunft dieser Trägersubstanz kurz zu erörtern.

Auf Grund von Untersuchungen über die cytologische Morphologie der Eisenspeicherung (Literatur s. HIRSCH²⁰) ist bekannt, daß Eisen an präformierten Strukturen (Speichergranula, Krimom) in der Zelle

niedergeschlagen wird, und zwar an Stellen, an denen sich bei Paralleluntersuchungen Golgi-Systeme finden.

Neuerdings gelang es GERSH²¹ den Golgi-Apparat mit der PJS-Methode darzustellen und die zugrunde liegende Substanz als ein Glykoproteid zu identifizieren, wobei er diesem Stoff eine wesentliche Rolle im Zellmetabolismus zusprach. Hieraus läßt sich eine Beziehung zu unseren Befunden darstellen und es wäre denkbar, daß auch die Glykoproteidkomponente des Hämosiderins aus dem Golgi-Material gebildet wird.

Schließlich besteht noch die Möglichkeit, daß ein Glykoproteid mit dem Eisen von außen in die Zelle eintritt. Bei der Erythrophagocytose käme als eine solche Quelle die Erythrocytenmembran in Betracht. Nach neueren Untersuchungen²² enthält das Stromin der Membranen ein fibrilläres als Elinin bezeichnetes Material, das einen Lipoglykoproteidkomplex darstellt.

Das für den Eisentransport im Blutplasma verantwortliche β -1-Pseudoglobulin (Siderophilin, Transferrin) besitzt einen Kohlenhydratgehalt von 1,8%²³; es ist aber unwahrscheinlich, daß diese Plasmafraktion normalerweise in die Zelle eindringen kann.

Zur endgültigen Entscheidung der zuletzt angeschnittenen Fragen müssen weitere experimentelle Untersuchungen beitragen.

Zusammenfassung.

1. Mit histochemischen Methoden läßt sich eine organische Trägersubstanz im Hämosiderinpigment von Mäuse- und Rattenmilzen nachweisen.

2. Dieselbe gibt eine positive Perjodsäure-Schiff-Reaktion. Es handelt sich auf Grund der Ergebnisse verschiedener histochemischer Teste wahrscheinlich um ein Glykoproteid.

3. Demnach besteht das Hämosiderinpigment aus 2 Komponenten, dem Eisen und einer farblosen organischen Komponente von Glykoproteidcharakter. Letztere läßt sich nach Extraktion des Eisens als Restkörper mit der Hotchkiss-McManus-Reaktion elektiv darstellen.

4. Die Beziehungen zum Ferritin und die Möglichkeiten der Herkunft dieser Trägersubstanz werden diskutiert.

Literatur.

- ¹ ROMETS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948. — ² ROULET, F.: Methoden der Pathologischen Histologie. Wien: Springer 1948. — ³ PETERFI, T.: Methoden der wissenschaftlichen Biologie, Bd. I. Berlin: Springer 1928. — ⁴ LILLIE, R. D.: Histopathologic Technic. Philadelphia: P. Blakiston Son. & Co. 1948. — ⁵ HUECK, W.: Beitr. path. Anat. **54**, 68 (1912). — ⁶ COOK, S. F.: J. of

Biol. Chem. **82**, 595 (1929). — ⁷ ASHER, TH.: Z. Physiol. Chem. **220**, 97 (1933). — ⁸ SCHWIETZER, C. H.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 17. — Arzneimittel-Forsch. **1**, 72 (1951). — ⁹ LILLIE, R. D.: Stain Technol. **26**, 123 (1951). — ¹⁰ MÖLLENDORF, W. v.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. VI, 1. Berlin: Springer 1930. — ¹¹ HENKE, F., u. O. LUBARSCH: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. I/2. Berlin: Springer 1927. — ¹² McMANUS, J. F. A.: Nature (Lond.) **158**, 202 (1946). — ¹³ GLICK, D.: Techniques of Histo- and Cytochemistry. Interscience Publishers 1949. — ¹⁴ CASELLA, C.: Anat. Anz. **93**, 289 (1942). — ¹⁵ LILLIE, R. D.: Stain Technol. **27**, 37 (1952). — ¹⁶ DANIELLI, J. F.: Symposia Soc. Exper. Biol. **1**, 101 (1947). — ¹⁷ PEARSE, A. G. E.: Quart. J. Microsc. Sci. **92**, 393 (1951). — ¹⁸ MICHAELIS, L.: Adv. Protein Chem. **3**, 53 (1947). — ¹⁹ GRANICK, S.: Physiologic. Rev. **31**, 489 (1951). — ²⁰ HIRSCH, G. Ch.: Form- und Stoffwechsel der Golgi-Körper. Protoplasma Monographien, Bd. 18. Berlin: Gebrüder Bornträger 1939. — ²¹ GERSH, I.: Arch. of Path. **47**, 99 (1949). — ²² MOSKOWITZ, M., and M. CALVIN: Exper. Cell. Res. **3**, 33 (1952). — ²³ SURGENOR, D. M., B. A. KOECLIN and J. STRONG: J. Clin. Invest. **28**, 73 (1949).

Dr. WOLFGANG GOESSNER,
Pathologisches Institut der Universität Tübingen.
