

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL).

Zur formalen Genese der Eisenpigmente *.

Von

PETER GEDIGK und GÜNTER STRAUSS.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Juli 1954.)

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß im Hämosiderinpigment außer der Eisenkomponente eine organische Grundsubstanz vorhanden ist, in der sich mit histochemischen Methoden Polysaccharide, Lipide und Proteine nachweisen lassen. Nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure zeigt der organische Restkörper des Pigmentes eine deutliche Basophilie und eine ausgesprochene Affinität für Eisen: Die eisenfreie Trägersubstanz des Hämosiderins kann erneut wieder mit Eisen beladen werden.

An Hand dieser Kenntnisse galt es nunmehr die formale Genese dieses Pigmentes zu untersuchen.

Zunächst war festzustellen, in welcher zeitlichen Reihenfolge die organischen Bestandteile des Pigmentes in den Zellen auftreten.

Dann war zu klären, ob die organischen Bausteine des Pigmentes als Abbauprodukte der Erythrocyten oder anderer Blutbestandteile zusammen mit dem Eisen von außen her an die Zelle herangebracht werden, oder ob die organische Trägersubstanz ein Produkt der pigmenttragenden Zelle darstellt.

Zur Klärung dieser Fragen haben wir bei Mäusen subcutane Injektionen von Eisenhydroxydlösungen und von Humanblut vorgenommen. Unsere besondere Aufmerksamkeit hat hierbei der Verarbeitung der Eisenhydroxydlösungen gegolten, die ja keine organischen Bestandteile enthalten. Bei dieser Versuchsanordnung braucht sich das Gewebe also nur mit dem Schwermetallhydroxyd auseinanderzusetzen, während alle organischen Substanzen von vornherein wegfallen, die bei dem Blutaustritt in das Gewebe zusammen mit dem Eisen verarbeitet werden müssen.

Methoden.

Tierversuche.

Wir haben bei unseren Versuchen 10 Wochen alte Inzuchtmäuse verwandt, die eine Milch-Hafer-Brotdiät erhielten.

Diesen Tieren haben wir jeweils 0,1 ml einer Lösung von kolloidalem Eisenhydroxyd am Rücken subcutan injiziert. Da die Injektionen stets unter sterilen

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Bedingungen vorgenommen wurden, haben wir niemals eine akute entzündliche Reaktion beobachtet.

Wir haben jeweils 2, 5, 7, 14, 56 und 84 Tage nach der Injektion die Tiere getötet und dann die Rückenhaut über dem Perimysium der langen Rückenmuskeln abpräpariert. Die Injektionsstellen waren in allen Fällen mit dem bloßen Auge als pfennigstückgroße, dunkelbraunrote Flecken gut zu erkennen. Die Eisenablagerungen waren stets mit der Umgebung fest verbunden und ließen sich nicht mechanisch aus dem Gewebe entfernen.

Die entnommenen Hautstücke haben wir bei allen Tieren in einer 10%igen wäßrigen Formalinlösung fixiert und in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet.

In weiteren Versuchen haben wir Mäusen 0,1 ml menschliches Blut subcutan injiziert, das durch Schlägen defibriniert worden war. Oxalsaure oder citronensaure Salze haben wir nicht zur Gerinnungshemmung verwandt. Auch diese Tiere wurden nach 2, 5, 7, 15, 28, 56 und 84 Tagen getötet. Die Injektionsstellen waren bei diesen Experimenten vielfach nicht leicht zu finden. Nach 56 bzw. 84 Tagen sah man im subcutanen Bindegewebe häufig nur noch einen stecknadelkopfgroßen, schwach hellbraun gefärbten Fleck.

Herstellung der Eisenhydroxydlösungen.

In der ersten Versuchsreihe haben wir kolloidale Eisenhydroxydlösungen verwandt, die wir nach der Vorschrift von RINEHART und ABUL-HAJ hergestellt haben. Bei dem Ansetzen dieser Lösung wird Glycerin benötigt, das allerdings bei dem Ausdialysern der fertigen Eisenhydroxydlösung fast völlig eliminiert wird und daher bei der Beurteilung der Versuche nicht berücksichtigt zu werden braucht. Trotzdem haben wir bei drei weiteren Versuchsreihen mit einer Eisenhydroxydlösung gearbeitet, die ohne den Glycerinzusatz hergestellt worden war:

275 g granuliertes Ferrichlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) werden in 1 Liter Wasser gelöst und mit 100 ml 28%igem Ammoniak versetzt. Das Präcipitat wird durch Umrühren gelöst. Dann weitere Zugabe von je 50, 30, 20 und 20 ml Ammoniak. Dazwischen wird bis zur vollständigen Lösung des Niederschlages jeweils 15 min umgerührt. Die klare dunkelbraune Lösung wird anschließend in einem Cellophanschlauch gebracht und gegen das 3—4fache Volumen Wasser dialysiert. Die Außenflüssigkeit wird im Laufe von 3 Tagen 10mal gewechselt.

Beide kolloidale Eisenhydroxydlösungen sind von dem Gewebe in prinzipiell gleicher Weise verarbeitet worden. Das Ergebnis der mit der Eisenhydroxydlösung nach RINEHART und ABUL-HAJ (Glycerinzusatz) durchgeführten Versuche unterschied sich weder in histologischer noch in histochemischer Hinsicht von dem Resultat der Versuchsreihen, bei denen die injizierten Eisenhydroxydlösungen ohne Glycerinzusatz hergestellt worden waren.

Histochemische Methoden.

I. Enteisen der Schnitte. Bei der Extraktion des Eisens aus den Schnitten sind wir genau so vorgegangen wie bei unseren früheren Untersuchungen: Wir haben die Schnitte $1\frac{1}{2}$ Std bei Zimmertemperatur mit 20%iger Salzsäure behandelt.

Demgegenüber hat GöSSNER bei seinen Versuchen zur histochemischen Charakterisierung des Hämosiderinpigmentes das Eisen mit 5%iger Oxalsäure aus dem Gewebe entfernt. Da eine 5%ige Oxalsäurelösung zweifellos ein milderes Mittel zur Lösung des Eisenhydroxydes darstellt als die von uns benutzte 20%ige Salzsäure, scheint die Verwendung dieser organischen Säure auf den ersten Blick mit erheblichen

Vorteilen einherzugehen. Wir haben daher jetzt beide Extraktionsverfahren geprüft. Aus folgenden Gründen glauben wir jedoch der Salzsäureextraktion weiterhin den Vorzug geben zu müssen:

Das Eisenhydroxyd wird mit 20%iger Salzsäure sehr schnell und zuverlässig entfernt. Wir haben es bei unseren zahlreichen Versuchen an dem verschiedensten biologischen Material niemals gesehen, daß bei der Salzsäureextraktion Reste des Eisens zurückbleiben. Demgegenüber benötigt man für die Entfernung des Eisens mit 5%iger Oxalsäure eine längere Extraktionszeit, die zudem in Abhängigkeit von der Art des Materials gewissen Schwankungen unterworfen ist. In vielen Fällen ist das Eisenhydroxyd bereits nach $2\frac{1}{2}$ —3 Std vollständig aus dem Gewebe entfernt. Manchmal werden für die Eisenextraktion jedoch fast 5 Std benötigt.

Ein weiterer Vorteil der Salzsäureextraktion liegt darin, daß es mit dieser Mineralsäure nicht nur gelingt, Eisenhydroxyd, sondern auch fast alle anderen Schwermetalloxyde und -salze aus dem Gewebe zu entfernen. Man kann also bei der Untersuchung anderer Metallablagerungen im Gewebe unter den gleichen Versuchsbedingungen arbeiten.

Von besonderer Bedeutung scheint uns die leichte Löslichkeit der Erdalkalien, vor allem der Calciumsalze, in Salzsäure zu sein. Durch die Untersuchungen von BEHRENS und ASHER wissen wir, daß im Hämosiderin neben dem Eisenoxyhydrat auch Calciumsalze vorkommen. Sie werden bei der Salzsäurebehandlung der Schnitte zusammen mit dem Eisen entfernt und beeinträchtigen daher nicht die Untersuchung des organischen Restkörpers des Pigmentes. Bei der Oxalsäureextraktion bleiben die Calciumsalze dagegen im Schnitt zurück und können durchaus einige histochemische Eigenschaften der Trägersubstanz, wie z. B. die Basophilie, beeinflussen oder verdecken.

Wir halten es daher für sehr wahrscheinlich, daß der Unterschied zwischen einigen Befunden von GöSSNER und uns auf dem unterschiedlichen Eisenextraktionsverfahren beruht.

Wie wir bereits in unserer früheren Mitteilung betont haben, werden durch die Salzsäureeinwirkung auf das Gewebe — abgesehen von der Extraktion der Ribonucleinsäuren, dem Auftreten einer positiven Nuclealreaktion und der Abschwächung der Basophilie der sauren Polysaccharide — keine tiefgreifenden histochemischen und histologischen Veränderungen im Gewebe hervorgerufen. Jedenfalls entstehen keine Kunstprodukte, die das Ergebnis der von uns angewandten Untersuchungsmethoden beeinträchtigen. Diesen Befund konnten wir, wie später gezeigt wird, bei unseren neuen Untersuchungen bestätigen.

Wir haben ferner festgestellt, daß für die morphologische und histochemische Erhaltung des Gewebes die *Dauer der Säurebehandlung* wich-

tiger ist als die *Säurekonzentration*. Bei den Versuchen, das Eisen mit verdünnten Salzsäurelösungen zu extrahieren, kam es durch die dann erforderliche Verlängerung der Säureeinwirkung leicht zu einer Zerstörung des Gewebes.

Zusammenfassend haben wir gefunden, daß das Eisenhydroxyd mit der Salzsäureextraktion schneller und sicherer entfernt wird als durch die Oxalsäurebehandlung der Schnitte. Die Salzsäure entfernt außerdem — im Gegensatz zur Oxalsäure — ohne weiteres andere Schwermetalle und Calciumsalze. Da wir außerdem nicht gesehen haben, daß die Behandlung der Schnitte mit Salzsäure morphologische oder histochemische Veränderungen zur Folge hat, welche die Untersuchungen des Pigmentes beeinträchtigen, geben wir diesem Extraktionsverfahren den Vorzug. In Anbetracht des schweren Eingriffes, den die Salzsäurebehandlung des Gewebes jedoch trotz dieser Beobachtungen darstellt, ist es ein großer Vorteil, daß mit der mildereren Oxalsäureextraktion noch ein anderer Weg zur Entfernung des Eisens aus dem Schnitt zur Verfügung steht, und daß sich die vorliegenden Untersuchungsergebnisse somit größtenteils überprüfen und erhärten lassen.

II. Histochemische Reaktionen zum Nachweis von Eiweißkörpern.

1. Tetrazoniumreaktion (LISON, DANIELLI) zum Nachweis aromatischer Aminosäuren.
2. Benzoylierung der aromatischen Aminosäuren zur Unterdrückung der Tetrazoniumreaktion.

Eine ausführliche Darstellung der Grundlagen und der Durchführung dieser Eiweißreaktionen findet man bei PEARSE.

III. Histochemische Reaktionen zum Nachweis von Kohlenhydraten.

1. *Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion* (PAS-Reaktion) (McMANUS, LILLIE, HOTCHKISS) zur Darstellung von Polysacchariden.
2. *Reversible Acetylierung* (McMANUS und CASON) zur histochemischen Unterscheidung von PAS-positiven α -Glykolen, α -Aminoalkoholen und Äthylengruppen.
3. Bebrütung der Schnitte mit *Diastase* zur Entfernung und Abgrenzung des Glykogens.
4. Messung der *Basophilie* mit gepufferten Methylenblaulösungen (PISCHINGER). Die pH-Werte wurden mit der Glaselektrode gemessen und abgerundet.
5. Färbung mit *Alcianblau* (STEDMAN, PEARSE) zur Darstellung von sauren Mucopolysacchariden.
6. Prüfung der *Metachromasie* mit Toluidinblau und Thionin.
7. Bebrütung der Schnitte mit *Hyaluronidase* zur Entfernung und Abgrenzung der mesenchymalen sauren Mucopolysaccharide.

Die Grundlagen der Kohlenhydratreaktionen sind in einer anderen Arbeit diskutiert worden (GEDICK). Genaue Angaben über die Durchführung dieser Methoden finden sich gleichfalls in einer früheren Mitteilung (GEDICK und STRAUSS).

IV. Färbungen und histochemische Reaktionen zur Darstellung von Lipiden.

1. Fettfärbung mit *Sudanschwarz* (LISON).
2. *Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion* (PEARSE, LILLIE) zur Darstellung von Äthylengruppen.

Die Grundlagen dieser Reaktion sind an anderer Stelle diskutiert worden (GEDIGK). Ihre Durchführung ist in einer früheren Mitteilung angegeben worden (GEDIGK und STRAUSS).

V. Weitere histochemische Methoden.

1. Die Darstellung des Eisens erfolgte mit der *Berlinerblau-* und der *Turnbullblau*-Reaktion (vgl. ROULET).

Die Lokalisation grobkörniger Eisenablagerungen erfolgte — wie bei unseren früheren Untersuchungen — häufig nur durch eine einfache Kernfärbung mit *Hämatoxylin*.

2. Die Prüfung der *Eisenbindefähigkeit* des Gewebes (HALE) wurde nach der Methode von RINEHART und ABUL-HAJ vorgenommen.

3. Zur *fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung* wurden die Schnitte in Glycerin eingeschlossen.

Untersuchungsergebnisse.

Unsere Untersuchungen zielten zunächst darauf ab, das Schicksal des *Eisenhydroxydes* zu verfolgen, wenn es in einem mesenchymalen Gewebe abgelagert wird.

Die histologischen und histochemischen Untersuchungen der Gewebe haben folgende Befunde ergeben:

Nach 2 Tagen ist das subcutane Bindegewebe im Bereich der Injektionsstelle stark aufgelockert, die kollagenen Fasern sind auseinander gedrängt. In den Saftspalten liegen zahlreiche kleinere und größere Eisenhydroxydkörnchen. Die ortständigen Zellen des Injektionsgebietes enthalten demgegenüber nur ganz vereinzelt kleinste Eisenpartikel (Abb. 1 a).

Mit der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion können weder am eisenhaltigen noch am eisenfreien Schnitt in nennenswertem Umfang PAS-positive Substanzen nachgewiesen werden (Abb. 1 b). Nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure zeigen die Mesenchymzellen keine Basophilie; die Methylenblaubindefähigkeit erlischt bei p_H 5,2. Die Zellen zeigen keine Affinität für kolloidales Eisen (Abb. 2). Eine Anfärbung mit Sudan-schwarz kann weder am eisenhaltigen noch am eisenfreien Schnitt erzielt werden (Abb. 3). Bei der Tetrazoniumreaktion verhalten sich die Bindegewebszellen im Injektionsgebiet genau wie alle anderen Mesenchymzellen. Ihr Protoplasma wird tief dunkelrot gefärbt. Mit Benzoylchlorid lässt sich die Tetrazoniumreaktion ohne weiteres unterdrücken.

Bereits nach 7 Tagen hat im Injektionsgebiet eine erhebliche Vermehrung der ortständigen Zellen eingesetzt, die Saftspalten haben sich wieder etwas geschlossen. Dagegen ist es nicht zu einem ins Gewicht fallenden Austritt von Leukocyten und Lymphocyten gekommen. Das Eisenhydroxyd ist jetzt bereits vornehmlich in den Zellen in Form kleiner Körnchen und Schollen abgelagert. Extracelluläre Eisenhydroxydpartikel sind nur noch selten zu finden.

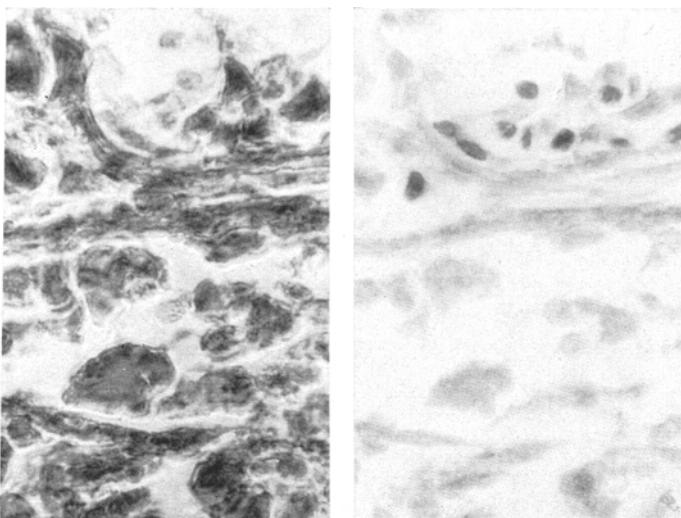


Abb. 1a u. b. a Eisenhydroxydkörnchen und -schollen im subcutanen Bindegewebe 2 Tage nach der Injektion der Eisenlösung. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergr. 820mal.
b Der gleiche Schnitt wie in Abb. 1a nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion. In den ortsständigen Zellen keine PAS-positiven Substanzen. Vergr. 820mal.

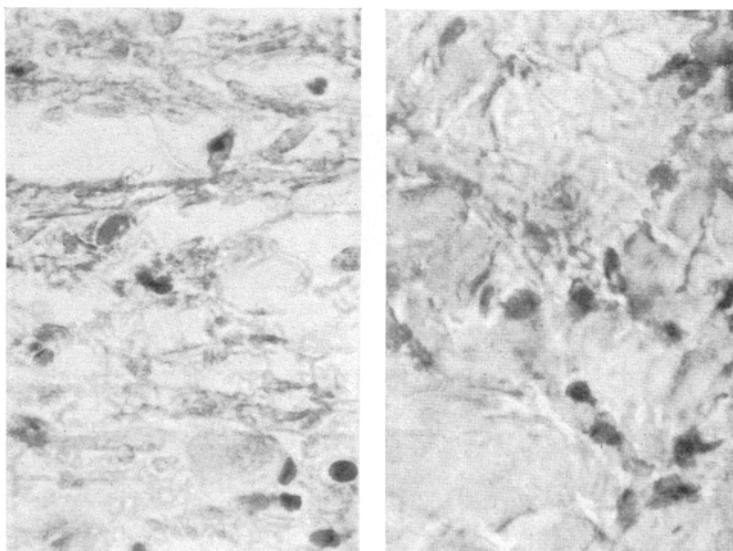


Abb. 2. 2 Tage nach der Eiseninjektion. Nach der Entfernung des Eisens mit Salzsäure wurden die Schnitte in eine Lösung von kolloidalem Eisen gebracht. Anschließend Berlinerblau-Reaktion. Das Protoplasma der ortsständigen Zellen zeigt keine Eisenaffinität. Vergr. 820mal.

Abb. 3. 2 Tage nach der Eiseninjektion. Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließende Färbung mit Sudanschwarz. In den ortsständigen Zellen keine sudanophilen Substanzen nachweisbar. Vergr. 820mal.

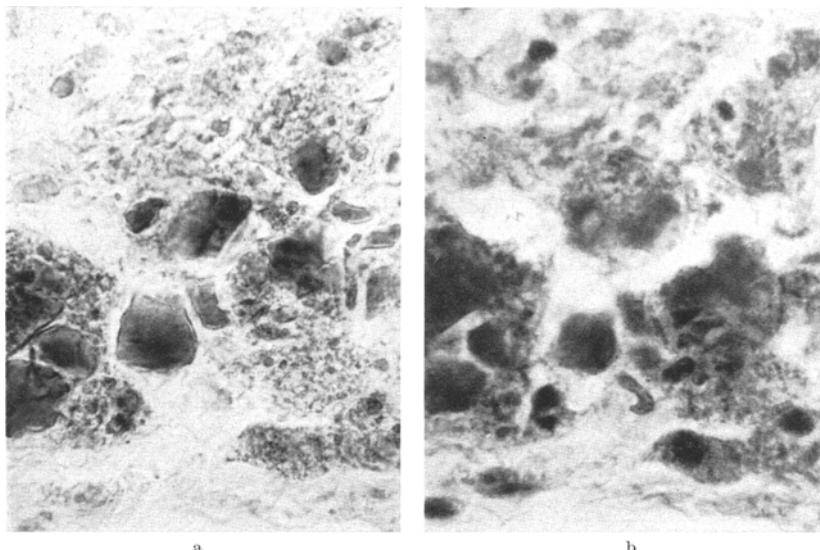


Abb. 4 a u. b. 14 Tage nach der Injektion der Eisenlösung. Die Eisenhydroxydkörnchen und -schollen sind jetzt größtenteils intracellulär gelagert. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergr. 900mal. b Der gleiche Schnitt wie in Abb. 4 a nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion. Stark PAS-positive Körnchen und Schollen in gleicher Verteilung wie die Eisenablagerungen in Abb. 4 a. Vergr. 900mal.

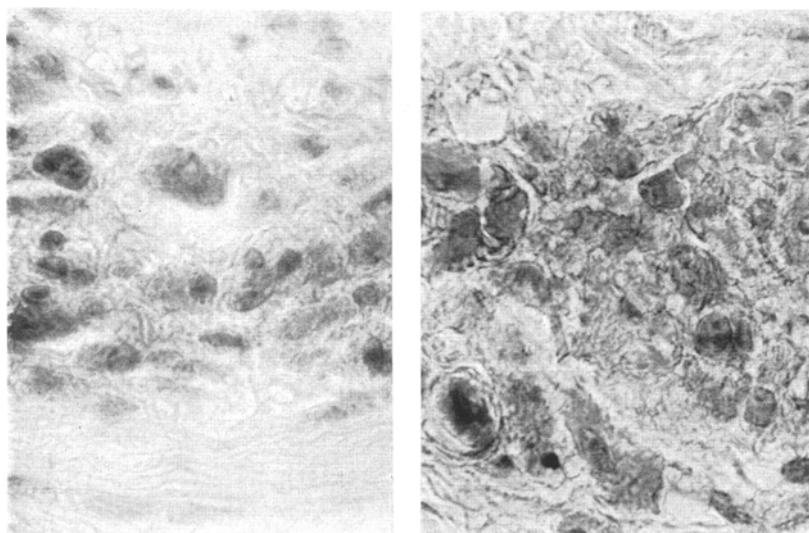


Abb. 5. 14 Tage nach der Eiseninjektion. Nach der Entfernung des Eisens mit Salzsäure wurden die Schnitte in eine Lösung von kolloidalem Eisen gebracht. Anschließend Berlinerblau-Reaktion. Das Protoplasma der ortständigen Zellen lässt sich stellenweise mit Eisen beladen. Vergr. 820mal.

Abb. 6. 14 Tage nach der Eiseninjektion. Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließende Färbung mit Sudanschwarz. Die ortständigen Zellen lassen sich schwach mit Sudanschwarz anfärben. Vergr. 820mal.

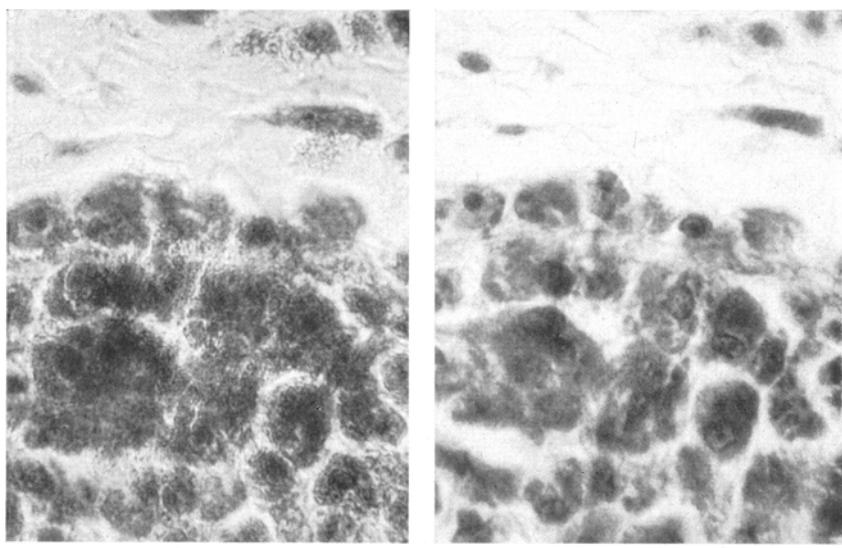


Abb. 7 a u. b. a 56 Tage nach der Injektion der Eisenlösung. Das Eisenhydroxyd ist vollständig von den Zellen aufgenommen worden. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergr. 820mal. b Dergleiche Schnitt wie in Abb. 7 a nach der Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Perjodsäure-Leukofuchsinsreaktion. In den ortsständigen Zellen reichlich PAS-positive Körnchen und Schollen in gleicher Verteilung wie die Eisenablagerungen in Abb. 7a. Vergr. 820mal.

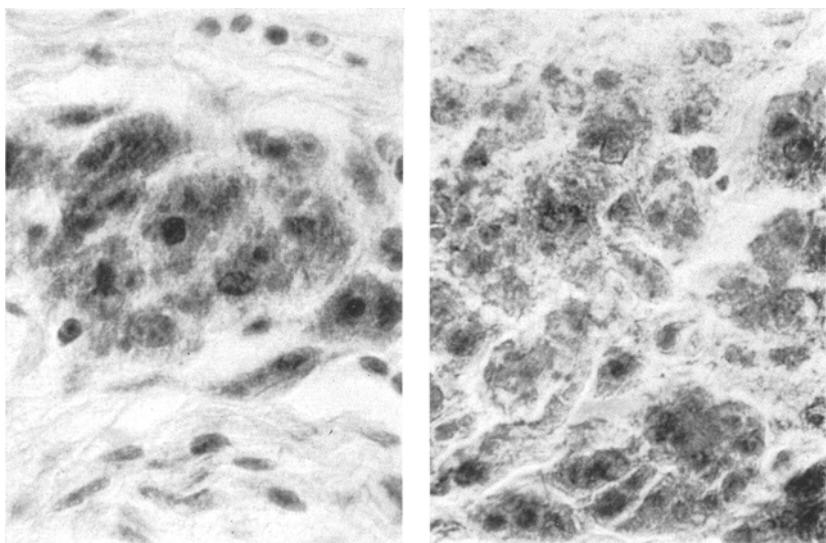


Abb. 8.

Abb. 8. 56 Tage nach der Eiseninjektion. Nach der Entfernung des Eisens mit Salzsäure wurden die Schnitte in eine Lösung von kolloidalem Eisen gebracht. Anschließend Berlinerblau-Reaktion. Das Protoplasma der ortsständigen Zellen besitzt eine sehr ausgesprochene Eisenaffinität. Vergr. 820mal.

Abb. 9. 56 Tage nach der Eiseninjektion. Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließende Färbung mit Sudanschwarz. Das Protoplasma der ortsständigen Zellen lässt sich mit Sudanschwarz anfärben. Vergr. 820mal.

Mit der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion lässt sich jetzt am eisenhaltigen und am eisenfreien Schnitt in den Mesenchymzellen eine deutliche purpurrote Färbung erzielen. Nach Entfernung des Eisens treten jedoch noch keine nennenswerte Basophilie (Methylenblaubindung bis p_{H} 4,3) und Eisenaffinität der Mesenchymzellen in Erscheinung. Auch die Anfärbarkeit mit Sudanschwarz ist außerordentlich schwach. Die Tetrazoniumreaktion des Protoplasmas ist unverändert stark positiv.

Nach 14 Tagen ist es an der Injektionsstelle zu einer weiteren Vermehrung der Bindegewebszellen gekommen, deren Zelleib durch Eisenkörnchen und -schollen aufgebläht ist (Abb. 4a). Die eisenverarbeitenden Zellen sind dicht nebeneinander gelagert, die Saftspalten sind nicht mehr verbreitert.

Die PAS-Reaktion der eisentragenden Zellen hat sich sowohl am eisenhaltigen als auch am eisenfreien Schnitt erheblich verstärkt (Abb. 4b). Die Prüfung der Basophilie ergab jetzt in einem Teil der eisenverarbeitenden Mesenchymzellen noch eine Methylenblaubindung bei p_{H} 4,0. Diese Zellen zeigen nunmehr auch eine geringe Affinität für Eisen (Abb. 5). In der gleichen Weise hat die Sudanophilie geringfügig zugenommen (Abb. 6). Bei der Tetrazoniumreaktion werden die Zellen weiterhin stark angefärbt.

In der Folgezeit (nach 28, 56 und 84 Tagen) ändert sich das histologische Bild an der Injektionsstelle nicht mehr wesentlich. Die Mesenchymzellen sind prall mit Eisenkörnchen und -schollen gefüllt. Extracelluläre Eisenablagerungen sind nur noch außerordentlich selten zu finden (Abb. 7a).

Auch die PAS-Reaktion hat in den eisenverarbeitenden Zellen nicht mehr wesentlich zugenommen (Abb. 7b). Dagegen tritt in diesen Zellen die Basophilie im eisenfreien Schnitt noch deutlicher hervor. Nach 28 Tagen lässt sich die Methylenblaubindefähigkeit bis p_{H} 3,8, nach 56 Tagen bis p_{H} 3,2 und nach 84 Tagen gleichfalls bis p_{H} 3,2 verfolgen. In der gleichen Weise nimmt auch die Eisenaffinität der organischen Trägersubstanz weiter zu. Nach 56 Tagen ist die Eisenbindefähigkeit der eisenfreien Trägersubstanz des Pigmentes fast mit der Eisenaffinität des sauren Schleimes vergleichbar (Abb. 8).

Die Sudanophilie der eisenhaltigen und der eisenfreien Mesenchymzellen hat gleichfalls erheblich zugenommen (Abb. 9). Nach Entfernung des Eisens zeigen die Mesenchymzellen nunmehr auch eine deutliche Autofluorescenz.

Die Anfärbarkeit des Protoplasmas mit der Tetrazoniumreaktion ist ebenso stark wie bei den nach 2, 7 und 14 Tagen getöteten Tieren.

Wir haben bei diesen Versuchen — genau wie bei den früheren Experimenten — Testeshyaluronidase auf das eisenfreie Pigment einwirken

lassen und wiederum gefunden, daß die Basophilie der Trägersubstanz sehr deutlich abnimmt. Die Grenze der Methylenblaubindefähigkeit wird von p_{H} 3,2 auf p_{H} 4,8 verschoben.

Mit Alcianblau haben wir den organischen Restkörper des Pigmentes nicht anfärben können. Dagegen haben wir wiederum festgestellt, daß die eisenfreie Trägersubstanz Toluidinblau bindet. Es gelingt jedoch nicht, einen metachromatischen Farbumschlag zu erzielen.

Die PAS-positive Träger-substanz des Eisenpigmentes läßt sich reversibel acetylieren und wird durch die Bebrütung der Schnitte mit Diastase nicht angegriffen.

14 Tage nach der Ver-abfolgung des Eisenhydroxydes sind im Injektionsgebiet erstmalig *Riesenzellen* zu finden, die sich entweder an größere Eisenhydroxydschollen angelagert haben, oder kleinere und größere Eisenpartikel phagocytiert haben. Auch in diesen Riesenzellen liegen reichlich PAS-positive Substanzen von der gleichen histochemischen Beschaffenheit wie die organische Restsubstanz des Eisenpigmentes.

Bei allen Untersuchungen sind wir auch der Frage nachgegangen, ob die PAS-positiven Substanzen und die Lipide genau an den Stellen der Eisenhydroxydablagerung zu finden sind, so wie es beim Hämosiderinpigment der Fall war. Zur Klärung dieser Frage haben wir wie bei den früheren Untersuchungen zunächst die eisenhaltigen Schnitte photographiert. Dann wurden von den photographierten Schnitten die Deckgläschen abgelöst, die Schnitte in Wasser gebracht, das Eisen aus dem Gewebe entfernt und schließlich an den gleichen Schnitten die PAS-Reaktion durchgeführt oder die Eisenbindefähigkeit geprüft. Der Vergleich der Photographien der eisenhaltigen Schnitte ergab folgende Befunde (vgl. Abb. 1 a und b, 4 a und b sowie 7 a und b):

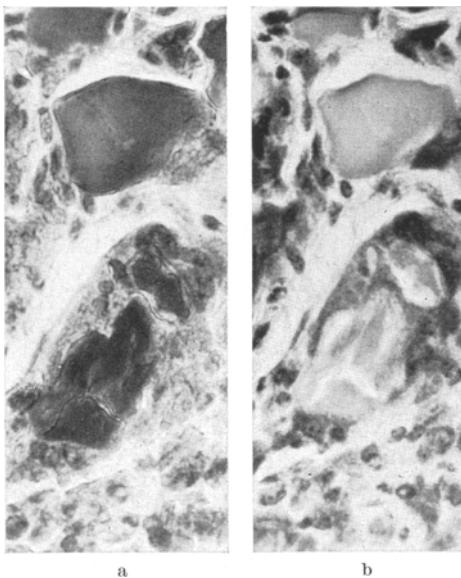


Abb. 10 a u. b. a Sehr große Eisenhydroxydschollen in Riesenzellen. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergr. 820mal. b Die gleichen Zellen wie in Abb. 10 a nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Perjodsäure-Leukofuchsireaktion. An der Stelle der großen Eisenhydroxydschollen findet man jetzt ein histochemisch indifferentes Protoplasma. Der die Eisenschollen umgebende Protoplasmasaum ist jedoch stark angefärbt. Vergr. 820mal.

Bei den kleinen und mittelgroßen Eisenkörnchen und -schollen treten wiederum die PAS-Reaktion, die Basophilie, die Eisenaffinität und die Sudanophilie genau an der Stelle der ursprünglichen Eisenablagerung auf. Die großen Eisenhydroxydschollen hinterlassen dagegen nach ihrer Herauslösung aus den Zellen häufig keine PAS-positive, sudanophile und basophile Trägersubstanz (Abb. 10a und b), sondern vielfach nur ein histochemisch indifferentes Protoplasma. Gelegentlich bleiben an Stelle der umfangreichen Eisenpartikel auch Lücken im Zelleib zurück.

Diese großen intracellulären Eisenhydroxydablagerungen werden jedoch stets von einem PAS-positiven Protoplasmasmaum umgeben, der die gleichen histochemischen Eigenschaften besitzt wie die organische Trägersubstanz der kleinen Eisenpartikel.

Der die größeren Eisenablagerungen einschließende Protoplasma- bezirk enthält vielfach nur sehr wenig Eisenhydroxyd, so daß hier fast alle histochemischen Reaktionen auch ohne vorherige Entfernung des Eisens durchführbar sind. Auf diese Weise war es uns möglich, das Ergebnis unserer histochemischen Untersuchungen in nativen, nicht mit Salzsäure behandelten Schnitten zu prüfen. Dabei haben wir erneut festgestellt, daß der Ausfall der histochemischen Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Lipidreaktionen nicht durch die Salzsäurebehandlung des Gewebes beeinflußt wird.

Die subcutane Injektion von *defibriniertem Blut* führt — wie erwartet — zu einer sehr ausgeprägten Bildung von verschiedenen Pigmenten. Wie bereits HUECK gezeigt hat, treten dabei nicht nur Hämosiderinkörnchen, sondern auch Lipopigmente (Ceroid) und Hämatoïdin-kristalle auf. Unser Interesse galt bei diesen Experimenten in erster Linie den Eisenpigmenten. In Übereinstimmung mit den Befunden von HUECK haben wir gesehen, daß die Berlinerblau-Reaktion schon nach einigen Tagen in dem Injektionsgebiet positiv ist, und daß bereits nach 7—14 Tagen typische Eisenpigmentkörnchen zu sehen sind. Histochemisch gleicht dieses Pigment — im wahrsten Sinne des Wortes ein Hämosiderin — völlig dem Eisenpigment, das durch die Injektion von Eisenhydroxydlösungen erzeugt worden war. Nach der Entfernung des Eisens mit Salzsäure bleibt eine PAS-positive, sudanophile und basophile Trägersubstanz in den Zellen zurück.

Erwähnenswert ist nur, daß in dem beim Blutabbau entstehenden Hämosiderin mehr Fettstoffe nachweisbar sind als in dem durch Injektionen von anorganischen Eisenhydroxydlösungen hervorgerufenen Pigment. Die Färbung mit den Sudanfarbstoffen ist hier erheblich kräftiger.

Es ist uns ferner aufgefallen, daß bei dem Blut-Eisenpigment die organischen Bestandteile etwas schneller gebildet werden als bei dem anorganischen Pigment.

Diskussion.

I. In unseren früheren Untersuchungen haben wir im Hämosiderin-pigment von menschlichen Organen außer der Eisenhydroxydkomponente Polysaccharide, Lipide und Proteine gefunden. Auf Grund der vorliegenden neuen Befunde können wir nunmehr zu der Frage Stellung, nehmen, welche Substanzen am Aufbau des Eisenpigmentes beteiligt sind, das nach der Injektion von anorganischen Eisenhydroxydlösungen auftritt.

Nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure gab der organische Restkörper dieses künstlich erzeugten Pigmentes eine deutliche *Tetrazoniumreaktion*. Da sich die Kupplungsfähigkeit der Trägersubstanz durch eine Behandlung mit Benzoylchlorid ohne weiteres blockieren läßt, ist die Annahme gerechtfertigt, daß bei der Tetrazoniumreaktion nur *aromatische Aminosäuren in Proteinen* und nicht auch purin- oder pyrimidinhaltige Verbindungen erfaßt werden (MITCHELL, DANIELLI). Die leichte Reaktionsfähigkeit der Proteine mit Benzoylchlorid spricht auch gegen das Vorliegen eines besonderen Polymerisationsgrades der Proteine im Sinne von PEARSE.

Das Eisenpigment selbst und die eisenfreie Trägersubstanz des Pigmentes geben ferner — genau wie wir das bereits bei unseren Untersuchungen am Hämosiderin der Hämochromatose beschrieben haben — eine deutliche *PAS-Reaktion*. Unsere weiteren histochemischen Untersuchungen haben auch bei dem künstlich erzeugten Eisenpigment ergeben, daß es sich bei diesen PAS-positiven Stoffen um *Mucopolysaccharide* oder um *Muco- bzw. Glykoproteide* handelt.

Wir haben schließlich auch in diesem Eisenpigment und in seiner organischen Trägersubstanz in geringer Menge mit Sudan färbbare *Lipide* gefunden. Die bereits beschriebene Autofluorescenz des eisenfreien Restkörpers des Pigmentes ist jetzt noch deutlicher in Erscheinung getreten als bei den früheren Untersuchungen am Eisenpigment der Hämochromatose.

Mit besonderem Nachdruck haben wir bereits früher auf die *Basophilie* des organischen Restkörpers des Pigmentes hingewiesen. Die Affinität der Trägersubstanz für basische Farbstoffe ist jetzt bei den Tiersuchen noch deutlicher in Erscheinung getreten als bei den Untersuchungen am Eisenpigment in den menschlichen Organen. Die Methylenblaubinddefähigkeit läßt sich bei der Trägersubstanz des experimentell erzeugten Eisenpigmentes bis p_H 3,2 verfolgen, während die Grenze der Methylenblaubindung der in menschlichen Organen gebildeten organischen Grundsubstanz des Pigmentes bei p_H 3,6—4,0 lag. Wir führen diesen Unterschied in dem Ausmaß der Basophilie auf den ungleichen Zustand des untersuchten Materials zurück. Bei den Tierexperimenten haben wir stets frische Organe untersuchen können, die

unter optimalen Bedingungen fixiert und eingebettet werden konnten. Bei unseren älteren Untersuchungen waren wir dagegen auf das Sektions- und Eingangsmaterial des Institutes angewiesen, bei dem diese günstigen Versuchsbedingungen naturgemäß nicht gegeben waren.

Wir haben uns auch bei diesen Untersuchungen die Frage vorgelegt, an welche organische Komponente des Eisenpigmentes die Basophilie der Trägersubstanz gebunden ist. Grundsätzlich kann die Basophilie von Gewebelementen im histologischen Schnitt auf Nucleinsäuren, saure Polysaccharide oder Lipide zurückgeführt werden. Nachdem wir bereits in früheren Untersuchungen das Vorliegen von Nucleinsäuren ausgeschlossen haben, müssen wir der Acidität entweder saure Polysaccharide oder Lipide zugrunde legen.

Da nun die einzelnen organischen Bausteine des Pigmentes von den eisenverarbeitenden Zellen nicht gleich schnell, sondern nacheinander gebildet werden, hatten wir gehofft, durch die zeitliche Beziehung zwischen dem Auftreten der verschiedenen Substanzen und dem Nachweis der Basophilie einen Aufschluß für die Ursache der sauren Eigenschaft der organischen Trägersubstanz zu gewinnen. Diese Erwartung hat sich nicht voll erfüllt. Die Basophilie tritt etwas später auf als die ausgeprägte PAS-Reaktion; sie läßt sich jedoch früher nachweisen als die deutliche Sudanophilie. Diese Beobachtung läßt sich einerseits mit der Auffassung in Einklang bringen, daß die Zellen zunächst neutrale Polysaccharide produzieren, und daß die sauren Gruppen in den Kohlenhydraten etwas langsamer gebildet werden. Es wäre aber ebenso vorstellbar, daß zunächst nur sehr kleine Mengen von Lipiden entstehen, deren Sudanophilie histologisch anfangs noch nicht zuverlässig nachweisbar ist, deren Basophilie dagegen, dank der sehr empfindlichen Meßmethoden, bereits in Erscheinung tritt.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung unserer älteren und neueren Befunde ergibt sich folgendes Bild:

Für die Auffassung, daß die Basophilie der Trägersubstanz an die Kohlenhydratkompone gebunden ist, spricht zunächst, daß der sehr starken PAS-Reaktion und der ausgeprägten Basophilie nur eine relativ schwache Sudanophilie gegenübersteht. Außerdem muß die Abschwächung der Basophilie durch Hyaluronidase für diese Auffassung ins Feld geführt werden.

Gegen diese Deutung spricht das Fehlen der Metachromasie und der Anfärbbarkeit mit Alcianblau. Es ist jedoch zu bedenken, daß der negative Ausfall dieser beiden histochemischen Teste für saure Polysaccharide möglicherweise auf die Salzsäurebehandlung der Schnitte zurückzuführen ist.

Wir halten es nun auf Grund unserer Beobachtungen für wahrscheinlich, daß die Basophilie der organischen Trägersubstanz des Eisenpigmentes an die Polysaccharidkompone gebunden ist, daß also im

Eisenpigment ein saures (komplexes oder einfaches) Mucopolysaccharid vorliegt. Eine definitive Klärung dieser Frage scheint allerdings mit histochemischen Methoden vorerst nicht möglich zu sein.

Aus den hier beschriebenen Versuchen geht hervor, daß bei der Injektion von anorganischen Eisenhydroxydlösungen das gleiche Eisenpigment gebildet wird wie bei einem Blutaustritt in das Gewebe und dem dabei erfolgenden Abbau des Hämoglobins. Beide Pigmente lassen sich weder morphologisch noch histochemisch voneinander unterscheiden. Dieser Befund steht in vollem Einklang mit früheren Beobachtungen von CEELEN und SCHEID, die mit histologischen Methoden gleichfalls eine Übereinstimmung zwischen dem bei Blutungen entstehenden „Hämosiderin“ und dem in Staublungen gebildeten „Siderin“ festgestellt haben. In der gleichen Weise kommt es in der Umgebung von metallischen Fremdkörpern zur Bildung von Eisenpigmenten. So haben wir in den Zellen eines Fremdkörpergranulationsgewebes, das sich im Laufe von 8 Monaten um eine in der Mamma liegende Nadelspitze entwickelt hatte, reichlich braunes eisenhaltiges Pigment beobachtet. Dieses Pigment gleicht völlig dem bei Blutungen entstehenden Hämosiderin.

Es ist daher nicht möglich, aus der einfachen histologischen Feststellung und aus der cytochemischen Analyse eines Eisenpigmentes eine Aussage über die Herkunft des Eisens zu machen. Die Bezeichnung „Hämosiderin“ dürfte daher in vielen Fällen unzutreffend sein, und es ist sicher zweckmäßig, einen weniger präjudizierenden Ausdruck, wie „Eisenpigment“ oder „Siderin“ zu verwenden.

II. In welcher Reihenfolge treten die organischen Bausteine des Pigmentes auf?

An dem *Proteingehalt* der Zellen im Bereich des Injektionsgebietes haben wir mit unseren Methoden keine Veränderungen feststellen können.

2 Tage nach der Injektion des Eisenhydroxydes enthalten die Mesenchymzellen im Bereich der Eisenablagerung noch keine histochemisch nachweisbaren *Polysaccharide*. Bereits nach 5—7 Tagen läßt sich aber in den eisenverarbeitenden Zellen eine deutliche PAS-Reaktion erzielen. Nach 14 Tagen ist die PAS-Reaktion der Zellen und des Eisenpigmentes schon außerordentlich stark. Der bei unseren Versuchen überhaupt maximal zu erzielende Kohlenhydratgehalt ist zu diesem Zeitpunkt nahezu erreicht. In der folgenden Zeit, d. h. nach 28, 56 und 84 Tagen, ist dann nur noch eine geringgradige Vermehrung der Polysaccharide zu beobachten.

Auch nicht extrahierbare *Lipide* lassen sich in den Zellen nach 2 Tagen noch nicht nachweisen. Nach 5—7 Tagen können die eisenverarbeitenden Zellen vereinzelt ganz schwach mit Sudanwarz angefärbt werden. In der folgenden Zeit nimmt die Sudanophilie des

Eisenpigmentes und der eisentragenden Zellen nur sehr langsam zu. Erst nach 56 Tagen findet man eine wirklich ausgeprägte Sudanophilie.

2 Tage nach der Eiseninjektion zeigen die eisenverarbeitenden Zellen keine *Affinität für kolloidales Eisen*. Sie können nach der Entfernung des Eisens aus dem Schnitt nicht erneut mit Eisen beladen werden. Nach 7—14 Tagen kann man erstmalig eine schwache, vorwiegend diffuse Eisenbindungsfähigkeit der eisenverarbeitenden Zellen erkennen. In den späteren Stadien der Pigmentbildung nimmt die Eisenaffinität der Zellen ständig zu und lässt sich mehr und mehr auf scharf umschriebene Bezirke des Protoplasmas lokalisieren. Sie ist nach 28 Tagen sehr deutlich und hat nach 56 Tagen ihr Maximum erreicht.

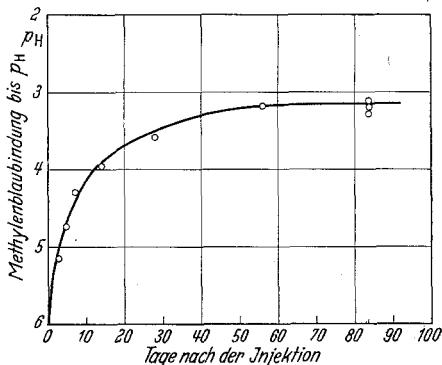


Abb. 11. Zunahme der Basophilie in den eisenverarbeitenden Zellen. Ordinate: Grenze der sichtbaren Methylenblaubindung. Abszisse: Tage nach der Injektion der Eisenlösung.

Methylenblaubindung bei p_H 4,7. eisenverarbeitenden Zellen noch keine deutliche Basophilie, die Methylenblaubindung lässt sich nur bis p_H 4,3 verfolgen. In der folgenden Zeit wird die Grenze der Methylenblaubindefähigkeit ständig weiter in den sauren p_H -Bereich verschoben. Nach 14 Tagen liegt sie bei p_H 4,0, nach 56 Tagen und 84 Tagen sogar bei p_H 3,2.

Die *Eigenfluorescenz* des eisenfreien Restkörpers nimmt in der gleichen Weise zu wie seine Sudanophilie. 2 Tage nach der Injektion zeigen die Bindegewebsszellen keine nennenswerte Autofluorescenz. Nach 28 Tagen erkennt man bereits eine schwache, bläulich-weiße, diffuse Fluorescenz. Erst nach 56 Tagen findet man in den eisenverarbeitenden Zellen eine distinkte, hellgelbe Eigenfluorescenz, die in der folgenden Zeit nicht mehr wesentlich zunimmt.

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen (vgl. Tabelle 1): Die Bildung des Polysaccharidbausteines des Pigmentes erfolgt sehr rasch. Der Kohlenhydratgehalt der organischen Trägersubstanz hat nach 28 Tagen fast sein Maximum erreicht. Die Lipide werden erheblich langsamer gebildet, die Sudanophilie tritt erst nach 56 Tagen voll in Erscheinung. Die Eisenbindefähigkeit und die Basophilie nehmen

Tabelle 1. Übersicht über die Verarbeitung des kolloidalen Eisenhydroxydes im subcutanen Bindegewebe.

	Zeit nach der Eiseninjektion in Tagen						
	2	5	7	14	28	56	84
Eisenablagerung . . .	vorwiegend extracelluläre diffuse Eisen-niederschläge; nur wenige intracelluläre Körnchen und Schollen	vielfach intracelluläre Körnchen und Schollen; außerdem diffuse extracellularäre Eisen-niederschläge	vorwiegend intracelluläre Körnchen und Schollen; nur noch wenig extracellularäre Eisen-niederschläge	vorwiegend intracelluläre Körnchen und Schollen; nur noch vereinzelt extracellularäre Eisen-niederschläge	intracelluläre Körnchen und Schollen; kaum noch extracellularäre Eisen-niederschläge	intracelluläre Körnchen und Schollen; keine extracellularäre Eisenablage-rung	wie nach 56 Tagen
Tetrazoniumreaktion . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PAS-Reaktion . . .	negativ, nur in einzelnen Zellen (\pm)	+	+	++	++	++	++
Färbung mit Sudanschwarz		(\pm)	(+)	+	+	++	++
Fluoreszenz . . .	—	—	—	—	(+)	+	+
Basophilie, Methylenblau-bindung bis p_H . . .	5,2	4,7	4,3	4,0	3,6	3,2	3,2
Eisenbindung . . .	—	(\pm)?	(\pm)?	+	++	++	++

langsamer zu als der Polysaccharidgehalt und schneller als der Lipidgehalt. Bereits nach 28 Tagen ist die Eisenaffinität der organischen Trägersubstanz sehr ausgeprägt.

III. Woher kommen die organischen Bestandteile des Eisenpigmentes? Wir können nunmehr eindeutiger als bisher zu der Frage Stellung nehmen, ob die organischen Komponenten des Hämosiderins Abbauprodukte der Erythrocyten (oder anderer Blutbestandteile) darstellen und von den ortsständigen Zellen zusammen mit dem Eisenoxyhydrat gespeichert werden, oder ob sie — wie wir bereits früher vermuteten — von den eisenverarbeitenden Zellen aktiv gebildet werden.

Die vorliegenden Versuche zeigen deutlich, daß es nach der Injektion von Eisenhydroxydlösungen, die keine organischen Beimengungen enthalten, in den eisenspeichernden Zellen zu einer sehr starken Neubildung von Polysacchariden, Lipiden (und wahrscheinlich Proteinen) kommt. Die Bildung dieser organischen sauren Substanzen stellt also in der Tat eine Reaktion auf die Eisenablagerung dar und ist als eine aktive Zellleistung anzusehen.

In unserer früheren Mitteilung haben wir die Vermutung geäußert, daß die Neubildung saurer organischer Substanzen bei der Ablagerung des Ferrioxyhydrates als der Versuch zu einer intracellulären Neutralisierung und Bindung des basischen Schwermetallhydroxydes aufgefaßt werden kann. Wir haben nun in weiteren Experimenten verfolgt, welche Veränderungen bei der Injektion anderer basischer Schwermetallhydroxyde in das subcutane Bindegewebe entstehen und dabei gefunden, daß z. B. auch die Verarbeitung und intracelluläre Speicherung von basischem Bleicarbonat mit der Produktion saurer organischer Substanzen einhergeht. Es entsteht hierbei ein „Bleipigment“, das im wesentlichen die gleichen histochemischen Eigenschaften aufweist wie das Eisenpigment. Nach Entfernung des Bleies mit einer Mineralsäure bleibt in den bleiverarbeitenden Zellen eine organische Trägersubstanz zurück, in der sich Polysaccharide, Lipide und Proteine nachweisen lassen, und die gleichfalls eine deutliche Basophilie zeigt. Die bleifreie organische Trägersubstanz besitzt ferner eine ausgesprochene Affinität für kolloidales Eisen: Sie läßt sich mit Eisenhydroxyd beladen. *Es gelingt also, das „Bleipigment“ im histologischen Schnitt in ein „Eisenpigment“ umzuwandeln.*

IV. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Eisenpigment und dem Ferritin?

In den letzten Jahren ist wiederholt die Aufmerksamkeit auf eine andere organische Eisenverbindung, das *Ferritin*, gelenkt worden. Diese Speicherform des Eisens im Organismus stimmt mit dem Eisenpigment insofern überein, als sie gleichfalls aus einer anorganischen Eisenhydroxydkomponente und einem organischen Baustein, dem Apo-

ferritin, besteht. Darüber hinaus kann auch aus dem Ferritin das Eisen ohne weiteres entfernt werden.

In Übereinstimmung mit Gössner haben wir keinen Anhaltspunkt für eine Identität der organischen Trägersubstanz des Eisenpigmentes mit dem Apoferritin gefunden. Das Ferritin und das Eisenpigment unterscheiden sich in folgenden Punkten voneinander:

Das Eisenpigment gibt stets eine deutliche Berlinerblau- oder Turnbullblaureaktion. Im Ferritin ist die Eisenkomponente dagegen nicht durch die üblichen Eisenreaktionen nachweisbar. Die organische Trägersubstanz des Eisenpigmentes enthält außer Proteinen noch reichlich Kohlenhydrate und in geringem Maße auch Lipide. Für das Apoferritin kann es demgegenüber als gesichert gelten, daß es sich um ein reines Protein handelt (MICHAELIS, sowie GRANICK). Der organische Restkörper des Eisenpigmentes besitzt ferner eine ausgesprochene Affinität für Eisenhydroxyd. Er kann nach Entfernung des Eisens wieder mit Eisen beladen werden. Die Trennung der Eisen-Eiweiß-Verbindung im Ferritin läßt sich dagegen nicht rückgängig machen. Das Apoferritin vermag nicht erneut Eisenhydroxyd zu binden.

Einen fließenden Übergang von Ferritin zum Hämosiderin, auf den SCHWIETZER hinweist, haben wir nicht beobachtet.

Den Unterschieden im chemischen Aufbau des Ferritins und des Eisenpigmentes steht sicherlich auch eine grundsätzlich verschiedene funktionelle Bedeutung dieser beiden Speicherformen des Eisens gegenüber. Im Ferritin müssen wir eine Eisen-Eiweiß-Verbindung sehen, die der physiologischen Resorption und Deponierung des Eisens dient. Das Eisenpigment entsteht dagegen offenbar nur unter pathologischen Bedingungen. Zur Bildung des Pigmentes kommt es anscheinend immer dann, wenn die Eiweiß- bzw. die Apoferritinproduktion im Verhältnis zu dem jeweiligen Eisenangebot zu gering ist. Das wird vornehmlich dann der Fall sein, wenn es zu einem übergroßen örtlichen oder allgemeinen Eisenangebot (z. B. beim Blutzerfall) kommt. Es ist aber auch möglich, daß der Organismus infolge eines allgemeinen Eiweißmangels trotz des an sich normalen Eisenstoffwechsels das Apoferritin nicht in ausreichendem Maße synthetisieren kann (vgl. SCHWIETZER, sowie KALK, BÖLKE und BERNIG). In beiden Fällen wird das überschüssige Eisenhydroxyd dann von den Zellen als Fremdkörper gebunden und zum Pigment verarbeitet.

Zusammenfassung.

Bei der subcutanen Injektion von kolloidalen Eisenhydroxydlösungen kommt es in den ortständigen Mesenchymzellen zur Bildung eines Eisenpigmentes, das sich weder histologisch noch histochemisch von dem beim Blatabbau gebildeten Hämosiderin unterscheiden läßt:

Die organische Trägersubstanz dieses experimentell erzeugten Eisenpigmentes enthält genau wie das Hämosiderin Proteine, Polysaccharide und in geringem Umfang auch Lipide. Nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure zeigt der organische Restkörper gleichfalls eine ausgeprägte Basophilie und eine starke Affinität für Eisen. Er kann erneut wieder mit Eisen beladen werden.

Von den organischen Komponenten des Eisenpigmentes werden die Polysaccharide sehr schnell gebildet, die Lipide treten etwas später in Erscheinung.

Da die injizierten Eisenhydroxydlösungen keine organischen Bestandteile enthielten, können wir nunmehr mit Sicherheit sagen, daß diese organischen Substanzen von den eisenverarbeitenden Zellen aktiv gebildet werden. Sie treten nicht zusammen mit dem Eisen von außen in die Zelle ein. Die Bildung dieser sauren Substanzen muß demnach als Reaktion der Zelle auf die Ablagerung des basischen Eisenoxyhydrates angesehen werden.

Bei der Injektion von basischem Bleicarbonat entsteht im subcutanen Bindegewebe ein dem Eisenpigment entsprechendes „Bleipigment“.

Literatur.

- BEHRENS, M., u. TH. ASHER: Z. physiol. Chem. **220**, 97 (1953). — BERNING, H.: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 346. — BÖLKE, E.: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 1620. — CEELEN, W.: Beitr. Silikoseforsch. **1951**, 171. — GEDIGK, P.: Klin. Wschr. **1952**, 1057. — GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Verh. dtsch. Ges. Path. **1953**, 240. — Virchows Arch. **324**, 373 (1953). — GöSSNER, W.: Virchows Arch. **323**, 685 (1953). — GRANICK, S.: Physiologic. Rev. **31**, 489 (1951). — HUECK, W.: Beitr. path. Anat. **54**, 68 (1912). — Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 3, S. 298ff. Leipzig: S. Hirzel 1921. — KALK, H.: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 225. — MICHAELIS, L.: Adv. Protein Chem. **3**, 53 (1947). — PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London: J. a. A. Churchill 1953. — RINEHART, J. F., and S. K. ABUL-HAJ: Arch. of Path. **52**, 189 (1951). — ROULET, F.: Methoden der pathologischen Histologie. Wien: Springer 1948. — SCHEID, K. F.: Beitr. path. Anat. **88**, 224 (1932); **89**, 93 (1932). — SCHWIETZER, C. H.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 17.

Dr. PETER GEDIGK, Pathologisches Institut der Universität Bonn.