

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

Über die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau*, **

Von

WINFRIED PLOCH

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 29. Januar 1957)

Für die histochemische Abgrenzung saurer Mucopolysaccharide von anderen Polysacchariden steht eine Reihe von bewährten Methoden zur Verfügung, wie z. B. die Prüfung der Basophilie und Metachromasie, sowie die enzymatischen Hydrolysen mit Hyaluronidasen^{4 a, b}. Diese Verfahren sind recht leistungsfähig; ihr Wert wird jedoch durch die zeitraubende und umständliche technische Durchführung oder durch die begrenzte Haltbarkeit der Schnitte eingeschränkt.

Einen wesentlichen Fortschritt des histochemischen Nachweises saurer Mucopolysaccharide stellt die unlängst von STEEDMAN¹³ eingeführte Färbung mit dem basischen Kupferphthalocyaninfarbstoff Alcianblau dar. Dieses Färbeverfahren ist technisch einfach durchführbar und bei strenger Einhaltung der Farbstoffkonzentration und der Färbezeit für saure Mucopolysaccharide weitgehend spezifisch. Schon bei einem kurzen Überschreiten der Färbedauer kommt es jedoch zu einer unspezifischen Überfärbung des Gewebes. Außerdem ist die im histologischen Schnitt erzielte Farbintensität nicht sehr stark.

Im Folgenden soll über einen neuen Kupferphthalocyaninfarbstoff, das „Astrablau“ (Bayer-Leverkusen), berichtet werden, der wegen seiner ausgesprochen hohen Basizität für die Darstellung saurer Strukturen besonders gut geeignet ist.

Material und Methoden

Bei der Ausarbeitung einer histologischen Technik für die Färbung mit Astrablau verwendeten wir hauptsächlich Organe, die aus dem Sektions- und Einsendungsmaterial des Institutes stammten und in üblicher Weise in Paraffin eingebettet oder als Gefrierschnitte behandelt wurden.

* Arbeit auf Veranlassung und unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. P. GEDIGK. Auszugsweise vorgetragen auf der Tagung der Arbeitsgemeinschaft Rhein.-Westf. Pathologen am 2. 6. 56 in Dortmund.

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

Zunächst wurden verschiedene *Fixierungsmittel* auf ihre Eignung für das Färbeverfahren untersucht. Weiterhin prüften wir den Einfluß des *Lösungsmittels*, der *Farbstoffkonzentration* und der *Färbezeit* auf das Färbeergebnis. Dabei hat sich folgendes ergeben:

Der Einfluß der Fixierung auf die Färbung ist gering. Es sind alle üblichen Fixierungsflüssigkeiten brauchbar: 10%iges Formalin, 10%iges neutrales Formalin (10 ml 40%iges Formalin, 10 ml 10%iges Cadmiumchlorid, 10 ml 10%iges Calciumchlorid, dest. Wasser ad 100 ml), 96%iger Alkohol, Formol-Alkohol nach SCHAFFER, BOUINS und ZENKERS Gemisch und das Susa-Gemisch nach HEIDENHAIN. Die besten Resultate erhielten wir nach Fixierung in neutralem Formalin, Formalin-Alkohol und Bouinschem Gemisch.

Eine länger dauernde Fixierung in nicht neutralisiertem Formalin hat den Nachteil, daß auch elastische und reticuläre Fasern angefärbt werden können, die normalerweise keine Affinität für Astrablau besitzen. Durch die Fixierung in ZENKERS Gemisch wird die sonst sehr deutliche Anfärbung der Mastzellen unterdrückt.

Der basische Farbstoff Astrablau wurde für die histologischen Färbungen in verschiedenen Konzentrationen von *Essigsäure*, *Weinsäure*, *Salzsäure*, *Schwefelsäure*, *angesäuertem Äthanol*, *Natrium-Acetatpuffer* (WALPOLE), *Zitrat-Phosphatpuffer* (MC ILVAIN) gelöst. Als besonders geeignet erwiesen sich eine Lösung von 0,5—1% *Astrablau in 2—3%iger wäßriger Weinsäurelösung* (p_H 2) oder eine 1%ige *Astrablaulösung in 1%iger Essigsäure* (p_H 3). Die mit diesen Astrablaulösungen erzielten Färbeergebnisse sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Wie zu erwarten, beeinflußt auch die *Wasserstoffionenkonzentration* die Anfärbung der verschiedenen Gewebelemente. So zeigte es sich, daß saure Mucopolysaccharide mit Farblösungen von p_H 2 bis p_H 3 am besten dargestellt werden. Die Verschiebung des p_H der Farblösung zum Neutralen hin führte — bei p_H 3,6 beginnend — zu vermehrter Anfärbung von Bindegewebsfasern und Cytoplasmastrukturen. Dagegen lassen Farbstofflösungen von p_H 1 und darunter, wie unsere Versuche mit einer Astrablaulösung von p_H 0,65 gezeigt haben, saure Mucopolysaccharide zum Teil ungefärbt.

Die günstigste *Färbezeit* beträgt 5—10 min. Zu diesem Zeitpunkt ist die stärkste Farbintensität fast erreicht. Eine verlängerte Färbedauer (bis 12 Std) führt im Unterschied zur Alcianblau-Methode zu keiner (oder höchstens zu einer unwesentlichen) Überfärbung des Gewebes.

Die Astrablaufärbung erwies sich als sehr resistent gegen Wasser, Alkohol und verdünnte Säuren, weniger gegen Alkali. Die Nachbehandlung mit 5%iger wäßriger Ammoniummolybdatlösung (oder 5%iger Phosphormolybdänsäure) vertieft den Farbton und verhindert eine eventuelle Farbeinbuße bei der Weiterbehandlung der Schnitte.

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse empfehlen wir folgende Färbetechnik:

Lösungen: a) 0,5% Astrablau in 2—3%iger Weinsäure (p_H 2) oder b) 1% Astrablau in 1%iger Essigsäure (p_H 3).

Astrablau löst sich in wäßrigen Lösungen sehr leicht. Es empfiehlt sich, den Farbstoff zum Lösungsmittel hinzuzusetzen. Geringe Erwärmung bis 40° C beschleunigt den Lösungsvorgang ohne Beeinträchtigung der färberischen Eigenschaften.

Färbung I. 1. Schnitte entparaffinieren und in Wasser bringen, 2. 5—10 min in der Astrablaulösung (a oder b) färben, 3. Farbüberschuß

in Wasser abspülen, 4. Gegenfärbung mit Kernechtrot, 5. kurz in Wasser spülen, 6. aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Caedax (Eukitt, DPX).

Ergebnis. Saure Mucopolysaccharide blau, Kerne rot gefärbt. Eine Kombination mit Bindegewebsfärbungen ist möglich, z. B. Hämatoxylin-van Gieson.

Färbung II. 1. Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin, 2. Abspülen in Leitungswasser (eventuell differenzieren in 1%igem Salzsäure-Alkohol), 3. 10 min in Astrablaufösung färben, 4. gründlich in Wasser spülen, 5. 10—15 min einstellen in 5%ige Ammoniummolybdatlösung, 6. gut in fließendem Wasser waschen, 7. 1 min in van Gieson-Gemisch färben, 8. aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Caedax.

Anmerkung. Nach der van Gieson-Färbung müssen die Schnitte solange in 70 (!)%igem Alkohol bleiben, bis der grünliche Farbton der sauren Mucopolysaccharide wieder blau erscheint (etwa 2—3 min; eventuell Kontrolle unter dem Mikroskop).

Astrablau-Perjodsäure-Schiff-Reaktion. Die Darstellung neutraler und saurer Mucopolysaccharide im gleichen histologischen Schnitt gelingt durch eine Kombination der Perjodsäure-Leukofuchsin-technik mit der Astrablaufärbung. Die PAS-Reaktion wird unmittelbar an die Astrablaufärbung angeschlossen und in üblicher Weise durchgeführt.

Ergebnis. Knorpelgrundsubstanz und saurer Schleim blau bis violett, Mastzellen blau, neutrale Mucopolysaccharide rot gefärbt.

Untersuchungsergebnisse

In Tabelle 1 sind die an verschiedenen Organen erzielten Ergebnisse der Astrablaufärbung zusammengestellt. Man erkennt, daß die Knorpelgrundsubstanz, die meisten Schleimstoffe und die Mastzellgranula mit Astrablau angefärbt werden, während z. B. Bindegewebsfasern und Zellkerne keine Affinität für den Farbstoff besitzen.

Alle angefärbten Gewebelemente enthalten, wie wir wissen, *einfache oder komplexe saure Mucopolysaccharide*. Es liegt daher nahe, die selektive Darstellung dieser Strukturen mit dem basischen Farbstoff Astrablau auf die sauren Gruppen der Mucopolysaccharide zu beziehen. Um die Richtigkeit dieser Auffassung zu prüfen, wurden an dem gleichen Material verschiedene Nachweisreaktionen für Polysaccharide, sowie Reaktionen zur Blockierung bestimmter chemischer Gruppen durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß die mit Astrablau angefärbten Gewebelemente Perjodsäure-Schiff positiv und ausgesprochen basophil sind. Mit den Thiazinfarbstoffen Thionin und Toluidinblau werden sie metachromatisch gefärbt. Die Acetylierung der Hydroxylgruppen durch Essigsäureanhydrid beeinflußt nicht die Affinität der Strukturen für Astrablau; dagegen wird die Färbbarkeit durch die Veresterung der sauren Gruppen mit Methanol vollständig unterdrückt (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 1. *Einfluß von Lösungsmitteln und Wasserstoffionenkonzentration auf die Anfärbarkeit von Zell- und Gewebsstrukturen in verschiedenen Organen mit Astrablau*

Organe	1 % Astrablau		0,5 % Astrablau		
	1 % Essig- säure pH 3,1	3 % Wein- säure pH 2,0	n/10 H ₂ SO ₄ pH 1,3	Walpole Puffer pH 0,65	
Bronchial- wand	Schleimdrüsen . .	++	+++	++	+
	Knorpelgrundsub- stanz	+++	+++	++	+++
Schleim und schleim- bildende Zellen in	Uvula	+++	++++	++	+
	Zungengrund . .	+++	++++	++	+
	Gland. sublingualis	+++	++++	++	+
	Dünndarm	+++	++++	+++	+
	Zervix	++	+++		—
	Pseudomucin- kystom*	--/(+)	--/(+)		—
Gallert-Ca des Rectums	++	+++		(+)	
Magen	Schleim	—	—	—	—
	Nebenzellen im Halsteil	(+)	+	(+)	—
	Hauptzellen (Fundus)	—	—	—	—
Nabelschnurschleim	++	+++	(+)	(+)	
Mastzellengranula	++	+++	+	+	
Bindegewebsfasern (kollagene und elastische Fasern)	—	—	—	—	
Zellkerne	—	—	—	—	
Keratin	—	—	—	—	
Ceroid, Lipofusein	—	—	—	—	
Organische Trägersubstanz in Fremdkörpergranulomen	(+)	+			
Corpora amylacea in Gehirn und Rückenmark	++	+++	+		

Anfärbarkeit mit Astrablau: +++++ = sehr stark

++++ = stark

+++ = deutlich

++ = mäßig

+ = schwach oder inkonstant

— = nicht

ange-
färbt

* Cystenininhalt (einzelne Becherzellen im Wandepithel dagegen stark angefärbt)

In weiteren Experimenten versuchten wir durch Oxydation mit Kaliumpermanganat und Perameisensäure im histologischen Schnitt saure Gruppen zu erzeugen. Bei der Verwendung von Kaliumpermanganat trat eine kräftige Färbung der elastischen Fasern und des Keratins auf, auch die reticulären Fasern färbten sich schwach an. Die Dar-

Tabelle 2. *Histochemische Reaktionen**

Färbung bzw. Reaktion	Saurer Schleim	Knorpelgrundsubstanz	Mastzellen
Perjodsäure-Schiff-R. (PAS)	+++	+	+ / ++
Färbung mit Methyleneblau bei pH 4,1	++	+++	+++
Mucikarmin	+ / ++	+	—
Toluidinblau (Metachromasie)	++ M	+++ M	+++ M
Alcianblau	++	++	(+)
Astrablau (unbehandelter Schnitt) . .	+++	+++	++
Astrablaufärbung			
nach Diastase	+++	+++	++
nach Hyaluronidase	+++	+	++
nach 0,9%iger NaCl-Lösung	+++	+++	+++
nach saurer Hydrolyse in n-HCl bei 60° C			
5 min	+++	+++	++
10 min**	++	+++	++
15 min**	++	+++	++
nach Methylierung	—	—	— / (+) ?
nach Demethylierung	++	+++	+
nach Acetylierung	+++	+++	++
nach Perjodsäure-Oxydation	+++	+++	+
nach Perameisensäure-Oxydation***	+++	+++	++
nach Kaliumpermanganat-Oxydation***	++++	++++	++++
nach Sulfonierung***	+++	+++	++

+ / + + + + = Grad der Anfärbung (s. Tab. 1) M = Metachromasie.

* Die theoretischen Grundlagen und die Durchführung dieser histochemischen Reaktionen finden sich in Zusammenstellungen von GEDIGK⁴, GOMORI⁷, LILLIE⁹, PEARSE^{12b}.

** Beginnende Chromatinfärbung.

*** Die Oxydation der Schnitte mit Perameisensäure oder Kaliumpermanganat sowie die Sulfonierung führen zu einer Astrablauaffinität verschiedener Gewebelemente (vgl. die Ergebnisse auf S. 340).

stellung der Mastzellen wurde auffallend verstärkt. Weiterhin zeigte das Ceroidpigment in Ovar und Leber ebenso wie das Lipofuscin (Herzmuskel, Leber) nach der Oxydation eine deutliche Affinität für Astrablau. In Pseudomucinkysten wurde der Cysteninhalte und das die Cystenwand auskleidende Epithel gefärbt. Auch das Cytoplasma der Hauptzellen in den Fundusdrüsen des Magens und der Magenschleim nahmen einen tiefblauen Farbton an.

Nach Behandlung der ungefärbten Schnitte mit Perameisensäure erhielten wir annähernd die gleichen Färbeergebnisse. Nur auf die Färbbarkeit der Hauptzellen der Fundusdrüsen und des Magenschleimes hatte die Perameisensäureoxydation keinen Einfluß.

Auch durch die *Sulfonierung der Schnitte* (GOMORI⁷, sowie KRAMER und WINDRUM⁸) wurde die Färbbarkeit mit Astrablau verstärkt. Einige Strukturen, wie z. B. Bindegewebsfasern, Basalmembranen, Ceroid, Gefäßelastica, wurden nach dem Einbringen der Schnitte in Schwefelsäure mit Astrablau gut dargestellt.

In besonderen Versuchen mit gereinigten Substanzen stellten wir fest, daß neutrale Mucopolysaccharide (z. B. Mucin aus Kälbermagen) mit Astrablau nicht angefärbt werden.

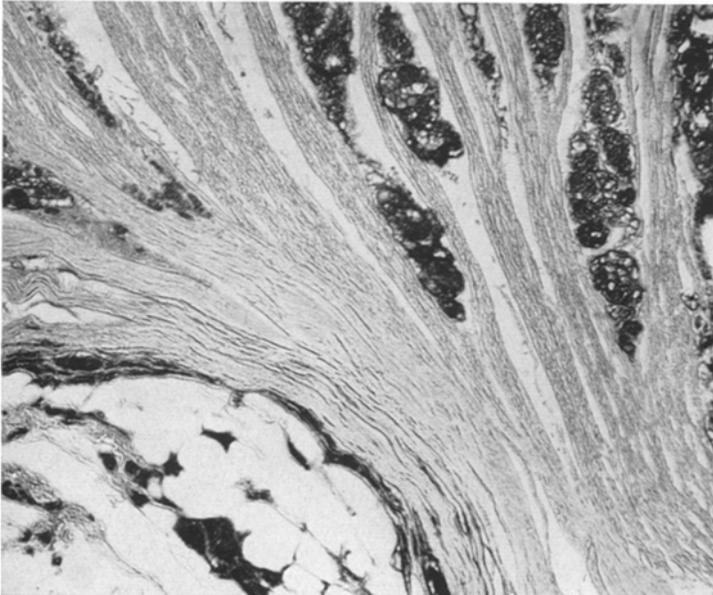


Abb. 1. Gallertcarcinom in der Muscularis propria des Dickdarmes und im anhaftenden Fettgewebe. Färbung mit Astrablau (Kernechtrot). Vergrößerung 81 ×

Besprechung der Ergebnisse

In Anbetracht der Tatsache, daß uns die chemische Konstitution des Farbstoffes nur zum Teil bekannt ist, möchten wir das chemische Prinzip der Astrablaufärbung mit großer Zurückhaltung diskutieren. Auf Grund unserer Befunde sind wir jedoch zu folgender Ansicht gelangt:

1. *Mit dem basischen Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau werden im histologischen Schnitt hauptsächlich einfache und komplexe saure Mucopolysaccharide angefärbt, und es ist anzunehmen, daß die Affinität dieser Substanzen für den basischen Farbstoff an ihre sauren Gruppen gebunden ist.* Hierfür sprechen folgende Beobachtungen:

a) Die mit Astrablau anfärbbaren Strukturen wie Schleimstoffe, Knorpelgrundsubstanz und Mastzellengranula enthalten, wie durch

biochemische Untersuchungen bekannt ist, saure Mucopolysaccharide. Auch histochemisch läßt sich ihr Gehalt an sauren Mucopolysacchariden leicht nachweisen: Sie sind PAS-positiv und ausgesprochen basophil; mit Thiazinfarbstoffen werden sie metachromatisch angefärbt.

Die Corpora amylacea im Zentralnervensystem² und in geringerem Maße die organische Trägersubstanz in Fremdkörpergranulomen^{5, 6} besitzen ebenfalls eine Affinität für Astrablau. Wie wir aus früheren Untersuchungen wissen, enthalten diese Strukturen saure Mucopolysaccharide.

Gelegentlich konnten wir auch eine stärkere Anfärbung von kollagenen Fasern im Stroma von Carcinomen oder in entzündeten Geweben beobachten. Hier lag offenbar eine Depolymerisierung dieser mesenchymalen Zwischensubstanz vor; mit Toluidinblau konnten wir dann auch diese Fasern metachromatisch färben.

b) Nach der Behandlung der Gewebsschnitte mit Hyaluronidase wird die Astrablauaffinität der mesenchymalen Mucopolysaccharide herabgesetzt.

c) Werden die sauren Gruppen durch Methylierung (LILLIE^{9, 3}) blockiert, so läßt sich keine Anfärbung mit Astrablau erzielen. Nach Behandlung der methylierten Schnitte mit Kaliumpermanganat³ wird die Blockade aufgehoben und die Anfärbbarkeit mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff wiederhergestellt.

d) Weder die Blockierung (Acetylierung) noch die oxydative Zerstörung der α -Glykolgruppen mit Perjodsäure hat auf die Astrablaufärbung einen Einfluß.

e) Durch die Einführung von sauren Gruppen in den histologischen Schnitt, z. B. nach Oxydation mit Perameisensäure oder Kaliumpermanganat, erlangen viele Strukturen eine Affinität für Astrablau. Besonders eindrucksvoll ist die Zunahme der Astrablauaffinität von cystinhaltigen Gewebselementen, wie z. B. des Keratins, in dem nach Perameisensäureoxydation Sulfin- und Sulfonsäuregruppen entstehen (LILLIE¹⁰, PEARSE¹²). Eine Zunahme der Färbbarkeit mit Astrablau kann weiterhin durch die Behandlung der Schnitte mit konzentrierter Schwefelsäure oder Schwefelsäuregemischen erzielt werden (GOMORI⁷, KRAMER und WINDRUM⁸). Dabei kommt es u. a. auch zu einer Veresterung der Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate, so daß auch neutrale Mucopolysaccharide und Glykoproteide basophil werden und sich mit Astrablau darstellen lassen.

f) Neutrale Polysaccharide werden im histologischen Schnitt mit Astrablau nicht angefärbt. Auch in vitro besitzen gereinigte neutrale Mucopolysaccharide keine Affinität für diesen Kupferphthalocyaninfarbstoff.

2. Es hat sich gezeigt, daß *Astrablau* — ebenso wie Alcianblau — die Zellkerne trotz ihres Gehaltes an *Nucleinsäuren nicht anfärbt*. Wir sehen darin einen Hinweis, daß wahrscheinlich auch sterische Faktoren für die Anfärbbarkeit von Bedeutung sind. Erst wenn es nach einer sauren Hydrolyse und nach Perameisensäure- oder Kaliumpermanganat-oxydation zu einer teilweisen Depolymerisierung von Nucleinsäuren gekommen ist, lassen sich Zellkerne mit Astrablau anfärben.

Saure Lipide, (oxydierte ungesättigte Fettsäuren) werden ebenso wie die Lipopigmente Ceroid und Lipofuscin mit Astrablau nicht angefärbt. Nach Behandlung mit Perameisensäure oder Kaliumpermanganatlösung zeigen sie jedoch eine deutliche Affinität für Astrablau.

3. *Anfärbung von Schleimstoffen mit Astrablau*. Da es sich bei den Schleimstoffen im menschlichen Gewebe teils um saure, teils um neutrale Mucopolysaccharide handelt, lag es nahe, die Anfärbbarkeit des mesenchymalen und epithelialen Schleims besonders zu prüfen. Dabei zeigte es sich, daß die meisten Schleimstoffe mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau bedeutend intensiver und spezifischer angefärbt werden als mit den älteren Farbstoffen, wie Bismarckbraun, Mucikarmin oder den Thiazinfarbstoffen (vgl. hierzu die ausführlichen Untersuchungen und die Diskussion von CLARA¹). Die Bezeichnung des Astrablau als „Schleimfarbstoff“ unterliegt jedoch zwei wesentlichen Einschränkungen. *Erstens* werden Strukturen gefärbt, die keinen Schleim enthalten, z. B. die Knorpelgrundsubstanz und die Mastzellengranula. Ihre Anfärbbarkeit beruht, wie bereits erwähnt, auf ihrem Gehalt an sauren Mucopolysacchariden. *Zweitens* ist nicht jeder Schleim mit Astrablau anfärbbar. So konnten wir den Magenschleim — dem ein neutrales Mucopolysaccharid zugrunde liegt — abgesehen von einer mäßigen Färbung des Oberflächenepithels, nicht anfärben. Im Gegensatz zu LISONS¹⁰ Befunden mit Alcianblau zeigten dagegen die PAS-positiven Nebenzellen im Halsteil der Fundusdrüsen eine deutliche Affinität für Astrablau.

Eine Spezifität für Schleim, wie sie STEEDMAN zunächst für Alcianblau annahm, besteht also auch für Astrablau nicht. In Anbetracht der chemischen Unterschiede zwischen den als „Schleim“ bezeichneten Zell- und Gewebsanteilen, ist es auch nicht zu erwarten, daß es überhaupt eine „spezifische“ Schleimfärbung gibt: Die allen Schleimstoffen auf Grund ihrer Polysaccharidbausteine gemeinsame Anfärbbarkeit mit Perjodsäure-Leukofuchsin besitzen auch andere kohlenhydrathaltige Strukturen, z. B. Basalmembranen, Exsudate, das Kolloid der Schilddrüse usw. Die für viele „Schleimstoffe“ kennzeichnende Fähigkeit, sich mit basischen Farbstoffen, wie Toluidinblau oder Astrablau zu verbinden, besitzen nur ein Teil von ihnen, nämlich diejenigen, die saure Mucopolysaccharide enthalten, nicht dagegen die „neutralen“ Schleime

(neutrale Mucopolysaccharide). Sie haben diese Eigenschaft zudem mit anderen Strukturen gemeinsam, die ebenfalls saure Mucopolysaccharide enthalten, ohne zu der Gruppe der Schleimstoffe zu gehören (z. B. Knorpelgrundsubstanz).

Zusammenfassend lassen sich die Eigenschaften des Astrablau in folgenden Punkten hervorheben:

1. Die Spezifität für saure Mucopolysaccharide ist bei Einhaltung von Farbstoffkonzentration und p_H sehr hoch.
2. Die Spezifität bleibt auch bei langer Färbedauer erhalten. Eine Überfärbung der Schnitte, wie sie beim Alicianblau leicht eintreten kann, ist beim Astrablau nicht zu befürchten.
3. Astrablau besitzt eine ausgeprägte Farbstärke. Die sauren Mucopolysaccharide werden daher stark und leuchtend blau gefärbt.
4. Herstellung der Farblösung und Färbemethode sind denkbar einfach. Die Farblösung ist sehr stabil; sie kann über Monate zum Färben verwendet werden.
5. Es ist möglich Dauerpräparate herzustellen. Bei Gegenfärbungen tritt kein Farbverlust ein.

Summary

A new copper phthalocyanin dye called „Astrablue“ is reported, which, because of its basicity, is ideal for the specific demonstration of acid structures in histological preparations. It could be shown with histochemical methods that the Astrablue stain is to a considerable degree specific for acid mucopolysaccharides.

The staining procedure is discussed.

Herrn Dr. H. HARMS (Bayer-Werke Leverkusen) danken wir für die freundliche Überlassung des Farbstoffs.

Literatur.

- ¹ CLARA, M.: Untersuchungen über den färberischen Nachweis des Schleims in Drüsenzellen beim Menschen. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **47**, 183—214 (1940). — ² DIETZEL, P. B.: Histochemische Untersuchungen an den Corpora amylacea des Zentralnervensystems. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **1956**, 199. — ³ FISHER, E. R., and R. D. LILLIE: The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. a. Cytochem.* **2**, 81—87 (1954). — ⁴ GEDIGK, P.: Über neue Färbeverfahren für Mucopolysaccharide und Phospholipide. *Zbl. Allg. Path. u. Path. Anat.* **95**, 486 (1956). — ^{4a} GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* **1952**, 1057—1067. — ^{4b} GEDIGK, P.: Histochemische Methoden. In *Biochemisches Taschenbuch*, S. 855—891. Berlin: Springer 1956. — ⁵ GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur Histochemie des Hämosiderins. *Virchows Arch.* **324**, 373 (1953). — Zur formalen Genese der Eisenpigmente. *Virchows Arch.* **326**, 172 (1954). — ⁶ GEDIGK, P., u. W. PROCH: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. *Beitr. path. Anat.* **116**, 124—148 (1955). — Über die Bildung organischer Substanzen in Siliciumdioxidgranulomen. *Virchows Arch.* **328**, 513 (1956). —

⁷ GOMORI, G.: The histochemical behavior of acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. a. Cytochem.* **2**, 470 (1954). — ⁸ KRAMER, H., and J. M. WINDRUM: Sulphation techniques in histochemistry with special reference to metachromasia. *J. Histochem. a. Cytochem.* **2**, 196—203 (1954). — ⁹ LILLIE, R. D.: *Histopathologic Technic and Practical histochemistry*. New York: Blackiston Comp. 1947. — ¹⁰ LILLIE, R. D., R. BANGLE and E. R. FISHER: Metachromatic basophilia of keratin after oxidation-cleavage of disulfide bonds. *J. Histochem. a. Cytochem.* **2**, 95—102 (1954). — ¹¹ LISON, L.: Alcianblue 8 G with chlorantine fast red 5 B. A technic for selective staining of mucopolysaccharides. *Stain Technol.* **29**, 131—138 (1954). — ^{12a} PEARSE, A. G. E.: The histochemical demonstration of keratin by methods involving selective oxidation. *Quart. J. Microsc. Sci.* **92**, 393—402 (1951). — ^{12b} PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied*. London: J. & A. Churchill 1954. — ¹³ STEEDMAN, H. F.: Alcian blue 8 GS, a new stain for mucin. *Quart. J. Microsc. Sci.* **91**, 477—479 (1950).

Dr. WINFRIED PIOCH, Institut für Gerichtliche Medizin,
Bonn, Wilhelmsplatz 7
