

Aus dem Ludwig-Aschoff-Haus, dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. F. BÜCHNER)

Über die Unterscheidung von zwei Lymphocytentypen im Phasenkontrastmikroskop

Von

E. GRUNDMANN

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. September 1958)

Der kleine reife Lymphocyt ist definiert als eine Zelle von der Größe des Erythrocyten mit einem sehr kompakten, angenähert runden Kern und mit einem äußerst schmalen, basophilen Cytoplasmasaum. Wie das Zellvolumen, so variieren auch die strukturellen Einzelheiten: Zahl, Größe und Färbbarkeit der Granula im Cytoplasma können verschieden sein, die Kernkontur erscheint bald glatt, bald eingedellt oder eingekerbt, und im Kerninneren sind manchmal 1—2 Nucleolen nachzuweisen. Der optische Eindruck wird jedoch von den hervorstechenden Gemeinsamkeiten bestimmt und der Lymphocyt im allgemeinen als einheitliche Zellform betrachtet (vgl. die neueste Übersicht von TROWELL). Einzelne Versuche, Form und Färbbarkeit der Cytoplasmagranula als Kennzeichen für verschiedene Lymphocytentypen zu benutzen (HU, ALTUNIC u. a.), blieben letztlich ohne Erfolg, wie auch die These, die großen Lymphocyten seien „Reizformen“ der kleinen (KLIMA), zumindest umstritten ist.

Gegen diese vorherrschende Ansicht von der Einheitlichkeit der Lymphocyten spricht die Cytomorphologie der lymphatischen Organe. Bei der Ratte [GRUNDMANN (1), (2)] und in gleicher Weise beim Menschen [GRUNDMANN (3)] geht die Lymphocytentbildung nämlich an zwei verschiedenen Stellen vor sich, und zwar einmal in den Follikelzentren, zum andern an den Sinus von Milz und Lymphknoten. Da beiden Orten eigene lymphoblastische Vorstufen angehören, können zwei in allen Reifungsstufen gut unterscheidbare Entwicklungsreihen aufgestellt werden. Auch die reife Endform in den Follikelzentren, der „Follikel-Lymphocyt“, weist mit einem relativ großen, meist mehr oder minder mittelständigen Nucleolus eine deutlich andere Kernzeichnung auf als der multinucleoläre „Sinuslymphocyt“.

Durch phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen sollen die am fixierten und gefärbten Präparat erhobenen Befunde über die Existenz zweier Lymphocytentypen überprüft und — wenn möglich — erweitert werden.

Methoden und Befunde

Kleine Stücke der lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz) von Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Goldhamstern wurden unmittelbar nach Dekapitation der Tiere lebensfrisch entnommen und entweder sofort phasenoptisch untersucht oder erst in eine bereitstehende

Lösung gebracht und dann in bestimmten Abständen aufgearbeitet. Als Aufbewahrungs- und Einschlußlösungen wurden verwandt:

- 10%ige Rohrzuckerlösung in Aqua dest.
- 10%ige Rohrzuckerlösung in Leitungswasser
- 10%ige Rohrzuckerlösung + 0,9%ige NaCl-Lösung } aa
- 10%ige Rohrzuckerlösung + molare NaCl-Lösung } aa
- 1%ige OsO₄-Lösung in Veronal-Acetat-Puffer pH 7,2—7,4 + 0,045 g Rohrzucker pro cm³
- 96%iger Alkohol + Eisessig (3:1)
- 40%ige Essigsäure

Wir machten uns dabei die Erfahrungen zunutze, die wir in einer früheren Untersuchungsreihe über die experimentelle Beeinflussung des supravitalen Kernbildes gewonnen hatten (ALTMANN und GRUNDMANN). Die Versuche mit Osmiumsäure sollten darüber hinaus die Beziehungen zum elektronenoptischen, die Beobachtungen im Alkohol-Eisessig-Gemisch die zum lichtoptischen Fixationsbild herstellen. Die Beobachtungen erstreckten sich ausschließlich auf die Lymphocyten; größere Zellen, also die lymphatischen Vorstufen und die Reticulumzellen, blieben außer Betracht.

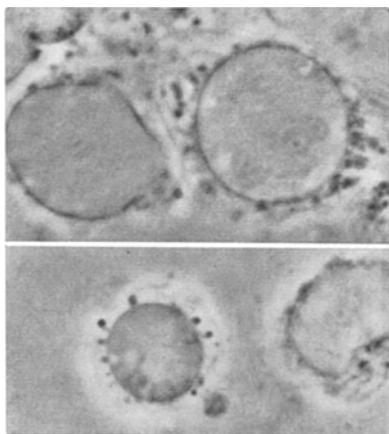


Abb. 1. Verschieden große Lymphocyten aus der Milz eines Goldhamsters, lebensfrisch in 10%iger Zuckerlösung (Aqua dest.) gequetscht. Homogene Kerne, unterschiedlich viele Cytoplasmagranula.

Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

in Reihen angeordnet liegen. Es fällt auf, daß manche Zellen sehr viele, andere nur wenige Granula besitzen (Abb. 1).

Läßt man ein stecknadelkuppengroßes Gewebsstück etwa 2 Std in Rohrzuckerlösung liegen und fertigt dann ein Quetschpräparat an, so ist vielfach das eben beschriebene Bild noch erhalten. Andere, vor allem die frei schwimmenden Zellen haben dagegen in ihrem Inneren verschiedene, scharf abgesetzte, runde Verdichtungen, die Nucleolen entsprechen. Manchmal findet sich ein großer Hauptnucleolus, oft vergesellschaftet mit der Kernmembran innen aufliegenden Randnucleolen (Abb. 2, links), während andere Kerne mehrere Nucleolen in unregelmäßiger Anordnung aufweisen (Abb. 2, rechts). Alle Zellen, die sichtbare Nucleolen haben, lassen sich einem der beiden Typen zuordnen. Dabei fällt auf, daß die großnucleoläre Form meist keine Cytoplasma-Granula besitzt, ja daß das ganze Cytoplasma fehlt, während die multinucleolären Lymphocyten runde Körnchen in der ganzen Kerncircumferenz, besonders häufig aber eine kleine Granulakappe aufweisen (Abb. 2, rechts).

b) Bei Untersuchung in 10%iger Rohrzuckerlösung in Leitungswasser sind alle Zellen kleiner. Auch jetzt ist die Kernstruktur im wesentlichen homogen und milchglasartig trüb, man sieht aber sofort nach Herstellung des supravitalen

Präparates deutliche Nucleolen. Dabei fallen wieder 2 Zelltypen auf: einer mit einem großen Hauptnucleolus ohne oder mit nur wenigen Cytoplasmagranula (Abb. 3, links), einer mit mehreren kleinen Nucleolen und vielen Granula im Cytoplasma (Abb. 3, rechts). Generell enthalten die größeren Lymphocyten mehr Granula als die kleinen (vgl. Abb. 3, oben und unten). Im Gegensatz zum Bild in 10%iger Rohrzuckerlösung in Aqua dest. (vgl. Abb. 1) sind die Granula durchweg viel kleiner und als einzelne kaum abgrenzbar. Auch sind die Nucleolen weniger scharf abgesetzt.

c) Das supravitale Zellbild in einer Mischung von *10%iger Rohrzuckerlösung mit 0,9% NaCl-Lösung* zeigt wesentlich mehr Einzelheiten im Kernraum: Außer den Nucleolen finden sich verschiedene große, meist unscharfe Kontraste, und die Kernmembran ist relativ dick. An ihrer Innenwand liegen vielfach Chromatinverdichtungen. Wiederum kann man die beiden Lymphocytentypen unterscheiden (Abb. 4). Zusätzlich zu den früheren Befunden zeigen die großnucleolären Lymphocyten an der Kernwand einen Kranz großer Randkontraste, der manchmal fädig mit dem Zentralnucleolus verbunden ist. Die Beurteilung der Cytoplasmagranula ist wesentlich schwieriger als in den vorangegangenen Untersuchungen.

d) Eine Mischung von *10%iger Rohrzuckerlösung mit molarer NaCl-Lösung* erzeugt ein ganz anderes Bild: Die Zellen sind aufgequollen, und vor allem das Cytoplasma ist stark verbreitert und schnürt manchmal kleine Blasen ab (Abb. 5). Die Granula liegen der glatten Kernmembran unmittelbar an. Man findet wieder einen Zelltyp mit wenigen, relativ großen und einen mit vielen, vergleichsweise kleinen Granula, die oft eine Kappe auf dem Kern bilden (Abb. 5, rechts). Im Inneren des Kerns liegen nur kleine Verdichtungen teils als Körnchen, teils als Fäden, und Nucleolen sind nicht sicher abgrenzbar.

e) Legt man stecknadelkuppengroße Gewebsstücke 4 Std lang in ein Gemisch von *0,045 g Rohrzucker/je cm³ in einer 1%igen Lösung von Osmiumtetroxyd* und fertigt in der gleichen Mischung ein Quetschpräparat an, so sind wie im Supravitalbild in Zucker + Aqua dest.-Zubereitung die stark vergrößerten Kerne als weitgehend homogene, milchglasartig getrübte Kugeln zu erkennen (Abb. 6), in denen man nur manchmal in einer optischen Ebene einen Nucleolus abgrenzen kann. Gut dargestellt sind die Granula im Cytoplasma, die teils als Kugelchen, teil als gerade oder im stumpfen Winkel abgeknickte Stäbchen vorliegen. Stäbchen finden sich vor allem in solchen Lymphocyten, die viele Granula besitzen (Abb. 6, rechts), während andere Lymphocyten nur einzelne, runde Körnchen im Cytoplasma aufweisen (Abb. 6, links).

f) Nach 4—5 Std Aufbewahrung in einer Mischung von *3 Teilen 96%igem Alkohol und 1 Teil Eisessig* zeigt das Quetschpräparat (in 40%iger Essigsäure) scharf konturierte Zellen (Abb. 7). Die Lymphocyten, die im Kern entweder eine

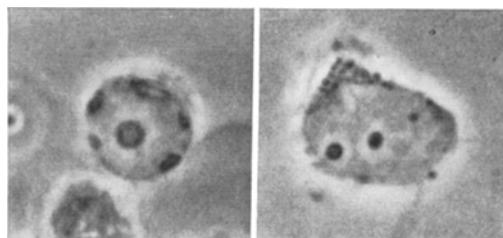


Abb. 2. Zwei Lymphocyten aus der Rattenmilz im Quetschpräparat in 10%iger Zuckerlösung (Aqua dest.), hergestellt nach 2 Std. Links ein großnucleolärer Follikel-Lymphocyt, rechts ein multinucleolärer Sinuslymphocyt. Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

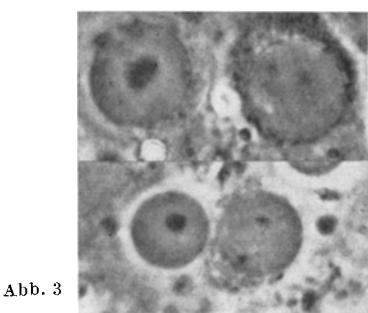


Abb. 3



Abb. 5

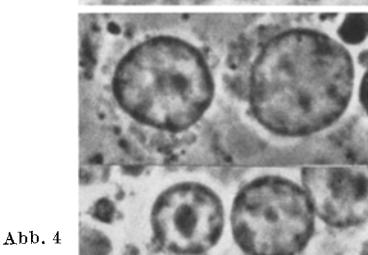


Abb. 4



Abb. 6

Abb. 3. Lymphocyten der Goldhamstermilz, lebensfrisch in 10 %iger Zuckerslösung (Leitungswasser) gequetscht. Links großnucleoläre Follikel-Lymphocyten, rechts multinucleoläre Sinuslymphocyten, jeweils zwei Größenklassen untereinander. Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

Abb. 4. Lymphocyten aus einem Kaninchenlymphknoten, lebensfrisch in einem Gemisch von 10 %iger Zuckerslösung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung zu gleichen Teilen gequetscht. Links großnucleoläre Follikel-Lymphocyten, rechts multinucleoläre Sinuslymphocyten, jeweils zwei Größenklassen untereinander. Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

Abb. 5. Zwei Lymphocyten in einer Mischung von 10 %iger Zuckerslösung mit molarer NaCl-Lösung zu gleichen Teilen. Links ein Follikel-Lymphocyt, rechts ein Sinuslymphocyt. Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

Abb. 6. Drei Lymphocyten in einer Mischung von 1 %igem Osmiumtetroxyd mit Rohrzucker. Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

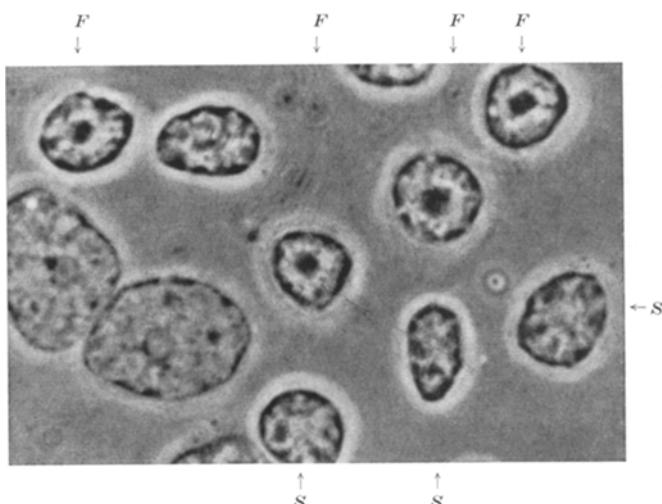


Abb. 7. Großnucleoläre Follikel-Lymphocyten (F) und multinucleoläre Sinuslymphocyten (S) sowie zwei Reticulumzellen aus einem Ratten-Lymphknoten. Quetschpräparat in 40 %iger Essigäure nach 5stündiger Fixation in einem Alkohol(96 %)-Eisessig-Gemisch 3:1, Phasenkontrast, Vergr. 1200fach

große, nucleoläre Zentralverdichtung oder mehrere, unregelmäßig verteilte Kontraste enthalten, sind jetzt wieder als 2 Typen unterscheidbar. Nach einiger Übung gelingt es leicht, jeden Lymphocyten einer der beiden Formen zuzuordnen. Das Cytoplasma ist geschwunden.

Erörterungen

Die Methode, überlebende Zellen in verschiedenen, eventuell wechselnden Medien zu untersuchen, hat nicht nur das Verständnis des für alle Dauerpräparate unumgänglichen Fixationsartefaktes gefördert, sondern darüber hinaus wesentliche Einblicke in den Feinbau der Zelle, vor allem des Zellkernes, ermöglicht. So wiesen die in ihrem Ansatz neuartigen Studien von BELAR (2) und wenige Jahre später die Versuche von ZEIGER (1) nach, daß der Vitalzustand des Zellkernes äußerst labil und schon durch geringe Milieuänderungen zu beeinflussen ist. Das konnte nach Einführung der Phasenkontrastmikroskopie vielfältig bestätigt werden (z. B. ZOLLINGER, ANDERSON und WILBUR, STOCKINGER, BÖKE, ENDERLIN, ALTMANN und GRUNDMANN u. a.), denn auch das phasenoptische Bild ist keinesfalls konstant sondern jeweils Ausdruck einer Reaktion der Zellbestandteile auf das einwirkende Milieu. Stark saure Lösungen bedingen z. B. eine Entquellung des chromosomalen Kerngerüstes. Rohrzuckerlösungen dagegen in den verschiedensten Konzentrationen können den Zellkern als ganzen sowie die ihn aufbauenden Chromosomen quellen lassen. Eine Entquellung äußert sich morphologisch durch ein deutliches Hervortreten der vom Schnittbild her gewohnten fäden-körnigen Innenzeichnung des Kernes, eine Quellung als homogene, milchglasartige Trübung des „Karyoplasmas“, worunter man seit BELAR (1) den gesamten Innerraum des Zellkernes — von den Nucleolen abgesehen — versteht. Systematische Untersuchungen dieser zum Teil reversiblen Vorgänge (RIS und MIRSKY, ANDERSON und WILBUR, ALTMANN und GRUNDMANN) haben übereinstimmend gezeigt, daß die entscheidenden Veränderungen allein die Chromosomen betreffen. Wahrscheinlich füllen diese in den meisten Kernen das „Karyoplasma“ vollständig aus, und ein freier „Kernsaft“ tritt erst nach artifizieller Dehydratation der Chromosomen auf (ALTMANN).

Diesen Befunden gliedern sich die hier mitgeteilten Beobachtungen lückenlos an: Einschluß der Lymphocyten in 10%iger Rohrzuckerlösung bedingt eine homogene Trübung des ganzen Kernes als Ausdruck einer Quellung (Abb. 1). Zugabe von Salzlösung, die ja bereits eine leichte Entquellung bewirkt, läßt in dem verkleinerten Kern unscharf begrenzte Kontraste auftreten (Abb. 4), und die Anwendung eines Alkohol-Eisessig-Gemisches erzeugt recht scharf abgesetzte Verdichtungen (Abb. 7). Hierbei handelt es sich um einen typischen Fixationsartefakt, der aber nicht als willkürliche Zerstörung der Bauelemente, sondern als ein Sichtbarmachen der sonst nicht darstellbaren Strukturen zu werten ist [ZEIGER (2)], also als ein „Äquivalentbild“ (NISSL) des Vitalzustandes.

Neben diesen äußeren Faktoren sind innere Struktureigentümlichkeiten für das Kernbild entscheidend, vor allem die Bereitschaft der Chromosomen, auf einen entsprechenden Eingriff ihr Bindungswasser abzugeben. Diese Bereitschaft zeigt nun regionale Unterschiede im Kern, und so kommt es, daß einzelne Kernpartien stärker schrumpfen als andere. Erst dadurch entstehen die beschriebenen Verdichtungen (vgl. ALTMANN u. GRUNDMANN), die zum großen Teil den „heterochromatischen Chromozentren“ von HEITZ (1), (2) entsprechen, genauer den „sekundären“ Chromozentren. Daß es sich hierbei wirklich um chromosomale Kondensationen handelt, zeigt die Beobachtung, wonach molare NaCl-Lösung, welche die chromosomale Desoxyribonucleinsäure aufzulösen vermag (vgl. z. B. RIS und MIRSKY), das Kernbild zerstört (Abb. 5, s. auch ZOLLINGER, ANDERSON und WILBUR, BÖKE, ENDERLIN, ALTMANN und GRUNDMANN).

Relativ unbeteiligt scheinen dabei die Nucleolen zu sein, denn man kann sie in Zuckerlösung — allerdings erst nach einiger Zeit — ebenso darstellen (Abb. 2) wie in saurer Fixierungsflüssigkeit (Abb. 7). Sie fehlen bei lebensfrischer Präparation in Zuckerlösung (Aqua dest.) (Abb. 1), allerdings auch im Zucker-Osmium-Gemisch (Abb. 6). Schon bei Anwendung einer Zuckerlösung in chlorhaltigem Leitungswasser sind die Nucleolen aber sofort deutlich (Abb. 3), ja, diese Methode eignet sich besonders gut zur isolierten Darstellung der Kernkörperchen in überlebenden Zellen.

Die durch „heterochromatische“ Kondensation und durch die Nucleolen gebildete Kerninnenzeichnung besitzt, wie bereits von HEIDENHAIN festgestellt worden war, in gewissen Grenzen einen „organologischen“, genauer einen gewebspezifischen Charakter (vgl. auch ALTMANN). Im gleichen Sinne konnten wir in den hier vorgelegten Beobachtungen mit allen angewandten Methoden, soweit sie das Kerninnere, wenigstens die Kernkörperchen, sichtbar machten, 2 Lymphocytentypen abgrenzen, von denen einer durch einen relativ großen Hauptnucleolus, der andere durch mehrere kleine, nucleolenartige Chromatinverdichtungen gekennzeichnet ist (vgl. Abb. 2—4, 7). In vorangegangenen Untersuchungen konnten beide Typen bei der jungen Ratte auch im Schnittpräparat unterschieden werden, und es hatte sich ergeben, daß die großnucleoläre Form in den Follikeln, die multinucleoläre an den Sinus von Milz und Lymphknoten gebildet wird [GRUNDMANN (1), (2)]. Wir hatten deshalb „Follikel-Lymphocyten“ von „Sinuslymphocyten“ unterschieden, und die gleiche Einteilung erbrachten auch analoge Untersuchungen am lymphatischen Gewebe des Menschen [GRUNDMANN (3)]. Da man mit Hilfe einer modifizierten Methylenblaufärbung (STOCKINGER und KELLNER) die Nucleolen der Lymphocyten auch im Ausstrichpräparat gut darstellen kann, haben wir die quantitative Verteilung beider Lymphocytentypen bei 10 Normalpersonen untersucht [GRUNDMANN (3)]. Es ergab sich, daß $\frac{2}{3}$ aller Lymphocyten zum Follikeltyp, $\frac{1}{3}$ zum Sinustyp gehören, und zwar in nahzu konstanter Relation.

In den hier vorgelegten Beobachtungen findet die daraus abgeleitete Gliederung der Lymphocyten in 2 Systeme noch eine weitere Stütze in dem Verhalten der Cytoplasmagranula. Auch deren Aussehen ist charakteristisch von dem angewandten Einschlußmittel abhängig: Sie quellen z. B. in Zuckerlösungen zu relativ kontrastreichen, großen, fastzählbaren Körnchen an (Abb. 1). Daß es sich wenigstens zum Teil um Mitochondrien handelt, ergaben die Beobachtungen im Zucker-Osmiumsäure-Gemisch, wobei man neben Körnchen vielfach ziemlich große Stäbchen abgrenzen konnte (Abb. 6), die den lichtoptisch und auch elektronenoptisch (z. B. MILLER) in Lymphocyten dargestellten Mitochondrien entsprechen. Ein Vergleich der beiden Lymphocytentypen ergibt, daß die großnucleolären Follikel-Lymphocyten durchweg weniger Granula besitzen als die multinucleolären Sinuslymphocyten, denen die Granula oft als eine breite Kappe aufsitzten (Abb. 2, 3, 5, 6). Die Kappenbildung als solche ist nicht für diese Zellform spezifisch, denn sie findet sich auch bei Follikel-Lymphocyten. Wenn die Mitochondrien aber unter Einfluß einer Zuckerlösung anschwellen (vgl. ZOLLINGER, ENDERLIN u. a.) und schließlich zerplatzen, erweist sich ein Teil der Granula der Sinuslymphocyten als wesentlich widerstandsfähiger, d. h. in den Sinuslymphocyten können noch Granula nachgewiesen werden, wenn die Follikel-Lymphocyten ihr Cyto-

plasma schon verloren haben (Abb. 2). Zahlenrelationen der Granula zu bestimmen, ist uns wegen einer außerordentlichen Streuung nicht gelungen; granulafreie Lymphocyten (ALTUNIC) haben wir nicht beobachtet.

Zusammenfassung

Kleine Stücke lebensfrisch entnommener lymphatischer Gewebe von verschiedenen Laboratoriumsnagetieren werden in unterschiedlichen Einschlußflüssigkeiten phasenkontrastmikroskopisch untersucht, und zwar in 10%iger Rohrzuckerlösung (in Aqua dest. sowie in Leitungswasser) im Gemisch mit 0,9%iger oder mit molarer NaCl-Lösung sowie in einer Alkohol-Eisessig-Mischung. Das Bild der Lymphocyten ist von dem jeweiligen Medium abhängig und für dieses weitgehend spezifisch. Alle Präparationsmethoden, die Einzelheiten der Kernstrukturen, mindestens die Nucleolen darstellen, erlauben eine Differenzierung der Lymphocyten in einen großnucleolären und in einen multinucleolären Typ. In Analogie zu Befunden an Schnittpräparaten werden die einen als Follikel-Lymphocyten, die anderen als Sinuslymphocyten angesprochen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal bietet das Cytoplasma, das bei der großnucleolären Form nur relativ wenige Granula besitzt, die unter der quellenden Wirkung von Zuckerlösungen rascher und vollständiger zerstört werden als die vielen, dicht liegenden Granula der multinucleolären Sinuslymphocyten.

Summary

Small fragments of fresh lymphatic tissue from various laboratory rodents were examined by phase contrast microscopy using various media: — a 10% sucrose solution of both distilled and tap water, — a mixture of 10% sucrose solution with both 0.9% NaCl and molar NaCl solutions and with a glacial acetic acid alcohol compound. The appearance of lymphocytes is dependent upon and specific for its medium. In the technics used in which the details of the nucleus are visible, or at least the nucleolus, a differentiation can be made of macronucleolar and multinucleolar types. These forms are analogous to the follicle and the sinus lymphocytes respectively, as seen in paraffin sections. A further differential point are the cytoplasmic granules. In the macronucleolar forms they are relatively sparse. They are more readily and quickly destroyed by the sucrose solution than are the more abundant compact granules in the multinucleolar sinus lymphocytes.

Literatur

- ALTMANN, H. W.: Allgemeine Morphologie der Zelle. In Handbuch der gesamten Hämatologie, 2. Aufl., Bd. 1, S. 85—128. München: Urban & Schwarzenberg 1957. — ALTMANN, H. W., u. E. GRUNDMANN: Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen zur Vitalstruktur tierischer Zellkerne. Beitr. path. Anat. **115**, 313—347 (1955). — ALTUNIC, A.: Beobachtungen über das Verhalten der Cytoplasmagranula der Lymphocyten im Phasenkontrastmikroskop und May-Grünwald-Präparat im Verlauf verschiedener Infektionskrankheiten und im Zusammenhang mit der Antikörperbildung. Klin. Wschr. **1955**, 848—851. — ANDERSON, N. G., and K. M. WILBUR: Studies on isolated cell components. IV. The effect of various solutions on the isolated rat liver nucleus. J. gen. Physiol. **35**, 781—795 (1952). — BELAR, K.: (1) Die cytologischen Grundlagen der Vererbung. In Handbuch der Vererbungswissenschaft, Bd. I. Berlin: Gebrüder Bornträger 1928. — (2) Über die reversible Entmischung lebenden Plasmas.

Protoplasma **9**, 209—244 (1930). — BÖKE, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. **38**, 428—454 (1953). — ENDERLIN, M.: Phasenmikroskopische Untersuchungen über Umgebungswirkungen auf die quergestreiften Muskelfasern. Acta anat. (Basel) **17**, 1—46 (1953). — GRUNDMANN, E.: (1) Cytologische Untersuchungen über Formen und Orte der Lymphocytentriierung bei der Ratte. Verh. dtsch. Ges. Path. **41**, 261—266 (1957). — (2) Die Bildung der Lymphocytenten und Plasmazellen im lymphatischen Gewebe der Ratte. Ein cytologischer Beitrag zur Blutzellreifung. Beitr. path. Anat. **119**, 217—262 (1958). — (3) Der morphologische Nachweis von zwei Lymphocytensystemen beim Menschen. Klin. Wschr. 1959 (im Druck). — HEIDENHAIN, M.: Plasma und Zelle. Jena: Gustav Fischer 1907. — HERTZ, E.: (1) Heterochromatin, Chromozentren, Chromosomen. Ber. dtsch. bot. Ges. **47**, 274—284 (1929). — (2) Die Herkunft der Chromozentren. Planta (Berl.) **18**, 571—636 (1932). — HU, C. H.: Studies on mature and immature lymphoid cells of spleen, lymph nodes and thymus of normal rats infected with Trypanosoma Brucei. Amer. J. Path. **10**, 29—41 (1934). — KLIMA, R.: Grundlagen für eine Neuordnung der Hämatologie cellulärer Reaktionen im lymphatischen Apparat. Wien. Z. inn. Med. **33**, 125—135 (1952). — MILLER, F.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an weißen Blutzellen. Verh. dtsch. Ges. Path. **40**, 208—220 (1956). — NISSL, F.: Nervensystem. In KRAUSES Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, 2. Aufl. Berlin 1910. — RIS, H., and A. E. MIRSKY: The state of the chromosomes in the interphase nucleus. J. gen. Physiol. **32**, 489—501 (1949). — STOCKINGER, L.: Das Kernkörperchen. Protoplasma **42**, 365—413 (1953). — STOCKINGER, L., u. G. KELLNER: Der Lymphocytenucleolus. I. Mittl. Die Darstellung und Bedeutung des Nucleolus. Wien. Z. inn. Med. **33**, 135—141 (1952). — TROWELL, O. A.: The lymphocyte. Int. Rev. Cytol. **7**, 233—293 (1958). — ZEIGER, K.: (1) Zum Problem der vitalen Struktur des Zellkernes. Z. Zellforsch. **22**, 607—632 (1935). — (2) Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden: Theodor Steinkopff 1938. — ZOLLINGER, H. U.: Cytologic studies with the phase microscope. III. Alterations in the nuclei of „resting“ and dividing cells induced by means of fixative, anisotonic solutions, acids, and alkali. Amer. J. Path. **24**, 797—811 (1948).

Doz. Dr. E. GRUNDMANN, Freiburg i. Br., Pathologisches Institut der Universität,
Albertstraße 19