

Zur Pathogenese der senilen Amyloidose

DANKWART STILLER und DETLEF KATENKAMP

Pathologisches Institut der Friedrich Schiller-Universität Jena
(Direktor: Prof. Dr. F. Bolck)

Eingegangen am 15. November 1970

On the Pathogenesis of Senile Amyloidosis

Summary. Investigations on the pathogenesis of senile amyloidosis were carried out on the hearts of old men using histochemical, polarizing and fluorescence microscopic methods.

The deposition of amyloid fibrils proceeds by orienting with pre-existent collagenous fibres, during which an increase in the number of fibre-bound sulfated mucopolysaccharides may be observed. During progressive formation of amyloid, the collagenous fibres are replaced successively by amyloid fibrils, and the mucopolysaccharides increase in number coincidentally. Eventually no collagenous fibres can be detected by polarizing microscopy in larger deposits; at this time the characteristic fluorescent metachromasia by acridine orange is completely developed.

It is supposed that in senile amyloidosis these processes take place during the physiological metabolism of connective tissue and that principally no new structural units originate, although an abnormal mucopolysaccharide is produced. The causes of senile amyloidosis are discussed, and a model for it proposed.

Zusammenfassung. Es wurden Untersuchungen zur Pathogenese der senilen Amyloidose an Herzen alter Menschen mittels histochemischer, polarisations- und fluoreszenzmikroskopischer Methoden durchgeführt. Die Ablagerung von Amyloidfibrillen erfolgt gerichtet an präexistenten Kollagenfasern, wobei eine Vermehrung fasergebundener sulfatierter Mucopolysaccharide nachzuweisen ist. Im Verlaufe einer fortschreitenden Amyloidbildung kommt es zum sukzessiven Ersatz der Kollagenfilamente durch Amyloidfibrillen und einer weiteren Erhöhung des Mucopolysaccharidgehaltes. Schließlich sind im größeren Amyloiddepositen polarisationsoptisch keine Kollagenfasern mehr nachzuweisen, während die charakteristische Fluoreszenzmetachromasie mit Acridinorange voll ausgebildet ist. Es wird gefolgt, daß dieser Vorgang bei der senilen Amyloidose im Rahmen des physiologischen Bindegewebsstoffwechsels abläuft und daß keine prinzipiell neuen Struktureinheiten gebildet werden, jedoch die Synthese eines anomalen Mucopolysaccharides vorliegt. Ursachen und ein Modell der senilen Amyloidose werden diskutiert.

Dem Amyloidproblem ist in den letzten 20 Jahren verstärkt Aufmerksamkeit gewidmet worden. Gleichwohl gibt es noch kein allgemein akzeptiertes Modell der formalen Pathogenese. Die Aufklärung dieser Fragestellung wird ohne Zweifel durch die Tatsache erschwert, daß trotz einheitlicher fibrillärer Grundstruktur (Lit. bei Katenkamp und Stiller, 1970) eine unterschiedliche Zusammensetzung der amyloiden Substanz in ihrer Gesamtheit vorliegt (Sorenson und Bari, 1968).

Die ältere Ansicht vom Amyloid als Antigen-Antikörper-Präcipitat ist durch die Theorie der lokal-cellulären Entstehung ersetzt worden (Lit. bei Cohen, 1965, und bei Letterer, 1968). Dabei wird eine ursächliche Beteiligung von Fibroblasten (Gafni u. Mitarb., 1966; Shibolet u. Mitarb., 1967), Endothelzellen (Hjort und Christensen, 1961; Cohen u. Mitarb., 1965), reticulo-endothelialen Zellen (Battaglia, 1962; Heefner und Sorenson, 1962; Gueft und Ghidoni, 1963; Christensen u. Mitarb., 1963; Uchino, 1967; Teilum, 1968; Ben-Ishay und Zlotnick,

1968), Plasmazellen (Teilum, 1956; Caesar, 1960) bzw. von mehreren der genannten Zelltypen (Zucker-Franklin und Franklin, 1970) angenommen. In Analogie zur Kollagensynthese soll die Fibrillenpolymerisation oder -aggregation unmittelbar nach Sekretion eines löslichen „Präamyloid“ extracellulär in Nachbarschaft der Zellwand erfolgen (Catchpole, 1968; Benditt, 1968), wenngleich besonders bei experimentellen Amyloidosen auch intracellulär Amyloidfibrillen gesehen wurden (Ranlov und Wanstrup, 1967). Die Annahme eines im Blut zirkulierenden „precursors“ wird heute allgemein abgelehnt (Hultgren u. Mitarb., 1967).

Im Hinblick auf die Definition der Amyloidosen (perikollagene und periretikuläre Typen — Missmahl und Gafni, 1964) erhebt sich die Frage nach den Beziehungen des Amyloids in seiner Gesamtheit sowie seiner fibrillären Grundtextur zu präexistenten Faserstrukturen. Da im Herzen alter Menschen bei fehlender Grundkrankheit ausschließlich der angeborenen Formen sowohl periretikuläre (Jones und Frazier, 1950) als auch perikollagene Ablagerungsformen (Baghirzade, 1967; Beneke und Mohr, 1969) beschrieben wurden, erschien uns für die Klärung dieser Problematik die systematische Untersuchung des Myokard geeignet. Allgemein stellt sich bei der Amyloidbildung außerdem die Frage nach einem Umbau präexistenter (Faser-)Strukturen oder nach einer pathologischen Faserneubildung. Aus diesem Grunde wurden Herzen über 60jähriger ohne und mit unterschiedlich ausgeprägter Altersamyloidose histochemisch, fluorescenz- und polarisationsoptisch analysiert.

Material und Methode

Aus dem laufenden Obduktionsgut wurden 100 menschliche Herzen von über 60jährigen zur Untersuchung herangezogen, wobei darauf geachtet wurde, daß keine Grundkrankheit vorlag, die eine sekundäre Amyloidose verursachen kann, wie rheumatoide Arthritis, Osteomyelitis, Tuberkulose u.a. Des weiteren wurden Herzen mit entzündlichen Veränderungen oder frischen Infarkten von diesen Untersuchungen ausgeklammert. Die Herzen wurden 8—24 Std post mortem entnommen und in 10 % igem neutralen Formalin fixiert. Die Gewebsproben aus den verschiedenen Herzregionen wurden so ausgewählt, daß folgende Abschnitte zur Untersuchung gelangten: Herzohren und Vorhöfe (rechts und links) einschließlich der Gegend des Sinus- sowie Aschoff-Tawara-Knotens, rechter und linker Ventrikel, muskuläres Kammerseptum einschließlich der Gegend des Hisschen Bündels, Aorten- und Mitralklappe mit entsprechenden Teilen des Anulus fibrosus sowie rechte und linke Coronararterie.

Das Material wurde in üblicher Weise in Paraffin eingebettet und aufgearbeitet. Überprüfung des gesamten Materials mittels der Thioflavin-S-Färbung als Suchmethode für Amyloid (Stiller und Katenkamp, 1970) und Anfertigung folgender Färbungen: Hämaoxylin-Eosin, Elastika-van Gieson, alkalische Kongorotfärbung (Puchtler u. Mitarb., 1962). Bei einem Teil der Fälle wurde außerdem die Retikulinfaserdarstellung nach Gömöri ausgeführt.

Auswahl geeigneter Fälle und weitere Aufarbeitung.

1. Histochemische Reaktionen

PAS-Reaktion (1 % Perjodsäure, 10 min, 20° C, Schiffsches Reagens nach Graumann), kolloidale Eisenbindungsreaktion nach Hale in den Modifikationen nach G. Müller und nach Mowry sowie Kombination von Eisenbindungs- und PAS-Reaktion (Ritter-Oleson), Alcianblaufärbungen pH 0,5, 1,0, 1,5 und 2,5 sowie Kombination Alcianblau pH 2,5-PAS-Reaktion (Spicer und Henson, 1967).

2. Fluorescenzmikroskopische Untersuchungen

Fluorochromierungen mit Thioflavin S sowie Acridinorange bei pH 0,5 und 1,0 (Ausführung s. Schwartz, 1964, bzw. Stiller u. Mitarb., 1970).

Fluorescenzmikroskop: Universalforschungsmikroskop NU des VEB Carl Zeiss, Jena; Anregungsfilter: Kombination UG₁ und BG₁₂, Sperrfilter: GG₉.

3. Polarisationsoptische Untersuchungen

a) Durchmusterung der kongorotgefärbten Schnitte zwischen gekreuzten Polars,
 b) Entparaffinierung 10 μ dicker Gewebsschnitte (Methanol-Chloroform 1:1, 12 Std, 60° C — Scheuner, 1968) und nachfolgend Phenol- bzw. Rivanolvorbehandlung.

Phenolreaktion: Imbibition der Präparate mit einem 50 %igen Phenol-Xylol-Gemisch und Messungen des Gangunterschiedes vor und nach Phenoleinwirkung. Errechnung des Phenolquotienten a/b (a = Wert der negativen, b = Wert der positiven Doppelbrechung).

Rivanolreaktion: Ausführung nach Németh-Csóka (1960); Färbung der entparaffinierten Schnitte mit Rivanollösung 10 min (mit Michaelispuffer pH 3 10fach verdünnte 0,1 m Rivanollösung), Abtrocknen mit Filterpapier, Aufhellen in Terpentinöl und Eidecken in Canada-balsam.

Polarisationsmikroskop: Universalforschungsmikroskop NU des VEB Carl Zeiss, Jena. Gemessen wurde im weißen Licht, Gips Rot I zur Bestimmung des Vorzeichens der Doppelbrechung, quantitative Gangunterschiedmessungen erfolgten mit einem Lambda/8-Kompen-sator nach Brace-Köhler¹.

Ergebnisse

Die morphologischen Befunde sind sowohl zwischen den einzelnen Herzen als auch in den verschiedenen Regionen des jeweiligen Organes unterschiedlich. Häufig finden sich bei über 70jährigen Vernarbungen im Myokard offenbar als Folge abgelaufener entzündlicher Veränderungen oder hypoxischer Schäden. In solchen Regionen sind neben dicht gepackten kollagenen Fasern Fibrocyten und Fibroblasten, Cardiohistiocytes sowie einzelne Lymphocyten vorhanden. An anderen Stellen sind aber trotz vermehrter und vergrößerter Fasern nur vereinzelt Mesenchymzellen erkennbar. Besonders hervorzuheben sind Veränderungen der Herzohren; die Skala reicht hier einerseits von ödematösen Grundsubstanzverquellungen bis zur Sklerosierung, andererseits sind nicht selten lympho-histio-cytäre Infiltrate mit nachfolgender reparativer Faserbildung vorhanden. Plasmazellen wurden dagegen in derartigen Arealen nicht beobachtet.

Mit Kongorot färben sich bei den meisten Herzen besonders im Bereich der Herzohren offenbar kollagene Fasern rot. Die Farbwerte reichen dabei von zart-rosa bei dünnen Faserelementen bis tiefrot bei sehr dicken Faserstrukturen. Auch Perimysium und Capillaren weisen in vielen Fällen eine Rottingierung auf. Gelegentlich finden sich schollige kongorotpositive Herde, die zum Teil atrophische Muskelfasern einschließen und in welche rottingierte Fasern einmünden.

Die Überprüfung der kongorot gefärbten Schnitte im polarisierten Licht ergibt eine anomale grüne Polarisationsfarbe zahlreicher, besonders subendothelial gelegener faseriger Strukturen und der angrenzenden Teile des Perimysiums. Analog verhalten sich größere kongorotpositive Deposite, die ebenfalls eine topische Bevorzugung blutstromnah gelegener Abschnitte erkennen lassen. Allerdings ist bemerkenswert, daß nicht alle mit Kongorot gefärbten Strukturen diese anomale Polarisationsfarbe zeigen, ein Befund, der die Unspezifität der Kongorottfärbung und die Bedeutung des Polarisationsmikroskopes bei der Amyloiddiagnostik unterstreicht (Rakow, 1969).

Nach Thioflavin-S-Fluorochromierung leuchten die im polarisierten Licht grün dargestellten Gewebelemente gelb auf. Jedoch kommen durch die wesentlich empfindlichere Fluoreszenzmethode bereits Strukturen zur Darstellung, die mit

¹ Herrn Dipl.-Ing. Bergner, Fa. Carl Zeiss, Jena, haben wir für die freundliche Überlassung des Meßkompasses vielmals zu danken.

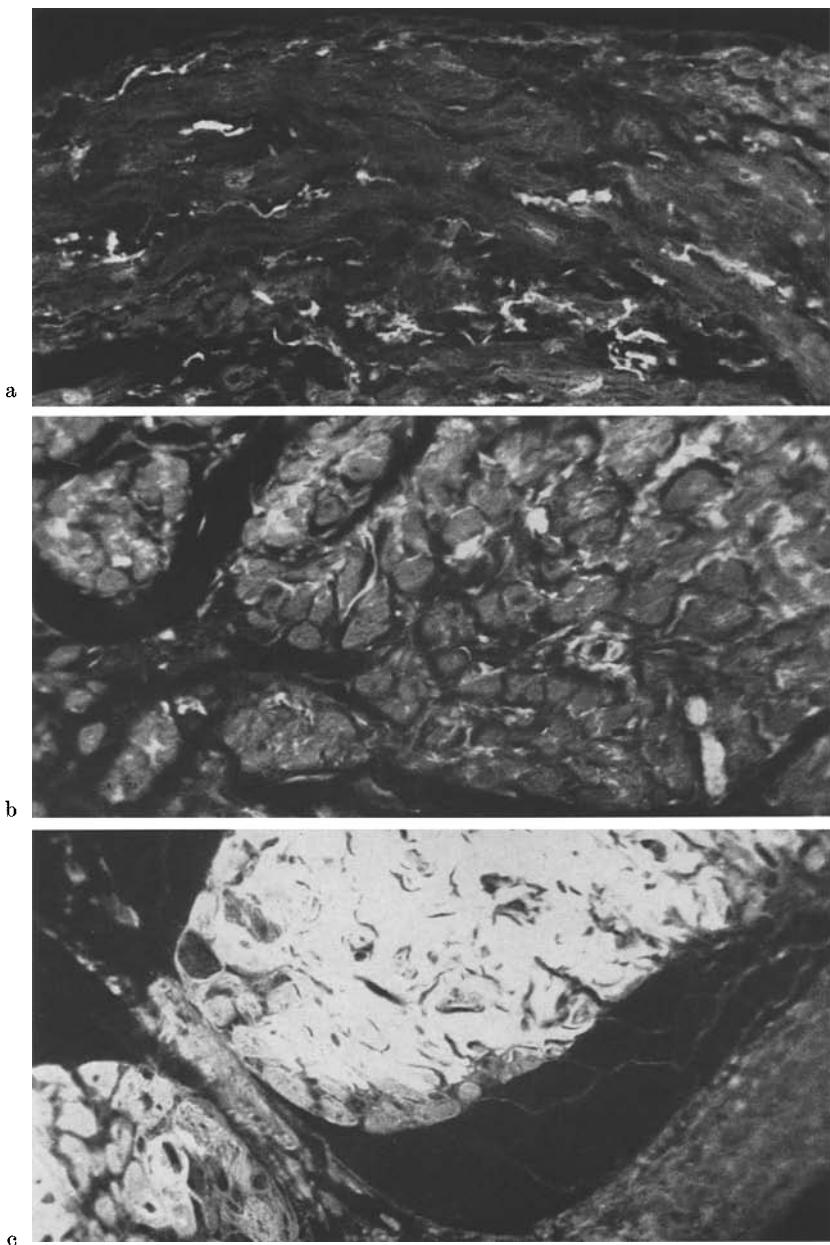


Abb. 1a—c. Verschiedene Stadien der Amyloidablagerung im Herzohr, dargestellt mittels Thioflavin S. a Zahlreiche feinste Fasern leuchten kräftig gelb auf. b Zunahme der Amyloidablagerungen mit teilweiser Umscheidung der Herzmuskelfasern. c Grobe schollige Ablagerungen; neben umhüllten Herzmuskelfasern finden sich große Deposite; links unten positive kleinere Arterienwandungen

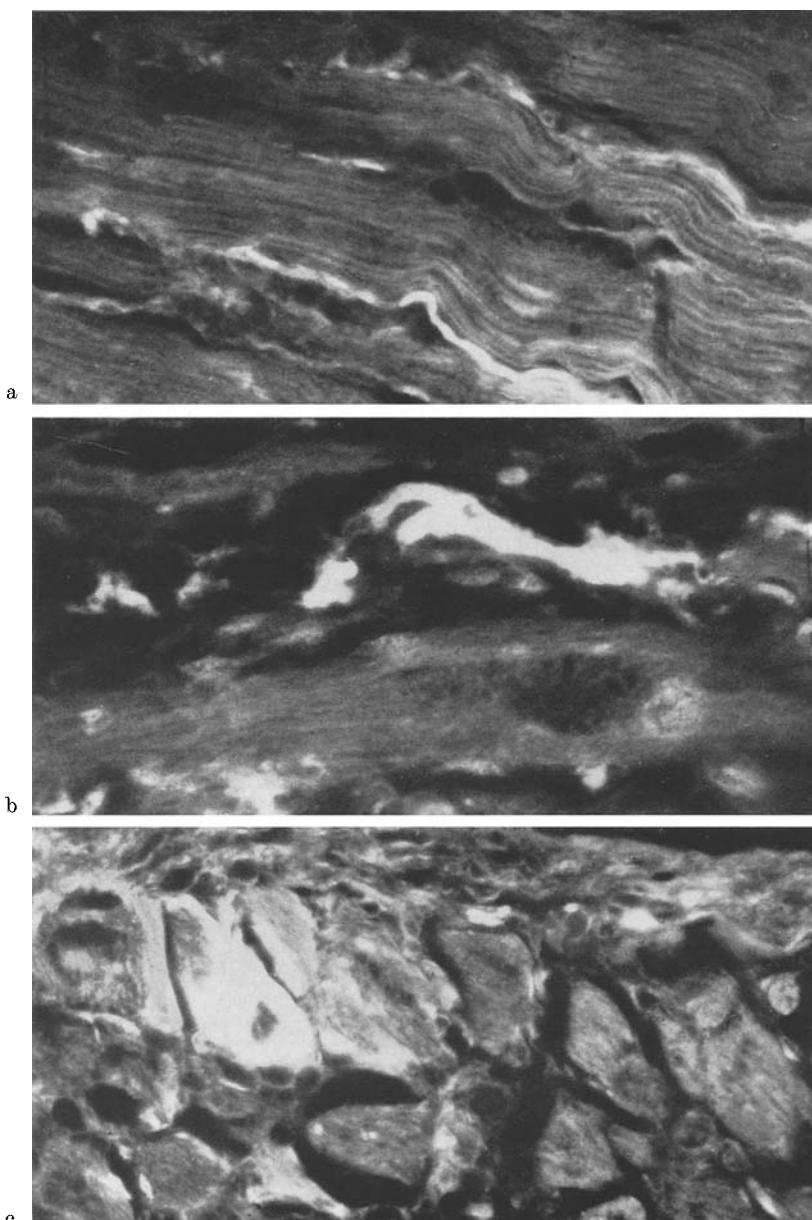


Abb. 2a—c. Darstellung des Ersatzes kollagener Fasern durch Amyloid, beginnend mit zarten Ablagerungen (a) über plumpe Faserverdickungen (b) zu massiven Ablagerungen zwischen und um Herzmuskelfasern

der Kongorot-Polarisations-Methode noch nicht sichtbar sind (Abb. 1). So fallen zusätzlich zahlreiche feinste gelbe Fasern auf. Sehr gut lässt sich an geeigneten Stellen die kontinuierliche Entwicklung von dünneren über dickere gelb fluoreszierende Fasern bis zu größeren Depositen verfolgen (Abb. 2).

Besonders häufig werden diese Veränderungen in den Herzohren und seltener subendokardial im Vorhof- und Ventrikelmyokard angetroffen, können aber unabhängig von der Lokalisation prinzipiell überall ablaufen, so daß entsprechend der hier aufgeworfenen Fragestellung von einer besonderen quantitativen-topischen Auswertung zunächst Abstand genommen wurde.

Synchron mit dem Auftreten erster Thioflavin-S-positiver Strukturen tritt eine Änderung des Mucopolysaccharidgehaltes ein, indem an diesen veränderten Fasern eine deutliche Zunahme sulfatgruppenhaltiger Polysaccharidsäuren vorliegt. Dies geht aus den kräftig positiven Alcianblaufärbungen bei pH 0,5—1,5 hervor. Entsprechend der negativen oder eben nur angedeuteten Alcianblaufärbung bei pH 2,5 können freie Carboxylgruppen kaum vorliegen. Eine Bindung kolloidalen Eisens findet, wie auch von anderen mesenchymalen Gewebsorten bekannt (Schmidt-Matthiesen, 1965), im Gegensatz zur Alcianblaufärbung statt. Mit zunehmender Ablagerung sind perjodreaktive Gruppen in stärkerem Maße vorhanden, so daß bei Kombination kolloidalen Eisens bzw. Alcianblau mit der PAS-Reaktion die PAS-Färbung überwiegt. Die groben scholligen Depositen sind am stärksten PAS-positiv, während eine kräftig positive Alcianblaufärbung nur bei pH 0,5 anzutreffen ist. Mit steigendem pH-Wert ist die Alcianophilie in den Zentren der Depositen vermindert und nur noch in den Randsäumen eindeutig faßbar. Die Fluorochromierung mit Acridinorange erbringt bei niedrigen pH-Werten (0,5 und 1,0) in den plumpen herdförmigen Ablagerungen eine deutliche Rotmetachromasie, wogegen dicke Fasern nur schwach rötlich fluorescieren und feine Fasern, Perimysium sowie kleinere Gefäße ohne Fluoreszenzmetachromasie sind.

Die *Phenolimbibierung* ergibt eine Umkehr des Vorzeichens der Gesamtdoppelbrechung bei den beschriebenen kongorot- und thioflavinpositiven Strukturen. Bei der quantitativen Auswertung findet sich ein unterhalb des Normalwertes von 1,35 (Jobst, 1955) gelegener Phenolquotient. Die ermittelten Werte schwanken zwischen 0,84 und 0,56, wobei sich die tieferen Werte bei den dickeren Fasern finden. Größere Depositen lassen eine Phenolreaktion vermissen. Leider lieferten die Gangunterschiedsmessungen rivanolbehandelter Schnitte nicht die erhofften quantitativen Aussagen über den Mucopolysaccharidgehalt, da sich kein Unterschied der Doppelbrechung vor und nach Rivanolimbibierung ergab.

Mit der Versilberung nach Gömöri waren signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gewebsschnitten bezüglich der beschriebenen Faseralterationen nicht zu erheben.

Besprechung der Befunde

Die faserigen Strukturen der untersuchten Herzen, die nach Kongorottfärbung im polarisierten Licht eine anomale grüne Polarisationsfarbe zeigen und nach Thioflavin-S-Fluorochromierung gelb aufleuchten, enthalten Amyloid, da beide Färbeverfahren in ihrer Kombination weitgehend spezifisch für Amyloid sind (Schott, 1965; Wright u. Mitarb., 1969).

Aus der kollagenspezifischen Umkehr der Doppelbrechung nach Phenolimbibition (Missmahl, 1964) ist zu schließen, daß es sich bei den feinfaserigen amyloidenthaltenden Strukturen ausschließlich um präexistente Kollagenfasern handelt, das heißt, es findet eine den Kollagenfasern entsprechende achsenperpendikuläre Anlagerung der sauren Phenolmoleküle und damit die Umkehr des Vorzeichens

der Doppelbrechung statt (Neumark, 1966). Mit zunehmenden Amyloidablagerungen geht dieser Effekt zurück. Somit muß durch die Einlagerung von Amyloidfibrillen eine Änderung entsprechender reaktiver Gruppen eingetreten sein, wobei eine Reduktion basischer Radikale, andererseits eine Zunahme saurer Gruppen, insbesondere saurer Mucopolysaccharide, zu diskutieren wären. Unsere Polysacchariduntersuchungen weisen darauf hin, daß bereits sehr frühzeitig vermehrt stark saure Gruppen (Sulfatgruppen) nachzuweisen sind, die allerdings noch keine Fluoreszenzmetachromasie ergeben, da ihre Ladungsdichte offenbar noch unzureichend ist. Im Verlaufe der Faserverdickung tritt mit weiterer Erniedrigung des Phenolquotienten eine Fluoreszenzmetachromasie auf, bis schließlich in Amyloiddepositen die Umkehr der Doppelbrechung fehlt (vgl. Romhányi, 1956), das heißt, die kollagene Grundstruktur ist polarisationsoptisch nicht mehr nachzuweisen, jedoch erreicht die Rotmetachromasie mit Acridinorange ihre größte Intensität. Somit ergibt sich, daß die reduzierte Phenolreaktion sowohl durch Verminderung kollagentypischer basischer Gruppen infolge einer Amyloidfibrillenan- und -einlagerung als auch durch vermehrte Attachierung stark saurer, sulfatgruppenhaltiger Mucopolysaccharide zustande kommt. Dabei beginnt der Einbau der Amyloidfibrillen gerichtet, ausgewiesen durch die anomale grüne Polarisationsfarbe nach Kongorotfärbung, und mit fortschreitender Zunahme der amyloiden Substanz wird die kollagene Faser schließlich völlig ersetzt (Rödermund und Klingmüller, 1970). Dagegen kann eine orientierte Einlagerung der sauren Mucopolysaccharide aufgrund des negativen polarisationsmikroskopischen Rivanoleffektes nicht vorliegen.

Der schrittweise Ersatz spricht ferner gegen eine vollständige Umhüllung der Kollagenfasern, da bei einer dreidimensionalen Anlagerung einachsigt-positiver Amyloidfibrillen anfangs keine Umkehr der Doppelbrechung erfolgen dürfte.

Dieser Umwandlungsprozeß verläuft, wie aus dem umfangreichen Beobachtungsgut zu ersehen ist, sehr langsam, wahrscheinlich im Rahmen des physiologischen Bindegewebsstoffwechsels, da im Gegensatz zu experimentellen und sogenannten sekundären Amyloidosen mesenchymale Zellaktivierungen selten sind.

Aufgrund unserer Befunde möchten wir folgendes *Pathogenesemodell* der senilen Amyloidbildung zu Diskussion stellen:

Als Prinzip ist die Faserbildung als Ausdruck eines erhöhten Stoffwechsels alterierter mesenchymaler Zellen zugrunde zu legen. Eine ständige Beanspruchung führt so normalerweise zur Kollagenbildung. Ein schrittweiser Informationsverlust der Zellpopulation im Alternsgang (genetische Determination? — Pomerance, 1966) und die ständige Inanspruchnahme des Stoffwechsels der Mesenchymzelle, sei es durch Autoimmunisierungsvorgänge (Strukov u. Mitarb., 1963; Schwartz, 1965; Walford, 1967, 1969), sei es durch die breite Palette dysorischer oder entzündlicher Schädigungen, führen zur Synthese eines anomalen Mucopolysaccharides (wahrscheinlich das meist in Amyloiden nachgewiesene Heparansulfat — Bitter und Muir, 1966; Berenson u. Mitarb., 1969; Missmahl, 1969). Die Bildung der fibrillären Einheiten (ubiquitäre Mikrofibrille? — Haust, 1965) bleibt als Grundphänomen erhalten. Im weiteren Verlauf dienen die zuvor gebildeten Kollagenfasern als Matrize für die stufenweise gerichtete Einlagerung der ständig neu entstehenden Grundfibrillen. Das anomale Mucopolysaccharid bewirkt hier eine Aggregation und/oder Polymerisation der fibrillären Grundeinheiten in einer

Anordnung, die für Amyloid typischen chemischen und physikalischen Eigenchaften aufweist. Der daraus resultierende Faserumbau kann somit nur als Zwischenphase aufgefaßt werden. Im Endstadium ist die Kollagenfaser ersetzt und nach Aufbrauch der Faser erfolgt eine unsystematische Anlagerung der teilweise gebündelten Amyloidfibrillen.

Diese Modellvorstellung wird durch den von Doerr und seiner Schule (Zusammenfassung s. Doerr, 1970) herausgearbeiteten Topismus metabolischer Schäden gestützt, indem die Bevorzugung besonders gut durchbluteter Herzregionen hervorgehoben wird und daraus eine adaptive Zellreakтивität in dem von uns geforderten Sinne resultiert.

Insgesamt ist die senile Amyloidbildung als Ergebnis einer Fibrillenaggregation oder -polymerisation nicht prinzipiell neuer Struktureinheiten im Zusammenhang mit einem anomalen Mucopolysaccharidstoffwechsel als Folge einer cellulären Fehlleistung aufzufassen.

Literatur

- Baghirzade, M. F.: Herzinsuffizienz bei Amyloidose. Verh. dtsch. Ges. Path. **51**, 216 (1967).
- Battaglia, S.: Elektronenoptische Untersuchungen am Leberamyloid der Maus. Beitr. path. Anat. **126**, 300 (1962).
- Benditt, E. P.: Diskussionsbeitrag zu Sorenson und Bari (1968). In: Proc. Sympos. Amyloidosis. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, Groningen, Sept. 1967, S. 73. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Beneke, G., Mohr, W.: Amyloidose des Herzens. Z. Herz/Kreisl. **1**, 254 (1969).
- Ben-Ishay, Z., Zolotnick, A.: The cellular origin of amyloid. Electron microscopic study in a case of amyloidosis. Israel J. Med. Sci. **4**, 987 (1968).
- Berenson, G. S., Dalferes, E. R., Ruiz, H., Radhakrishnamurthy, B.: Changes of acid mucopolysaccharides in the heart involved by amyloidosis. Amer. J. Cardiol. **24**, 358 (1969).
- Bitter, T., Muir, H.: Mucopolysaccharides of whole human spleens in generalized amyloidosis. J. clin. Invest. **45**, 963 (1966).
- Caesar, R.: Die Feinstruktur von Milz und Leber bei experimenteller Amyloidose. Z. Zellforsch. **52**, 653 (1960).
- Catchpole, H. R.: The ground substance of connective tissue and amyloid. In: Proc. Sympos. Amyloidosis. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, Groningen, Sept. 1967. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Christensen, H. E., Hjort, G. H., Bertelsen, S.: The cellular origin of amyloid. Ann. Histochim. **8**, 30 (1963).
- Cohen, A. S.: The constitution and genesis of amyloid. Int. Rev. exp. Path. **4**, 129 (1965).
- Gross, E., Shirahama, T.: The light and electron microscopic autoradiographic demonstration of local amyloid formation in spleen explants. Amer. J. Path. **47**, 1079 (1965).
- Doerr, W.: Allgemeine Pathologie der Organe des Kreislaufs. In: Handbuch der allg. Pathologie, III/4, S. 205, hrsg. von H. W. Altmann, F. Büchner, H. Cottier, E. Grundmann, G. Holle, E. Letterer, W. Masshoff, H. Meessen, F. Roulet, G. Seifert, G. Siebert, A. Studer. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Gafni, J., Merker, H. J., Shibolet, S., Sohar, E., Heller, H.: On the origin of amyloid. Study of an amyloid tumor in multiple myeloma. Ann. intern. Med. **65**, 1031 (1966).
- Gueft, B., Ghidoni, J. J.: The site of formation and ultrastructure of amyloid. Amer. J. Path. **43**, 837 (1963).
- Hast, M. D.: Fine fibrils of extracellular space (microfibrils). Amer. J. Path. **47**, 1113 (1965).
- Heefner, W. A., Sorenson, G. D.: Experimental amyloidosis. I. Light and electron microscopic observations of spleen and lymph nodes. Lab. Invest. **11**, 585 (1962).
- Hjort, G. H., Christensen, H. E.: Electron microscopic investigation on secondary renal amyloidosis. Acta rheum. scand. **7**, 65 (1961).
- Hultgren, M. K., Druet, R. L., Janigan, D. T.: Experimental amyloidosis in isogenic X-irradiated recipients of sensitized spleen tissue. Amer. J. Path. **50**, 943 (1967).

- Jobst, K.: Beiträge zur submikroskopischen Struktur der fibrinoiden Degeneration. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **4**, 333 (1955).
- Jones, R. S., Frazier, D. R.: Primary cardiovascular amyloidosis. *Arch. Path.* **50**, 366 (1950).
- Katenkamp, D., Stiller, D.: Das Amyloid. Ein Überblick zu Problemen der Ätiologie, Pathogenese, Struktur und Diagnostik aus pathologisch-anatomischer Sicht. *Hippocrates* (Stuttg.) **41**, 5 (1970).
- Letterer, E.: History and development of amyloid research. In: *Proc. Sympos. Amyloidosis*. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, Groningen, Sept. 1967, S. 3. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Missmahl, H. P.: Quantitative Auswertung der Phenolreaktion an der kollagenen Faser. *Acta histochem.* (Jena), Suppl. IV, 188 (1964).
- Amyloidose bei ankyloisierender Spondylitis. *Verh. Ges. Rheumat.* **1**, 97 (1969).
- Gafni, J.: Peri-collagen and peri-reticular amyloidoses. Their differentiation by polarization microscopy. *Path. et Microbiol.* (Basel) **27**, 826 (1964).
- Németh-Csóka, M.: Untersuchungen über die kollagenen Fasern. I. Teil: Über die submikroskopische Struktur der in vitro präzipitierten kollagenen Fasern und die stabilisierende Rolle der sauren Mukopolysaccharide. *Acta histochem.* (Jena) **9**, 282 (1960).
- Neumark, T.: Phenol reaction of collagen fibres and acid mucopolysaccharide content of connective tissue. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **14**, 59 (1966).
- Pomerance, A.: The pathology of senile cardiac amyloidosis. *J. Path. Bact.* **91**, 357 (1966).
- Puchtler, H., Sweat, F., Levine, M.: On the binding of congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 355 (1962).
- Rakow, A. D.: Die Amyloidose bei Bindegewebskrankheiten und die Altersamyloidose mit Berücksichtigung der Aussagekraft diagnostischer morphologischer Untersuchungen. Inauguraldis. Gießen 1969.
- Ranlov, P., Wanstrup, J.: Ultrastructural investigations on the cellular morphogenesis of experimental mouse amyloidosis. *Acta path. microbiol. scand.* **71**, 575 (1967).
- Rodermund, O.-E., Klingmüller, G.: Zur submikroskopischen Struktur des Amyloid. *Arch. klin. exp. Derm.* **236**, 147 (1970).
- Romhányi, G.: Zur Frage der submikroskopischen Struktur des Amyloid. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **95**, 130 (1956).
- Scheuner, G.: Zum polarisationsoptisch-histochemischen Nachweis gerichtet angeordneter saurer Gruppen mit Akridinderivaten. *Acta histochem.* (Jena) **31**, 36 (1968).
- Schmidt-Matthiesen, H.: Eisenbindungsverfahren. In: *Histochemische Methodik des Nachweises von Polysaccharidkomponenten in Schleimstoffen und Grundsubstanzen*. *Acta histochem.* (Jena), Suppl. V, 137 (1965).
- Schott, H. J.: Polarisationsoptische Untersuchungen über gerichteten Eiweißeinbau in der Niere. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **49**, 186 (1965).
- Schwartz, Ph.: Morphologische und pathogenetische Untersuchungen über Veränderungen im Greisenalter. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **106**, 320 (1964).
- Senile cerebral, pancreatic insular and cardiac amyloidosis. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **27**, 393 (1965).
- Shibolet, S., Merker, H. J., Sohar, E., Gafni, J., Heller, H.: Cellular proliferation during the development of amyloid. Electron microscopic observation on the kidneys of Leishmania-infected hamster. *Brit. J. exp. Path.* **48**, 244 (1967).
- Sorenson, G. D., Bari, W. A.: Murine amyloid deposits and cellular relationships. In: *Proc. Sympos. Amyloidosis*. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, Groningen, Sept. 1967, S. 58. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Spicer, S. S., Henson, J. G.: Methods for localizing mucosubstances in epithelial and connective tissues. *Med. Achievem. exp. Path.* **2**, 78 (1967).
- Stiller, D., Katenkamp, D.: Untersuchungen zum fluoreszenzoptischen Nachweis von Amyloid durch Thioflavin S. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **113**, 451 (1970).
- Thoß, K.: Der fluoreszenzhistochemische Nachweis des Amyloid mit Thioflavin S und Akridinorange. *Acta histochem.* (Jena) **38**, 18 (1970).
- Strukov, A. J., Serov, V. V., Pavlikhina, L. V.: On the pathogenesis of amyloidosis. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 550 (1963).

- Teilum, G.: Periodic acid-Schiff-positive reticulo-endothelial cells producing glycoprotein. Functional significance during formation of amyloid. Amer. J. Path. **32**, 945 (1956).
- Origin of amyloidosis from PAS-positive reticulo-endothelial cells *in situ* and basic factors in pathogenesis. In: Proc. Sympos. Amyloidosis. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, Groningen, Sept. 1967, S. 37. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Uehino, F.: Pathological study on amyloidosis. Role of reticuloendothelial cells inducing amyloidosis. Acta path. jap. **17**, 49 (1967).
- Walford, R. L.: Advances in gerontological research. New York 1967.
- Immunologische Aspekte des Alterns. Klin. Wschr. **47**, 599 (1969).
- Wright, J. R., Calkins, E., Breen, W. J., Stolte, G., Schultz, R. T.: Relationship of amyloid to aging. Review of the literature and systematic study of 83 patients derived from a general hospital population. Medicine (Baltimore) **48**, 39 (1969).
- Zucker-Franklin, D., Franklin, E. C.: Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. Amer. J. Path. **59**, 23 (1970).

Doz. Dr. Dankwart Stiller
Pathologisches Institut der
Friedrich Schiller-Universität
DDR-69 Jena, Ziegelmühlenweg 1
Deutschland