

## Untersuchungen über die Metachromasie der Hornhautgrundsubstanz am Beispiel der anaphylaktischen Keratitis

H.-J. Thiel und W. Brauer

Augenklinik (Dir.: Prof. Dr. W. Böke) der Universität Kiel

Eingegangen am 20. Januar 1973

### Metachromic Investigation of Ground Substance in Anaphylactic Interstitial Keratitis

*Summary.* An anaphylactic interstitial keratitis was produced in 10 rabbits of an inbred New Zealand strain after systemic immunisation with 20% cattle serum albumin (RSA) and subsequent intracorneal injection of the swollen and turbid areas of the cornea which corresponded clinically to the keratitis region. This failure of metachromic chromatophilia is traced to a change in the molecular structure of the glucosaminoglycane.

*Zusammenfassung.* Nach systemischer Immunsisierung mit 20%igem Rinder-serumalbumin (RSA) und nachfolgender intracornealer Injektion von RSA wurde an 10 Kaninchen eines Neuseeländer Inzuchtstammes eine anaphylaktische interstitielle Keratitis ausgelöst. In den gequollenen und getrübbten Hornhautbezirken, die klinisch der Keratitisregion entsprachen, blieb die metachromatische Reaktion aus. Dieser Ausfall der metachromatischen Färbbarkeit wird auf eine Änderung der molekularen Struktur der Glykosaminoglykane zurückgeführt.

Grundlegende Arbeiten über die Metachromasie der normalen menschlichen und tierischen Hornhaut haben u. a. Francois und Rabaey (1952), Günther (1953), Clemens (1955) und Marré (1967) durchgeführt. Über pathologisch veränderte Corneae finden sich in der Literatur dagegen nur wenige Angaben. In den folgenden Untersuchungen soll daher geprüft werden, ob und inwieweit eine metachromatische Reaktion der Hornhautgrundsubstanz bei experimenteller interstitieller Keratitis nachzuweisen ist.

Der Morphologe versteht unter dem Begriff „Grundsubstanz“ den elektronenmikroskopisch nicht eindeutig als strukturiert nachgewiesenen Bestandteil des Bindegewebes zwischen den Zellen und Fasern (Lindner, 1966). Im ophthalmologischen Sprachgebrauch wird die Bezeichnung „Grundsubstanz der Hornhaut“ ganz allgemein auf die in ihr enthaltenen Glykosaminoglykane bezogen (McKusick, 1960), die in biochemisch-stoffwechselaktiver und in physiologischer Beziehung ganz entscheidende Funktionen zu erfüllen haben (Duke-Elder). Diese Nomenklatur ist je-

doch nicht ganz korrekt, da auch Protein-Lipoid-Komplexe und weitere Bestandteile wie Proteine, lösliches Kollagen, Glucose, Ionen und Metabolite enthalten (Gersh und Catchpole, 1949).

Die Hornhautgrundsubstanz ist färberisch und histochemisch dadurch charakterisiert, daß sie mit gewissen reinen Anilinfarbstoffen in wäßriger Lösung eine metachromatische Reaktion hervorzurufen vermag (Kramer und Windrum, 1955). Man versteht unter Metachromasie (Lison, 1935; Ball und Jackson, 1953; Kelly, 1956; Bergeron und Singer, 1958) eine charakteristische Farbänderung bestimmter reiner Anilinfarbstoffe, wenn sie an definierte Substanzen (Chromotrope) entweder im histologischen Schnitt oder in wäßriger Lösung gebunden werden (Thompson, 1966). Eine Änderung der metachromatischen Färbbarkeit kann zu Aussagen über bestimmte Strukturen der Hornhautgrundsubstanz führen (van Walbeek, 1960).

Eine Interstitielle Keratitis kann prinzipiell auf verschiedenen Wegen verursacht werden (bakterielle und Virusinfektionen, chemische und physikalische Noxen). Auch die durch ein Antigen auslösbaren Immunreaktionen führen zu einer interstitiellen Keratitis (Böke, 1968); über entsprechende tierexperimentelle Versuche an der Cornea wird in der Literatur ausführlich berichtet (Oakley, Batty und Warrack, 1955; Schwab, 1957, 1959; Burkl und Schwab, 1959; Leibowitz und Elliott, 1965). Hier haben allerdings weniger die Reaktionen des Hornhautstromas selbst als vielmehr Probleme der Antikörperbildung und Antikörpernachweise im Vordergrund gestanden.

Für die vorliegende Untersuchungsreihe wählten wir aus methodischen Gründen ein anaphylaktogenes Antigen (Rinderserumalbumin = RSA), mit dem in der Hornhaut eine lokale Anaphylaxie (Arthus-Phänomen) im Sinne einer interstitiellen Keratitis leicht ausgelöst werden kann (Thiel und Brauer, 1969), und bei der gleichzeitig eine Bestimmung der humoralen Antikörper möglich ist.

### Material und Methode

Die Untersuchungen befassen sich mit den Veränderungen der metachromatischen Anfärbbarkeit der Kaninchenhornhaut nach systemischer Immunisierung mit 20%igem Rinderserumalbumin (RSA) und nach Auslösung einer anaphylaktischen Reaktion durch intracorneale Reinjektion. Zusätzlich wurden die humoralen Antikörper mit der Gel-Diffusionsmethode nach Oudin (Mod. nach Schwab) für alle Tiere nachgewiesen. Die Versuche wurden an 10 Tieren beiderlei Geschlechts eines Neuseeländer-Inzuchtstammes (Gewicht der Tiere 2—3 kg) durchgeführt; nicht immunisierte Kontrolltiere dienten als Vergleichsobjekte. Zehn Kaninchen erhielten je eine einmalige intravenöse Injektion vom 5 ml 20%iges RSA in die Ohrvene. Nach 12 Tagen wurde bei den Versuchstieren Nr. 1—5 eine intracorneale Injektion von 0,04—0,05 ml 20%iges RSA in die linke Cornea in Form eines runden, blasigen oder sternförmigen Antigen-Depots gesetzt. Das rechte

Tabelle 1. Verlauf der Immunisierung

Tier-Nr.	Injektion		
	Systemische Immunisierung	1.intracorneale Injektion n.12 Tg.	2.intracorneale Injektion n.8 Wo.
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+
10	+	-	+
11	Kontrolltier		

Auge blieb jeweils unberührt. 8 Wochen später intracorneale Injektion links von 0,04—0,05 ml RSA bei allen Versuchstieren, die Hornhäute rechts blieben jeweils frei. Es wurden also 5 Tiere einmal und 5 Tiere zweimal intracorneal injiziert bei sonst gleicher vorausgegangener systemischer Immunisierung (Tabelle 1). 48—72 Std nach der letzten intracornealen Injektion, auf dem Höhepunkt der klinischen Reaktion im Sinne einer interstitiellen Keratitis mit Trübung und Quellung erfolgte die Blutabnahme zur Serumgewinnung für die Antikörperbestimmung nach Oudin. Nach Tötung der Tiere wurden die Corneae präpariert und sofort im Gefrierschnittverfahren aufgearbeitet. Die Untersuchung der stark veränderten Cornea hinsichtlich ihrer metachromatischen Anfärbbarkeit erfolgte im Bereich der stärksten Trübung, d. h. zumeist im Zentrum und im Hornhautrandgebiet. Auslösung der metachromatischen Reaktion mit einer Toluidinblau-Lösung (0,01%) in pH-Stufen von 3,8—4,8 an unfixierten und fixierten (CPC 0,5% über 48 Std) Gefrierschnitten; Stabilisierung der pH-Stufen nach der von Graumann und Claus (1958) angegebenen Methode mit einer Phosphatpuffer-Lösung nach Mellvaine.

### Ergebnisse

48—72 Std nach der letzten intracornealen Injektion zeigten alle Versuchstiere an dem betroffenen Auge eine deutliche klinische Reaktion in Form einer bereits makroskopisch erkennbaren Trübung und Quellung der Hornhaut; die zweite intracorneale Injektion führte zu einer stärkeren Reaktion (Abb. 1).

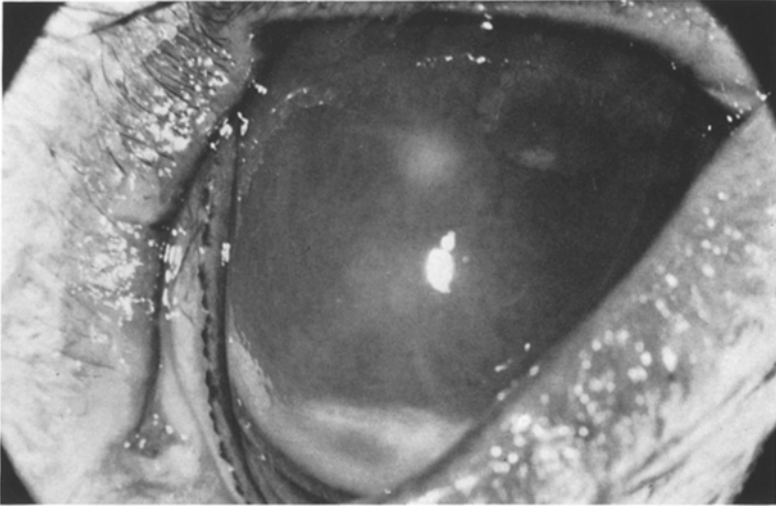


Abb. 1. Diffuse interstitielle Keratitis mit Quellung und Trübung der Hornhaut

Histologisch war bei den Versuchstieren Nr. 1—5 (zweimalige intracorneale Injektion) im Trübungsbereich eine erhebliche Dickenzunahme der gesamten Cornea nachweisbar, die durch ein Ödem mit Auseinanderweichen der kollagenen Fasern und Spaltbildung im Hornhautstroma hervorgerufen wurde; des weiteren ließen sich Zellansammlungen im Ödembereich selbst und vor allem in der Randzone zur nicht veränderten Hornhaut nachweisen (Abb. 2). In den Gebieten mit Hornhauttrübung und Quellung fand sich ein signifikanter Ausfall der Metachromasie für alle pH-Stufen (Abb. 2; Tabelle 2). In den jeweiligen Randzonen dagegen zeigte sich ein stufenloser Übergang zur normalen metachromatischen Färbbarkeit der nicht veränderten Hornhaut, die am Beispiel des Kontrollauges für die jeweiligen Corneaabschnitte (äußeres, mittleres und inneres Drittel) schematisch aufgezeichnet ist (Tabelle 3).

Bei den Versuchstieren 6—10 mit einmaliger intracornealer Injektion lagen histologisch und von der metachromatischen Reaktion her gesehen im Prinzip die gleichen Veränderungen vor wie bei der ersten Gruppe

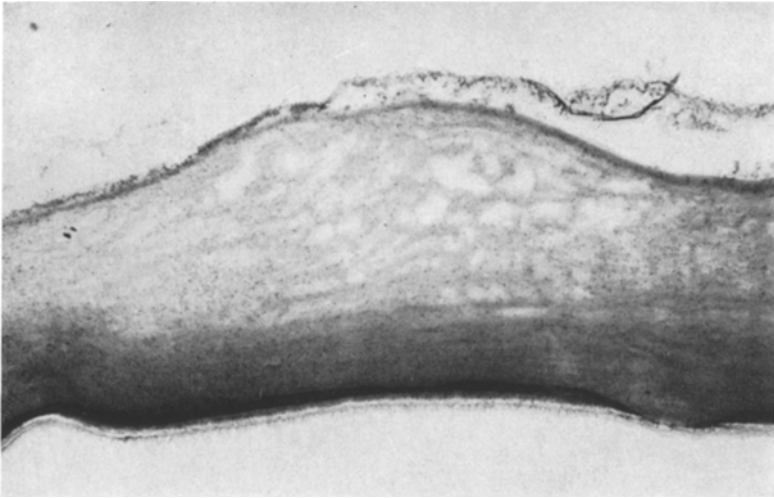


Abb. 2. Histologischer Schnitt durch den Bereich der „Keratitis“. In der oberen Hornhauthälfte stark ödematös verändertes Gewebe, keine Anfärbung mit Toluidinblau. In den unteren Anteilen und am rechten Bildrand metachromatische Reaktion (pH 4,8). Gefrierschnitt unfixiert. Schnittdicke 15  $\mu$ . Vergrößerung 1:95

Tabelle 2. Verhalten der Metachromasie: 2. mitracorn. Injektion

pH-Bereich	Schnitt-Nr.	Äußeres Drittel	Mittleres Drittel	Inneres Drittel	Reaktionsbereich
4,0	5	-	-	-	—
	13	-	-	-	—
	21	-	-	-	—
4,2	4	-	-	(+)	keine Anfärbung
	12	-	-	(+)	
	20	-	-	(+)	
4,4	3	(+)	(+)	(+)	keine Anfärbung
	11	(+)	(+)	(+)	
	19	(+)	(+)	(+)	
4,6	2	+	+	++	im Zentrum Fehlen der Metachromasie (i.übrigen s. Text)
	10	+	+	++	
	18	+	+	++	
4,8	1	++	++	+++	beginnende Anfärbung im Zentrum
	9	++	++	+++	
	17	++	++	+++	

(zweimalige intracorneale Injektion), nur in schwächerer Form. Die Präzipitation der humoralen Antikörper nach Oudin war bei allen 10 Versuchstieren bereits nach wenigen Std in Form einer nach unten scharf

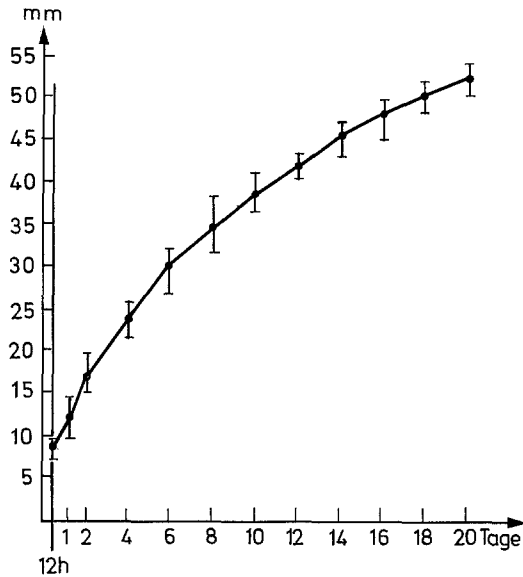


Abb. 3. Oudinscher Gelpräzipitationsversuch. Nachweis der humoralen Antikörper

Tabelle 3. Verhalten der Metachromasie: Kontrollauge

pH-Bereich	Schnitt-Nr.	Äußeres Drittel	Mittleres Drittel	Inneres Drittel
4,0	5	-	-	-
	13	-	-	-
	21	-	-	-
4,2	4	-	-	(+)
	12	-	-	(+)
	20	-	-	(+)
4,4	3	+	+	+
	11	+	+	+
	19	+	+	+
4,6	2	++	++	++
	10	++	++	++
	18	++	++	++
4,8	1	+++	+++	+++
	9	+++	+++	+++
	17	+++	+++	+++

begrenzten, dichten Präzipitationsbande sichtbar, deren Wanderung im Gel gut verfolgt werden konnte (Abb. 3). Die Seren der zweifach intracorneal injizierten Tiere wiesen letztlich keine schnellere Wanderung der Präzipitationsbande aus.

### Diskussion

Die tierexperimentellen Untersuchungen haben gezeigt, daß nach systemischer Allergisierung die intracorneale Antigen-Injektion eine Sofortreaktion vom Typ des Arthus-Phänomens auszulösen vermag. Voraussetzung für eine solche Gewerbsreaktion sind humorale Antikörper, die über das Gefäßsystem und das Randschlingennetz in die Cornea einwandern. Derartige Vorgänge sind tierexperimentell ausreichend belegt, sie werden auch für die hier durchgeführten Untersuchungen vorausgesetzt, zumal zirkulierende Serumantikörper im Gel-Präzipitationsversuch nach Oudin nachgewiesen werden konnten.

Der Begriff „Stärke der Metachromotropie“ geht auf Graumann (1959, 1961) sowie Graumann *et al.* (1966) zurück, der damit Eigenschaften gewisser Substrate charakterisierte, „im absorbierten basischen Farbstoff das Auftreten einer metachromatischen Absorptionsbande bewirken zu können“. Entsprechende Untersuchungen an der Cornea haben Francois und Rabaey (1952) und unter Berücksichtigung der von Graumann erarbeiteten Methode Marré (1967) durchgeführt. Die Materialeigenschaft Metachromotropie stellt demnach ein Maß der Art, Anordnung und Zahl der freien elektro-negativen Ladungen dar; sie beruht in erster Linie auf dem Gehalt der Substantia propria corneae an sauren Mucopolysacchariden.

In der vorliegenden Untersuchungsreihe wurde die variable Wasserstoff-Ionen-Konzentration von pH 3,8—5,0 zur Beeinflussung des Dissoziationszustandes gewählt. Es fand sich im Bereich der interstitiellen Keratitis eine verzögerte Farbreaktion, bei den ausgeprägten Formen der interstitiellen Keratitis auch ein Ausfall der metachromatischen Färbbarkeit. Es stellt sich nun die Frage, welche Faktoren für den Ausfall der Metachromasie verantwortlich zu machen sind.

Walton und Ricketts (1954) postulierten aufgrund ihrer Versuche, daß

1. eine Abnahme der Konzentration der Glykosaminoglykane,
2. ein Verlust der anionischen Gruppen,
3. eine Zerstörung der molekularen Strukturen,
4. eine Bindung anionischer Gruppen durch Proteine das Ausbleiben einer metachromatischen Reaktion zu erklären vermag.

Meyer und Rapport (1951) kamen zu vergleichbaren Schlußfolgerungen. Die unter Punkt 1 genannte Möglichkeit kann eintreten, wenn Glykosaminoglykane im histologischen Schnitt ausgewaschen werden; dies wurde durch die angewandte Verarbeitungsverfahren (unbehandelte Kryostatsschnitte) und Fixierungsmethoden (Cetylpyridiniumchlorid: Kitano, 1969) weitgehend verhindert.

Ein Verlust anionischer Gruppen führt dann zu einem Ausfall der Metachromasie, wenn der Abstand zweier benachbarter  $\text{SO}_3\text{OH}$ -Gruppen mehr als 5 Å beträgt; umgekehrt wird die metachromatische Reaktion zunehmend stärker, wenn dieser Maximalabstand unterschritten wird, d. h.

je dichter die anionischen Gruppen liegen. Sylvén (1954) hat diese Beziehung in seinen Versuchen nachweisen können. Das würde für die hier durchgeführten Experimente bedeuten, daß bei fehlender Metachromasie keine oder nicht ausreichend verfügbare saure Gruppen in engen Abständen vorgelegen haben. Es wäre aber auch möglich, daß überwiegend schwefelhaltige Komponenten abgespalten wurden. Diese Überlegung sollte in die Betrachtungsweise deshalb noch mit einbezogen werden, weil bei molekularen Reifungsprozessen mit steigendem Einbau von  $\text{SO}_3\text{OH}$ -Anteilen die Gewebe im histologischen Schnitt zunehmend metachromotrop werden (Arnold, 1968).

Der Bereich der experimentell ausgelösten interstitiellen Keratitis ist histologisch durch ein umschriebenes Ödem, makroskopisch durch eine verminderte Transparenz oder durch deren Verlust gekennzeichnet. Elektronenmikroskopisch zeigt die gequollene Hornhaut eine Verbreiterung der interfibrillären Räume (Langham *et al.*, 1969), jedoch lassen die cornealen kollagenen Fibrillen selbst keine Dickenzunahme erkennen (Francois *et al.*, 1954; Langham und Cox, 1966, 1968). Die kollagenen Anteile nehmen demnach an der Gewebequellung nicht teil, die quellfähige Komponente ist die zwischen den Fasern gelegene Grundsubstanz, was Hedbys (1961) mittels bestimmter Fixierungsmethoden nachweisen konnte. Letztlich kommt den sauren Gruppen der Polysaccharide und hier vor allem den Sulfatgruppen (Cogan, 1960) für die Stromaquellung entscheidende Bedeutung zu (Francois *et al.*, 1954; Hedbys, 1961; Maurice, 1969; Langham *et al.*, 1969), da Änderungen in der molekularen Struktur der Polysaccharide zum Verlust der Wasserbindung, zur Verschiebung des Ionengleichgewichts und damit zur Trübung des bis dahin transparenten Gewebes führen (Maurice, 1969). Woodin (1952) hat in der normalen Hornhaut als makromolekulare Grundeinheit einen stabilen Polysaccharid-Kollagen-Komplex angenommen. Es spricht vieles dafür, daß nach Auslösung des Keratitis-Modells eine Depolymerisation erfolgt. Oberberger und Praus (1963) haben tierexperimentell anaphylaktische Keratitiden gesetzt und die Inkorporation von  $^{35}\text{S}$  gemessen. Die Autoren fanden anfangs einen verminderten, vom 10. Tag an jedoch einen gesteigerten Einbau. Diese Befunde können dahingehend interpretiert werden, daß in der Regenerationsphase der Keratitis nach erneuter Polymerisation von Saccharideinheiten, möglicherweise auch erst nach Anlagerung an den Proteinanteil, der Einbau von  $^{35}\text{S}$  erfolgt. In weiteren Versuchen haben wir beobachtet, daß 2—3 Wochen nach der experimentellen Keratitis die sich aufklarende Hornhaut zunehmend chromotrop verhält. Ein Ausfall der Metachromasie in Hornhäuten, die sich klinisch durch eine Quellung und Trübung auszeichnen, dürfte als Folge der veränderten molekularen Struktur der Glykosaminoglykane anzusehen sein.

Eine Suppression der Metachromasie durch basische Proteine hat Kelly (1955) in seinen in-vitro-Versuchen nachgewiesen. Walton und



Ricketts (1954) glauben überdies, daß sich kovalente esterähnliche Bindungen zwischen anionischen Gruppen der Glykosaminoglykane und Hydroxyl-Gruppen der Proteine ausbilden. Inwieweit derartige Reaktionen in den vorliegenden Versuchen tatsächlich abgelaufen sind und dadurch einen Ausfall der Metachromasie verursacht haben, dürfte von der Methodik her kaum zu entscheiden sein.

### Literatur

- Arnold, M.: Histochemie — Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Ball, J., Jackson, D. S.: Histological, chromatographic and spectrophotometric studies of Toluidin Blue. *Stain Technol.* **28**, 33—40 (1953).
- Bergeron, J. A., Singer, M.: Metachromasy: An experimental and theoretical reevaluation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 433—457 (1958).
- Böke, W.: Immunpathologie des Auges. Bibliotheka Ophthalmologica 78. Basel: Karger 1968.
- Burkl, W., Schwab, F.: Histologischer und immunhistologischer Nachweis der lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **161**, 168—184 (1959).
- Clemens, H.-J.: Über die Kittsubstanzen in der Propria corneae des Rindes. *Acta histochem. (Jena)* **1**, 287—302 (1955).
- Cogan, M.: In: The transparency of the cornea, p. 63. Oxford: Blackwell 1960.
- Duke-Elder, St.: System of ophthalmology, vol. VII: The foundations of ophthalmology, p. 160. London: Henry Kimpton 1962.
- Francois, J., Rabaey, M.: Recherches histo-chimiques, sur le mucoide de la cornée. *Bull. Soc. belge Ophtal.* **102**, 568—583 (1952).
- Francois, J., Rabaey, M., Vandermeersche, G.: L'ultrastructure des tissus oculaires au microscope électronique. II. Etude de la cornée et de la sclérotique. *Ophthalmologica (Basel)* **127**, 74—85 (1954).
- Gersh, I., Catchpole, H. R.: The organisation of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Amer. J. Anat.* **85**, 457—507 (1949).
- Graumann, W.: Bestimmung der „Stärke der Metachromotropie“. *Acta histochem. (Jena)* **2**, 217—220 (1959).
- Graumann, W.: Stärke der Metachromotropie — eine Meßgröße zur histochemischen Charakterisierung schleimbildender Drüsenzellen. *Histochemie* **2**, 244 (1961).
- Graumann, W., Arnold, M., Gleisner, U.: Histologische und spektralphotometrische Untersuchungen der „Stärke der Metachromotropie“. *Acta histochem. (Jena)* **23**, 276—287 (1966).
- Graumann, W., Clauss, W.: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. *Acta histochem. (Jena)* **6**, 1—7 (1958).
- Günther, G.: Die Metachromasie bei verschiedenen Erkrankungen der Wirtshornhaut und ihre Bedeutung für den Erfolg der Keratoplastik. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **154**, 184—196 (1953).
- Günther, H.-J.: Die Metachromasie der konservierten menschlichen Leichenhornhaut. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **154**, 177—183 (1953).
- Hedbys, B. O.: The role of polysaccharides in corneal swelling. *Exp. Eye Res.* **1**, 81—91 (1961).
- Kelly, J. W.: Suppression of metachromasia by basic proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **55**, 133—137 (1955).
- Kelly, J. W.: The metachromatic reaction. *Protoplasmatologica* **2**, 1—98 (1956).
- Kitano, S.: Cytoplasmic granules of keratocytes and their relationship to formation of the ground substance. Baltimore and London: Johns Hopkins Press 1969.

- Kramer, H., Windrum, G. M.: The metachromatic staining reaction. *J. histochem. cytochem.* **3**, 227—237 (1955).
- Langham, M. E., Cox, J. L.: The interaction of collagen and acid mucopolysaccharides. *Fed. Proc.* **25**, 706 (1966).
- Langham, M. E., Cox, J. L.: The structural basis to secretory mechanism in the mammalian cornea. In: *Biochemistry of the eye*, p. 84—102 Basel: Karger 1968.
- Langham, M. E., Hart, R. W., Cox, J.: The interaction of collagen and mucopolysaccharides. In: *The cornea*. Baltimore and London: Johns Hopkins Press 1969.
- Leibowitz, H. M., Elliott, J. H.: Antibody production in corneal hypersensitivity. *Arch. Ophthalm. (Chic.)* **73**, 687—707 (1965).
- Lindner, J.: Bausteine des Stütz- und Bindegewebes. Diskussionsbemerkung. In: *Binde- und Stützgewebe Symposium*, S. 14. Bad Bramstedt 1965. Darmstadt: Steinkopff 1966.
- Lison, L.: Études sur la metachromasie. Colorants métachromatiques et substances chromatropes. *Arch. Biol. (Liège)* **46**, 1—70 (1935).
- Marré, M.: Die Stärke der Metachromotropie der Cornea in Abhängigkeit vom Lebensalter. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalm.* **174**, 177—185 (1967).
- Maurice, D. M.: The physical state of water in the corneal stroma. In: *The cornea*. Baltimore and London: Johns Hopkins Press 1969.
- McKusick, V. A.: Heritable disorders of connective tissue. Saint Louis: C. V. Mosby Comp. 1966.
- Meyer, K., Rapport, M. M.: Mucopolysaccharides of ground substance of connective tissue. *Science* **113**, 596—599 (1951).
- Oakley, C. D., Batty, J., Warrack, G. H.: Antibody production in the rabbit cornea. *J. Path.* **70**, 349—367 (1955).
- Obenberger, J., Praus, R.: Incorporation of inorganic sulphate  $^{35}\text{S}$  into sulphated mucopolysaccharides of the course of experimental anaphylactic reactions. *Exp. Eye Res.* **2**, 247—254 (1963).
- Oudin, J.: L'analyse immunochemique qualitative; Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé; première partie. *Ann. Inst. Pasteur* **75**, 30—51 (1948).
- Oudin, J.: L'analyse immunochemique qualitative; Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé; deuxième partie. *Ann. Inst. Pasteur* **75**, 109—129 (1948).
- Schwab, F.: Untersuchungen über den Antikörpergehalt der Hornhaut unter verschiedenen Bedingungen. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalm.* **159**, 1—44 (1957).
- Schwab, F.: Untersuchungen über den Antikörpergehalt (Präzipitine) der Hornhaut nach gleichzeitiger Einverleibung verschiedener Antigene. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalm.* **160**, 592—627 (1959).
- Sylvén, B.: Metachromatic dye — substrate interactions. *Quart. J. micr. Sci.* **95**, 327—358 (1954).
- Thiel, H.-J., Brauer, W.: Metachromatische Untersuchungen der Hornhautgrundsubstanz beim Arthus-Phänomen. *Ber. 70. Zus. DOG Heidelberg* 1969, S. 48—50.
- Thompson, S. W.: Selected histochemical and histopathological methods. Springfield/Ill. (USA): Ch. C. Thomas, 1966.
- Walbeek, K. van: Turgescence and swelling pressure. In: *The transparency of the cornea*. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1960.
- Walton, K. W., Ricketts, C. R.: Investigation of the histochemical basis of metachromasia. *Brit. J. Path.* **35**, 227—240 (1954).
- Woodin, A. M.: The corneal mucopolysaccharide. *Biochem. J.* **51**, 319—330 (1952).

Priv.-Doz. Dr. H. Thiel, Univ.-Augenklinik, D-2300 Kiel, Hegewischstr. 2, Bundesrepublik Deutschland.