

## SUMMARY

The authors describe the incorporation of radioactive aminoacids into microsomes from *Drosophila melanogaster* (*pupae*). Enzymatic incorporation can only be shown after inhibition of a very active tyrosinase, which is present in the microsomal fraction, by phenylthiourea.

The system has the following properties: (1) It requires ATP,  $Mg^{++}$ , an ATP regenerating system, but not GTP. (2) Sucrose-washed microsomes with and without addition of pH 5 enzymes incorporate to the same extent. (3) Microsomes treated with deoxycholate or 0,05M KCl incorporate less than the untreated ones, the former being nevertheless stimulated by addition of pH 5 enzymes or the pH 5 precipitate of the KCl extract. (4) Rat liver microsomes or pH 5 enzymes can be exchanged with the corresponding fraction from *Drosophila*.

Zürich, Biochemisches Institut der Universität

---

## 240. Über die Dünnschichtchromatographie von Lipiden

2. Mitteilung

### Untersuchungen von Gehirngewebe aus der weissen Substanz Multiple-Sklerose-Kranker

von C. G. Honegger

(26. VII. 62)

**I. Einleitung.** – In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> wurden Untersuchungen von Gehirnextrakten Multiple-Sklerose-Kranker und Normaler beschrieben, bei welchen das pathologische Material, ausser einigen bekannten Befunden, Anhaltspunkte über das Vorkommen noch unbekannter Stoffe lieferte. Diesen an einem kleinen Untersuchungsgut durchgeführten Versuchen lag vor allem die Fragestellung nach der *qualitativen* Zusammensetzung der verschiedenen Gehirnextrakte zugrunde, wobei sich die Dünnschichtchromatographie zur Lösung spezieller neurochemischer Fragen im Bereiche der Lipide als durchaus geeignet erwies. Gewisse Beschränkungen ihres Anwendungsbereichs können anhand folgender 4 Punkte beurteilt werden:

1. Das Trennbild eines Extraktes kann von Chromatogramm zu Chromatogramm schwanken. Beim chromatographischen Vergleich verschiedener Extrakte müssen diese also unbedingt auf derselben Platte aufgetrennt werden, oder es müssen mindestens einzelne davon jeweils als Kontrolle mitgeführt werden. Zusätzlich wird gleichzeitig ein Eichgemisch aus bekannten Lipiden mitaufgetrennt (im Falle der Auftrennung nur eines Extraktes, zur Kontrolle von Abweichungen). Bei lipidreichen Extrakten können die Wanderungswerte einzelner Komponenten infolge von Interferenzen mit Substanzen mit ähnlichen Wanderungswerten sich ändern.

<sup>1)</sup> C. G. HONEGGER, *Helv.* 45, 281 (1962).

2. *Quantitative* Abschätzungen durch visuellen Vergleich der Fleckenintensität können Fehler von ca. 10% bei Flecken geringer Intensität, bis zu 100% bei Flecken hoher Intensität aufweisen. Eine solche Bestimmung ist deshalb nur semiquantitativ, sie kann jedoch, da die Beurteilung an chromatographisch aufgetrennten Extrakten erfolgt, häufig ebenso wertvolle Aussagen liefern wie quantitative Bestimmungen an Gesamtextrakten. Letztere ergeben nämlich oft Summationswerte, da mit demselben Reagens angefärbte Chromatogramme oft mehrere klar unterscheidbare Flecke der gleichen Farbe aufweisen. ZÖLLNER *et al.*<sup>2)</sup> haben bereits Cholesterinester im Serum durch direkte photometrische Messung von Farbkomplexen auf Dünnschichtchromatogrammen quantitativ bestimmt. Diesem eleganten Verfahren, welches das Abkratzen des substanzbeladenen Adsorptionsmaterials umgeht, dürfte in Zukunft grosse Bedeutung zukommen.

3. Die Identifizierung der Flecke anhand des Vergleiches von Wanderungswerten und Färbereigenschaften mit chemisch reinen Substanzen muss stets unter Vorbehalt gemacht werden (vgl. 1. Reproduzierbarkeit) und sollte immer mit den klassischen chemischen Methoden gesichert werden. Da Stoffe unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung in verschiedenen Laufmitteln gleiche Wanderungswerte aufweisen können, ziehen wir es vor, nicht von Identifizierung, sondern von «chromatographischer Charakterisierung» zu sprechen. Noch unsicherer sind auf blosser «färbereischer Charakterisierung» begründete Schlüsse betreffend die chemische Zusammensetzung, falls ein direkter Vergleich mit authentischen Substanzen nicht möglich ist. Trotzdem können Angaben über die mögliche Identität der verschiedenen Flecke mit bestimmten Substanzen auch für andere Untersucher von Nutzen sein. Sie sind umso eher zulässig, als prinzipiell bei der chromatographischen und chemischen Analyse von Gehirnextrakt dieselben Stoffe gefunden werden sollten, solange bei keiner Methode unerwünschte chemische Veränderungen eintreten.

4. Gegenüber anderen Methoden weist die Dünnschichtchromatographie für unsere Fragestellung folgende Vorteile auf:

a) In sehr kurzer Zeit ist eine semiquantitative *Gesamtübersicht* über die in Gehirnextrakten vorhandenen Lipide möglich.

b) Eine Analyse ist mit sehr kleinen Gewebsmengen (z. Z. ca. 50 mg Frischgewebe) ausführbar.

c) Für die eventuelle Gewinnung grösserer Mengen eines bestimmten Lipids können die im Mikromaßstab gemachten Erfahrungen direkt auf die präparative Dünnschichtchromatographie<sup>3)</sup> übertragen werden.

**II. Untersuchungsmaterial und Methode.** – In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Herd- und Nichtherd-Partien aus dem Gehirn von Multiple-Sklerose-Patienten vergleichend semiquantitativ untersucht. Verarbeitet wurde frisches, unfixiertes Gehirngewebe – ausser in einem Fall, bei welchem das Gesamthirn während 1 Stunde formolfixiert wurde – von 7 Multiple-Sklerose-Patienten, welches ca. 6–20 Stunden nach dem Tode entnommen und bis zur Aufarbeitung bei

<sup>2)</sup> N. ZÖLLNER, G. WOLFRAM & GRETA AMIN, *Klin. Wschr.* **40**, 273 (1962).

<sup>3)</sup> F. J. RITTER & G. M. MEYER, *Naturc* **193**, 941 (1962); C. G. HONEGGER, *Helv.* **45**, 1409 (1962).

-20° aufbewahrt wurde<sup>4</sup>). Davon wurden zur Extraktion und anschliessenden dünn-schichtchromatographischen Untersuchung 46 Proben entnommen, nämlich: 16 Herde (MSWH) von 5 Patienten, 9 Proben Herdumgrenzendes (MSWHU) von 3 Patienten, 8 kleinere Herde mitsamt angrenzender weisser Substanz (MSWHW) von 6 Patienten und 13 Proben von makroskopisch normal erscheinender weisser Substanz (MSW) von 6 Patienten.

In Anbetracht der Möglichkeit, dünn-schichtchromatographische Analysen auch mit «ungereinigten» Lipidextrakten auszuführen, konnte das von FOLCH *et al.*<sup>5</sup>) beschriebene Extraktionsverfahren weitgehend vereinfacht werden. Der im ursprünglichen Verfahren empfohlene Waschprozess sowie das Eindampfen wurden weggelassen oder nur an einem aliquoten Teil zur Trockengewichtsbestimmung durchgeführt. Substanzen wie die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die in einem der verwendeten Laufmittel (Chloroform-Methanol-Wasser) Wanderungswerte aufweisen, welche den Flecken 1-4 entsprechen würden (vgl. Fig. 1) und dadurch zu Fehlinterpretationen führen könnten, sind in freier Form im Gehirngewebe in so kleiner Konzentration vorhanden (4,6-12 µg/g Frischgewebe<sup>6</sup>), dass sie in den 15-20 µl der zur Auftrennung benötigten «ungewaschenen» Extrakte nicht mehr nachweisbar sind. Die Extraktion beschränkt sich somit auf zwei Schritte: Das Gewebe wird mit Chloroform : Methanol = 2 : 1 durch Homogenisieren (im Glashomogenisator) extrahiert; pro 60 mg Gewebe wird 1 ml Extraktionsmittel verwendet. Nach Zentrifugieren werden vom Überstehenden gleiche Volumina Extrakt strichförmig auf (mit Chloroform vorgereinigte) Kieselgel-G-Platten aufgetragen und mit den Laufmitteln CMW, C und T (CMW = Chloroform : Methanol : Wasser = 65 : 25 : 4<sup>7</sup>); C = Chloroform; T = Tetrachlorkohlenstoff) entwickelt. Gegenüber der früher verwendeten Zusammensetzung von Lauf CMW<sup>1</sup>) führt die abgeänderte Mischung zu einer besseren Auftrennung der Lipide mit kleinen Wanderungswerten. Die Anfärbung der Flecke für Lauf CMW erfolgte mit Ammoniummolybdat, Phosphormolybdänsäure, Ninhydrin, Kaliumwismutjodid, wie bereits beschrieben<sup>1</sup>). Zum Nachweis der Glykolipide diente ein modifiziertes Orcinreagens, in welchem das ursprüngliche<sup>8</sup>) HCl durch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ersetzt war. Diese Änderung erhöht die Empfindlichkeit und, gegenüber dem Diphenylaminreagens, die Farbbeständigkeit der Flecke bei geringerer Untergrundfärbung.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte wie bereits beschrieben<sup>1</sup>). Sie wurden am Rande zusätzlich mit einer schematischen Darstellung der Gesamtheit der beobachteten Flecke versehen, die gleichzeitig Auskunft über deren Anfärbbarkeit gibt (vgl. Fig. 1-2). Viele der Chromatogramme stellen jedoch Annäherungen an dieses Schema dar, wobei Überlappungen an verschiedenen Stellen, vor allem

<sup>4</sup>) Herr Prof. Dr. A. WERTHEMANN, Vorsteher des Pathologisch-Anatomischen Instituts der Universität Basel, und Herr Prof. Dr. S. SCHEIDEGGER stellten in grosszügiger Weise das zur Untersuchung benötigte Gehirnmaterial zur Verfügung. Herr Dr. R. WÜTHRICH aus unserer Klinik war so hilfsbereit, die Isolierung von Herd- und Nichtherdmaterial auszuführen. Ich möchte diesen Herren auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen.

<sup>5</sup>) J. FOLCH, M. LEES & SLOANE STANLEY, *J. biol. Chemistry* **226**, 497 (1957).

<sup>6</sup>) J. FOLCH & F. N. LEBARON, in *Metabolism of the Nervous System*, ed. by D. RICHTER, p. 69, Pergamon Press 1957.

<sup>7</sup>) H. WAGNER, L. HÖRHAMMER & P. WOLFF, *Biochem. Z.* **334**, 175 (1961).

<sup>8</sup>) E. KLENK & H. LANGERBEINS, *Z. physiol. Chem.* **270**, 185 (1941).

in der Region der Flecke 4–7, auftreten können. Dies führt zu einer Verminderung der Fleckenzahl und zu Verschiebungen in der Farbintensität und erschwert dadurch die Auswertung. Auf folgende Fehlerquelle soll noch besonders hingewiesen werden. Entgegen den Angaben von FOLCH *et al.*<sup>5)</sup>, wonach käufliche Lösungsmittel *p. a.* für die Extraktion von lipidreichen Geweben, wie Gehirn, genügend rein sind, können diese Lösungsmittel beträchtliche Verunreinigungen vor allem lipidartigen Charakters aufweisen: Chloroform *p. a.* MERCK ca. 1,7 mg%, Methanol *p. a.* MERCK ca. 0,65 mg%. Eine vorherige Destillation dieser Lösungsmittel ist also unbedingt erforderlich.

Diese Methode eignet sich besonders gut zur Untersuchung lipidreicher Gewebe wie Gehirn. Die Extraktion mit der ca. 17fachen Menge Lösungsmittel führt zu einer optimalen (ca. 1-proz.) Lipidkonzentration des Extraktes, von welchem zur chromatographischen Analyse wenige  $\mu$ l genügen.

**III. Ergebnisse.** – Auf Grund verschiedener Farbreaktionen wurden in den Extrakten insgesamt 39 Flecke nachgewiesen (s. Fig. 1–2). Laut chromatographischer Charakterisierung sind Flecke 10 und 11 Lecithine, 18 und 19 Cerebroside, 26 Cholesterin, 30 Neutralfett, 36–37 Cholesterinester; laut färberischer Charakterisierung sind Flecke 5 und 6 Sphingomyeline, 15 und 16 Kephaline und Acetalphosphatide und 32–35 weitere Cholesterinester. Aus einem Vergleich unserer chromatographischen Auftrennungen mit denjenigen von WAGNER *et al.*<sup>7)</sup> ergeben sich Anhaltspunkte, dass es sich bei Flecken 5 und 6 um Ganglioside (gleicher Wanderungswert wie Sphingomyeline) und bei 12 und 13 um Sulfatide handeln könnte. Es muss betont werden, dass in der weissen Substanz auch beim Normalen die gefundene Fleckenzahl nur einem Teil der tatsächlich vorhandenen Substanzen entspricht. Durch differenzierte Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln konnten noch weitere Flecke gefunden werden, deren Gesamtzahl wir auf über 50 schätzen.

Die Besprechung der Ergebnisse aus den ca. 70 Chromatogrammen, welche im einzelnen zu weit führen würde, soll in 3 Gruppen *a*, *b* und *c* zusammengefasst erfolgen. Dabei wird vorerst die Zusammensetzung der Extrakte *a*) makroskopisch normal erscheinender weisser Substanz derjenigen der Extrakte *b*) Herdumgrenzendes (maximaler Lipidabbau) gegenübergestellt. Eine Beantwortung der bedeutungsvollsten Frage: «Welches sind die ersten feststellbaren chemischen Veränderungen», soll anhand der Befunde aus den Extrakten *c*) Herdumgrenzendes und kleine Herde plus angrenzende weisse Substanz (beginnender Lipidabbau) angestrebt werden.

*a*) Die Extrakte aus makroskopisch normaler weisser Substanz lassen untereinander geringfügige Unterschiede erkennen. Man findet 28 bis 32 Flecke, die sich normalerweise folgendermassen verteilen: 1–22 im Lauf CMW und 21, 22, 25, 26, 29–30 im Lauf C. Abweichungen: 3 Extrakte von 3 Fällen zeigen geringe Spuren von Flecke 36 und 37 im Lauf T (Cholesterinester); 3 Extrakte von 2 Patienten zeigen kleine Mengen von Fleck 28, in einem Extrakt fehlt der normalerweise in Spuren vorhandene Fleck 3. Die Ursache dieser Abweichungen könnte sowohl in den zur Analyse verwendeten topographisch unterschiedlichen Gewebeproben als auch (beim Auftreten von Cholesterinestern) im Vorhandensein mikroskopisch kleiner Herde liegen. Diese geringen Unterschiede können in verschiedenen Gehirnextrakten sowohl desselben als auch verschiedener Patienten auftreten.

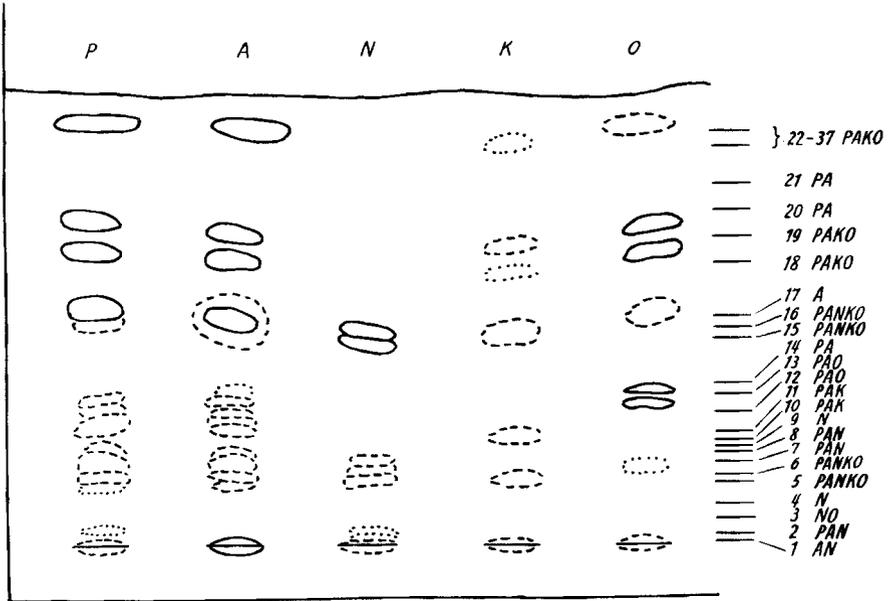


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm und schematische Darstellung aufgetrennter Flecke (aus verschiedenen Chromatogrammen) sowie deren Numerierung und Anfärbbarkeit auf Kieselgel G. Laufmittel: Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4; Anfärbung mit: P = Phosphormolybdänsäure, A = Ammonmolybdat, N = Ninhydrin, K = Kaliumwismutjodid, O = Orcin

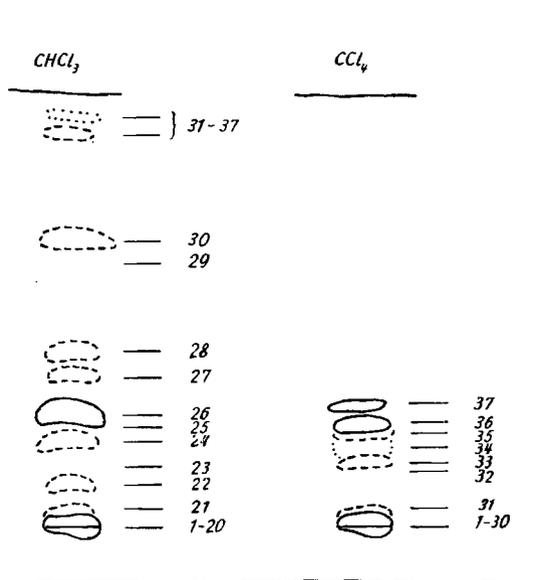


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm mit Chloroform bzw. Tetrachlorkohlenstoff sowie schematische Darstellung aufgetrennter Flecke (aus verschiedenen Chromatogrammen) und deren Anfärbbarkeit auf Kieselgel G. Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure

b) Die Extrakte aus Herdzentrum, in welchen die extremsten Lipidveränderungen festzustellen sind, lassen sich anhand des Auftretens von Cholesterinestern in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe zeichnet sich durch das Fehlen von Cholesterinestern und, gegenüber der makroskopisch normalen weissen Substanz, durch eine maximale Lipidverminderung aus. Diese kann soweit gehen, dass im Lauf CMW mehr als die Hälfte der Flecke verschwinden, und zwar Nr. 1–3, 5–9, 12–13, 15, 17–19. Den massivsten Abbau erleiden die normalerweise in hohen Konzentrationen vorhandenen Lipide: Cholesterin (26), Cerebroside (18, 19), sowie Kephaline und Acetalphosphatide (15, 16). Von Herd zu Herd sind in den Extrakten sowohl derselben als auch verschiedener Patienten Unterschiede zu erkennen, die auf einen verschieden weit erfolgten Abbau zurückzuführen sind. In der zweiten Gruppe ist das Auftreten von Cholesterinestern (32–37) charakteristisch, deren Konzentration in weiten Grenzen schwankt. Der mehr oder weniger ausgeprägte Abbau der Lipide zeigt sich auch hier vor allem im Cholesterin, in den Cerebrosiden, sodann in den Flecken 5, 7–9, 12, 13 und 16. Auch hier sind in den verschiedenen Extrakten derselben und verschiedener Patienten grosse Unterschiede bezüglich des Grades der Lipidveränderungen sichtbar.

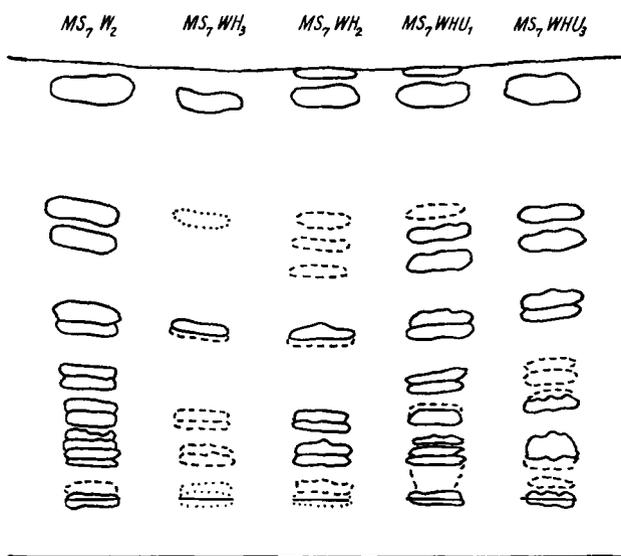


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm von je 15  $\mu$ l Lipidextrakt auf Kieselgel  
 Laufmittel: Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4  
 Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure

c) Die Extrakte Herdumgrenzendes und kleine Herde plus angrenzende weisse Substanz sollen gemeinsam besprochen werden. Hier können nun, je nachdem mehr demyelinisiertes Gewebe oder mehr gesundes Gewebe in einer Probe vorhanden ist, die Ergebnisse nach der einen (Lipidabbau) oder anderen Seite (normale weisse Substanz) verschoben sein. Die Schwankungen im Lipidgehalt dieser Extrakte sind dementsprechend gross. Von besonderem Interesse ist jedoch festzustellen, welche Substanzen als erste einer Veränderung unterliegen. In einem Extrakt ( $MS_5HU_2$ )

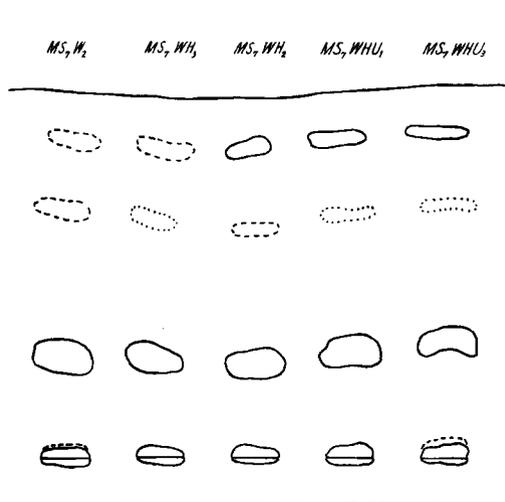


Fig. 4. Dünnschichtchromatogramm von je 25  $\mu$ l Lipidextrakt auf Kieselge IG  
 Laufmittel: Chloroform; Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure

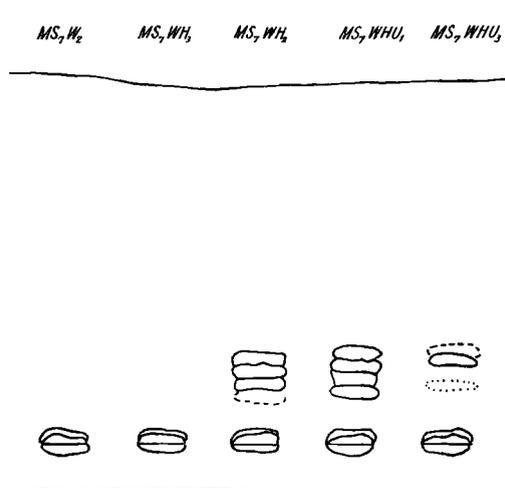


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm von je 25  $\mu$ l Lipidextrakt auf Kieselgel G  
 Laufmittel: Tetrachlorkohlenstoff; Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure

fanden sich Cholesterinester ohne offensichtliche Veränderung des Cholesterins und der übrigen Lipide. Diese Beobachtung, die auf eine Störung im Cholesterinstoffwechsel hinweisen würde, muss aber noch durch eine exakte Bestimmung nachgeprüft werden. In einem weiteren Extrakt ( $MS_5HU$ ) ist neben der Cholesterinesterbildung eine deutliche Cholesterinverminderung festzustellen. Ausserdem deutet sich eine Abnahme des Cerebrosides Nr. 19 an, während die übrigen Lipide noch unverändert erscheinen. Vom weiteren Abbau (Extrakt  $MS_1HU$ ) werden neben

Cholesterin und Cerebrosiden die Acetalphosphatide, Kephaline und Sulfatide erfasst, wie uns schon aus den Befunden der Herdextrakte bekannt. Im übrigen sind auch hier 2 Gruppen bezüglich Auftreten von Cholesterinestern festzustellen. Unterschiede in den Extrakten desselben sowie verschiedener Patienten sind ebenfalls anzutreffen.

Ein Vergleich mit den qualitativen Untersuchungen der 1. Mitteilung<sup>1)</sup> ist nur in beschränktem Rahmen möglich. Dabei sind besonders zwei Befunde, welche im pathologisch veränderten Gewebe erhoben wurden, von Interesse: 1. Eine Vermehrung von Cholesterinestern konnte bestätigt werden. 2. Ein zusätzlich vermehrtes Auftreten von weiteren Substanzen (z. B. Neutralfetten) konnte hier jedoch nicht beobachtet werden; wir vermuten, dass dies auf das Fehlen der normalerweise in grossen Mengen vorhandenen Myelinlipide im Herdmaterial zurückzuführen ist, was bei einer von gewichtsäquivalenten Lipidmengen ausgehenden Untersuchung eine Vermehrung gewisser Substanzen vortäuschen kann<sup>1)</sup>.

Vergleichen wir nun unsere Befunde mit denjenigen von CUMINGS<sup>9)</sup>, GERSTL *et al.*<sup>10)</sup> sowie BAUER & HEITMANN<sup>11)</sup>, die 2 Wochen formolfixiertes<sup>12)</sup> bzw. frisches, isoliertes Herd- und Nichtherdmaterial untersucht haben. In bezug auf weisse Substanz sind diese Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst. Diesen Arbeiten<sup>9-11)</sup> wurden nur die oberen bzw. unteren Grenzwerte aus verschiedenen Bestimmungen für die Tabelle entnommen (was z. T. den Anschein von Unstimmigkeiten erwecken kann). Es geht daraus eine starke Verminderung der Gesamtlipide im demyelinisierten Gewebe hervor, die sich in einer mehr oder weniger ausgeprägten Abnahme aller untersuchten Stoffe, Sphingomyelin, Lecithin, Kephalin, Plasmalogen, Cerebroside und Cholesterin, widerspiegelt. Eine Vermehrung von Cholesterinestern wurde nur von CUMINGS<sup>9)</sup> (in 4 von 7 Fällen) beobachtet. Diese Befunde werden durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Zusätzlich können wir jedoch differenziertere Aussagen bezüglich der Reihenfolge des Lipidabbaus machen sowie feststellen, dass nicht nur die erwähnten Stoffe, sondern noch eine ganze Reihe anderer Lipide durch die Demyelinisierung bei der Multiplen Sklerose vermindert werden. Der Abbau von Lecithin scheint dabei gegenüber den anderen Lipiden weniger rasch und weitgehend zu erfolgen. In Übereinstimmung mit CUMINGS<sup>9)</sup> können wir sogar in 6 von 7 Fällen Cholesterinester nachweisen. GERSTL *et al.*<sup>10)</sup><sup>13)</sup> dehnten ihre Untersuchungen auch auf Fettsäuren aus. Auf diese nur an einem Fall von Multipler Sklerose gemachten Befunde möchten wir hier nicht näher eintreten. CUMINGS<sup>9)</sup> sowie GERSTL *et al.*<sup>10)</sup><sup>13)</sup> beobachteten eine veränderte Zusammensetzung auch in der makroskopisch scheinbar normalen weissen Gehirns substanz bei Multipler Sklerose. Diesem Befund können wir auf Grund der bisherigen Untersuchungen nicht zustimmen.

<sup>9)</sup> J. N. CUMINGS, *Brain* 76, 551 (1953); 78, 554 (1955); in *Modern Scientific Aspects of Neurology*, ed. by J. N. CUMINGS, p. 344, Edward Arnold, Ltd., London 1960.

<sup>10)</sup> B. GERSTL, M. J. KAHNKE, J. K. SMITH, M. G. TAVASTSTJERNA & R. B. HAYMAN, *Brain* 84, 310 (1961).

<sup>11)</sup> H. BAUER & R. HEITMANN, *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 178, 47 (1958).

<sup>12)</sup> Von verschiedenen Autoren wurde eine Lipidverminderung nach Formolfixierung gefunden, speziell, wenn diese über längere Zeiträume erfolgte. Ergebnisse aus quantitativen Untersuchungen nach längerer Fixierung sind deshalb in dieser Arbeit nicht berücksichtigt worden.

<sup>13)</sup> B. GERSTL, R. B. HAYMAN, M. G. TAVASTSTJERNA & J. K. SMITH, *Experientia* 78, 131 (1962).

*Gehirnlipide aus weisser Substanz bei Multipler Sklerose*  
(makroskopisch normales Gewebe: MS norm., demyelinisiertes Gewebe: MS demyel.)  
und Kontrollfällen (K); von frischem<sup>10)</sup> bzw. 2 Wochen formolfixiertem<sup>9)</sup> Gewebe

Zahl der Fälle	Lit.	Total Lipide	Total Phospho- lipide (I)	Monoamino- phospho- lipide (II)	Sphingo- myelin (ber.) (I-II)	Lecithin (III)	
a) 3 K 5 MS norm. 5 MS demyel. 4 K 2 MS norm. 1 MS demyel.	<sup>9)</sup>    <sup>10)</sup>		6,0 4,22-6,56 1,82-4,38 6,24-8,28 4,59-5,26 3,17	3,7 2,44-4,03 1,33-2,63	2,3 1,78-2,8 0,49-1,75	1,2 0,89-1,7 0,34-1,24	
b) 1 K 2 MS norm. 3 MS demyel. **) K 2 MS demyel.	<sup>11)</sup>   <sup>9)</sup>	71,5 68,9-71,9 34,6-65,3	26,8 25,5-29,1 13,85-27,0 23,0 17,1-20,2	19,8 19,8-22,0 9,6-19,6	7,5 3,2-3,5		
Zahl der Fälle	Lit.	Kephalin (ber.) (II-III)	Freies Chole- sterin	Chole- sterin- ester	Cerebro- side	Plas- malogen	Wasser
a) 3 K 5 MS norm. 5 MS demyel. 4 K 2 MS norm. 1 MS demyel.	<sup>9)</sup>    <sup>10)</sup>	2,5 1,06-2,64 0,98-1,83	4,83 2,56-4,0 1,08-2,13 3,58-5,22 2,3 -3,6	0 0-1,07 0,08-1,76 0-0,1 0	5,5 3,5 -6,24 0,58-3,4	c) 3,361- 3,706 2,404*) 0,281	72,9 66,7-77,2 76,3-82,3 64,8-73,4 57,9-63,6
b) 1 K 2 MS norm. 3 MS demyel. **) K 2 MS demyel.	<sup>11)</sup>   <sup>9)</sup>		18,9 15,5 -17,7 8,75-15,2 14,0 6,1-8,6	0,3 0,3-0,7 0,3-0,5 0,3-0,6	17,7 15,6 -16,6 3,62-11,6	1,4 1,54-2,5 1,06-1,75	a) 70,6 69,3-70,8 65,1-78,5
a) in g/100 g Feuchtgewicht ;		*) Nur 1 Fall untersucht					
b) in g/100 g Trockengewicht:		**) Anzahl in Originalarbeit nicht angegeben					
c) in mMol/100 g Feuchtgewicht <sup>10)</sup>		Fehlergrenze der Bestimmungen ca. 4%.					

Auf die Bedeutung der in dieser Arbeit beschriebenen chemischen Veränderungen sowie ihrer Gegenüberstellung zu den gleichzeitig ablaufenden histopathologischen Vorgängen soll an anderer Stelle näher eingegangen werden.

Die Unterstützung dieser Arbeit durch den EMIL BARELL-FONDS sei auch an dieser Stelle herzlichst verdankt.

**Experimentelles.** - Verwendete Lösungsmittel: *p. a.* MERCK, destilliert. Alle Glaswaren wurden vor Gebrauch mit dem Extraktionsmittel gereinigt.

**Extraktion:** Abgewogenes Hirngewebe wird im Glashomogenisator mit Chloroform:Methanol = 2:1 (v/v) - pro 60 mg Frischgewebe 1 ml Extraktionsmittel - mindestens 3 Min. homogenisiert.

Das Homogenat wird in verschlossenem Zentrifugenglas 5 Min. bei 6000 U/Min. zentrifugiert. Der vorsichtig abgenommene Überstand (Lipide) wird chromatographisch aufgetrennt.

*Dünnschichtchromatographie:* Laufmittel s. S. 2022. Die Auftragung auf vorgereinigte Kieselgel G-Platten erfolgte auf einen 1,5 cm langen Strich, wobei für die Auftrennung im Lauf CMW 15  $\mu$ l, für Lauf C und T je 25  $\mu$ l Extrakt verwendet wurden. Zur Vermeidung von Verunreinigungen wurden die Deckel der Trennkammern nicht eingefettet, sondern nur mit einem Gewicht beschwert. Laufmittel CMW wurde jeden Tag, Laufmittel C und T jeden 2.–3. Tag erneuert.

*Anfärbung:* Orcin-Reagens (jeweils frisch zubereitet): 0,1 g Orcin (BDH) + 1 ml 1-proz. wässriges Ferrichlorid (*p. a.*, RIEDEL) werden mit 40 ml 2N Schwefelsäure (*p. a.* MERCK) versetzt. Chromatogramm bis feucht besprühen, mit einem rostfreien Metallrahmen (Breite 1 cm, Dicke 1,5 mm) und einer Deckplatte versehen, 35 Min. bei 105–110° im Ofen erhitzen und nach Entfernen der Deckplatte weitere 3 Min. im Ofen belassen. Man erhält rote bis violette, gelbe und graue Flecke auf schwach grauem Untergrund, welche vorwiegend Glykolipiden entsprechen. Die Flecke sind sofort einzuzeichnen, da sie nach mehreren Std. leicht verblassen.

Weitere Angaben s. 1. Mitteilung<sup>1)</sup>.

Frl. M. BERNHARDT danke ich für ihre geschickte experimentelle Mithilfe.

#### SUMMARY

1) Brain tissue from cortical white matter of seven multiple sclerosis patients has been separated in (a) white matter of macroscopically normal appearance, (b) center of demyelinated area, (c) surrounding white matter of the demyelinated areas and small demyelinated plaques plus surrounding white matter. These 46 samples of brain tissue have been individually extracted with chloroform : methanol (2 : 1).

2) The extracts (a)–(c) have been analysed by means of a semiquantitative thin layer chromatographic method;

to (a): in general, 28–32 spots are visible, whereby small deviations may occur in the various extracts of a single case, as well as in the comparison of different cases.

to (b): extracts from the center of the demyelinated areas are marked by a maximum loss of all lipids. In the extreme case only about half of the spots were still present. Two groups can be distinguished: one with and one without cholesterol esters. The maximum losses occur in cholesterol, cerebroside and spots 12, 13 and 15–17, which represent lipids which normally are present in high concentrations. Deviations may occur in the extracts of a single case, as well as in the comparison of different cases.

to (c): these extracts were examined especially in relation to the initial stage of the demyelination process.

The first noticeable chemical change seems to be the occurrence of cholesterol esters, without apparent loss of cholesterol. In the further degradation steps at first a decrease of cholesterol, then of the cerebroside, especially of spot No. 19, takes place, followed by a gradual loss of the other lipids. Deviations as in (a) and (b) may be observed in a single case as well as in the comparison of different cases.

Forschungslaboratorium der Neurologischen Universitätsklinik  
Basel, Socinstrasse 55