

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg. — Direktor: Prof.
Dr. Versé.)

Über die Bildung intracellulärer anisotroper Tröpfchen nach örtlicher Einspritzung von Cholesterin in die Cornea und Vorderkammer des Kaninchenauges¹⁾).

Von

Dr. med. **Wilhelm Rohrschneider**,
Assistent an der Universitätsaugenklinik Berlin.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Dezember 1924.)

Über das Schicksal von Lipoiden²⁾, die in reiner Substanz oder in Mischungen in den tierischen Organismus gebracht und dem Einfluß des umgebenden Gewebes überlassen wurden, sind experimentelle Untersuchungen von *Kawamura*, *Wail* und *Zinserling* ausgeführt worden. Durch diese Versuche sollte festgestellt werden, welche Veränderungen Neutralfett, Cholesterin und Cholesterinester bei parenteraler Zufuhr im Organismus erleiden. Dabei wurden durch Einspritzung die genannten Fettstoffe in das Unterhautgewebe, zum Teil auch in die Bauchhöhle gebracht und nach verschiedenen Zeitabständen mit Hilfe histochemischer Methoden und im polarisierten Licht untersucht. Diese Versuchsanordnungen waren kompliziert dadurch, daß die zu untersuchende Substanz sofort in ein gefäßreiches Gewebe gebracht wurde, in dem zum Teil auch wieder andere Lipide enthalten waren (subcutanes Fettgewebe). Man kann also bei den Resultaten dieser Untersuchungen³⁾ schließlich nicht mehr trennen, was als reines Umwandlungsprodukt der eingespritzten Lipide anzusprechen ist und was der Organismus des Versuchstieres an Lipoidsubstanzen geliefert hat. Um diesen Übelstand möglichst zu vermeiden, habe ich die Nachprüfung eines Teiles der Versuche, die von den oben genannten Autoren gemacht wurden, am Auge des Kaninchens vorgenommen. Meine Untersuchungen beschäftigen sich in der Haupt-

¹⁾ Ausgeführt mit Unterstützung der *Rockefeller-Stiftung* für Deutschland, der ich auch an dieser Stelle meinen Dank ausspreche.

²⁾ Unter „Lipoiden“ verstehen wir hier nach *Bang* sämtliche Fette und fettähnlichen Stoffe einschließlich der Triglyceride.

³⁾ Nach *Wails* Befunden soll sich z. B. unter die Haut gespritztes Neutralfett in Cholesterinester verwandeln.

sache mit den Veränderungen des dem Organismus parenteral zugeführten Cholesterins. Ich spritzte die Lipoidsubstanzen bei dem einen Teil meiner Versuche in die Hornhaut, ein von Hause aus lipoid- und gefäßfreies Gewebe. Etwaige Gefäßneubildung, die übrigens bei diesen Versuchen niemals auftrat, wäre am lebenden Tiere sofort mit dem Hornhautmikroskop erkennbar gewesen. Bei einem anderen Teil meiner Versuche wurden die Lipide in die Vorderkammer gebracht. Hier war zwar der Einfluß des Blutgefäßsystems der Uvea nicht auszuschließen; aber eine Beimengung anderer Fettstoffe aus den Geweben zu den eingespritzten konnte nicht eintreten.

Kawamura führte eine in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Mischung von Cholesterinoleat und Cholesterinpalmitat in die Bauchhöhle des Meerschweinchens und konnte schon nach 18 Stunden doppelbrechende Tröpfchen innerhalb großer Lymphocyten nachweisen. Ein Kontrollversuch, bei dem die gleiche Cholesterinester-mischung in das subcutane Gewebe injiziert wurde, hatte ein negatives Resultat bezüglich der Bildung intracellulärer anisotroper Tröpfchen. *Kawamura* schließt hieraus, daß bei solchen Versuchen doppelbrechende Tropfen innerhalb der Zelle nur dann zu finden wären, wenn das eingespritzte Lipoid sich vor der Aufsaugung durch die betreffenden Zellen im Körper in einem Medium befand, indem aus physikalischen Gründen Tröpfchen entstehen, und aus dem die Zellen das Lipoid unmittelbar in Tropfenform in sich aufnehmen können. Synthetisch dargestellte Cholesterinester bilden ja Kristalle und können erst in bestimmten Medien, z. B. Wasser-Glycerin oder Glycerin-Gelatine, in anisotrope Tröpfchen übergeführt werden. *Kawamura* bezeichnet seine Versuche als wertlos für die Erklärung der pathologischen anisotropen Verfettung, bei welcher häufig anisotrope Tröpfchen innerhalb von Zellen zu beobachten sind. Er ist vielmehr der Ansicht, daß diese Tröpfchen nicht durch einfache Phagocytose in die Zellen gelangen wie bei seinen Versuchen in der Bauchhöhle des Meerschweinchens, sondern innerhalb der Zellen aufgebaut werden. Auch mir gelang es nicht, durch Einspritzung einer mit Hilfe von Gummi arabicum hergestellten Aufschwemmung von Cholesterinestern¹⁾ in physiologischer Kochsalzlösung (Cholesterinoleat, -palmitat und -stearat zu gleichen Teilen) in der Vorderkammer des Kaninchenauges anisotrope Tröpfchen zu erzeugen (Versuch 1a). Ebenso wenig gelang dieses, wenn ich eine 5proz. Lösung der Cholesterinestermischung in Olivenöl in die Vorderkammer einführte (Versuch 1b). Dagegen gelang es *Zinserling*, anisotrope Tröpfchen innerhalb von Zellen durch parenterale Zufuhr von ungebundenem Cholesterin hervorzurufen. Er spritzte eine 4proz.

¹⁾ Die Cholesterinester stellte Herr Professor *Kutscher* im physiologischen Institut der Universität Marburg aus reinen Substanzen her, wofür ich ihm zu besonderem Danke verpflichtet bin.

Lösung von Cholesterin in Sonnenblumenöl in das Unterhautgewebe ein. Nach 5, 10, 20, 30 und 113 Tagen wurden mikroskopische Untersuchungen vorgenommen, durch welche festgestellt wurde, daß das eingeführte Öl allmählich aufgesaugt wurde, während die aus der Lösung ausgefallenen Cholesterinkristalle in dem sich bildenden Granulationsgewebe liegen blieben und zum Teil von Riesenzellen aufgenommen wurden. In diesen Riesenzellen sowie auch in Polyblasten, die nicht immer Beziehungen zu den Cholesterinkristallen erkennen ließen, fand *Zinserling* neben isotropen Fetttröpfchen auch kleinste tröpfchenförmige Zelleinschlüsse mit deutlich doppelbrechenden Eigenschaften (typische Kreuzfiguren im polarisierten Licht).

Ich habe mit geringfügigen Abweichungen die Versuche *Zinserlings* am Auge wiederholt und die diesbezügliche Versuchsanordnung in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Ver- suchs- Nr.	Lipoid	Herkunft d. Cholesterins	Wohin injiziert	Versuchs- dauer
2	5% Chol. in Rüböl	Kahlbaum	Vorderkammer	26 Tage
3	5% Chol. in Olivenöl	desgl.	desgl.	26 Tage
4	5% Chol. in Rüböl	Aus Gallensteinen selbst hergestellt	"	69 Tage
5	5% Chol. in „Salatöl“	desgl.	"	104 Tage
6	5% Chol. in Rüböl	"	Cornea	99 Tage
7	5% Chol. in „Salatöl“	"	"	183 Tage

Als übereinstimmendes Ergebnis aller dieser Versuche ist neben anderen Veränderungen am Auge das Auftreten anisotroper Tröpfchen innerhalb von Zellen zu verzeichnen. Daneben traten Zellen mit isotropen Tröpfchen auf; auch fanden sich reichlich unveränderte Cholesterinkristalle. Dieser Befund war zu erheben sowohl bei Injektion der Cholesterinöllösung in die Vorderkammer als auch in die Cornea¹⁾. Hierdurch sind also im wesentlichen die Versuchsergebnisse *Zinserlings* bestätigt.

Da es sich bei der Bildung anisotroper Tröpfchen innerhalb von Zellen nach der heute geltenden, allerdings noch nicht exakt bewiesenen Ansicht um das Auftreten von Cholesterinestern handelt, so erhob sich die Frage, woher die Zellen die zur Veresterung notwendigen Fettsäuren beziehen. Es liegt nahe, anzunehmen, daß die Fettsäuren aus dem gleichzeitig eingespritzten Öle stammen. Man könnte sogar auf den Ge-

¹⁾ Die Untersuchung auf Doppelbrechung im polarisierten Lichte wurde bei allen Versuchen an Schnittpräparaten, die in Gelatine eingebettet und mit Hämatoxylin gefärbt waren, nach der Vorschrift *Aschoffs* für formalinfixierte Gefrierschnitte vorgenommen.

danken kommen, daß der Vorgang der Veresterung, falls ein solcher vorlag, sich als selbständiger chemischer Vorgang während der langen Versuchsdauer in der Cholesterinöllösung vollzog. Um dieses aufzuklären, habe ich eine 10proz. Lösung von Cholesterin in Rüböl in einem keimfreien Reagensglase 66 Tage lang bei 37° C aufbewahrt. Die Cholesterinkristalle waren während dieser Zeit in Menge aus der Lösung ausgefallen, es wurden aber keine doppelbrechenden Tröpfchen gefunden. Das Fehlen doppelbrechender Tropfen spricht allerdings noch nicht gegen etwaige Esterbildung, da ja, wie schon angedeutet, die Substanz, in der man die Lipoide untersucht, für die Tröpfchenbildung von Wichtigkeit ist; hier wurde die Cholesterinölmischung in reinem Zustande untersucht. Es erwies sich also als notwendig zu versuchen, der Lösung dieser Frage auf anderem Wege näherzukommen.

Der Einfluß des gleichzeitig eingespritzten Öles ließ sich dadurch ausschalten, daß reines Cholesterin ohne Ölzusatz in die Vorderkammer gebracht wurde. Hier ergaben sich technische Schwierigkeiten, die zu einigen Mißerfolgen führten; deshalb verfüge ich nur über 2 gelungene Versuche. Zunächst erwiesen sich Cholesterinkristalle, die aus 80proz. Alkohol auskristallisiert waren, als unbrauchbar zur Herstellung einer Aufschwemmung, da sie stark aneinander haften und sich sofort zusammenballen. Aber auch bei den aus Äther auskristallisierten Cholesterinkristallen konnte eine längere Zeit haltbare Aufschwemmung nur mit Hilfe von Gummi arabicum hergestellt werden. Die zweite Schwierigkeit stellte sich bei der Einspritzung selbst heraus. Am leichtesten konnte ich eine größere Menge von Kristallen in die Vorderkammer bringen, wenn ich mit dem Lanzenmesser die Vorderkammer eröffnete und nach Ablassen des Kammerwassers die Vorderkammer mit der Suspension füllte. Da das zweite Kammerwasser des Kaninchens fibrinhaltig ist, so trat nach einigen Stunden bei der Fibrinbildung eine Zusammenballung der eingespritzten Cholesterinkristalle ein. Nach 10 Tagen wurde die Injektion wiederholt. Beide Male wurde das Cholesterin 37 Tage lang in der Vorderkammer belassen und dann das Tier getötet.

Das Ergebnis dieser beiden Versuche (8 und 9) war, daß beide Male neben freiliegenden Cholesterinkristallen sehr reichlich doppelbrechende Tröpfchen in Lipoidophagen gefunden wurden, und zwar in größerer Menge als bei den Versuchen mit Einspritzung einer Cholesterinöllösung; isotrope Tröpfchen fehlten in den Zellen gänzlich. Im Gegensatz zu den freiliegenden Cholesterinkristallen färbten sich die anisotropen Tröpfchen mit Sudan III und nahmen dabei einen schmutzigen Farbton an. Abb. 1 zeigt eine Partie aus der Vorderkammer nach einem mikroskopischen Schnitt von Versuch 8 im polarisierten Licht bei schwacher Vergrößerung. Man sieht in der Mitte die hellaufleuchtenden zusammengeballten Cholesterinkristalle und darum die feinen anisotropen Tröpf-

chen, die — wie auf der Mikrophotographie nicht erkennbar — innerhalb von Lipoidophagen liegen. In Abb. 2 sind diese intracellulären Tröpfchen in demselben Präparat bei starker Vergrößerung dargestellt. Die

typischen Kreuzfiguren treten auf der Mikrophotographie deutlich hervor.

Diese Versuche beweisen

1. daß zur Bildung anisotroper Tröpfchen innerhalb der Zelle die Anwesenheit gleichzeitig eingespritzten Öles nicht notwendig ist;

2. daß das injizierte Cholesterin durch die Aufnahme in Lipoidophagen eine Änderung seines physikalischen und seines chemischen Zustandes erfährt. Das geht hervor einerseits aus der Bildung

anisotroper Tröpfchen nach der Aufnahme des Cholesterins in die Zellen, andererseits aus der Färbbarkeit der intracellulären Tröpfchen mit Sudan III neben den ungefärbten Kristallen.

Es ist also möglich, daß bei den geschilderten Versuchen eine Veresterung des zugeführten Cholesterins im Organismus unter Umgehung des Magendarmkanals eingetreten ist.

Der Vollständigkeit halber füge ich noch hinzu, daß ich zu diesen Versuchen Kontrollversuche mit reinem Öl ohne Cholesterinzusatz gemacht habe, indem ich Rüböl und „Salatöl“ je einmal in die Vorderkammer und in die Cornea einspritzte. Bei

allen 4 Versuchen wurde niemals eine doppeltbrechende Substanz sichtbar. Ein Abbau des eingespritzten Neutralfettes zu doppeltbrechenden Phosphatiden oder Cholesterinestern, wie *Wail* bei seinen Versuchen

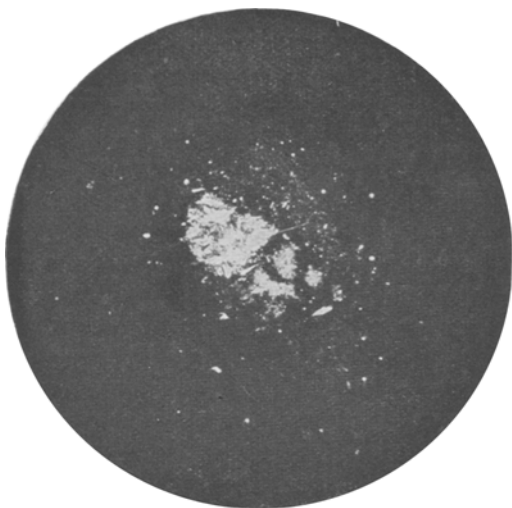


Abb. 1.

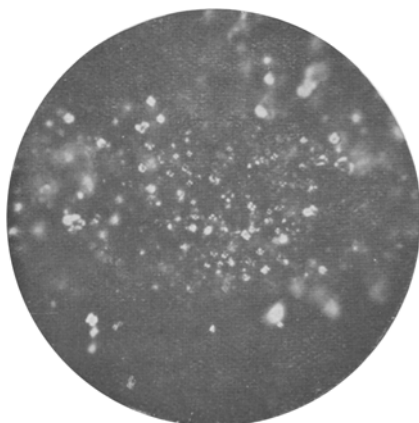


Abb. 2.

gefunden zu haben behauptet, ist am Auge jedenfalls nicht nachzuweisen, trotz der von *Wail* geforderten genügend langen Versuchsdauer.

Anschließend hieran will ich noch kurz auf die Ausbreitung der eingespritzten Lipide im Auge eingehen: *Meesmann* hat angegeben, bei einem Versuche, der meinen Versuchen 8 und 9 sehr ähnlich ist, infolge der Einspritzung von Cholesterinkristallen in die Vorderkammer eine sekundäre Verfettung der Cornea beobachtet zu haben. Die Nachprüfung dieses Versuches ist insofern von Wichtigkeit, als die Ablagerung von Cholesterinkristallen in der Vorderkammer ein nicht allzu seltener Befund bei menschlichen Augen ist (*Xanthomatosi bulbi*, v. *Szily*). Außerdem würde unsere Kenntnis von der Pathologie der cornealen Aufsaugung im allgemeinen und der Corneaverfettung im besonderen durch den experimentellen Beweis, daß ein derartiger Vorgang möglich ist, sehr erweitert werden, da bisher solche sekundäre Verfettung der Cornea von der Vorderkammer aus ein Versuch noch nicht nachgewiesen ist.

Bei meinem Versuch 8, wo die Hornhaut mit dem Lanzenmesser durchschnitten wurde, außerdem bei einem der mit reinem Öl angestellten Versuche, habe ich bei der mikroskopischen Untersuchung auch Fett in der Cornea gefunden. Diese Einlagerung von Fett in das Hornhautgewebe lag jedesmal in unmittelbarer Nähe der Schnittwunde bzw. der Einstichstelle der Kanüle, und es ließ sich aus den histologischen Präparaten ohne weiteres erkennen, daß das Fett im unmittelbaren Anschluß an die Einspritzung in die Hornhaut gelangt war. Die übrige Substantia propria der Hornhaut war wie die der anderen Tiere dieser Versuchsreihe mikroskopisch vollständig fettfrei. Eine sekundäre Verfettung der Hornhaut von der Vorderkammer aus ist also noch nicht erwiesen. Bei denjenigen Versuchen, bei denen die Lipide direkt in das Hornhautgewebe eingespritzt waren, traten fetthaltige Zellen nur in der nächsten Umgebung der künstlichen Lipoiddepots auf. Die übrige Hornhaut war auch bei diesen Versuchen frei von Fett. Wurde das Cholesterin, in Öl gelöst, in die Vorderkammer eingespritzt, so waren die Endothelzellen der Descemetischen Membran an der Stelle, wo ihnen der Öltropfen unmittelbar angelegen hatte, verfettet. Dasselbe beobachtete ich nach Einspritzung von reinem Öl. Auch an der Iris konnte ich eine resorptive Verfettung feststellen, und zwar an den Stellen, wo die zusammengeballten Cholesterinkristalle unmittelbar auf der Iris lagen. Hier waren in den oberflächlichen Schichten der Iris Lipidophagen aufgetreten. Die übrige Uvea sowie die Sklera und die Retina waren frei von Fett.

Wenn *Meesmann* als weitere Folge der Einspritzung von Cholesterinkristallen in die Vorderkammer bei seinem albinotischen Kaninchen eine Verfettung des retinalen Pigmentepithels ansieht, so muß ich dem entgegenhalten, daß ich bei allen erwachsenen albinotischen Kaninchen,

deren Augen ich untersucht habe, diesen Fetttropfen, der übrigens isotrop ist, in den Pigmentepithelzellen der Retina gefunden habe. Dieser am normalen Auge des albinotischen Kaninchens besonders hervortretende Befund ist seit längerer Zeit bekannt (*Krause*, Die Anatomie des Kaninchens, Leipzig 1874), und noch in letzter Zeit hat *Versé* darauf hingewiesen.

Auf die durch Fremdkörperreizung seitens der eingespritzten Lipoiden hervorgerufenen reaktiven Vorgänge an den Augengeweben will ich hier nur kurz eingehen. Im allgemeinen wurden die Fettstoffe sowohl in der Vorderkammer als auch in der Cornea nach vorübergehenden anfänglichen Reizzuständen längere Zeit vom Auge gut vertragen (bis zu 6 Monaten beobachtet). Wenn eine 5proz. Cholesterinöllösung in die Vorderkammer eingespritzt wurde, so fielen nach etwa 1—2 Wochen aus dem injizierten Tropfen Cholesterinkristalle aus und lagerten sich an die Hornhauthinterfläche. Dieser Vorgang ist wohl durch die Abkühlung der Cholesterinöllösung in der Vorderkammer hervorgerufen, infolge deren die Löslichkeit des Cholesterins im Öl herabgesetzt ist. Läßt man im Reagensglas eine durch Erwärmen hergestellte 5proz. Lösung von Cholesterin in Öl allmählich abkühlen, so beginnen die ersten Cholesterinkristalle bei ca. 32° C auszufallen. Die ausgefallenen Cholesterinkristalle übten bei meinen Versuchen in der Vorderkammer eine stärkere Reizwirkung aus als das flüssige Öl. Daher traten sekundäre Entzündungserscheinungen an der Cornea nur dann in stärkerem Maße auf, wenn Cholesterinöllösung in die Vorderkammer eingespritzt worden war, im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen reines Öl verwendet wurde. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich, daß die Anwesenheit der Cholesterinkristalle eine Gewebswucherung veranlaßt hatte, welche im Zusammenhange mit dem Endothel der Descemetischen Membran stand. Das neugebildete Gewebe bestand aus teils parallelen, teils spitzwinklig einander zustrebenden Balken einer anscheinend homogenen Grundsubstanz. Die Ränder dieser Balken, welche etwa die Breite von Hornhautlamellen hatten, waren mit flachen endothelartigen Zellen besetzt. Dazwischen lagen die Cholesterinkristalle und größere, mehr rundliche Lipidophagen. Diese Gewebsneubildung war immer anzutreffen, wenn eine Cholesterinöllösung in die Vorderkammer eingespritzt worden war. Nur angedeutet war sie nach Injektion reinen Öles in die Vorderkammer an den Rändern des Öltropfens vorhanden. Bei den beiden Versuchen mit Einspritzung einer Aufschwemmung von Cholesterinkristallen ohne Ölzusatz wurde diese Gewebswucherung vermißt. Es war hier nur um die Cholesterinkristalle, welche sich zusammengeballt auf der Iris abgelagert hatten, ein Granulationsgewebe entstanden, das reichlich Lipidophagen mit anisotropen Tröpfchen enthielt. Bei einem Versuche waren Cholesterinkristalle in den Kammerwinkel gelangt und

hatten dort zur Bildung von Fremdkörperriesenzellen Anlaß gegeben. Bei Einspritzung von Cholesterinöllösung zwischen die Hornhautschichten war als wesentlicher Befund das Auftreten von Lipidophagen in der nächsten Umgebung der injizierten Lipidtropfen anzutreffen.

Literaturverzeichnis.

Aschoff, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **47**, 1910. — *Bang*, Chemie und Biochemie der Lipide. Wiesbaden 1911. — *Kawamura*, Die Cholesterinester-
verfettung. Jena 1911. — *Meesmann*, Arch. f. Augenheilk. **94**, 56. 1924. — *v. Szily*,
Klin. Monatsbl. f. Augenheilk. **71**, 30. 1923. — *Versé*, Verhandl. d. Dtsch. pathol.
Ges. 19. Tagung. Göttingen 1923. — *Versé*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u.
Physiol. **250**, 252. 1924. — *Wail*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol.
245, 219. 1923. — *Zinserling*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **71**, 292.
1923.
