

Beitrag zur Morphologie der Lipide.

Von

Dr. Hans Kutschera-Aichbergen,
Prosekturadjunkt.

(Eingegangen am 12. Dezember 1924.)

In der medizinischen Literatur der letzten 20 Jahre nimmt die Frage der Bedeutung der „Lipide“ einen breiten Raum ein. Sehr zahlreich sind die Abhandlungen, welche sich mit den „Lipiden“ im allgemeinen, dem Lipidstoffwechsel, den Zelllipiden, den Blutlipiden, den Nebennierenlipiden, den Gehirnlipiden usw. beschäftigen. Und doch ist der Begriff der „Lipide“ bis heute so wenig gut umgrenzt, daß ein hervorragender Kenner dieses Gebietes wie *Abderhalden* meint, es wäre besser, den Namen „Lipide“ überhaupt fallen zu lassen, denn es würden „bedauerlicherweise die heterogensten Verbindungen“, ja „nahezu alles, was man in der Zelle nicht genau definieren kann“, sofern es bezüglich der Löslichkeit mit den Fetten übereinstimme, unter dem Namen „Lipide“ zusammengefaßt.

Es scheint mir daher notwendig, vorerst festzulegen, welche Substanzen im folgenden als Lipide bezeichnet werden sollen. Der besseren Übersichtlichkeit wegen habe ich die wichtigsten der im menschlichen Körper vorkommenden Lipide in der Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1.

Gruppennamen	Einzelbeispiele	Chemische Zusammensetzung ¹⁾
1. Glycerinester (Neutralfett) . .	—	Glycerin + Fettsäuren
2. Cholesterinester	—	Cholesterin + Fettsäuren
3. Phosphatide: a) ungesättigt .	Lecithine, Cephalin	Organische Basen + Glycerinphosphorsäure + Fettsäuren
b) gesättigt . .	Sphingomyelin	Organische Basen + Phosphorsäure + Fettsäuren
4. Cerebroside-Sphingogalaktoside	Phrenosin, Kerasin	Organische Basen + Galaktose + Fettsäuren

¹⁾ In der Tabelle wurden die allgemeinen Bezeichnungen „Fettsäuren“ und „organische Basen“ eingesetzt und die verwirrende Fülle der chemischen Einzelnamen nach Möglichkeit vermieden, um in dieser zur ersten Orientierung bestimmten Zusammenstellung den Überblick zu erleichtern. Genauere Angaben über den chemischen Aufbau dieser Stoffe bei *S. Fraenkel, Thudichum, Thierfelder*.

Jene Lipide, deren chemische Zusammensetzung noch nicht sichergestellt ist (wie z. B. Cuorin, Jecorin, Sulfatide), werden dabei nicht berücksichtigt.

Manches scheint für eine gemeinsame Bezeichnung der in der Tab. I zusammengestellten Stoffe mit dem Namen „Lipide“ zu sprechen, und in diesem Sinne glaube ich, daß sich eine solche Zusammenfassung rechtfertigen läßt¹⁾. Dazu möchte ich vor allem folgende Gründe anführen:

1. Die Lipide zeigen in ihrem chemischen Aufbau gemeinsame Eigenschaften. Sie alle enthalten eine hohe Fettsäure esterartig an einen organischen Komplex gebunden²⁾. Vielfach kehren die *gleichen* Fettsäuren in verschiedenen Lipoidgruppen wieder, z. B. die Palmitin-, die Stearin- und die Ölsäure in Gruppe 1, 2 und 3a, die Lignocerin- und die nahe verwandte Cerebronsäure in den Gruppen 3b und 4.

2. Abgesehen von den Fettsäuren sind auch andere chemische Bestandteile mehreren Lipiden *gemeinsam*, das Glycerin der Gruppe 1 und 3a, die Phosphorsäure der Gruppe 3a und 3b; auch die gleichen organischen Basen können in verschiedenen Gruppen wiederkehren, z. B. das Cholin in Gruppe 3a und b, das Sphingosin in Gruppe 3b und 4. Bei dem Vergleich aller dieser auf den ersten Blick anscheinend verschiedenartigen Lipide ergibt sich also, daß diese Mannigfaltigkeit durch die verschiedene Gruppierung nur *weniger* (weil zumeist mehreren Gruppen *gemeinsamer*) organischer Bausteine erzeugt wird³⁾.

3. Die Lipide haben ähnliche physikalische Eigenschaften, besonders was ihre Löslichkeit in Fettlösungsmitteln anlangt.

Im folgenden wird uns die Frage beschäftigen, ob diese chemisch verschiedenen Lipoidgruppen auch morphologisch identifiziert und bei

¹⁾ Dagegen ist es wohl abzulehnen, wenn etwa auch die zahlreichen Bausteine bzw. Abbauprodukte der Lipide wie Fettsäuren, Cholin, Cholesterin, Glycerin u. a. herausgegriffen und auch diese (wie *Abderhalden* so treffend bemerkt, „heterogensten Verbindungen“) schon als Lipide bezeichnet werden.

²⁾ *Escher* bezeichnet alle Substanzen als Fettstoffe, „welche aus einer höheren aliphatischen Verbindung — etwa von C₁₀ oder C₁₂ an gerechnet — bestehen oder solche chemisch gebunden enthalten, soweit dieselben die allgemeinen Löslichkeitsverhältnisse der Glycerinesterfette besitzen“.

³⁾ Auf diese Zusammengehörigkeit weisen auch folgende Beobachtungen hin: 1. Die Stoffwechselversuche von *Hueck* und *Wacker* über die wechselseitige Ersetzbarkeit verschiedener Lipide. 2. Dort, wo die 4 erwähnten Lipoidgruppen im Körper angetroffen werden (in reichlicherer Menge im Zentralnervensystem, in den Nebennieren und im Blut), sind sämtliche Lipide stets sehr innig untereinander vermischt, ja die verschiedenen Lipide sind gegenseitig so fest verankert, daß die vollkommen reine Darstellung und Abtrennung einzelner Lipide aus dem Gemenge auf außerordentlich große Schwierigkeiten stößt. (*S. Fraenkel*.)

der mikroskopischen Betrachtung voneinander unterschieden werden können.

Bisher suchte man auf 2 Wegen der Lösung dieser Frage näherzukommen:

1. Durch parallelgehende histologische und chemische Untersuchungen;

2. durch Untersuchung der einzelnen isolierten und möglichst rein dargestellten Lipoide mit den in der mikroskopischen Technik gebräuchlichen Färbemethoden und Vergleichung der an den isolierten reinen Präparaten erhaltenen Farbtöne mit den durch gleiche Färbung in lipoidhaltigen Gewebsschnitten erzielten Farbtönen.

Ad 1. Diese Paralleluntersuchungen befaßten sich ausschließlich mit der Frage der chemischen Zusammensetzung der doppeltbrechenden (von *Kaiserling* und *Orgler* im Jahre 1902 entdeckten) Lipoidtröpfchen.

Panzer war der erste Chemiker, der sich erfolgreich um die Lösung dieses Problems bemühte. Er extrahierte Organe, welche bei der morphologischen Untersuchung (*Stoerk*, *Schlagenhauer*) einen besonders reichen Gehalt an anisotropen Lipoiden aufgewiesen hatten, mit Alkohol und heißem Aceton und isolierte doppeltbrechende Krystalle, die sich bei der Sudanfärbung und bei der Osmierung ebenso verhielten, wie die anisotropen Lipoidtröpfchen in den mikroskopisch untersuchten Gefrierschnitten der gleichen Organe. Als „integrierende Bestandteile“ dieser Krystalle konnte *Panzer* Cholesterin und Fettsäuren feststellen. *Panzer* betonte, daß die von ihm dargestellten Krystalle nicht ausschließlich aus Cholesterinestern beständen, sondern aus einem *Gemenge* von Cholesterinestern mit *anderen* unbekannten Substanzen.

Windaus richtete bei Untersuchungen, welche das gleiche Ziel verfolgten, seine Aufmerksamkeit nur mehr allein auf das Cholesterin und die Cholesterinester und zog die Frage, ob neben den Cholesterinestern auch noch *andere* Lipoide an der Bildung der anisotropen Tröpfchen beteiligt sein könnten, gar nicht mehr in den Kreis seiner Untersuchungen. *Windaus* stellte fest, daß Nieren, welche mikroskopisch besonders reich an anisotropem Lipoid befunden worden waren (*Aschoff*), bei der chemischen Untersuchung sehr viel mehr Cholesterinester und auch etwas mehr freies Cholesterin enthielten als normale Nieren. *Windaus* glaubte deshalb, mit „großer Wahrscheinlichkeit“ annehmen zu dürfen, „daß die doppeltbrechenden Stoffe der pathologisch verfetteten Nieren aus Gemischen von Cholesterylpalmitat und Cholesteryloleat bestehen“. Bei der Untersuchung atheromatöser Aorten gelangte *Windaus*, abgesehen von einer stärkeren Mitbeteiligung auch des freien Cholesterins, zu dem gleichen Ergebnis.

Das von *Windaus* beigebrachte Zahlenmaterial ist sehr eindrucksvoll, doch erlaubt es m. E. einzig und allein den Schluß, daß die doppeltbrechenden Substanzen Cholesterinester *enthalten*, dagegen gestattet es *nicht* den Schluß, daß die anisotropen Lipoide ausschließlich aus Cholesterinestern *bestehen*.

Nach *Windaus* beschäftigten sich noch mehrere andere Untersucher mit der gleichen Frage. Aber auch alle diese chemischen und morphologischen Paralleluntersuchungen berücksichtigten wieder ausschließlich *nur* die Cholesterinester und das Cholesterin. Der Gedanke der

ersten Untersucher (*Kaiserling, Panzer*), daß die anisotropen Tröpfchen aus einem *Gemenge verschiedener* Lipoide bestehen könnten, wurde auch hierbei gar nicht mehr erwogen und geriet infolgedessen in Vergessenheit.

Bei diesen Untersuchungen, welche meist die anisotropen Lipoide menschlicher Nebennieren betrafen (*Landau und McNee, H. Sternberg, Wacker und Hueck, Weltmann, Fex*), ergab sich wieder, daß der chemisch bestimmbare Gehalt an Cholesterinestern und freiem Cholesterin ungefähr die gleichen Schwankungen zeigte, wie die morphologisch geschätzte Menge des anisotropen Lipoids. Die Übereinstimmung war allerdings keine genaue, sondern es kam auch vor, daß anscheinend an anisotropen Lipoiden reichere Nebennieren weniger Cholesterinester enthielten als morphologisch lipoidärmere Nebennieren. Auf diese schon von *Landau* und *McNee* beobachteten Unregelmäßigkeiten hat besonders *Fex* hingewiesen. Kompliziert wird die Beurteilung noch dadurch, daß auch Organe, die bei der mikroskopischen Untersuchung frei von anisotropen Lipoiden gefunden werden, doch Cholesterinester enthalten können, z. B. die Nebennieren des Schweines und des Ochsen (*Biedl, Beumer*) und menschliche Nebennieren, wenn der Cholesterinestergehalt unter 0,25% des feuchten Organgewichtes (das entspricht etwa 1% der Trockensubstanz) liegt.

Zur Klärung dieser Frage wurde auch der Tierversuch herangezogen. Wenn man Herbivore mit sehr großen Cholesterinmengen monatelang schoppt, dann nimmt die Menge der anisotropen Lipoide in den Nebennieren der Versuchstiere zu, und außerdem werden auch anisotrope Lipoide in den Reticuloendothelien (besonders der Leber und der Milz) und in der Gefäßwand der Versuchstiere abgelagert (*Rothschild, H. Sternberg, Anitschkow, Soper*).

Daraus glaubte man wieder den Schluß ableiten zu dürfen, daß das anisotrope Lipoid aus Cholesterinestern bestehe. Da aber bei den mit Cholesterin geschoppten Herbivoren¹⁾ nicht nur die Cholesterinester, sondern *auch die Phosphatide und die Glycerinester* im Blutserum an Menge *sehr beträchtlich zunehmen* (*Wacker und Hueck*), ist es nicht allzu fernliegend, an die Möglichkeit zu denken, daß auch an der vermehrten Bildung der anisotropen Lipoidtröpfchen in den Geweben Phosphatide und Triglyceride beteiligt sein könnten! Dafür spricht ferner auch die Beobachtung, daß reichlichere Lipoidablagerungen in den Organen nur dann entstehen, wenn neben reinem Cholesterin *gleichzeitig auch andere Lipoide* (Gehirn, Leber, Ei, Öl) verfüttert werden (Lit. bei *Schönheimer*).

Aus allen diesen mühevollen chemischen und morphologischen Paralleluntersuchungen kann also nur das eine mit Sicherheit gefolgert werden: Die anisotropen Lipoidtröpfchen in normalen Nebennieren, in pathologisch verfetteten Nieren, Aorten usw. *enthalten* regelmäßige Cholesterinester und freies Cholesterin. Die Frage, ob neben den Cholesterinestern nicht auch *andere* Lipoide an der Bildung der anisotropen Tröpfchen beteiligt seien, ist noch offen; ja manche Erfahrungen sprechen dagegen, daß die anisotropen Lipoide ausschließlich aus Cholesterinestern und Cholesterin bestehen, so insbesondere die Beobachtung von *Dietrich*, daß die doppeltbrechenden Lipoide im Gewebe in der Regel auch nach *Smith* färbbar seien. Wie wir später sehen werden, sind ja weder Cholesterinester noch Cholesterin nach *Smith*

¹⁾ Die Carnivoren reagieren auf Cholesterinfütterung nicht mit Speicherung anisotroper Lipoide (*H. Sternberg, Anitschkow*).

färbbar, sondern diese Färbung dürfte durch ein (also in der Regel an Cholesterinester gebundenes) *Phosphatid* bedingt sein! (S. S. 578 und 590.) Diese (auf histochemischen Beobachtungen beruhende) Schlußfolgerung fand ich bei chemischen Untersuchungen bestätigt: Die Atheromatose der Gefäße ist wohl eines der bekanntesten Beispiele der sog. Cholesterinesterverfettung. In atherosklerotischen Arterien nun konnte ich neben der Cholesterinvermehrung stets auch eine bedeutende Vermehrung des lipoiden (ätherlöslichen) Phosphors nachweisen¹⁾.

Nach alledem ist es vielleicht besser, den von Kaiserling vorge schlagenen, mehr allgemeinen Ausdruck „*Lipoidosis*“ für die anisotrope Verfettung beizubehalten, denn die Bezeichnung „Cholesterinesterverfettung“ würde bedeuten, daß ausschließlich Cholesterinester an der Bildung der hierbei auftretenden Lipoidtröpfchen beteiligt seien.

Zu Punkt 2 (vgl. S. 571) ist folgendes zu bemerken: Die in den Geweben enthaltenen Lipide können nicht nur nach ihrem optischen Verhalten (von welchem im vorhergehenden Abschnitte die Rede war) in isotrope und anisotrope geschieden werden, sondern sie können auch durch die histologischen Färbemethoden in verschiedenen Farben bzw. in verschiedenen Farbtönen dargestellt werden. Da diese Färbemethoden sehr mannigfaltig sind, ist uns die Möglichkeit gegeben, die Lipide noch weiter in ziemlich zahlreiche Gruppen zu scheiden. Es fragt sich nun, ob den in gleicher Farbtönung färbbaren Lipiden stets auch die gleichen chemischen Verbindungen entsprechen, und ob die mit dem Mikroskop unterscheidbaren verschiedenen Lipoidgruppen auch chemisch verschiedenen, bestimmten Lipiden entsprechen. Die Lösung dieser Frage versuchten mehrere Autoren in der Weise, daß sie chemisch möglichst rein isolierte Lipide, Lipoidabbauprodukte und künstlich bereitete Lipoidgemische in Emulsionen oder in feiner Verteilung auf Glasplatten, Zigarettenpapier oder Filtrierpapier²⁾ mit den in der Histologie gebräuchlichen Färbemethoden und auch bezüglich ihres Lichtbrechungsvermögens untersuchten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind von Aschoff, Kawamura und von Escher in ausführlichen Tabellen zusammengestellt worden.

Obwohl wir in diesen Tabellen die färberischen und optischen Eigenschaften der meisten bekannten Lipide verzeichnet finden, ergeben sich doch die größten Schwierigkeiten, sobald wir versuchen, an der Hand dieser Tabellen zu ermitteln, ob irgendein bestimmtes Lipoid

¹⁾ Diese Vermehrung kann mehrere hundert Prozent betragen; es wird darüber an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden.

²⁾ Die mit Lipoid getränkten Papierstreifen können ebenso wie Gewebsschnitte behandelt (fixiert, gehärtet, gebeizt, gefärbt, differenziert) werden (R. Altman, Wlassak, Escher).

in einem Fetttröpfchen des Gewebes vorhanden sei oder nicht. Wenn wir beispielsweise feststellen wollen, ob ein doppeltbrechendes Lipoidtröpfchen Lecithin enthält, dann nützt es uns recht wenig, daß wir genau wissen, in welchen Farbabtönungen *chemisch reines* Lecithin bei Anwendung bestimmter Färbungen erscheint. *Da Lecithin in chemisch reinem Zustande, also unvermischt, im Organismus überhaupt nicht vorkommt, können wir ja gar nicht erwarten, daß es in einem Lipoidtröpfchen des Gewebes die gleichen Farbnuancen zeigt wie in reinem Zustande.*

Ich gehe daher im folgenden auf die feineren Farbabstufungen, die beispielsweise für die Färbung mit Nilblausulfat von *Kawamura* mit so großer Genauigkeit verfolgt worden sind, gar nicht weiter ein¹⁾. Wenn wir dagegen nur solche Methoden berücksichtigen, welche bei bestimmten Lipoiden ein positives, bei anderen dagegen ein völlig negatives Resultat ergeben, ist eine Beurteilung, welche Lipotide vorliegen, schon eher möglich. Zur Orientierung über diese Verhältnisse habe ich in der Tab. 2 die wichtigsten morphologischen Gruppenreaktionen zusammengestellt²⁾. Ich habe mich auch hier auf die An-

Tabelle 2. Farbreaktionen von Lipoiden in reinem (isoliertem) Zustande.

	Doppel- brechung	Sudan	Markscheiden- färbungen ³⁾	Ciaccio
1. Glycerinester	—	+	—	—
2. Cholesterinester	+	+	—	—
3. Phosphatide: a) ungesättigte; Beispiel: Lecithin ⁴⁾	+	+	+	+
b) gesättigte; Beispiel: Sphingomyelin	+	+	+	—
4. Cerebroside-Sphingogalaktoside	+	+	+	—

¹⁾ Reines Lecithin wird nach *Kawamura* durch Nilblausulfat „bläulich“ gefärbt. Die Lipoidtröpfchen in der Nebenniere ergeben nach dem gleichen Untersucher mit Nilblausulfat „rötlich-bläuliche, rot-blaurote oder blau-blaurote“ Farbtöne. Wer wollte entscheiden, welcher von diesen 3 Farbtönen für einen Gehalt an Lecithin spricht?

²⁾ Die Unterlage für diese Zusammenstellung sind die übereinstimmenden Befunde von *Aschoff*, *Kawamura* und *Escher*, von deren Richtigkeit ich mich durch eigene Nachprüfungen gleichfalls überzeugen konnte. Nur bezüglich des Sphingomyelins und der Cerebroside sind wir auf die Untersuchungen von *Kawamura* allein angewiesen; über die Eigenschaft der Doppelbrechung liegen beim Sphingomyelin auch gleichlautende Mitteilungen von *Thudichum* und von *Rosenheim* vor.

³⁾ Vgl. hierzu Tab. 3.

⁴⁾ Das Cephalin zeigt keine Doppelbrechung, verhält sich aber im übrigen wie das Lecithin (*Kawamura*).

⁵⁾ Von *Kawamura* wird gelbrote Färbung angegeben; ich fand diese Färbung nur äußerst schwach ausgeprägt; wenn man die Filterstreifen nicht mit sehr konzentrierten Lecithinlösungen (deren Eigenfarbe aber die Sudanfärbung fast völlig verdeckt) beschickt, erhält man überhaupt keine Färbung mit Sudan. Ebenso scheinen sich die gesättigten Phosphatide und die Cerebroside zu verhalten, von welchen ich allerdings keine reinen Lösungen zur Verfügung hatte (vgl. Tab. 6).

führung der wichtigsten und für das Verständnis der folgenden Ausführungen unentbehrlichen Reaktionen beschränkt, da durch die Anführung aller der zahlreichen geprüften Färbemethoden die Übersichtlichkeit verloren ginge. Bezüglich der Einzelheiten verweise ich auf die ausführlichen Tabellen von *Kawamura* und von *Escher*.

Aus der Tab. 2 ist folgendes zu ersehen:

1. Die Eigenschaft der Doppelbrechung wird nur bei den Glycerinestern völlig vermisst.

2. Durch Sudan sind Glycerinester und Cholesterinester gut färbbar, Phosphatide und Cerebroside aber schlecht oder gar nicht färbbar.

3. Nach den *Weigertschen* Markscheidenfärbungen und deren Modifikationen (im folgenden gekürzt als W. F. bezeichnet) und nach *Ciaccio* bleiben Glycerinester und Cholesterinester ungefärbt, Phosphatide dagegen werden gefärbt¹⁾.

Da wir uns mit dem W. F. im folgenden noch beschäftigen müssen, möchte ich mit einigen Worten auf die gebräuchlichsten nach diesem Prinzip verlaufenden Färbungen eingehen: Die *Weigertsche* Originalmethode und die Modifikationen derselben nach *Kultschitzky*, *Benda*, *Spielmeyer* und nach *Smith*. Alle diese Färbungen zeigen im wesentlichen einen gleichen Verlauf: 1. Beizung („Härtung“) des Lipoids mit einem Metallsalz, 2. Färbung mit gereifter alkoholischer Hämatoxylinlösung, 3. Differenzierung (s. Tab. 3).

Da sich die Färbungen ganzer Stücke schon wegen der dazu notwendigen langen Zeit (bei der *Weigertschen* Originalmethode mehrere Monate) zu systematischen Untersuchungen nicht eignen, habe ich diese Färbungen nur gelegentlich angewendet und mich vorwiegend mit den für Gefrierschnitte ausgearbeiteten Methoden beschäftigt. Von diesen steht die Färbung nach *Smith* der Originalmethode von *Weigert* am nächsten, da die gleiche Beize und die gleiche Differenzierungsflüssigkeit angewendet wird, wäh-

¹⁾ *Kawamura* gibt an, daß auch Cerebroside nach den W. F., nicht aber nach *Ciaccio* färbbar seien.

Tabelle 3. Die *Weigertsche* Markscheidenfärbung und deren Modifikationen.

Autor	Färbung ganzer Stücke und Celloidin-Einbettung		Färbung von Gefrierschnitten	
	<i>Weigert</i> , Originalmeth. Formol	<i>Kultschitzky</i> Formol	<i>Smith</i> Formol	<i>Spielmeyer</i> Formol
Fixation	Kaliumbichromat	Kaliumbichromat	Kaliumbichromat	Eisenalaun
Beizung	Celloidin	Celloidin	—	70 % Alkohol
Einbettung	Cuprum acetic.	—	—	—
2. Beizung	H ^x + Lith. carbon.	H + Essigsäure	H + Essigsäure	H + Aq. destill.
Färbung	Borax-Ferricyank.	Lith. carb.-Ferricyank.	Borax-Ferricyank.	Eisenalaun
Differenzierung				Borax-Ferricyank.

H^x = gereifte alkoholische Hämatoxylinlösung nach *Weigert*.

rend *Spilmeyer* und *Benda* abweichend von *Weigerts* Vorschriften Eisenalaun (schwefelsaures Eisenammoniumoxyd) zur Beizung verwenden.

Wenn wir jetzt zu unserem früheren Beispiel zurückkehren, so läßt sich folgendes sagen: Wird ein Lipoidtröpfchen des Gewebes durch die W.F. gefärbt (nämlich geschwärzt), dann ist natürlich daran zu denken, daß es *Lecithin* enthalten könnte, denn auch reines *Lecithin* wird durch diese Färbungen geschwärzt. Allerdings läßt sich diese Schlußfolgerung keineswegs mit Sicherheit ziehen, denn es könnten ja auch *andere* Substanzen durch die W. F. geschwärzt werden. Tatsächlich ist auch gerade dieser Punkt noch umstritten.

In erster Linie hat man nämlich daran gedacht, daß *Cholesterin* oder irgendeine Cholesterinverbindung die Grundlage der W.F. sein müsse, da gerade die *doppeltbrechenden* Lipoidtröpfchen in der Regel auch nach *Smith* [sowie nach *Ciaccio*¹⁾] darstellbar sind (*Dietrich*, *Kaiserling*). Nun verhalten sich aber reine Cholesterinester und Cholesterin gegen die W.F. vollständig negativ!

Fürs erste schien zwar die Meinung, daß doch Cholesteringemische die Grundlage der W.F. seien, bestätigt zu werden. *L. Smith* und *W. Mair* haben in ihrer „Untersuchung über die Prinzipien, welche *Weigerts* Markscheidenfärbung zugrunde liegen“, die Meinung vertreten, daß Fettsäure-Cholesteringemische, insbesondere Ölsäure-Cholesteringemische das Substrat der W.F. seien, und daß solche Gemische sich besonders gut nach der von *Smith* und *Mair* angegebenen Modifikation der *Weigertschen* Originalmethode [in der deutschen Fachliteratur unter der Bezeichnung „Lipoidfärbung nach *Smith-Dietrich*“ bekannt²⁾] färben lassen³⁾.

In gleichem Sinne äußerte sich *Kawamura*. *Escher* dagegen fand nach der gleichen Methode bei den „verschiedensten Mischungen von Fettsäuren und Cholesterin“ niemals eine der Färbung der Gewebslipide entsprechende Schwarz-

¹⁾ Auch diese Methode „stützt sich auf die Tatsache, daß das *Lecithin* und andere Lipide derselben Natur (Protagon) nach einer geeigneten Behandlung mit alkalischen Bichromaten unlöslich in den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln werden“ (*Ciaccio*). Anstatt mit Hämatoxylin, wie *Weigert*, färbt *Ciaccio* mit Sudan.

²⁾ Die von *Smith* und *Mair* veröffentlichten Vorschriften für diese Färbung lauten: Beizung in gesättigter Kaliumbichromatlösung, Färbung „at 37° in *Kultschitzkys acid haematoxylin* for a few hours (4—6) and then differentiate over night in *Weigerts* solution of potassium, ferricyanide and borax“. Schon *Smith* und *Mair* haben diese Färbung auch auf Lipide außerhalb des Zentralnervensystems angewendet und diese Autoren haben auch eingehend den Einfluß der Chromierungsdauer untersucht. Genau genommen sollte die Färbung also wohl nach *Smith* und *Mair* benannt werden. Der Kürze halber wird im folgenden die Bezeichnung *Smithsche* Färbung angewendet. *Dietrich* fand bei Anwendung der *Smithschen* Färbung eine 24—48stündige Chromierungsdauer am brauchbarsten und hat bei dieser Anordnung Lipide in sehr zahlreichen Organen „färben“ können.

³⁾ Diese, wie ich vorwegnehmen will (s. Tab. 4), irrige Vorstellung wurde von *Dietrich* in die deutsche Literatur übernommen. Trotz eines eigenen *negativen* Färbversuches mit reiner Ölsäure (über eine Untersuchung irgendwelcher aus reinen Substanzen bereiteter Cholesteringemische wird von *Dietrich* selbst *nichts* berichtet) meinte *Dietrich*, „daß die *Smithsche* Methode sich so ausgestalten läßt, daß sie mit großer Schärfe die Anwesenheit von Cholesteringemischen zu erkennen gestattet, selbst da, wo das bisher vorherrschende morphologische Kriterium der Doppelbrechung fehlt“.

färbung, sondern höchstens Färbung in der „Intensität eines relativ blassen Lila“. Da *Escher* eine solche Schwarzfärbung mit den W.F. nur beim Lecithin erhielt, glaubte er, daß die *Weigert*-positive Substanz mit Lecithin (Summe aller Substanzen, welche man heute Lecithin, Protagon usw. nennt) identisch sei.

Wegen dieser widersprechenden Angaben habe ich die Färbbarkeit verschiedener Fettsäuren und Fettsäure-Cholesteringemische nachgeprüft (s. Tab. 4).

Tabelle 4. (Nach eigenen Untersuchungen.)

Färbemethode nach:		<i>Spiel-</i> <i>meyer</i>	<i>Benda</i>	<i>Smith</i>	<i>Ciaccio</i> ¹⁾	<i>Weigert</i> Originalmethode
	Ölsäure	+	+	—	—	
	Palmitinsäure	±	±	—	—	
	Stearinsäure	—	—	—	—	
	Palmitins. + Stearins. + Cholesterin	±	±	—	—	
	Ölsäure + Cholesterin	+	+	—	±	+
	Lecithin Merck	+	+	+	+	+
	Cholesterin Merck	—	—	—	—	—
Gewebs- lipide	Markscheiden	+	+	+	+	+
	Nebennieren	+	+	+	+	—
	Atherosklerotische Arterien	+	+	+	+	—
	Nieren	—	—	+	+	—

Es zeigt sich, daß zwar mit den Färbungen nach *Spielmeyer*, *Benda* und andeutungsweise auch nach *Ciaccio* Fettsäure-Cholesteringemische positive Resultate ergeben, daß aber gerade die umstrittene Färbung nach *Smith* diese Gemische nicht darstellt.

Filterstreifen, welche mit Ölsäure-Cholesterin getränkt sind, nehmen bei der Färbung nach *Smith*, besonders wenn eine längere Chromierung vorausgegangen ist²⁾, einen blaßgrauen Farbton an. Ja sogar leeres, fettfreies Filtrierpapier³⁾ zeigt die gleiche Erscheinung, wenn das Filtrierpapier nach erfolgter Chromierung nicht sehr gründlich gewässert worden ist. Vielleicht haben *Smith* und *Kawamura* diese blaßgraue Färbung als positives Färbeergebnis gebucht, weil sie keine Kontrollen mit leeren fettfreien Papierstreifen anstellten. Dann wäre der Widerspruch gegenüber *Eschers* Ergebnissen, die durch meine Untersuchungen durchaus bestätigt werden, erklärt⁴⁾.

Wenn man einen Filterstreifen zur Hälfte mit Ölsäure-Cholesterin trinkt, zur anderen Hälfte leer läßt, so erscheint nach beendeter Färbung die mit Ölsäure-Cholesterin getränkte Hälfte andeutungsweise dunkler als die leere Hälfte. Dieser

¹⁾ *Kawamura* gibt bei Ölsäure, abweichend von meinem Befunde, positive, dagegen bei Ölsäure-Cholesteringemischen negative Färbung nach *Ciaccio* an.

²⁾ Ich machte Versuche mit bis 3wöchiger Vorchromierung.

³⁾ Das Filtrierpapier, welches von der Fabrik (Schleicher und Schüll) fettfrei geliefert wird, wurde zur Vorsicht mehrere Tage mit Äther und Alkohol vorbehandelt.

⁴⁾ Auf andere technische Einzelheiten, welche den widersprechenden Färbergebnissen zugrundeliegen könnten, will ich nicht näher eingehen, verweise nur darauf, daß beispielsweise *Kawamura* manche Lipide (welche?) vor der Färbung „über der Flamme (!) knetete“.

Unterschied wird während der anschließenden Differenzierung aber nicht etwa deutlicher, sondern er schwindet immer mehr. Ich glaube, daß dieses Verhalten im Vergleich zur Färbbarkeit der Gewebslipide als *negatives* Färbeergebnis¹⁾ verzeichnet werden muß, da ja die Gewebslipide durch die *Smithsche* Färbung *intensiv blauschwarz* dargestellt werden und diese Färbung auch nach 12 und mehrstündiger Differenzierung beibehalten.

Es ergibt sich also (vgl. Tab. 4) folgendes: Wenn ein Lipoidtröpfchen im Gewebe nach *Spielmeyer*, *Benda* oder nach der *Weigertschen* Originalmethode färbbar ist, dann kann darin sowohl ein Gehalt an Fettsäuren (besonderes Ölsäure) als auch ein Gehalt an Lecithin vermutet werden. Dagegen entbehrt (wie ich *Escher* beistimmen muß) die gegenwärtig so weit verbreitete Annahme, daß die durch die *Smithsche* Färbung in den Gewebslipiden zu erzielende Blauschwarzfärbung auf Cholesterin-Fettsäuregemische zurückzuführen sei, jeder tatsächlichen Unterlage.

Es ist allgemein anerkannt (*Kawamura*, *Escher*), daß reine Cholesterinester, reines Cholesterin und ebenso die Glycerinester nach der Methode von *Smith* *nicht* dargestellt werden. Von den Lipiden, deren Färbbarkeit in chemisch reiner Form bisher überhaupt untersucht ist, zeigen *nur die Phosphatide* (nach *Kawamura* auch die Cerebroside) bei der *Smithschen* Färbung Eigenschaften, welche mit der Färbbarkeit der Gewebslipide vergleichbar sind²⁾. Unter diesen Stoffen ist der bekannteste und am häufigsten geprüfte das Lecithin. Dieses ergibt bei der *Smithschen* Färbung (wie auch *Escher* berichtet hat) eine gleich intensive Blauschwarzfärbung wie die Gewebslipide; diese Färbung widersteht 12stündiger Differenzierung und ist sogar nach 24stündiger Differenzierung noch deutlich. Lecithin färbt sich ebenso wie die Markscheiden und ein großer Teil der *Smith-positiven*

¹⁾ *Escher* hat angegeben, daß die Fettsäuren deshalb nach *Smith-Dietrich* nicht färbbar seien, weil sie in *essigsäurem* Hämatoxylin gelöst werden würden. Ich prüfte die Färbbarkeit von Ölsäure-Cholesteringemischen bei Verwendung von Hämatoxylinlösungen mit verschieden abgestuftem (0%, 0,01%, 0,1%, 1% und 2%) Essigsäuregehalt und kombinierte diese Farblösungen mit verschiedener Vorbehandlung und mit verschiedenen Differenzierungsmethoden (vgl. Tab. 3). Dabei ergab sich, daß es für den Ausfall der Färbung von Ölsäure-Cholesterin ganz gleichgültig ist, ob das Hämatoxylin viel, wenig oder gar keine Essigsäure enthält, sondern daß die Färbbarkeit nur von der Vorbehandlung abhängt. Beizung mit Eisenaun ergibt stets positive (blauschwarze Färbung!), Beizung mit Kaliumbichromat dagegen negative Resultate.

²⁾ Die morphologisch-färberischen Eigenschaften der Seifen, welche von *Kawamura*, *Fischler* und andern ausführlich geschildert worden sind, haben an Interesse verloren, seit *Jarisch* nachgewiesen hat, daß in den Tierkörper eingeführte Seifen infolge der physiologischen Bedingungen sofort hydrolysiert werden müssen, daß es folglich „im Blut und in den Geweben praktisch keine Seifen geben kann“. Aus diesem Grunde gehe ich auf die Farbreaktionen der Seifen (bei welchen ich zum Teil andere Ergebnisse als *Kawamura* fand) nicht näher ein.

Lipide auch nach *Spielmeyer*, *Benda*, *Ciaccio* und nach der *Weigert*-schen Originalmethode.

Aber dürfen wir uns mit dieser Feststellung begnügen? Beweist die Färbbarkeit eines Lipoidtröpfchens nach *Smith* und nach den andern Markscheidenmethoden die Anwesenheit von Phosphatiden, insbesondere von Lecithin oder von Cerebrosiden in diesem Tröpfchen?

Die Verhältnisse in den Geweben sind doch viel kompliziertere als unsere bei der Prüfung reiner Substanzen vorliegenden Untersuchungsbedingungen. Innerhalb der Zellen können ja mannigfache andere, neben den Lipiden vorhandene Substanzen den Ablauf der Farbreaktionen beeinflussen! Es könnten folglich die Lipide in den Geweben eine andere Färbbarkeit zeigen als in reinem Zustande. Es schien mir daher notwendig, die mit der Untersuchung reiner Substanzen gewonnenen Ergebnisse auch von einer anderen Seite her nachzuprüfen. Vor dem Bericht über diese Untersuchungen möchte ich mir kein Urteil über den Wert der verschiedenen Färbemethoden erlauben.

Wie schon erwähnt, kommen Lipide in chemisch reinem Zustande im Organismus kaum vor, sondern es handelt sich stets um die Beurteilung von Lipoidgemischen. Darauf hat schon *Aschoff* hingewiesen. *Aschoff* meint allerdings, es müsse „ein künftiger Forscher sich der mühevollen Arbeit unterziehen, alle in Betracht kommenden Körper, sobald sie erst rein dargestellt sind, in verschiedenen Emulsionen und in verschiedenster Mischung bei verschiedensten Temperaturen zu untersuchen“.

Aber eine kurze Überlegung ergibt, daß das ein von vornherein ganz aussichtsloses Beginnen wäre. Es gibt so viele verschiedene Lipide, und jedes dieser Einzellipide kann in verschieden großen Mengen vorhanden sein, daß die Zahl der sich ergebenden Kombinationen eine ganz ungeheure ist; es wäre auch bei der Herstellung von Tausenden von Gemischen nicht zu erwarten, daß man zufällig quantitativ und qualitativ den natürlich vorkommenden Gemischen entsprechende Gemenge erhalten könnte¹⁾.

Ich habe daher nicht die möglichst rein isolierten Einzellipide, wie *Aschoff*, *Kawamura* und *Escher*, sondern im Gegenteil die natürlichen Lipoidgemische, welche in den Geweben vorliegen, zur Grundlage aller weiteren Untersuchungen gemacht. Es schien mir aussichtsreicher, zu versuchen, von den fertigen natürlichen Gemischen durch stufenweisen Abbau zu einfacheren Verbindungen zu gelangen, als

¹⁾ *Kawamura* hat 6 verschiedene Lipoidmischungen (eine im Vergleich der möglichen Kombinationen verschwindend kleine Zahl!) untersucht, ohne die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten dieser Mischungen anzugeben.

umgekehrt den Versuch zu machen, mit den isolierten Einzellipoiden ein den natürlichen Lipoidverbindungen ähnliches künstliches Gemenge zusammenzusetzen.

Sehr erleichtert wird dieses Beginnen dadurch, daß wir chemisch gegenwärtig viel besser über die Zusammensetzung der Lipoiden unterrichtet sind als etwa zu der Zeit, in welcher die doppeltbrechenden Lipoiden zum erstenmal die Aufmerksamkeit der Histologen auf sich lenkten. Es ist geglückt, durch fraktionierte Extraktion der getrockneten Organe die verschiedenen Lipoidgruppen voneinander zu trennen. Wenn man beispielsweise mit Aceton zu extrahieren beginnt, nach erschöpfender Acetonextraktion eine Ätherextraktion und an diese eine Alkoholextraktion anschließt, so erhält man im Acetonextrakt alle Glycerinester, Cholesterinester (außerdem Fettsäuren und Cholesterin) sowie die acet unlöslichen Phosphatide¹⁾, im Ätherextrakt die ungesättigten Phosphatide (z. B. das Lecithin) und im Alkoholextrakt die gesättigten Phosphatide und die Cerebroside.

Bezüglich der eingehenderen Beschreibung dieses Extraktionsverfahrens und der durch chemische Analysen belegten Begründung verweise ich auf die Mitteilungen von *S. Fraenkel*, *Beumer*, *Erlandsen*, *Thudichum*. Besonders bestimmt drückt sich *Fraenkel* aus: „Man erhält durch dieses Verfahren (nämlich durch die fraktionierte Extraktion) eine glatte Trennung der Hauptgruppen.“

Durch eine solche Extraktion erfolgt aber nur eine ganz grobe Trennung der verschiedenen Lipoidgruppen, und zur weiteren Reinigung und Darstellung der einzelnen Lipoiden ist eine weitere Aufarbeitung der einzelnen Extrakte notwendig. Es ist, wie ich glaube, kein Nachteil, sondern eher ein Vorteil, daß man bei einem solchen Verfahren vorerst noch nicht zu ganz reinen Produkten gelangt, denn die Beimischungen, welche den nur in groben Umrissen getrennten Lipoidgruppen anhaften, sind ja die natürlich vorkommenden, welche auch im Gewebe mit diesen Lipoidgruppen vereinigt waren. Wenn man erst einmal über die Eigenschaften der Hauptgruppen unterrichtet ist, kann man später noch immer durch weitere Spaltung und Reinigung der Extrakte allmählich zu immer einfacheren Verbindungen und schließlich zu den reinen Lipoiden gelangen (s. S. 589). Ich bin daher auch bei der Untersuchung mit histologischen Methoden diesem durch die eingehenden chemischen Untersuchungen der letzten Jahre erschlossenen Weg gefolgt. Ich versuchte durch eine schrittweise Lipoidextraktion in Verbindung mit histologischen und chemischen Untersuchungen einen Überblick über die Leistungsfähigkeit morphologischer Lipoiduntersuchungen zu gewinnen.

Als erstes Objekt für diese Untersuchungen wählte ich die Nebennieren. Es ist durch eingehende chemische Untersuchungen (an Säuger-

¹⁾ Siehe Anmerkung ¹⁾ S. 588 und Anmerkung ²⁾ S. 590.

nebennieren) festgestellt worden, daß die Nebennieren neben Glycerin- und Cholesterinestern auch reichlich Lecithin, ferner Cephalin, Sphingomyelin, Cerebroside sowie acetonlösliche Phosphatide enthalten (*Alexander, Nerking, Wagner, Rosenheim und Tebb, Beumer*). Ich selbst fand auch in menschlichen Nebennieren bei chemischen Untersuchungen einen hohen Gehalt an lipoidem Phosphor¹⁾.

Es scheint daher gerade bei der Nebenniere besonders aussichtsreich, die wichtigsten Lipoidgruppen, besonders auch die Phosphatide morphologisch zur Darstellung zu bringen.

Gang der Untersuchung.

Lebenswarm entnommene lipoidreiche Nebennieren werden in Scheiben zerschnitten und mehrere Stunden bei Zimmertemperatur in 10proz. Formol fixiert²⁾. Von diesem Material werden einige Hundert ungefähr je 5–10 mm dicke Gefrierschnitte³⁾ angefertigt. Einige dieser Gefrierschnitte werden in der üblichen Weise mikroskopisch untersucht (Doppelbrechung, Sudan, Smith usw.), die übrigen werden mit 100 ccm Aceton übergossen. Im Verlaufe der nächsten 3 Stunden schüttelt man die in der Brutkammer bei 40° belassenen⁴⁾ Gefrierschnitte mehrmals in Aceton auf. Dann wird die lipoidgetränkte Acetonlösung abfiltriert und der Filterrückstand mit den im Glas kleben gebliebenen Gefrierschnitten vereinigt. In gleicher Weise werden die Gefrierschnitte noch 3 mal mit frischem Aceton extrahiert. Nach beendeter Acetonextraktion werden wieder Proben aus den

¹⁾ Darüber wird an anderer Stelle berichtet werden.

²⁾ Ich bin mir wohl bewußt, daß die Einwirkung des Formols auf die Gewebe nicht gleichgültig ist und die Ergebnisse der Extraktion im Vergleich zu „unfixiertem“ Material ändert. Da aber fast sämtliche histologischen Lipoidstudien an fixiertem, und zwar meist an in Formol fixiertem Material gemacht worden sind, und da ferner die Herstellung einer großen Anzahl sehr dünner Gefrierschnitte nur an fixiertem Material gelingt, mußte ich für diesen Abschnitt meiner Lipoiduntersuchungen, welcher die Herstellung vieler dünner Gefrierschnitte erfordert, fixiertes Material verwenden. Um den Fixationsfehler möglichst zu verringern, habe ich möglichst kurz in der Kälte fixiert und die Schnitte dann sofort in Wasser ausgewaschen. Bei dieser Untersuchung habe ich die Möglichkeit einer Beeinflussung der Extraktionsergebnisse durch die vorhergegangene Fixation nie aus dem Auge gelassen und *stets parallellaufende ergänzende Untersuchungen an unfixiertem Material angefügt* (s. S. 584, 586–587). Übrigens kann auch der gewöhnliche chemische Untersuchungsgang nicht eine Fixation des Materials vermeiden, wenn man unter Fixation eine künstlich bewirkte Koagulation des Gewebs-eiweißes versteht. Unter der Einwirkung des Acetons und mehr noch unter der Einwirkung siedenden absoluten Alkohols kommt es stets zu einer „Fixation“ im histologischen Sinne.

³⁾ Bei einiger Übung ist es leicht, so dünne Schnitte in so großer Zahl herzustellen, da in Formol fixierte Nebennieren am Gefriermikrotom besonders leicht schneidbar sind und da es ja nicht schadet, wenn manche Schnitte zerrissen sind; dagegen müssen alle etwas dickeren Schnitte herausgesucht und von der weiteren Untersuchung ausgeschaltet werden, da dicke Schnitte ja nur unvollkommen extrahiert würden.

⁴⁾ Weil die Lipide durch warmes Aceton schneller extrahiert werden als durch kaltes (*S. Fraenkel*).

Gefrierschnitten entnommen und histologisch (Doppelbrechung, Sudan, Smith, Spielmeyer) untersucht. Das zur Extraktion verwendete Aceton wird gesammelt und im Wasserbad auf ein geringes Volumen eingeeengt. Mit dem so erhaltenen konzentrierten Acetonextrakt werden einige Filtrierpapierstreifen getränkt und auch diese nach Eintrocknen des Extraktes mit histologischen Färbemethoden untersucht¹⁾.

Die in Aceton löslichen Lipide (s. Tab. 5) müssen nach der Acetonextraktion aus den Gefrierschnitten verschwunden und in den Extrakt übergegangen sein. In den Gefrierschnitten können daher dann nur die durch acetonunlösliche Lipide (z. B. durch Lecithin) bedingten Färbungen noch positiv bleiben, dagegen müssen alle jene Färbungen, welche durch acetonlösliche Lipide allein bedingt sind, in den Gefrierschnitten dann negativ ausfallen, dafür aber in den mit Acetonextrakt getränkten Filterstreifen zum Vorschein kommen.

Der gleiche Vorgang wiederholt sich nach der Ätherextraktion und nach der mit siedendem Alkohol am Rückflußkühler vorgenommenen Extraktion²⁾. Jedesmal werden Proben der Gefrierschnitte und mit dem betreffenden Extrakt getränkte Filterstreifen mit den histologischen Färbemethoden untersucht.

Eine Übersicht über den Ablauf dieser stufenweisen Lipoidextraktion gibt Tab. 5.

Tabelle 5. *Fraktionierte Lipoidextraktion aus Gefrierschnitten (schematisch).*

	Im Gewebe bleiben zurück	In den Extrakt sind übergegangen
Nach der Acetonextraktion	ungesättigte und gesättigte Phosphatide, Cerebroside	Glycerinester, Cholesterinester, acetonlösl. Phosphatide, Lipoidabbauprodukte (Fettsäuren, Cholesterin)
Nach der Ätherextraktion	gesättigte Phosphatide, Cerebroside	ungesättigte Phosphatide (Lecithin)
Nach der Alkoholextraktion	—	gesättigte Phosphatide, Cerebroside

Dadurch, daß wir die gleichen Substanzen vor und nach jeder Extraktion zuerst in den Gefrierschnitten, dann aber im Extrakt färberisch prüfen, kann uns nichts entgehen. Ergänzt wird diese Prüfung noch durch die chemische Untersuchung der Lipoidextrakte, welche wegen der geringen Mengen allerdings auf den qualitativen Nachweis von Phosphor und Cholesterin beschränkt bleiben muß.

Bei dieser Untersuchung ergibt sich überraschenderweise, daß aus der Nebenniere *sämtliche im Gewebsverbande färberisch überhaupt nachweisbaren Lipide schon nach der Acetonextraktion verschwunden* sind. Die gleichen färberischen Eigenschaften, welche vor der Extraktion den

¹⁾ Dazu genügt eine äußerst geringe Extraktmenge! Mit einem Tropfen kann man mehr als 10 je 2—3 mm breite Filterstreifen beschicken.

²⁾ Diese verlaufen analog der als Beispiel ausführlicher beschriebenen Acetonextraktion.

Gefrierschnitten anhafteten, sind nunmehr alle an den mit Acetonextrakt getränkten Filterstreifen nachweisbar (s. Tab. 6).

Obwohl die Schnitte schon nach der Acetonextraktion bei der mikroskopischen Untersuchung anscheinend völlig lipoidfrei gefunden werden, enthalten sie doch noch reichlich¹⁾ acetonunlösliche, aber in Äther und in Alkohol lösliche Lipide, wie die nachfolgenden Extraktionen mit Äther und Alkohol ergeben. *Alle diese erst durch die Äther- und Alkoholextraktion zum Vorschein gebrachten Lipide sind also morphologisch nicht darstellbar.* Es ist bemerkenswert, daß der Ätherextrakt bei der Prüfung mit Filterstreifen entsprechend seinem Lecithin-gehalte (s. Tab. 5) auch positive histologische Färbungen (wie reines Lecithin!) gibt, obwohl doch die Gefrierschnitte vor der Ätherextraktion (nach der Acetonextraktion) diese Färbungen nicht gezeigt haben. Wir sehen also, daß die Färbbarkeit der Lipide im Gewebe und im freien Zustande eine ganz *verschiedene* sein kann.

Es sind also alle lipoiden Substanzen, welche in Nebennieren morphologisch nachweisbar sind, primär²⁾, in Aceton löslich. Die in Aceton unlöslichen Lipide [Lecithin³⁾, Cerebroside u. a.] sind, wenn man von den Spuren absieht, welche als „Verunreinigungen“ dem primären Acetonextrakt beigemischt sein können, der mikroskopischen Betrachtung nicht zugänglich.

Bei näherer Untersuchung zeigte es sich, daß gar keine so lange gründliche Acetonextraktion notwendig ist, um alle morphologisch darstellbaren Lipide aus Nebennierenschnitten zu entfernen. Dünne

¹⁾ Die Menge der acetonunlöslichen Lipide kann die Menge der acetonlöslichen Lipide sogar übertreffen. (Eigene quantitative Untersuchungen an frischen getrockneten Nebennieren.)

²⁾ Darunter befinden sich, wie wir durch chemische Untersuchungen wissen, stets auch Lipide, welche nach ihrer Abtrennung aus dem im Aceton enthaltenem Lipidgemenge in reinem Zustande nicht mehr in Aceton löslich sind. Der durch die Beimengung (sekundär) in Aceton unlöslicher Lipide entstehende Fehler (vgl. hierzu die schematische Übersicht in Tab. 5!) dürfte nicht beträchtlich sein. Bestimmte Angaben hierüber macht *S. Fraenkel*: Bei der Extraktion des Gehirnes gehen „sehr wenig acetonunlösliche Phosphatide“ (z. B. Lecithin) in den Acetonextrakt hinein.

³⁾ Durch Cadmiumchlorid wird Lecithin aus Lösungen ausgefällt; der so entstehende Niederschlag färbt sich nach *Smith* tiefschwarz. Ich versuchte in gleicher Weise, wie das in der Eprovette gelingt, das Lecithin auch im Gewebe durch heiße alkoholische Cadmiumchloridlösung zu fällen in der Erwartung, daß auch im Gewebe eine (unlösliche!) Cadmium-Lecithinverbindung entstehen und in situ nach *Smith* färbbar sein würde. Das gelingt aber weder an fixierten noch an unfixierten Schnitten. Nach Einwirkung heißer Cadmiumchloridlösung ist in den Schnitten ebenso wie nach einer Acetonextraktion mit keiner Färbemethode mehr auch nur die geringste Spur von Lipoiden nachzuweisen. Dieses Verhalten bestätigt die bei der Acetonextraktion gewonnene Erfahrung, daß das *Lecithin* in der Nebenniere *morphologisch nicht darstellbar* ist.

Gefrierschnitte geben schon nach 2—3 Min. langer Einwirkung von Aceton keine einzige Lipoidfärbung mehr. *Unfixierte Gefrierschnitte der Nebennieren verhalten sich ebenso wie die Formolgefrierschnitte.*

Ebenso schnell wie durch Aceton können alle färbbaren Lipide auch durch Äther, Xylol, Chloroform¹⁾ und durch heißen Alkohol in wenigen Minuten extrahiert werden. Nur kalter oder wasserhaltiger Alkohol wirkt (wohl wegen der schlechten Löslichkeit der Cholesterinester in Alkohol) bedeutend langsamer.

Wie schon *Kawamura* berichtet hat, werden durch kalten Alkohol die nach *Smith* (und nach *Spielmeyer*) färbbaren Lipide schneller extrahiert als die doppeltbrechenden *Smith*-negativen Substanzen (welche letztere wohl stets Cholesterinester enthalten!).

Kawamura glaubte, daß dieses Verhalten seine Ansicht stütze, daß die *Smith*-positiven Lipide Hüllen um die *Smith*-negativen Substanzen bilden. Wenn man auch gelegentlich eine stärkere Färbbarkeit der Ränder mancher Lipoidtröpfchen bei der *Smith*-schen Färbung beobachten kann, so sind die mikroskopischen Bilder doch keineswegs eindeutig und können kaum als vollgültiger Beweis für *Kawamuras* Auffassung gelten. Aus der leichteren oder schwereren Löslichkeit der einzelnen Lipoidfraktionen aber auf ihre örtliche Anordnung im Gewebe zu schließen, ist vielleicht doch etwas gewagt.

In gleicher Weise wie die *Nebennierenlipide* verhalten sich die Lipide in *atherosklerotischen Arterien*²⁾ (s. Tab. 6). Eine andere Löslichkeit und Färbbarkeit zeigen dagegen die Lipide in pathologisch verfetteten *Nieren*³⁾.

Vor der Extraktion findet man (vorwiegend in den Epithelien der Tubuli contorti) doppeltbrechende Lipoidtröpfchen, die mit Sudan, nach *Ciaccio* und nach *Smith* färbbar sind. Nach der Acetonextraktion sind Doppelbrechung, Sudanfärbung und Färbung nach *Ciaccio* negativ, dagegen bleibt die Färbung nach *Smith* positiv, ja sie tritt nach der Acetonextraktion eher noch deutlicher hervor und verschwindet auch nicht nach der Äther- und Alkoholextraktion. Da ich vermutete, daß vielleicht eine zu wenig gründliche Extraktion die Ursache sei, habe ich wenige, ausgesucht dünne Gefrierschnitte dieses Materials *tagelang* mit großen Mengen kochenden Acetons, mit Äther und mit siedendem Alkohol am Rückflußkühler extrahiert. Das Ergebnis war das gleiche, die Färbung nach *Smith*

¹⁾ Vor der Einwirkung dieser Extraktionsmittel werden die (fixierten oder unfixierten) Gefrierschnitte an Objektträger angetrocknet. Vom Standpunkte des Histologen erscheint dieses Vorgehen vielleicht etwas barbarisch, da die Gewebe beim Austrocknen beträchtlich schrumpfen; es ist aber notwendig, da diese 3 Extraktionsmittel nicht mit Wasser mischbar sind. Die Entscheidung, ob noch färbbare Lipide vorhanden sind oder nicht, bereitet auch an geschrumpften Schnitten keine Schwierigkeit, wenn die Schnitte nur gut ausgebreitet sind.

²⁾ Ich untersuchte Aorten und basale Hirnarterien.

³⁾ Die färberischen Eigenschaften der in den Nierenepithelien bei verschiedenen Krankheiten anzutreffenden Lipide zeigen mannigfaltige Verschiedenheiten. Ich beschränke mich hier auf die Anführung eines Beispiels von Lipoidose der Nieren (ohne Amyloidose) bei chronisch indurierender Lungenspitzen tuberkulose (57jähriger Mann, im Harn bis 25⁰/₀₀ Eiweiß, Leukocyten, granulierten Zylinder, nie Erythrocyten; Ödeme, afebriler Verlauf).

Tabelle 6. *Über kombinierte histologische und chemische Lipiduntersuchungen.*

		Gefrierschnitte						Lipidextrakte																
		Nach der Acetonextraktion		Nach der Ätherextraktion		Nach der Alkohol- extraktion		Acetonextrakt		Ätherextrakt		Alkoholextrakt												
Vor Beginn der Extraktion	Doppelbrechung	Ciaccio	Benda	Spilmeyer	Smith	Sudan	Doppelbrechung	Ciaccio	Benda	Spilmeyer	Smith	Sudan	Cholesterin	Phosphor	Benda	Spilmeyer	Smith	Sudan	Cholesterin	Phosphor	Benda	Spilmeyer	Smith	Sudan
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neben- nieren	in Formol fixiert unfixiert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Athero- sklerotische Arterien	in Formol fixiert unfixiert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gehirn	in Formol fixiert in Aceton fixiert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipoid- nieren	in Formol fixiert unfixiert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾ und ²⁾ Die Alkoholextrakte von in Formol fixiertem Gehirn und von atherosklerotischen Arterien zeigen *positive* Farbreaktionen und enthalten stets noch in Spuren Cholesterin, während die Alkoholextrakte von *unfixiertem* Gehirn und von Nebennieren *kein* Cholesterin enthalten und *nicht* färbbar sind. Dieses gegensätzliche Verhalten dürfte darauf zurückzuführen sein, daß in Formol fixiertes Gehirn (vgl. Anmerkung ¹⁾, S. 587) und Arterien durch Aceton und Äther nur unvollständig extrahiert werden.

blieb sowohl an den Lipoiden als auch an den Erythrocyten¹⁾ ebenso kräftig wie vor der Extraktion. An unfixierten Gefrierschnitten dagegen war bei der gleichen Behandlung eine deutliche Abnahme, aber kein völliger Schwund der nach *Smith* färbbaren Substanz festzustellen.

Auch mit Zenkerscher Lösung fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material zeigte eine unveränderte Färbbarkeit bei der *Smithschen* Färbung.

In mit Formol fixierten Gefrierschnitten des *Gehirns* sind die Markscheiden auch nach gründlicher Extraktion mit warmem Aceton noch deutlich durch die Sudanfärbung, ferner nach *Ciaccio* und nach *Smith* darstellbar, während die Färbungen nach *Spielmeyer* und *Benda* negativ geworden sind. Die *Smithsche* Färbung ergibt an den Gefrierschnitten nach der Acetonextraktion sogar viel bessere, klarere Bilder²⁾ als vorher, und selbst nach der Ätherextraktion sind die Markscheiden in diesen Gefrierschnitten noch mit Sudan und auch nach *Smith* färbbar geblieben; erst nach der Alkoholextraktion ist die Färbbarkeit der Markscheiden bis auf geringe Spuren verloren gegangen.

Das Verschwinden mancher Färbungsreaktionen (*Spielmeyer* und *Benda*) bei Erhaltenbleiben der *Smithschen* Färbung und der Sudanfärbung nach der Aceton- und nach der Ätherextraktion formolfixierter Gehirnschnitte kann nicht auf die Extraktion irgendeines bestimmten Lipoids zurückgeführt werden, denn, wie wir gesehen haben (Tab. 4), haben die von *Spielmeyer* und *Benda* angegebenen Färbungen einen *weiteren* Wirkungsbereich als die *Smithsche* Färbung: Alle nach *Smith* färbbaren Lipide, deren Reaktion in reinem Zustande wir kennen, z. B. das Lecithin, sind auch nach *Spielmeyer* und nach *Benda* färbbar, nicht aber umgekehrt. Dieses nur an formolfixiertem Material zu beobachtende Verhalten muß also *andere* Ursachen haben.

Wir konnten schon bei der Untersuchung lipidhaltiger Nieren einen ungleichmäßigen Ausfall der verschiedenen Färbungen an fixiertem und an unfixiertem Material feststellen. Die gleiche Beobachtung können wir nun auch bei der Untersuchung des Gehirnes machen. Diese Erscheinung dürfte dadurch bedingt sein, daß manche Lipide an die durch das Fixationsmittel gefällten Eiweißkörper des Zellprotoplasmas gebunden sind³⁾, und daß in solcher Art gebundene Lipide

¹⁾ Diese enthalten bekanntlich Lecithin (*Feigl*, *Bang* und *Forssmann*), also ein *Smith-positives* Lipoid.

²⁾ Ich glaube diese, Methode zur Darstellung der Markscheiden in Gefrierschnitten besonders empfehlen zu sollen, da die Schnitte durch die Acetonbehandlung viel fester werden und auch bei der nachfolgenden Chromierung nicht brüchig werden, wie sonst. Man verfährt in folgender Weise: Fixation in Formol, Herstellung von Gefrierschnitten; diese werden 24 Stunden bei Zimmertemperatur oder 4 Stunden bei 37° unter öfterem Umschütteln in Aceton belassen. Dann erst wird die Färbung nach *Smith* vorgenommen (2 Tage Bichromat, 4 Stunden *Kultschitzkys* essigsäures Hämatoxylin, 12 Stunden *Weigerts* Boraxferricyankalium, Einschließen in Canadabalsam).

³⁾ Über den feineren morphologischen Aufbau dieser Eiweiß-Lipoidverbindungen im Zellprotoplasma sind wir durch die Untersuchungen von *E. Albrecht* unterrichtet.

sowohl der Extraktion länger widerstehen als auch nicht mehr allen Färbemethoden (z. B. nicht den Färbungen nach *Spielemeyer* und nach *Benda*) zugänglich sind.

Für die Richtigkeit dieses Erklärungsversuches sprechen auch folgende Beobachtungen:

1. Es läßt sich durch Wägung der Lipoidextrakte zahlenmäßig feststellen, daß aus dem mit Formol fixierten Materiale durch Aceton und durch Äther *weniger* Lipide extrahiert werden als aus frischem Material¹⁾.

2. Wenn frisches Gehirn ohne Formolfixation unmittelbar in Aceton gebracht und von diesem Material²⁾ nach kurzer Wässerung Gefrierschnitte gemacht werden, so zeigt es sich, daß die morphologisch darstellbaren Lipide aus diesen unter Umgehung der Formolfixation hergestellten Schnitten viel leichter und vollständiger extrahiert werden können³⁾. In diesem Falle sind nämlich die Markscheiden schon nach der Acetonextraktion nur mehr andeutungsweise, nach der Ätherextraktion überhaupt nicht mehr mit Sudan und nach *Smith* färbbar.

Es sind also *auch im Gehirn alle histologischen Lipoidfärbungen einschließlich aller Markscheidenfärbungen in erster Linie auf primär acetonlösliche Lipide* zurückzuführen. Daneben sind die acetonunlöslichen und erst in Äther löslichen Lipide (besonders das Lecithin) nur wenig an dem Zustandekommen der Markscheidenfärbung beteiligt, während die erst durch Alkohol extrahierbaren gesättigten Phosphatide und die Cerebroside im Gehirn überhaupt nicht färbbar sind (s. Tab. 5 und 6).

¹⁾ Brücke und Medulla oblongata werden möglichst genau in der sagittalen Mittellinie halbiert. Beide Hälften werden gewogen. Eine Hälfte wird sogleich unter Zusatz von Gips getrocknet und zu Pulver zerrieben, die andere Hälfte wird zuerst in feine Schnitte zerschnitten mit, 10% Formol übergossen, nach 24 Stunden mit kaltem Wasser ausgewaschen und erst dann mit Gips getrocknet und pulverisiert. Hierauf werden beide Hälften in Soxhletapparaten erschöpfend zuerst mit Aceton und dann mit Äther, schließlich am Rückflußkühler mit siedendem Alkohol extrahiert. Bei diesem Verfahren ergibt das in Formol fixierte Material (wenn man die Ausbeute der gleichen Menge des frischen Ausgangsmateriales zu 100% ansetzt) nur 84,5% Acetonextrakt, 44% Ätherextrakt, dagegen 333% Alkoholextrakt. Die Alkoholextraktion gleicht also bei fixiertem Material zum größten Teil die unvollständige Aceton- und Ätherextraktion aus. Der Alkoholextrakt enthält demnach in diesem Falle auch mit Sudan, nach *Spielemeyer* usw. färbare Lipide (vgl. Tab. 6), welche bei Verwendung unfixierten Ausgangsmateriales stets schon durch Aceton und Äther ausgezogen werden.

²⁾ Die Vorbehandlung mit Aceton ist notwendig, da es unmöglich ist, aus völlig unfixiertem Gehirn dünne Gefrierschnitte herzustellen.

³⁾ Nur die Färbbarkeit der Erythrocyten nach *Smith* bleibt auffallend lange nach der Aceton- und nach der Ätherextraktion erhalten.

Mit einigen Worten möchte ich noch auf die Untersuchung der einzelnen, durch die aufeinanderfolgenden Aceton-, Äther- und Alkohol-extraktionen getrennten Lipoidfraktionen eingehen. Durch die Extraktion von Gefrierschnitten erhält man nur sehr geringe Extraktmengen, selbst wenn man mehrere hundert Gefrierschnitte verarbeitet. Die Menge der in dieser Weise erhaltenen Extrakte war nur bei den lipoidreichen Nebennieren und beim Gehirn für eine weitere Untersuchung (Prüfung des Phosphorgehaltes und der histologischen Färbbarkeit der Extrakte) ausreichend.

Da bei der Verwendung von Gefrierschnitten, also von feuchtem Ausgangsmaterial auch anorganische Salze und vielleicht auch Eiweiß in den Acetonextrakt gelangen, habe ich zur Kontrolle stets auch Paralleluntersuchungen mit größeren Mengen unfixierten, getrockneten und pulverisierten Materiales durchgeführt. Diese letztere Methode wurde auch bei atheromatösen Arterien (bei welchen die Gefrierschnitte eine zu geringe Ausbeute an Lipoidextrakten ergeben) angewendet.

Es zeigte sich, daß die Acetonextrakte stets (auch bei der Verwendung getrockneten Ausgangsmaterials!) neben Cholesterin auch Phosphor enthielten. Die Prüfung der aus Gefrierschnitten und der aus trockenem Organpulver hergestellten Extrakte mit histologischen Färbemethoden hatte übereinstimmende Ergebnisse. Bezüglich der Färbungsreaktionen des Äther- und des Alkoholextraktes und der Extraktion von Lipoiden aus morphologisch anscheinend lipoidfreiem Material verweise ich auf meine Ausführungen S. 583 und auf die Tab. 6.

Wie sich aus den im vorhergehenden mitgeteilten Befunden ergibt, kann die Frage: Welche Lipide können histologisch dargestellt werden? in der Regel auf ein engeres Gebiet beschränkt werden, da alle primär acetonunlöslichen Lipide einer histologischen Darstellung meist (z. B. in der Nebenniere) überhaupt unzugänglich sind. Unsere Fragestellung wird daher folgende sein: Welche *acetonlöslichen* Lipide werden durch die einzelnen Färbungen dargestellt?

Ich versuchte durch weitere Spaltung des Acetonextraktes von Nebennieren diese Frage wenigstens zum Teil zu lösen. Der Acetonextrakt besteht, wie wir durch chemische Untersuchungen wissen, hauptsächlich aus Glycerinestern, Cholesterinestern, freien Fettsäuren und freiem Cholesterin. Alle diese Substanzen sind aber nicht nach *Smith* färbbar (s. Tab. 4). Der Acetonextrakt ist aber sehr stark nach *Smith* färbbar!

Da der Acetonextrakt neben den erwähnten *Smith*-negativen Stoffen stets auch Phosphatide enthält¹⁾, so war daran zu denken,

¹⁾ Das Vorkommen acetonlöslicher Phosphatide ist seit den Untersuchungen von *S. Fraenkel* und dessen Mitarbeitern bekannt. Sie wurden bisher aus den

daß diese die Träger der im Acetonextrakt feststellbaren positiven *Smith'schen* Färbung sein könnten. Ich versuchte daher, die acetonlöslichen Phosphatide aus dem Acetonextrakt abzutrennen, um ihre histologischen Farbreaktionen zu prüfen.

Nach mehreren Versuchen, welche sich an den von *Fränkel* und *Elias* für die Isolierung der acetonlöslichen Phosphatide aus dem Gehirn beschriebenen Untersuchungsgang anschlossen, gelangte ich zu folgender Methode:

Menschliche Nebennieren werden lebenswarm entnommen, nach *Windaus* mit Gips getrocknet, pulverisiert und das trockene Organpulver mit Aceton im Soxhletapparat extrahiert. Nach Abdampfen des Acetons im Wasserbad wird das extrahierte Lipoid in wenig absolutem Alkohol gelöst und bei 60° mit alkoholischer 10proz. Cadmiumchloridlösung¹⁾ im Überschuß gefällt. Der Alkohol wird im Wasserbad abgedampft und der verbleibende Rückstand im Soxhletapparat mit Äther cholesterinfrei gewaschen. Wir erhalten auf diese Weise 2 getrennte Fraktionen des Acetonextraktes:

1. Die Ätherlösung; diese enthält alle Bestandteile des Acetonextraktes, welche auch in Äther löslich sind: alle Glycerinester, Cholesterinester sowie freies Cholesterin, freie Fettsäuren und in Spuren Phosphor²⁾. Filterstreifen, welche mit dieser Ätherlösung beschickt worden sind, zeigen positive Färbung mit Sudan (rot), ferner nach *Ciaccio* (gelbrot), *Spielmeyer* und *Benda* (tiefschwarz); dagegen fällt die *Smith'sche* Färbung fast völlig negativ aus (Graufärbung anstatt Schwarzfärbung).

2. Der cholesterinfrei gewaschene Rückstand; dieser ist von allen ätherlöslichen Lipiden gereinigt. Er wird durch destilliertes Wasser³⁾ auch von dem überschüssigen Cadmiumchlorid befreit. Die übrigbleibende feste braune Substanz wird getrocknet. Diese Substanz enthält Phosphor und zeigt ähnliche (aber nicht völlig gleiche!) Löslichkeit, wie die von *Fränkel* und *Elias* aus dem Acetonextrakt des Gehirns isolierte, weißgefärbte Cadmium-Phosphatidverbindung⁴⁾. Sie ist

Acetonextrakten des Gehirnes, Rückenmarkes, des Pankreas und aus Hühnereiern isoliert (*Elias, Pari, Dimitz, Bolaffio, Linnert*). Die chemische Untersuchung hat ergeben, daß diese acetonlöslichen Phosphatide sich durch mehrere Eigenschaften, besonders durch ihren hohen Stickstoffgehalt, von den Lecithinen unterscheiden. Acetonlösliche Phosphatide fanden auch *Beumer* in den Hammelnebennieren und *Erlandsen* im Rinderherzen. Ich habe in den Acetonextrakten aus getrockneten und pulverisierten menschlichen Nebennieren, atheromatösen Arterien und aus Gehirn stets ziemlich reichlich Phosphor nachweisen können. Nach den Erfahrungen von *S. Fränkel* war daran zu denken, daß ein Teil von diesem Phosphor anorganischer Natur sein könnte. Bei näherer Prüfung einiger Nebennierenextrakte fand sich diese Vermutung aber nicht bestätigt. Es ließ sich darin kein anorganischer Phosphor nachweisen. (Vgl. Anm. ³⁾, S. 589.)

¹⁾ Bekanntes Fällungsmittel für Phosphatide.

²⁾ Ich versuchte durch wiederholte Fällung mit Cadmiumchlorid diese Fraktion von Phosphor zu reinigen und gelangte auf diese Weise zu einer Lipoidlösung, in welcher kein Phosphor mehr nachweisbar war; auch diese Lösung war färbbar mit Sudan, nach *Ciaccio*, *Spielmeyer* und *Benda*, dagegen war nunmehr die *Smith'sche* Färbung völlig negativ.

³⁾ In dieser wässrigen Lösung ist kein Phosphor nachweisbar; der Acetonextrakt scheint demnach keinen anorganischen Phosphor zu enthalten.

⁴⁾ Diese ist nach Angabe der Autoren löslich in Chloroform, Xylol, siedendem Alkohol, „kaum“ löslich in Petroläther und „noch weniger“ in Äther.

löslich in Chloroform und in heißem Alkohol, schwer löslich in warmem Xylol und Benzol, unlöslich in Äther und in Aceton¹⁾. Eine weitere Reinigung und Analyse war wegen der geringen Menge nicht möglich²⁾. Für unsere Zwecke genügt es, zu wissen, daß diese phosphorhaltige, aus dem Acetonextrakte isolierte Substanz nach *Smith* blauschwarz gefärbt wird, und zwar *stärker* als der ursprüngliche Gesamtacetonextrakt. Diese Substanz ist auch nach *Spielmeyer* und *Benda* (schwarz), nach *Ciaccio* und mit Sudan (gelbbrot) färbbar.

Die gleiche Färbbarkeit zeigt das aus dem Gehirn ausziehbare acetonlösliche Phosphatid, das Leukopoliin, welches ich nach der Methode von *Fränkel* und *Elias* darstellte.

Es ergibt sich also, daß die *Smithsche* Färbung der Nebennieren-lipoide nicht auf dem Gehalt an Cholesterinestern, Glycerinestern, freien Fettsäuren, freiem Cholesterin oder deren natürlich vorkommenden Gemischen beruht, sondern auf ihrem Gehalt an einer phosphorhaltigen, primär acetonlöslichen, nach Fällung mit Cadmiumchlorid in Aceton und in Äther unlöslichen Substanz.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß der gleiche Stoff, welcher in der Nebenniere so eng mit den doppeltbrechenden Lipoiden verbunden ist, auch in anderen Organen mit den doppeltbrechenden Lipoiden zugleich auftritt und es bedingt, daß überall dort, wo doppeltbrechende Lipoiden vorkommen, meist auch die Färbungen nach *Smith* (und ebenso nach *Ciaccio*) positiv ausfallen (*Dietrich, Kaiserling* s. S. 573). Der Nachweis dieser Substanz in anderen Organen stößt aber wegen der sehr geringen Menge auf noch größere Schwierigkeiten als in den Nebennieren.

Wie die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, können wir uns durch die *mikroskopische* Betrachtung nur über *einen verhältnismäßig kleinen* Teil aller im Zellprotoplasma vorhandenen Lipoiden ein Urteil bilden, der Weg der chemischen Identifizierung färberisch dargestellter Gewebslipoiden ist lang und beschwerlich, und unsere Kenntnisse auf diesem Gebiete sind *sehr unvollkommen*.

Bevor ich die Ergebnisse meiner Beobachtungen zusammenfasse, möchte ich noch kurz auf die neueren und neuesten Arbeiten über die Morphologie der Lipoiden hinweisen, welche (ganz im Gegensatz zu meinen Erfahrungen!) eine sehr optimistische Auffassung über die Leistungsfähigkeit der mikroskopischen Untersuchung auf diesem Ge-

¹⁾ Nach der Fällung mit Cadmiumchlorid!

²⁾ Auf das sehr heikle und umstrittene Gebiet (Lit. hierüber bei *S. Fränkel*) der chemischen Individualität dieser primär acetonlöslichen Phosphatide kann ich nicht eingehen, da hierzu ein sehr viel größeres Material notwendig wäre, als mir zur Verfügung steht. Nur eingehende chemische Untersuchungen könnten uns darüber Aufschluß geben, ob hier ein acetonlösliches Phosphatid im Sinne *S. Fränkels* vorliegt, oder ob es sich um acetonunlösliche Phosphatide (etwa Lecithine) handelt, welche infolge enger Bindung an acetonlösliche Lipoiden (Fett, Cholesterin u. a.) in den primären Acetonextrakt hineingeraten sind.

biete zeigen. Alle diese Arbeiten stützen sich in erster Linie auf die Untersuchungen *Kawamuras*, und es scheint die Meinung weit verbreitet zu sein, daß aus den färberischen Eigenschaften rein dargestellter isolierter Lipide Schlüsse auf die Gewebslipide zulässig seien und umgekehrt. Daher kommt es, daß in histologischen Untersuchungen über Lecithin, Cephalin, Sphingomyelin, Cerebroside und über manche andere Lipide berichtet wird, welche nach meinen Erfahrungen im Gewebe mit keiner einzigen histologischen Methode sichtbar gemacht werden können. Dieser Optimismus tritt in zahlreichen Arbeiten bis in die allerletzte Zeit hervor (*v. Mikulicz-Radecki*, *Wail*, *Jaffé* und *Iwantscheff*, *Sorg* und *Jaffé*, *Petri* u. a.), ja *Dietrich* und *Kleeberg* meinen in ihrem zusammenfassenden Bericht über dieses Thema sogar, daß „das Ziel einer morphologischen Analyse nahezu erreicht“ sei.

Dagegen beschränkt sich *Arndt* auf eine Abgrenzung der „Lipide im engeren Sinne¹⁾“ und meint, daß sich eine „präzisere Aussage über den näheren chemischen Charakter der Lipide im engeren Sinne auf histochemischem Wege nicht erzielen läßt“.

Schlußsätze.

1. Die doppeltbrechenden Lipoidtröpfchen in den Geweben *enthalten* in der Regel Cholesterinester, sie *bestehen aber nicht ausschließlich* aus diesen. Die ältere, von *Kaiserling* eingeführte Bezeichnung *Lipoidosis* dürfte daher für die anisotrope Verfettung der einseitigen Bezeichnung Cholesterinesterverfettung vorzuziehen sein (vgl. hierzu im folgenden Punkt 10).

2. Cholesterin-Fettsäuregemische werden durch die *Weigertsche* Markscheidenfärbung und ebenso durch die meisten der *Weigertschen* Methode nachgebildeten „Markscheidenfärbungen“ gefärbt. Eine Ausnahme bildet die von *Smith* angegebene Modifikation. Nach der *Smithschen* Färbung werden weder Cholesterin-Fettsäure-Gemische, noch Cholesterinester geschwärzt. Dagegen gibt die *Smithsche* Färbung bei Phosphatiden positive Ergebnisse.

3. Chemisch rein dargestellte isolierte Lipide können zwar durch histologische Untersuchungsmethoden voneinander unterschieden werden (Tab. 2); dagegen können die an reinen Lipiden festgestellten färberischen Eigenschaften nicht immer ebenso auch an den im Gewebe gebundenen Lipiden sichtbar gemacht werden, da im Gewebe meist Lipoidgemische vorliegen, und da ferner die Färbbarkeit der Lipide im Gewebe auch von anderen, neben den Lipiden im Zellprotoplasma vorhandenen Substanzen beeinflusst werden kann.

4. Es kann demnach ein Lipid, welches in reinem Zustande eine bestimmte Färbbarkeit zeigt, im Gewebe eine andere oder überhaupt

¹⁾ Als solche gelten die Phosphatide und Cerebroside.

keine Färbbarkeit erkennen lassen. Man darf daher bei Lipoidfärbungen im Gewebe nicht schon aus dem Auftreten einer bestimmten Farbnuance allein auf ein bestimmtes Lipoid schließen, wenn dieses in reinem Zustande (also unter ganz anderen Untersuchungsbedingungen!) eine gleiche Farbnuance zeigt.

5. Der Versuch, nach *Kawamuras* Beispiel durch die Herstellung möglichst mannigfaltiger künstlicher Lipoidgemische ein brauchbares Vergleichsobjekt zu den Lipoidgemischen des Gewebes zu erhalten, ist aussichtslos, denn es ist wohl kaum möglich, künstlich den verwickelten, im Zellprotoplasma enthaltenen Lipoidgemischen und Lipoid-Eiweißgemischen vergleichbare Gemenge nachzubilden.

6. Dagegen gelingt es, einen gewissen Überblick über die Leistungsfähigkeit der morphologischen Lipoidanalyse zu bekommen, wenn man die mikroskopischen Untersuchungen mit einer planmäßigen stufenförmigen Lipoidextraktion verbindet (an Gefrierschnitten).

7. Hierbei ergibt sich, daß die Leistungsfähigkeit der morphologischen Lipoidanalyse bisher *sehr überschätzt* worden ist. Im allgemeinen sind *nur die primär acetonlöslichen Lipide einer morphologischen Darstellung zugänglich*. Die (z. B. in den Nebennieren) *sehr beträchtlichen Mengen der primär acetonunlöslichen* und erst durch Äther oder durch Alkohol extrahierbaren Lipide können *durch keine einzige Lipoidfärbung sichtbar* gemacht werden. Auch die Markscheidenfärbungen beruhen in erster Linie auf dem Gehalte der Markscheiden an acetonlöslichen Lipiden.

8. *Man kann also nach histologischen Untersuchungen allein kein Urteil über acetonunlösliche Lipide (Lecithin, Cephalin, Cerebroside u. a.) abgeben.*

9. Innerhalb der acetonlöslichen Lipide ist eine Unterscheidung durch verschiedene Färbungen möglich. Im besondern kann aus dem Acetonextrakt der Nebennieren eine nach der Behandlung mit Cadmiumchlorid in Äther unlösliche, phosphorhaltige, nach *Smith* färbbare Substanz von den ätherlöslichen, nach *Smith* nicht färbbaren Bestandteilen des Acetonextraktes abgetrennt werden.

10. Chemische Untersuchungen haben ergeben, daß überall dort, wo *normalerweise* cholesterinhaltige Lipoidgemische vorkommen (Nebennieren, Gehirn, Blut), *stets auch* acetonunlösliche, also *morphologisch nicht nachweisbare Lipide in beträchtlichen Mengen vorhanden* sind. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch bei den pathologischen Verfettungen neben den Cholesteringemischen *andere weniger auffallende* (nicht färbbare), aber darum *kaum weniger wichtige* Lipide abgelagert werden. Bisher haben die Cholesterinester infolge ihrer, ich möchte fast sagen, aufdringlichen morphologischen Eigenschaften nahezu die ganze Aufmerksamkeit der Untersucher auf sich gezogen (vgl. Punkt 1).

Die Aufdeckung der Unzulänglichkeit aller morphologischen Lipoiduntersuchungen fordert geradezu auf, unsere *sehr einseitigen* Kenntnisse über die pathologischen Lipoido durch chemische Untersuchungen zu ergänzen.

So sind z. B. *an der Bildung der atherosklerotischen Herde*, welche als wichtige Beispiele der sog. „Cholesterinesterverfettung“ gelten, *auch phosphorhaltige Lipoido in sehr beträchtlicher Menge* beteiligt.

11. Vergleichende Untersuchungen an fixiertem und an unfixiertem Material ergeben (in Übereinstimmung mit *E. Albrechts* Theorie), daß ein großer Teil der Gewebslipoido an Eiweiß gebunden ist.

Nachtrag bei der Korrektur.

Erst während der Drucklegung erhielt ich Kenntnis von den Untersuchungen *Buscainos*¹⁾, welcher schon in den Jahren 1913–1915 die fraktionierte Lipoidextraktion nach *S. Fränkel* auf Gefrierschnitte angewendet hat. *Buscaino* untersuchte *nur formolfixiertes* Material des Zentralnervensystems und gelangte daher (siehe meine vergleichenden Untersuchungen an formolfixiertem und an unfixiertem Material S. 585–587) zu irrigen Schlußfolgerungen. Die Zusammensetzung der einzelnen Lipoidextrakte hat *Buscaino* nicht geprüft.

Die soeben von *Stüler*²⁾ mitgeteilte Methode zur histochemischen Darstellung von Phosphatiden konnte ich auf ihre Spezifität nicht mehr nachprüfen. Nach meinen eigenen Erfahrungen mit Cadmiumchlorid (s. Anmerkung 3, S. 583) dürfte auch durch die von *Stüler* vorgeschlagene Anwendung von Cadmiumsalzen nicht mehr erreicht werden als durch die verschiedenen schon bisher bekannten „Markscheidenfärbungen“.

Literaturverzeichnis.

- Abderhalden*, Lehrbuch d. physiol. Chemie 1920. — *Albrecht, E.*, Frankfurt. Zeitschr. f. Pathol. **1**, 22. 1907. — *Alexander*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **11**, 145. 1892. — *Altmann*, zit. nach Escher. — *Anitschkow*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **249**, 73. 1924. — *Arndt*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **72**, 517. 1924. — *Aschoff*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **47**, 1. 1910. — *Beumer*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **77**, 305. 1914. — *Biedl*, Innere Sekretion. 3. Aufl. 1916. — *Bolaffio*, Biochem. Zeitschr. **9**, 44. 1908. — *Ciccio*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **20**, Nr. 9. 1909. — *Dietrich*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **21**, 464 u. Ergänzungsh., S. 263. 1910. — *Dietrich und Kleeberg*, Handbuch Lubarsch-Ostertag **20**, II, 913. 1924. — *Dimitz*, Biochem. Zeitschr. **28**, 295. 1910. — *Elias*, Biochem. Zeitschr. **28**, 320. 1910. — *Erlandsen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 7. 1907. — *Escher*, Korresp.-Bl. d. Schweiz. Ärzte 1919, Nr. 43. — *Fex*, Biochem. Zeitschr. **104**, 82. 1920. — *Fränkel, S.*, Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 6. — *Hueck und Wacker*, Biochem. Zeitschr. **100**. 1919. — *Jaffé und Iwantschew*, Zentralbl. f. Herz- u. Gefäßkrankh.

¹⁾ Archives Italiennes de biologie **61**, 1914. Ricerche di biologia Firenze 1915. Rivista di Patologia nervosa e mentale **18**, 11. 1913.

²⁾ Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **35**, 513. 1925.

16, 340. 1924. — *Jarisch*, Biochem. Zeitschr. **134**, 163. 1922. — *Kaiserling*, Berl. klin. Wochenschr. 1910, S. 2156. — *Kaiserling* und *Orgler*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **167**. 1902. — *Kawamura*, Die Cholesterinverfettung. Jena: Fischer 1914. — *Landau* und *McNee*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **58**. 1914. — *Linnert*, Biochem. Zeitschr. **26**, 44. 1910. — *v. Mikulicz-Radecki*, Arch. f. Gynäkol. **116**, 203. 1922. — *Nerking*, Biochem. Zeitschr. **10**, 193. 1908. — *Pari*, Biochem. Zeitschr. **17**, 68. 1909. — *Panzer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 519. 1906 u. **54**, 239. 1907. — *Petri*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **251**. 588. 1924. — *Rosenheim* und *Tebb*, Journ. of physiol. **37**, **38**. 1909. — *Rothschild*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **60**, 39 u. 66. 1915. — *Schönheimer*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **249**, 1. 1924. — *Smith* und *Mair*, Journ. of pathol. a. bacteriol. **13**, 14. 1909. — *Soper*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **60**, 232. 1915. — *Sorg* und *Jaffé*, Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. **35**, 354. 1924. — *Sternberg, H.*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **60**. 1915. — *Thierfelder*, Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Abt. 6. — *Thudichum*, Über die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901. — *Wacker* und *Hueck*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **71**, 373. 1913. — *Wagner*, Biochem. Zeitschr. **64**, 72. 1914. — *Wail*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **245**, 219. 1923 u. **249**, 488. 1914. — *Weltmann*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **56**, 278. 1913. — *Windaus*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110 u. **67**, 174. 1910. — *Wlassak*, Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 1898, S. 453.
