

(Aus dem Pathologischen Institut der Universitäts-Frauenklinik [Vorstand: Professor *Robert Meyer*] und dem Chemischen Institut der Landwirtschaftl. Hochschule [Vorstand: Professor *A. Binz*] zu Berlin.)

Über den histochemischen Fettnachweis im Gewebe. Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung des von Ciaccio angegebenen Färbeverfahrens¹.

Von

Dr. Carl Kaufmann und Dr. Erich Lehmann,
Assistent an der Universitäts-Frauenklinik Assistent am Chemischen Institut
d. Charité. (Direkt.: Prof. Dr. G. A. Wagner.) d. Landwirtsch. Hochschule.

(Eingegangen am 9. Juli 1928.)

Überblickt man die Reihe der Hilfsmittel, die zum Nachweis von Fetten und Lipoiden im Gewebe zur Verfügung stehen, so sind bisher die histochemischen Methoden für die morphologische Betrachtung von ausschlaggebender Bedeutung gewesen.

Wir haben schon in mehreren Arbeiten auf die grundlegenden Mängel hingewiesen, die diesen Methoden anhaften. Neben der von uns erwiesenen Unzulänglichkeit der zur Verfügung stehenden Färbeverfahren zur Differenzierung einzelner Fettgruppen, also zur chemischen Identifizierung wirkt störend, daß der Ausfall der Farbreaktionen in entscheidender Weise von dem wechselnden physikalisch-chemischen Zustande der Fettstoffe im Organe abhängig ist. Wir konnten selber nach Untersuchungen über den Ablauf des Fettstoffwechsels im menschlichen und tierischen Corpus luteum auf die Abhängigkeit des positiven oder negativen Ausfalles einer Fettfärbung im Gewebe von dem jeweiligen Funktionszustande des betreffenden Organs aufmerksam machen. Da wir über weitere ergänzende Untersuchungen in Kürze berichten werden, begnügen wir uns mit diesem Hinweis.

Unsere Kenntnisse über die physico-chemischen Zustandsänderungen der Fettstoffe im Gewebe sind völlig lückenhaft. Die Versuche, mit Hilfe fraktionierter Extraktionen einen Einblick zu gewinnen, stehen im Anfangsstadium und ihre Ergebnisse sind nur mit großer Vorsicht zu werten (s. auch S. 369).

Bei den Untersuchungen, die wir zur Klärung der Frage der Spezifität der einzelnen histochemischen Fett differenzierungsverfahren anstellten, gingen wir von der Untersuchung der reinen chemischen Stoffe aus. Neben der Prüfung einzelner ungemischter Fettstoffe wurde das Hauptgewicht auf die Ergebnisse der Färbungen an zahlreichen Mi-

¹ Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft durchgeführt.

schungen der verschiedensten Fettstoffe gelegt, da wir im Gewebschnitt stets mit zusammengesetzten Fettgemischen zu rechnen haben. Wir konnten nachweisen, daß die am Gefrierschnitt durchführbaren Unterscheidungsverfahren in ihrer Mehrzahl bei Prüfungen an Fettmischungen versagen und somit für eine Gruppenunterscheidung der Fettstoffe im Gewebe unbrauchbar sind.

Es ist im Anschluß an unsere früheren Untersuchungsergebnisse von verschiedenen Seiten die Frage des bleibenden Wertes der histochemischen Fettdifferenzierungsverfahren erörtert worden. Die Methoden haben ohne Zweifel nur deshalb eine so große Verbreitung gefunden, weil man glaubte, mit ihnen einen Einblick in den physiologischen und pathologischen Zellchemismus gewinnen zu können. Nach unseren Untersuchungen sind alle Versuche, aus dem Ausfall der Färbungen auf die Anwesenheit chemisch bestimmter Körper zu schließen, völlig abzulehnen. *Wolff* und *Frankenthal* sprechen davon, daß durch das Ergebnis unserer Untersuchungen „der Histochemie der Fettstoffe das Todesurteil gesprochen sei“. Wenn *Wolff* und *Frankenthal* das Urteil „als zu weit gegangen“ einschränken, so begründen sie diese Meinung mit Forderungen an den Ausbau der Methodik, die bis heute unerfüllt sind. Die weitere Erforschung der Färbevorgänge überzeugt immer mehr von dem zweifelhaften Wert der Unterscheidungsmethoden. Wir glauben, daß auch durch die Zuhilfenahme anderer Untersuchungsmethoden, wie die Ergebnisse chemischer Analysen schon heute zeigen, keine Änderung unseres Urteils herbeigeführt wird.

Wir selber haben (im Institut von Herrn Prof. *Robert Meyer*) die Anwendung der Differenzierungsverfahren verlassen und begnügen uns mit der Sudanfärbung, der eine überragende praktische Bedeutung zur mikroskopischen Darstellung von Fettstoffen überhaupt zuzusprechen ist (s. auch *Romeis, Froboese*).

Um unseren Untersuchungsergebnissen eine breitere Grundlage zu geben und gleichzeitig jeden Zweifel an der Exaktheit der von uns gewählten Prüfungsbedingungen auszuschalten, haben wir unsere Arbeiten fortgeführt. Die weiteren Versuche wurden gleichzeitig zu einer Prüfung der Brauchbarkeit des von *Ciaccio* zum Nachweis von Lipoiden im Gewebe angegebenen Verfahrens benutzt. Wir haben uns insbesondere dieses Farbverfahrens ausgewählt, weil ihm bei Innehaltung gewisser methodischer Vorschriften eine Spezifität für die Darstellung der „*Lipoide im engeren Sinne*“ zugesprochen wird, und es allgemeine Verbreitung gefunden hat. *Ciaccio* selbst faßt unter den durch seine Methode nachweisbaren „Lipoiden im engeren Sinne“ gesättigte und ungesättigte Phosphatide, also Lecithine, Kephaline, Myeline, Sphyngeomyeline, ferner Mischungen von reinem und verestertem Cholesterin mit Ölsäure zusammen. Die Untersuchungen von *Bell, Bocchi, Fauré-Frémiel*

und *Hoffheinz* lassen gewisse Zweifel an der Spezifität der Methode aufkommen. Doch kommt *Hoffheinz*, der sich wohl zuletzt eingehend mit den Ergebnissen der Ciacciofärbung am Organschnitt beschäftigt hat, — ohne allerdings chemische Vergleichsuntersuchungen anzustellen — zu dem abschließenden Urteil, daß die Ciacciosche Färbemethode nur unter Einhaltung bestimmter technischer Forderungen geeignet ist, als eine sogenannte spezifische Lipoidfärbemethode bezeichnet zu werden. Es müßte also immerhin bei peinlichster Innehaltung bestimmter methodischer Bestimmungen gelingen, die „Lipoide“ zu erfassen. Besteünde die Annahme zu Recht, daß die Ciacciofärbung für Lipoide spezifisch ist, so müßte dieser Reaktion im Gegensatz zu allen anderen Fettfärbeverfahren eine überragende Bedeutung bei der Untersuchung des Lipoidstoffwechsels im Gewebe zuerkannt werden. Mit einer genauen Prüfung des Ciaccio-Verfahrens konnten weiterhin Beiträge zur Klärung zahlreicher anderer für den histochemischen Fettnachweis bedeutsamer Fragen erbracht werden und wir berichten über die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die über den Rahmen einer rein methodologischen Prüfung des Ciaccio-Verfahrens hinaus von Bedeutung sein dürften.

Als Einleitung sei eine Charakterisierung der Ciaccio-Methode gegeben.

Das Originelle des Verfahrens besteht in einer Behandlung mit Kaliumbichromat, das eine elektive Fixationswirkung auf Lipoide ausüben soll. Die Lipoide sollen chromiert und dadurch in organischen Lösungsmitteln (Alkohol, Xylol), deren Anwendung durch die Paraffineinbettung notwendig wird, unlöslich werden. Hierdurch sollen sie der nachfolgenden Sudanfärbung zugänglich sein, während die nichtchromierten Fettstoffe, die nicht zur Gruppe der Lipoide gehören, durch die Behandlung mit Alkohol aus dem Gewebe ausgezogen werden sollen.

Ciaccio selbst äußert sich über die Wirkung der Chromsalze folgendermaßen: „Experimentell habe ich an Proben von reinen Fettstoffen gesehen, daß das Lecithin und verwandte Stoffe, zweckmäßig mit einem Chromsalz behandelt, in den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln unlöslich werden. Nicht im geringsten beeinflußt durch diese Behandlung werden dagegen die Fettsäuren, die Neutralfette und das Cholesterin. Diese Wirkung der Chromsalze auf die Lecithine wird durch Zusatz von Formol und einer organischen Säure beschleunigt. Der Hauptpunkt dieser Methode ist der, daß die mit Chromsalzen behandelten Lecithine sich bequem mit den für die Fette spezifischen Farben tingieren lassen.“

Es ergeben sich somit, wenn wir die Spezifität des Verfahrens prüfen wollen, folgende Fragestellungen.

A. Histochemischer Teil.

Welche Fettstoffe lassen sich bei Verwendung einer einwandfreien Methodik nach *Ciaccio* färben?

B. Chemischer Teil.

I.

Werden die „Lipoide im engeren Sinne“ durch das Ciaccioverfahren, also die Behandlung mit Kaliumbichromat, fixiert und in organischen Lösungsmitteln unlöslich ?

II.

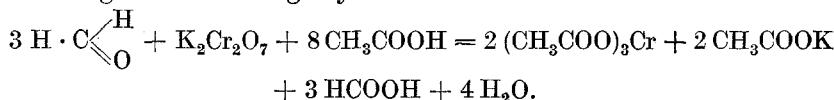
Werden die Fettstoffe, die nicht zu den Lipoiden zu rechnen sind, bei dem Ciaccio-Verfahren aus dem Gewebe vollständig entfernt und dadurch der nachfolgenden Sudanfärbung entzogen ?

Wir weisen darauf hin, daß es bei dieser Betrachtung bedeutungslos ist, daß die Ciaccio-Sudanfärbung im Gewebe anders ausfällt als die einfache Sudanfärbung. Hoffheinz hat — wie andere Untersucher — gezeigt, daß die Ciaccio-Lipoide sich nicht beständig mit der gewöhnlichen Sudanlösung färben lassen. Diese Befunde werden durch die weit stärkere Wirkung des beim Ciaccio-Verfahren in konzentrierter alkoholischer Lösung (85 %) verwandten Sudans ohne weiteres erklärt. Für unsere Auffassung ist die Tatsache maßgebend, daß als Farbstoff Sudan verwandt wird, dessen Löslichkeit in sämtlichen Fettstoffen hinreichend bewiesen ist.

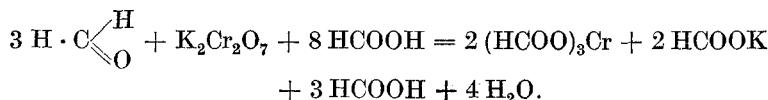
Erlaubt schon das Ergebnis jeder einzelnen Untersuchungsreihe eine Entscheidung über den Wert der Methode zum spezifischen Lipoidnachweis, so haben wir uns bemüht, durch die Ergebnisse der parallel laufenden Untersuchungsergebnisse ein möglichst lückenloses Bild des zu prüfenden Verfahrens zu liefern.

Das größte Sorgfalt und *strenge Innehaltung aller methodischen Vorschriften* erfordernde Verfahren zerfällt in mehrere Abschnitte, von denen jeder einzelne kurz besprochen werden soll. Hieran knüpfen wir die Erörterung der chemischen bzw. physikalisch-chemischen Verhältnisse.

1. Der erste Abschnitt der Ciaccio-Methode besteht in einer 48-stündigen Fixierung mit einer Lösung, die aus 100 ccm 5 proz. Kaliumbichromatlösung, 20 ccm 40 proz. Formaldehydlösung und 5 ccm Eisessig zusammengesetzt ist. Bei der Herstellung dieser Fixierflüssigkeit kann man einige Zeit nach dem Zusammengießen der Bestandteile bemerken, daß die rotgelbe Farbe des Bichromats unter Reduktion in Grün umschlägt. Dabei wird ein Teil des Formaldehyds durch das Kaliumbichromat unter Mitwirkung von Essigsäure zu Ameisensäure nach folgender Gleichung oxydiert:

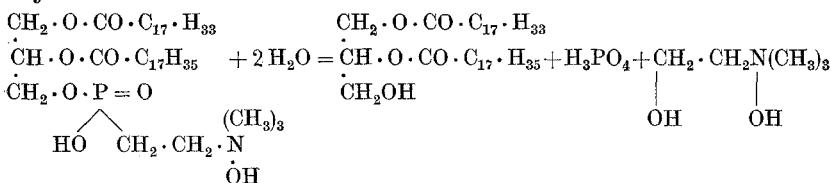


Die nach dieser Gleichung entstandene Ameisensäure bewirkt wiederum mit dem Rest des Kaliumbichromats Oxydation des Formaldehyds zu Ameisensäure :



wobei das Bichromat zu ameisensaurem Chrom reduziert wird. Bei diesem Vorgang wird nur ein Teil des vorhandenen Formaldehyds verbraucht, denn bei Berücksichtigung der Mengenverhältnisse der bei dieser Reaktion umgesetzten Stoffe ergibt sich, daß die in der Kaliumbichromatlösung enthaltenen 5 g Bichromat 1,53 g Formaldehyd zu oxydieren imstande sind, und daß somit von der 8 g betragenden Formaldehydmenge noch 6,47 g zur Fixationswirkung übrigbleiben. Neben der vom Formalin ausgehenden fixierenden Wirkung dieser Lösung auf das zu bearbeitende Organ kommt gleichzeitig die beizende Kraft durch das essigsaure bzw. ameisensaure Chrom zur Geltung. Diese erste Lösung, der von Ciaccio in erster Linie eine fixierende Wirkung zugeschrieben wird, übt auf das Organ die stärkste Wirkung aus.

Die Chromierung des Lecithins durch die Ciacciolösung I stellen wir uns folgendermaßen vor: Nach den auf S. 363 angestellten Überlegungen muß die Ciacciolösung I freie Essigsäure bzw. Ameisensäure enthalten. Nun ist seit langem bekannt, daß Lecithin unter der Wirkung von Säuren langsam Phosphorsäure abspaltet, wobei es zunächst den Cholin-Teil verliert. Man muß demnach annehmen, daß das Lecithin auch im Gewebe durch die Ciacciolösung I in Cholin, Phosphorsäure und den Glycerindifettsäureester zerfällt:



Das Cholin würde als starke Base sofort einen Teil der Essig- bzw. Ameisensäure binden und so die Acidität des Chrombades abschwächen. Der andere Teil der Säure wird durch die basischen Gruppen der Eiweißstoffe neutralisiert, so daß sich jetzt ein Niederschlag von graugrünem Chromphosphat bilden kann, ein Vorgang, der bei Gegenwart freier Essig- und Ameisensäure nicht möglich ist. Der Glycerindifettsäureester wird, solange die Lösung noch sauer ist, wieder in Glycerin und Fettsäuren zerlegt, die dann gleichfalls Chromsalze bilden.

2. Abschnitt. Es folgt nunmehr eine mehrtägige Behandlung mit 3 proz. Kaliumbichromatlösung, der Ciaccio eine entscheidende Bedeutung für die Chromierung der später zur Darstellung gelangenden Fettstoffe beilegt. Nach 3—4 tägigem Verweilen sollen Phosphatide und Cerebroside, nach 6—7 tägiger Chromierung mit dieser Lösung die Verbindungen des Cholesterins, nach längerer als 7 tägiger Chromierung die Ölsäure darstellbar sein. Merkwürdigerweise ist es sowohl Ciaccio als auch allen Untersuchern, die sich mit dem von Ciaccio angegebenen Verfahren beschäftigten, scheinbar völlig entgangen, daß die zur Chro-

mierung verwendete Kalumbichromatlösung selbst bei langdauernder Einwirkung auf fettreiche Organe keinerlei chemische Veränderungen erfährt. Es war für uns sehr auffällig, daß die Kalumbichromatlösung selbst nach langdauernder Einwirkung auf Organe ihre rotgelbe Farbe unverändert beibehielt.¹ Wir mußten daraus schließen, daß sie keine chromierende Wirkung ausgeübt haben konnte. Das durch seine gelbrote Farbe kenntliche 6wertige Chrom des Kalumbichromats kann als solches keine chromierende Wirkung ausüben. Die Chromierung kann erst eintreten, wenn das gelbrote 6wertige Chrom zum grünen 3wertigen Chrom reduziert worden ist. Eine solche Reduktion, die an einer Umfärbung in Grün zu erkennen ist, konnte aber niemals bei Einwirkung der Kalumbichromatlösung auf Organe beobachtet werden. Nach dieser Erkenntnis mußten wir annehmen, daß die chromierende Wirkung schon von der ersten Lösung, also dem Formaldehyd-Chrom-Essigsäure-Gemisch ausgegangen war. In dieser Annahme wurden wir dadurch bestärkt, daß die Organstücke nach 48stündiger Behandlung mit der ersten grüngefärbten Lösung, die dreiwertiges Chrom enthält, durch und durch graugrün gefärbt, also mit 3wertigem Chrom beladen waren. Die von Ciaccio und anderen Untersuchern an der Reinsubstanz, von Hoffheinz am Organ erhobenen Befunde, daß durch länger dauerndes Verweilen in der 3proz. Kalumbichromatlösung eine Vermehrung der nach Ciaccio darstellbaren Lipoide zu erzielen ist, sind so zu deuten, daß das in den Organstücken von der Behandlung mit der Lösung Nr. I zurückgebliebene 3wertige Chrom länger einwirken kann und dadurch mehr Fettstoffe chromiert. Daß das in der Lösung Nr. II befindliche 6wertige Chrom für diesen Vorgang ohne Bedeutung ist, zeigt folgende einfache Versuchsanordnung:

Wir legten Leberstücke 48 Stunden lang in das Formaldehyd-Chromacetat-Gemisch. Die Hälfte der Organstücke wurde sodann nach den Vorschriften Ciaccios in 3proz. Kalumbichromatlösung, die andere Hälfte in 4proz. Formalinlösung gelegt. Aus beiden Flüssigkeiten wurden verschiedene Male nach gleichdauernder Einwirkung Stücke entnommen und nach der von Ciaccio angegebenen Anweisung weiter behandelt. Es zeigte sich, daß sowohl in den nur mit Formalin behandelten, als auch in den nach Ciaccio mit Kalumbichromat behandelten Organstücken die Menge der nach Ciaccio färbbaren Fettstoffe vollkommen gleich war, und daß auch die Schönheit der Färbung durch die Veränderung des Verfahrens keinerlei Einbuße erlitten hatte. Es gelingt also, unter Ausschaltung der Nachbehandlung mit 3proz. Kalium-

¹ Schwache Grünfärbung der 3proz. Kalumbichromatlösung wird durch dreiwertiges Chrom bedingt, das den Organstücken aus der 1. Lösung (Kalumbichromat-Formaldehyd-Essigsäuregemisch) anhaftet. Wechselt man die 3proz. Kalumbichromatlösung nur einmal, so bleibt die Lösung gelbrot.

bichromatlösung eine ausgezeichnete Färbung nach *Ciaccio* zu erzielen. — Weiterhin konnte in diesem Versuche die Tatsache bestätigt werden, daß die Menge der färbbaren Fettstoffe mit der Dauer der Aufbewahrung zunimmt, wobei ausdrücklich darauf hinzuweisen ist, daß hierbei nur der länger dauernden Einwirkung des im Organ befindlichen aus der ersten Lösung stammenden 3wertigen Chroms eine Bedeutung zukommt.

Über die Wirkung der Chrombäder ist zu sagen, daß eine Fixation der sogenannten Lipoide durch die Chrombehandlung nicht zu leugnen ist. Es bleibt aber zu prüfen, ob die Fixation die Lipoide vollständig erfaßt. Für die Frage der elektiven Erfassung der Lipoide im Gewebe — wie sie *Ciaccio* annimmt — ist jedoch von größerer Bedeutung, das die nur schwer chromierbaren Fettstoffe durch die angewandten organischen Lösungsmittel (Alkohol, Xylol) völlig entfernt werden. Der Wert der Methode zum Nachweis von Lipoiden im Gewebe entscheidet sich mit der Lösung der Frage: Werden die Fettstoffe, die nicht zu den Lipoiden zählen, während des *Ciaccio*-Verfahrens aus den Organen restlos herausgeschafft oder nicht? Wenn es der Methode nicht gelingt, diese Fettstoffe zu beseitigen, so bleibt im Organ ein Gemisch von Lipoiden und Nichtlipoiden zurück, dessen Zusammensetzung bei der Nachfärbung mit Sudan unmöglich erkennbar ist.

Die nur schwer chromierbaren Fettstoffe müssen unbedingt aus dem Organstück entfernt werden, weil sie andernfalls bei der Färbung Sudan ohne weiteres aufnehmen. Die Extraktion dieser Fettstoffe soll nach *Ciaccio* durch die der Fixierung folgende Alkohol-Xylolbehandlung erreicht werden.

3. Abschnitt. Nach gründlichem Auswässern folgt die Behandlung in der steigenden Alkoholreihe und in einem Alkohol-Xylolgemisch und in Xylol. Da dieser Abschnitt der Behandlung, den wir zusammenfassen, für den Wert der Methode entscheidend ist, weisen wir nochmals auf die Bedeutung folgender Frage hin: Werden im Verlaufe der Vorbereitung des Organs die nicht chromierbaren Fettstoffe (Triglyceride, Cholesterin und seine Ester) durch die Alkohol-Xylolbehandlung restlos entfernt oder nicht?

Die Antwort, die *Ciaccio* auf diese Frage gibt, ersehen wir aus einer Zusammenstellung seiner Färbeergebnisse an chemischen Reinsubstanzen.

Ciaccios Ergebnisse.

Wir verdanken folgende Zusammenstellung der Liebenswürdigkeit von Herrn Professor *Ciaccio*.

,Fixation 48 Stunden in dem Kaliumbichromat-Formaldehyd-Essigsäuregemisch. Chromierung in 3 proz. Bichromat verschieden lange, Wässern 24 Stunden, Lösungsmittel.

Wir ersehen aus dieser Zusammenstellung, welchen ausschlaggebenden Einfluß die Dauer der Chrombehandlung ausübt. Nach kurz-

Fettstoffe	Ergebnisse gemäß der Chromierungsdauer
Glycerinester	negativ nach 6—7 tägiger Chromierung
Cholesterinester (der Ölsäure und der Palmitinsäure)	desgl.
Palmitinsäure	desgl.
Stearinsäure	desgl.
Ölsäure	desgl.
Ölsäure + Cholesterin	negativ nach 4—5 tägiger Chromierung
Ölsäure + Cholesterinester	positiv nach 7 tägiger Chromierung desgl.
Ungesättigte Phosphatide (Eilecithin, Cephalin, Myelin, Cuorin und Sahidin)	positiv nach einfacher Fixierung in der Mischung Bichromat-Formaldehyd und Essigsäure oder nach 1—2 tägiger Chromierung
Ungesättigte Phosphatide und Cholesterin	positive Ergebnisse nach Chromierung von 2—4 Tagen
Ungesättigte Phosphatide und Cholesterinester	
Ungesättigte Phosphatide und gesättigte Phosphatide	
Ungesättigte Phosphatide und Cerebroside	
Gesättigte Phosphatide (Sphingomyelin, Neottin und Cerebrin)	positiv nach 5 tägiger Chromierung.“

dauernder Chromierung ergaben *positive* Färbungen ungesättigte und gesättigte Phosphatide. Langdauernder Chromierung bedürfen die Mischungen von Cholesterin und Ölsäure¹ und von Cholesterinester und Ölsäure, um in den organischen Lösungsmitteln unlöslich zu werden.

Negativen Färbeausfall erzielte Ciaccio bei Prüfung der Fettsäuren (sowohl der gesättigten wie der *ungesättigten!*), ferner der Cholesterin- und Glycerinester.

Entscheidend ist die Feststellung, daß nach 48 stündiger Behandlung in dem Chrom-Essigsäure-Formaldehydgemisch und anschließender 5 tägiger Aufbewahrung in der 3 proz. Kaliumbichromatlösung eine *elektive Darstellung* der Ciaccio-Lipoide möglich sein soll. Auf diese Tatsache stützt sich die Annahme einer elektiven Lipoidfärbung im Gewebe.

Die bisherigen methodologischen Nachprüfungen des Verfahrens an der Reinsubstanz.

Es liegen nur wenige Nachprüfungen dieser Ergebnisse vor. Wir erwähnen die Arbeiten von Kaiserling und Kasarinooff, Kawamura, Bell, Bocchi und Fauré-Frémiel. Die Ergebnisse von Bell, Bocchi und Fauré-

¹ Wir werden später zeigen, daß hierbei nur die Anwesenheit der Ölsäure für den positiven Färbeausfall entscheidend ist. Cholesterin ist durch die Ciaccio-Methode *nicht* darstellbar.

Frémiet beanspruchen besondere Beachtung, da diese Forscher auf Grund histochemischer Untersuchung von Reinsubstanzen darauf hinweisen, daß auch die reine Ölsäure positive Färbeergebnisse liefert. Eine von *Ciaccio* vorgenommene Überprüfung seiner Ergebnisse ergab folgende Befunde (*Les lipoides intracellulaires*, Biolog. Médicale, Août 1922, S. 18): „Ölsäure ergibt nach Fixation in dem Gemisch Formaldehyd, Bichromat und Essigsäure und Chromierung bei gewöhnlicher Temperatur auf die Dauer von 6—7 Tagen (bei einer Fixationsdauer von 24 oder 48 Stunden) negative Resultate. Nach vorausgegangener Fixation durch das Formol-Chrom-Essigsäuregemisch und Chromierung während einer Woche bei 37° erhält man teilweise positive Resultate, die sich je nach der Verlängerung der Chromierung verstärken.“

Es wäre somit nach *Ciaccio* anzunehmen, daß bei einer Chromierung von 5 Tagen nach vorausgegangener Fixation seine Methode an der chemischen Reinsubstanz eine elektive Färbung der gesättigten und ungesättigten Phosphatide, also der häufig auch als „Lipoide“, bezeichneten Stoffe ermöglichte.

Kritik an dem von *Ciaccio* gewählten Prüfungsverfahren.

Wir müssen hier eine kurze Besprechung des von *Ciaccio* und *Bell* gewählten Prüfungsverfahrens einfügen.

Beide Verfasser füllten Zigarettenpapierstreifen mit den zu prüfenden Fettstoffen und unterwarfen diese Papierstreifen der Färbung. Durch die Wahl dieses Prüfungsverfahrens werden die von *Ciaccio* erhobenen Befunde leicht erklärt. Die nur schwer chromierbaren Fettstoffe werden — wie *Ciaccio* annimmt — aus den dünnen Papierstreifen nach kurzer Chrombehandlung durch die organischen Lösungsmittel ausgezogen, während sie nach längerer Chrombehandlung nicht mehr extrahiert werden können.

Das Entscheidende ist, daß zu dem Versuche *dünnes Papier* verwandt wird, da so die organischen Lösungsmittel leicht angreifen können. Es gelingt jedoch durch eine geringfügige Änderung des Verfahrens, gänzlich andere Färbeergebnisse zu erzielen.

Verwendet man zu den Versuchen 3—5 mm dicke Holundermarkstücke, also Stücke, die in ihrer Dicke den zur Ciacciountersuchung verwandten Organstücken gleichen, so werden die nur schwer chromierbaren Fettstoffe — also die nach *Ciaccio* unfärbaren — nur teilweise entfernt und somit auch gefärbt. Es ist also schon aus diesem Grunde nicht angängig, die im Zigarettenpapierversuch erhobenen Befunde auf das Organ zu übertragen. Daß auch aus anderen Gründen, insbesondere — weil die kolloidchemische Struktur des Gewebes nicht nachzuahmen ist — vor einer Übertragung der am Reinversuch erhobenen Befunde auf die Organverhältnisse zu warnen ist, muß nach

den Ausführungen von *H. J. Arndt* als selbstverständliche Forderung gelten.

Uns kommt es in erster Linie darauf an zu zeigen, daß schon durch die Wahl des Prüfungsverfahrens von *Ciaccio* erhebliche Unterschiede zwischen seinen Befunden im Modellversuche und im Organ bestehen müssen.

Die Prüfung der histochemischen Reaktionen an der Reinsubstanz.

Die Erkenntnis, daß die im Organ vorliegenden kolloidchemischen Verhältnisse im Reinversuch überhaupt nicht nachzuahmen sind, darf jedoch nicht dazu führen, die Prüfung an der chemischen Reinsubstanz zur Klärung histochemischer Reaktionen als unzweckmäßig abzulehnen, wie es von *Kutschera-Aichbergen* und *Hoffheinz* geschehen ist. Solange wir über die physicochemischen Zustandsbedingungen der Fettstoffe im Gewebe so mangelhaft unterrichtet sind wie bisher, ist eine Spezifitätsprüfung einer Fettreaktion am Organschnitt unmöglich und wir müssen die Prüfung im Modellversuche als Behelfsmittel verwenden. Das ist insbesondere dann erlaubt, wenn wir die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit größter Vorsicht werten.

Wir haben schon früher an einem Modellversuche zeigen können, wie leicht die am Organschnitt erhobenen Befunde zu Trugschlüssen führen. Die von *Kutschera* auf Grund fraktionierter Extraktionen von Gewebsschnitten vermeintlich festgestellte Tatsache der Unfärbbarkeit von Lecithin in seinen Versuchen ist mit der Nichtbeachtung der Löslichkeitserhöhung von Lecithin, das im Organ in einer Mischung mit anderen Fettstoffen vorhanden ist, zu erklären. *Kutschera* konnte feststellen, daß nach kurzer Acetonextraktion menschlicher Nebenniere „sämtliche im Gewebsverbande färberisch überhaupt nachweisbaren Lipide schon nach der Acetonextraktion verschwunden sind.“ Er folgert hieraus, daß Lecithin als ein in Aceton unlösliches Lipoid der mikroskopischen Betrachtung im Gewebe nicht zugänglich sei. Da uns die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung auf Grund eigener Untersuchungen am Corpus luteum unwahrscheinlich schien, haben wir uns mit der Extraktion menschlicher Nebenniere beschäftigt. (Zentralbl. f. allgem. Pathol., 39, 232.) Wir konnten nachweisen, daß schon nach kurzer Acetonextraktion 26,6% des in der Nebenniere befindlichen Gesamtphosphors in den Acetonextrakt übergehen. Es ist also aus den Ergebnissen von *Kutschera-Aichbergen* nur der Schluß zu ziehen, daß ein großer Teil des in der Nebenniere vorhandenen Lecithins durch die Färbung nicht dargestellt wird; eine Tatsache, deren Richtigkeit auch für die Färbung anderer Fettstoffe von keiner Seite bezweifelt wird. Von einer Unfärbbarkeit des Lecithins im Organschnitt darf aber keine Rede sein, nachdem nachgewiesen wurde, daß Lecithin in den Acetonextrakt übergeht.

Wir weisen bei dieser Gelegenheit auf die Ausführungen von *Sehrt* hin, der auf Grund der Angaben von *Bang* über die Löslichkeitsveränderungen von Phosphatiden bei Anwesenheit anderer Stoffe auf die Schwierigkeit der Wertung der Ergebnisse fraktionierter Extraktionen aufmerksam macht. Wir konnten selbst in einem Modellversuche zeigen, daß Lecithin bei Zusatz von Ölsäure zu fast 50% in den Acetonextrakt übergeht, während reines Lecithin sich bekanntermaßen nur in Spuren in Aceton löst.

In einer soeben erschienenen Arbeit kommt *Kimmelstiel* auf Grund von Färbeversuchen an extrahierten Organschnitten ebenfalls zu einer Ablehnung der von *Kutschera-Aichbergen* gezogenen Schlußfolgerungen; *Kimmelstiel* konnte in gründlich acetonextrahierten atheromatösen Aorten mit Hilfe einer in Aceton gelösten Fettponceaulösung positive Fettfärbungen erzielen.

Hoffheinz kommt auf Grund vergleichend morphologischer Untersuchungen an Lebern zu dem Ergebnis, daß „die *Ciacciosche* Färbe-methode nur unter Einhaltung bestimmter technischer Forderungen geeignet ist, als eine sogenannte spezifische Lipoidfärbemethode bezeichnet zu werden“. Nach dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen ist selbst diese vorsichtige Formulierung, die nach Organuntersuchungen ohne chemische Vergleichsversuche gewonnen wurde, abzulehnen.

Wir empfehlen weiterhin zur Prüfung der Farbreaktion die Untersuchung der chemischen Reinsubstanz, allerdings unter Bedingungen, die Fehlerquellen nach Möglichkeit ausschließen, und für das Verfahren von *Ciaccio* glauben wir die Forderung exakter Versuchsbedingungen durch die Prüfung fettbeladener Holundermarkstücke von 3—5 mm Dicke erfüllt zu haben.

Der Wert der Untersuchungen am Holundermark.

Wir haben uns schon in früheren Arbeiten der Holundermarkmethode¹ bedient, die darin besteht, daß man bei leichtschmelzenden Fettstoffen bzw. Fettgemischen das Holundermark in die geschmolzene Masse untertaucht, evakuiert und nach einiger Zeit wieder normalen Luftdruck herstellt. Bei hochschmelzenden Fettstoffen wie Cholesterin oder unter Zersetzung schmelzenden wie Lecithin muß die Füllung des Holundermarkes durch Einlegen in ein die betreffenden Fette enthaltendes Lösungsmittel erfolgen. Um jeden Zweifel an der Genauigkeit des Verfahrens auszuschalten, glaubten wir, besonders im Hinblick auf die später folgenden chemischen Analysen folgende Fragen beantworten zu müssen.

1. Ist leeres Holundermark lecithin- und cholesterinfrei?

¹ Käufliches Holundermark wurde vor Benutzung stets 5 Stunden mit Äther im Soxhlet ausgezogen.

2. Gehen bei dem von uns vorgeschlagenen Verfahren wirklich Fettstoffe in hinreichender Menge in das Holundermark ein?

Zu 1. wurden in 3 Versuchen mehrere Stücke Holundermark von verschiedenen Stangen mit Schwefel- und Salpetersäure verascht und auf ihren Phosphorgehalt geprüft.

Analyse 1.

6 Stücke Holundermark von 0,1382 g Gewicht wurden verascht, nach Veraschung und Abkühlung mit Natronlauge neutralisiert und auf 75 ccm aufgefüllt. Bei Zusatz von Molybdänsäure-Strychninreagens zu 3 bzw. 10 ccm dieser Lösung entstanden keine Trübungen. Es war also kein Phosphor vorhanden.

Analyse 2.

6 Stücke Holundermark von 0,0826 g Gewicht wurden wie unter 1 behandelt. Es wurde auf 75 ccm aufgefüllt. Mit 15 ccm dieser Lösung entstand wiederum keine Trübung.

Analyse 3.

4 Holunderstücke von 0,0986 g Gewicht wurden wie vorstehend verascht. Nach Auffüllung auf 50 ccm trat mit 10 ccm dieser Menge keine Trübung ein.

Obwohl Pflanzen kein Cholesterin, sondern Phytosterin enthalten, das die Reaktionen des Cholesterins nicht gibt, wurde auch hier eine Prüfung vorgenommen, um auszuschließen, daß irgendwelche andere Stoffe mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure Grünfärbung ergeben. Von 20 verschiedenen Stangen Holundermark wurde je 1 Stück abgeschnitten und alle zusammen gewogen. Diese 20 Stücke, die ein Gewicht von 0,2530 g hatten, wurden etwa 6 Stunden mit Chloroform im Soxhlet extrahiert und auf 100 ccm aufgefüllt. 5 ccm davon gaben mit 2 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm Schwefelsäure keine Grünfärbung. Auch bei Einengung von 10 ccm des Extraktes auf 5 ccm erschien keine grüne Farbe.

Das leere Holundermark wurde also lecithin- und cholesterinfrei gefunden.

Zu 2. Nachdem das Holundermark lecithin- und cholesterinfrei gefunden worden war, mußte geprüft werden, ob bei dem Aufsaugeverfahren aus einer Lösung von Fettstoffgemischen die *Mischungsbestandteile auch wirklich in das Holundermark eintreten*.

Zu diesem Zwecke wurden 0,2816 g Cholesterin und 0,3200 g Lecithin in ein Schälchen eingewogen, das Gemisch beider Stoffe in Äther gelöst, dazu 0,1308 g Holundermark getan, zum Untertauchen gebracht und evakuiert. Nach Aufheben des Vakuums wurde das Mark mit Filterpapier abgetrocknet und im Exsiccator vom Äther bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dieser Behandlung wog das gefüllte Holundermark 0,1764 g. Demnach waren 0,0456 g Cholesterin + Lecithin vom Holundermark aufgenommen worden. Dieses wurde nun 15 Stunden lang mit Äther extrahiert, der Auszug auf 250 ccm gebracht und darin Cholesterin und Lecithin bestimmt. Es fanden sich darin 0,0255 g Cholesterin und 0,0146 g Lecithin.

1. *Cholesterinbestimmung.* Aus dem auf 250 ccm aufgefüllten Ätherextrakt wurden 2 ccm entnommen, der Äther verdampft, der Rückstand mit 5 ccm Chloroform aufgenommen und colorimetrisch bestimmt. Ablesungsmittel: 64, entsprechend 0,204 mg. Verdünnung: 125fach. Gefunden: 25,5 mg Cholesterin.

2. Lecithinbestimmung. Aus dem 250 ccm umfassenden Extrakt wurden 50 ccm verdampft, der Rückstand verascht, neutralisiert und auf 50 ccm aufgefüllt. Davon wurde der Gehalt in 5 ccm bestimmt.

- | | |
|---|---------------------------------|
| a) Ablesungsmittel: 11,1; | bei Vergleichsstellung 10; |
| P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0270; | Verdünnung: 50fach; |
| gefunden: 1,35 mg P ₂ O ₅ ; | entsprechend: 15,3 mg Lecithin. |
| b) Ablesungsmittel: 12,3; | bei Vergleichsstellung 10; |
| P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0244; | Verdünnung: 50fach; |
| gefunden: 1,22 mg P ₂ O ₅ ; | entsprechend: 13,8 mg Lecithin. |

Mittel aus beiden Bestimmungen: 14,6 mg Lecithin.

Im 2. Versuch wurde als Lösungsmittel für das Cholesterin-Lecithingemisch statt Äther Chloroform benutzt, weil dieses beim Evakuieren weniger rasch verdunstet als der Äther. Die Einwagen betrugen für Cholesterin 0,3193 g, für Lecithin 0,3807 g, für das verwendete Holundermark (6 Stücke) 0,0965 g. Nach Beschickung und Trocknung bis zur Gewichtskonstanz hatte das Holundermark um 0,0140 g zugenommen. Nach 15stündiger Extraktion mit Chloroform und Auffüllen auf 100 ccm wurde daraus der Gehalt an Cholesterin und Lecithin bestimmt.

a) **Cholesterinbestimmung.** Dem 100 ccm enthaltenden Meßkolben wurde 2mal je 2 ccm entnommen, durch Zugeben von 3 ccm Chloroform auf 5 ccm verdünnt, und colorimetrisch bestimmt.

- | | |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1. Ablesungsmittel: 60; | entsprechend: 0,228 mg; |
| Verdünnung: 50fach; | gefunden: 11,40 mg Cholesterin. |
| 2. Ablesungsmittel: 62; | entsprechend: 0,218 mg; |
| Verdünnung: 50fach; | gefunden: 10,90 mg Cholesterin. |

Mittel aus beiden Bestimmungen: 11,15 mg Cholesterin.

b) **Lecithinbestimmung.** 25 ccm des 100 ccm enthaltenden Chloroformauszuges wurden auf dem Wasserbade verdampft, verascht, neutralisiert und auf 50 ccm aufgefüllt. Dieser Lösung wurden zur Bestimmung 2mal je 20 ccm entnommen und bestimmt.

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Ablesungsmittel: 14,0; | bei Vergleichsstellung 10; |
| P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0214; | Verdünnung: 10fach; |
| gefunden: 0,214 mg P ₂ O ₅ ; | entsprechend: 2,43 mg Lecithin. |
| 2. Ablesungsmittel: 14,2; | bei Vergleichsstellung 10; |
| P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0211; | Verdünnung: 10fach; |
| gefunden: 0,211 mg P ₂ O ₅ ; | entsprechend: 2,39 mg Lecithin. |

Mittel aus beiden Bestimmungen: 2,41 mg Lecithin.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß tatsächlich die *Mischungsbestandteile* der zu prüfenden Fettstoffe in das Holundermark eingehen, und somit die Exaktheit unserer Versuchsanordnung bewiesen ist.

Wie bedeutungsvoll die Wahl der geeigneten Methodik für die Prüfung histochemischer Verfahren ist, geht aus folgenden Versuchen her vor.

Wir gingen zuerst in der Weise vor, daß wir zur Prüfung chemischer Reinsubstanzen auf ihre Färbbarkeit nach Ciaccio Holundermarkschnitte von etwa 30 μ wie in unseren früheren Versuchsreihen (Technik s. Virchows Arch., 261, H. 2, S. 633ff.) benutzten. Die mit Fettstoffen beladenen Holundermarkstücke wurden mit dem Gefriermikrotom ge-

schnitten und dem gesamten Ciaccio-Prozeß¹ unterworfen. Bei der Prüfung der Ciaccio-Methode an 142 Gemischen von Fettsäuren, Glyceriden der Fettsäuren und des Cholesterins, Cholesterin, Lecithin, Kerasin, Sphingomyelin, Phrenosin, Glycerin und Eiweiß fanden sich sehr widersprüchsvolle Ergebnisse. Da eine ganze Reihe von Schnitten, die mit Mischungen gefüllt waren, welche Lecithin, Kerasin, und Sphingomyelin enthielten, *negative* Färbungen aufwiesen, mußten wir annehmen, daß aus den 30μ dicken Schnitten selbst diese leicht chromierbaren Stoffe durch die organischen Lösungsmittel herausgelöst worden waren. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, untersuchten wir darauf in neuen Versuchsreihen Holundermarkschnitte von 3—5 mm Dicke und kamen zu dem Ergebnis, daß bei diesem Verfahren bei gleicher Einwirkungsdauer der verschiedenen Lösungen die Mehrzahl sämtlicher Fettmischungen nach Ciaccio positive Färbungen ergaben. Die 3—5 mm dicken, fettbeladenen Holundermarkstücke wurden als ganze Stücke der Ciaccio-Fixation und der Durchführung durch organische Lösungsmittel unterworfen. Nach Abschluß der Alkohol-Xylolbehandlung wurden die Stücke auf dem Gefriermikrotom geschnitten, und die Färbung nach Ciaccio vorgenommen. Durch den hierbei erzielten positiven Färbeausfall der Ciaccioreaktion bei sämtlichen Fettstoffen mit Ausnahme der gesättigten Triglyceride ist der Nachweis erbracht, daß die Ergebnisse der Prüfung chemischer Reinsubstanzen im Zigarettenpapierversuch, wie sie bisher zur Prüfung des Ciaccio-Verfahrens angewandt wurden, nicht als verwertbar bezeichnet werden dürfen. Es ist weiter erwiesen, daß von einer elektiven Färbung der Lipoide durch das Ciaccio-Verfahren nicht die Rede sein kann. Der Ausfall unserer Versuche legt es vielmehr nahe, die Doppel- oder Lückenbindung der Ölsäure als den Träger der Ciaccio-Färbung zu bezeichnen.

Es wird im chemischen Teile der Versuch gemacht werden, die Richtigkeit dieser Anschauung experimentell zu belegen.

In der Anzahl der untersuchten Fettstoffe und ihrer Mischungen haben wir uns Beschränkungen auferlegt. Es gelangten in 69 Einzeluntersuchungen 7 Stoffe, Stearinsäure, Tristearin, Ölsäure, Triolein, Cholesterin, Cholesterinölsäureester und Lecithin, als typische Vertreter aus verschiedenen Gruppen von Fettstoffen, rein und in den verschiedensten Mischungen, zur Verwendung. Maßgebend für diese Auswahl waren die Erfahrungen, die wir in bezug auf das farberische Verhalten gewisser Fettstoffe in unseren früheren Versuchen gewonnen hatten. Es hatte sich herausgestellt, daß Palmitinsäure und Tripalmitin sich ebenso ver-

¹ Bei sämtlichen Ciaccio-Färbungen, sowohl an der Reinsubstanz wie auch an Organen wurde mit peinlicher Genauigkeit eine 48stündige Behandlung in der Ciaccio-Flüssigkeit I (Chrom-Essigsäure-Formaldehydgemisch) und eine 5 tägige in der 3 proz. Kaliumbichromatlösung durchgeführt.

hielten wie Stearinsäure und Tristearin. Daher glaubten wir, auf eine noch-malige Prüfung dieser Fettstoffe verzichten zu können. Dasselbe gilt von dem Cholesterinstearinsäureester, der das gleiche färberische Verhalten wie Tristearin aufwies. In den folgenden Tabellen führen wir zum Vergleich neben dem Ergebnis der Ciaccio-Färbung das der gewöhnlichen Sudanfärbung an.

Histochemische Prüfung chemisch reiner Fettmischungen in Holundermarkstücken von 5 mm Dicke.

Ciaccio-Färbung: Fixation in der Lösung Kalumbichromat-Formaldehyd-Essigsäure 48 Stunden.

3 proz. Kalumbichromatlösung 5 Tage!

Die Einwage der einzelnen Fettstoffe zu den untersuchten Mischungen geschah im gleichen Gewichtsverhältnis.

Tabelle 1. *Gesättigte Fettsäure und gesättigtes Triglycerid.*

	Sudan	Ciaccio
Stearinsäure	ungefärbt	ungefärbt
Tristearin	mattes Grau-gelb	ungefärbt
Stearinsäure und Tristearin	ungefärbt	ungefärbt

Tabelle 2. *Ungesättigte Fettsäure und ungesättigtes Triglycerid.*

	Sudan	Ciaccio
Ölsäure	goldgelb	goldgelb
Triolein	"	"
Ölsäure und Triolein	"	"

Tabelle 3. *Mischungen der Fettstoffe von Gruppe I und II.*

	Sudan	Ciaccio
Stearinsäure und Ölsäure	goldgelb	goldgelb
Tristearin und Triolein	"	"
Stearinsäure und Triolein	"	"
Ölsäure und Tristearin	"	"
Stearinsäure und Ölsäure und Tristearin	"	"
„ und Ölsäure und Triolein	"	"
„ und Ölsäure und Tristearin und Triolein	"	"

Tabelle 1 zeigt, daß gesättigte Fettsäuren und gesättigtes Triglycerid mit Sudan und mit Ciaccio in gleicher Weise unfärbbar sind.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß sich ungesättigte Fettsäure und ungesättigtes Triglycerid nach 48 stündiger Fixation und 5 tägiger Chromierung nach Ciaccio ausgezeichnet färben lassen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Lückenbindung, also der ungesättigte

Tabelle 4. Cholesterin rein und in Mischungen mit Fettsäuren und Triglyceriden.

	Sudan	Ciacio
Cholesterin	goldgelb	ungefärbt
„ und Stearinsäure	schwachgelb	“
„ und Ölsäure	goldgelb	goldgelb
„ und Tristearin	“	ungefärbt
„ und Triolein	“	goldgelb
„ und Stearinsäure und Tristearin	“	ungefärbt
„ und Stearinsäure und Triolein	“	goldgelb
„ und Stearinsäure und Ölsäure	“	“
„ und Ölsäure und Tristearin	“	“
„ und Ölsäure und Triolein	“	“
„ und Stearinsäure und Ölsäure und Tristearin	“	“
„ und Stearinsäure und Ölsäure und Triolein	“	“
„ und Stearinsäure und Ölsäure und Stearinsäure und Triolein	“	“

Tabelle 5. Lecithin rein und in Mischungen mit Fettsäuren und Triglyceriden.

	Sudan	Ciacio
Lecithin	goldgelb	goldgelb
„ und Stearinsäure	“	“
„ und Ölsäure	“	“
„ und Tristearin	“	ungefärbt
„ und Triolein	“	goldgelb
„ und Tristearin und Triolein	“	“
„ und Stearinsäure und Tristearin	“	ungefärbt
„ und Stearinsäure und Triolein	“	goldgelb
„ und Stearinsäure und Ölsäure	“	“
„ und Ölsäure und Tristearin	“	“
„ und Ölsäure und Triolein	“	“
„ und Stearinsäure und Ölsäure und Tristearin	“	“
„ und Stearinsäure und Ölsäure und Triolein	“	“
„ und Stearinsäure und Ölsäure und Tristearin und Triolein	“	“

Charakter der Ölsäure, Träger der Ciacio-Reaktion ist, eine Annahme, die in den Ergebnissen der

Tabelle 3 eine Stütze findet; denn wir finden hier, daß Mischungen von gesättigten und ungesättigten Fettstoffen stets positive Reaktionen ergeben.

In Tabelle 4 wird dieses Verhalten von gesättigten und ungesättigten Fettstoffen in Mischung besonders deutlich hervorgehoben. Mischungen von Cholesterin, das für sich allein ciaccionegetativ ist und sich wie ein gesättigter Fettstoff verhält, mit gesättigten Fettstoffen färben sich *nicht*, Mischungen von Cholesterin mit ungesättigten Fettstoffen nehmen hingegen den Farbstoff gut an.

Tabelle 6. Cholesterin und Lecithin in Mischungen mit Fettsäuren und Triglyceriden.

	Sudan	Ciaccio
Cholesterin und Lecithin	goldgelb	ungefärbt
" " " und Stearinsäure	"	goldgelb
" " " und Ölsäure	"	ungefärbt
" " " und Tristearin	"	goldgelb
" " " und Triolein	"	ungefärbt
" " " und Stearinsäure und Tri-	"	goldgelb
stearin	"	ungefärbt
" " " und Stearinsäure und Tri-	"	goldgelb
olein	"	ungefärbt
" " " und Stearinsäure und Öl-	"	goldgelb
säure	"	"
" " " und Ölsäure und Tristearin	"	"
" " " und Ölsäure und Triolein	"	"
" " " und Stearinsäure und Öl-	"	"
säure und Tristearin.	"	"
" " " und Stearinsäure und Öl-	"	"
säure und Triolein .	"	"
" " " und Stearinsäure und Öl-	"	"
säure und Tristearin	"	"
" " " und Triolein	"	"

Tabelle 7.

Cholesterinölsäureester rein und in Mischungen mit den Stoffen der vorhergehenden Gruppen.

	Sudan	Ciaccio
Cholesterinölsäureester	goldgelb	goldgelb
" und Stearinsäure	"	"
" und Ölsäure	"	"
" und Tristearin	"	"
" und Triolein	"	"
" und Cholesterin	"	"
" und Lecithin	"	"
" und Cholesterin und Stearin-	"	"
säure	"	"
" und Cholesterin und Ölsäure	"	"
" und Cholesterin und Tri-	"	"
stearin	"	"
" und Cholesterin und Triolein	"	"
" und Cholesterin und Lecithin	"	"
" und Cholesterin und Lecithin	"	"
und Tristearin	"	"
" und Cholesterin und Lecithin	"	"
und Triolein	"	"
" und Cholesterin und Lecithin	"	"
und Stearinsäure	"	"
" und Cholesterin und Lecithin	"	"
und Ölsäure	"	"

Aus Tabelle 5 geht hervor, daß reines Lecithin positiven Ausfall der Ciaccio-Färbung zeigt, weil es den Rest der Ölsäure enthält. *Die Anwesenheit gesättigter Fettstoffe kann die Färbung des Lecithins nach Ciaccio verhindern.*

In Tabelle 6 ist den Mischungen von Lecithin mit anderen Fettstoffen Cholesterin hinzugefügt, und hierbei verschwindet die Färbung wiederum in 3 Fällen. Daß es bei diesen Mischungen auf die relative Menge gesättigter und ungesättigter Fettstoffe ankommt, ist daran zu erkennen, daß Mischungen, die zwei unfärbbare Anteile und nur einen färbaren enthalten, negative Ergebnisse aufweisen. Die Chromierung wird im Reinversuche durch die Anwesenheit gesättigter Fettstoffe verhindert. Da im Gewebe die ungesättigten Fettstoffe überwiegen, ist dieser Befund für die Organverhältnisse außer acht zu lassen.

Der Ausfall unserer Versuche in Tabelle 7 bringt die Bestätigung, daß der Ölsäurerest die Färbung verursacht, denn freies Cholesterin ist nach Ciaccio nicht färbbar, aber Cholesterinölsäureester färbt sich in allen Mischungen genau so wie ungesättigtes Triglycerid.

Überblickt man das Ergebnis der vorstehenden histochemischen Untersuchungen, so drängt sich eine Einteilung der Fettstoffe in 2 Gruppen auf,

1. in *chromophile* Fettstoffe, die in ihrem Molekül eine Lückenbindung haben;

2. in *chromophobe*, die das Verhalten vollständig gesättigter organischer Stoffe zur Schau tragen; unter ihnen nimmt das Cholesterin, das nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse über seine Struktur auch eine Lückenbindung besitzt, eine Ausnahmestellung ein. Allerdings liegt diese Lückenbindung innerhalb eines 5-Kohlenstoffringes, so daß der ungesättigte Charakter dieser Bindung nicht so scharf hervorzutreten braucht.

Will man zur leichteren Orientierung auf färberischem Gebiete an der Einteilung in *chromophile* und *chromophobe* Fettstoffe festhalten, so muß man der Gruppe der *chromophilen* Fettstoffe Ölsäure, Triolein, Lecithin und Cholesterinölsäureester, ganz allgemein die Ölsäure und ihre Verbindungen, zuordnen. Der Gruppe *chromophober* Fettstoffe gehören Stearinsäure, Stearinsäureester, Palmitinsäure, Palmitinsäureester und Cholesterin an.

Aus den mitgeteilten Ergebnissen unserer histochemischen Untersuchungen geht hervor, daß bei genauerer Innehaltung der von Ciaccio angegebenen Vorschriften in 3—5 mm dicken, mit verschiedenen Fettstoffen beladenen Holundermarkstückchen (deren Größe den gewöhnlichen zur Untersuchung gelangenden Organstücken entspricht), sämtliche Fettstoffe, mit Ausnahme des Cholesterins und der gesättigten Triglyceride, positive Färbungen eingehen.

Chemische Untersuchung.

Nachdem wir uns in dem vorhergehenden Abschnitt zur Prüfung der Ciaccio-Färbung der histochemischen Untersuchung an Reinsubstanzen bedienten, haben wir uns in dem folgenden chemischen Teile bemüht, mit Hilfe chemischer Analysen von ciacciobehandelten, chemisch reinen Fettstoffen und von Organen eine Reihe von Teilfragen, die für die Beurteilung des Ciaccio-Prozesses von Bedeutung sind, und auf die wir bei der Besprechung des Verfahrens eingehend eingegangen sind, zu bearbeiten.

Es sei an dieser Stelle nochmals kurz eingefügt, daß wir die Ciaccio-Methode nur dann für den *Lipoidnachweis* als spezifisch anerkennen können, wenn der Nachweis gelingt, daß während des Verfahrens die Fettstoffe, die nicht zur Gruppe der Lipoide zu rechnen sind, völlig durch die organischen Lösungsmittel (Alkohol, Xylol) entfernt werden (s. S. 366). Andernfalls ist eine Unterscheidung von Lipoiden und anderen Fettstoffen unmöglich. Wir erwähnen, daß die chemische Untersuchung ciacciobehandelter Organe mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft ist, um damit zu erklären, daß diese Untersuchungen auf eine unbedingte Vollständigkeit vorläufig keinen Anspruch machen sollen. Sie genügen aber, um zu der uns beschäftigenden Frage der Spezifität des Verfahrens auch vom chemischen Standpunkte Stellung nehmen zu können. Wir haben uns folgende Fragen vorgelegt.

1. Werden die Lipoide durch die Ciaccio-Methode vollständig fixiert?

2. Werden die Fettstoffe, welche nicht zu den Lipoiden im engeren Sinne zählen, während des *Ciaccio*-Verfahrens restlos entfernt? (Andernfalls müssen sie positive Färbungen ergeben, da sich Sudan in ihnen löst.)

3. Auf welchem Wege wirkt die Chrombehandlung auf die Fettstoffe?

Als Hauptvertreter der uns angehenden Lipoide ist Lecithin zu betrachten. Seine chemische Bestimmung gründet sich auf seinem Gehalt an *organischem Phosphor*, der als P_2O_5 analysiert wird. Da im Organ gewisse Mengen organischen Phosphors nicht lipoiden organischen Verbindungen angehören, mußte die Fixationswirkung der Ciaccio-Methode zuerst an der chemischen Reinsubstanz, und zwar an Lecithin geprüft werden. Erst nachdem an der ciacciobehandelten Reinsubstanz gefunden war, daß Lecithin nur unvollständig fixiert wird, durfte man aus den Befunden vergleichender Extraktion von frischen und nach *Ciaccio* fixierten Organen schließen, daß ein Teil des durch die Ciaccio-Methode aus dem Organ entfernten organischen Phosphors von Lipoiden herrührt.

Auch die zweite Frage, deren Bedeutung für die Beurteilung des Ciaccio-Verfahrens wir genügend gewürdigt haben, war nur nach vorher-

gehenden Untersuchungen an der Reinsubstanz zu entscheiden. Die Feststellung, daß 53 % des in Holundermark aufgenommenen Trioleins nach der Ciaccio-Behandlung im Holundermark zurückbleiben, berechtigt zu der Annahme, daß dies im Organ mit seiner noch feineren Struktur zu einem höheren Prozentsatze der Fall sein dürfte.

Die Lösung der dritten Frage war nur durch Paralleluntersuchungen von Reinsubstanzen und von Organen möglich. Da an der Reinsubstanz durch Isolierung von Spaltprodukten gezeigt werden konnte, welche chemische Wirkung die Chrombehandlung auf Lipoide ausübt, und wir nach Ciaccio-Behandlung von Organen dieselben Spaltprodukte nachgewiesen haben, so dürfen wir annehmen, daß die Chromverbindungen auf die Lipoide im Organ dieselbe Wirkung ausüben wie auf Lipoide im Modellversuche.

A. Untersuchungen an Reinsubstanzen im Holundermark.

Zu Frage 1 und 2: Wird Lecithin durch die Ciaccio-Behandlung vollständig fixiert? Werden andere Fettstoffe durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln restlos ausgezogen?

Zuerst wurde Lecithin in Holundermark gebracht und das gefüllte Mark (wiederum unter peinlichster Innehaltung der von Ciaccio gegebenen Vorschriften, s. S. 373) der Ciaccio-Behandlung unterworfen. Nach den theoretischen Anschauungen, die Ciaccio seinem Verfahren zugrunde legt, durfte sich aus dem behandelten Mark kein Lecithin bzw. kein organischer Phosphor ausziehen lassen. Das Lecithin mußte durch die Chrombehandlung fixiert sein. *Die Untersuchung ergab, daß sich beträchtliche Mengen Lecithin aus dem behandelten Holundermark ausziehen lassen.*

Es ist hieraus der Schluß zu ziehen, daß ein Teil des Lecithins unfixiert bleibt.

Es sei an dieser Stelle auf die Bedeutung des Lösungsmittels für den Erfolg der Extraktion hingewiesen. Für die Extraktion des zu den Versuchen benutzten Lecithins konnten nur Lösungsmittel verwandt werden, in denen dieser Fettstoff in reinem Zustande leicht löslich ist, also Chloroform und Alkohol. Gegen die Wahl von Chloroform könnte der Einwand erhoben werden, daß dieses Lösungsmittel beim Ciaccio-Verfahren nicht gebraucht wird. Für den Modellversuch aber ist es grundsätzlich gleichgültig, welches der beiden genannten Extraktionsmittel zur Anwendung gelangt, weil es sich nur darum handelt, festzustellen, ob das vom Holundermark aufgenommene Fett durch die Ciaccio-Methode vollständig fixiert und dadurch in organischen Lösungsmitteln unlöslich gemacht wird. Für die Untersuchungen am Organ kam nur Alkohol zur Verwendung, weil sich die Organuntersuchungen streng an die Vorschriften des von Ciaccio angegebenen Originalverfahrens anschließen mußten. Daß der Wert der Untersuchung an der Reinsubstanz durch die Wahl des Extraktionsmittels keine Einbuße erlitten hat, geht aus den später mitgeteilten Organanalysen hervor, die ergeben, daß die beim Ciaccio-Verfahren angewandte Alkoholbehandlung ebenfalls imstande ist, Lipoide auszuziehen.

Beschreibung der Versuche.

Es wurden drei Parallelversuche angesetzt. Die für alle drei Versuche zur Füllung des Holundermarks gebrauchte Chloroformlösung enthielt 0,3807 g Lecithin.

1. Versuch: 0,0936 g Holundermark wurden in angegebener Weise gefüllt und zeigten nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz ein Gewicht von 0,1106 g. Es hatte also um 0,0170 g zugenommen. Nach der Ciaccio-Behandlung wurde mit Chloroform erschöpfend extrahiert und auf 100 ccm aufgefüllt.

Lecithinbestimmung vom Auszug: Zur Bestimmung des Lecithingehaltes des 100 ccm umfassenden Extraktes wurden 25 ccm entnommen, das Chloroform verdampft, der Rückstand verascht, neutralisiert und auf 75 ccm aufgefüllt. 10 ccm dieser Lösung gaben mit Strychninreagens keine Trübung. Die Bestimmung wurde darauf 2 mal mit je 20 ccm wiederholt.

a) Ablesungsmittel: 20,4;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0147;	Verdünnung: 3,75- und 4fach;
gefunden: 0,2204 mg P ₂ O ₅ ;	entsprechend: 2,52 mg Lecithin.
b) Ablesungsmittel: 19,3;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0155;	Verdünnung: 3,75- und 4fach;
gefunden: 0,2332 mg P ₂ O ₅ ;	entsprechend: 2,64 mg Lecithin.

Mittel beider Bestimmungen: 2,6 mg Lecithin.

Lecithinbestimmung vom extrahierten Holundermark: Das extrahierte Holundermark wurde, nachdem es vom Chloroform befreit worden war, verascht und nach dem Neutralisieren auf 10 ccm aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden je 5 ccm zu 2 Bestimmungen entnommen.

a) Ablesungsmittel: 16,0;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,01875;	Verdünnung: 20fach;
gefunden: 0,375 mg P ₂ O ₅ ;	entsprechend: 4,25 mg Lecithin.
b) Ablesungsmittel: 16,2;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0185;	Verdünnung: 20fach;
gefunden: 0,370 mg P ₂ O ₅ ;	entsprechend: 4,20 mg Lecithin.

Mittel aus beiden Bestimmungen: 4,2 mg Lecithin. Summe von ausziehbarem (2,6 mg) und nicht ausziehbarem (4,2 mg): 6,8 mg Lecithin.

2. Versuch: 0,1263 g Holundermark hatten nach Füllung und Trocknung um 0,0445 g zugenommen. Nach der Ciaccio-Behandlung wurde wieder mit Chloroform extrahiert und auf 100 ccm aufgefüllt.

Lecithinbestimmung vom Auszug: Zur Ermittlung des extrahierbaren Lecithins wurden 25 ccm des Gesamtauszuges verdampft, verascht, neutralisiert und auf 75 ccm aufgefüllt. Davon wurden 2 mal je 10 ccm zur Bestimmung entnommen.

a) Ablesungsmittel: 19,3;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0155;	Verdünnung: 4- und 7,5fach;
gefunden: 0,466 mg P ₂ O ₅ ;	entsprechend: 5,29 mg Lecithin.
b) Ablesungsmittel: 19,5;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0154;	Verdünnung: 4- und 7,5fach;
gefunden: 0,462 mg P ₂ O ₅ ;	entsprechend: 5,23 mg Lecithin.

Mittel aus beiden Bestimmungen: 5,2 mg Lecithin.

Lecithinbestimmung vom extrahierten Holundermark: Die anschließend erfolgte Veraschung des wieder getrockneten und extrahierten Markes ergab nach Auffüllung auf 100 ccm und Entnahme von 4 ccm folgende Werte.

- a) Ablesungsmittel: 7,1; bei Vergleichsstellung: 10;
 P_2O_5 -Faktor: 0,0422; Verdünnung: 25fach;
 gefunden: 1,056 mg P_2O_5 ; entsprechend: 11,98 mg Lecithin.
 b) Ablesungsmittel: 7,4; bei Vergleichsstellung: 10;
 P_2O_5 -Faktor: 0,0405; Verdünnung: 25fach;
 gefunden: 1,013 mg P_2O_5 ; entsprechend: 11,50 mg Lecithin.

Mittel aus beiden Bestimmungen: 11,7 mg Lecithin. Summe von ausziehbarem (5,2 mg) und nicht ausziehbarem (11,7 mg) Lecithin: 16,9 mg.

3. Versuch: 0,1316 g Holundermark enthielten nach Füllung, Trocknung und Wägung 0,229 g Lecithin. Nach Ciaccio-Behandlung erfolgte Chloroformextraktion und Auffüllung auf 100 ccm.

Lecithinbestimmung vom Auszug: Die Bestimmung des Lecithins im Extrakt geschah mit 25 ccm des 100 ccm betragenden Gesamtvolumens durch Veraschung und Auffüllung auf 100 ccm. Davon wurden 2 mal je 25 ccm zur Bestimmung verwendet.

- a) Ablesungsmittel: 16,8; bei Vergleichsstellung: 10;
 P_2O_5 -Faktor: 0,0180; Verdünnung: 16fach;
 gefunden: 0,288 mg P_2O_5 ; entsprechend: 3,27 mg Lecithin.
 b) Ablesungsmittel: 16,5; bei Vergleichsstellung: 10;
 P_2O_5 -Faktor: 0,0182; Verdünnung: 16fach;
 gefunden: 0,291 mg P_2O_5 ; entsprechend: 3,20 mg Lecithin.

Mittel aus beiden Bestimmungen: 3,3 mg Lecithin.

Lecithinbestimmung vom extrahierten Holundermark: Nach Veraschung des getrockneten und extrahierten Holundermarkes wurde neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. Davon wurden 2 mal je 5 ccm verwendet.

- a) Ablesungsmittel: 10,0; bei Vergleichsstellung: 10;
 P_2O_5 -Faktor: 0,0300; Verdünnung: 20fach;
 gefunden: 0,6 mg P_2O_5 ; entsprechend: 6,8 mg Lecithin.
 b) Ablesungsmittel: 10,1; bei Vergleichsstellung: 10;
 P_2O_5 -Faktor: 0,0297; Verdünnung: 20fach;
 gefunden: 0,594 mg P_2O_5 ; entsprechend: 6,74 mg Lecithin.

Mittel aus beiden Bestimmungen: 6,8 mg Lecithin. Summe von ausgezogenem (3,3 mg) und durch Veraschung gefundenem Lecithin (6,8 mg): 10,1 mg Lecithin.

Zur besseren Übersicht seien die Ergebnisse der drei Versuche in Tabellenform zusammengestellt:

Aus lecithinbeschicktem, nach Ciaccio behandeltem Holundermark		
	lässt sich Lecithin durch Chloroform extrahieren	ist von Lecithin nicht extrahierbar, also nach Ciaccio fixiert
Versuch 1	38%	62%
Versuch 2	31%	69%
Versuch 3	33%	67%

Aus der Tabelle geht hervor, daß ein bedeutender Teil des aufgenommenen *Lecithins*, etwa $\frac{1}{3}$, nach der Ciaccio-Behandlung durch organische Lösungsmittel ausziehbar, also *nicht* im Sinne Ciaccios als fixiert zu betrachten ist.

Übertragen wir diese Ergebnisse auf den Organschnitt, so ergibt sich, daß auch hier wahrscheinlich ein Teil des unfixierten Lecithins

durch die organischen Lösungsmittel (Alkohol, Xylol) entfernt wird. Das bedeutet, daß durch die Ciaccio-Färbung vermutlich auch im Organschnitt weniger Lecithine zur Darstellung gelangen können, als es mit anderen Färbungen der Fall ist, bei denen eine langdauernde Behandlung mit Alkohol unterbleibt (z. B. Färbung nach *Smith-Dietrich*).

Werden die Fettstoffe, die nicht zu den Lipoiden im engeren Sinne zählen, während des Ciaccio-Verfahrens restlos entfernt?

Für die Beurteilung des Ciaccio-Verfahrens ist die Frage, ob die nicht zu den Lipoiden gehörenden Fettstoffe restlos aus dem behandelten Organ beseitigt werden, von entscheidender Bedeutung. Die Methode stützt sich auf die Annahme, daß die Fettstoffe, die nicht zu den Lipoiden zählen, aus dem Gewebe durch die Alkohol-Xylol-Behandlung entfernt werden. Wir haben schon mehrmals darauf hingewiesen, daß — falls die Annahme *Ciaccios* nicht zutrifft — diese Fettstoffe bei Verwendung von Sudan gefärbt werden müssen. Da Triolein bei den Färbeversuchen (s. histochemischer Teil) positive Färbung nach *Ciaccio* ergeben hatte, haben wir dieses ungesättigte Neutralfett zu unseren Versuchen benutzt. Ein weiterer Grund für die Verwendung von Triolein liegt darin, daß dieser Stoff im menschlichen Fettstoffwechsel die Hauptrolle spielt. Jede Körperzelle enthält Neutralfette, die zum größten Teil aus Triolein bestehen, also auch die in erster Linie mit Hilfe des Ciaccio-Verfahrens untersuchten parenchymatösen und innersekretorischen Organe. Das menschliche Fettgewebe besteht bis zu 85% aus *Triolein*.

Der positive Ausfall der Färbungen bei Anwesenheit von Triolein im Modellversuch zeigt, daß Triolein durch das Ciaccio-Verfahren nicht entfernt wird.

Wir konnten durch die chemische Untersuchung den Nachweis erbringen, daß im Holundermark, das mit Triolein beschickt und nach Ciaccio behandelt wurde, erhebliche Mengen Triolein, und zwar 53% der zum Versuche verwandten Menge zurückbleiben.

Die Färbeversuche hatten weiterhin einen Hinweis auf die Bedeutung des ungesättigten Charakters der Fettstoffe für den positiven Ausfall der Färbungen geliefert, und wir mußten daher der Frage nachgehen, ob sich bei der Behandlung von Triolein nach dem Ciaccio-Verfahren ein ungesättigter Stoff absapltet, der für die Färbung verantwortlich zu machen ist.

Es ist der Nachweis gelungen, daß sich während der Ciaccio-Behandlung von Triolein Ölsäure bildet.

Es wurde bei diesen Extraktionsversuchen die lehrreiche Tatsache beobachtet, daß Triolein nach der Ciaccio-Behandlung dunkelbraun

gefärbt und harzig wird. Daraus ist ersichtlich, daß das Triolein Veränderungen erfahren hat, welche seine unvollständige Extrahierbarkeit bei der Ciaccio-Behandlung erklären. Die zähe Konsistenz, die das Triolein durch die Ciaccio-Behandlung annimmt, macht diesen Stoff in organischen Lösungsmitteln schwer löslich. *Der Vorgang, der als oxydative Verharzung aufzufassen ist, der sämtliche ungesättigte Fettstoffe unterliegen, dürfte für die Deutung der Ciaccio-Färbung auch im Gewebe von einer gewissen Bedeutung sein, da anzunehmen ist, daß auch hier ungesättigte Fettstoffe durch die Ciaccio-Behandlung schwerer in organischen Lösungsmitteln löslich werden.*

Da durch diese Untersuchungen gezeigt wird, daß Fettstoffe, die nicht zu den Ciaccio-Lipoiden zu rechnen sind, nur teilweise durch die Alkohol-Xylol-Behandlung im Modellversuche entfernt werden, so ist anzunehmen, daß auch im Organschnitt störenderweise durch die Anwendung der Sudanfärbung im Verfahren nach Ciaccio Stoffe dargestellt werden, die nicht zu den Lipoiden im Sinne Ciaccios zählen.

Beschreibung der Versuche.

Ciaccio-Behandlung von Triolein im Holundermark.

Triolein spaltet bei der Ciaccio-Behandlung Ölsäure ab und wird nur zum Teil entfernt.

Die Untersuchung geschah in folgender Weise:

6,6 g Holundermarkstücke wurden mit einer Lösung von 25 g Triolein in Chloroform übergossen und in der üblichen Weise gefüllt. Nach dem Trocknen im Exsiccator betrug das Gewicht des mit Triolein gefüllten Markes 14,1 g. Es hatte also 7,5 g Triolein aufgenommen. Das Mark wurde nunmehr der Ciaccio-Behandlung unterworfen. Nach der Einwirkung der beiden Chromierungsbäder und nach der Wässerung hatte das Holundermark seine Farbe nicht verändert. Dem äußeren Anschein nach war keine Chromierung eingetreten. Die darauf folgende Behandlung mit Alkohol zeigte, daß dabei erhebliche Mengen Triolein entfernt wurden, denn der abgegossene Alkohol trübte sich auf Zusatz von Wasser unter langsamer Absetzung von Öltropfen. Nach der Aufbewahrung im Xylol wurde abgegossen und mehrere Tage unter Vakuum gehalten, um die größte Menge des anhaftenden Xylools abzusaugen. Darauf wurde das Holundermark in einem Schütteltrichter getan und 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Das auf dem Wasserbade abdestillierte Chloroform hinterließ einen Rückstand, der stark xylolhaltig war. Das Xylol ließ sich wegen seines hohen Siedepunktes auf dem Wasserbade nicht vertreiben. Die fetthaltige Xylollösung wurde daher durch Destillation über freier Flamme vom Xylol befreit. Es wurde bis 160° destilliert, wonach alles Xylol übergegangen war und das zurückbleibende Fett sich zu zersetzen begann. Die zurückbleibende Fettmenge wog 4 g. Sie wurde zur Feststellung, ob während der Ciaccio-Behandlung auch Ölsäure abgespalten war, mit Sodalösung verrührt. Das entstandene Gemisch wurde 3 mal mit Petroläther ausgeschüttelt, die ausgeschüttete Sodalösung mit Salzsäure angesäuert. Bei Anwesenheit von Ölsäure in der Lösung hätte sofort Trübung eintreten müssen. Da dies nicht erfolgte, war in der Sodalösung keine Ölsäure vorhanden.

Die Petrolätherlösung hatte nach dem Stehen über Nacht eine Gallerte abgesetzt. Sie wurde abfiltriert und löste sich unter starkem Schäumen im Wasser.

Sie bestand aus Natriumoleat, das offenbar kolloidal in den Petrolätherauszug übergegangen war. Zur Identifizierung wurde das Oleat mit Salzsäure angesäuert, und die freigemachte Säure mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung addierte Brom. Daraus ist zu schließen, daß während der Ciaccio-Behandlung aus dem Triolein zum Teil Ölsäure entstanden war. Ein Teil der nachgewiesenen Ölsäure kann durch das Erhitzen auf 160° entstanden sein. Bei der kurzen Einwirkungsdauer der Erhitzung konnte diese Menge nur gering sein und nicht den großen, von uns nachgewiesenen Mengen entsprechen.

Ein Teil der Petrolätherlösung wurde mit einer Lösung von Brom in Petroläther versetzt. Das Brom wurde gierig verschluckt. Der andere Teil der Petrolätherlösung wurde abdestilliert und das zurückbleibende Triolein, das infolge der oxydierenden Wirkung des Bichromats braun gefärbt war, zeigte beim Erhitzen durchdringenden Akroleingeruch, das charakteristische Kennzeichen der Triglyceride. Das Triolein war also zum größten Teil nach der Ciaccio-Behandlung unverändert geblieben. Da vom Holundermark aus der Chloroformlösung ursprünglich 7,5 g aufgenommen und nach der Ciaccio-Behandlung und Extraktion 4 g wiedergewonnen worden waren, mußten 3,5 g oder rund 47% während der Ciaccio-Behandlung verlorengegangen sein.

Nachdem in den vorhergehenden Modellversuchen durch Prüfung von Reinsubstanzen gezeigt werden konnte, daß

1. die Lipoide im Sinne Ciaccios, von denen wir als Hauptvertreter Lecithin prüften, durch die Ciaccio-Methode nur unvollständig fixiert werden (von Lecithin werden fixiert 60—70%);

2. die Fettstoffe, die nicht zu den Lipoiden zählen, während des Ciaccio-Verfahrens nur zum Teil entfernt werden (53% Triolein werden nicht ausgezogen),

sind wir zur Beantwortung der dritten Frage übergegangen. Wir hofften durch die Feststellung, wie die Chrombehandlung auf die Lipoide wirkt, einen Einblick in den Chemismus des Ciaccio-Prozesses zu gewinnen und damit gleichzeitig die Frage der Möglichkeit einer elektiven Färbung gewisser Fettstoffe zu beantworten.

Die färberischen Ergebnisse deuteten darauf hin, daß der ungesättigte Charakter der Ölsäure die Fixierung im Verfahren nach Ciaccio verursacht. Da Lecithin den Rest der Ölsäure enthält, war zu vermuten, daß dieser Ölsäurerest während der Ciaccio-Behandlung abgespalten und chromiert wird. Wir haben uns bemüht, den Nachweis der Richtigkeit dieser Anschauung durch den folgenden Versuch zu erbringen.

Nachweis von Ölsäure als Spaltprodukt des Lecithins nach Ciaccio-Behandlung.

Es wurde geprüft, ob bei der Ciaccioeinwirkung auf lecithinbeschicktes Holundermark Ölsäure als Spaltprodukt des Lecithins auftritt, um eine Stütze für unsere Ansicht zu finden, daß der ungesättigte Charakter der Ölsäure Träger der Ciaccio-Reaktion ist. Die Ausführung des Versuches geschah folgendermaßen:

Wir füllten Holundermarkstücke durch Evakuieren mit einer lecithinhaltigen Chloroformlösung. Das lecithinbeladene, vom Chloroform getrocknete Holunder-

mark wurde gewogen. Es hatte um genau 2 g zugenommen und wurde nunmehr nach der Ciaccio-Methode behandelt. Nach Verdunsten des noch anhaftenden Xylols aus der letzten Phase der Ciaccio-Behandlung wurde das Holundermark in möglichst kleine Stücke zerschnitten, mit verdünnter Salzsäure übergossen und auf dem Wasserbade so lange gelinde erwärmt ($50-60^\circ$), bis die Stücke sich benetzen und untersanken. Der entstandene Brei wurde in einen Schütteltrichter übergeführt, 3 mal ausgeäthert, die ätherische Lösung filtriert, mit Natriumsulfat getrocknet, und der Äther auf dem Wasserbade abgedampft. Als Rückstand blieb ein braunes Öl, das noch stark nach Xylol roch, zu dessen Entfernung das Öl mit Sodalösung übergossen wurde. Es schied sich sofort fettsaures Natrium ab, das in der wässrigen Sodalösung suspendiert blieb. Zur Entfernung des Xylols wurde 3 mal mit Äther ausgeschüttelt. Die vom Xylol befreite Suspension wurde wieder mit Salzsäure angesäuert und 3 mal mit Äther ausgeschüttelt, wobei sich die Fettsäuren im Äther lösten. Die ätherische Lösung wurde abgegossen und filtriert, ein Teil davon mit ätherischer Bromlösung versetzt, die sich sofort entfärbte. Ein anderer Teil wurde mit schwefelsaurer Kaliumpermanganatlösung unterschichtet, beim Umschütteln trat sofort Entfärbung ein.

Dadurch war die Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren bewiesen.

Der Rest der ätherischen Lösung wurde verdunstet und hinterließ wieder braunes Öl, das in Wasser unlöslich war, aber keine Quellung und keinen Lecithingeruch zeigte. Eine veraschte Probe gab keine Trübung mit Strychninreagens, *ein Beweis, daß kein unversehrtes Lecithin mehr vorhanden sein konnte.*

Wir betrachten das Ergebnis dieses Versuches als einen weiteren Beweis dafür, daß die Träger der Ciaccio-Reaktion Stoffe mit Lückenbindung sind, deren Hauptvertreter die Ölsäure ist. Auf die Verhältnisse im Gewebe übertragen, bedeutet dies, daß bei Vorhandensein von Lecithin eine Färbung infolge Abspaltung und Chromierung der Ölsäure eintritt.

Das Entscheidende für den positiven Ausfall der Ciaccio-Färbung bei der Anwesenheit von Lecithin ist das Vorhandensein des Ölsäurerestes im Lecithinmolekül.

Nach den Versuchen, die wir mit Triolein anstellten, ist der Rückschluß zu ziehen, daß sämtliche Fettstoffe, die den Rest der Ölsäure enthalten, positive Färbung nach Ciaccio ergeben.

Für die spätere Organuntersuchung ist der Nachweis bedeutungs- voll, daß nach Ciaccio-Behandlung von Lecithin kein unversehrtes Le- cithin mehr nachweisbar ist.

B. Untersuchungen an Organen¹.

Nachdem durch die chemische Analyse an der Reinsubstanz festgestellt worden war, daß Fettstoffe, die der Gruppe der Lipoide im engeren Sinne angehören, darunter Lecithin, trotz der Behandlung nach Ciaccio zu einem beträchtlichen Prozentsatze durch organische Lösungsmittel

¹ Zu sämtlichen Organuntersuchungen wurden Leberstücke frisch getöteter Kaninchen verwandt, um Störungen der Reaktion durch postmortale Zersetzungsvorgänge zu vermeiden.

extrahierbar sind, also bei Anwendung von Alkohol und Xylol im histo-
logischen Verfahren entfernt und damit der Färbung entzogen werden,
haben wir diesen Befund an Organen nachgeprüft.

Nach den histochemischen und chemischen Untersuchungen an der Reinsubstanz ist für die Spezifität des Ciaccio-Verfahrens zum Nach-
weis bestimmter Fettstoffe die Frage entscheidend, ob die schwer
chromierbaren Fettstoffe, nach unseren Ergebnissen die färbaren ölsäure-
haltigen Verbindungen, entfernt werden. Eine Prüfung dieser
Frage am ciaccio behandelten Organ mußte aus technischen Rück-
sichten unterbleiben. Eine Bestimmung von Triolein als dem Haupt-
vertreter ungesättigter Triglyceride ist nur nach Verseifung zu Ölsäure
möglich. Um diese Ölsäure als Bestandteil von Triglyceriden sicher zu
charakterisieren, ist es notwendig, sie von anderen ölsäurehaltigen Fett-
stoffen, z. B. Lecithin zu trennen. Diese Trennung gelingt im ciaccio-
behandelten Organ nicht, weil Lecithin Ölsäure abspaltet. Wir mußten
uns daher begnügen, durch die Organuntersuchung folgende Fragen
zu klären.

a) Wird der organisch gebundene Phosphor¹, d. h. Lipoidphosphor,
durch das Ciaccio-Verfahren im Organ vollständig fixiert?

b) Läßt sich durch Isolierung der beim Ciaccio-Verfahren entstehenden
Reaktionsprodukte ein Hinweis auf den Chemismus dieses Färbevor-
ganges gewinnen?

a) Untersuchungen an ciacciofixierten Organen.

Bei Auswertung der Versuche zur Beantwortung der ersten Frage
war zu berücksichtigen, daß jedes Organ neben organisch gebundenem
Phosphor¹ auch anorganisch gebundenen in Form von Phosphaten ent-
hält. Die Trennung des organisch gebundenen Phosphors von dem
anorganisch gebundenen läßt sich bekanntlich im nichtfixierten Organ
durch Ausziehen des Organpulvers mit Alkohol herbeiführen. Da die
Wirkung des Ciaccio-Verfahrens darin besteht, die alkohollöslichen orga-
nischen Phosphorverbindungen, in erster Linie die phosphorhaltigen

¹ Die Bestimmung des Lecithins gründet sich auf seinen Gehalt an Phosphor.
Unter Gesamtphosphor ist die Summe von organisch gebundenem und anorganisch
gebundenem Phosphor zu verstehen.

Organischer Phosphor vorwiegend = Lipoidphosphor.

Anorganischer Phosphor = Phosphate.

Die Trennung von organischem und anorganischem Phosphor gelingt durch Alkohol-
extraktion des getrockneten Organpulvers. Beispiel: Leber wird getrocknet und
pulverisiert, aus dem Organpulver durch Alkoholextraktion der organisch gebundene
Phosphor herausgezogen. Der anorganisch gebundene Phosphor bleibt im extra-
hierten Organpulver zurück. Bestimmung des organisch gebundenen Phosphors
im Alkoholextrakt, des anorganisch gebundenen im Organpulver, beide nephelo-
metrisch nach der Kleinmannschen Methode. Der Phosphorgehalt wird bei dieser
Methode als P_2O_5 angegeben.

Lipoide in eine alkoholunlösliche Form überzuführen, war eine Trennung des organisch gebundenen vom anorganisch gebundenen Phosphor im ciacciobehandelten Organ nur soweit möglich, als der organisch gebundene Phosphor nicht alkoholunlöslich geworden war. Durch vergleichende Untersuchungen des in nichtfixierter Leber bestimmten Gehaltes an organischem und anorganischem Phosphor ließ sich der fixierte Anteil des organisch gebundenen Phosphors in der Ciaccio-Leber ungefähr errechnen. Nach Alkoholextraktion des ciacciobehandelten Organs mußte sich in dem Organrückstand ein Mehr von nichtausziehbarem Phosphor finden, das von dem in eine alkoholunlösliche Form übergeführten organischen Phosphor herrühren mußte.

Für die Organuntersuchung erwies sich eine Teilung des Ciaccio-Verfahrens in zwei Abschnitte als zweckmäßig. Der erste Anteil umfaßt nur die Einwirkung der Kaliumbichromatbäder (Bichromat-Essigsäure-Formaldehyd-Gemisch und 3 proz. Kal.-Bichrom.-Lösung), der zweite den ganzen Ciaccio-Prozeß einschließlich der Alkohol-Xylol-Behandlung. Diese Teilung wurde vorgenommen, weil es auf diese Weise möglich war, die ausziehende Wirkung der einzelnen Staffeln des Verfahrens zu bestimmen. Es war daher notwendig, zuerst festzustellen, ob und wie weit eine Veränderung des Gesamtphosphorgehaltes nach der Fixation des Organs in den Kaliumbichromatbädern eintritt. Zuerst mag es verwunderlich erscheinen, daß wir die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß die alleinige Behandlung des Organs in den Fixations- und Chromierungsgemischen imstande ist, dem Organ gewisse Mengen Gesamtphosphor zu entziehen. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen über die Wirkung der gebräuchlichen Formollösungen haben uns gezeigt, daß mit Regelmäßigkeit bei Behandlung eines Organs mit Formollösung der Gesamtphosphorgehalt des fixierten Organs gegenüber dem gleichen nichtfixierten Organ abnimmt. Diese mit Hilfe der chemischen Analyse gewonnenen Befunde bilden eine Ergänzung der Untersuchungen von *Hammar*, der als erster durch Wägung getrockneter zur Fixierung verwandter, Formalinrückstände die extrahierende Wirkung des Formalins auf Lipoidstoffe im Organ festgestellt hat (s. auch *L. Pick*, der feststellt, daß Lipoide bereits bei Formalinbehandlung der Organe nach einigen Tagen in Lösung gehen). *Für die ciacciobehandelte Leber konnten wir in dem später als Beispiel mitgeteilten Versuche¹ feststellen, daß der Gehalt an Gesamtphosphor durch die Behandlung in den Chrombädern gegenüber der gleichen unfixierten frischen Leber um 20% abnimmt.* Die frische Leber enthielt 20,52 mg P₂O₅ als Gesamtphosphor auf 1 g Organ, die ciacciofixierte nur 16,31 mg P₂O₅ als Gesamtphosphor.

Weiterhin erwies sich die Teilung des Ciaccio-Verfahrens in zwei

¹ Die Versuche wurden an 4 verschiedenen Lebern durchgeführt. Der Raumersparnis wegen wird immer nur das Ergebnis einer Versuchsreihe mitgeteilt.

Abschnitte als zweckmäßig, weil die Ergebnisse unserer Untersuchungen am völlig ciaccio behandelten Organ zeigten, daß in die Alkohol- und Xylolbäder nach Fixierung und Chromierung noch organischer Phosphor übergeht, also aus dem Organ ausziehbar ist. Es mußte also ein Teil des im Organ befindlichen, organischen Phosphors durch das Ciaccio-Verfahren nicht in eine unlösliche Form gebracht worden sein. Die Menge dieses ausziehbaren Phosphors schwankt in den einzelnen Versuchen an den gleichen Organen verschiedener Kaninchen. Um sie in einer möglichst von Schwankungen freien Form, wie sie bei dem histologischen Verfahren durch Temperatureinflüsse und die verschiedene Dauer der Behandlung in den Alkohol- und Xylolbädern unvermeidlich sind, zu bestimmen, haben wir nach der Kalium-Bichromatbehandlung Organstücke im Soxhlet mit Alkohol extrahiert. Wir konnten nun genau bestimmen, welche Menge organischen Phosphors nach der Ciaccio-Fixation noch in organischen Lösungsmitteln löslich war. Die bei der Organeinbettung verwandten Bäder stellen naturgemäß ein milderes Verfahren dar als die Soxhlet-Extraktion, und wir möchten das Ergebnis unseres Versuchs auch nur dahin werten, daß er uns genau zeigt, wieviel organischer Phosphor nach Ciaccio-Behandlung unfixiert zurückbleibt, also möglicherweise ausziehbar ist.

Durch Alkoholextraktion ließen sich aus 1 g ciacciofixierten Organs 2,92 mg P₂O₅ ausziehen, das sind 32,2 % des organischen Phosphorgehaltes der gleichen unfixierten Leber.

Es wurde also zuerst gezeigt, daß die Kalumbichromatbäder 20% des Gesamtphosphors entziehen, weiterhin, daß nach der Kalumbichromatbehandlung noch alkohollöslicher organischer Phosphor im Gewebe vorhanden ist. Hiermit war erwiesen, daß der organische Phosphor durch Ciaccio-Behandlung nicht vollständig im Organ fixiert wird. Wir haben uns dann bemüht festzustellen, wieviel organischer Phosphor in eine alkoholunlösliche Form übergeführt wird. Leider stößt eine in Prozentzahlen ausgedrückte Berechnung des im Organ fixierten lipoiden Phosphors auf große Schwierigkeiten. Wir sahen, daß 20% des Gesamtphosphors in die Chrombäder übergehen. Zu einer exakten Bestimmung des im ciacciofixierten Organ verbliebenen, in eine alkoholunlösliche Form übergeföhrt, früher organischen Phosphors hätten wir wissen müssen, wie sich die durch die Kalumbichromatbäder ausgezogenen 20% Gesamtphosphor auf organischen und anorganischen Phosphor verteilen. Das war nicht möglich, weil die organischen Phosphorverbindungen bei ihrem Übertritt in die Chrombäder Veränderungen erleiden, die ihre Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und somit ihre analytische Erfassung unmöglich machen.

Um die Werte des fixierten organischen Phosphors, also des für das Ciaccio-Verfahren bedeutungsvollen, wenigstens annähernd zu bestim-

men, wurden vergleichende Untersuchungen zwischen frischer unfixierter und ciacciofixierter Leber angestellt. Es ergab sich folgendes:

Tabelle 8.

Material	Ausziehbarer Phosphor als P_2O_5	Nichtausziehbarer Phosphor als P_2O_5	Gesamtphosphor als P_2O_5
Frische unfixierte Leber	Alkoholauszug 9,06 Organischer P_2O_5	Organ 11,46 Anorganischer P_2O_5	20,52
Ciacciofixierte Leber	Alkoholauszug 2,92 Unfixierter organischer P_2O_5	Organ 13,39 Fixierter organischer + anorganischer P_2O_5	16,31

Verlust durch die Kaliumbichromatbäder: 4,21 = 20%.

Der Gehalt der frischen Leber an organischem Phosphor, also vorwiegend Lipoidphosphor, betrug 9,06 mg. Der Gehalt an anorganischem Phosphor 11,46 mg.

In der ciacciofixierten Leber waren 2,92 mg organischen Phosphors unfixiert geblieben. Nichtextrahierbar waren 13,39 mg. Diese setzen sich zusammen aus dem anorganischen Phosphor und dem durch das Ciaccio-Verfahren in eine alkoholunlösliche Form übergeführten organischen Phosphor. Es wäre nun leicht, einen genauen Wert für den gesamten fixierten organischen Phosphor anzugeben, wenn uns nicht verborgen bliebe, wie sich der in die Kaliumbichromatbäder übergegangene Phosphor auf organischen und anorganischen verteilt. Wir haben oben erklärt, warum diese Feststellung undurchführbar war. Um nun zu einigermaßen brauchbaren Werten zu kommen, müssen wir der folgenden Berechnung zwei Möglichkeiten zugrunde legen. Machen wir zuerst die unwahrscheinliche Annahme, daß der gesamte in die Chrombäder übergegangene Phosphor anorganischer Herkunft ist, so ergibt sich folgendes: In der Ciaccio-Leber muß sich der gesamte organische Phosphor des frischen Organs finden mit Ausnahme des durch die Alkoholextraktion entzogenen organischen Phosphors. Das waren in unserem Falle 9,06 mg P_2O_5 (Gehalt der frischen Leber an organischem Phosphor), weniger 2,92 mg P_2O_5 (ausgezogener organischer P_2O_5 aus ciacciofixiertem Organ) = 6,14 mg P_2O_5 oder 67,3%. Es wären also nur 67,3% organischen Phosphors als fixiert zu betrachten.

Im zweiten Falle machen wir die Annahme, daß anorganischer und organischer Phosphor im Verhältnis des Gehaltes der frischen Leber an anorganischem und organischem Phosphor in die Chrombäder übergegangen sind. Da der Verlust an Gesamtphosphor 20% betrug, müßten sowohl 20% des organischen wie 20% des anorganischen Phosphors in die Kaliumbichromatbäder übergegangen sein. Der Gehalt der frischen Leber an organischem Phosphor betrug 9,06 mg P_2O_5 pro 1 g Organ.

20% dieses Gehaltes, die in den Kalumbichromatbädern verlorengehen, sind $1,81 \text{ mg P}_2\text{O}_5$. Bei Subtraktion dieser Menge von 9,06 ergibt sich ein Wert von $7,25 \text{ mg P}_2\text{O}_5$ für den Gehalt der Ciaccio-Leber an organischem Phosphor. Diese $7,25 \text{ mg P}_2\text{O}_5$ müssen noch um die $2,92 \text{ mg P}_2\text{O}_5$ betragende Menge des aus der Ciaccio-Leber extrahierten organischen Phosphors vermindert werden, um den Gehalt der Ciaccio-Leber an tatsächlich fixiertem organischem Phosphor mit $4,33 \text{ mg P}_2\text{O}_5$ pro 1 g Organ zu bestimmen, d. h. 47,8% des organischen Phosphors der frischen Leber.

Wir mußten aus den oben angeführten Gründen eine sicherlich nicht völlig befriedigende Rechnung zugrunde legen und finden dann zur Beantwortung der ersten, von uns gestellten Frage, daß in ciacciofixierten Organen nur noch 80% des Phosphorgehaltes der frischen Leber vorhanden sind. 20% des Gesamtphosphorgehaltes werden durch die Chrombäder ausgezogen. Von diesem 80% betragenden Gesamtphosphorgehalt, der nach Ciaccio fixierten Leber werden, je nachdem wieviel organischer Phosphor in die Kalumbichromatbäder übergeht, etwa 46,6% bis höchstens 67,3% des organischen Phosphors der Fixationswirkung, wie sie von Ciaccio angenommen wird, unterliegen.

Extraktionswirkung der bei der Organeinbettung angewandten organischen Lösungsmittel Alkohol und Xylol.

Die vorstehenden Ergebnisse über die Fixationswirkung der Chromverbindungen beziehen sich auf Organe, die nur mit den Ciaccio-Flüssigkeiten I und II behandelt worden waren. Die im normalen Gang der Ciaccio-Behandlung folgende Einwirkung von Alkohol und Xylol war mit der obenerwähnten Begründung fortgelassen und durch eine Soxhletextraktion mit heißem Alkohol ersetzt worden. Daher mußte jetzt festgestellt werden, welche Verluste an Gesamtphosphor durch den normalen Weg der Methode von der Chromfixierung bis zur Xylolbehandlung im Vergleich zu frischer Leber entstehen. Die Prüfung zeigte, daß völlig ciaccio behandelte Leber nur noch 70% des in der frischen Leber vorhandenen Gesamtphosphors enthielt, daß somit 30% des Gesamtphosphors durch den vollständigen Ciaccio-Prozeß entfernt sein mußten. Mit dem Gehalt der ciacciofixierten Leber verglichen, der 80% der frischen Leber betrug, ergibt sich, daß durch die organischen Lösungsmittel (Alkohol, Xylol), deren Anwendung bei der Organeinbettung notwendig ist, 10% des Gesamtphosphors ausgezogen werden.

Bei der technischen Schwierigkeit der Untersuchungen am Organ im Gegensatz zur Prüfung an der chemischen Reinsubstanz wurden die einzelnen Abschnitte der Organuntersuchungen in verschiedenen parallel laufenden Analysen an den Lebern von 4 Kaninchen geprüft. Naturgemäß schwanken die gefundenen Werte der einzelnen Fälle in

individuellen Grenzen. Die im folgenden angeführten Analysen stellen Mittelwerte dar, die Prozentzahlen unserer Beispiele sind also auch nur als mittlere Werte zu betrachten. Es konnte in den Untersuchungen nachgewiesen werden, daß die Menge des durch die organischen Lösungsmittel aus Kaninchenleber ausziehbaren Phosphors zwischen 5% und 20% schwankt. In dem von uns als Beispiel angeführten Falle beträgt die Menge des mit organischen Lösungsmitteln — wie sie im histologischen Verfahren angewendet werden — extrahierbaren Phosphors 10%.

Nachdem durch die vorstehenden Untersuchungen festgestellt worden war, daß während der Ciaccio-Behandlung 5—20% des in einer Leber vorhandenen Phosphors durch die bei der Organeinbettung angewandten organischen Lösungsmittel entzogen werden, wurde untersucht, wie sich dieser Prozentsatz auf die einzelnen Behandlungssabschnitte der Alkohol-Xyloreihe verteilt. Als wesentliches Ergebnis ist zu betrachten, daß sich der bei weitem größte Anteil des ausgezogenen Phosphors in der aufsteigenden Alkoholreihe nachweisen ließ, während sich in dem Xylo entweder kein oder nur Spuren Phosphor finden. Von dem in dem untersuchten Fall 17,2 mg betragenden Gesamtgehalt der Ciaccio-Leber nach der Chrombehandlung und der Waschung mit Wasser wurden durch die lösende Wirkung der steigenden Alkoholreihe 2,9 mg pro 1 g Organ, d. h. 16,8% des Gesamtporphors entfernt. In den anschließenden Bädern (Alkoholxylo und Xylo) konnte kein Phosphor mehr nachgewiesen werden.

Beschreibung der Versuche zur Fixationswirkung des Ciaccio-Verfahrens.

I. Chromfixierung nach Ciaccio ohne Alkoholxylobehandlung.

Die Arbeitsmethode bestand in einer Extraktion von frischer und ciacciofixierter Leber mit Alkohol. Durch Extraktion mit Alkohol war eine Trennung von anorganischem und organischem Phosphor bei den angeführten Organen zu erreichen. Die Ergebnisse der Extraktion wurden dann untereinander verglichen. Die Bestimmung geschah in jedem Falle so, daß die Leberstücke im Vacuum bei der Siedetemperatur des Chloroforms getrocknet und nach dem Trocknen gepulvert wurden. Eine gewogene Menge des Leberpulvers wurde sodann mit Alkohol 14 Stunden lang im Soxhlet ausgezogen. Dieses Vorgehen bot Gewähr dafür, daß der Alkoholauszug den gesamten organisch gebundenen Phosphor enthielt. Der anorganische Phosphor blieb als alkoholunlöslich im Extraktionspulver zurück und war daraus durch Veraschung festzustellen. Die Summe des im Auszug und des im Rückstand gefundenen Phosphors ergab den Gehalt der verschiedenen Lebern an Gesamtporphor. Die Einwagen für die Extraktionen wie auch für die Bestimmung des nichtausziehbaren Phosphors aus dem extrahierten Organpulver waren jedesmal verschieden. Die erhaltenen Einzelergebnisse wurden zum Vergleich untereinander stets auf 1 g Trockenorgan umgerechnet.

1. Untersuchung frischer Leber.

a) Bestimmung des organischen Phosphors aus dem Extrakt.

Von einer frischen Leber wurden nach dem Trocknen und Pulvern 2,5 g eingewogen und extrahiert. Der Auszug wurde auf 250 ccm aufgefüllt. Davon wurden 25 ccm verascht, neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. 1 ccm hiervon wurde zur Bestimmung verwendet.

Ableseungsmittel: 13,2;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0227;	Verdünnung: 10- und 100fach;
gefunden: 22,7 mg P ₂ O ₅ .	
Ableseungsmittel: 13,3;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0226;	Verdünnung: 10- und 100fach;
gefunden: 22,6 mg P ₂ O ₅ .	

Bei Umrechnung auf 1 g ergibt sich als Mittel aus beiden Bestimmungen ein Gehalt des Alkoholextraktes von 9,06 mg P₂O₅.

b) Bestimmung des anorganischen Phosphors aus dem Rückstand.

Von dem nach der Alkoholextraktion im Vakuum getrockneten Leberpulver wurden 0,1527 g zur Veraschung eingewogen. Nach Veraschung und Neutralisation wurde auf 100 ccm aufgefüllt und davon 1,5 ccm zur Bestimmung entnommen.

Ableseungsmittel: 11,7;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0259;	Verdünnung: 66,6fach;
gefunden: 1,73 mg P ₂ O ₅ .	
Ableseungsmittel: 11,4;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0263;	Verdünnung: 66,6fach;
gefunden: 1,75 mg P ₂ O ₅ .	

Bei Umrechnung auf 1 g ergibt sich als Mittel aus beiden Bestimmungen 11,46 mg P₂O₅.

2. Untersuchung Ciacciofixierter Leber.

a) Bestimmung des organischen Phosphors aus dem Extrakt.

2,23 g getrocknetes Ciaccioleberpulver wurden 14 Stunden mit Alkohol ausgezogen, der Extrakt auf 250 ccm gebracht, davon 25 ccm verascht und nach dem Neutralisieren auf 100 ccm aufgefüllt. Daraus wurden 2mal je 5 ccm zur Bestimmung entnommen.

Ableseungsmittel: 9,1;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0330;	Verdünnung: 10- und 20fach;
gefunden: 6,60 mg P ₂ O ₅ .	
Ableseungsmittel: 9,3;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0322;	Verdünnung: 10- und 20fach;
gefunden: 6,44 mg P ₂ O ₅ .	

Aus 1 g Ciaccioleber waren mit Alkohol ausziehbar 2,92 mg P₂O₅.

b) Bestimmung des alkoholunlöslichen Phosphors aus dem Rückstand.

Nach dem Trocknen im Vakuum wurden von dem ausgezogenen Leberpulver 0,1180 g zur Veraschung eingewogen. Nach dem Neutralisieren wurde auf 250 ccm aufgefüllt und davon je 2mal 5 ccm zur Bestimmung entnommen.

Ableseungsmittel: 9,6;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0312;	Verdünnung: 50fach;
gefunden: 1,56 mg P ₂ O ₅ .	
Ableseungsmittel: 9,4;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0319;	Verdünnung: 50fach;
gefunden: 1,59 mg P ₂ O ₅ .	

1 g des Rückstandes enthielt 13,39 mg P₂O₅.

Die Zahlen geben mg P₂O₅ pro 1 g Trockenorgan an.

II. Chromfixierung bei vollständiger Ciacciobehandlung (einschließlich der Alkohol-Xylol-Behandlung).

Von dem ciacciobehandelten Organpulver wurden 0,2602 g im Kjeldahl-Kolben verascht, neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. 10 ccm hiervon wurden auf 75 ccm verdünnt und davon 2 mal je 5 ccm zur Bestimmung verwendet.

Ableseungsmittel: 12,1;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0248;	Verdünnung: 10- und 15fach;
gefunden: 3,72 mg P ₂ O ₅ .	
Ableseungsmittel: 12,4;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0242;	Verdünnung: 10- und 15fach;
gefunden: 3,63 mg P ₂ O ₅ .	

Mittel aus beiden Bestimmungen 3,68 mg P₂O₅. Daraus ergibt sich für 1 g Ciaccioleber an fixiertem Gesamtphosphor 0,0143 g P₂O₅.

III. Phosphorgehalt der Alkohol-Xylol-Reihe.

Die aus 3,53 g Ciaccio-behandelter Leberstücke stammenden Lösungsmittel — Alkohol, Alkohol-Xylol und Xylol — wurden jedes für sich auf Phosphorgehalt analysiert.

1. Phosphorgehalt der Alkoholfraktion.

Die alkoholische Lösung, die intensiv nach Lecithin roch, umfaßte 295 ccm, von denen 50 ccm getrocknet, verascht, neutralisiert und auf 75 ccm aufgefüllt wurde. Dieser Lösung wurden einmal 3 und einmal 1 ccm zur Bestimmung entnommen.

Ableseungsmittel: 4,3;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0700;	Verdünnung: 5,9- und 25fach;
gefunden: 10,32 mg P ₂ O ₅ .	
Ableseungsmittel: 13,1;	bei Vergleichsstellung: 10;
P ₂ O ₅ -Faktor: 0,0229;	Verdünnung: 5,9- und 75fach;
gefunden: 10,14 mg P ₂ O ₅ .	

Mittel aus beiden Bestimmungen 10,23 mg P₂O₅. Aus 1 g Ciaccioleber gingen in den Alkohol 2,9 mg P₂O₅.

2. Phosphorgehalt der Alkohol-Xylolfraktion.

Die aus dem 2. Abschnitt der Ciacciobehandlung stammende Alkohol-Xylolmenge bestand aus 100 ccm. Davon wurden 25 ccm verdampft, verascht, neutralisiert und auf 75 ccm aufgefüllt. Auf Zusatz von Strychninreagens entstand weder mit 5 ccm noch mit 10 und 25 ccm dieser Lösung eine Trübung. Es war also in diesem Anteil kein Phosphor mehr vorhanden.

3. Phosphorgehalt der Xylolfraktion.

Das von der 3. Periode der Ciacciobehandlung kommende Xylol konnte erwartungsgemäß keinen Phosphor mehr enthalten. Dies bestätigte sich auch bei der Veraschung des Rückstandes aus 25 ccm, der im ganzen 96 ccm betragenden Xylolmenge. Nach dem Neutralisieren und Verdünnen auf 75 ccm riefen 25 ccm davon keine Trübung des Strychninreagens hervor.

Nachweis von Ölsäure als Spaltprodukt im Organ nach Ciacciobehandlung.

Chemismus des Färbevorganges.

Die soeben beschriebenen Abschnitte der Organuntersuchung hatten die Lösung der Frage über die Fixationswirkung der Ciacciomethode gebracht. In den folgenden Versuchen wurden die im Organ nach der Ciacciobehandlung entstehenden Spaltprodukte zu bestimmen versucht, um damit einen Hinweis auf den *Chemismus des Färbevorgangs* zu ge-

winnen. Da als Spaltprodukt im Organ Ölsäure nachgewiesen wurde, die nach den früheren Ausführungen sowohl vom Lecithin als auch von ungesättigten Triglyceriden stammen konnte, scheint uns dieses Versuchsergebnis als letztes, schwerwiegendes Beweisstück gegen die Annahme einer spezifischen Lipoidfärbung von Bedeutung.

Die Färbeversuche von Reinsubstraten hatten den Hinweis gegeben, daß der Träger der Ciaccioreaktion der ungesättigte Charakter des Ölsäurerestes sei, und bei der Ciacciobehandlung von lecithinbeladenem Holundermark wurde nachgewiesen, daß das Lecithin zum Teil während der Behandlung in Fettsäuren gespalten wird, von denen die Ölsäure charakterisiert werden konnte. Am trioleinbeschickten Holundermark war gefunden worden, daß auch das Triolein nach der Einwirkung der Ciaccioreagentien z. T. in Ölsäure und in deren Oxydationsprodukte übergeführt wird. Es war nun zu untersuchen, ob sich diese Befunde am Organ bestätigten. Wenn sich auch am Organ zeigen ließ, daß Ölsäure als Spaltprodukt nach der Ciacciobehandlung auftrat, so konnte die Ölsäure sowohl aus Lecithinen als auch aus ungesättigten Triglyceriden stammen. *Das Entscheidende dieser Untersuchungen ist darin zu sehen, daß es gelungen ist, in ciacciobehandelten Organen Ölsäure, aber kein unversehrtes Lecithin nachzuweisen. Diese Ölsäure ist sicherlich z. T. als Spaltprodukt des Lecithins zu betrachten. Zum anderen Teil jedoch entstammt sie Triglyceriden, die nachgewiesenermaßen durch das Ciaccioverfahren nicht annähernd restlos entfernt werden.*

Bei der Durchführung der Untersuchung gingen wir von folgender Überlegung aus. Das Ciaccioverfahren besteht im wesentlichen in einer Beladung des behandelten Organs mit Chromverbindungen. Wie eingangs bewiesen, bringt allein die Chromlösung I, die 3wertiges Chrom enthält, die chromierende Wirkung hervor. Dieses 3wertige Chrom, das in der Essigsäure und Ameisensäure enthaltenden Lösung als Acetat bzw. Formiat zur Einwirkung gelangt, bildet mit den im Organ schon vorhandenen löslichen Salzen und den erst während der Behandlung abgespaltenen Säuren, je nachdem, ob im Gewebe schwach saure oder schwach alkalische Reaktion vorherrscht, unlösliche, neutrale oder basische Chromsalze. Auch die Bildung von unlöslichen Komplexsalzen ist bei der großen Anzahl der vorhandenen Stoffe anzunehmen, ebenso die Entstehung von Chromadsorptionsverbindungen. Um die an diesen verschiedenen Chromverbindungen hängenden Fettanteile wieder freizulegen, mußten Mineralsäuren (z. B. Salzsäure) angewandt werden, und die auf diese Weise vom Chrom getrennten Fettstoffe mußten durch Äther ausziehbar sein.

Beschreibung der Versuche.

Ciacciobehandelte Leber wurde durch Trocknen im Exsiccator von Xyloresten abgesaugt und im Mörser gepulvert. 6,4 g davon wurden

mit 220 ccm 2proz. Salzsäure übergossen und auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis die anfangs nicht benetzbaren, oben schwimmenden Organflocken sich entfärbten, untersanken und die Flüssigkeit infolge der Auflösung des Chroms grüne Färbung annahm. Nach dem Abkühlen wurde 3mal ausgeäthert, die ätherische Lösung mit Natrium-Sulfat getrocknet, und der Äther abdestilliert. Es hinterblieb ein gelbliches Öl, das nach dem Absaugen der Ätherreste im Exsiccator Krystalle ausschied. Der erhaltene Rückstand war unlöslich in Wasser, löste sich aber völlig klar in Soda, wodurch die Anwesenheit von Säuren erwiesen war. *Unversehrtes Lecithin konnte nicht festgestellt werden.* Es hätte sich durch seinen charakteristischen Geruch und durch sein hohes Quellungsvermögen im Wasser oder in der Sodalösung als Trübung verraten müssen. Ebensowenig konnten phosphorhaltige Spaltprodukte des Lecithins in einer Probe des Ätherrückstandes nach Veraschung mit Schwefel- und Salpetersäure und Prüfung mit Strychninreagens nachgewiesen werden. Dagegen ergab die Lösung des Öles in Soda nach dem Ansäuern mit Essigsäure auf Zusatz von Bleiacetat einen Niederschlag von fettsaurem Blei, eine andere Probe mit Kupferacetat in essigsaurer Lösung einen grünen Niederschlag von fettsaurem Kupfer.

Zur näheren Charakterisierung der vorliegenden Fettsäuren wurden nochmals 3 g Ciaccioleber derselben Behandlung unterzogen. Ein Teil vom Verdampfungsrückstand des Ätherauszuges wurde wieder in Äther gelöst und verdünnte, ätherische Bromlösung hinzutropft. Es trat sofort Entfärbung ein, ohne Bromwasserstoffentwicklung, ein Beweis, daß ungesättigte Säuren vorliegen mußten. Ebenso wurde verdünnte, schwefelsaure Kaliumpermanganatlösung in der Kälte sofort entfärbt. *Dies war ein weiterer Beweis dafür, daß mindestens ein Teil der gewonnenen Säuren ungesättigten Charakter haben müsse, daß also Ölsäure vorhanden war.*

Welche Schlußfolgerungen ergeben sich für die Verwendung der Ciacciomethode in der histologischen Technik?

Wir müssen es nach dem Ergebnis unserer Untersuchungen als feststehend betrachten, daß die Ciacciomethode auch unter Einhaltung genauerster methodischer Vorschriften eine Spezifität zum Nachweis bestimmter Fettstoffe, insbesondere der Lipide, *nicht* besitzt. Die Ansicht Ciaccios, daß die Chrombäder eine starke Wirkung auf die Lipoidstoffe ausüben, konnte von uns weitestgehend bestätigt werden. Soll jedoch das Verfahren zur Lipoidbestimmung geeignet sein, so müßte die Annahme Ciaccios zutreffen, daß alle übrigen Fettstoffe, außer den Lipiden, entfernt werden. Diese Annahme trifft, wie einwandfrei gezeigt werden konnte, *nicht* zu. Somit ist für die Beurteilung des Verfahrens unser Nachweis entscheidend, daß die Stoffe, die nicht zu

den Lipoiden zählen, während des Verfahrens nur teilweise entfernt werden, also bei der Sudanfärbung mitgefärbt werden.

Für die morphologische Betrachtung muß man daher beachten, daß die „ciacciopositiven Fettstoffe“ ein Gemisch von Fetten ungesättigten Charakters darstellen.

Zusammenfassung.

Wiederholen wir nunmehr zum Abschluß in kurzen Zügen das Ergebnis der verschiedenen Untersuchungsreihen, so war es unser Bestreben, durch exakte Versuchsbedingungen ein möglichst lückenloses Bild der von Ciaccio zum Lipoidnachweis angegebenen Methode zu liefern. Es geschah dies nicht nur wegen der Bedeutung, die dieser Methode zugemessen wird, wie aus zahllosen Arbeiten ersichtlich ist, sondern um zu zeigen, welche Voraussetzungen zu erfüllen sind, um die Leistungsfähigkeit einer histochemischen Methode, zum Nachweis bestimmter chemischer Stoffe zu prüfen. Die Prüfung der Ciacciomethode und die hierbei gewonnenen Ergebnisse betrachten wir als wesentliche Stütze unserer schon früher dargelegten Anschauungen, daß die histochemischen Fettfärbeverfahren zur Unterscheidung bestimmter, chemisch abgrenzbarer Fettstoffe als unbrauchbar abzulehnen sind. Exakte Prüfungsbedingungen erblicken wir in der histochemischen Prüfung der Reinsubstanz und in der chemischen Organanalyse. Für die histochemische Prüfung der Reinsubstanz empfehlen wir die von uns angewandte Holundermarkmethode, von deren Brauchbarkeit uns die chemische Vergleichsuntersuchung überzeugt hat. Wir konnten nachweisen, daß bei dem von uns empfohlenen Aufsaugeverfahren die Mischungsbestandteile der verwendeten Fettmischung in das Holundermark eingehen.

Die Ciacciomethode stützt sich auf die Tatsache, daß Chromsalze mit Lecithinen chemische Verbindungen eingehen. Die Lipide sollen durch Fixation mit Chromsalzen in organischen Lösungsmitteln (Alkohol, Xylol) unlöslich werden, während diese Lösungsmittel die nicht chromierten Fettstoffe, also die Nichtlipide nach Ciaccio ausziehen sollen.

Von der Tatsache ausgehend, daß nur 3wertiges, grünes Chrom chromierend wirken kann, konnten wir im Gegensatz zu den bisherigen Ansichten zuerst feststellen, daß die chromierende Wirkung nur dem Chrom-Essigsäure-Formaldehydgemisch zugesprochen werden kann.

Die von Ciaccio an Reinsubstanzen im Zigarettenpapierversuch erhobenen Befunde, welche die Grundlage seiner Ansicht bilden, daß die von ihm angegebene Methode zum Nachweis der Lipide spezifisch sei, mußten wir ablehnen. Der Zigarettenpapierversuch ist unbrauchbar und es gelingt mühelos, durch Änderung des Prüfungsverfahrens gänzlich andere Färbeergebnisse zu erzielen.

Nach einer von uns als zweckmäßig befundenen und empfohlenen Prüfung in 3—5 mm dicken Holundermarkstücken konnten wir feststellen, daß sämtliche Fettstoffe mit Ausnahme der gesättigten Triglyceride nach Ciaccio färbar sind.

Nach unseren durch das Ciaccioverfahren gewonnenen Färbeergebnissen wird eine Einteilung der Fettstoffe in *chromophile* (Stoffe mit Lückenbindung, Ölsäure, Triolein, Lecithin und Cholesterinölsäureester, ganz allgemein Ölsäure und ihre Verbindungen) und *chromophobe* (gesättigte organische Stoffe, Stearinsäure, Stearinsäureester, Palmitin, Palmitinsäureester und Cholesterin) vorgeschlagen.

Träger der Ciaccioreaktion sind sämtliche Fettstoffe mit ungesättigten Fettsäureresten. Es gelingt daher nicht, eine Scheidung von sogenannten Lipoiden und ungesättigten Neutralfetten herbeizuführen.

Um unseren Ergebnissen eine breitere Grundlage zu geben, haben wir versucht, den Ciaccioprozeß an der Reinsubstanz und am Organ chemisch zu erfassen. Wir haben zuerst die Frage beantwortet, welche Mengen von Lipoiden im Modellversuche und im Organ durch das Ciaccioverfahren fixiert werden, und weiterhin den für die Beurteilung der Methode entscheidenden Nachweis erbracht, daß Stoffe, die nicht zu den Lipoiden im Sinne Ciaccios gehören, während des Verfahrens nur teilweise entfernt werden. Wir konnten am Modellversuche zeigen, daß von einer bestimmten Lecithinmenge nur etwa 62—67% durch die Kalumbichromatbäder fixiert werden. Von einer bestimmten Trioleinmenge werden im Modellversuche nur 47% beim Ciaccioverfahren durch die organischen Lösungsmittel entfernt. Die übrigen 53% bleiben zurück, spalten teilweise Ölsäure ab und ergeben somit nach Ciaccio positive Färbungen. Es ist also eine irrite Annahme, daß Stoffe, die nicht zur sogenannten Gruppe der Lipide zählen, während des Verfahrens entfernt werden. Nachdem dieser Nachweis einwandfrei gelungen ist, dürfen wir es als nicht mehr angängig bezeichnen, der Methode eine Bedeutung zur Unterscheidung bestimmter Fettstoffe zuzusprechen.

Lecithin spaltet während der Ciacciobehandlung Ölsäure ab, die für den positiven Färbeausfall verantwortlich ist.

An ciacciobehandelten Organen gelang der Nachweis, daß allein durch die Kalumbichromatbäder 20% des Gesamtphosphors entfernt werden. Im Organ werden 47,8—67,3 % des organisch gebundenen Phosphors, also vorwiegend des Lecithinphosphors, durch das Ciaccioverfahren fixiert. Die zur Anwendung gelangende aufsteigende Alkoholreihe entfernt bis zu 20% des Gesamtphosphors.

Auch im ciacciobehandelten Organ ist der Nachweis von Ölsäure als Spaltprodukt gelungen. Diese kann sowohl von Lecithin als auch von ungesättigten Fettstoffen stammen. Die Ciaccio-Methode ist somit nicht als spezifisches Lipoidnachweisverfahren zu betrachten. Positiver Aus-

fall der Ciacciofärbung spricht nur für das Vorhandensein ungesättigter Fettstoffe mit dem Rest einer ungesättigten Fettsäure. Eine Anhäufung ciacciofärbbarer Fettstoffe im Gewebe darf nicht als Gradmesser für das Vorhandensein von sogenannten „Lipoiden“ verwertet werden.

Bei weiterer Verwendung der Methode darf kein Zweifel darüber herrschen, daß die ciacciopositiven Fettstoffe ein Gemisch von Fettstoffen ungesättigten Charakters darstellten. Eine Abgrenzung einer bestimmten Gruppe von Fettstoffen durch die Methode ist nicht möglich.

Literaturverzeichnis.

- Arndt, H. J.*, Verh. dtsch. path. Ges. **1925**, 143. — *Arndt, H. J.*, Anat. Anz. **56**, 290 (1923). — *Bang*, Chemie und Biochemie der Lipoide. Wiesbaden: Bergmann 1911. — *Bell, J.* med. Res. **24**, 539 (1911). — *Ciaccio*, Les lipoides intracellulaires. Biologie méd. **1912**. — *Froboese* und *Spröhnle*, Z. mikrosk.-anat. Forschg **14**, 13 (1928). — *Hammar*, Z. mikrosk.-anat. Forschg **1**, 90 (1924). — *Hoffheinz*, Virchows Arch. **260**, 493 (1926). — *Hueck*, Verh. dtsch. path. Ges. **1925**, 18. — *Kimmelstiel*, Krkh.forschg **5**, 403 (1928). — *Kutschera-Aichbergen*, Virchows Arch. **256**, 269 (1925). — *Kaufmann* und *Lehmann*, Virchows Arch. **261**, 623 (1926) — Zbl. Path. **39**, 232 (1927). — *Kaufmann*, Z. Geburtsh. **91**, 668. — *Pick, L.*, Ergeb. d. inn. Med. **29**, 561 (1926). — *Romeis*, Virchows Arch. **264**, 301 (1927). — *Sehrt*, Histologie und Chemie der Lipoide der weißen Blutzellen usw. Leipzig: Thieme 1927. — *Versé*, Verh. dtsch. path. Ges. **1925**. — *Wolff* und *Frankenthal*, Verh. dtsch. path. Ges. **1926**.
-