

Über den Phosphatid- und Cerebrosidgehalt von Milz und Leber eines Falles von Morbus Gaucher im Säuglingsalter (mit Vergleichswerten von Normalmilz und Milz bei Pick-Niemannscher Krankheit)¹.

Von
Priv.-Dozent Dr. Emil Epstein.

(Eingegangen am 25. März 1929.)

Herr *Hamperl* hat jüngst in diesem Archive über die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei einem Fall von Morbus Gaucher im Säuglingsalter berichtet². Durch Zuweisung des geeigneten Materials waren *Lieb* und ich in der Lage, Milz und Leber dieses im Herbst 1927 durch Herrn *Hamperl* seziierten Falles einer chemischen Untersuchung zu unterziehen.

Gelegentlich der im Frühjahr 1928 abgehaltenen Tagung der Deutschen Pathologischen Gesellschaft in Wiesbaden habe ich im Anschluß an die in der Aussprache zu den Milzreferaten erstattete Mitteilung Herrn *Hamperls* die damals vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchungen in Kürze erörtert³. Diese, sowie die endgültigen Ergebnisse der weiter fortgesetzten chemischen Arbeiten durch *Lieb* und *Mladenović* bilden den Gegenstand des im folgenden veröffentlichten Berichtes, als notwendige Ergänzung des in der *Hamperlschen* Abhandlung enthaltenen Zahlenmaterials der chemischen Analysen *A. Wasickys* mit kritischen Bemerkungen zu den von ihm aufgestellten Umrechnungswerten von Phosphor auf Lecithin. Ich hatte zunächst über die Ergebnisse der Milzuntersuchung dasjenige berichtet, was ich gemeinsam mit *Lorenz* bei dem nur in geringen Mengen zur Verfügung gestandenen Material zu ermitteln imstande war. (13 g *formolfixiertes* Gewebe = 3,07 g Milztrockenpulver.) Als Lecithingehalt ergab sich ein Wert von höchstens 3 g auf 100 g *Trockenpulver* — jedenfalls *keine* nennenswerte Erhöhung des Lecithingehaltes —, eine Ziffer, zu welcher der von *Wasicky* ermittelte Wert von rund 6% auf *frisches*

¹ Verspätet angemeldet als Mitteilung für die 24. Tagung der Dtsch. path. Ges., Wien 1929.

² *H. Hamperl*, Virchows Arch. **271**, 147 (1929).

³ *H. Hamperl*, Verh. dtsch. path. Ges., 23. Tagung, Wiesbaden 1928, 133. — *E. Epstein*, Ebenda S. 137.

Organ berechnet im auffallenden Gegensatze steht. Bezogen auf Trockenpulver ergäbe dies nämlich, ausgehend von den von *Lieb* und *Madonovič* ermittelten Durchschnittswerten für Trockensubstanzgehalt verschiedener Milzen mit rund 20%, einen *Lecithingehalt* von *mehr als 30%*. Dieser außergewöhnlich hohe Lecithinwert kam dadurch zustande, daß *Wasicky*, ähnlich wie *Siegmund*, den Phosphor der gesamten Extraktfraktionen, die er durch je 12stündiges Ausziehen mit Chloroform, Äther und Alkohol gewonnen hatte, auf Lecithin umgerechnet hat. Seine Befunde, auf das Gewicht des frischen Organs berechnet, lauten folgendermaßen:

Gesamtlipide	9,62 %
Gesamtcholesterin	0,93 %
Phosphor, berechnet als Lecithin	5,98 %

Mittelwerte aus 3 als Normalmilzen bezeichneten Organen gleichaltriger Kinder:

Gesamtlipide	3,39 %
Gesamtcholesterin	0,32 %
Phosphor, berechnet als Lecithin	1,08 %

Demgegenüber betone ich, daß diese Umrechnung nach den grundlegenden Untersuchungen *Siegmund Fraenkels* als unstatthaft abzulehnen ist, dessen fraktionierte Lipoidextraktionsmethode auch heute noch allgemein gültig und anerkannt ist, indem sich auf diese Weise sowohl für *Normal-* als auch für *Gauchermilzen* Lecithinmengen ergeben, die 5—6 mal zu hoch gegriffen sind. Der Gesamtphosphor aller Extraktfraktionen kann sich neben Lecithin in erster Linie auf organischen Phosphor anderer Herkunft, z. B. gesättigte Phosphatide wie Sphingomyelin oder auf phosphorhaltige Eiweißabkömmlinge beziehen. So ist zu bedenken, daß durch die Löslichkeitsbeeinflussung von seiten der verschiedenen Lipide phosphorhaltige Verbindungen, die nicht den Phosphatiden angehören, mitgelöst werden, auch wenn sie in den betreffenden Extraktionslösungsmitteln an sich nicht löslich sind. Zu einem geringen Teile kommt ferner auch anorganischer Phosphor in Betracht, da die im 90—95proz. Extraktionsalkohol vorhandenen geringen Mengen Wassers phosphorsaure Salze mitzulösen imstande sind. Bemerkenswert bleibt trotzdem, daß der Phosphorwert der Gauchermilz des Falles *Hamperl* nach *Wasicky* das Sechsfache des von ihm ermittelten Durchschnittswertes für 3 Normalmilzen beträgt. Auch der in der Mitteilung von *B. Brahn* und *L. Pick*¹ für einen Fall von Pick-Niemannscher Erkrankung angeführte hohe Lecithinwert mit 10,3g auf 100 g frische Milz (= über 50 g in 100 g Trockenpulver) läßt vermuten, daß von *Brahn* und *Pick* ähnlich wie von *Siegmund* und von *Wasicky* der Phos-

¹ Klin. Wschr. 1927, Nr 50, 2367.

phor sämtlicher Auszüge in Chloroform, Äther und Alkohol auf Lecithin berechnet wurde. Ebenso ist der von ihnen mit 8,7% Lecithin in frischer Milz (= 40% im Trockenpulver) angegebene Lecithinwert des Pick-Niemannfalles von *Bloom* und *Kern* wohl irrig berechnet, da der allein auf Lecithin zu beziehende acetonfällbare Phosphor der Ätherextraktfraktion laut Originaltabelle 0,5% beträgt, somit einem Werte von 13,2 g und nicht einem über 40 g Lecithin in 100 g Trockenpulver entspricht¹. Immerhin erscheint es bei dem ganz außergewöhnlich hoch angegebenen Lecithinwerte von 10,3 g, der den des Falles von *Siegmund* mit 6,4 g auf 100 g frische Milz noch beträchtlich übertrifft, keineswegs ausgeschlossen, daß ein Teil dieses Phosphorgehaltes auf Lecithin zu beziehen ist. *Der strenge Nachweis eines erhöhten Lecithingehaltes fehlt jedoch.*

Die folgende Tab. 1 (Nr. 1—3) gibt einen Einblick in die mittels der *Fraenkelschen* Methode aus frischen, nicht in Formalin fixierten Milzen ermittelten Phosphor- und Lecithinwerte, aus denen hervorgeht, daß die *Gauchermilzen* mit 0,055% bzw. 0,051% Phosphor des Ätherauszuges (= 1,45% bzw. 1,34% Lecithin) *keine* nennenswerte *Erhöhung*, gegenüber dem Normalwerte von 0,05% Phosphor (= 1,3% Lecithin), der Fall (Nr. 4) Morbus *Pick-Niemann* dagegen mit 0,5% des mit Aceton fällbaren Phosphors dieser Extraktfraktion (= 13,2% Lecithin) eine sehr *beträchtliche Vermehrung des Lecithinphosphors* erkennen läßt, während das *Vorhandensein von Cerebrosiden* bei diesem Falle mit Sicherheit auszuschließen ist, wie von *Bloom* und *Kern* ausdrücklich vermerkt wird.

Tabelle 1. Prozentzahlen für Phosphorgehalt in 100 g Trockenpulver (mit Angabe der umgerechneten Lecithinwerte).

Ausgangsmaterial	Ätherabdunstungsrückstand		Alkoholabdunstungsrückstand
	Phosphor in %	Lecithin in %	Phosphor in %
	1	2	3
1. Normalmilz (<i>Epstein</i> 1924) ²	0,05	1,3	0,183
2. Gauchermilz (<i>Epstein</i> 1924) ²	0,055	1,45	0,266
3. Gauchermilz (<i>Bloom</i> und <i>Kern</i> 1927) ³	0,051	1,34	0,214
4. Pick-Niemann-Milz (<i>Bloom</i> und <i>Kern</i> 1927) ³	0,5	13,2!	0,918!
5. Pick-Niemann-Milz-Smetana (<i>Epstein</i> und <i>Lorenz</i> 1929)	0,499	13,17! (10,56)	1,22!

¹ Vgl. Tab. 1.

² Biochem. Z. **148**, 398 ff. (1924).

³ Arch. int. Med. **39**, 456—461 (1927).

Die Phosphorwerte der Alkoholabdunstungsrückstände (Tab. 1 Längskolonne 3) dürfen dagegen *nicht* auf *Lecithin* berechnet werden. Die Herkunft dieses Phosphors wird an der Hand eingehender Untersuchungen demnächst anderwärts ausführlich zur Besprechung gelangen. Weiter sei bemerkt, daß diese Untersuchungen bei den in der Tabelle mit Fettdruck angeführten *Lecithin*werten des Falles 5 eine geringe Berichtigung nach unten erforderlich machen, indem der Wert 13,2 auf 10,56 richtigzustellen ist. Auch für Fall 4 dürfte der Wert von 13,2 um ein geringes zu hoch bestimmt worden sein.

Lieb gelang es in der Folge im Verein mit *Mladenović*, trotz des geringen Ausgangsmaterials von 3,07 g Trockenpulver aus dem ihm von mir zur Verfügung gestellten 286 mg wiegenden Abdunstungsrückstand der nur alkohollöslichen (ätherunlöslichen) Lipoidfraktion 80 mg einer durch mehrmaliges Umkrystallisieren in absolutem Alkohol und Essigester gereinigten Substanz zu isolieren — das ist die immerhin nicht unbeträchtliche Menge von 2,6% des Trockenpulvers —, die zufolge ihrer charakteristischen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, der eigentümlichen Ausscheidung aus ihren heißen alkoholischen Esteressiglösungen beim Erkalten in Form gequollener, gallertartiger Massen, die bei vorsichtigem langsamen Abkühlen deutlich ausgebildete Sphärolithe erkennen ließen, weiters zufolge der Farbreaktion mit konzentrierter Schwefelsäure, dem deutlichen Reduktionsvermögen nach der Hydrolyse, einem Schmelzpunkte von 180°, sowie der für Kohlenstoff und Wasserstoff ermittelten Werte keinen Zweifel darüber aufkommen läßt, daß das Cerebrosid *Kerasin* vorliegt. *Lieb* weist besonders darauf hin, daß infolge gewisser, in der angewandten Methode gelegenen Verluste (primäre Acetonextraktion, die aus besonderen Gründen erforderlich war) der tatsächliche Kerasingehalt höher (mit etwa 3%) anzunehmen ist, als es in den durch die Bestimmung ermittelten Werten zum Ausdrucke gelangt.

Es folgt nun auszugsweise die Wiedergabe der Besprechung von den die bisherigen Ergebnisse sehr wesentlich ergänzenden Ergebnisse der von *Lieb* und *Mladenović* durchgeführten Leberanalysen, die inzwischen zusammen mit den soeben besprochenen Milzbefunden des *Hamperlschen* Falles in einer ausführlichen Mitteilung in Bd. 181 von Hoppe-Seylers Z. für physiol. Chemie (1929) zur Veröffentlichung gelangt sind.

Die genannten Forscher verarbeiteten 7 g Trockenpulver von Leber, die durch Auswaschen in Wasser von Formalin befreit worden war. Der Abdunstungsrückstand des Ätherextraktes betrug 10,2% des Trockenpulvergewichtes. Er erwies sich in seinem überwiegenden Anteile (93,6%) in Aceton löslich. In der acetonunlöslichen Fraktion waren, bezogen auf Lebertrockenpulver, 0,11% *Lecithin* enthalten.

Die acetonlösliche Fraktion des Ätherabdunstungsrückstandes war frei von Phosphor und Stickstoff. Dagegen ergab sich ein Gehalt von 1,15% Cholesterin und 5,96% Neutralfett. Überdies schieden sich bei Abdunsten des Lösungsmittels vereinzelte Krystallaggregate aus, die nach ihrem optischen Verhalten als Sphärolithe des Kerasins anzusehen waren, woraus hervorgeht, daß kleinste Mengen von Cerebrosid bei der Ätherextraktion mitgelöst werden. Das primär mit Äther ausgezogene Lebertrockenpulver wurde sekundär mit 95proz. Alkohol extrahiert, der Abdunstungsrückstand des Alkoholauszuges betrug 10,9% des Trockenpulvers. Er enthielt als wesentlichen Bestandteil das krystallisierbare Cerebrosid Kersain mit dem für diesen Stoff charakteristischen Schmelzpunkt von 180°. Seine Sphärolithe wiesen bei der Untersuchung mit Gipsplättchen nach Rosenheim einen optisch-negativen Charakter auf, womit das gleichzeitige Vorkommen von Cerebron fast sicher ausgeschlossen erscheint. Der endgültige Beweis für die Gleichheit des aus der Leber isolierten Stoffes mit Kerasin wurde durch die Ergebnisse der Elementaranalyse und Ermittlung des Bestandes der optischen Drehung erbracht. Die quantitative Bestimmung des Kerasins ergab auf den gesamten Alkoholabdunstungsrückstand umgerechnet 100 mg, das sind 13,1% des Abdunstungsrückstandes oder 1,43% von Lebertrockenpulver. Die Alkoholfraktion enthält 0,78% Phosphor, bei Umrechnung ergäbe sich ein Gehalt von 2,25% von Phosphatiden im Trockenpulver.

Aus den besprochenen Untersuchungsergebnissen läßt sich zunächst folgendes ableiten: Die von Lieb ermittelten Zahlenwerte für Phosphatidphosphor der Leber des Falles Hamperl lassen — selbst bei Einbeziehung der auf Phosphatide umgerechneten Phosphorwerte der Alkoholfraktion — in Summe mit 2,36% — auch nicht annähernd eine so erhebliche Lecithinvermehrung erkennen, wie sie für die Milz der Fälle von Morbus Pick-Niemann von Bloom und Kern¹ sowie von Epstein und Lorenz mit 13% Lecithin zutrifft (s. Tab. I, Fall 4 u. 5). Der von Wasicky durch Gesamtextraktion der frischen Milz des Hamperlschen Falles festgestellte hohe Phosphorwert kann keineswegs durch Lecithinspeicherung erklärt werden, er weist vielmehr, ebenso wie die hohen Phosphorzahlen der Alkoholfraktionen der Pick-Niemann-Fälle, auf andere Ursachen hin, deren Ermittlung uns künftig vor neue Aufgaben stellt, aber auch neue Aufklärungen verspricht.

Die Theorie von L. Pick, daß es sich bei Fällen von Splenohepatomegalie von Typus Pick-Niemann um eine tatsächliche und starke Phosphatidanreicherung handelt, erscheint aber dessen ungeachtet chemisch in einwandfreier Weise durch die Untersuchungen von Bloom und Kern gestützt. In weiterer Bestätigung dieser Theorie habe ich

¹ Arch. of int. Med. 39, 456—460 (1927).

während der Drucklegung vorliegender Mitteilung gemeinsam mit *Lorenz* in der Milz eines am pathologischen Universitätsinstitute in Wien von *Smetana* sezierten Falles von *Pick-Niemannscher* Erkrankung (Tab. 1, Fall 5) einen rund um das 10fache erhöhten Lecithingehalt gegenüber Normal- und Gauchermilz festgestellt, der mit dem von *Bloom* und *Kern* ermittelten Lecithinwerte (Tab. 1, Fall 4) zufällig nahezu genau übereinstimmt. Über den in Rede stehenden Fall wird von *Smetana* in diesem Archiv und von uns in einer chemischen Fachschrift noch ausführlich berichtet werden. *Cerebroside* waren auch in diesem Falle *nicht* nachweisbar. In gleichem Sinne fielen von *Fate* durchgeführte Analysen aus, über die im heuer erschienenen Juni-Hefte (Nr. 19, 47, 1929) der „Ber. Physiol.“ in Kürze berichtet wurde.

Der *Nachweis* von mindestens 3% *Kerasin* in der *Milz* und 1,43% dieses Cerebrosids in der *Leber* ist für die *Einreihung* des in Erörterung stehenden *Hamperlschen* Falles als *M. Gaucher*, wie sie von ihm vom Standpunkte der Morphologie und Pathologie getroffen wurde, auch *chemisch betrachtet* von ausschlaggebender Bedeutung, da bis jetzt wenigstens in keinem Falle von lipoidzelliger Splenohepatomegalie Typus *Pick-Niemann*, von großzelliger Umwandlung der Milz bei Diabetes oder dgl. ein Cerebrosid aufgefunden werden konnte. Dafür, daß in Normalorganen nur ganz verschwindende Mengen von Cerebrosid vorkommen, ist die Mitteilung von *Erwin Walz*¹ maßgebend, der in 45 kg Rindermilz (7,3 kg Trockenpulver) nicht mehr als 2,3 g *Kerasin* nachzuweisen imstande war, das sind 0,03% in Milztrockenpulver.

Tab. 2 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analysen der mittels der fraktionierten Extraktionsmethode gewonnenen Abdunstungsrückstände in jenen Fällen von Morbus Gaucher und einer Vergleichsmilz, bei denen die von *Lieb* und mir ausgearbeitete Technik befolgt wurde.

Es zeigt sich, daß die Werte für den das *Kerasin* enthaltenden Abdunstungsrückstand des Alkoholextraktes bei dem von mir untersuchten, 1924 veröffentlichten Falle von Morbus Gaucher², bei dem ich *frisches, nichtformalinfixiertes* Organ verarbeitet hatte, und ebenso auch die von *Lieb* erhobenen Mengen für *Kerasin*³ bedeutend höher sind, als die bezüglichen Werte jener Fälle, die von formolfixiertem Material ausgegangen sind. Ähnliches ergibt sich auch in den Untersuchungsergebnissen von *W. Bloom* und *R. Kern* bezüglich der Phosphatide. Beachtenswert ist auch, daß in meinem Falle von 1924 die Menge des Alkoholabdunstungsrückstandes das 5fache des Ätherabdunstungsrückstandes beträgt.

² Hoppe-Seylers Z. **160**, 210 (1927).

² *E. Epstein*, Virchows Arch. **253**, 157 (1924) — Biochem. Z. **145**, 398 (1924).

³ *H. Lieb*, Hoppe-Seylers Z. **140**, 305 (1924).

Tabelle 2.

Ausgangsmaterial	Prozentzahlen der Extraktabdunstungsrückstände berechnet auf 100 g Trockenmilzpulver				Ergebnis der chemischen Analyse auf Cerebroside		Schmelz- (Klärungs)- Punkt
	Eingewogene Menge in g	Ätherabdunstungsrückstand in %	Alkoholabdunstungsrückstand in %	Summe der in Äther und Alkohol löslichen Substanz in %	Autor	Menge und Art der nachgewiesenen Substanz	
		<i>Frisch. (nicht fixiertes) Material</i>					
Normalmilz <i>Epstein</i> 1924	16,82	7,61	12,24	19,85	<i>Lieb</i>	Cerebroside <i>nicht</i> nachweisbar	—
Gauchermilz <i>Epstein</i> 1924	25,25	6,7	34,95	41,65	<i>Lieb</i> ¹	Kerasin 10 %	185°
		<i>Formolfixiertes Material</i>					
Gauchermilz <i>Klercker</i> 1927	102,36	6,75	11,86	18,61	<i>Lieb</i> ²	Kerasin 6,25 %	185°
Gauchermilz <i>Hamperl- Epstein</i> 1928	3,07	5,2	9,3	18,9 (inklusive 4,4 % Acetonextrakt)	<i>Lieb</i> und <i>Mladenović</i>	Kerasin bestimmt 2,55 %, mit den Verlusten 3 %	180—182°
Gauchermilz <i>W. Bloom</i> 1927		7,5	22,4	29,9	<i>Bloom</i>	Kerasin (sicher nachgewiesen)	178°
Gaucherleber <i>Hamperl</i> 1928	6,99	10,2	10,9	21,1	<i>Lieb</i> und <i>Mladenović</i>	Kerasin 1,43 %	180—182°

¹ Hoppe-Seylers Z. **140**, 306 (1924).² Ebenda, **170**, 60 1927.

Jüngst haben nun *Lieb* und *Mladenović* an 4 sog. Normalmilzen, die ich je zur Hälfte frisch und zur Hälfte nach mehrwöchiger Formolfixation getrocknet und gepulvert hatte, Extraktionsversuche gemacht, aus denen hervorgeht, daß die Ätherabdunstungsrückstände aus *frischem* Material um ein Drittel mehr wiegen als aus fixiertem Milzgewebe, während die Alkoholabdunstungsrückstände aus frischer Milz im allgemeinen nur um ein Zehntel, in einem Falle aber um das Doppelte, schwerer gewesen sind als die aus den fixierten Organen. Kerasin fehlte vollkommen, ebenso wie in meiner Vergleichsmilz von 1924. Die von *Lieb* und *Mladenović* ermittelten Werte des Falles *Hamperl*, und zwar sowohl die Zahlen für Phosphatide als auch die für Kerasin, sind demnach jedenfalls niedriger ausgefallen, als wenn frisches, nicht-fixiertes Material zur Verfügung gestanden wäre.

Es erfolgt daher die inständige Bitte an die geehrten Herren Vorstände der Pathologischen Institute, das Material von *Gaucher*-, *Pick-Niemann*- oder sonstigen für Lipoidextraktionen in Aussicht genommenen Fälle immer unfixiert auf Eis aufzubewahren und die Organe möglichst noch am Tage der Obduktion zur chemischen Untersuchung

zur Verfügung zu stellen. Falls die Organe aus äußeren Gründen längere Zeit aufbewahrt werden müßten, kann man sie in dünne Scheiben zerlegen und mit chemisch reinem Kochsalzpulver pökeln. Präparate, die in Aceton oder Alkohol eingelegt wurden, können nachträglich noch immer einer verlässlichen Untersuchung unterzogen werden, wenn die Originalfixierungsflüssigkeit beigegeben wird.

Zum Schlusse gestatte ich mir, dem Vorstand des Wiener Pathologischen Universitätsinstitutes Herrn Prof. Dr. *Rudolf Maresch* im eigenen sowie im Namen der Herren *Lieb* und *Mladenović* für die Zuweisung des Untersuchungsmaterials und die Ermöglichung unserer Arbeiten den verbindlichsten Dank auszusprechen.
