

(Aus dem Pathologischen Institut der Universitäts-Frauenklinik, Berlin [Vorstand: Prof. *R. Meyer*] und dem chemischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin [Direktor: Prof. *A. Binz*].)

Der Wert des Ciaccioverfahrens zum histochemischen Nachweis von Lipoiden.

Eine Antwort an Herrn Prof. Ciaccio.

Von

Privatdozent Dr. C. Kaufmann und Privatdozent Dr. E. Lehmann
Assistent an der Universitätsfrauenklinik der Charité Assistent am chemischen Institut.
(Direktor Professor *G. A. Wagner*)

(Eingegangen am 3. August 1931.)

Wir haben in einer Reihe früherer Arbeiten die Brauchbarkeit der verschiedenen, zur Differenzierung bestimmter Fett- und Lipoidgruppen im Gewebe angegebenen, histochemischen Färbeverfahren geprüft. Auf Grund eingehender Untersuchungen haben wir diese Methoden als unbrauchbar ablehnen müssen. Für uns besteht auf Grund unserer experimentellen Belege nicht der geringste Zweifel, daß mit dem üblichen Färbeverfahren eine Differenzierung der Lipoide im Gewebe *nicht* gelingen kann. Da bereits von anderer Seite vor uns besonders auf Grund vergleichender chemischer und histochemischer Organanalysen der Boden für die Kritik „der färberischen Fettanalysen“ genügend vorbereitet war, haben unsere Untersuchungen im allgemeinen völlige Zustimmung erfahren. Z. B. bei *L. Pick, Epstein*; letzterer schreibt: „Eindringlichst ist zu warnen vor der so häufig in den Vordergrund gestellten Bewertung der histochemischen Färbemethoden zur Entscheidung strittiger Lipoidbefunde, die mit Ausnahme der Sudanfärbung als unbedingt unzuverlässig abzulehnen sind“¹. Als einzige uns bekannte Ausnahme müssen wir eine Folge von Arbeiten vermerken, in denen *Ciaccio* sich bemüht, unsere an seinem Verfahren geübte Kritik zu entkräften.

Ciaccio hat ein bekanntes Verfahren angegeben, dem eine Spezifität für die Darstellung der „Lipoide im engeren Sinne“ zukommen soll. Der Kernpunkt der Methode liegt in der Behandlung mit Kaliumbichromat, das eine elektive Fixationswirkung auf Lipoide ausüben soll. Die chromierten Lipoide sollen in der nachfolgenden Behandlung

¹ Virchows Arch. 281. 198.

mit organischen Lösungsmitteln unlöslich sein, während die nicht-chromierten Fettstoffe, die nicht zur Gruppe der Lipode gehören, durch Alkohol ausgezogen werden sollen.

Mit welchen experimentellen Unterlagen haben wir die Unrichtigkeit dieser Annahme belegt? Entscheidend für die Beurteilung der Methode ist unser Nachweis, daß Stoffe, die *nicht* zu den Lipoiden gehören — entgegen der Annahme *Ciaccios* — nur teilweise nach Chromierung durch die nachfolgende Alkoholbehandlung entfernt werden. Von einer bestimmten Trioleinmenge wurden in unseren Versuchen nur 47% nach Ciacciobehandlung durch Alkohol entfernt. Da also die Neutralfette nachweislich nicht annähernd mengenmäßig entfernt sind, werden sie bei der nachfolgenden Sudanfärbung gefärbt. Somit ist die Methode kein spezifisches Verfahren zum Nachweis einer bestimmten Lipoidgruppe. In seinen neuen Mitteilungen erhebt *Ciaccio* Einwände gegen unsere Untersuchungen, indem gleichzeitig von ihm einige histochemische und neue chemische Untersuchungen mitgeteilt werden, die erneut die Zuverlässigkeit seiner Methode erweisen sollen.

Gegen die histochemischen Versuche ist folgendes zu sagen:

Ciaccio glaubt den Wert seiner Methode auf zweierlei Weise erneut belegen zu können. Erstens durch Einbettung der Fette in Gelatine oder in Holundermark, das mit Gelatine umhüllt wird, zweitens durch Emulgierung der Fette mit der Chromlösung in Zentrifugierröhrchen. Zum ersten Verfahren ist zu sagen, daß hierbei vorwiegend die Gelatine chromiert wird, so daß das Chrom an die Fettstoffe kaum herankommt. Das zweite Verfahren ist deshalb ungeeignet, weil die Phosphatide die Chromverbindung rasch adsorbieren, Olein und Ölsäure aber viel langsamer, erst nach Spaltung und Oxydation. Die reaktionsfähige Oberfläche in den von *Ciaccio* verwendeten Emulsionen ist für das Olein viel zu klein, die Einwirkungsdauer der Chromatlösung daher viel zu kurz, als daß man eine augenfällige Wirkung erwarten könnte. Wir bedauern es sehr, daß *Ciaccio* die Vollständigkeit der Extraktion des Oleins nach der Chromierung nicht durch quantitative Analysen belegt hat, da hierin — wie immer wieder betont werden muß — der Kernpunkt des ganzen Verfahrens liegt. Was die Einwirkung des Chroms auf die Phosphatide betrifft, so findet auch *Ciaccio*, daß gewisse Mengen phosphorhaltiger Stoffe nach der Chromierung durch Lösungsmittel extrahierbar sind. Er bestätigt damit unsere Befunde, aus denen wir entnehmen, daß die Fixierung der Phosphatide durch die Chrombäder unvollständig ist. Wenn *Ciaccio* sagt, daß diese phosphorhaltigen Stoffe „nicht die Konstitution der bekannten Phosphatide zeigen“, so können wir dem durchaus bestimmen. Doch müssen wir hinzufügen, daß dies nur die Spaltprodukte der Phosphatide sein können, und nicht, wie *Ciaccio* annimmt, „undefinierbare komplexe Verbindungen von Lipophosphorsäuren mit stickstoffhaltigen Substanzen“.

In der chemischen Versuchsreihe teilt *Ciaccio* Versuche mit, die er an frischer und an chromierter Meerschweinchenleber ausgeführt hat. Die Beurteilung dieser Untersuchungen ist dadurch sehr erschwert, daß *Ciaccio* sein chemisches Verfahren nur unvollständig wiedergibt. *Ciaccio* findet, daß aus frischen und aus chromierten Organen gleich viel Triglyceride, die als Fettsäuren bestimmt werden, mit Aceton ausziehbar sind. Dabei trennt er Phosphatide und Triglyceride durch Fällen der Organextrakte mit Aceton. Dieses Verfahren muß abgelehnt werden, da sich eine quantitative Trennung von Phosphatiden und Triglyceriden durch einfaches Fällen mit Aceton nicht erreichen läßt. Wir haben bereits früher nachgewiesen, daß Lecithin bei Anwesenheit anderer Fettstoffe in erheblichem Maße in Aceton löslich ist. Den von *Ciaccio* angeführten Analysenzahlen können wir somit eine Beweiskraft nicht zusprechen. Ferner ist den Ausführungen *Ciaccios* nicht zu entnehmen, ob Organstücke oder Organpulver extrahiert worden sind. Dieses ist für den Erfolg der Extraktion von wesentlicher Bedeutung. Für die Entscheidung der Frage, ob die Triglyceride während der *Ciacciobehandlung* durch die Alkohol-Xylolreihe vollständig oder unvollständig entfernt werden, besagt daher dieser Versuch nichts, besonders auch deshalb, weil die extrahierende Wirkung der Alkohol-Xylolreihe beim *Ciaccio*-prozeß schon wegen der begrenzten Dauer der Einwirkung nicht erschöpfend sein kann.

Völlig unhaltbar ist der Einwand, den *Ciaccio* gegen unseren Nachweis der Ölsäure im *ciacciobehandelten* Organ erhoben hat. Bedauerlicherweise ist das von uns zu diesem Zwecke angewandte Verfahren falsch wiedergegeben. Man kann eine Behandlung der *Ciaccioorgane* mit 2% iger Salzsäure (daß *Ciaccio* uns die Benutzung von 50 bis 60% iger! Salzsäure zuspricht, sei nur als chemische Kuriosität vermerkt) nicht als grob bezeichnen, da bekannt ist, daß Lecithin gegen Säuren recht widerstandsfähig ist. Wir haben uns überzeugt, daß Lecithin eine Behandlung mit 2% iger Salzsäure verträgt. Es bedarf kaum einer näheren Begründung, daß es zum Nachweis der Ölsäure, die nach der Einwirkung von Chromat als Chromsalz vorliegt, keine andere Möglichkeit gibt, als die Ölsäure aus ihrem unlöslichen Salz mit einer stärkeren Säure (2% ige Salzsäure) freizumachen. Wenn *Ciaccio* unsere an fettbeladenem Holundermark erhaltenen Befunde, daß die Lipide nach dem *Ciaccioverfahren* teilweise noch extrahierbar sind, als technisch bedingte Fehldeutungen beurteilt, so übersieht er hierbei, daß wir den gleichen Nachweis am *ciacciobehandelten* Organ erbracht haben (II. Teil unserer Arbeit S. 386 u. f.).

Der Kernpunkt für die Beurteilung des *Ciaccioverfahrens* liegt in dem von uns erbrachten Nachweis, daß die Neutralfette bei dem Verfahren nicht quantitativ entfernt werden. Dieser Beweis ist nicht widerlegt.

Wir sehen daher in den neuen Mitteilungen keine Widerlegung unserer Feststellung, daß die ciacciopositiven Fettstoffe ein Gemisch von Fettstoffen ungesättigten Charakters darstellen.

Es muß weiterhin daran festgehalten werden, daß eine Abgrenzung einer bestimmten Gruppe von Fettstoffen durch die Ciacciomethode nicht möglich ist.

Schrifttum.

Ciaccio: Boll. Soc. Biol. sper. 5, H. 5 (1930). Mitt. 1 u. 2. C. r. Assoc. Anat. 25, Reunion Amsterdam 1930. — *Kaufmann, C. u. E. Lehmann*: Zbl. Path. 37 (1926). Virchows Arch. 261, H. 2 (1926); 270, H. 2 (1928).