

(Aus der Pathologisch-anatomischen Abteilung des Staatsinstituts für experimentelle Medizin in Leningrad [Vorstand: Prof. Dr. N. Anitschkow].)

Über die Lipoidsubstanzen in Zellen mesenchymaler Herkunft.

Von

Dr. J. Goldmann.

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 29. Juni 1932.)

Der Nachweis verschiedener Fettsubstanzen in den Geweben stellt bekanntlich schon seit *Virchow* ein aktuellstes Problem dar, das bei weitem noch nicht gelöst ist. Selbst in der Frage über die Lipoideinschlüsse in normalen Zellen herrscht trotz des überaus großen Schrifttums eine außerordentliche Meinungsverschiedenheit. Ebenso finden wir in den Arbeiten der allerletzten Zeit, die der Auffindung von Lipoideinschlüssen in normalen und pathologisch veränderten Zellen mesenchymaler Herkunft gewidmet sind, ein äußerst starkes Auseinandergehen der Ansichten, z. B. in der Frage über Lipoidstoffe in den Leukocyten. Die Ursache dieser Meinungsverschiedenheiten sehen wir vor allem in der Färbungsmethodik, die von verschiedenen Forschern angewandt wurde.

Cesaris-Dehmel glaubt, daß in Leukocyten außer den phagocytierten Einschlüssen Fettstoffe nur von rein degenerativen Charakter vorkommen. *Neumann* gelang es, die Lipoidnatur der gewöhnlichen eosinophilen Körnelung der Pferdeleukocyten zu erweisen. Hinsichtlich der Leukocyten des Menschen finden sich Hinweise auf die lipoide Struktur der Granula der Leukocyten in den Arbeiten von *Savini, Gorecki und Słonimski*. Diese Untersucher erhielten mittels der von ihnen ausgearbeiteten Methodik der Sudanfärbung eine positive Färbung in den Eosinophilen und Neutrophilen. *Alexejew*, der sich speziell mit der Erforschung der Fetteinschlüsse in den Leukocyten beschäftigte, fand sie in normalen Leukocyten nicht und nur selten im Blute bei einigen Krankheiten.

Eine eingehendere Beschreibung der lipoiden Körnelung in den Blutleukocyten gehört *Sehrt*. Lipoide Körnelung stellte er in den Eosinophilen, Neutrophilen, Basophilen und in einem Teil der Monocyten des Menschen fest. Mit Hilfe der von mir vorgeschlagenen Methodik gelang es mir, eine lipoide Struktur in bestimmten Blutzellen nicht nur im peripherischen Blut, sondern auch in den Geweben festzustellen. *Dabelow* entdeckte in den Lymphknoten nach Fütterung der Tiere mit Fetten sudanophile Einschlüsse in den Leukocyten und schreibt den letzteren eine Phagocytenrolle zu. Die Angaben *Sehrt*s wurden der Meinung *Dabelows* nach am pathologischen Material erhalten. Bei Vergleichstieren (Ratten und Mäusen) konnte nämlich *Dabelow* niemals Lipoideinschlüsse in den Leukocyten

nachweisen. Endlich führt *Carminati*, welcher die Fetteinschlüsse in den Leukozyten an Hand seiner vervollkommenen Methodik der Sudanfärbung erforschte, merkwürdig kleine Zahlen positiver Befunde von Leukozyten mit Lipoideinschlüssen an: von 0—5% bei Menschen, und noch weniger bei Mäusen.

Nach meinen Angaben jedoch beträgt der positive Befund von Lipoiden in den eosinophilen und neutrophilen Leukozyten sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen in normalen Verhältnissen 100%.

Die Feststellung lipoider bzw. sudanophiler Granula im Zelleib hängt, wie oben gesagt, von dem angewandten Verfahren ab, was schon lange die Mehrzahl der Forscher berücksichtigten.

Zahlreiche Arbeiten, die der histochemischen Differenzierung gewidmet sind, zeigten die Ungenauigkeit der vorgeschlagenen Methoden, wie die Nilblausulfatfärbung, sowie die Färbung nach *Dietrich*, *Ciaccio* u. a.; diese Methoden erwiesen sich bei der Ansammlung neuen Materials (*Kaufmann* und *Lehmann*) als unzureichend. Sogar die Differenzierung der Fettsubstanzen mittels des Polarisationsmikroskops hat ihre Mängel (*Plenge*).

Bei der Lipoidfärbung mit Sudan III (Scharlach-R) α -Naphthol mit nachträglicher Einwirkung der Osmiumsäure gelang es mir Präparate zu bekommen, in welchen die Lipoide intensiv rot, dagegen die Neutralfette schwarz tingiert waren. Auf diese Weise färbte ich z. B. Präparate vom Knochenmark sowie benutzte diese Methode zur Differenzierung der Fetteinschlüsse in den Zellen des Nervensystems von den Lipoiden. Aber diese Methode gründet sich nur auf dem quantitativen Unterschied im Verhalten der Lipoide und Fette zur Osmiumsäure. Bei länger dauernder Wirkung der Osmiumsäure auf Sudanpräparate schwärzen sich auch die Lipoide.

Die beste Methode der Lipoidfärbung ist bekanntlich die Färbung mit Sudan III (Scharlach-R). Trotzdem bestehen unter den Forschern gerade über die *sudanophilen* Einschlüsse große Meinungsverschiedenheiten, besonders über Lipoideinschlüsse in Leukozyten.

Als wesentliche Verbesserung der Sudanfärbung betrachtet *Romeis* die Anwendung einer schwachen (40°) alkoholischen Lösung des Sudans. Er ging dabei von den Angaben *Kaufmanns* und *Lehmanns* aus, daß verschiedene Lipoide, die sich einzeln mit 70%iger Sudanlösung färben, in ihren Gemischen nicht gefärbt werden, eine Färbung kommt nur bei Anwendung einer schwächeren Farbstofflösung zu stande. *Sehrt* empfiehlt eine geringe Abweichung von der üblichen Konzentration der alkoholischen Sudanlösung, statt 70° nur 68° . Ich benutzte auch schwächere Konzentrationen des Farbstoffs, jedoch ohne wesentliche Abweichungen der dabei erzeugten Ergebnisse.

Als den wichtigsten Faktor für die Erzielung der Farbstoffwirkung betrachte ich den Kolloidalzustand der Farbstofflösung. So wird beim „Altwerden“ der Farbstofflösungen ihre Färbungsfähigkeit erheblich herabgesetzt und beim wiederholten Kochen wiederhergestellt, erhebliche Veränderungen in der Alkoholkonzentration spielen dabei keine wesentliche Rolle. *Romeis* weist darauf hin, daß die Lösungen des Sudans III in Alkohol von gewöhnlicher Konzentration die Fettstoffe teilweise ausziehen, während bei der Anwendung des 40%igen Alkohols eine Fettextraktion nicht zustande kommt. Bei Anwendung solcher schwächeren Sudanlösungen im Alkohol konnte ich niemals irgendwelche neuen Elemente entdecken, die sich positiv färben, obgleich anstatt der gewöhnlichen Färbung im Laufe von 10—20 Min. die Schnitte und Blutausstriche im Laufe von 24 und 48 Stunden gefärbt wurden.

Auf die wichtige Rolle des kolloidalen Zustandes des Farbstoffes bei der Lipoidfärbung weisen im Gegensatz zu *Romeis*, *Froboese* und *Spröhnle* hin. Nach meinen Beobachtungen kann die vorläufige kurze Bearbeitung der Präparate mit Alkohol

(bis 95%) in einigen Fällen das Ergebnis sogar verbessern. Einige vorgeschlagene Abänderungen der Sudanfärbung, wie z. B. die Anwendung stärkerer Lipoidlösungsmitte — des Acetons (*Herxheimer*) — gründen sich auf der teilweisen Zerstörung der Lipoidgemische, wodurch eine bessere Färbung erzielt wird.

Nach diesen kurzen Angaben über einige Methoden der Lipoidfärbung gehe ich zu den Ergebnissen über, die von mir bei der Anwendung meiner Lipoidfärbung erzielt wurden.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel nicht nur die Anwesenheit von Lipoideinschlüssen in diesen oder jenen Zellen mesenchymaler Herkunft festzustellen, sondern nach Möglichkeit die Bedingungen ihres Auftretens (und Verschwindens) in den Zellen zu klären. Die Bedingungen des Lipoidauftretens in diesen Zellen versuchte ich durch Verfütterung dieser Stoffe zu klären.

Versuchsmethodik. Als Versuchstiere dienten Kaninchen, Meerschweinchen, weiße Ratten und Mäuse. Die Tiere erhielten täglich 5—15 Tage lang Cholesterin in Form einer 5%igen Lösung in Sonnenblumenöl in den Magen eingeführt. Den Kaninchen und zum Teil den Meerschweinchen führte ich Cholesterin durch Sonde ein, in Versuchen an Mäusen und Ratten wurde das Futter (Brot) mit Cholesterinöl getränkt. Außerdem wurden die Tiere 24 Stunden vor Abschluß des Versuchs mit Trypanblau und Tusche vital gespeichert. Kaninchen wurde eine 1%ige Tuscheaufschwemmung in physiologischer Lösung (5 ccm) in Blutadern, weißen Mäusen 0,5 ccm Tuschaufschwemmung in die Schwanzvene, Ratten 3 ccm und den Meerschweinchen 5 ccm einer 1%igen Trypanblaulösung unter die Haut eingeführt. Durch Einführung des Kolloidfarbstoffes und Tusche verfolgte ich nur das Ziel, die Zellen des Reticuloendothelsystems einigermaßen zu kennzeichnen.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden den Versuchstieren Stückchen verschiedener Organe (Milz, Leber, Lymphknoten, Lungen usw.), bei Kaninchen auch dem Knochenmark entnommen. Bei allen Tieren wurden auch Zupfpräparate aus lockeren Bindegewebe zum Teil auch schon nach der Formolfixierung vorbereitet. Die Organe eben getöteter Tiere wurden in 10—20%igem Formalin (auf physiologischer NaCl-Lösung) fixiert. Außerdem wurden auch Blutausstriche vor Beginn und nach Abschluß der Versuche angefertigt. Die Färbung von Gefrierschnitten (5—10 μ) geschah mit Sudan- α -Naphthol mit Nachfärbung mit Hämatoxylin nach der von mir bereits veröffentlichten Methode.

Da der Zweck dieser Versuche die weitere Klärung der Frage über die Bildung der Lipoideinschlüsse in den Zellen war, so sei hier vor allem die Morphogenese der Lipoidgranula auf Grund meiner früheren Ergebnisse berührt, die bei der Erforschung sowohl des embryologischen als auch des vergleichend-anatomischen Materials gewonnen wurden.

Die charakteristischen Merkmale der Lipoideinschlüsse, die ständig in den Leukocyten vorkommen, sind das Auftreten der Granula in einem bestimmten Reifungsstadium dieser Zellen, der Zusammenhang der Lipide mit Eiweiß (bzw. mit einer bestimmten Leukocytenkörnelung) und die Möglichkeit des Verschwindens des lipoiden Substrats unter pathologischen Bedingungen. Die Lipoidkörnelung, das Zeichen der myeloiden Reihe, tritt nicht in den jungen Stammzellen (Myeloblasten) auf, sondern nur bei ihrer weiteren Reifung. Das sieht man sehr deutlich bei der Untersuchung des Blutes von Embryonen sowie bei Krankheiten blutbildender

Organe, bei Myelosen. Die Nichtberücksichtigung der Erscheinung der Lipoidegranula nur in bestimmten Reifungsstadien der Leukocyten bildet eine Fehlerquelle in der vorliegenden Frage. Freilich fehlen noch im Schrifttum ausreichende Angaben über den Auftritt der Lipoidegranula in den Leukocyten, man stützt sich in der Frage nach der Entstehung von Zellen der myeloischen Reihe hauptsächlich auf die „Oxydasereaktion“. Nun liegt aber zwischen den Lipoide und Oxydasegranula in den Leukocyten, wie spezielle Arbeiten einer Reihe von Forschern, insbesondere von *Sehrt*, gezeigt haben, ein engster Zusammenhang vor.

Besonders in der Frage nach der Herkunft der Monocyten gehen bekanntlich die Ansichten der Forscher auseinander. Nach dem Vorhandensein oder Fehlen des Oxydaseferments in diesen Zellen schreiben sie einzelne Untersucher der myeloischen, lymphatischen oder reticulo-endothelialen Reihe zu. Nach dem Vorhandensein oder Fehlen der Oxydase (oder der Lipoide), ohne die Alters- und pathologischen Bedingungen zu berücksichtigen, läßt sich jedoch die Frage über die Herkunft der Zellen noch nicht beantworten. Aus diesem Grunde sollte man z. B. auch die Einbeziehung der Myeloblasten in die myeloide Reihe nicht anerkennen, wenn in ihnen noch keine Oxydase- und Lipoidegranula auftreten.

Nach meinen Beobachtungen geben die Monocyten eine positive Lipoidfärbung, aber das Vorhandensein des lipoide Stoffes schwankt in ihnen zum Unterschied von den Zellen der myeloiden Reihe erheblich. In der Norm finden wir oft bei Menschen bis 100% Monocyten mit positiver Lipoidfärbung, bei Monocytosen erheblich weniger. Bei verschiedenen Tierarten schwankt die Menge der Monocyten, die eine Lipoidfärbung geben, sehr stark. Von den Säugetieren fehlen die Lipoide und Oxydasegranula in den Monocyten des Kaninchens gänzlich. Von Interesse ist, daß bei Zerstörung des Oxydaselipoidsubstrats, z. B. durch Erhitzen, eine durchaus verschiedene Widerstandsfähigkeit desselben in den Eosinophilen, Neutrophilen und Monocyten beobachtet wird (*Goldmann*).

Das lipoide Substrat ist in den Leukocyten mit der granulären Substanz des Zelleibes, d. h. mit den Eiweißgranula, verbunden, jedoch können diese beiden Teile auch getrennt nachgewiesen werden. Es ist nämlich sehr leicht, den Lipoidanteil durch Erhitzen oder Einwirkung fettlösender Stoffe zu zerstören und die (spezifische) Eiweißkörnelung zu erhalten.

Der Zusammenhang der Lipoide mit der Leukocytenkörnelung kann auch auf Grund der morphologischen Eigenschaften der Granula angenommen werden, die Lipoidkörnchen der Leukocyten sehen gewöhnlich den spezifischen Granula ganz ähnlich. So erhält man z. B. bei der Färbung auf Lipoide charakteristische Granulaformen für die eosinophile Körnelung bei verschiedenen Tieren (eosinophile beim Pferde, acidophile bei Vögeln, sog. pseudoeosinophile bei Kaninchen usw.).

Einige Forscher (*Nicolet*) sind zur unrichtigen Schlußfolgerung gekommen, daß die Oxydase mit dem intergranulären Substrat der Leukocyten verknüpft sei, weil die sich färbenden Körnchen von größerem Ausmaß als die gewöhnliche Leukocytenkörnelung sind. In vielen Fällen können wir aber in Abhängigkeit von dem Färbungsverfahren, von der Fixierung und dem kolloidalen Zustande des Farbstoffs die Größe der Granula willkürlich ändern, die sich sowohl auf Lipoide als auch auf Oxydase färben. Daher kann zum Unterschied von der Eiweißkörnelung die Größe der lipoiden Körnchen nicht als beständig gelten, und in jedem Fall ist ein Hinweis auf die Methodik und die Bedingungen der Färbung notwendig. Eine verschiedene Größe der Lipoidgranula in Abhängigkeit von der Methodik beobachtet man nicht nur am integralen lipoiden Bestandteil des Zelleibs der Leukocyten, sondern auch in den Zellen, in welchen die Lipoide erst hineingebracht sind (z. B. in den Leberzellen). Die Veränderung der Größe der Lipoidkörnchen ist auch von dem Charakter ihres Eiweißanteils abhängig. So gelingt es leicht, bei Anwendung verschiedener Färbungsverfahren mit Sudan III eine sehr verschiedene Größe der Lipoidkörnchen in Neutrophilen zu erhalten (sie können die Größe der eosinophilen Granula erreichen oder auch größer sein), indessen bleibt die Lipoidkörnelung der Eosinophilen bei den gleichen Bedingungen unverändert, es ändert sich nur der Grad der Färbung ihrer Körnelung.

Die Anwendung verschiedener Färbungsmethoden mit Sudan III gibt einige Anhaltspunkte zum Urteil über Bindung der Lipoide mit Eiweißstoffen der Granula, so z. B. können wir uns von der leichten Färbbarkeit der eosinophilen Granula im Vergleich mit anderen Granula überzeugen. Bekanntlich ist die Darstellung der Eiweißkörnelung der Leukocyten, besonders in den Geweben, öfters mit großen Schwierigkeiten verknüpft, und verlangt ein besonderes, recht verwickeltes Verfahren. Nun gibt uns aber meine Sudanmethode die Möglichkeit, die Leukocytengranula nicht nur im Ausstrich, sondern auch im Gewebe leicht darzustellen.

Sogar im Ausstrich des Blutes gelingt die Darstellung der Eiweißkörnelung aller Leukocyten bei verschiedenen Tierarten nicht, z. B. werden die ungranulierten Leukocyten des Frosches den „ungranulierten“ polymorphkernigen Leukocyten zugezählt (*Klieneberg*), indessen ist die Lipoidkörnelung dieser Leukocyten beim Frosch mit meiner Sudanmethode ebenso leicht darstellbar wie die Körnelung der Neutrophilen des Menschen. So sehen wir, daß das negative Ergebnis der histochemischen Färbung sowohl für den Nachweis der Lipoidenzellstrukturen (*Kaufmann* und *Lehmann*) als auch für die Eiweißgranula nicht überzeugend sein kann.

Da das lipoide Substrat mit der granulären Substanz der Leukocyten verknüpft ist, so entsteht die Frage, in welcher Art der Leukocytengranula wir eben die Lipoidsubstanz entdecken. Bei der Lipoidfärbung

nach meiner Methode erhält man eine positive Färbung in Eosinophilen, Neutrophilen und Monozyten (in Abhängigkeit von der Tierart — beim Menschen sind im allgemeinen die Monozyten lipoidpositiv); was die Basophilen anbetrifft, so lassen sich die Lipoide nur in jenen Zellen nachweisen, in welchen bei der parallelen Untersuchung mit der üblichen Färbung eosinophile Körnchen erhalten bleiben (junge Basophile). Die Acidophilen bei verschiedenen Tierarten (insbesondere bei Vögeln) sind schon ihrem Aussehen nach nicht gleichartig, und in dieser Hinsicht ist beachtenswert, daß nicht alle Acidophilen eine Lipoidfärbung geben.

Wir glauben, daß die Untersuchung der Lipoidfärbung neue Ergebnisse bei der vergleichend-morphologischen Untersuchung des Bluts für die Bestimmung der Natur der Eiweißstoffgranula geben kann, welche sonst die gleiche Färbung annehmen (z. B. verschiedene Acidophile, die sich in gleicher Weise mit Eosin färben). Die Klärung des physikalisch chemischen Aufbaus des Eiweißstoffanteils der Granula, mit denen die Lipoide verbunden sind, verlangt erhebliche Aufmerksamkeit, jedoch sind in dieser Richtung weitere Untersuchungen notwendig.

Der Zusammenhang des Lipoidsubstrats mit bestimmten Granula wird noch dadurch bewiesen, daß in Neutrophilen beim Auftritt toxischer basophiler Körnelung die Lipoidfärbung verschwindet.

Die Eiweißstoff-Lipoidverbindung in den Leukocyten kann sich unter verschiedenen pathologischen Bedingungen verändern, was auch das Ergebnis der Lipoidfärbung beeinflußt.

Sehr bemerkenswert ist in dieser Hinsicht das beständige Vorkommen von Fetteinschlüssen in Leukocyten, die *in vitro* gezüchtet werden (*Krontowski* und *Polew*). Diese Einschlüsse werden in diesem Fall durch die übliche Sudanfärbung nachgewiesen. In diesen Leukocyten könnte man eine Störung der Eiweißstoff-Lipoidverbindung annehmen, obgleich auch ein Eindringen von Fett in einigen Leukocyten nicht geleugnet werden kann.

Weiterhin ist die Veränderung der Lipoideiweißstruktur im Eiter beachtenswert. Schon *a priori* müssen wir eine erhebliche Veränderung in der Lipoideiweißstruktur der Leukocyten im Eiter annehmen, da in ihnen die Lipoidkörnelung auch bei gewöhnlicher Sudanfärbung nachweisbar ist. Viele Untersucher sprechen daher von einer „Fettdegeneration“ der Leukocyten im Eiter.

Für meine Untersuchungen wurde Eiter aus verschiedenen Hautabscessen bei Menschen genommen. Außerdem untersuchte ich verschiedene Gewebe mit Eiterherden (eitrige Lungenentzündungen usw.). Nach Sudanfärbung der Eiteraussstriche nach meinem Verfahren sieht man schon makroskopisch eine ausgesprochene rote Färbung des gesamten Präparats. Mikroskopisch sind die erhaltenen Leukocyten von formlosen Fettmassen umgeben. In vielen neutrophilen Leukocyten findet man neben den erhaltengebliebenen Lipoidgranula zusammenfließende Lipoid-

massen, in anderen ein völliges Verschwinden der Lipoidfärbung mit Erhaltenbleiben des Kerns, der größtenteils verschiedene Stadien der Nekrobiose (Pyknose, Karyorhexis) zeigt. Entsprechende Veränderungen beobachtet man auch in veränderten Geweben entsprechend den Leukozytenherden. Diese Veränderungen der Lipoidgranula der Leukocyten bei ihrer Entartung kann man auf Grund der oben angeführten Vorstellung über die Eiweißstoff-Lipoidverbindung als eine Störung der Bindung des Lipoidsubstrats mit der Eiweißstruktur auffassen. In Eiterleukocyten kommt scheinbar eine tiefe Veränderung der Eiweißgranula zustande, wobei die Bindung des Eiweißteils mit dem Lipoid zerstört wird; infolgedessen färbt sich der Lipoidanteil schon mit der gewöhnlichen Sudanmethode, die Lipoidkörnchen fließen zusammen und können dann gänzlich aus dem Zelleib austreten.

Auf diese Weise ist die frühere Ansicht über das Wesen des Vorgangs bei der Erscheinung der Fetteinschlüsse in pathologisch veränderten Leukocyten nicht mehr haltbar; diese Veränderung ist nicht als eine Neuentstehung der Fettsubstanzen aus dem Zelleiweiß („Fettransformation“), sondern als die Äußerung einer Veränderung des protoplasmatischen Lipoidanteils, als eine „Fettdekomposition“ zu betrachten (Aschoff).

Wenn somit Veränderungen der Eiweiß-Lipoidverbindung der Zellen die Färbbarkeit mit Sudan III bedingen kann, so entsteht die Frage, ob auch nicht verschiedene Bedingungen des Gewebsmediums eine ähnliche Wirkung geben können, selbst dann, wenn das Eiweiß-Lipoidsubstrat der Zelle unverändert ist. Die Lösung dieser Frage ist von großer Bedeutung. Im Schrifttum schreibt man nämlich den Leukocyten auf Grund der Feststellung sudanophiler Einschlüsse eine aktive Rolle im Fettstoffwechsel zu. Besonders bemerkenswert ist es, daß manche Forscher die Rolle der Fettphagocyten im Darm bei Versuchstieren gerade den Eosinophilen zuschreiben (Schatzillo), deren Granula, wie erwähnt, am leichtesten die sudanophile Färbung aufnehmen. Meine Vergleichsuntersuchungen zeigten, daß man mit der von mir vorgeschlagenen Methodik im Darm der Hunde Lipoide nicht nur in Eosinophilen, sondern auch in anderen Blutzellen erhält, die überhaupt eine positive Sudanfärbung geben. Bei der Erforschung der Lipoidkörnelung der Leukocyten in inneren Organen, z. B. in der Leber und in den Lungen, konnten wir uns davon überzeugen, daß die Färbung der Lipoidkörner sehr deutlich hervortritt, mitunter in Form zusammenfließender Schollen. Die Forscher, welche die Leukocyten mit Fetteinschlüssen in der Leber und in den Lungen beschreiben und daraus den Schluß ziehen, daß diese Leukocyten sich am Fetttransport beteiligen, berücksichtigen anscheinlich nicht den Umstand, daß auch normale Leukocyten Lipoide enthalten. Die Frage über die Beteiligung der Leukocyten im Fettstoffwechsel müßte daher erneut geprüft werden.

Die Tatsache der Färbung normaler Leukocyten in den inneren Organen in einigen Fällen auch mit der gewöhnlichen Sudanmethode verdient eine besondere Beachtung. Welche Bedingungen des Gewebsmediums die Färbung der Lipoidgranula in den Organen beeinflussen, ist schwer zu sagen.

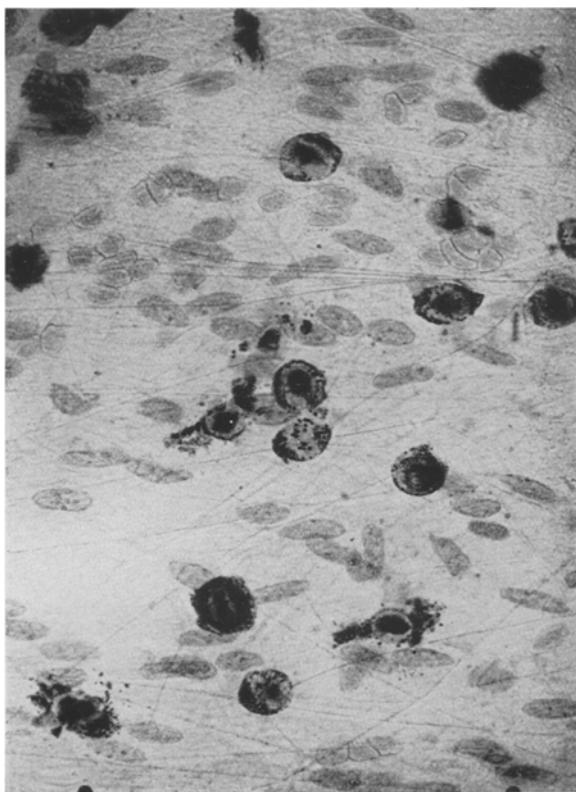


Abb. 1. Lockeres Bindegewebe der normalen Maus. Zahlreiche Leukocyten mit Lipoidgranula. In einigen Leukocyten sind ringförmige Kerne deutlich zu sehen. Zahlreiche blasse Fibrocytenkerne. Das Gewebe ist von feinen elastischen Fasern durchsetzt. Färbung: Sudan- α -Naphthol-Hämatoxylin. (Mikrophotogramm.)

In meinen Fütterungsversuchen mit Cholesterinöl wollte ich feststellen, ob nicht die Einführung der Lipoide das Auftreten der Lipoide auch in jenen Blutzellen bedingen könnte, in welchen in der Norm die Lipoidstruktur fehlt, z. B. in den Lymphocyten, sowie in den Monocyten des Kaninchens. Bei unseren Versuchstieren konnten wir jedoch unter dem Einflusse lange dauernder Einführung der Lipoide keinen Unterschied in der Färbung der „integralen“ Lipoidgranula der Leukocyten zu den Vergleichstieren bemerken, die Zellen mit lipoidnegativen Granula

sowohl im Blut als auch in den Geweben verhielten sich auch in diesen Versuchen der Lipoidfärbung negativ; eine Lipoideanreicherung beobachtete man dabei nur in den Zellen des Reticuloendothels (infiltrative Lipoideinschlüsse). Dieser Umstand weist darauf hin, daß die Leukocyten im Gegensatz zu den Zellen des Reticuloendothelsystems sich am Vorgang

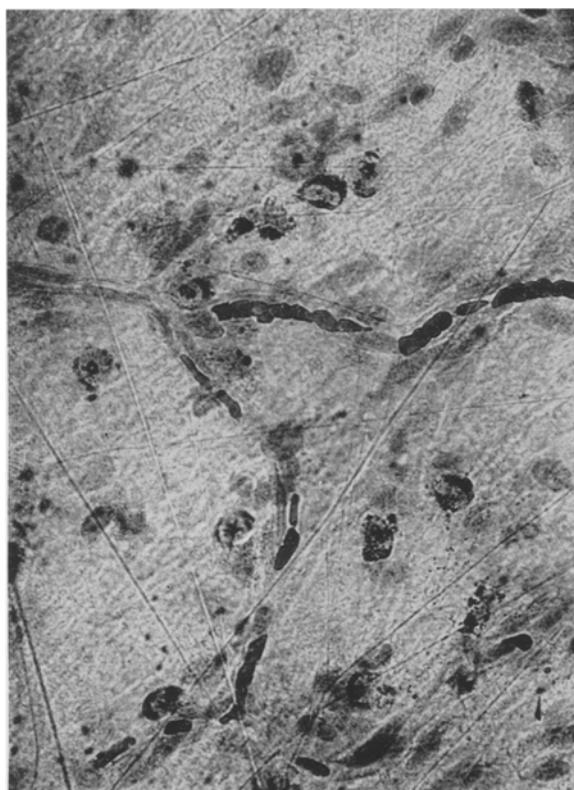


Abb. 2. Lockeres Bindegewebe der normalen Ratte. Zahlreiche Leukocyten mit Lipoidgranula. In der Mitte eine Capillare, Fibrocytenkerne und feine elastische Fasern. Färbung: Sudan- α -Naphthol-Hämatoxylin. (Mikrophotogramm.)

der Speicherung und Übertragung der Lipoide bei der Lipoidsättigung des Körpers nicht beteiligen.

Um die Färbbarkeit der Lipoidgranula mit Sudan III in verschiedenen Bedingungen des Gewebsmediums zu verfolgen, untersuchte ich die Lipoidfärbung auch im lockeren Bindegewebe. Die Färbung mit der von mir angewandten Methode erlaubt eine so deutliche Darstellung der lipoiden Granula der Leukocyten, daß dieses Verfahren für den Nachweis der myeloiden Zellen im lockeren Bindegewebe eine besondere Beachtung verdient. Jedoch stellt das lockere Bindegewebe in dieser Hinsicht die

Schwierigkeit dar, daß das Vorhandensein der Zellen der myeloischen Reihe hier auch in der Norm bei verschiedenen Tieren erheblich schwankt. Während beim Kaninchen in Zupfpräparaten Leukocyten fast gar nicht zu finden sind und im Bindegewebe beim Meerschweinchen nur vereinzelt vorkommen, tritt bei Ratten und besonders bei Mäusen eine sehr große Menge freiliegender Leukocyten auf (Abb. 1 und 2).

Die Artunterschiede des lockeren Bindegewebes in Hinsicht der Leukocytenmenge sind bereits im Schrifttum beschrieben [„leukozytenarmes“ und „leukozytenreiches“ Gewebe (*Stockinger*)]. In Präparaten des lockeren Bindegewebes von Mäusen, wo ein beständiges Vorhandensein einer sehr großen Anzahl von Leukocyten verzeichnet wird, gelang es mir, eine ungleiche Leichtigkeit und Stärke der Färbung der Lipoidgranula der Leukocyten innerhalb und außerhalb der Blutgefäße nachzuweisen. Die Lipoidgranula der Leukocyten, die innerhalb und um die Gefäße liegen, färben sich nämlich stärker. Es gelingt auch Unterschiede in der Lipoidfärbung der Leukocyten im Bindegewebe der neugeborenen und der ausgewachsenen Mäuse zu bemerken. Bei neugeborenen Tieren gelingt die Lipoidfärbung der Leukocyten im Bindegewebe überhaupt schwieriger, außerdem sind hier auch bedeutend weniger Leukocyten als bei Erwachsenen vorhanden. Bei Mäuseembryonen fehlen im Bindegewebe sogar in späteren Stadien vor der Geburt die Leukocyten gänzlich (*Boeninghoff*).

Nun gehen wir zu jenen Zellen mesenchymaler Natur über, in welchen die Einführung der Lipoide den Gehalt an Lipoid Einschlüssen unmittelbar beeinflußt, zu den reticuloendothelialen Zellen. Freilich beschränkte sich in meinen Versuchen die Infiltration mit Lipoiden nicht ausschließlich auf das Reticuloendothel und trat auch in anderen Zellen auf (z. B. Leberzellen, Epithel der Gallencapillaren, Knorpelzellen der Bronchien usw.) wie das bereits aus dem Schrifttum bekannt ist. Lipoid Einschlüsse können wohl unter gewissen Bedingungen sich in jeder Zelle finden (*Maximow*). Aber die Beteiligung der Zellen des Reticuloendothelialen Systems tritt nach Einführung der Lipoide in den Organismus ganz besonders deutlich hervor.

Wir wollen hier auf Anführung eigener Versuchsniederschriften verzichten. Entsprechende eingehende Beschreibungen der experimentell hervorgerufenen Lipoidablagerungen finden sich in den Arbeiten vieler Forscher (*Anitschkow, Chalatow, Landau u. a.*). Wir werden hier die Ablagerung der Lipoide im Reticuloendothel nur zum Vergleich dieser „infiltrativen“ Lipoid Einschlüsse mit den „integralen“ Lipoiden berühren.

Das Vorhandensein der Lipoide in den Zellen des Reticuloendothelialen Systems weist zum Unterschied von den „integralen“ Lipoidgranula, die nur für bestimmte Zellarten charakteristisch sind keine so große Beständigkeit auf. Nicht nur die Zellen des Reticuloendothelialen Systems verschiedener Tierarten verhalten sich der Lipoid einföhrung gegenüber ungleich,

sondern es reagieren dabei auch Zellen verschiedener Abschnitte des Reticuloendothelsystems nicht im gleichen Grade. Schließlich weisen sogar einzelne Zellen des Reticuloendothelsystems eines und desselben Organs beträchtliche Schwankungen in dem Vorhandensein der Lipoide auf. Bei unseren Versuchstieren war die Ablagerung der Lipoide in den Zellen des Reticuloendothelsystems nach Einführung des Cholesterinöls bei Kaninchen am stärksten ausgeprägt, darauf bei Meerschweinchen und am schwächsten bei Ratten. Unter den Zellen, die dem Reticuloendothelsystem zugezählt werden, waren Lipoideinschlüsse in meinen Fütterungsversuchen bei allen Tieren in den *Kupfferschen* Zellen und im Reticuloendothel der Lymphknoten und der Milz regelmäßig nachweisbar.

Das ungleiche Verhalten der Zellen des Reticuloendothelsystems bei der Aufnahme von Lipoiden ist an den *Kupfferschen* Zellen der Leber besonders deutlich wahrnehmbar. Neben *Kupfferschen* Zellen, deren Leib mit Lipoideinschlüssen vollständig angefüllt war, so daß sogar die Kerne undeutlich hervortraten, waren in anderen Zellen nur einzelne Lipoidkörnchen vorhanden, schließlich fehlten sie in einigen Zellen vollkommen. Die *Kupfferschen* Zellen enthielten neben den aufgenommenen Lipoiden auch Körnchen der eingeführten Tusche. In verschiedenen *Kupfferschen* Zellen bei Kaninchen waren verschiedene Mengen bald der Lipoide und Tuschkörnchen, bald nur Körnchen einer dieser Stoffe vorhanden, schließlich enthielten einige *Kupffersche* Zellen gar keine Einschlüsse.

Bei einigen Tieren waren in den Zellen außer den Lipoiden und zur Markierung eingeführten Stoffen noch andere aufgenommene Massen, wie weiße und rote Blutzellen, Hämosiderin und andere Pigmente vorhanden. In den Gekröselymphknoten des Kaninchens konnten außer Lipoiden auch ein grünes Pigment stets nachgewiesen werden. Den *Kupfferschen* Zellen entsprechend findet man eine ebensolche Unbeständigkeit in der Aufnahme von Lipoiden auch in den Zellen des Reticuloendothelsystems der Milz, der Lymphknoten und des Knochenmarks, was scheinbar für ungleiche Funktion dieser morphologisch gleichartigen Zellen spricht.

Eine weitgehende Abhängigkeit der Lipoidaufnahme in den Zellen des Reticuloendothelsystems von der Menge und Dauer der Einführung des Cholesterinöls kann man nur in den Gekröselymphknoten bemerken. Eine eingehende Beschreibung der Speicherung von Fettstoffen in den Lymphknoten ist in der Arbeit von *Dabelow* enthalten. Wir stimmen *Dabelow* nur darin nicht bei, daß er normalen Leukocyten dieselbe Rolle von Lipoidphagocyten, wie den reticuloendothelialen Zellen zuschreibt. Die in den Lymphknoten vorkommenden Leukocyten enthalten nämlich nach meinen Beobachtungen Lipoideinschlüsse auch unabhängig von der Einführung von Fettstoffen, obgleich diese Granula in normalen Leukocyten durch übliche Färbungsmethoden gewöhnlich nicht nachweisbar

sind. Außer den reifen Leukocyten begegnet man in den Lymphknoten verschiedener Tiere in wechselnder Menge auch jüngeren Zellen, Myelocyten, welche stets lipoide Granula enthalten. Freilich kann die Unterscheidung dieser rundkernigen Zellen von den freiliegenden Reticulozellen mit Lipoideinschlüssen Schwierigkeiten bereiten. Bei der morphologischen Unterscheidung der Lipoideinschlüsse in retikulären und myeloiden Zellen ist auch die verschiedene Stärke der „Färbungsreaktion“ bei verschiedener Dauer der Färbung, Anwendung des Farbstoffes von verschiedenem Kolloidzustand usw. in Betracht zu ziehen. Daß die Lymphorgane auch in der Norm nicht allein Organe der Lymphbildung sondern auch der Myelopoese sind, wird von vielen Forschern angenommen. *Lang* weist auf das Vorhandensein von Myelocyten in den Keimzentren der Lymphknoten normaler Kaninchen hin.

Die in der Milz einiger normaler Tiere (Mäuse und Ratten) immer vorkommenden Megakaryocyten enthalten keine Lipoidgranula. Von den übrigen Organen, die sich an der Aufnahme der Lipoide beteiligen, interessierten mich die Lungen. Diesem Organ schreibt man nämlich, wie bekannt, eine „aktive“ Rolle im Fettstoffwechsel zu (*Roget* u. a.). Bei unseren Versuchstieren fanden sich stets die aufgenommenen Lipoide in wechselnder Menge in den Makrophagen der interalveolären Lungensepten. Viele Lipoidophagen, bisweilen in Gestalt ganzer Anhäufungen, beobachtete ich insbesondere bei Mäusen. Ein Teil der Lipoidophagen lag auch frei im Lumen der Lungenalveolen. Auf die innere noch strittige Frage über die Natur dieser Zellen wollen wir hier nicht eingehen.

Im Endothel der Lungencapillaren, ähnlich dem gewöhnlichen Gefäßendothel, fanden sich keine Lipoideinschlüsse, was gegen die Ansichten von *Oeller*, *Domagk*, *Töppich* u. a. von der Zugehörigkeit dieser Zellen zum Reticuloendothelsystem spricht.

Bei Anwendung meiner Färbungsmethode konnte ich mich von einer großen Anhäufung von Leukocyten in den Lungencapillaren überzeugen. Eine solche Anhäufung von Leukocyten im normalen Lungengewebe beobachtete ich in den Fällen wo im peripherischen Blut eine deutliche Leukopenie bestand (*Staemmler*) (Abb. 3). So erreichte bei einigen solchen Mäusen die Neutropenie im Blut der Schwanzvene 4—6%.

Außer der Untersuchung des Reticuloendothelsystem der oben genannten Organe vom Standpunkt der Lipoidaufnahme berücksichtigte ich auch das Verhalten der Histiocyten des lockeren Bindegewebes bei Cholesterintieren. In diesen Zellen sind nach der Einführung des Cholesterinöls in dem von mir untersuchten Zeitpunkte keine Lipoideinschlüsse nachweisbar. Einzelne Histiocyten und Fibrocyten mit Fetteinschlüssen beobachtete ich im lockeren Bindegewebe auch bei Vergleichstieren.

Schließlich suchte ich bei allen meinen Versuchstieren nach Lipoidophagen auch im Blute. Solche Lipoidophagen fanden sich nur in den

Capillaren innerer Organe (Milz, Leber), im peripherischen Blute aber konnte ich keine nachweisen. Die Rolle von Makrophagen im peripherischen Blut gehört bekanntlich den monocytairen Zellen (Bluthistiozyten). Befunde solcher Monocyt-Lipoidophagen wären von Interesse im Sinne des Verhaltens der phagocytierten Lipoide zu der monocytairen „integralen“ Lipoidkörnelung.

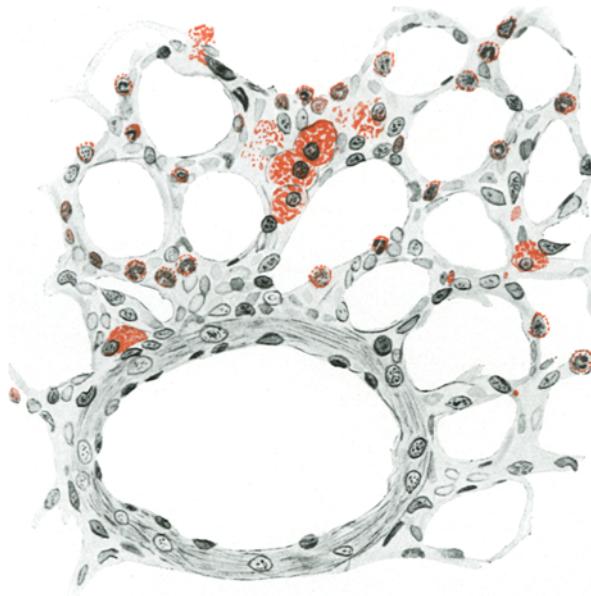


Abb. 3. Lunge einer mit Cholesterinöl im Laufe von 10 Tagen gefütterten Maus. In den Lungensepten einige große lipoidhaltige Makrophagen und zahlreiche Leukocyten mit „integralen“ Lipoidgranula. Färbung: Sudan- α -Naphthol-Hämatoxylin.

Daß solche Befunde tatsächlich erhoben werden können, zeigt z. B. der folgende von mir beobachtete Fall. Bei schwerer Malaria gelang es mir 24 Stunden vor dem Tode des Kranken im Coma in dem untersuchten Blute unter den Makrophagen eine erhebliche Menge von Lipoidophagen nachzuweisen. In einigen solcher monocytairen Zellen waren außer den Lipoid Einschlüssen auch Bruchstücke von Erythrocyten und Leukocyten, stellenweise auch Melaninpigment enthalten. Lipoidkörnchen fanden sich in den Monocyten, welche die gewöhnliche „integrale“ Lipoidkörnelung enthielten, als auch in denjenigen, in welchen keine Körnelung vorhanden war.

Das Vorhandensein von phagocytierten Lipoiden ist somit für das Auftreten der „integralen“ lipoiden Körnelung nicht genügend, dafür ist eine bestimmte Eiweißstruktur (wie z. B. in der spezifischen Körnelung der Leukocyten) notwendig. In den Lipoidophagen, in welchen die entsprechende Eiweißstruktur fehlt (z. B. in den entsprechenden Monocyten des Menschen oder in den Monocyten des Kaninchens) oder verändert ist (s. oben), kann die „integrale“ Lipoidkörnelung fehlen.

Bei der Charakteristik unserer „integralen“ Lipoidgranula der Leukozyten wiesen wir schon auf ihren Zusammenhang mit dem Oxydaseferment hin. *Wallbach*, der sich mit dem Studium der Eigenschaften des Oxydaseferments in den Zellen bei Einführung von an Peroxydase reichen Stoffen beschäftigt hat, kommt zum Schluß, daß „die Oxydasegranulation einer Zelle nicht immer als etwas Unveränderliches und Charakteristisches angesehen werden muß, daß vielmehr zwischen exogenen und endogenen Oxydaseablagerungen stets Unterschieden werden muß.“

Aus meinen Arbeiten leuchtet hervor, daß man im Leib der Zellen zwei verschiedene Lipoidsubstanzen unterscheiden muß: die „integrale“ lipoide Körnelung und jene Lipoideinschlüsse, welche einen rein infiltrativen Charakter haben. Diese Lipoide sind voneinander unabhängig. Bei Einführung von Lipoiden (Cholesterinöl) nimmt die Menge der Lipoid einschlüsse in den Zellen des Reticuloendothelsystems bedeutend zu, während die „integrale“ Lipoidkörnelung unbeeinflußt bleibt.

Was die Natur der integralen Lipoidkörnchen betrifft, so sind zur Klärung dieser Frage noch weitere Untersuchungen notwendig, besonders vom Standpunkte ihres Verhaltens zu dem „morphologisch nicht sichtbaren“ jeder Zellen eigenen Lipoide (*Noll*).

Auf Grund unserer Ergebnisse sind folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Außerordentliche Meinungsverschiedenheiten der Forscher in der Frage über die Anwesenheit der Lipoideinschlüsse in den Leukocyten (von 0—100%) hängen von der verschiedenen Methodik der Lipoidfärbung mit Sudan III ab.

2. Die von mir vorgeschlagene Methode der Lipoidfärbung (Sudan- α -Naphthol), erlaubt die normalen Lipoideinschlüsse der Leukocyten sowohl im Blute als auch in den Geweben zu färben.

3. Auf Grund der vergleichend-morphologischen und experimentellen Angaben haben die im Protoplasma nachweisbaren Lipoideinschlüsse einen doppelten Charakter: „integrale“ und „infiltrative“ Lipoideinschlüsse.

4. Die lipoiden integralen Einschlüsse sind mit bestimmter Eiweißstoffgranula der Zellen verbunden. In den lipoidpositiven Leukocyten erscheint das lipoide Substrat nur von einem bestimmten Stadium der Entwicklung dieser Zellen an.

5. Bei Veränderungen der Eiweißstoffkörnelung verändert sich auch die Lipoidstruktur. Unter pathologischen Veränderungen spaltet sich der normale lipoide Anteil vom Eiweißteil ab und kann verschwinden.

6. Unter dem Einflusse der Einführung von Cholesterinöl tritt eine Zunahme der Ablagerung der Lipoide in den Zellen des Reticuloendothelsystems ein, jedoch werden dadurch die „integralen“ Lipoideinschlüsse nicht beeinflußt.

Schrifttum.

Alexejew: Zbl. Bakter. **1** (1927). — *Benninghoff*: Arch. mikrosk. Anat. u. Entw.-mechan. **99** (1923). — *Carminati*: Haematologica (Palermo) **1930**, Nr 5. Ref. Zbl. Path. **51**, Nr 6 (1931). — *Cesaris-Dehmel*: Virchows Arch. **195**, H. 1 (1909). — *Dablow*: Z. Zellforsch. **12**, H. 2 (1930). — *Domagk*: Virchows Arch. **253** (1924). — *Froboese u. Spröhnle*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **16** (1929). — *Goldmann*: Zbl. Path. **46** (1929); Z. Bakter. **112** (1929); Z. mikrosk.-anat. Forsch. **18**, H. 1/2 (1929). — *Gorecki u. Slonimski*: C. r. Soc. Biol. Paris **91**, 57 (1924). — *Jasswoin*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **15** (1918). — *Kaufmann u. Lehmann*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **16** (1929). — *Krontowsky u. Polew*: Beitr. path. Anat. **58** (1914). — Fol. haemat. (Lpz.) **36** (1928). — *Neumann*: Fol. haemat (Lpz.) **36** (1928). — *Nicolet*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **10**, H. 3/4 (1929). — *Noll*: Arch. f. Physiol. **1913**. — *Oeller*: Krkh.forsch. **1**, 28 (1925). — *Plenge*: Virchows Arch. **253** (1924). — *Roget*: Presse méd. **1923**, No 3. — *Romeis*: Virchows Arch. **264**, H. 2; Z. mikrosk.-anat. Forsch. **15** (1928). — *Sawini*: Wien. med. Wschr. **1921**, Nr 46. — *Sehrt*: Histologie und Chemie der Lipoide der weißen Blutzellen. 1927. — *Schatzillo*: Einige Beobachtungen über Aufbau und Entwicklung des Fettgewebes bei Säugetieren. 1914 (russ.). — *Staemmler*: Krkh.forsch. **8**, H. 5 (1930). — *Stockinger*: Z. exper. Med. **58** (1928). — *Töppich*: Krkh.forsch. **3**, 335 (1926). — *Wallbach*: Klin. Wschr. **1928**, Fol. haemat. (Lpz.) **43**, H. 1/2 (1930).