

Auch in Zukunft wird die Entscheidung der für die Pathologie der allgemeinen Lipoidosen so wichtigen chemischen Fragen der exakten Mitarbeit der physiologischen Chemie nicht entarten können.

Schrifttum.

¹ Epstein, E. u. K. Lorenz: Hoppe-Seylers Z. **211**, 217 (1932). — ² Epstein, E.: Virchows Arch. **284**, 867 (1932). — ³ Pick, L.: Über die lipoidzellige Splenohepatomegalie Typus Niemann-Pick. Berlin: L. Schumacher 1927. — ⁴ Bielschowsky, M.: J. Psychol. u. Neur. **36**, 103 (1928). — ⁵ Kufs, H.: Z. Neur. **139**, 802 (1932). — ⁶ Spielmeyer, W.: Klin. Wschr. **1933**, Nr 33, 1273—1276. — ⁷ Schaffer, K.: Arch. f. Psychiatr. **93**, 767 (1931). — ⁸ Sánthá, K. v.: Arch. Psychiatr. **93**, 675 (1931). — ⁹ Hamburger, R.: Jb. Kinderheilk. **116**, 41 (1927). — ¹⁰ Sobotka, Harry c. suis: Arch. of Path. **10**, 677 (1930). — ¹¹ Pighini, G. u. P. Barbieri: Z. Neur. **25**, 353 (1914). — ¹² Sánthá, K. v.: Arch. f. Psychiatr. **101**, 593 (1933). — ¹³ Tay, Waren: Trans. ophthalm. Soc. U. Kingd. **1**, 55 (1881). — ¹⁴ Smetana, Hans: Virchows Arch. **274**, 697 (1930).

II.

Über die Aufspaltung der Hirnphosphatide durch wäßrige Formalinlösung in wasserlösliche Spaltprodukte*.

Von
Emil Epstein und Karl Lorenz.

Im Zuge der voranstehend veröffentlichten Untersuchungen über den Gehalt an ätherlöslichen Phosphatiden der Gehirne bei infantiler amaurotischer Idiotie vom Typus *Tay Sachs* zeigte sich zunächst, daß die in 10%iger wäßriger Formalinlösung aufbewahrten Gehirne und zwar sowohl Normalhirne, im besonderen Maße aber auch die Gehirne von infantiler amaurotischer Idiotie vom Typus *Tay Sachs* auffällig niedrige Phosphorwerte aufweisen.

Die ätherlösliche Fraktion des formalinfixierten Normalkinderhirnes (1) enthielt gegenüber dem mittleren Phosphorgehalte von 0,43 g eines frisch getrockneten Normalkinderhirnes (A) nur 0,31 g in 100 g Trockenpulver (siehe Mitteilung I, Tabelle 1).

Drei formalinfixierte Gehirne von *infantiler amaurotischer Idiotie vom Typus Tay Sachs* ließen nicht nur einen auffällig niedrigen Phosphorgehalt, sondern überdies noch eine mit der Dauer der Formalinkonservierung fortschreitende Phosphatidverarmung erkennen. Der Phosphorgehalt des Gehirnes von Fall 2 (Dauer der Konservierung 3 Jahre) betrug 0,18%, der der Fälle 3 bzw. 4 (Dauer der Konservierung 4½ bzw. 9 Jahre) 0,08 bzw. 0,09 g in 100 g Trockenpulver.

* Mit Unterstützung der Ella Sachs-Plotz Foundation.

Weiterhin zeigte sich, daß das Phosphordefizit des Gehirnes von Fall *Marburg* (4) von infantiler amaurotischer Idiotie, dem das Material für die im vorliegenden mitgeteilten Untersuchung entstammte, fast zur Gänze durch die Menge des in der wäßrigen Formalinlösung bestimmten organischen Phosphors (0,435—0,46 g) gedeckt erscheint.

Ätherlöslicher Phosphatidphosphor des Gehirnes von infantiler amaurotischer Idiotie Fall <i>Marburg</i> (s. Mitteilung I, Tabelle 3)	0,17 g
Phosphorgehalt der Originalkonservierungsflüssigkeit (10% Formalin) dieses Gehirnes (s. Mitteilung I, Tabelle 2)	0,46 g
Summe beider Phosphorwerte	<u>0,63 g</u>
Ätherlöslicher Phosphatidphosphor zweier frisch getrockneter Normalkinderhirne im Mittel (siehe Mitteilung I, Tabelle 3)	0,65 g

Daraus ergibt sich der Schluß, daß die bekanntlich *wasserunlöslichen* Phosphatide bei längerem Aufbewahren in 10%iger wäßriger Formalinlösung fortschreitend immer mehr und mehr in *wasserlösliche Spaltprodukte* aufgeschlossen werden müssen.

Aufgabe unserer Untersuchungen war es daher, in Ergänzung der weiter unten angeführten beachtenswerten Arbeiten die Spaltprodukte nachzuweisen, deren Vorhandensein in der wäßrigen Konservierungsflüssigkeit des Gehirnes von infantiler amaurotischer Idiotie vom Typus *Tay Sachs* (Fall *Marburg*) zu vermuten war.

Als solche kommen in Betracht:

a) Als phosphorhaltige Abbauprodukte: *Glycerinphosphorsäureester*, *Lysolecithin* usw.

b) Als phosphorfreie Verbindungen: das *Cholin* und *Colamin*, die Basen des *Lecithins* und *Kephalins*.

Folgender Versuch brachte zunächst die Bestätigung, daß die *Phosphatide frisch getrockneter* Gehirne *wasserunlöslich* sind, während aus dem Trockenpulver eines *formalinfixierten* Gehirnes phosphorhaltige Verbindungen *in Wasser in Lösung* gehen.

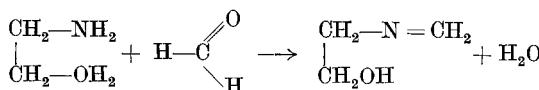
Versuch. Schüttelt man je 5 g Trockenpulver einerseits vom frisch getrockneten, andererseits von vorher formalinfixiertem Hirnmaterial mit 50 ccm destillierten Wassers eine Stunde und zentrifugiert die beiden Proben nachher, so enthält das Dekantat der Probe aus frisch getrocknetem Hirnpulver keine Spur von Phosphor, das derjenigen vom vorher formalinfixierten Hirnpulver 0,1% Phosphor.

Dies bedeutet zugleich einen sehr bemerkenswerten Hinweis dahin, daß die *Phosphatide frisch getrockneter Organgewebe* vermutlich durch die stets vorhandene innige Vermengung mit schützenden Fettkörpern und Eiweißverbindungen, *eine sehr auffällige Stabilität* an den Tag legen, die die Konstanz der Normalstandardwerte für äther- und alkohollösliche Phosphatide erklärt, die wir im Verlaufe vieler Jahre an den verschiedensten Normalorganen: Milz, Leber, Gehirn usw. immer wieder gefunden hatten. Der kolloide Schutz ist naturgemäß ein gegenseitiger.

Nur auf diese Weise erklärt sich auch die von *King, Rosenheim* und *Webster*¹ festgestellte Tatsache, daß das im reinen Zustande *instabile Ergosterin* im luftgetrockneten Gehirne einer ägyptischen Mumie, eines vor 1400 Jahren verstorbenen Individuums, also über einen Zeitraum von 1400 Jahren hin, unversehrt erhalten geblieben ist.

Im Sinne des erwähnten Untersuchungsziels der Ermittlung wasserlöslicher Spaltprodukte der Hirnphosphatide im Formalin, insbesondere aber zum Nachweise des *Cholins* und *Colamins* haben wir 50 ccm der wäßrigen Konservierungsflüssigkeit des Hirnes Fall *Marburg* nach *Thierfelder* und *Klenk*² unter Zusatz einiger Tropfen Salzsäure am Wasserbade abgedampft. Aufnehmen des Rückstandes in absolutem Alkohol. Versetzen des Alkoholextraktes mit alkohollöslicher HgI_2 -Lösung zur Ausfällung eines reichlichen Niederschlages einer phosphorhaltigen Doppelverbindung mit $HgCl_2$ (A). Von diesem Niederschlage wurde abfiltriert, das alkoholische Filtrat durch eingeleiteten Schwefelwasserstoff vom überschüssigen $HgCl_2$ befreit und nunmehr zur Ausfällung von Cholin-Platinchlorid mit gesättigter alkoholischer Platin-Chlorid ($PtCl_4$)-Lösung versetzt. Ausfallen eines ziemlich dichten Niederschlages der Doppelverbindung des Platinchlorids mit Cholin (B).

Abfiltrieren vom Niederschlage B. Das Filtrat wird, wie das erst erwähnte Filtrat durch Einleitung von Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Platinchlorid befreit, sodann mit konzentrierter Salzsäure eingeengt und nunmehr mit gesättigter Goldchloridlösung versetzt. Es bildet sich ein geringer und uncharakteristischer Niederschlag (C), von schmieriger Beschaffenheit. Jedesfalls unterblieb der Ausfall einer krystallinischen auf etwa vorhandenes Colamin hindeutenden Substanz, da unter der Einwirkung des Formalins nach folgender Formel eine Umwandlung des Colamins in Methylaminäthylalkohol stattfindet, der sich weder mittels Goldchloridfällung noch mittels des *van Slyke*-Verfahrens nachweisen läßt.



Zur Identifizierung des mit *Platinchlorid* ausgefällten *Niederschlages* (B) wurde derselbe durch Filtration abgetrennt, mit Alkohol mehrmals gewaschen, bei 90°C und sodann im Exsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen und hierauf im Porzellantiegel sorgfältig geäugt.

Das Gewicht des *Niederschlages* betrug 0,0388 g, das seines *Glührückstandes* 0,0212 g.

¹ Biochemie. J. 23, 166 (1929).

² *Thierfelder, H. u. E. Klenk:* Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide. Berlin: Julius Springer 1930.

Tabelle:

B. Gesamter aus dem Alkoholextrakt nach Abtrennung der Quecksilberchloridfällung und Zusatz von Platinchlorid resultierender Niederschlag	0,0388 g
G. Glührückstand von B	0,0121 g
P. Phosphorgehalt von Glührückstand G	in quantitativ nicht bestimmbaren Spuren

Der *Niederschlag B* enthält somit 31,2% *Platin*, entspricht also in seinem *Platin gehalt* annähernd der reinen Doppelverbindung von *Cholin-Platinchlorid* (berechneter Wert 31,7%).

Es gelang somit der *sichere Nachweis* reinen *Cholins* als P-freien N-haltigen Spaltprodukts des ursprünglich vorhandenen *Hirnlecithins*.

Um einigermaßen einen Einblick in die Menge des in Formalin vorhandenen Cholins zu gewinnen, wurde der Alkoholextrakt des Abdunstungsrückstandes von 50 ccm Formalin direkt mit Platinchlorid versetzt, um auf diese Weise den Verlust an Cholin zu vermeiden, der bei primärer Ausfällung von $HgCl_2$ dadurch zustande kommt, daß beträchtliche Mengen des Cholins an den mit $HgCl_2$ ausfallenden Niederschlag adsorbiert werden.

Es ergibt sich auf diese Weise ein sehr reichlicher Niederschlag (C), der wie der Niederschlag B behandelt wurde.

Sein Gewicht betrug 0,2192 g (C)

Sein Glührückstand 0,0581 g (G)

Dieser Glührückstand enthielt aber statt 31,7% des berechneten Wertes von Cholin-Platinchlorid nur 26,5%. Er war mit nicht unbeträchtlichen Mengen phosphorhaltiger Verbindungen vermengt. Nach Ausziehen des Glührückstandes mit heißem Wasser, das mit Salpetersäure angesäuert worden war und durch Ausfällung mit Ammonmolybdat ließ sich unter Zusatz von Ammonnitrat Phosphor in einer Menge nachweisen, die

0,0035 (P_2O_5) = 0,0015 Phosphor (P) entsprach.

Der für die Berechnung von Cholin in Betracht kommende auf Cholin-Platinchlorid beziehbare Platinwert G—P beträgt somit $Pt = 0,0566$ g. Dieser Wert von 0,0566 Platin entspricht 0,18 g Cholin-Platinchlorid in 50 ccm bzw. 3,6 g in der Gesamtformalinmenge von 1000 ccm, und dieser Wert wieder gemäß der Proportion des Molekulargewichtes von Cholin-Platinchlorid : Cholin = 454,4 : 121 = 0,9 g Cholin.

Zieht man in Betracht, daß dem Gesamtphosphorgehalt dieser Flüssigkeitsmenge 12,1 g Phosphatid entsprechen (s. Mitteilung I, Tabelle 2, Kolonne 3), so ergibt sich, daß wir mit beiläufig 0,9 g Cholin einen sehr ansehnlichen Anteil des ursprünglich vorhandenen Cholins als Spaltprodukt wiedergefunden haben, um so mehr, als man berücksichtigen muß, daß neben dem Lecithin das cholinfreie Hirnphosphatid Kephalin vorhanden sein dürfte, daß ferner ein Teil des Cholins etwa in Form von Lysolecithin an Glycerinphosphorsäureester verankert, ein anderer Teil zu tieferen Abbaustufen wie *Trimethylamin* und *Äthylalkohol* aufgespalten werden könnte, die dem Nachweise mittels Platinchloridfällung entgehen würden.

Als Ergänzungsstücke der stickstoffhaltigen Bruchstücke enthält die wässrige Formalinlösung die phosphorhaltigen Spaltprodukte der Phos-

phatide in Form von Lysolecithin, Glycerinphosphorsäureestern und Glycerinphosphorsäure usw. mit einem Gesamtphosphorgehalt von 0,435 g bis 0,46 g P (vgl. Mitteilung I, Tabelle 2), Stoffe, die offenkundig unter der Einwirkung des Formalins aus dem formalinfixierten Hirntrockenpulver in die wäßrige Formalinlösung übergegangen sind und sich auch in der Versuchsanordnung für den Nachweis des reinen Cholins durch ihre Sublimatfällbarkeit zu erkennen gegeben haben.

Überdies müßte noch mit Rücksicht auf die in Formalin von Gehirn Fall *Marburg* nachgewiesenen Relation von N : P = 3 : 1 (s. Mitteilung I, Tabelle 2, Kolonne 4) Vorhandensein niedrig molekularer stickstoffhaltiger Eiweißabbauprodukte angenommen werden. Komplexes Eiweiß kann nicht in Betracht kommen, da Formalin Eiweiß ausfällt und die mit der Konservierungsflüssigkeit und Trichloressigsäure und Sulfosalicylsäure angestellten Ringproben negativ ausgefallen waren.

Die *verminderte Extrahierbarkeit* der Lipoide durch Formalinfixierung, wie sie *H. Lieb* und *M. Mladenovic*¹ an verschiedenen Organgeweben, später dann auch *Kimmelstiel*² und *A. Weil*³ nachgewiesen haben, findet durch die abschließenden Ergebnisse der hier mitgeteilten Untersuchungen *ihre Aufklärung dahin*, daß die verminderte Extrahierbarkeit nicht etwa durch eine Härtung des zu extrahierenden Materials od. dgl. verursacht wird, sondern, wie bereits *Lieb* vermutet hatte, durch partielle Umwandlung der *wasserunlöslichen* Phosphatide in *wasserlösliche* phosphorhaltige und phosphorfreie *Spaltprodukte*, die nunmehr aus den Geweben in die Konservierungsflüssigkeit übergehen.

Aus alledem ergibt sich der Schluß, daß die Untersuchung von formalinfixierten Geweben bezüglich der Phosphor- und Stickstoffwerte nur dann zu einwandfreien Resultaten führt, wenn die Originalkonservierungsflüssigkeit zur Verfügung steht, ohne daß etwa während der Einwirkungsdauer etwas von der wäßrigen Formalinlösung abgegossen und durch neues Formalin ersetzt worden wäre. Die konservierende Wirkung des Formalins bürgt dafür, daß nichts von den aus den Geweben stammenden stickstoff- und phosphorhaltigen, in diese Konservierungsflüssigkeit übergegangenen Spaltprodukten durch Fäulnisprozesse od. dgl. derart zerstellt werde, daß etwa flüchtige Verbindungen entstehen könnten, die auf diese Weise dem chemischen Nachweise entzogen würden.

Dagegen ist dringend zu warnen, längere Zeit in wäßriger Formalinlösung fixierte Gewebe einer Untersuchung auf Phosphatidgehalt zu unterziehen, wenn nicht die Originalkonservierungsflüssigkeit vorhanden ist und mituntersucht wird, da sonst der, wie unsere Untersuchungen zeigen, sehr beträchtliche Anteil der in der wäßrigen Formalinlösung vorhandenen stickstoff- und phosphorhaltigen Spaltprodukte unberück-

¹ *Lieb, Hans u. Mladenovic Milos:* Hoppe-Seylers Z. 181, 221 (1929).

² *Kimmelstiel, Paul:* Hoppe-Seylers Z. 184, 143 (1929).

³ *Weil, Arthur:* J. of biol. Chem. 83, Nr 3 (1929, Sept.).

sichtigt bleibt, was naturgemäß zu ganz unkontrollierbaren Fehlresultaten führen müßte. Aus demselben Grunde muß auch an dieser Stelle darauf verwiesen werden, daß den durch die modifizierte Markscheidenfärbungen nach *Smith-Dietrich*, *Ciaccio* usw. zustande gekommenen histochemischen Befunden in Gewebsschnitten aus einem Material, das längere Zeit in Formalin konserviert worden war, hinsichtlich des Nachweises der Phosphatide nach Art und Menge keinerlei Beweiskraft zukommt. Unsere Untersuchungen bestätigen auch die ältere gleichgerichtete Stellungnahme von seiten *Kutscheras*¹, *C. Kaufmanns*² u. a.

Auch der gelegentliche Nachweis einer Sudan- bzw. Scharlachrotreaktion von variabler Intentität und Färbungsqualität in Schnittpräparaten *lipoidreicher* Gewebe ist nicht immer auf Verfettung zurückzuführen, sondern bisweilen auch durch Abspaltung von Neutralfett aus Phosphatiden und durch teilweise Veresterung des Cholesterins zu erklären. Dahingestellt bleibe dabei vorläufig, inwieweit die Einwirkung des Formalins bzw. der in wässriger Formalinlösung stets vorhandene Ameisensäure an dem Zustandekommen derartiger Reaktionen eine Rolle spielt. Jedenfalls scheint die Beobachtung, die der eine von uns (*Epstein*) mehrmals anzustellen Gelegenheit hatte, daß Schnitte ein und desselben lipoidreichen Materials nach jahrelangem Verweilen in Formalin eine Intensitätszunahme dieser Reaktionen erkennen ließen, einen Fingerzeig nach dieser Richtung hin zu geben.

¹ *Kutschera, H.*: *Virchows Arch.* **256**, 569 (1925).

² *Kaufmann, C. u. E. Lehmann*: *Virchows Arch.* **261**, 623 (1926). — *Virchows Arch.* **270**, 360 (1928).