

Aus dem pathologisch-bakteriologischen Institut der Städtischen Krankenanstalten Karlsruhe (Vorstand: Prof. Dr. R. BÖHMIG) und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. LANG).

## Untersuchungen an isoliertem, unverändertem Lipofuscin aus Herzmuskulatur.

Von

OTTO HEIDENREICH und GÜNTHER SIEBERT.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Februar 1955.)

Kenntnisse über das Lipofuscin können auf drei verschiedenen Wegen gewonnen werden. Zunächst durch die morphologische Untersuchung, die Aufschluß über das Vorkommen und die Art der Lagerung gibt; ferner durch die Bestimmung des färberischen und histochemischen Verhaltens des Pigments und schließlich durch die Isolierung und die chemische Analyse.

Die ersten *morphologischen Untersuchungen* ließen den Eindruck entstehen, daß das Lipofuscin bei alten Leuten oder nach zehrenden Krankheiten vermehrt aufträte. Es wurde daher auch als Abnutzungs- oder Alterspigment bezeichnet, beides Namen, die eine pathologische Komponente in den Begriff hineintragen. Als erster hat aber MAASS (1889) hervorgehoben, daß dieses Pigment bereits in früher Kindheit zu finden ist. H. MÜLLER (1935) fand Lipofuscin in der Herzmuskulatur schon regelmäßig in den ersten Lebensmonaten. Im späteren Lebensalter steigt der Pigmentgehalt an, um in der Mitte der zwanziger Jahre den höchsten Wert zu erreichen und später wieder abzusinken. Bei Kranken fand sich eher weniger Pigment als bei Gesunden. v. FINK (1936) konnte feststellen, daß die Herzmuskulatur von Tieren, die in einer Lauftrömmel trainiert worden waren, mehr Lipofuscin enthielt, als solche untrainierter Kontrolltiere. Eine Vermehrung von Lipofuscin war schon nach 4stündiger Versuchsdauer nachweisbar. Zu entsprechenden Ergebnissen kam KNY (1937) bei Untersuchungen an der Skelettmuskulatur. Bewegungsmuskulatur enthielt mehr Pigment als die sog. Haltemuskulatur. Auffallend gering war der Lipofuscingehalt gelähmter, atrophischer Muskeln. UHLENBROOCK und BÖHMIG (1937) untersuchten das gegenseitige Verhalten von Lipofuscin und Ascorbinsäure in verschiedenen Schichten des Herzmuskels. Sie konnten nachweisen, daß sich die Lipofuscin- zu den Vitaminmengen umgekehrt proportional verhielten. Die Auswertung der geschilderten Ergebnisse führte BÖHMIG (1937) zu der Vermutung, daß das Lipofuscin eine funktionelle Bedeutung für den Stoffwechsel der Muskelzelle haben könnte.

Das Vorkommen von Lipofuscin in der Leber zeigt gewisse Parallelen. BACHMANN (1953) konnte durch die Untersuchung einer großen Zahl frischer Leberpunktate ein deutlich altersabhängiges Auftreten von Pigment in der Leber nachweisen, wobei die höchsten Werte in der Altersgruppe von 10—19 Jahren lagen. Unabhängig vom Alter war es bei Urämiekranken vermehrt, bei Lebercirrhosen und Hepatitiden dagegen vermindert. Durch Untersuchung desselben Patienten zu verschiedenen Zeiten konnte er das Auftreten bzw. das Verschwinden von Lipofuscin innerhalb weniger Monate beobachten.

Auf eine Schwierigkeit bei Lipofuscinuntersuchungen muß noch hingewiesen werden. „Durch Forschungen amerikanischer Autoren sind Pigmente bekannt geworden, die dem Lipofuscin sehr ähnlich sind und auch an den gleichen Stellen vorkommen können, obwohl sie sicherlich eine andere Genese und Bedeutung haben. Es handelt sich dabei um das Ceroid und das Vitamin E-Mangelpigment. Das als Ceroid, also als wachsähnlich, bezeichnete Pigment ist besonders von LILLIE und seinen Mitarbeitern (1941) untersucht worden. Es wurde zuerst in Lebern von Ratten, die eine Eiweißmangelnahrung erhalten hatten, entdeckt. BÜCHNER (1947) und KÜHN (1947) haben bei ihren Untersuchungen über die Hepatitis epidemica in vergrößerten v. KUPFFERschen Sternzellen ein feinkörniges, gelbliches Pigment beschrieben, das sie als Zellzerfallspigment aus untergegangenen Leberzellen deuteten und als Lipofuscin bezeichneten. HAMPERL beobachtete in vielen Organen, unter anderem auch in gesunden Lebern, ganz ähnliche, mit einem gelblichen Pigment beladene Zellen, die er wegen ihrer Fluoreszenz im ultravioletten Licht als Fluorocyten bezeichnete. Das Pigment hielt er am ehesten noch für Hämofuscin. In einer späteren Arbeit aus seinem Institut hielt R. SCHMIDT (1953) dieses Pigment jedoch für Ceroid.

In der Muskulatur ist es in erster Linie das Vitamin E-Mangelpigment, das schwer vom Lipofuscin abzugrenzen ist. Es wurde zuerst von MARTIN und MOORE (1936) bei vitamin-E-frei ernährten Ratten beobachtet. Vitamin E-Mangelpigment tritt in vielen Organen und Geweben, besonders aber in der gesamten glatten, quergestreiften und Herzmuskulatur auf. Ein Beispiel für die Schwierigkeit der Abgrenzung gegen Lipofuscin geben die Befunde von MASON und TELFORD (1947) bei vitamin-E-frei ernährten Affen. Sie beobachteten in deren Herzmuskulatur braune, den Zellkernen benachbart liegende Pigmentgranula und deuteten sie als Vitamin E-Mangelpigment. Bei Menschen konnte dieses Pigment bisher allerdings nicht sicher nachgewiesen werden.

Durch morphologische Untersuchungen sind diese Verhältnisse offenbar nicht zu klären. Seit langem wurde daher besonderer Wert auf die Heranziehung *färbender und histochemischer Methoden* gelegt.

Grundlegende Untersuchungen auf diesem Gebiet stammen von HUECK (1912, 1921). Er beschrieb das „fetthaltige Abnutzungspigment“ als unlöslich in Säuren und Alkalien und als teilweise löslich in Fettlösungsmitteln. Nach seinen Untersuchungen war es, wenn auch nicht ganz regelmäßig, durch Fettfarbstoffe wie Sudan III und Scharlach R färbbar und nahm basische Farbstoffe wie Neutralrot und Nilblausulfat an. Durch „Bleichungsmittel“ wie  $H_2O_2$  wurde es langsam gebleicht. Eisenfärbungen verliefen negativ, ebenso wenig ließ sich das Lipofuscin versilbern. Er hielt es für abgrenzbar gegenüber Melanin, da dieses sich nicht mit basischen oder Fettfarbstoffen anfärbte, sich dafür aber regelmäßig versilbern ließ. HUECK (1912) sprach sich auf Grund seiner Untersuchungen für die Möglichkeit aus, daß das Lipofuscin aus dem Fettstoffwechsel entstehe, während er das Melanin für ein Produkt des Eiweißabbaues hielt. Diesen Feststellungen ist vielfach widersprochen worden. SCHMIDTMANN [zit. nach LUBARSCH (1922)] betonte, daß Fettfärbungen am Lipofuscin in vielen Fällen negativ verliefen und hielt daher das Fett für eine Beimengung mehr oder weniger zufälliger Natur. KUTSCHERA-AICHBERGEN (1922) gelang die Versilberung auch des Lipofuscins, am besten in entfetteten Präparaten. Er hielt eine Zusammenfassung der beiden autogenen Pigmente Lipofuscin und Melanin unter den Begriff Melanin für berechtigt, da sie die gleichen Reaktionen gäben. LUBARSCH (1902, 1922) kam zu ähnlichen Ergebnissen und betrachtete beide als „proteinogene“ Pigmente. Von ihm stammt der Name Abbaupigment. Diese Zusammenfassung erscheint aber heute doch als zu weitgehend. Schon KÖNIG (1926) wies ausdrücklich auf den Unterschied in der Färbbarkeit durch basische Farbstoffe hin. Auf eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit machte HAMPERL (1934) auf Grund seiner fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an menschlichen Geweben aufmerksam. Lipofuscin zeigte nämlich eine gelbbraune Eigenfluoreszenz, die dem Melanin vollständig abging. Melanin dagegen absorbierte ultraviolette Licht, was er für bedeutsam hielt, da so die tieferen Schichten der Haut vor der Einwirkung von UV-Licht geschützt würden.

Noch schwieriger als gegen Melanin ist die Abgrenzung von Lipofuscin gegen Ceroid und Vitamin E-Mangelpigment. Die färberischen Eigenschaften des Ceroids sind von ENDICOTT und LILLIE (1944) zusammengestellt worden. Nach ihrer Beschreibung gibt das Ceroid alle Reaktionen, die weiter oben bei der Besprechung von Lipofuscin angeführt worden sind. Zum Unterschied gegenüber Lipofuscin war das Ceroid aber nach einer Färbung mit ZIEHL-NEELSENS Carbol-Fuchsin säurefest. Schließlich kann auch die Perjodsäure-Leukofuchsinmethode zur Unterscheidung beider Pigmente mit herangezogen werden. Fast ausgeschlossen scheint nach ihrem färberischen Verhalten dagegen die Unterscheidung zwischen Ceroid und Vitamin E-Mangelpigment zu sein [PAPPENHEIMER und VICTOR (1946)].

Überblickt man die Ergebnisse, die durch solche färberischen und histochemischen Methoden gewonnen worden sind, so ergibt sich, daß ihnen eine gewisse Bedeutung für die Abgrenzung der Pigmente zukommt. Über die chemische Zusammensetzung von Lipofuscin ist aber mit diesen Methoden nichts Sicheres zu erfahren.

Man hat daher versucht, das Lipofuscin *chemisch* zu analysieren. Voraussetzung dafür ist, daß das Pigment isoliert vorliegt. BRAHN und SCHMIDTMANN (1920, 1922) isolierten Lipofuscin und Melanin nach Methoden, die SALKOWSKI (1920) ausgearbeitet hat. Sie bestanden im Prinzip darin, daß pigmenthaltiges, zerkleinertes Gewebe so lange einer Salzsäure-Pepsinlösung ausgesetzt wurde, bis alles Eiweiß verdaut war. Der Filtrerrückstand wurde mit Alkohol, Äther und Eisessig behandelt, dann in Lauge gelöst und schließlich mit Säure gefällt. Die Elementaranalyse der so gewonnenen Substanzen ergab übereinstimmende Werte. Da diese sich auch nach Farbe und Löslichkeit nicht unterscheiden, zogen die Untersucher den Schluß, daß man so dargestelltes Lipofuscin und Melanin miteinander identifizieren könnte.

Auch das Vitamin E-Mangelpigment ist auf chemischem Weg isoliert worden. Die von MOORE und WANG (1947) angegebene Methode ähnelt derjenigen von ROSENFELD (1901) zur Isolierung von Hämo-fuscin. Auch diese Methode war sehr eingreifend und ging von einer Hydrolyse des Gewebes mit Bariumhydroxyd aus. Isolierungsversuche von Ceroid, die von ENDICOTT und LILLIE (1944) beschrieben wurden, waren etwas schonender. Sie gingen von formolfixiertem Lebergewebe aus. Chemische Analysen des Ceroids sind von ihnen anscheinend nicht ausgeführt worden.

So isolierte Pigmente sind auch elektronenmikroskopisch erforscht worden. SCHMIDTMANN (1949) untersuchte isoliertes Lipofuscin und Melanin. Sie betrachtete beide Pigmente als Melanine verschiedener Herkunft und beschrieb in ihnen Kristalle von hexagonalem Typ und Kristalle, die splitterförmig aussahen und in Bündeln zusammenlagen. LINDNER (1954) kennzeichnete das isolierte Vitamin E-Mangelpigment als ein polydisperses globuläres Kolloid, dessen Primärteilchen sich nicht darstellen ließen.

Bei der Beurteilung der geschilderten Untersuchungen fällt auf, daß die größten Schwierigkeiten schon bei der Isolierung liegen. Die Ergebnisse der chemischen Untersuchungen mußten unvollständig bleiben, da die Pigmente mindestens eine Veränderung ihres Eiweißbestandteiles erfahren hatten und die Fettkomponente durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln ganz verlorengegangen war. Aus-sichtsreich kann aber eine chemische oder physikalische Untersuchung der Pigmente nur dann sein, wenn von einem unveränderten, rein dargestellten Produkt ausgegangen werden kann.

### Eigene Untersuchungen.

Auf Grund der vorangehenden Untersuchungsbefunde versuchten wir daher, Lipofuscin nach modernen Methoden zu isolieren, wie sie bei Darstellung von Kernen, Mitochondrien und anderen Zellbestandteilen zum Zwecke physiologisch-chemischer Untersuchungen Anwendung finden [K. LANG und G. SIEBERT (1955)]. Wir beschränkten uns dabei zunächst auf die Darstellung von Lipofuscin aus der Herzmuskulatur. Die Ausarbeitung der Isolierungsmethode und die chemischen Untersuchungen wurden im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Mainz durchgeführt. Sie werden an anderer Stelle ausführlich beschrieben. Herrn Prof. LANG sei auch an dieser Stelle für sein großes Entgegenkommen besonders gedankt.

### Methodik der Isolierung.

Im Prinzip besteht der Isolierungsvorgang darin, daß pigmenthaltige Herzmuskulatur von Fett und Bindegewebe befreit und in einem „Starmix“-Apparat in einer Rohrzuckerlösung weitgehend homogenisiert wird. Das Homogenat wird in einer Rohrzuckerlösung mit diskontinuierlichem Dichtegradienten zentrifugiert. In einer bestimmten Schicht stellen sich die Lipofuscingranula ein und sind so schon von größeren Zellbestandteilen sowie von Hämoglobin und Fettgewebe befreit. Diese lipofuscinhaltige Fraktion wird entnommen und in Standzylindern, in denen sich 2 Zuckerlösungen verschiedener Konzentration befinden, einer Spontansedimentation überlassen. Die Lipofuscingranula haben im Gegensatz zu den meisten anderen Zellbestandteilen die Eigenschaft, aus 4%iger Rohrzuckerlösung nicht zu sedimentieren. Es gelingt durch weiteres Zentrifugieren und Abtrennen, das Lipofuscin aus dieser Schicht fast vollkommen frei von allen Verunreinigungen darzustellen. Nach Entfernung des Rohrzuckers durch Spülen mit destilliertem Wasser trocknet das Pigment im Exsiccator zu einer zusammenhängenden, schwarzbraunen Substanz ein. Die Ausbeute beträgt bis zu 50 mg auf 100 g Frischgewebe.

Bei der Ausarbeitung der geschilderten Arbeitsgänge machte die sichere Wiedererkennung der Lipofuscingranula zunächst einige Schwierigkeiten. Sie gelang schließlich einwandfrei, als wir getrocknete Objektträgerausstriche der fraglichen Fraktionen 10 min mit einer 1:5000 verdünnten Lösung von Neutralrot in physiologischer Kochsalzlösung färbten und den Ausstrich mit Glyceringelatine und einem Deckglas eindeckten, um störende Lichtbrechungen zu vermeiden. Die rötlich-braunen Lipofuscingranula treten dann deutlich hervor. Zur Beurteilung etwa vorhandener Verunreinigungen bewährte sich eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, das alle übrigen Zellsubstanzen bläulich färbt.

Der Gang der Isolierung sei noch durch die Abbildung von 3 Mikrophotogrammen erläutert. Abb. 1 stellt einen Gefrierschnitt von längs-

getroffener Herzmuskulatur dar, die mit Neutralrot gefärbt ist. Man erkennt die Gruppen der meist rundlichen Lipofuscingranula, die iuxtannucleär in Kegelform gelagert sind. Kerne sind bei dieser Färbung nicht zu sehen.

Die Abb. 2 zeigt einen neutralrotgefärbten Ausstrich von Material, das nach 2 min langer Zerkleinerung im „Starmix“-Apparat gewonnen

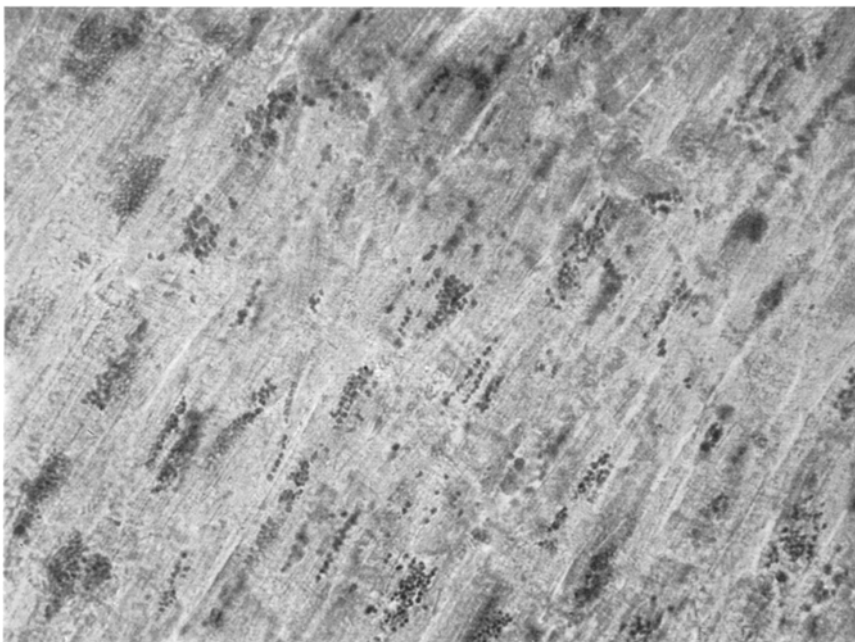


Abb. 1. Lipofuscinreiche Herzmuskulatur. Färbung mit Neutralrot (500 ×).

wurde. In den Zellfragmenten ist noch Lipofuscin in Form von Körnern oder eckigen Schollen vorhanden. Zwischen den Zellresten liegen bereits freigewordene Pigmentgranula, die an ihrer dunklen Farbe zu erkennen sind. In Abb. 3 ist schließlich ein Ausstrich reiner, isolierter Pigmentgranula dargestellt.

#### Ergebnisse der Untersuchungen an isoliertem Lipofuscin.

Es wurde Lipofuscin untersucht, das aus 8 menschlichen Herzen stammt, die ohne Berücksichtigung des Alters oder einer Krankheit ausgewählt wurden. Die Ergebnisse können daher in etwa als Durchschnittswerte betrachtet werden. Zunächst sind einige allgemeinere Eigenschaften zu beschreiben. Die Granula sind von einer auffallenden mechanischen Festigkeit. Bei der Zerkleinerung im „Starmix“-Apparat werden Kerne, Myofibrillen und viele andere Zellelemente zerstört, während die Pigmentkörner unbeeinflusst bleiben. Sie haben ferner ein relativ geringes spezifisches Gewicht. In einer 4%igen Rohrzucker-

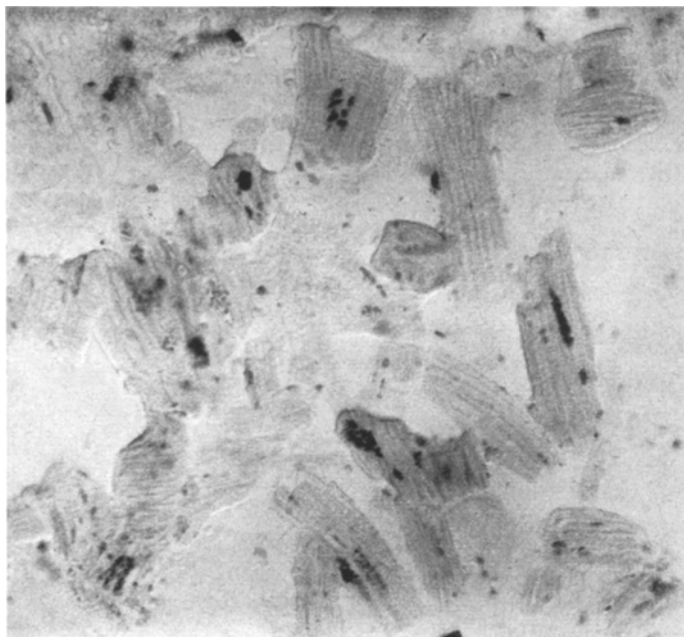


Abb. 2. Objektträgerausstrich eines Herzmuskelhomogenates. Neutralrotfärbung (500  $\times$ ).

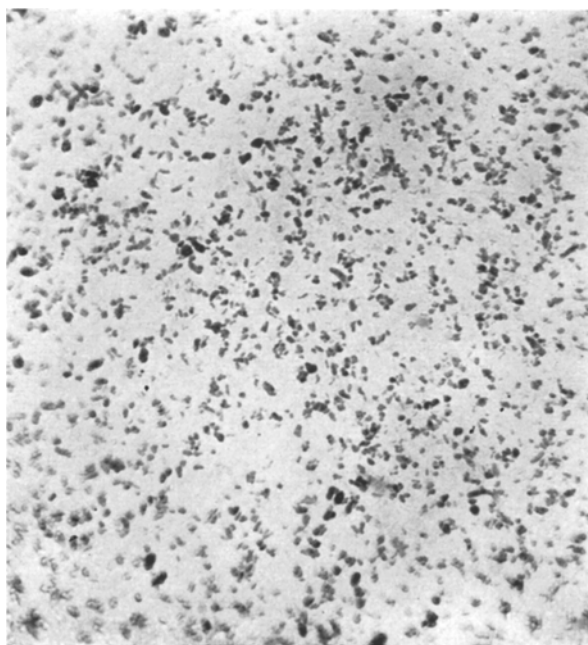


Abb. 3. Isoliertes Lipofuscin. Neutralrotfärbung (500  $\times$ ).

lösung sedimentieren die übrigen Zellsubstanzen überwiegend spontan, wogegen das Lipofuscin schweben bleibt. Schließlich sind sie auch gegenüber chemischen Einflüssen relativ resistent. Lipofuscinhaltiges Gewebe kann man in der Kälte tagelang aufbewahren, ohne daß sich bei der Isolierung oder in den Versuchsergebnissen etwas ändert. Auch kurzzeitige Erwärmungen, etwa im „Starmix“-Apparat auf 35°, haben keinen schädigenden Einfluß.

Die weiteren Untersuchungen erfolgten auf 2 Wegen:

### *1. Mikroskopische Untersuchungen.*

Dazu wurde Lipofuscin, bevor es eingetrocknet war, auf Objektträgern ausgestrichen. Nach Trocknen an der Luft wurde der Ausstrich ungefärbt oder gefärbt mit Glyceringelatine und einem Deckglas eingedeckt. Lediglich bei Fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung wurden uneingedeckte Objektträger benutzt.

Die Granula haben die Form rundlicher Körner oder eckiger Schollen. Ihre Größe ist keineswegs einheitlich. Viele erscheinen größer als innerhalb der Zelle, eine Erscheinung, die man an Ausstrichen häufig beobachten kann. Die Pigmentschollen zeigen eine gelblich-bräunliche Eigenfarbe, manchmal mit einem Stich ins gelblich-grünliche. Sie sind durchscheinend und völlig homogen. Auch mit der Ölimmersion ist weder eine Granulierung noch eine besondere Hülle zu erkennen. Sie sind stark lichtbrechend, geben aber keine Doppelbrechung im polarisierten Licht. Im Fluoreszenzmikroskop mit Filter-UV-Licht von Wellenlängen zwischen 250 m $\mu$  und kurzwelligem Blau zeigt Lipofuscin eine schwache, gelblich-bräunliche Eigenfluoreszenz. Die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes wurde mit dem Mikrospektrographen nach ENGELMANN bestimmt und hatte Bandengrenzen zwischen 480 und 570 m $\mu$ . Das Maximum lag bei 525 m $\mu$ .

Die Granula nehmen Fettfarbstoffe wie Sudan III und Scharlach R an. Die Farbtöne waren jedoch ziemlich schwach. Mit Neutralrot färben sie sich rötlich, mit Nilblausulfat blau, wobei letztere Färbung nach Differenzierung in 1%iger Essigsäure einen bläulich-grünlichen, etwas schmutzigen Farbton annimmt. Nach Färbung mit ZIEHL-NEESENS Carbol-Fuchsin erweisen sie sich als nicht säurefest. Sie verlieren den Farbstoff in Salzsäure-Alkohol innerhalb weniger Minuten. Mit Hämatoxylin tingieren sie sich bläulich-grau. In unserem Material waren celluläre Verunreinigungen, die durch ihre blaue Farbe hätten hervortreten müssen, praktisch nicht vorhanden.

Das isolierte Lipofuscin zeigt bei diesen Untersuchungen das gleiche Verhalten wie innerhalb der Zelle. Die Farbreaktionen sind aber deutlicher und übersichtlicher. Die besondere Bedeutung der Ergebnisse dieser mikroskopischen Untersuchungen liegt darin, daß sie die Identität der isolierten Substanz mit Lipofuscin eindeutig beweisen.



## 2. Chemische Untersuchungen<sup>1</sup>.

Der Gesamtfettgehalt von Lipofusein wurde durch 3malige Extraktion mit BLOORScher Mischung (Alkohol-Äther 3:1) auf einem siedenden Wasserbad unter dem Rückflußkühler bestimmt. Er beträgt fast 20% des Trockengewichtes. Nach Eindampfen des Lösungsmittels unter einem CO<sub>2</sub>-Strom bleibt eine bräunliche fettige Substanz zurück, die zu etwa 80% in Petroläther löslich ist. Der normale Fettgehalt von Herzmuskulatur ist etwa von der gleichen Größenordnung. Für Rinderherz wird er mit 15,5—17,4% angegeben<sup>2</sup>.

Die Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL ergibt für das Lipofusein einen Wert von 11,8%. Da beim Lipofusein 20% seines Gewichtes auf Lipid entfallen, hat der fettfreie Rückstand einen Stickstoffgehalt von 14,7%. Er liegt also in der Größenordnung des Stickstoffwertes für Eiweiß, bei dem man mit einem Mittelwert von 16% rechnet.

Der Phosphorgehalt wurde nach Veraschung des Pigmentes photometrisch bestimmt. Er beträgt 0,424%. Er ist etwas niedriger als in der Herzmuskulatur, für die ein Phosphorgehalt von 0,513—1,069%, bezogen auf Trockengewebe, angegeben wird.

Zum Schwefelnachweis wurde die Substanz durch metallisches Natrium reduziert und Schwefel durch die Farbreaktion mit Natrium-Nitroprussid nachzuweisen versucht. Die Reaktion verläuft stark positiv. Das Pigment ist weder in Säure noch in Lauge vollständig in Lösung zu bringen. Die Ergebnisse einiger qualitativer Reaktionen zum Nachweis bestimmter Verbindungen oder chemisch aktiver Gruppen sollen hier nicht einzeln angeführt, sondern weiter unten gleich im Zusammenhang diskutiert werden.

Von dem Hydrolysat wurde anschließend die UV-Absorptionskurve zwischen den Wellenlängen von 220—360 m $\mu$  photometrisch aufgenommen. Das Maximum der Extinktion lag bei etwa 272 m $\mu$  und darf auf das Vorhandensein von Benzolringen zurückgeführt werden. In Frage kommen hier in erster Linie die cyclischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, ferner aber auch Dopa und seine Oxyderivate in Richtung auf die Melanine hin. Die Kurve ergab keine Absorption im Bereich der Werte, die für Nucleinsäurebausteine charakteristisch wären. Papierchromatographische Untersuchungen an einem Hydrolysat [SIEBERT, HEIDENREICH, BÖHMIG, LANG (1955)] zeigten das Vorhandensein der meisten für ein Eiweiß typischen Amino-

<sup>1</sup> Es ist hier nicht möglich, die angewendeten chemischen Methoden in allen Einzelheiten zu besprechen oder die ermittelten Kurven graphisch darzustellen. Darüber wird an anderer Stelle berichtet.

<sup>2</sup> Alle Normalwerte für die Herzmuskulatur sind entnommen aus HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Auflage, Bd. 5.

säuren im Lipofuscin (zum Vergleich diente Casein). Dieser Befund mahnt zu besonderer Reserve gegenüber Angaben über Lipofuscin, das nach Einwirkung ei-weißspaltender Fermente gewonnen wurde (s. oben).

Die *anorganischen Bestandteile* im Lipofuscin wurden spektrochemisch im Quarzspektrographen von STEINHEIL bestimmt. Das Prinzip dieses Nachweises besteht in der Aufnahme des ultravioletten Emissionsspektrums, das eine Substanz im elektrischen Lichtbogen aussendet. Die

Tabelle 1.

Element	Anorganische Bestandteile im Lipofuscin in %	Anorganische Bestandteile im Herzmuskel in %
Mg	0,1 —1	0,056 —0,135
Si	0,1 —1	0,005 —0,013
Ca	0,03 —0,3	0,018 —0,068
Al	0,01 —0,1	0,000225
Cu	0,001 —0,01	
Fe	0,01 —0,1	0,0029—0,0072
Mn	0,0001—0,001	Spur
Zn	< 0,1	0,0033
Sn	< 0,05	0,00535
Cr	< 0,03	
Co	< 0,001	
Ni	< 0,001	

Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Zur Orientierung sind in ihr gleichzeitig die Normalwerte für Herzmuskulatur angegeben. Diese beziehen sich auf menschliches Trockengewebe, mit Ausnahme des Wertes für Eisen, der für frische Herzen von Hunden und Ratten berechnet ist.

Die Eisenanalyse wurde ergänzt durch die Eisenbestimmung im veraschten Lipofuscin nach der Methode von BOREL. Es wurden in 5 mg Lipofuscin 1,56  $\gamma$  Eisen bestimmt. Das sind 0,0312 %. Die Ergebnisse beider Eisennachweise stimmen gut überein.

Abschließend wurden die analytischen Bestimmungen durch Fermentuntersuchungen vervollständigt. Sie betreffen die Bestimmung der Aktivität von Proteasen (Kathepsin) und von Esterasen. Beide Fermente zeichnen sich durch ihre Haltbarkeit und ihre relativ große Resistenz gegenüber autolytischen Prozessen aus. Für ihre Erfassung stehen empfindliche Methoden zur Verfügung.

Das Kathepsin wird nachgewiesen, indem man das Ferment unter definierten Bedingungen auf eine 5%ige Hämoglobinlösung einwirken läßt. Gleichzeitig werden Kontrollen ohne Fermentquelle und ohne Hämoglobin angesetzt, deren Werte später von dem des Vollansatzes abgezogen werden. Zu verschiedenen Zeiten werden Proben aus den Ansätzen entnommen, die Fermentreaktion wird mit Trichloressigsäure unterbrochen und das abgespaltete Tyrosin durch die Farbreaktion, die es mit einem Phenolreagens gibt, photometrisch quantitativ bestimmt. Das Kathepsin, das in 20 mg Lipofuscin enthalten ist, spaltet in 60 min 21  $\gamma$ , in 180 min 56  $\gamma$  Tyrosin aus 5%iger Hämoglobinlösung ab. Um vergleichbare Werte zu erhalten, muß man das abgespaltene Tyrosin auf Milligramm Stickstoff der untersuchten Substanz berechnen. Das sind in 60 min 8,9  $\gamma$  Tyrosin/mg N aus Lipofuscin und in 180 min 23,7  $\gamma$  Tyrosin/mg N aus Lipofuscin. Die Kurve der Fermentaktivität

zeigt einen annähernd linearen Anstieg. Zum Vergleich sei der Wert der Kathepsinaktivität im Pankreas angeführt. Er beträgt 50–100  $\gamma$  Tyrosin/mg N und Std. In Leber und Niere liegt er etwas tiefer, in der Milz etwas höher [LANG und SIEBERT (1954)]. Die Fermentaktivität im Lipofuscin ist also etwa 10mal geringer als die im Pankreas.

Zur Bestimmung der Esterasen läßt man das Ferment unter definierten Bedingungen auf Phenolphthaleindibutyrat einwirken. Die abgespaltene Menge Phenolphthalein ist ein Maß für die Aktivität des Fermentes. Die Konzentration des Farbstoffes wird photometrisch bestimmt. Die Esterasen, die in 12 mg Lipofuscin enthalten sind, spalten in 60 min 14,6  $\gamma$ , in 120 min 42,8  $\gamma$  Phenolphthalein ab. Das sind in 60 min 10,2  $\gamma$  Phenolphthalein/mg N aus Lipofuscin, in 120 min 29,9  $\gamma$  Phenolphthalein/mg N. Zur Beurteilung der Esteraseaktivität seien ihre Werte in Schweinenieren- und Rattenleberhomogenaten angegeben. Sie betragen 2,5 mg Phenolphthalein/mg N und Std im Nieren- bzw. 5,4 mg Phenolphthalein/mg N und Std im Leberhomogenat (LANG, SIEBERT und JUNG). Im Lipofuscin ist die Esteraseaktivität mehrere hundertmal geringer als in diesen Organen.

Die Ursache für das Vorkommen hydrolytisch wirkender Enzyme im Lipofuscin ist unklar. Alle morphologischen Untersuchungen am isolierten Lipofuscin sprechen dagegen, daß Verunreinigungen mit fremden Gewebsbestandteilen dabei beteiligt sind. Vermutlich handelt es sich um eine Adsorption von in den Herzmuskelzellen vorhandenem Enzym an das Lipofuscin. Diese Frage muß in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

### Diskussion.

Unter Lipofuscin ist die Gesamtheit aller der Verbindungen zu verstehen, die in Gestalt des Pigmentgranulums in der Zelle vorliegen. Es handelt sich also primär beim Lipofuscin um einen morphologischen Begriff. Daher ist es auch nicht möglich, bestimmten Bestandteilen dieses Pigments eine mehr oder weniger große Bedeutung zuzumessen. Durch morphologische Forschungen kann die Zusammensetzung des Pigmentes nicht ergründet werden. Auch histochemische Untersuchungen haben nur einen begrenzten Wert. Schon die Fixierung bedeutet einen Eingriff in die Zellchemie. Der Nachweis einzelner Verbindungen oder Radikale ist oft mit einer gewissen Unsicherheit in der Deutung behaftet. Sobald es um quantitative Angaben geht, gleichgültig ob es sich dabei um analytische Bestimmungen oder um die Erfassung der Fermentaktivität handelt, müssen an die Stelle subjektiver Eindrücke exakt zu bestimmende Zahlenangaben treten. Aus diesen Überlegungen geht die große Bedeutung der chemischen Pigmentuntersuchung hervor. Voraussetzung dafür ist, daß die zu untersuchende Substanz rein und unverändert vorliegt. Ferner muß sich diese Substanz sicher mit dem Ausgangsmaterial in der Zelle identifizieren lassen. Es liegt an der Eigenart der das Pigment aufbauenden,

komplizierten organischen Verbindungen, daß mit chemischen Isolierungsmethoden diese Forderungen kaum zu erfüllen sind.

Die von uns zur Isolierung von Lipofuscin ausgearbeitete Methode nutzt dagegen physikalische Eigenschaften der Pigmentgranula aus, vor allem den Unterschied, der in der mechanischen Festigkeit und im spezifischen Gewicht gegenüber den anderen Zellbestandteilen besteht. Das Pigment wird in seiner ursprünglichen Morphe als Granulum isoliert und kommt dabei nur mit wäßrigen Lösungen einer apolaren, völlig indifferenten Verbindung, dem Rohrzucker, in Berührung. Die Temperatur kann konstant um  $+5^{\circ}$  gehalten werden. Lediglich der osmotische Druck der Lösung wechselt zwischen hypertonischen und hypotonen Werten. Durch mikroskopische Untersuchungen lassen sich Identität und Reinheitsgrad bestimmen.

Welche Schlüsse auf die Zusammensetzung von Lipofuscin können nun aus den chemischen Untersuchungen gezogen werden? Der Fettgehalt ist mit 20% unerwartet niedrig. Erstaunlich ist daher die Färbbarkeit der Granula mit Fettfarbstoffen, die in unserem Material zwar nicht sehr ausgeprägt, aber doch einwandfrei nachweisbar war. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß das an einer besonderen Zusammensetzung des Fettanteiles liegt, da sich Neutralfette und Lipoide in gleicher Weise anfärben. Für die Ansicht von KUTSCHERA-AICHBERGEN (1922), daß das Fett eine äußere Hülle um den „Pigmentkern“ bildet, läßt sich kein Beweis erbringen. Die Frage muß daher offen gelassen werden.

Der Stickstoffgehalt von Lipofuscin liegt größenordnungsmäßig im Bereich von Eiweißen. Auch das für Eiweiß typische Element, der Schwefel, ist vorhanden. Er liegt nur in Spuren als anorganischer Sulfatschwefel vor. Aus dem negativen Ausfall der Reaktion mit Natrium-Nitroprussid geht das Fehlen freier Sulfhydrylgruppen hervor. Im Lipofuscin könnte der Schwefel also in der Bindung an Methionin oder Cystin oder als Sulfonschwefel vorliegen.

Trotzdem kann es sich bei dem lipidfreien Rest des Pigmentes nicht um ein typisches Eiweiß handeln, da die Biuretreaktion negativ verläuft. Besprechen wir nun die Bausteine, die diesen Körper bilden. Wie aus den Reaktionen mit Ninhydrin sowie besonders aus der Papierchromatographie hervorgeht, kommen in ihm Aminosäuren vor. Ferner sind Verbindungen, die den Benzolring enthalten, nachweisbar. Dieser Befund ist durch 2 Untersuchungen gesichert: durch die Ergebnisse der UV-Absorptionskurve und durch den positiven Verlauf der Reaktion mit Phenolreagens. Ob es sich bei den Benzolabkömmlingen um cyclische Aminosäuren, wie Tyrosin, oder eher um Dopa und seine Oxyderivate in Richtung auf die Melanine hin handelt, ist zur Zeit nicht zu entscheiden. Gegen das Vorhandensein von Melanin könnte der negative Ausfall der THORMÄHLSchen Reaktion angeführt werden. Bindend ist eine solche Schlußfolgerung aber nicht, da diese Reaktion nur sog. Melanogene, farblose Vorstufen von Melanin, erfaßt.

Gewisse andere Verbindungen lassen sich wiederum ausschließen. Dazu gehören solche, die in Nucleinsäuren vorkommen. Nach dem Verlauf der UV-Absorptionskurve zu schließen, fehlen Purinkörper. Aus der negativen Phloroglucinprobe ergibt sich die Abwesenheit von Pentosen. Ferner kommen im Lipofuscin keine Indol- oder Pyrrolderivate vor, was der Ausfall der EHRLICHschen Reaktion beweist. Damit sind auch besondere Beziehungen von Lipofuscin zu den Blut- und Gallenfarbstoffen unwahrscheinlich.

Zusammenfassend läßt sich über den lipidfreien Restkörper von Lipofuscin sagen, daß er neben relativ viel Stickstoff auch Schwefel, Phosphor, Aminosäuren oder andere Stickstoffbasen und Benzolderivate enthält. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Protein mit besonderen Eigenschaften.

Anorganische Bestandteile kommen im Lipofuscin etwa in der gleichen Menge wie in der Herzmuskulatur vor. Ausnahmen bilden dabei Silicium, Magnesium und Aluminium. Das Silicium könnte, wenigstens zum Teil, aus den verwendeten Glasgefäßen stammen. Um das auszuschließen, müßte die Isolierung in Kunststoff- oder paraffinierten Glasgefäßen erfolgen. Der Aluminium- und der Magnesiumgehalt sind aber wohl als relativ hoch zu bezeichnen. Über die Funktionen dieser Metalle ist nicht allzuviel bekannt. Magnesium gehört zu den lebenswichtigen Elementen und aktiviert Fermente, die den Phosphatumsatz katalytisch beeinflussen. Die Höhe des Eisenwertes wurde durch 2 Methoden, die übereinstimmende Werte ergaben, gesichert. Es ist nicht möglich, aus dem Eisengehalt auf die endogene oder hämatogene Herkunft des Pigmentes zu schließen. Interessant ist er aber im Hinblick auf den Ausfall histologischer Eisenuntersuchungen, etwa der Turnbull- oder der Berliner-Blau-Reaktion. Als entscheidend für den Ausfall dieser Reaktion im Gewebe werden meist quantitative Unterschiede hervorgehoben. SCHWARZ (1928) gibt als untere Grenze für das Erscheinen einer diffusen Blaufärbung einen Eisengehalt von 0,12% an. Die Eisenreaktionen können aber auch negativ verlaufen, wenn das Eisen in nicht ionisierter Form vorliegt. Solches Eisen kann etwa durch die Einwirkung von Halogenen [KOCKEL (1930)] teilweise ionisiert und so dem histologischen Nachweis zugänglich gemacht werden. OEBIKE (1950) hat Lipofuscin mit solchen Methoden untersucht. Die Reaktion verlief positiv bei Lipofuscin in der glatten Muskulatur, negativ in der Prostata und in den Samenblasen. Er betonte, daß eine endgültige Klärung nur durch den Eisennachweis in der Asche erbracht werden könnte. Für das Lipofuscin des Herzmuskels kann festgestellt werden, daß der Eisengehalt nur von der gleichen Größenordnung wie in der Herzmuskulatur selbst ist.

Schließlich konnten noch 2 Fermentgruppen, die Proteasen und die Esterasen, im Lipofuscin erfaßt werden. Nach Oxydasen oder anderen ähnlich empfindlichen Fermenten wurde nicht gefahndet. Man

hätte, um Aussicht auf Erfolg zu haben, von vornherein das methodische Vorgehen wesentlich anders gestalten müssen. Die beiden untersuchten Fermente zeigen einen etwa linearen Anstieg ihrer Wirkung in bestimmten Zeiteinheiten, sind aber von geringer Aktivität. Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Fermente im Lipofuscin sind kaum zu ziehen, da ihre Stellung im Stoffwechselgeschehen auch sonst noch nicht genügend geklärt ist.

Welche Gesichtspunkte ergeben sich nun, wenn man die bestehenden Theorien über die Entstehung und Bedeutung von Lipofuscin an Hand der vorliegenden Ergebnisse einer kritischen Betrachtung unterzieht? Der geringe Fettgehalt und die Zusammensetzung des lipidfreien Restes lassen besondere Beziehungen von Lipofuscin zum Fettstoffwechsel, wie sie HUECK (1912, 1921) vermutete, nicht erkennen. LUBARSCH (1923) hielt Lipofuscin für ein Endprodukt des Eiweißstoffwechsels. Je mehr über die komplizierten Vorgänge im Zellstoffwechsel bekanntgeworden ist, desto weniger berechtigt erscheint die Annahme eines unabhängig voneinander verlaufenden Fett- oder Eiweißstoffwechsels. In neuerer Zeit hat OEBIKE (1950) das Lipofuscin als ein Pigment bezeichnet, das nicht aus dem Zellstoffwechsel, sondern aus dem Blut entsteht. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen aber besondere Beziehungen von Lipofuscin zum Blutfarbstoff nicht erkennen. Es besteht daher kein Grund, die alte Ansicht, daß das Lipofuscin ein zelleigenes, endogen entstandenes Pigment ist, aufzugeben. Sehr schwierig ist die Frage nach einer funktionellen Bedeutung von Lipofuscin für die Zelle, die BÖHMIG (1937) aufgeworfen hat, zu beantworten, da es vorläufig für sie kein sicheres Kriterium gibt. Auch über die Beziehungen zwischen Lipofuscin und den anderen endogenen Pigmenten läßt sich vorerst nichts Sicheres aussagen.

So muß man feststellen, daß die Kernfrage des Pathologen nach der Bedeutung von Lipofuscin heute noch nicht beantwortet werden kann. Unsere Kenntnisse vom normalen Stoffwechsel in der Zelle sind dafür noch zu gering. Durch die geschilderten neuen Arbeitsmethoden ergeben sich aber gerade auf dem Gebiet der Pigmentforschung neue Möglichkeiten.

### Zusammenfassung.

1. Nach einer kritischen Betrachtung der heutigen Kenntnisse über das Lipofuscin und einer Abwägung der einzelnen Untersuchungsmethoden wird die besondere Bedeutung chemischer Untersuchungen an isoliertem Lipofuscin hervorgehoben.

2. Es wird eine Methode zur Isolierung reinen, unveränderten Lipofuscins aus Herzmuskulatur angegeben, die bestimmte physikalische Eigenschaften von Lipofuscin für die Isolierung ausnutzt. Chemische Methoden zur Isolierung erscheinen wenig geeignet, da durch sie das Pigment denaturiert wird.

3. Bei mikroskopischen Untersuchungen zeigt das isolierte Lipofuscin das gleiche optische und färbereiche Verhalten wie innerhalb der Zelle. Es kann daher sicher identifiziert und auch in seinem Reinheitsgrad beurteilt werden.

4. Die chemisch-analytischen Untersuchungen ergeben einen Lipidgehalt von 20%. Der Rest ist ein Körper, in dem Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Aminosäuren (auch cyclische) oder andere stickstoffhaltige Basen enthalten sind. Vermutlich handelt es sich bei ihm um ein Protein mit besonderen Eigenschaften und mit einer Farbstoffkomponente. Unter den anorganischen Bestandteilen fällt der relativ hohe Gehalt an Magnesium und Aluminium auf.

5. Im Lipofuscin konnten 2 Fermente, die Protease und die Esterase, nachgewiesen werden, deren Aktivität jedoch recht gering ist.

### Literatur.

- BACHMANN, K.-D.: Virchows Arch. **323**, 133 (1953). — BÖHMIG, R.: Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. (10. Tagg) **1937**, 254. — BRAHN, B., u. M. SCHMIDTMANN: Virchows Arch. **227**, 137 (1920); **239**, 488 (1922). — BÜCHNER, F., u. H. KALK: Klin. Wschr. **1947**, 874. — ENDICOTT, K., u. R. D. LILLIE: Amer. J. Path. **20**, 149 (1944). — FINK, M. v.: Virchows Arch. **297**, 404 (1936). — HAMPERL, H.: Virchows Arch. **292**, 1 (1934); **318**, 32 (1950). — HUECK, W.: Beitr. path. Anat. **54**, 68 (1912). — In KREHL-MARCHANDS Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. III/2, S. 298. Leipzig 1921. — KNY, W.: Virchows Arch. **299**, 468 (1937). — KOCKEL, H.: Virchows Arch. **277**, 856 (1930). — KÖNIG, P.: Beitr. path. Anat. **75**, 181 (1926). — KÜHN, H. A.: Beitr. path. Anat. **109**, 589 (1947). — KUTSCHERA-ARCHBERGEN, H.: Frankf. Z. Path. **27**, 21 (1922). — LANG, K., u. G. SIEBERT: Aufarbeitung von Geweben und Zellen. In HOPPE-SEYLER/THIERFELDERS Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II/10. Heidelberg: Springer 1955. — Die chemischen Leistungen der morphologischen Zellelemente. In FLASCHENTRÄGER-LEHNARZT, Physiologische Chemie, Bd. II/1. 1954. LANG, K., G. SIEBERT u. G. JUNG: Unveröffentlicht. — LILLIE, R. D., F. S. DAFT and W. H. SEBRELL: Publ. Health Rep. **56**, 1255 (1941). — LINDNER, E.: Ärztl. Forsch. **11**, 505 (1954). — LUBARSCH, O.: Zbl. Path. **13**, 801 (1902). — Virchows Arch. **239**, 491 (1922). — MAASS: Arch. mikrosk. Anat. **34**, 452 (1889). — MARTIN, A., u. T. MOORE: Chem. a. Industr. **55**, 236 (1936). — MASON, K. E., and I. R. TELFORD: Arch. of Path. **43**, 363 (1947). — MOORE, T., and Y. L. WANG: Brit. J. Nutrit. **1**, 53 (1947). — MÜLLER, H.: Virchows Arch. **295**, 514 (1935). — OEBIKE, B.: Wesen und Herkunft endogener Pigmente. Veröff. morph. Path. **56** (1950). — PAPPENHEIMER, A. M., and J. VICTOR: Amer. J. Path. **22**, 395 (1946). — ROSENFELD, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **45**, 46 (1901). — SALKOWSKI, E.: Virchows Arch. **227**, 121 (1920). — SCHMIDT, R.: Virchows Arch. **323**, 123 (1953). — SCHMIDTMANN, M.: Verh. dtsh. path. Ges. (33. Tagg) **1949**, 212. — SCHWARZ, L.: Virchows Arch. **269**, 638 (1928). — SIEBERT, G., O. HEIDENREICH, R. BÖHMIG u. K. LANG: Naturwiss. **1955**. — UHLENBROOCK, K., u. R. BÖHMIG: Virchows Arch. **299**, 699 (1937).

Dr. Ö. HEIDENREICH, Pathologisch-Bakteriologisches Institut  
der Städt. Krankenanstalten Karlsruhe.