

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn  
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

## Über die Entstehung des Ceroidpigmentes bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose\*

Von

PETER GEDIGK und ROBERT FISCHER

Mit 11 Textabbildungen, davon 2 farbige

(Eingegangen am 25. Januar 1958)

Das Auftreten eines fetthaltigen eisenfreien Pigmentes beim lokalen Erythrocytenabbau ist seit fast 60 Jahren bekannt. Wegen seiner braunen Eigenfarbe und seiner Entstehung beim Blutzerfall ist es als Hämofuscin bezeichnet und von den anderen hämatogenen Pigmenten, dem Hämosiderin und Hämatoidin, abgegrenzt worden<sup>24, 39, 40</sup>. Unabhängig davon wurden in den beiden vergangenen Jahrzehnten bei der experimentellen diätetischen Lebercirrhose, bei anoxischen Lebernekrosen, beim Vitamin E-Mangel, bei der Sprue, in arteriosklerotischen Ulcera, in Ovarien und in lipophagen Granulomen Pigmente beobachtet, die wegen ihres wachsartigen glänzenden Aussehens und ihres Fettgehaltes den Namen „Ceroid“ erhielten<sup>9, 31, 32</sup> (weitere Literatur bei ZOLLINGER<sup>43</sup>). Sehr bald zeigte es sich, daß diese beiden Lipopigmente in vielen morphologischen und färberischen Eigenschaften miteinander übereinstimmen und außerdem dem in Parenchymzellen auftretenden Lipofuscin nahestehen: Alle diese Pigmente, nämlich das sog. Hämofuscin, das Ceroid und das Lipofuscin sind unter anderem durch ihre gelbliche bis gelbbraune Eigenfarbe, ihre Sudanophilie, die Unlöslichkeit ihres Fettbausteines in organischen Lösungsmitteln, sowie ihre Säurefestigkeit gekennzeichnet. Bemerkenswert ist ferner ihr Gehalt an hydrolytischen Enzymen<sup>13, 23</sup>.

Da nun die histochemischen Eigenschaften dieser Pigmente in weiten Grenzen schwanken und ihre chemische Zusammensetzung und Entstehungsweise nur bruchstückhaft bekannt sind, herrscht hinsichtlich ihrer Einteilung und Bezeichnung eine fast unübersehbare Verwirrung. Und nicht zuletzt gehen die Meinungen über ihre kausale und formale Genese weit auseinander (vgl. hierzu die Diskussion bei HAMPERL<sup>20</sup>, LINDNER<sup>33</sup> und ZOLLINGER<sup>43</sup>).

Die Vielfalt der Meinungen läßt sich in zwei Hypothesen zusammenfassen: Die eine Gruppe von Autoren vertritt den Standpunkt, daß

---

\* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

diese fetthaltigen Pigmente im Prinzip gleichartig sind und nur verschiedene Entwicklungsstufen ein und desselben Pigmentes darstellen. Dabei ist jedoch noch keine Einigkeit darüber erzielt worden, in welcher Weise die Entwicklung dieser Pigmente abläuft. So hält GOMORI<sup>16</sup> das Ceroid für die älteste Form der Lipopigmente, während PEARSE<sup>38</sup> das Ceroid als die jüngste Entwicklungsstufe und das Lipofuscin als das Spätprodukt bei der Ausreifung lipogener Pigmente ansieht.

Demgegenüber werden von anderen Autoren die genannten Lipopigmente voneinander getrennt, wobei auf Unterschiede in ihrer Pathogenese, sowie in ihren chemischen und histochemischen Eigenschaften verwiesen wird. So stellen LILLIE und Mitarbeiter<sup>9</sup> die Identität zwischen dem Hämofuscin und Ceroid in Abrede und klassieren das Ceroid unter die Lipofuscine. BRAHN und SCHMIDTMANN<sup>1</sup>, LUBARSCH<sup>34</sup>, KUTSCHERA-AICHBERGEN<sup>26</sup>, sowie HEIDENREICH und SIEBERT<sup>23</sup> halten dagegen die Zugehörigkeit der Lipofuscine zu der Gruppe der Lipopigmente für wenig wahrscheinlich. Nach ihrer Ansicht müssen die Lipofuscine und die Ceroidpigmente wegen ihres unterschiedlichen Fettgehaltes voneinander abgegrenzt werden.

Wenn man nun diese Hypothesen kritisch vergleicht, so ergibt sich folgendes Bild:

Alle Lipopigmente besitzen eine Reihe von gemeinsamen färberischen und histochemischen Eigenschaften. Da man außerdem häufig in ein und demselben histologischen Schnittpräparat (z.B. in der Leber oder im Ovar) Lipopigmente mit wechselnden Eigenschaften findet, liegt die Vermutung nahe, daß die Unterschiede zwischen diesen gefärbten Körnchen nur der Ausdruck für das Vorliegen verschiedener Entwicklungsstufen eines Pigmentes sind<sup>16,38</sup>.

Gegen ihre Gleichartigkeit lassen sich aber doch gewichtige morphologische Gründe aufführen: Es sei nur an die gestaltlichen Unterschiede zwischen den eckigen Lipofuscinkörnchen in den Parenchymzellen und dem rundlichen Ceroid in den phagocytierenden Mesenchymzellen erinnert. Vor allem aber würde es der biologischen Erfahrung widersprechen, wenn man annehmen müßte, daß die an funktionell besonders wichtigen Zellbezirken, wie z.B. an den Kernpolen der Herzmuskelfasern, liegenden Lipofuscinkörnchen identisch wären mit den ohne sichtbare Ordnung im Cytoplasma von Phagocyten angehäuften Ceroidgranula.

Die Klärung dieser Fragen hat zunächst eine genaue Kenntnis der verschiedenen Entwicklungsstufen der Lipopigmente zur Voraussetzung. Da wir in den histologischen Präparaten jedoch nur „Momentbilder“ vor uns haben, ist es außerordentlich schwierig, aus ihnen das Alter eines Strukturelementes mit genügender Sicherheit zu bestimmen. In der

Regel ist es daher nicht ohne weiteres möglich, bei nebeneinanderliegenden, histochemisch etwas unterschiedlichen Pigmenten festzustellen, welche das jüngere und welche das ältere Entwicklungsstadium repräsentieren. Den bisher in der Literatur vorliegenden Angaben über die Entwicklung der Lipopigmente liegen daher meistens nur spekulative Betrachtungen zugrunde. Auch die wenigen experimentellen Arbeiten auf diesem Gebiet können zur Lösung dieses Problems nicht beitragen, da sie nur kurze Zeitabschnitte berücksichtigen und somit keine Aussagen über späte Entwicklungsstadien zulassen. Und schließlich sind nicht selten nur wenige chemische und histochemische Eigenschaften der Pigmente geprüft und Ergebnisse miteinander verglichen worden, die mit verschiedenartigen Methoden gewonnen waren. In Anbetracht dieser Tatsachen wird es verständlich, daß bei der pathogenetischen Deutung der Lipopigmente viele einander widersprechende Theorien vertreten werden, und daß z. B. in der jüngsten Zeit auch GOMORI<sup>16</sup> und PEARSE<sup>38</sup> bei dem Versuch, das räumliche Nebeneinander fetthaltiger Pigmente in ein zeitliches Nacheinander umzudeuten, zu völlig entgegengesetzten Resultaten gelangt sind.

Wegen der Widersprüche zwischen den einzelnen Auffassungen haben wir versucht, mit eigenen Experimenten in die Entstehung und Alterung lipogener Pigmente einen Einblick zu gewinnen, um so vielleicht zur Kenntnis der Orthologie und Pathologie dieser gefärbten Strukturen beizutragen. Wir sind dabei so vorgegangen, daß wir bei Ratten hämorrhagische Nekrosen des mesenterialen Fettgewebes erzeugt und in den dort entstehenden lipophagen Granulomen die Entwicklung der Lipopigmente in regelmäßigen Zeitabständen verfolgt haben.

### Versuchsanordnung und Methoden

**I. Tierversuche.** Bei den Versuchen verwendeten wir 8—10 Monate alte männliche Inzuchtratten mit einem Gewicht von 350—400 g, welche eine Mischkost aus Würfelfutter und Getreide und zusätzlich Karotten und Salatblätter erhielten. Insgesamt operierten wir 50 Tiere nach dem Vorgehen von HARTROFT<sup>21</sup> in Nembutal-Narkose (0,25—0,3 ml i. p.).

Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden beide Hodenfettzipfel an ihrer Basis durch einen locker angelegten Catgutfaden abgebunden und jeweils 0,1 ml Heparin (100 E in physiologischer Kochsalzlösung) in das Fettgewebe injiziert. Anschließend quetschten wir mehrmals kräftig beide Fettzipfel mit einer größeren Gefäßklemme. Danach waren oft schon mit bloßem Auge kleinere Blutungen in das Fettgewebe erkennbar. Nach dem Versenken der Zipfel in die Bauchhöhle und intraperitonealer Penicillininjektion erfolgte ein dreischichtiger Verschluß der Laparotomiewunde. Die Tiere erholten sich sehr rasch von dem Eingriff. Die Wundheilung war bis auf einen Fall komplikationslos, so daß nach 1—2 Monaten nur noch eine strichförmige Hautnarbe sichtbar war.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Nackenschlag und Dekapitation, und zwar jeweils am 4., 7., 10., 13., 35., 46., 60., 80., 100., 160., 190. und 230. Tage nach der Operation. Zu jedem Termin wurden 2—3 Tiere getötet, um genügend Material für die

Aufarbeitung zu erhalten. Nach kurzer Versuchsdauer waren die gequetschten Fettzipfel meist von trüber, grauweißer Farbe und von kleineren und größeren Blutungen durchsetzt. Im weiteren Verlauf trat eine Schrumpfung und Verfestigung dieses Fettgewebes auf. Schließlich (nach 2—3 Monaten) fanden sich in den stark geschrumpften Hodenfettzipfeln meistens nur ein oder zwei etwa erbsengroße, feste Knötchen. Diese zeigten auf der Schnittfläche kleine rundliche, blaßgelbe oder weißliche Bezirke mit einem umgebenden gelblichen Saum, der nach langer Versuchsdauer eine mehr gelbbraune Farbe annahm. Manchmal war von den gequetschten Fettzipfeln jedoch nur noch ein schmaler, mit der Umgebung verwachsener, leicht bräunlich verfärbter Gewebsstrang übriggeblieben. Die oben beschriebenen Gewebestückchen wurden mit einer Rasierklinge halbiert und je zur Hälfte in 10%igem neutralen Formalin bzw. eiskaltem Aceton fixiert. Je nach den erforderlichen Untersuchungen wurde das Gewebe in Paraffin oder in Gelatine eingebettet.

**II. Histochemische Methoden.** 1. Die von uns angewandten *histochemischen Reaktionen zum Nachweis von Eiweißkörpern, Lipiden und Kohlenhydraten* können der Tabelle I entnommen werden. Ihre Durchführung erfolgte nach den Angaben von LILLIE<sup>29</sup>, PEARSE<sup>38</sup>, sowie GEDIGK<sup>12</sup>.

Zur gleichzeitigen Darstellung von Ceroid und Hämosiderin in ein und demselben histologischen Schnitt, die zur morphologischen Orientierung sehr zweckmäßig ist, hat sich eine Kombination der Berliner Blau-Reaktion mit der Sudan- bzw. Ölrotfärbung im Paraffinschnitt bewährt. Dabei wird zunächst der Eisennachweis durchgeführt, dessen Reaktionsprodukt, das Berliner Blau, sehr stabil ist. Anschließend erfolgt die Färbung mit Sudan III/IV oder Ölrot. Bei diesem Vorgehen wird die in älteren Eisenpigmenten vorhandene Lipidkomponente durch das anfangs gebildete Berliner Blau überdeckt, so daß ihre Affinität für Fettfarbstoffe bei der Färbung mit Sudanrot bzw. Ölrot nicht mehr in Erscheinung tritt. Das eisenfreie Ceroid wird dagegen durch den Fettfarbstoff unverändert dargestellt. In diesen Schnitten sind daher die Eisenpigmente tiefblau, die Ceroidkörnchen leuchtend rot gefärbt.

2. Der *histochemische Nachweis von Enzymen* wurde nach den Angaben von PEARSE<sup>38</sup> und GOMORI<sup>16</sup> durchgeführt. Einzelheiten der Methodik sind in den Arbeiten von GEDIGK und BONTKE<sup>13</sup> angegeben.

*Folgende Fermentreaktionen wurden angewandt:*

1. *Saure Phosphatase.* a) Bleiphosphatmethode nach GOMORI, b) Azofarbstoffmethode nach GROGG und PEARSE;

2. *Alkalische Phosphatase.* a) Calcium-Kobaltmethode nach GOMORI, b) Azofarbstoffmethode nach PEARSE.

3. *Unspezifische Esterase* (GOMORI, PEARSE),

4. *Lipasen* (GOMORI, PEARSE),

5. *Phosphoamidase* (GOMORI, PEARSE),

6. *Aminopeptidase* (BURSTONE und FOLK),

7. *Peroxydase* (DE ROBERTIS und GRASSO, PEARSE).

### Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

*Vier Tage nach der Quetschung* findet man im Mesenterium ausge dehnte, von Blutungen durchsetzte Nekrosen. Das noch erhaltene Gewebe ist ödematös aufgelockert und schütter leukocytär durchsetzt. Am Rand der Nekrosen und Blutungen liegen vermehrt Histocyten und Mastzellen, sowie spindelige bis polygonale phagocytierende Zellen, die

in ihrem Cytoplasma vereinzelte kleinste Fetttröpfchen enthalten (Abb. 1). Daneben trifft man an manchen Stellen Zellgruppen, die mit Eisenpigmentkörnchen beladen sind.

Mit histochemischen Methoden können an den Phagocyten folgende Befunde erhoben werden: Die intracellulären sudanophilen Fetttröpfchen werden bei der gewöhnlichen Paraffineinbettung in der Regel aus dem Schnitt herausgelöst, so daß die Phagocyten dann ein schaumiges Cytoplasma besitzen. Ganz vereinzelt trifft man jedoch Lipidtröpfchen, die in den üblichen organischen Lösungsmitteln nicht löslich sind und daher auch im Paraffinschnitt erhalten bleiben (Abb. 1). Die Lipidgranula besitzen keine Eigenfarbe und zeigen auch keine nennenswerte Autofluoreszenz. Mit dem Schiffischen Reagens werden sie nicht angefärbt; erst nach vorheriger Oxydation mit Perameisensäure oder Perjodsäure nehmen sie bei der Schiff-Reaktion einen roten Farbton an. Die Peroxydreaktion und die Färbung nach ZIEHL-NEELSEN sind deutlich positiv. Mit basischen Farbstoffen, wie Toluidinblau werden sie nicht oder nur ganz schwach gefärbt; dementsprechend erlischt ihre Methylenblauindefähigkeit bereits bei  $p_H$  4,5 (Abb. 3a). — Die Reaktionen zum Nachweis von Aminosäuren und Proteinen sind negativ; auch ein Reduktionsvermögen ist nicht nachweisbar.

In der *folgenden Zeit* entwickelt sich im Bereich des gequetschten Mesenteriums ein resorbierendes Granulationsgewebe mit mononucleären Phagocyten und mehrkernigen Riesenzellen. Das nekrotische Fettgewebe und die Blutungsreste werden dabei zum großen Teil von dem Säftestrom aufgelöst und abtransportiert. Einige Abbauprodukte dieser Gewebe werden jedoch im Cytoplasma der phagocytierenden Zellelemente gespeichert. *Nach 5—7 Wochen* findet man dann in diesen Zellen, die nunmehr einen aufgeblähten, rundlichen bis ovalen Zelleib besitzen, kleinere und größere, fetthaltige Granula. Diese Körnchen sind gleichmäßig im Cytoplasma verteilt, das sie in der Regel völlig ausfüllen (Abb. 2). Andere Zellen enthalten Eisenpigmentkörnchen und manchmal trifft man auch Zellen, die gleichzeitig (nebeneinander) Fettgranula und Eisenpigment gespeichert haben.

Die histochemische Untersuchung dieser Gewebe sei am Beispiel eines *46 Tage alten Granulomes* geschildert:

Die *kleineren fetthaltigen Körnchen* sind jetzt nicht mehr in organischen Lösungsmitteln löslich und können daher auch im Paraffinschnitt ausgezeichnet mit Fettfarbstoffen dargestellt werden. Auch durch 24stündiges Kochen der Schnitte in Pyridin oder einer siedenden Methanol-Chloroformmischung läßt sich die Fettkomponente dieser Körnchen nicht extrahieren. Die Granula besitzen ferner eine hellgelbe, ebenfalls nicht extrahierbare Eigenfarbe und eine deutliche gelbliche Eigenfluoreszenz (Blaulicht). Mit dem Schiffischen Reagens werden sie nur ganz schwach rötlich gefärbt. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion, die PAS-Reaktion und die Prüfung der Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN fallen stark positiv aus. Der Peroxydtest ist inkonstant, meistens negativ. Die Lipidkörnchen sind jetzt basophil und werden daher mit Toluidinblau angefärbt. Ihre Methylenblauindefähigkeit läßt sich bis  $p_H$  3,9 verfolgen (Abb. 3b). Bei der Tetrazoniumreaktion für aromatische Aminosäuren nehmen sie einen dunkelbraunroten Farbton an. Der Ninhydrin-Schiff-Test, die Millonsche Reaktion und die Argininreaktion (SAKAGUCHI) fallen teils positiv, teils eindeutig negativ aus. Durch den Reduktionstest nach

CHÈVREMENT-FRÉDÉRIC werden die lipidhaltigen Körnchen blau gefärbt, dagegen gibt die Reaktion für Sulfhydrylgruppen nach BARNETT-SELIGMAN nur eine ganz schwache rötliche Anfärbung. Bei der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL verhalten sie sich negativ.

Außer den *kleinen lipidhaltigen Granula* findet man im Cytoplasma der Speicherezellen *häufig große Fettropfen*, die meistens bei der Paraffineinbettung aus dem Schnitt herausgelöst werden. Gelegentlich lassen sie sich aber auch — genau wie die kleinen Körnchen — mit Fettlösungsmitteln nicht mehr extrahieren. Diese großen intracellulären Fettkugeln besitzen nur eine ganz schwache gelbliche Eigenfarbe, während sie im Blaulicht hellgelb aufleuchten. Mit dem Schiffischen Reagens

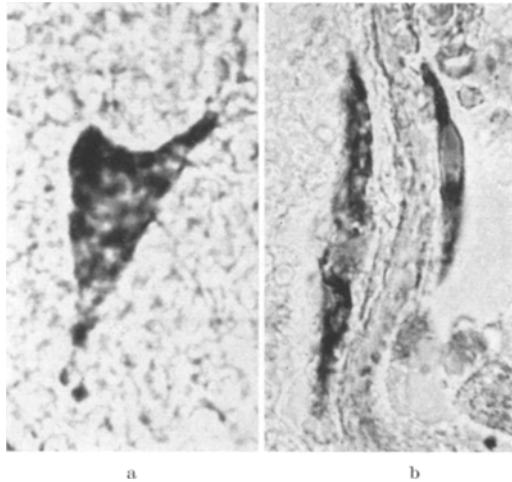


Abb. 1a u. b. Phagocyten 4 Tage nach der Quetschung des Mesenteriums. Paraffinschnitt. Fettfärbung mit Sudan III/IV. Kernfärbung: Hämatoxylin. Vergr. 1900mal. Im Cytoplasma der teils polygonalen, teils spindelförmigen Phagocyten finden sich bereits schwer lösliche, sudanophile Fettropfen

werden sie kaum angefärbt. Auch ihre Reaktionsfähigkeit mit Perjodsäure und Perameisensäure ist nur gering. Sie sind weiterhin nur schwach basophil und haben nur ein eben angedeutetes Reduktionsvermögen. Eiweißstoffe lassen sich in ihnen nicht nachweisen.

*Im Laufe der nächsten Monate* werden die Reste der Blutungen und das nekrotische Fettgewebe fast völlig resorbiert und organisiert. Schließlich findet man nach *etwa 8 Monaten* in dem gequetschten Mesenterium nur 1—2 etwa stecknadelkopfgroße Fettnekroseherde, die von einem 2—3 mm breiten Granulationsgewebesaum umgeben werden. Dieses resorbierende Bindegewebe enthält neben Histioeyten, vereinzelt Lymphocyten und jungen Capillarsprossen reichlich einkernige und mehrkernige Phagocyten, in deren Cytoplasmaleib sehr zahlreiche kleine und große lipidhaltige Granula liegen (Abb. 2). Je nach dem Umfang der ursprünglichen Blutung trifft man in wechselnder Menge Eisen- und Hämatoidinpigmente.

Diese kennzeichnende Anordnung der einzelnen Gewebsanteile, nämlich die zentrale Fettgewebsnekrose mit dem umgebenden Granulationsgewebswall, ermöglicht den Vergleich aller Stadien der Fettresorption und Speicherung in ein und demselben histologischen Schnitt: Unmittelbar am Rand des nekrotischen Zentrums sind die histiocytären Elemente gerade im Begriff, die zugrunde gegangenen Fettzellen zu phagocytieren. Je weiter man dann zur Peripherie dieser Knötchen fortschreitet, um so

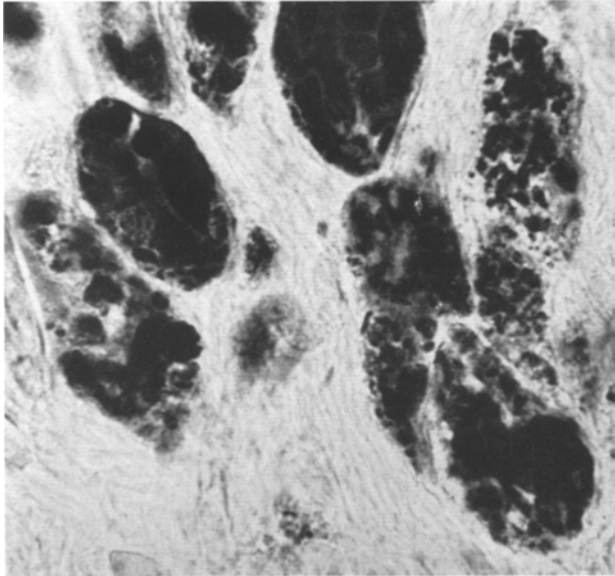


Abb. 2. Ceroidhaltige Zellen 160 Tage nach Versuchsbeginn. *Paraffinschnitt*. Färbung mit Sudanschwarz und Kernechtrot. Vergr. 1130mal. Das Cytoplasma enthält reichlich kleinere und größere Ceroidkörnchen

älter ist das Granulationsgewebe, und um so länger ist offenbar die Zeit, die seit der Phagocytose der hier liegenden Lipide vergangen ist. Die ältesten Fettablagerungen im Cytoplasma der Phagocyten sind somit am äußersten Rand der Granulome zu finden. Dementsprechend nimmt auch der bei der intracellulären Speicherung erfolgende Umbau der Fettstoffe mit der Entfernung von dem Nekrosezentrum zu: Am Rand der Nekrose unterscheiden sich die im Cytoplasma der Phagocyten sichtbaren Fetttröpfchen in ihren histochemischen Eigenschaften noch nicht nennenswert von den großen Fetttropfen der im Zentrum liegenden nekrotischen Fettzellen. Anschließend besitzen die gespeicherten lipidhaltigen Granula Eigenschaften, wie sie im allgemeinen bei dem 4 Tage alten Versuchstier zu finden waren (vgl. S. 344). Etwas weiter nach außen zu sieht man ein Stadium, das ungefähr einer 5—7wöchigen Versuchsdauer entspricht (vgl. S. 345, und am äußersten Rand der Knötchen

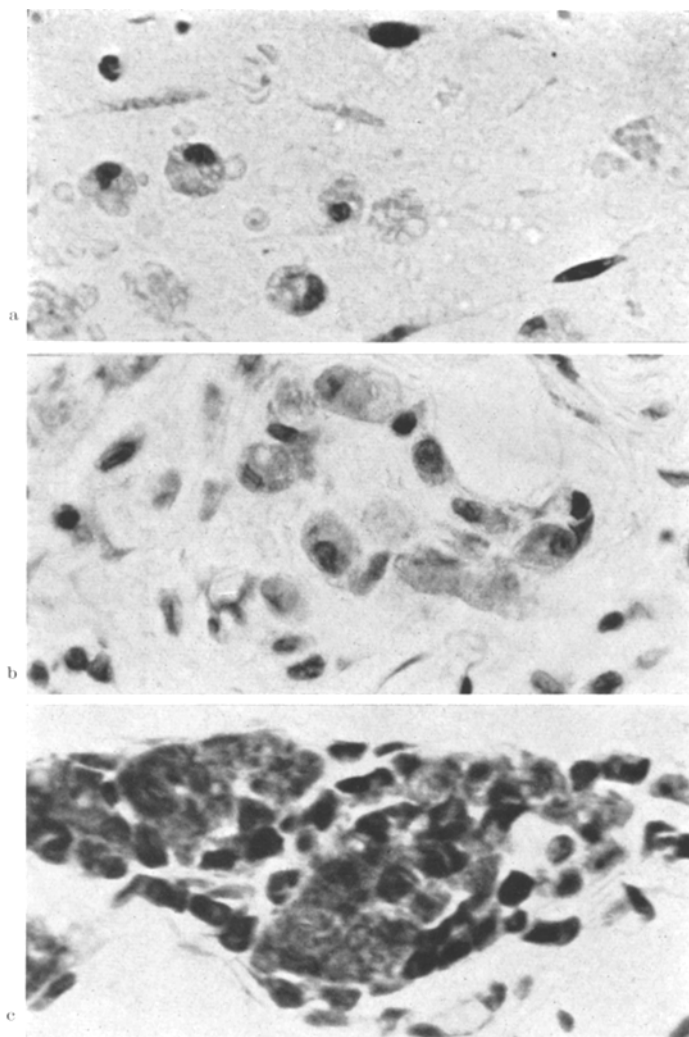


Abb. 3a—c. Phagocyten 4 Tage (a), 46 Tage (b) und 230 Tage (c) nach der Quetschung des Mesenteriums. Vergr. 827mal. Färbung mit einer  $4 \cdot 10^{-4}$  m-Methylenblaulösung, die mit Acetatpuffer auf pH 3,9 eingestellt war. Die Schnitte wurden gleichzeitig in einer Cuvette gefärbt. Die Photographie der Präparate, die Entwicklung der Platten und die Herstellung der Abzüge erfolgte ebenfalls unter konstanten Bedingungen, um vergleichbare Resultate zu erzielen. Der Vergleich der Bilder zeigt eine deutliche Zunahme der Methylenblauindefähigkeit der phagocytierten und zum Pigment umgeformten Fettstoffe im Laufe der Alterung (vgl. Tabelle 2)

sind die von den Phagocyten gespeicherten Lipide am stärksten chemisch verändert.

*Die letzteren (ältesten) intracellulären lipidhaltigen Körnchen geben folgende histochemische Reaktionen:*

In organischen Lösungsmitteln sind die Granula völlig unlöslich und werden somit bei der Paraffineinbettung nicht extrahiert. Die zunächst sehr gut mit Fettfarbstoffen darstellbaren Körnchen zeigen nach der Peripherie der Granulome hin, also mit zunehmender Alterung, eine deutliche Abnahme ihrer Sudanophilie. Am äußersten Rand der Knötchen findet man dann Phagocyten, deren Lipidgranula nur noch eine sehr geringe Affinität für Fettfarbstoffe besitzen. Da die Anfärbbarkeit fetthaltiger Strukturen mit Sudanschwarz meistens größer ist als mit Sudanrot, werden diese Körnchen mit Sudanschwarz noch ganz schwach dargestellt,

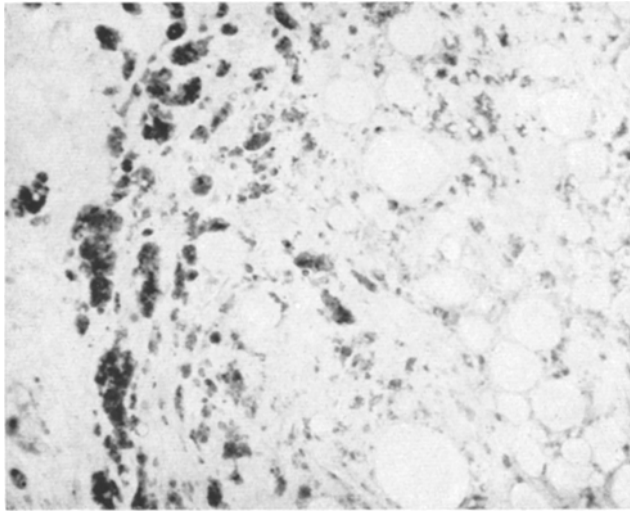


Abb. 4. Ausschnitte aus dem Granulationsgewebewall am Rand einer Fettgewebsnekrose (230 Tage nach Versuchsbeginn). Färbung mit Toluidinblau, Vergr. 162mal. Die Resorption und Organisation des nekrotischen Materials schreitet von links nach rechts fort: Links liegen Phagocyten mit älteren, stark basophilen Pigmentkörnchen. Auf der rechten Seite sind noch Reste des nekrotischen Fettgewebes erkennbar, das bereits von einzelnen phagocytierenden ceroidhaltigen Zellen durchsetzt wird. Die Basophilie der Ceroidkörnchen nimmt mit ihrer Alterung, d.h. auf diesem Bild von rechts nach links, deutlich zu

während sie bei der Sudanrotfärbung nur ihre gelbbraune Eigenfarbe behalten (Abb. 10 und 11).

Mit der Alterung der Granula geht weiterhin eine Zunahme ihrer Eigenfarbe einher. Sie sind jetzt deutlich gelblich gefärbt und besitzen in der äußersten Randzone der Knötchen manchmal sogar eine gelbbraune Farbe (Abb. 10 und 11). Auch diese Farbkomponente kann mit organischen Lösungsmitteln nicht aus dem Schnitt extrahiert werden. Der Eigenfarbe entsprechend besitzen die älteren Granula nunmehr eine gelbbraune Autofluoreszenz.

Die Lipidgranula verlieren allmählich ihre Färbbarkeit mit dem Schiffschen Reagens. Auch die Nachweisreaktion für Peroxyde ist völlig negativ. Die PAS-Reaktion, die Perameisensäure-Schiff-Reaktion und die Färbung nach ZIEHL-NEELEN sind dagegen unverändert stark positiv. Sehr auffällig ist die Verstärkung der Basophilie, die sich in einer ausgeprägten Affinität für basische Farbstoffe, wie Toluidinblau, und einer Methylenblaubindefähigkeit bis  $pH$  3,0 äußert (Abb. 3c und 4). — Im Laufe der Alterung der Körnchen nimmt auch ihr Reduktionsvermögen erheblich zu. So werden sie bei dem Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC stark blau gefärbt (Abb. 6). Außerdem besitzen die älteren Granula

nunmehr die Fähigkeit, Silbernitrat zu reduzieren, so daß sie bei der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL einen braunschwarzen Farbton annehmen (Abb. 5b). Die Tetrazoniumreaktion färbt die kleinen lipidhaltigen Granula unverändert deutlich braunrot an (Abb. 7). Die Ninhydrin-Schiff-Reaktion und der Argininnachweis

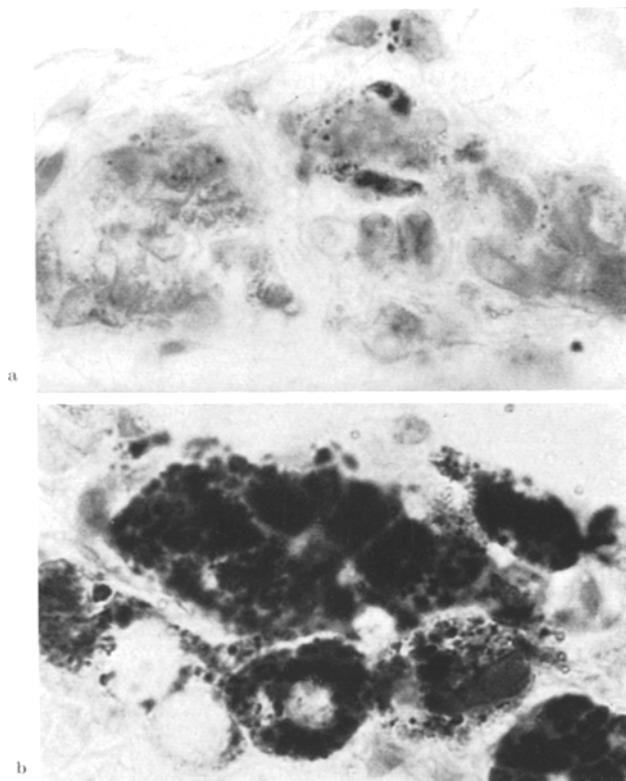


Abb. 5a u. b. Ceroidhaltige Phagocyten. Vergr. 1130mal. Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL. a: 160 Tage nach Versuchsbeginn. Die Pigmentkörnchen vermögen die ammoniakalische Silberlösung (von ganz vereinzelt Ausnahmen abgesehen) noch nicht zu reduzieren. Ihre photographische Wiedergabe beruht auf der zu diesem Zeitpunkt bereits ausgeprägten gelben Eigenfarbe. b: 230 Tage nach Versuchsbeginn. Ausgeprägtes Reduktionsvermögen der Ceroidkörnchen, die jetzt tief braun-schwarz gefärbt sind. Nur die großen, unvollständig verarbeiteten intracellulären Fetttropfen bleiben ungefärbt

(SAKAGUCHI) geben inkonstante Resultate. Auch Sulfhydrylgruppen können mit der Reaktion nach BARNETT-SELIGMAN nicht sicher nachgewiesen werden.

Neben diesen *kleinen fetthaltigen Körnchen* enthalten die Phagocyten auch in den älteren Granulomen *größere Fetttropfen* ( $1-3\ \mu$ ) (Abb. 11), deren Zahl allerdings mit dem zunehmenden Alter der Granulome abnimmt. Anscheinend werden die großen Tropfen von den Speicherzellen allmählich in kleine Partikel unterteilt und weiterverarbeitet. In diesen großen Fettkugeln lassen sich keine Eiweißstoffe nachweisen (Abb. 7). Ihr histochemisches Verhalten entspricht weitgehend dem der ersten Entwicklungsstadien des Ceroids. Sie sind in organischen

Lösungsmitteln schlecht löslich oder sogar völlig unlöslich. Sie besitzen eine schwach gelbliche Eigenfarbe und eine hellgelbe Autofluoreszenz. Mit der Perjodsäure- und der Perameisensäure-Schiff-Reaktion und bei der Prüfung der Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN werden sie nur schwach rot gefärbt. Ihre Basophilie und ihr



Abb. 6

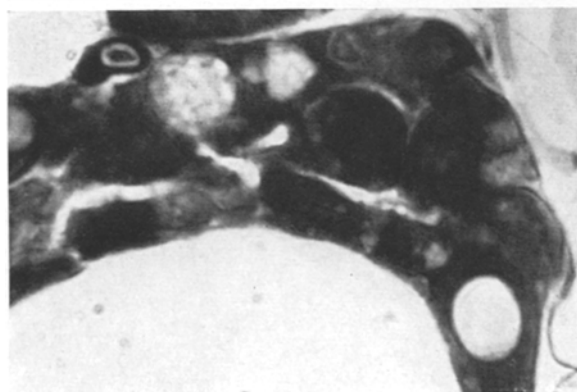


Abb. 7

Abb. 6 u. 7. Phagocyten 230 Tage nach Versuchsbeginn. Vergr. 1130mal. Abb. 6. Reduktionstest (Ferri-Ferriyanidmethode nach CHÈREMONT-FRÉDÉRIC). Starkes Reduktionsvermögen der Pigmentkörnchen. Die großen, unvollständig verarbeiteten Fettkugeln besitzen keine nennenswerte Reduktionsfähigkeit. Sie bleiben ungefärbt. Abb. 7. Tetrazoniumreaktion für aromatische Aminosäuren (DANIELLI). Die Ceroidkörnchen werden bei dieser Reaktion stark angefärbt, während die unverarbeiteten großen Fetttropfen ungefärbt bleiben

Reduktionsvermögen sind ebenfalls wesentlich geringer ausgeprägt als bei den kleinen lipidhaltigen Granula (Abb. 5b und 6).

Außerdem findet man in den Gewebsspalten der älteren Granulome Fettmassen, die teils membranartig gefaltet sind und teils eine völlig unregelmäßige Gestalt aufweisen. Auch diese nicht phagocytierten Fettstoffe sind nicht mehr extrahierbar und schwach gelblich gefärbt. Sie sind nicht basophil, besitzen kein nennenswertes Reduktionsvermögen und werden nur schwach mit der Perjodsäure- und Perameisensäure-Schiffreaktion angefärbt. Eiweißstoffe lassen sich in ihnen nicht nachweisen

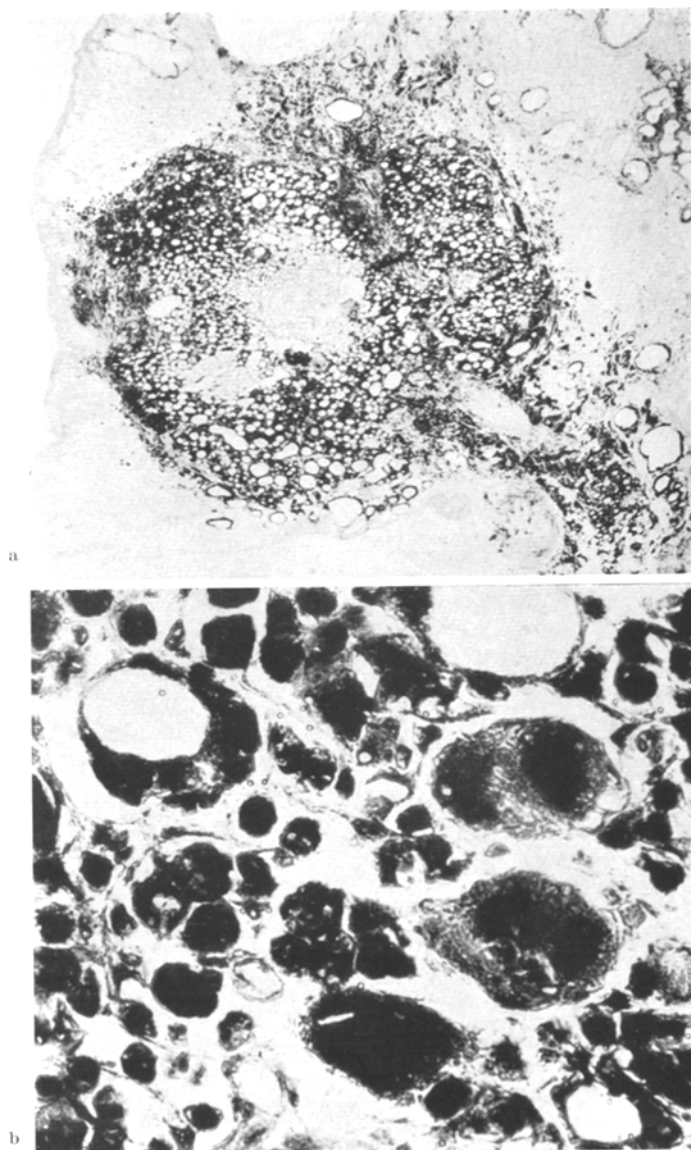


Abb. 8a u. b. Granulationsgewebe mit zentralem, restlichem Nekroseherd 160 Tage nach Versuchsbeginn. Saure Phosphatase (Gomori, Inkubationszeit 90 min). a: Vergr. 20mal. Die Fermentaktivität ist auf das resorbierende Granulationsgewebe beschränkt. Im Bereich der zentralen Nekrose und im entfernteren noch erhaltenen Fettgewebe keine histochemisch nachweisbare Phosphataseaktivität. b: Vergr. 596mal. Starke Fermentaktivität in mononucleären Phagocyten und Riesenzellen. Die zunächst feinkörnigen, den Ort der Enzymaktivität markierenden Niederschläge sind infolge der langen Inkubation der Schnitte zu einem homogenen Präcipitat zusammengefloßen

In weiteren Experimenten ermittelten wir die *Fermentaktivität der fettspeichernden Zellen*.

Dabei ergaben sich folgende Befunde:

Bei der Nachweisreaktion für *saure Phosphatase* (GOMORI) traten schon nach kurzer Zeit in den phagocytierenden Zellen braunschwarze körnige Niederschläge

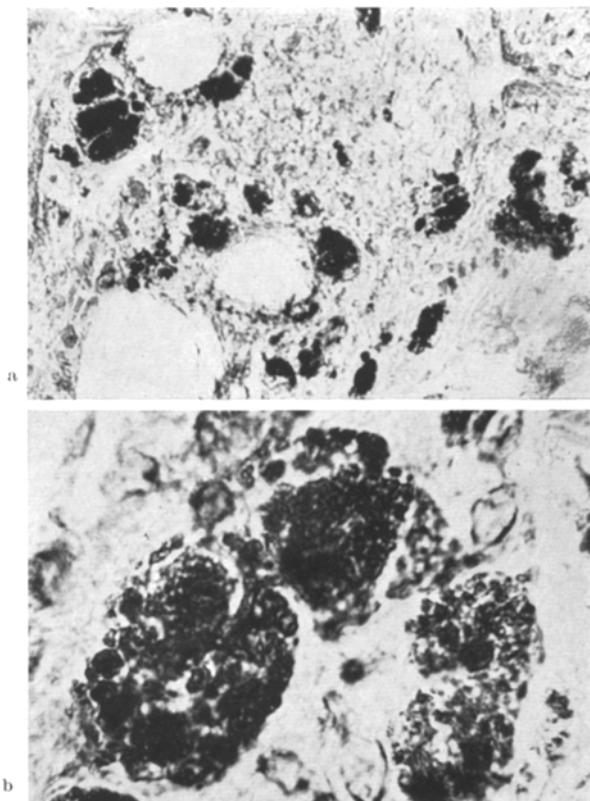


Abb. 9a u. b. Phagocyten 80 Tage nach Versuchsbeginn. Amino-peptidase (Inkubationszeit 90 min). a: Vergr. 535mal. b: Vergr. 1070mal. Starke Fermentaktivität in den ceroidhaltigen Zellen

auf, die bei längeren Inkubationszeiten zu homogenen Präcipitaten zusammenflossen. Die anfangs sichtbaren braunschwarzen Körnchen entsprachen in ihrer Größe und Anordnung den intracellulären, kleinen, lipidhaltigen Granula. Die großen nicht verarbeiteten Fetttropfen im Cytoplasma der Phagocyten färbten sich bei der Phosphatasereaktion nicht an (Abb. 8).

Das gleiche Bild ergab die *Phosphoamidase-reaktion*, bei der die phagocytierenden Zellen ebenfalls eine starke Aktivität zeigten.

Ferner beobachteten wir in den Phagocyten eine ausgeprägte *Amino-peptidase-aktivität*, während die Fibroblasten und Capillarwände nur eine schwache (inkonstante) Aktivität dieses Enzyms aufwiesen (Abb. 9).

Die näheren morphologischen Beziehungen zwischen den Ceroidkörnchen und Stellen der *Phosphoamidase*- und *Amino-peptidaseaktivität* ließen sich nicht bestimmen, da die derzeitigen histochemischen Nachweisreaktionen dieser Enzyme für eine feinere Lokalisation innerhalb der Zellen ungeeignet sind. Nur bei der Amino-peptidase könnte man vielleicht vermuten, daß die Aktivität dieses hydrolytischen Enzymes auch im Bereich der Pigmentkörnchen liegt (Abb. 9).

*Alkalische Phosphatase* besaßen die Capillarwände und polymorphkernigen Leukocyten innerhalb der Gefäßlichtungen. Die emigrierten Leukocyten in den Gewebsspalten wiesen dagegen meistens keine alkalische Phosphatase auf.

Eine deutliche *Peroxydasereaktion* gaben die polymorphkernigen Leukocyten. Dagegen konnten wir dieses Ferment — wider Erwarten — nicht in den fett-verarbeitenden und -speichernden Phagocyten nachweisen.

Eine schwache Aktivität von *Lipasen* und *unspezifischer Esterase* beobachteten wir gelegentlich in den fettspeichernden Zellen. Dieser Befund war jedoch inkonstant und nicht sicher reproduzierbar. Versuche zum Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität haben wir nicht durchgeführt.

Die Aktivität der hydrolytischen Enzyme trat schon kurze Zeit (am 10. Tag) nach der Quetschung des Mesenteriums auf und blieb dann bis zum 120. Tag fast unverändert erhalten.

In den älteren Granulomen (nach dem 120. Versuchstag) haben wir wegen des knappen Gewebsmaterials keine Enzymreaktionen durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen<sup>13</sup> ist jedoch bekannt, daß die Fermentaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe lange Zeit (bis zu einem Jahr) nahezu konstant bleibt, so daß damit gerechnet werden muß, daß auch bei unseren Experimenten in den älteren Resorptionsherden keine Änderung der Enzymausstattung der Phagocyten erfolgt.

### Diskussion

Bei der Resorption und Organisation von hämorrhagischen Fettgewebstekrosen des Mesenteriums treten in den phagocytierenden Mesenchymzellen Fetttropfen auf, die allmählich zu einem gelblichen bis gelbbraunen Pigment umgeformt werden, das in allen wesentlichen morphologischen und cytochemischen Eigenschaften mit dem Hämo-fuscin und Ceroid übereinstimmt: Mit Sudanfarbstoffen wird es auch im Paraffinschnitt stark angefärbt, es ist säurefest und besitzt eine starke gelbe Autofluoreszenz.

*I. Welche Rückschlüsse ergeben sich aus unseren Beobachtungen auf die chemische Zusammensetzung der Pigmentkörnchen?* (Vgl. Tabelle 1.)

Wie seit langem bekannt, ist das typische Ceroidpigment (zwischen dem 35. und 160. Versuchstag) durch seinen Gehalt an *unlöslichen ungesättigten Lipiden* gekennzeichnet, deren Äthylengruppen mit der Perameisensäure-Schiff-Reaktion im histologischen Schnitt gut dargestellt werden<sup>3, 4, 5, 7, 8, 17, 18, 21, 22, 30, 35, 36</sup>. Diese ungesättigten Fettsäuren sind an ihren Doppelbindungen sehr reaktionsfähig und werden schon durch milde Oxydationsmittel an den die Äthylengruppe bildenden Kohlenstoffatomen angegriffen und oxydiert. Dabei entstehen Epoxyde, Peroxyde, benachbarte Hydroxylgruppen sowie Carbonyl- und schließlich Carboxylgruppen. Die im Ceroid histochemisch nachweisbaren Peroxyde (Methode von DAM und GRANADOS), die Carbonylreste (Schiffsche

Tabelle 1. Übersicht über die histochemischen Eigenschaften und das färberische Verhalten der Ceroidkörnchen

Eigenfarbe . . . . .	gelblich
Eigenfluoreszenz (Blaulicht) . . . . .	++ (hellgelb)
Färbung mit Sudan III/IV (am Paraffinschnitt) . . . . .	+++
Färbung mit Sudan III/IV nach Extraktion (24 Std) mit einer siedenden Chloroform-Methanolmischung . . . . .	+++ (unverändert)
Färbung mit Sudanschwarz (am Paraffinschnitt) . . . . .	+++
Perameisensäure-Schiffreaktion . . . . .	++
Perameisensäure-Schiffreaktion nach Bromierung . . . . .	0
Schiffreaktion . . . . .	(+)
Ameisensäure-Schiffreaktion . . . . .	(+)
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEESEN . . . . .	+++
Bakersche Reaktion für Phospholipide . . . . .	0
Färbung mit Luxol-Fast blue . . . . .	(+)
Nachweis von Cholesterin (ROMIEU) . . . . .	0
Peroxydnachweis (DAM und GRANADOS) . . . . .	0
PAS-Reaktion . . . . .	+++
PAS-Reaktion nach Acetylierung . . . . .	0
PAS-Reaktion nach Acetylierung und Verseifung . . . . .	+++
PAS-Reaktion nach Diastase . . . . .	+++
PAS-Reaktion nach Hyaluronidase . . . . .	+++
Färbung mit Toluidinblau . . . . .	++
Färbung mit Toluidinblau nach Methylierung . . . . .	0
Färbung mit Methylgrün . . . . .	++
Metachromasie (Toluidinblau) . . . . .	0
Färbung mit Astrablau . . . . .	0
Methylenblaubindung bis $pH$ . . . . .	3,5—3,9
Eisenbindung (HALE) . . . . .	(+)
Berliner Blau-Reaktion . . . . .	0
Reduktionstest (CHÈVREMENT-FRÉDÉRIC) . . . . .	+
Reduktionstest (CHÈVREMENT-FRÉDÉRIC) nach KCN . . . . .	++
Reduktionstest (CHÈVREMENT-FRÉDÉRIC) nach $HgCl_2$ . . . . .	(+)
Silberimprägnation nach MASSON . . . . .	0/(+)
Tetrazoniumreaktion . . . . .	++
Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung . . . . .	0
Millonsche Reaktion . . . . .	(+)*
Argininreaktion (SAKAGUCHI) . . . . .	(+)*
Ninhydrin-Schiffreaktion . . . . .	(+)*
Sulphydrylnachweis nach BARNETT und SELIGMAN . . . . .	(+)
Sulphydrylnachweis nach BARNETT und SELIGMAN nach KCN . . . . .	(+)
Färbung mit Fastgreen . . . . .	+
Hämatoxylin-Eosin . . . . .	gelbbraun bis braunrötlich
van Gieson . . . . .	gelbbraun
Bindegewebsfärbung nach MASSON . . . . .	dunkelviolet
<i>Fermentnachweise:</i>	
Saure Phosphatase . . . . .	+++
Phosphoamidase . . . . .	+++
Alkalische Phosphatase . . . . .	0
Unspezifische Esterase . . . . .	(+)
Lipase . . . . .	(+)?
Aminopeptidase . . . . .	++
Peroxydase . . . . .	0

Die Angaben beziehen sich auf ein Entwicklungsstadium des Ceroids, das etwa dem 46.—80. Versuchstag entspricht.

Reaktion: +++ sehr stark, ++ stark, + deutlich positiv, (+) inkonstant oder schwach, 0 negativ. \* gelegentlich eindeutig negativ, manchmal eindeutig positiv.

Reaktion) und  $\alpha$ -Glykolgruppen (PAS-Reaktion) dürften daher bei der vorsichtigen Oxydation dieser ungesättigten Verbindungen entstanden sein. Auch die Säurefestigkeit (Färbung nach ZIEHL-NEELEN), die Acidität (Basophilie) und das Reduktionsvermögen (Ferrichlorid-Ferricyanidmethode) müssen somit auf die Lipidkomponente des Pigmentes bezogen werden. Für das Vorkommen von Phospholipiden oder Cholesterin ergeben sich keine Anhaltspunkte.

Während heute allgemein anerkannt wird, daß ungesättigte Fettstoffe einen wesentlichen Baustein des Ceroids darstellen, gehen die Meinungen z. Z. auseinander, ob die Pigmentkörnchen noch andere Substanzen enthalten. So vermuten MOORE und WANG<sup>37</sup>, ENDICOTT und LILLIE<sup>9</sup>, sowie GYÖRGY und GOLDBLATT<sup>19</sup>, daß im Ceroid noch ein *Eiweißbaustein* enthalten ist. In der jüngsten Zeit weisen ZOLLINGER<sup>43</sup> sowie LEBLOND und Mitarbeiter<sup>27</sup> auf die Möglichkeit hin, daß auch *Glykoproteide* am Aufbau dieses Pigmentes beteiligt sind. Demgegenüber sieht CASSELMAN<sup>3</sup> in ungesättigten Fettsäuren und ihren Oxydations- und Polymerisationsprodukten den alleinigen Baustein des Ceroids. Für das Vorkommen von Proteinen oder Kohlenhydraten ergeben sich nach seiner Meinung keine zwingenden Anhaltspunkte.

Im Gegensatz zu älteren Beobachtungen konnten wir nunmehr mit modernen Methoden neben den Lipiden auch Eiweißstoffe in den Ceroidkörnchen nachweisen. Hierfür spricht hauptsächlich die stark positive Tetrazoniumreaktion, welche das Vorkommen von aromatischen Aminosäuren anzeigt. Der Gehalt des Pigmentes an hydrolytischen Enzymen, und zwar besonders an saurer Phosphatase, ist ebenfalls als Hinweis auf einen Proteinbaustein zu werten. Ein Teil dieser Eiweißstoffe dürfte daher Fermenteiweiß darstellen. Eine weitere Charakterisierung des Eiweißbausteines konnte mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht vorgenommen werden. Da quantitative Aussagen auf Grund histochemischer Untersuchungen nur in beschränktem Umfang möglich sind, können vorerst keine näheren Angaben über das Mengenverhältnis der Proteine und Lipide zueinander gemacht werden. Die bisherigen Befunde weisen jedoch darauf hin, daß der Lipidbaustein mengenmäßig den Eiweißanteil erheblich übertrifft. Für die quantitative Zusammensetzung der Ceroidkörnchen dürften die nachgewiesenen Proteine daher nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Auf den ersten Blick ist es nun merkwürdig, daß andere histochemische Eiweißreaktionen, wie der Ninhydrin-Schiff-Test, der Argininnachweis und die Millonsche Probe uneinheitlich ausfallen (vgl. Tabelle I). Hierfür lassen sich zwei Gründe auführen: Erstens entstehen bei den Nachweisreaktionen für Arginin und Tyrosin im histologischen Schnitt in der Regel nur schwache Färbungen, die sehr leicht von der Eigenfarbe der Gewebsstrukturen überdeckt werden. Bei den älteren Pigmentablagerungen ist es daher gar nicht zu erwarten, daß diese Eiweißreaktionen verwertbare Ergebnisse liefern. Zweitens wird die Reaktionsfähigkeit der Proteine

durch die Mischung mit oxydierten Fetten anscheinend verändert, so daß sie z. B. auch keine Biuret-Reaktion geben, wie HEIDENREICH und SIEBERT<sup>23</sup> am Lipofuscin gezeigt haben. Wir konnten diese Beobachtung bestätigen und fanden außerdem, daß sich die Lipofuscinpigmente auch bei dem Ninhydrin-Schiff-Test nicht anfärben, obwohl an ihrem Eiweißgehalt gar kein Zweifel bestehen kann.

Demgegenüber erzielt man bei der Tetrazoniumreaktion für aromatische Aminosäuren eine sehr kräftige rotbraune Farbe, die auch bei gefärbten Strukturen gut sichtbar ist. Vor allem aber wird die Kupplungsfähigkeit der aromatischen Aminosäuren durch die Mischung mit Fetten offenbar nicht so leicht beeinträchtigt, wie es bei den anderen histochemischen Reaktionen für Aminosäuren und Eiweißstoffe der Fall ist. Für die von BURSTONE<sup>2</sup> angegebene Möglichkeit, daß bei der Tetrazoniumreaktion auch unspezifische Adsorptionen erfolgen, haben wir bei unseren Untersuchungen keine Anhaltspunkte gewonnen.

Die positive PAS-Reaktion des Ceroids<sup>27, 43</sup> und die gelegentlich zu beobachtende Anfärbung mit Mucicarmin oder Bestschem Carmin<sup>6, 10</sup> haben bereits früher die Frage aufgeworfen, ob die Pigmentgranula nicht vielleicht auch einen Kohlenhydratbaustein enthalten, zumal das Ergebnis der reversiblen Acetylierung zeigt, daß der Perjodsäure-Schiff-Reaktion 1,2 Glykolgruppen zugrunde liegen. Es ist jedoch bekannt<sup>25</sup>, daß bei der vorsichtigen Oxydation ungesättigter Lipide an die Äthylengruppen zwei Hydroxylgruppen angelagert werden können. Es entstehen Dioxy-carbonsäuren, die genau wie Polysaccharide an den benachbarten Hydroxylgruppen angegriffen und unter Aldehydbildung oxydiert werden. Eine positive Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion kann daher nur dann als Zeichen für das Vorliegen eines Kohlenhydratbausteines gewertet werden, wenn in dem untersuchten Gewebelement keine Lipide vorkommen, oder wenn die vorhandenen Lipide vorher aus dem Schnitt entfernt werden<sup>12, 38, 42</sup>. Wie bereits betont, gelingt es jedoch nicht, den Fettbaustein des Ceroids aus dem Schnitt zu extrahieren. Die entscheidende Voraussetzung für die Bewertung der PAS-Reaktion als Kohlenhydrattest, nämlich die Abwesenheit von Fettstoffen, ist somit nicht gegeben.

Wenn man weiterhin in Rechnung stellt, daß der Fettkomponente des Ceroids zweifellos ungesättigte Lipide zugrunde liegen, und daß Oxydationsvorgänge bei der Entwicklung des Pigmentes eine Rolle spielen, so ist die Annahme naheliegend, daß die mit der PAS-Reaktion nachgewiesenen  $\alpha$ -Glykolgruppen bei der Oxydation dieser Fettstoffe entstanden sind.

Allerdings kann an Hand unserer Versuche vorerst nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, daß neben den ungesättigten oxydierten Lipiden auch noch ein eiweißgebundener Kohlenhydratbaustein vorhanden ist, wie es in jüngster Zeit erneut von LEBLOND und Mitarbeitern<sup>27</sup> vertreten wird.

Wir gelangen somit in Übereinstimmung mit CASSELMAN<sup>3</sup>, PEARSE<sup>38</sup> und GOMORI<sup>16</sup> zu der Ansicht, daß die im Ceroid nachweisbaren  $\alpha$ -Glykol-

Tabelle 2. *Änderung der histochemischen Eigenschaften des mesenterialen Fettes der Ratte bei der Phagocytose und Umformung zum Ceroidpigment*

Histologische Eigenschaften und histochemische Reaktionen	Fettgewebe	Zeit nach der Quetschung des Mesenteriums in Tagen													Ceroidkörnchen		
		4	7	10	13	35	46	60	80	100	160	190	230				
Eigenfarbe . . . . .	farblos	ungefärbt	ungefärbt	schwach hellgelb	schwach hellgelb	schwach hellgelb	hellgelb	hellgelb	gelb	gelb	gelb bis hellbraun	gelbbraun	gelbbraun				
Autofluoreszenz (Blaulicht) . . . . .		(+)	(+)	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++/+				
Färbung mit Sudan III/IV . . . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	(+)/0				
Perameisensäure-Schiffreaktion . . . . .	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++				
Perjodsäure-Schiffreaktion . . . . .	(+)	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++				
Peroxydnachweis . . . . .	(+)	++	++	++	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0				
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN . . . . .	0	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
Methylenblaubindung bis pH . . . . .	4,5	4,5	4,5	3,9	3,9	3,9	3,5	3,5	3,5	3,5	3,2	3,2	3,0				
Färbung mit Toluidinblau . . . . .	0	(+)	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++				
Reduktionstest (CHÉVREMENT-FRÉDÉRIC)	0	0	(+)	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++				
Silberimprägnation (MASSON-HAMPERL)	0	0	0	0	0	0	0	0/(+)	(+)	(+)	+	+	++				
Tetrazoniumreaktion . . . . .	0	0	(+)	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++				

Reaktion: +++ sehr stark, ++ stark, + deutlich positiv, (+) inkonstant oder schwach, 0 negativ.

gruppen an den Lipidbaustein des Pigmentes gebunden sind. Ein PAS-positives eiweißgebundenes Polysaccharid dürfte demgegenüber — falls es überhaupt vorhanden ist — nur eine untergeordnete Rolle spielen.

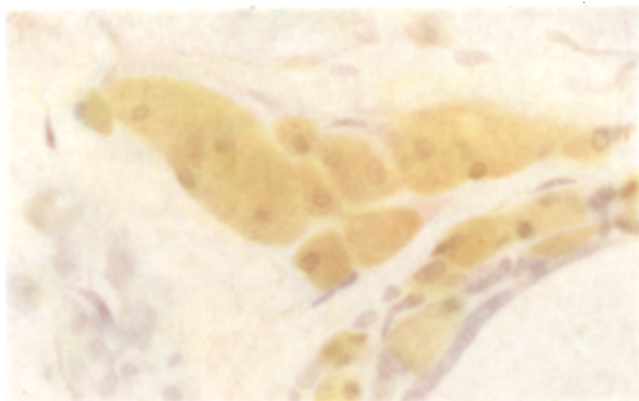


Abb. 10

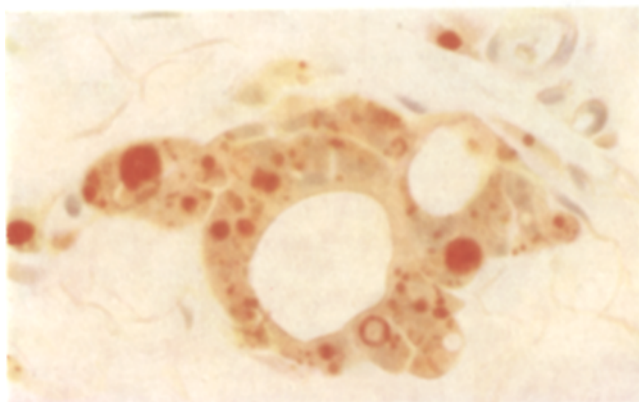


Abb. 11

Abb. 10. Ceroidhaltige Zellen 230 Tage nach Versuchsbeginn. Schwache Kernfärbung mit Coelestinblau-Hämalaun. Paraffinschnitt. Vergr. 640mal. Photomikroskop (Zeiss).  
Deutliche Gelbbraunfärbung der Pigmentkörnchen

Abb. 11. Phagocyten 230 Tage nach Versuchsbeginn. Färbung mit Sudan III/IV am Paraffinschnitt. Schwache Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergr. 400mal. Photomikroskop (Zeiss). Die Pigmentkörnchen sind nicht mehr sudanophil. Sie binden nur noch Spuren des Fettfarbstoffes und sind dank ihrer bräunlichen Eigenfarbe erkennbar.  
Nur die großen, unvollständig verarbeiteten Fetttropfen werden rot angefärbt

## *II. Wie ändern sich die histochemischen Eigenschaften des Ceroids im Laufe seiner Alterung? (Vgl. Tabelle 2.)*

Der Fettbaustein, der zunächst, genau wie die Neutralfetttropfen in den Fettzellen des Mesenteriums, leicht löslich ist, verliert allmählich seine *Löslichkeit*. Nach 4—7 Tagen bleiben bereits einige intracelluläre

Fetttröpfchen trotz der Paraffineinbettung im Schnitt erhalten (Abb. 1), und nach 4—6 Wochen können die Granula selbst mit siedenden organischen Lösungsmitteln nicht mehr aus dem Gewebe extrahiert werden (Abb. 2).

Die Fetttröpfchen sind in den ersten Wochen und Monaten sehr deutlich *sudanophil*. Mit allen typischen Fettfarbstoffen können sie im Gelatine- oder Paraffinschnitt gut dargestellt werden. Nach dem 160. Versuchstag nimmt ihre Affinität für Fettfarbstoffe jedoch allmählich ab, um schließlich (nach 230 Tagen) fast ganz zu verschwinden (Abb. 11).

Die anfangs ungefärbten Fetttröpfchen nehmen mit zunehmender Alterung eine *Eigenfarbe* an. Schon 10—14 Tage nach dem Versuchsbeginn zeigen sie einen ganz schwach hellgelblichen Farbton, der sich in der folgenden Zeit allmählich verstärkt. Nach 7—8 Monaten besitzen sie dann eine deutliche gelbe bis gelbbraune Farbe (Abb. 10 und 11). Etwa synchron mit der Eigenfarbe tritt die *Autofluoreszenz* des Pigmentes auf. Sie ist nach 10 Tagen sicher erkennbar und weist eine schwache gelblichweiße Farbe auf (Blaulicht). In den nächsten Monaten wird die Eigenfluoreszenz erheblich stärker und erreicht nach etwa 100—190 Versuchstagen ihr Intensitätsmaximum. Die Körnchen leuchten dann im Blaulicht hellgelb auf. Später nimmt die Autofluoreszenz der Pigmentgranula wieder ab und geht dabei in einen mehr braunen Farbton über.

Die *Perameisensäure-Leukofuchsin-Reaktion* für Äthylengruppen ist von Anfang an positiv und nimmt im Laufe der Alterung nur geringgradig zu. Dagegen können  $\alpha$ -Glykolgruppen mit der Perjodsäure-Leukofuchsin-Technik am 4. Versuchstag nur in geringem Umfang nachgewiesen werden. Die Reaktionsfähigkeit mit Perjodsäure nimmt bis zum 46. Tag erheblich zu und bleibt dann bis zum 230. Versuchstag unverändert stark bestehen. Bei der Prüfung der *Säurefestigkeit* (ZIEHL-NEELEN) werden die unlöslichen Fetttröpfchen schon nach 4 Tagen deutlich rot gefärbt. Im Laufe der nächsten 6 Wochen kommt es zu einer erheblichen Verstärkung dieser Farbreaktion, die sich dann vom 46. bis 230. Versuchstag nicht mehr ändert. *Peroxyde* können unmittelbar nach der Phagocytose der Fettstoffe nachgewiesen werden. Die Peroxydreaktion wird dann aber allmählich abgeschwächt und ist vom 46. Versuchstag an negativ. *Aromatische Aminosäuren* lassen sich mit der Tetrazoniumreaktion erst nach 13 Tagen nachweisen. Bis zum 80. Versuchstag nimmt die Intensität der Tetrazoniumreaktion zu und bleibt dann ohne erkennbare Veränderungen erhalten (Abb. 7).

Die Fetttröpfchen sind anfangs nicht *basophil* und vermögen in den ersten Versuchstagen selbst bei  $p_H$  4,5 kaum Methylenblau zu binden. Nach 7—8 Monaten läßt sich ihre *Methylenblaubindefähigkeit* dagegen

bis  $pH$  3,0 verfolgen (Abb. 3). In entsprechender Weise wird ihre Anfärbbarkeit mit *Toluidinblau* erheblich verstärkt (Abb. 4).

Das zunächst nur schwache *Reduktionsvermögen* bei der Ferrichlorid-Ferricyanid-Reaktion nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC nimmt gleichfalls allmählich zu und ist nach 7—8 Monaten sehr deutlich ausgeprägt (Abb. 6). Vom 190. Versuchstag an besitzen die Granula sogar die ausgeprägte Fähigkeit, Silbernitrat zu reduzieren, und die ältesten Pigmentkörnchen (230 Tage) werden bei der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL tief braunschwarz gefärbt (Abb. 5).

Im Gegensatz zu diesen Änderungen der färberischen und histochemischen Eigenschaften der Pigmentgranula bleibt die *Fermentaktivität* der phagocytierenden Zellen im Rahmen der Fehlerbreite unserer Nachweisverfahren konstant.

Die bei unseren Versuchen gewonnenen Daten über den Entwicklungsablauf des Ceroids dürften allerdings nur hinsichtlich der *Art seiner Alterung* Allgemeingültigkeit besitzen. Dagegen kann die *Geschwindigkeit*, mit der die Umwandlung des Pigmentes erfolgt, zunächst nur auf die von uns gewählten Versuchsbedingungen bezogen werden. Es ist durchaus denkbar, daß die Zeit, welche für den Umbau der Fettstoffe benötigt wird, von der Art des Organs abhängt, in dem die Speicherung erfolgt. Außerdem spielt sicher das Ausmaß der Gewebsschädigung und der Blutung eine Rolle, welche mit der Bildung der Pigmente einhergehen.

Die cytochemischen Veränderungen, die das Ceroidpigment im Laufe seiner Alterung erfährt, erklären zwanglos die Tatsache, daß nicht selten die im Gewebe dicht nebeneinanderliegenden und morphologisch weitgehend übereinstimmenden Lipopigmente verschiedene histochemische Eigenschaften besitzen. So findet man z.B. in Mesenchymzellen des Ovars gelegentlich eisenfreie, fetthaltige Pigmente, die sich durch die Intensität ihrer Eigenfarbe, ihre Sudanophilie, ihr Reduktionsvermögen, ihre Basophilie usw. deutlich voneinander unterscheiden. Die wechselnden Eigenschaften der Pigmentkörnchen lassen sich jedoch ohne weiteres in das hier wiedergegebene Entwicklungsschema einordnen. Es ist daher der Schluß gerechtfertigt, daß diese Unterschiede nicht der Ausdruck einer großen Variationsbreite in der chemischen Zusammensetzung dieser Pigmente oder gar Hinweise auf das Vorliegen grundsätzlich verschiedenartiger Pigmenttypen sind, sondern nur verschiedene Entwicklungsstadien ein und desselben Lipopigmentes darstellen.

Wenn man z.B. zwei Wochen und acht Monate alte Ceroidgranula nebeneinanderstellt (s. Tabelle 2), so findet man grundverschiedene Cytoplasmaeinschlüsse, die scheinbar nichts miteinander zu tun haben, bei denen es sich jedoch in Wirklichkeit nur um weit auseinanderliegende Altersstufen des gleichen lipogenen Pigmentes handelt.

Auch die recht divergierenden Angaben früherer Untersucher werden in Anbetracht dieser Beobachtungen ohne weiteres verständlich. Denn es liegt auf der Hand, daß die am Sektionsmaterial oder im Tierexperiment gewonnenen Befunde verschieden ausfallen müssen, je nachdem welches Entwicklungsstadium des Ceroidpigmentes jeweils untersucht worden ist.

Diese sozusagen „physiologischen“ Änderungen der chemischen Eigenschaften des Ceroidpigmentes, wie die zunehmende Umwandlung des Fettbausteines und der steigende Gehalt an Eiweißstoffen, erschweren natürlich die chemisch-analytische Untersuchung dieses Pigmentes. Auch bei der Isolierung dieser gefärbten Strukturen dürfte es kaum möglich sein, ein einheitliches Produkt zu gewinnen, da im Gewebe fast immer Pigmentgranula verschiedener Altersstufen dicht beieinander liegen.

*III. In welcher Weise lassen sich diese Änderungen der histochemischen Eigenschaften des Ceroidpigmentes erklären?*

Die bei der Resorption des nekrotischen Fettgewebes und der Blutungsreste in den phagocytierenden Bindegewebszellen auftretenden Fetttropfen stimmen zunächst in ihren cytochemischen Eigenschaften völlig mit den Fetteinschlüssen der lebenden Zellen des Mesenteriums überein. *Die weitere Umwandlung dieser intracellulären Lipidkugeln läßt sich zum großen Teil erklären, wenn man von der Annahme ausgeht, daß diese ungesättigten, an ihren Äthylengruppen leicht angreifbaren Lipide bei ihrer Speicherung im Cytoplasma allmählich oxydiert werden* <sup>3, 4, 5, 7, 17, 18, 22, 35, 36</sup>. Die hierbei entstehenden verschiedenen Oxydationsstufen, wie Peroxyde,  $\alpha$ -Glykolgruppen, Carbonyl- und Carboxylgruppen sind histochemisch in den lipidhaltigen Granula nachweisbar. Während nun die instabilen Zwischenprodukte dieser Oxydationsvorgänge im Laufe der Alterung des Pigmentes mehr oder weniger schnell verschwinden, kommt es allmählich zu einer Anreicherung der weniger gut angreifbaren Gruppen und zwar besonders der Carboxylgruppen, welche so die zunehmende Basophilie der Ceroidgranula verursachen. Auch die Reduktionsfähigkeit des Ceroids dürfte an die Äthylengruppen der Lipide bzw. ihre Oxydationsprodukte gebunden sein.

Ob den Veränderungen der Ceroidkörnchen allein ein oxydativer Umbau der ungesättigten Fettstoffe zugrunde liegt, läßt sich allerdings noch nicht sicher entscheiden. Es wäre denkbar, daß außerdem Wechselwirkungen zwischen dem Fettbaustein bzw. seinen Oxydationsprodukten und der Eiweißkomponente eine Rolle spielen. Und schließlich muß auch die Möglichkeit einer Umwandlung der Proteine in Betracht gezogen werden.

So läßt sich heute die Frage noch nicht eindeutig beantworten, worauf die *zunehmende Unlöslichkeit des Fettbausteines* beruht. Besonders

naheliegend ist die Vermutung, daß die ungesättigten Fettsäuren nicht nur oxydiert, sondern auch polymerisiert werden und dabei ihre Löslichkeit verlieren<sup>3, 4, 22</sup>. Andererseits könnte auch eine Bindung der Lipide an Eiweißstoffe ihre Löslichkeit in Fettlösungsmitteln beeinträchtigen<sup>9, 19, 37</sup>.

Von besonderem Interesse ist die allmählich auftretende *Gelbbraunfärbung der Ceroidgranula*. Da die Eigenfarbe des Pigmentes weder durch organische Lösungsmittel, noch durch Säuren, Alkali oder Oxydationsmittel aus dem Schnitt entfernt werden kann, besteht die Möglichkeit, daß dieser Färbung Oxydationsprodukte der Fettsäuren zugrunde liegen<sup>4</sup>. Dieser Auffassung steht die Ansicht einiger Autoren entgegen, welche die Eigenfarbe der Lipopigmente auf einen besonderen, an Eiweißstoffe gebundenen Farbstoff zurückführen<sup>1, 37</sup>. An Hand der bisherigen Experimente kann diese Frage noch nicht geklärt werden.

Und schließlich muß es vorerst offenbleiben, ob die gelbliche *Eigenfluoreszenz* an den Eiweißbaustein des Ceroids gebunden ist und nur infolge der Eigenfarbe des Pigmentes den kennzeichnenden gelblichen bis gelbbraunen Farbton erhält, oder ob es sich um eine Autofluoreszenz der oxydierten Fette handelt.

#### IV. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Ceroidpigment und anderen Lipopigmenten?

Überblickt man die histochemischen und morphologischen Eigenschaften des *Hämofuscins* und des *Ceroids*, so fällt die weitgehende Übereinstimmung zwischen diesen Pigmenten ins Auge. Auch hinsichtlich ihrer Pathogenese stimmen sie insofern überein, als bei ihnen Blutungen, bzw. ein Hämoglobinzerfall, häufig (jedoch nicht immer) eine wesentliche Rolle spielen. Wir möchten daher in Anlehnung an PEARSE<sup>38</sup> und ZOLLINGER<sup>43</sup> die alte Bezeichnung „Hämofuscin“ mit dem neuen Begriff „Ceroid“ identifizieren. Da es bekannt ist, daß diese Pigmente manchmal auch unabhängig von Blutungen auftreten, scheint es allerdings zweckmäßig zu sein, den präjudizierenden Namen „Hämofuscin“ zu verlassen und an seiner Stelle den die färberischen und chemischen Eigenschaften besser kennzeichnenden Namen „Ceroid“ zu wählen.

Auf die enge Verwandtschaft zwischen dem *Lipofuscin* und dem *Ceroidpigment* (einschließlich *Hämofuscin*) ist in den vergangenen Jahren wiederholt hingewiesen worden. So vermutet PEARSE<sup>38</sup>, daß es sich bei dem Ceroid und Lipofuscin nur um verschiedene Entwicklungsstufen ein und desselben Pigmentes handeln würde. Das Ceroid soll nach der Ansicht dieses Autors ein junges Lipopigment, das Lipofuscin eine spätere Entwicklungsstufe darstellen. Von anderen Untersuchern wird dagegen die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß sich das Lipofuscin in ein ceroidartiges Pigment umwandeln könnte<sup>16, 43</sup>.

Unsere Befunde zeigen gleichfalls die engen histochemischen Beziehungen zwischen diesen beiden Pigmenttypen. Beide Pigmente sind

durch ihren Gehalt an Proteinen und schwer löslichen oxydierten Fettstoffen gekennzeichnet. Darüber hinaus zeigen die älteren Ceroidpigmente Eigenschaften, die wir von dem alten Lipofuscin menschlicher Organe kennen: Sie besitzen eine gelbbraune Eigenfarbe, ein deutliches Reduktionsvermögen und eine ausgeprägte Basophilie. *Das Ceroid gewinnt bei der Alterung also eine Reihe von Eigenschaften, die für das typische Lipofuscin kennzeichnend sind.*

Gegen die Einheitlichkeit dieser Pigmente spricht jedoch, daß der Eiweißbaustein des Ceroids mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle spielt, während Proteine bei der Genese des Lipofuscins von Anfang an im Vordergrund stehen<sup>1, 23</sup>. Wenn man weiterhin berücksichtigt, daß diese beiden Pigmenttypen in morphologisch sehr verschiedenartigen Zellen abgelagert werden, nämlich das Lipofuscin in Parenchymzellen, das Ceroid (und Hämofuscin) in Phagocyten, *so scheint es zweckmäßig zu sein, vorerst nur von einer Verwandtschaft, nicht aber von einer Identität dieser Pigmente zu sprechen.*

V. Welche Hinweise ergeben sich auf die kausale Genese des Ceroidpigmentes?

Unsere Versuche bestätigen die von DYX (FEYRTER)<sup>6</sup>, HARTROFT<sup>21</sup>, HAMPERL<sup>20</sup>, LEE<sup>28</sup>, sowie ZOLLINGER<sup>43</sup> vertretene Auffassung, daß das Zusammentreffen von Fettgewebsnekrosen und Blutungen besonders günstige Voraussetzungen für die Entstehung dieses Pigmentes schafft. Auch bei den vorliegenden Experimenten führen der Abbau großer Fettmengen und die gleichzeitige Durchsetzung dieser Gewebsbezirke mit Blutungen zu umfangreichen Ceroidablagerungen. *Offenbar begünstigt das frei werdende Hämoglobin die Oxydation der im Fettgewebe vorhandenen ungesättigten Fettsäuren, die dabei zu einem Pigment umgewandelt werden.*

Allerdings dürfen wir daneben nicht die *aktive Leistung der phagocytierenden Zellen* vergessen. Hierfür spricht zunächst die Beobachtung, daß die intracellulären, feingranulären Fetttropfen, welche naturgemäß für die Zellen am leichtesten angreifbar sind, am schnellsten zum Pigment umgewandelt werden. Dagegen werden die großen intracellulären Fettkugeln, welche mit der zunehmenden Alterung der Granulome immer seltener zu finden sind, von den Phagocyten wegen ihrer Größe langsamer verarbeitet als die feinen Tröpfchen. Sie werden daher sehr viel später unlöslich und pigmentiert. Nach 230 Versuchstagen zeigen diese großen Fetttropfen Eigenschaften, wie man sie bei den kleinen Tröpfchen bereits nach 2—3 Wochen findet.

Noch langsamer erfolgt die Oxydation der extracellulären Fettmassen, die erst nach einer sehr langen Versuchsdauer höchstens eine ganz schwache gelbliche Farbe annehmen. Auch die anderen kennzeich-

nenden Eigenschaften des Ceroidpigmentes, wie die Basophilie und das Reduktionsvermögen, sind hier nur andeutungsweise vorhanden.

Für eine aktive Beteiligung der Zellen an der Bildung des Pigmentes läßt sich ferner ihre starke *Enzymaktivität* ins Feld führen, die kurze Zeit nach der Phagocytose auftritt. Die fettspeichernden Mesenchymzellen besitzen dann eine ausgeprägte Aktivität hydrolytischer Fermente, und zwar von saurer Phosphatase, Phosphoamidase und Aminopeptidase, die während der Verarbeitung der Lipide unverändert bestehen bleibt.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Befunden, die wir bei der Untersuchung verschiedener experimentell erzeugter Fremdkörpergranulome erhoben haben. Die mononucleären Phagocyten und Riesenzellen besaßen bei diesen Versuchen ebenfalls eine ausgesprochene Aktivität von saurer Phosphatase, Phosphoamidase, Aminopeptidase und  $\beta$ -Glucuronidase, also sozusagen die enzymatische Standardausrüstung des Makrophagen<sup>13</sup>. Auch im Ceroidpigment menschlicher Organe fanden wir unlängst saure Phosphatase und gelegentlich auch unspezifische Esterase<sup>13</sup>.

Da in den vorliegenden Untersuchungen das nekrotische Fettgewebe und die Blutungsreste von einem resorbierenden Fremdkörpergranulationsgewebe abgebaut werden und die Umwandlung der Fettstoffe in typischen Phagocyten und Fremdkörperriesenzellen erfolgt, dürfte die histochemisch nachweisbare Fermentaktivität in den fettverarbeitenden Zellen die gleiche Ursache haben wie in den Phagocyten der anderen experimentell erzeugten Fremdkörpergranulome. Wir möchten daher die Enzymausstattung dieser Zellen ebenfalls als Zeichen ihrer gesteigerten Stoffwechselleistungen und ihrer erhöhten funktionellen Beanspruchung ansehen. Auch ihre Fermentaktivität spricht somit dafür, daß sie eine Aufgabe bei der Verarbeitung des gespeicherten Fettes zu erfüllen haben. Genau wie bei den Gewebsreaktionen auf andere Fremdkörper ergeben sich histochemisch jedoch keine Anhaltspunkte für eine adaptive Enzymbildung in den phagocytierenden Zellen<sup>13</sup>.

#### *VI. Wie verhalten sich die bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose auftretende Eisenpigmente?*

Neben dem Ceroidpigment fanden sich im Bereich der hämorrhagischen Fettnekrosen im wechselnden Umfang auch Ablagerungen von *Eisenpigmenten*. So war die Berliner Blau-Reaktion im Cytoplasma einiger Phagocyten schon nach 4 Tagen positiv, und nach 8—10 Tagen waren bereits die ersten typischen Eisenpigmentkörnchen zu sehen. Während sich die fettverarbeitenden und eisenspeichernden Zellen in der Regel gut voneinander abgrenzen ließen und häufig sogar in ganz verschiedenen Gewebsbezirken lagen, beobachteten wir gelegentlich auch

Phagocyten, die Fettstoffe und Eisen dicht nebeneinander in ihrem Cytoplasma abgelagert hatten.

Von besonderem Interesse war der Vergleich des Ceroidkörnchens mit der organischen Trägersubstanz des Eisenpigmentes. In früheren Untersuchungen hatten wir gefunden, daß die Trägersubstanz der Siderinpigmente — ebenso wie die anderen Schwermetallverbindungen — neben Proteinen und Polysacchariden auch dem Ceroid nahestehende Lipide enthält. Der Fettbaustein wird bei der Entstehung dieser Pigmente jedoch später gebildet als die Eiweiß- und Kohlenhydratkomponente und tritt auch quantitativ hinter diesen beiden anderen organischen Substanzen zurück<sup>15</sup>.

Die chemische Zusammensetzung der Trägersubstanz war — soweit sie mit histochemischen Methoden erfaßt werden konnte — weitgehend unabhängig von der Art des gespeicherten Schwermetalles und von den Organen und Geweben, in denen die Schwermetallablagerungen erfolgten<sup>14</sup>. Diese Befunde sprachen (neben anderen Beobachtungen) für die Annahme, daß der organische Anteil der Schwermetallpigmente von den speichernden Zellen aktiv gebildet wird und nicht einen Schlackenstoff darstellt, der bei dem Abbau des Blutes oder des Gewebes anfällt und nur zusammen mit dem jeweiligen Metallkation gespeichert wird. — Demgegenüber vertrat WEBER<sup>41</sup> die Auffassung, daß dem organischen Restkörper des Hämosiderins Ceroid bzw. Hämo-fuscin zugrunde liegt, das ohnehin stets bei Blutungen entstehen würde. Nach der Entfernung des Eisenhydroxydes aus dem histologischen Schnitt soll nach der Meinung dieses Autors in den eisenspeichernden Zellen nur eine Art von Ceroidpigment zurückbleiben.

Für die Untersuchung dieser Fragen ist die hämorrhagische Fettgewebsnekrose besonders gut geeignet, weil bei der Resorption des nekrotischen Fettgewebes sehr reichlich Fettstoffe abgebaut und zum großen Teil als Ceroidpigment gespeichert werden. Wäre die Annahme von WEBER<sup>41</sup> richtig und würde der organische Restkörper einen phagocytierten Schlackenstoff darstellen, so müßte er unter diesen Versuchsbedingungen mit dem Ceroid übereinstimmen. Nach der Extraktion des Eisens aus dem histologischen Schnitt dürfte man dann die eisenfreie Trägersubstanz des Hämosiderins nicht von dem Ceroidpigment unterscheiden können.

Das ist jedoch nicht der Fall. In Übereinstimmung mit unseren älteren Befunden tritt auch bei diesen Experimenten der Lipidbaustein des Eisenpigmentes später in Erscheinung als die Eiweiß- und Polysaccharidkomponente und ist auch bei älteren Eisenablagerungen nicht stark ausgeprägt. Demgegenüber steht der Fettbaustein bei dem Ceroid von Anfang an völlig im Vordergrund. In jüngeren Granulomen findet man daher neben dem stark sudanophilen Ceroid die völlig fettfreie,

PAS-positive, organische Trägersubstanz des Hämosiderins. Erst ganz allmählich lassen sich in den Eisenpigmenten in geringerem Umfang auch Lipide nachweisen, und selbst nach einer längeren Versuchsdauer erreicht die Sudanophilie der Trägersubstanz bei weitem nicht die des Ceroidpigmentes. Die charakteristische Entstehungsweise der Eisenpigmente, bei der zunächst der Eiweiß- und Kohlenhydratbaustein und erst später ein geringfügiger Lipidanteil gebildet werden, bleibt also auch dann erhalten, wenn synchron mit der Eisenspeicherung reichlich Fettgewebe abgebaut wird und somit besonders günstige Voraussetzungen für die Ceroidbildung gegeben sind.

Es zeigt sich somit auch unter diesen Versuchsbedingungen, daß die organische Trägersubstanz des Eisenpigmentes nicht mit dem Ceroid identisch ist. Nur ihr Fettbaustein, der erst allmählich in Erscheinung tritt und mengenmäßig gegenüber den Proteinen und Polysacchariden eine untergeordnete Rolle spielt, dürfte vielleicht dem Ceroid nahestehen.

### Zusammenfassung

Bei experimentell erzeugten hämorrhagischen Fettgewebsnekrosen am Mesenterium der Ratte treten in den phagocytierenden Zellen neben Eisenpigmenten reichlich *gelbbraune fluoreszierende Lipopigmente* auf, die in ihren morphologischen und histochemischen Eigenschaften mit dem *Ceroid (bzw. Hämo-fuscin) pigment* übereinstimmen. Sie enthalten ungesättigte Fette und deren Oxydationsprodukte sowie in kleinen Mengen auch Eiweißstoffe. Außerdem lassen sich in den ceroidhaltigen Zellen saure Phosphatase, Phosphoamidase, Amino-peptidase und gelegentlich unspezifische Esterase nachweisen.

Im Laufe der *Alterung* werden die färberischen und histochemischen Eigenschaften der Pigmentkörnchen in charakteristischer Weise verändert: Sie verlieren allmählich ihre Sudanophilie und lassen sich nach sieben bis acht Monaten mit Sudan III/IV nicht mehr anfärben. Die zunächst farblosen Fetttröpfchen nehmen eine gelbe und schließlich eine gelbbraune Farbe an. Ferner werden die gespeicherten Fettstoffe säurefest und PAS-positiv. Sie bekommen ein deutliches Reduktionsvermögen und eine starke Basophilie, so daß die ältesten Körnchen auch Silbernitrat zu reduzieren vermögen und noch bei  $pH\ 3,0$  Methylenblau binden. Die zunächst deutliche Peroxydreaktion ist dagegen schon nach kurzer Zeit negativ. Die ältesten Ceroidkörnchen stimmen somit in ihren Eigenschaften weitgehend mit dem Lipofuscin überein.

*Dieser Umwandlung des Ceroidpigmentes liegt offenbar eine allmähliche Oxydation des Fettbausteines zugrunde.*

Die im histologischen Schnittpräparat oft zu beobachtenden wechselnden Eigenschaften des Ceroids lassen sich in dieses Entwicklungsschema einordnen. Sie sind nicht als Hinweis auf das Vorliegen

verschiedener Pigmenttypen zu werten, sondern stellen offenbar nur verschiedene Entwicklungsstufen ein und desselben Pigmentes dar.

In den hämorrhagischen Fettnekroseherden treten außerdem in wechselnder Menge *Eisenpigmente* auf, deren organische Trägersubstanz sich vom Ceroid unterscheidet.

### Summary

Hemorrhagic necrosis of fat-tissue was experimentally produced in mesentery of the rat. Besides iron pigments there appear in phagocytes considerable amounts of *yellowish brown fluorescent lipopigments*, which in their morphological and histochemical qualities are identical with *ceroid (or hemofuscin)* pigment. They arise mainly by oxidation of unsaturated fats and contain also small amounts of proteins. Furthermore in ceroid-containing cells, acid phosphatase, phosphoamidase, aminopeptidase, and at times unspecific esterase can be found.

In the course of *aging* the staining and histochemical qualities of the pigment granules are characteristically altered: They gradually lose their sudanophily and cannot be stained after 7—8 months with Sudan III/IV. The originally colorless fat droplets become yellow and finally yellowish brown. Concurrently the stored fats become acid-fast and PAS-positive. They acquire a definite reduction capacity and a strong basophilia, so that the oldest granules are capable of reducing silver nitrate and binding methylenblue still at  $p_H$  3,0. However, the originally clear peroxide reaction is negative after a short time. Thus the oldest ceroid granules resemble to some degree lipofuscin.

*This change of the ceroid pigment is apparently based on a gradual oxidation of the lipid components.*

The variable qualities of ceroid as observed in histological preparations can be fitted into this developmental scheme. They are not to be evaluated as sign of the presence of various pigment types but demonstrate merely various developmental stages of the same pigment.

There also appear in hemorrhagic fat necrosis varying amounts of iron pigments, whose organic „Trägersubstanz“ (carrier substance) differs clearly from ceroid.

### Literatur

- <sup>1</sup> BRAHN, B., u. M. SCHMIDTMANN: Pigmentstudien. Zur Kenntnis des Melanins und des braunen Abnutzungspigmentes. Virchows Arch. path. Anat. **227**, 137—145 (1920). — Zur Pigmentfrage. Virchows Arch. path. Anat. **239**, 488—490 (1922). — <sup>2</sup> BURSTONE, M. S.: An evaluation of histochemical methods for protein groups. J. Histochem. Cytochem. **3**, 32—49 (1955). — <sup>3</sup> CASSELMAN, W. G. B.: The in vitro preparation and histochemical properties of substances resembling ceroid. J. exp. Med. **94**, 549—562 (1951). — <sup>4</sup> DAM, H., and H. GRANADOS: Peroxidation of body fat in Vitamin E-deficiency. Acta physiol. scand. **10**, 162—171 (1945). — <sup>5</sup> DAM, H. and H. GRANADOS: Role of unsaturated fatty acids in changes

of adipose and dental tissues in vitamin E deficiency. *Science* **102**, 327—328 (1945). — <sup>6</sup> DYX, W. (F. FEYRTER): Über argentaffine makrophage Körnchenzellen. Inaug.-Diss. Danzig 1940. — <sup>7</sup> ELFTMAN, H., H. KAUNITZ and C. A. SLANETZ: Histochemistry of uterin-pigment in Vitamin E-deficient rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **52**, 72—79 (1949). — <sup>8</sup> ENDICOTT, K. M.: Similarity of the acid-fast pigment ceroid and oxidized unsaturated fat. *Arch. Path. (Chicago)* **37**, 49—53 (1944). — <sup>9</sup> ENDICOTT, K. M., and R. D. LILLIE: Ceroid, the pigment of dietary cirrhosis of rats, its characteristics and its differentiation from hemofuscin. *Amer. J. Path.* **20**, 149—153 (1944). — <sup>10</sup> FEYRTER, F.: Über örtliche Ansammlung eigenartiger Speicherzellen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **1936**, 277—288. — <sup>11</sup> GEDIGK, P.: Histochemische Methoden. In *Biochemisches Taschenbuch*, S. 855—891. Berlin: Springer 1956. — <sup>12</sup> GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* **1952**, 1057—1065. — <sup>13</sup> GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten. *Z. Zellforsch.* **44**, 495—518 (1956). — Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538—568 (1957). — <sup>14</sup> GEDIGK, P., u. W. PROCH: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. *Beitr. path. Anat.* **116**, 124—148 (1956). — <sup>15</sup> GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur Histochemie des Hämosiderins. *Virchows Arch. path. Anat.* **324**, 373—390 (1953). — Zur formalen Genese der Eisenpigmente. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 172—190 (1954). — <sup>16</sup> GOMORI, G.: *Microscopical histochemistry*. Chicago: University of Chicago Press 1953. — <sup>17</sup> GRANADOS, H., and H. DAM: On the histochemical relation between peroxidation and the yellow-brown pigment in the adipose tissue of vitamin E-deficient rats. *Acta path. microbiol. scand.* **27**, 591—596 (1950). — <sup>18</sup> GRANADOS, H., K. E. MASON and H. DAM: Histological changes in adipose tissue of rats receiving a vitamin E-deficient diet containing highly unsaturated fatty acids. *Acta path. microbiol. scand.* **24**, 86—95 (1947). — <sup>19</sup> GYÖRGY, P., and H. GOLDBLATT: Observations on the conditions of dietary hepatic injury (necrosis, cirrhosis) in rats. *J. exp. Med.* **75**, 355—368 (1942). — <sup>20</sup> HAMPERL, H.: Über fluoreszierende Körnchenzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 32—47 (1950). — Über das Verhalten der Leberpigmente (Lipofuscin und Ceroid) besonders bei Hepatitis. *Schweiz. Z. allg. Path.* **16**, 399—403 (1953). — <sup>21</sup> HARTROFT, W. S.: In vitro and in vivo production of ceroid like substances from erythrocytes and certain lipids. *Science* **113**, 673—674 (1951). — Pathogenesis and significance of hemoceroid and hyaloceroid. Two types of ceroid like pigments found in human atheromatous lesions. *J. Geront.* **8**, 158—166 (1953). — <sup>22</sup> HASS, G. M.: Tissue reactions to natural oils and fractions thereof. *Arch. Path. (Chicago)* **26**, 955—965 (1938). — Intercellular transformation of unsaturated fatty acids and esters. *Arch. Path. (Chicago)* **26**, 955—965 (1938). — Membrane formation at lipid-aqueous infacts in tissues. *Arch. Path. (Chicago)* **27**, 177—198 (1939). — <sup>23</sup> HEIDENREICH, O., u. G. SIEBERT: Untersuchungen am isolierten, unveränderten Lipofuscin der Herzmuskulatur. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 112—126 (1955). — <sup>24</sup> HUECK, W.: Pigmentstudien. *Beitr. path. Anat.* **54**, 68—232 (1912). — Die pathologische Pigmentierung. Das Lipofuscin. In *KREHL-MARCHAND, Allgemeine Pathologie*, Bd. III/2, S. 433—472. Leipzig: Hirzel 1921. — <sup>25</sup> KARRER, P.: *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. 220. Leipzig: Georg Thieme 1943. — <sup>26</sup> KUTSCHERA-ARCHBERGEN, H.: Über Melanin und über das braune Abnützungspigment. *Frankfurt. Z. Path.* **27**, 21—55 (1922). — <sup>27</sup> LEBLOND, C. P., R. E. GLEGG and D. EIDINGER: Presence of carbohydrates with free 1,2 glycolgroups in sites stained by the periodic acid Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 445—458 (1957). — <sup>28</sup> LEE, C. S.: Histochemical studies of the ceroid-pigments of rats and mice and its relation to necrosis. *J. nat. Cancer Inst.* **11**, 339—349 (1950). — <sup>29</sup> LILLIE, R. D.: *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: Blakiston

Comp. 1947. — <sup>30</sup> LILLIE, R. D.: Ethylenic reactions of ceroid with performic acid and Schiff-reagent. *Stain Technol.* **27**, 37—45 (1952). — <sup>31</sup> LILLIE, R. D., L. L. ASHBURN, W. H. SEBRELL jr., F. S. DAFT and J. V. LOWRY: Histogenesis and repair of the hepatic cirrhosis in rats produced on low protein diets and preventable with choline. *U.S. Publ. Health Rep.* **57**, 502—508 (1942). — <sup>32</sup> LILLIE, R. D., F. S. DAFT and W. H. SEBRELL jr.: Cirrhosis of the liver in rats on a deficient diet and the effect of alcohol. *U.S. Publ. Health Rep.* **56**, 1255—1258 (1941). — <sup>33</sup> LINDNER, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchung von braunen fluoreszierenden Pigmenten bei Vitamin E-Mangel. *Ärztl. Forsch.* **8**, 501—513 (1954). — <sup>34</sup> LUBARSCHE, O.: Über fetthaltige Pigmente. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **13**, 881—883 (1902). — Über das sogenannte Lipofuscin. *Virchows Arch. path. Anat.* **239**, 491 (1922). — <sup>35</sup> MASON, K. E., H. DAM and H. GRANADOS: *Anat. Rec.* **94**, 265 (1946), *Zit. nach ZOLLINGER*<sup>43</sup>. — <sup>36</sup> MASON, K. E., and A. F. EMMEL: Vitamin E and muscle pigment in the rat. *Anat. Rec.* **92**, 33—60 (1945). — <sup>37</sup> MOORE, T., and Y. L. WANG: *Brit. J. Nutr.* **1**, 53 (1947). *Zit. nach LINDNER*<sup>33</sup>. — <sup>38</sup> PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London 1953. — <sup>39</sup> RECKLINGHAUSEN, F. v.: *Tagebl.* **62**. *Verslg Dtsch. Naturforsch. u. Ärzte 1889*, S. 324. — <sup>40</sup> RÖSSLE, R.: In HENKE-LUBARSCHS *Handbuch der speziellen Pathologie*, Bd. V/1, S. 415. Berlin: Springer 1930. — <sup>41</sup> WEBER, G.: *Contatti e divergenze di anatomia pathologica e di patogenesi tra emocromatosi idiopatica ed emosiderosi trasfusionale*. *Arch. „De Vecchi“ (Firenze)* **20**, 403—495 (1954). — *La questione della sostanza ceroidale e dell'aposiderina epatiche in corso di emocromatosi e di emosiderosi trasfusionale*. *Arch. „De Vecchi“ (Firenze)* **20**, 913—933 (1954). — <sup>42</sup> WOLMAN, M.: Staining of lipids by the periodic-acid-Schiff reaction. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **75**, 583—585 (1950). — The lipids stained by the periodic acid-Schiff technic. *Stain Technol.* **31**, 241—245 (1956). — <sup>43</sup> ZOLLINGER, H. U.: *Lokalisation und Bedeutung des Ceroidpigmentes*. *Schweiz. Z. allg. Path.* **16**, 1026—1040 (1953).

Priv.-Doz. Dr. PETER GEDIGK, Pathologisches Institut der Universität,  
Bonn-Venusberg