

Aus der Universitäts-Nervenklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. W. SCHEID)

Histochemische Untersuchungen des „lipoiden Pigmentes“ in den Ganglienzellen des Gehirns*

Von

ALBRECHT STAMMLER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 4. Mai 1959)

Über die Entstehung und biologische Bedeutung des lipoiden Pigmentes (Lipofuscin) im Zentralnervensystem ist kaum etwas bekannt. Darüber hinaus ist aber auch die chemische Zusammensetzung dieser Substanzen noch nicht befriedigend aufgeschlüsselt, wenn auch unser Wissen in dieser Hinsicht durch eine Reihe vorzüglicher Arbeiten bereichert wurde. Im folgenden wird versucht, durch die Anwendung neuerer histochemischer Methoden unsere Kenntnisse zu erweitern.

Die Untersuchungen wurden an menschlichem Sektionsgut durchgeführt. Zur histochemischen Bearbeitung wurde Material aus verschiedenen Regionen der Großhirnrinde, der Stammganglien, des Kleinhirns und der unteren Olive von Gehirnen aus den verschiedenen Lebensaltern entnommen. Färbemethode, Fixierungen und Färbeergebnisse sind aus der Tabelle 1 ersichtlich. Bei mehreren Färbungen wurden Leerschnitte zum Ausschluß von Fehlfärbungen mitgegeben. Die Extraktionsversuche nahmen wir an fixierten und unfixierten Schnitten vor.

Untersuchungsergebnisse

Das Vorkommen von Glykogen konnte vermittels der Bestschen Karminfärbung ausgeschlossen werden. Da das Lipofuscin keine Metachromasie, Basophilie und keine Eisenbindung (nach HALE) zeigt und sich auch mittels der Alcianblaumethode nicht darstellen läßt, wird man schließen dürfen, daß saure Mucopolysaccharide in den Ablagerungen ebenfalls nicht vorliegen.

Das lipide Pigment der Ganglienzellen ist stark PAS-positiv, reversibel acetylierbar und durch Bromierung für die Oxydation nicht zu blockieren. Mit der Perameisensäurereaktion auf Äthylengruppen wird lediglich eine schwache Anfärbung erzielt.

Die Acetylierung wurde sowohl nach der von McMANUS und CASON (1950) als auch nach deren Modifikation nach DIEZEL (1955) vorgenommen. Da bei der letztgenannten Methode die Schnitte fast regelmäßig vom Objektträger abschwammen, legten wir sie für 24 Std in ein Gemisch von absolutem Alkohol, 30%igem Ammoniak und Aqua dest. im Verhältnis von 7:2:1. Die beiden Abwandlungen ergaben gleiche Befunde, nämlich eine schwach positive Reaktion der CHOH-CHOH -Gruppen (1,2-Glykolgruppen), im Gegensatz zum negativen Ausfall bei der ursprünglichen Methode, bei der die reaktionsfähige Substanz in der Essigsäureanhydrid-Pyridin-Lösung schnell entfernt wird.

Aus diesem histochemischen Verhalten des Lipofuscin können wir ablesen, daß reaktionsfähige Glykol-Gruppen vorliegen, die auf kohlenhydrathaltige Verbindungen schließen lassen. — Nach dem negativen Reaktionsausfall bei der Neuraminsäurebestimmung (Methode an histologischen Schnittpräparaten nach

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Tabelle 1

| Histochemische Reaktionen | Ergebnis Gefrierschnitt | Ergebnis Paraffinschnitt |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion (McMANUS, HOTCHKISS und LILLIE) (Schiffsches Reagens nach GRAUMANN 1953) Formol | hellrot | hellrot |
| Acetylierungstest nach McMANUS, CASON a) nach Acetylierung b) nach Deacetylierung Formol | nicht dargestellt schwach rot | nicht dargestellt schwach rot |
| Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion nach Bromierung (LILLIE) Formol | hellrot | hellrot |
| Perameisensäure-Leukofuchsin-Reaktion auf Äthylengruppen Formol | schwach rot | schwach rot |
| Färbung mit Alcianblau (LISON) Nachweis von sauren Mucopolysacchariden Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Prüfung der Eisenbindung mit dialysiertem Eisen (HALE) Nachweis von sauren Mucopolysacchariden Formol und Formol-Calcium, Carnoy | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Prüfung der Metachromasie: a) SCHMORLS Thionin-Methode b) Toluidin-Blau Formol | blau schwach blau | blau schwach blau |
| Bestsche Carminfärbung Carnoy | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Färbung mit Sudan-III-Lösung Formol | rot-orange | nicht dargestellt |
| Färbung mit Sudanschwarz-B Formol | braun | bräunlich |
| Sudan-Gelatine-Methode (GOVAN) Formol | rot-orange | nicht dargestellt |
| Plasmalfärbung (FEULGEN) Nativ | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| FISCHLERS Methode (Fettsäurenachweis) a) nach Behandlung mit warmem Chloroform b) nach Behandlung mit 10% Essigsäure c) nach Behandlung mit Citratpuffer pH 4,5 Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Phosphorlipoidreaktion (ONAMOTO, SHIMAMOTO, UEDA, KUSOMOTO, SHIGATA) Formol und Formol-Calcium | schwach blau-violett | nicht dargestellt |
| Nilblau-Methode (SMITH und CAIN) Formol und Formol-Calcium | dunkelblau | |
| Nilblau-Methode zum Nachweis von Phosphati- den (MENSCHIK) Formol-Calcium | dunkelblau | |
| BAKERS saurer Hämatintest Formol-Calcium | nicht dargestellt | |

Tabelle 1 (Fortsetzung)

| Histochemische Reaktionen | Ergebnis Gefrierschnitt | Ergebnis Paraffinschnitt |
|---|--|---|
| Thionin-Einschlußfärbung (FEYRTER) Formol und Formol-Calcium | blau | |
| Neuraminsäurenachweis (DIEZEL) zum Nachweis von Gangliosiden Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Nuclearreaktion (FEULGEN) Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Gekoppelte Tetrazonium-Reaktion (DANTELLI) Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Tetrazonium-Reaktion nach Benzolierung (PEARSE) Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Millonsche Reaktion zum Nachweis von Tyrosin Formol | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Alloxan-Schiff-Färbung Ninhydrin-Schiff-Färbung (YASUMA und ICHIKAWA) Alkohol 80 % | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| DDD-Reaktion (BARNETT und SELIGMAN) Trichloressigsäure 1 % — Alkohol 80 % | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Astrablau-Reaktion (MÜLLER 1957 in der Modi- fikation nach GOSLAR 1958) Alkohol 80 % | nicht dargestellt | nicht dargestellt |
| Bestimmung des isoelektrischen Punktes (PISCHINGER, PEARSE) Formol neutral, Formol | Beginn der Ent- färbung pH 4,15, entfärbt 3,69 | Beginn der Ent- färbung pH 4,7, entfärbt 4,15 |

DIEZEL 1955) ist es unwahrscheinlich, daß ein Gangliosid enthalten ist. Die Ganglioside müßten zudem wegen ihrer Neuraminsäurekomponente mit der Tetrazonium- und der Ninhydrinreaktion zu erfassen sein (LENNERT 1954/55; YASUMA und ICHIKAWA 1953). Auch diese bleiben negativ. Mit der Einschlußfärbung nach FEYRTER färbt sich das Lipofuscin blau und nicht metachromatisch rot wie die Ganglio- und Cerebroside. Auf diese Befunde hin haben wir keine Extraktionsversuche, die der Differenzierung von Gangliosiden und Cerebroside dienen, vorgenommen (BRANTE 1951).

Oben genannte Methode ist nach den systematischen Untersuchungen von DIEZEL (1954 und 1955) an Modellsubstanzen und Lipoidspeicherkrankheiten zur Differenzierung der einzelnen Glykolipide geeignet. Für die Verbindlichkeit der Feyrterschen Thionineinschlußfärbung besteht die Auffassung (LENNERT 1954/55), daß nur die neutralen Cerebroside bei der Färbung negativ reagieren, während die SO_4 -Ester der Cerebroside und die Ganglioside eine starke Metachromasie zeigen, was auf die saure Natur dieser Glykolipide zurückzuführen sei.

Es sei jetzt näher auf die Fettkomponente des lipoiden Pigmentes eingegangen. Von SIEBERT, HEIDENREICH, BÖHNING und LANG (1955) wird der Fettgehalt des Pigmentes auf Grund papierchromatographischer Untersuchung auf 20 % geschätzt. Bei unseren an fixierten und unfixierten Gefrierschnitten angestellten Extraktionsversuchen (Tabelle 2) zeigte sich, daß bei beiden die PAS-positive

Substanz auch nach der Behandlung mit verschiedenen Fettlösungsmitteln noch darstellbar ist und sich ebenfalls mit Thionin anfärben läßt. Eine gewisse Menge des PAS-positiven Anteiles wird jedoch entfernt, wobei Unterschiede bei den einzelnen Lösungsmitteln zu verzeichnen sind.

Der mit Sudan III färbbare Fettanteil ist durch Extraktion relativ leicht zu entfernen. Sichtbar bleibt ein Pigmentrest mit gelblicher bis bräunlicher Eigenfarbe. Je nach Art des Lösungsmittels ist nach der Extraktion jedoch noch ein verschieden großer Rest eines mit Sudanschwarz B anfärbbaren Lipoids zu

erkennen. Hiermit finden wir bestätigt, daß Sudanschwarz B die größte Färbbreite hat und, wenn eine möglichst vollständige Erfassung der Lipoide angestrebt wird, stets angewendet werden sollte (LISON 1934; McMANUS 1945; LENNERT und WEITZEL 1952 b). Darüber hinaus zeigt sich, daß die Ablagerung hinsichtlich ihres Lipoidgehaltes nicht einheitlich gebaut ist, sondern daß sie aus einem Lipoidgemisch verschiedenartiger Löslichkeit besteht. Über die Spezifität des Sudanschwarz B als Lipoidfarbstoff — insbesondere auch der Lipoproteide — soll nach der Arbeit von EDWARD, BERMES, HUGH und McDONALD (1957) kein Zweifel bestehen.

Tabelle 2

| Einwirkung folgender Lösungsmittel 16 Std bei Zimmertemperatur und bei 65° C | Extraktionsrest in Bruchteilen nach der Farbintensität ohne Berücksichtigung der Pigmenteigenfarbe geschätzt | | |
|---|---|--------------|------------------------|
| | PAS | Sudan III | Sudan- schwarz B |
| Aceton | 1/2 | — | 1/4 |
| Äther | 1/2 | — | 1/5 |
| Chloroform | 1/2 | — | 1/5 |
| Äthylacetat | 2/3 | — | 3/4 |
| Benzol | 1/3 | — | 1/4 |
| Xylol | 2/3 | — | 1/2 |
| Äthylalkohol | 1/2 | — | 1/2 |
| Alkohol-Äther 3:1 | 1/2 | — | 2/3 |
| Methylalkohol (Zimmertemperatur) . . . | 2/3 | 1/4 | 1/2 |
| Methylalkohol-Chloro- form 3:1 | 1/3 | — | 1/3 |
| Pyridin | 1/2 | — | 1/2 |
| Essigsäure | 2/3 | — | 2/3 |

Unsere Extraktionsversuche lassen die Frage ungeklärt, ob und wie sich im vorliegenden Fall die einzelnen Komponenten des Lipoidgemisches in ihrer Löslichkeit gegenseitig beeinflussen oder ob ein Einbau eines Fettanteiles in den Kohlenhydrat- oder Eiweißteil des Pigmentes vorliegt. Es stellt sich weiter die Frage, ob wirklich alle Lipoide mit Ausnahme der festen Wachse (LENNERT und WEITZEL 1952 a) durch Pyridin aus dem Schnitt entfernbar sind, wodurch ihre Lipoidnatur im Zweifelsfall erhärtet werden soll (BAKER 1944 und 1946). Es muß daran erinnert werden, daß auch die autoxydativ veränderten Fette nicht mehr mit Fettlösungsmitteln zu extrahieren sind. Auf die Bedeutung dieser Stoffgruppe bei der Entstehung lipoider Pigmente haben in jüngster Zeit GEDIGK u. Mitarb. (1956, 1958) hingewiesen. Wir werden auf diese Fragen später noch eingehen müssen. Außerdem kann durch die Fixierung — auch die Extraktionsflüssigkeiten bedingen einen Fixierungseffekt — aus physikalischen Gründen die Löslichkeit der Lipoide beeinflußt werden (KAUFMANN, LEHMANN und BANTECHI 1927; BAKER 1946).

Von der Gruppe der Phosphatide ist mittels der Feulgenschen Plasmalfärbung am unfixierten Schnitt das Vorkommen von Acetalphosphatiden auszuschließen (STAMMLER 1952). Mit den üblichen Fettfärbemethoden werden die Phosphatide nicht oder nur zum Teil erfaßt. Nach LENNERT (1954/55) ist bei Formolcalciumfixierung neben dem Darstellen durch Sudanschwarz B die Blaufärbung mit Nilblausulfat nach der Smith- und Cainschen Technik bereits als ein wichtiger Hinweis auf die Phosphatidnatur des Lipoids zu betrachten, die

Menschikische NBS-Färbung — sie fiel positiv aus — aber bereits als spezifische Phosphatidreaktion zu betrachten. Die Feststellung von SIEBERT, HEIDENREICH, BÖHMIG und LANG (1955), daß im lipoiden Pigment Phosphor enthalten ist, würde gleichfalls dafür sprechen. Leider läßt sich in der Reihe unserer Versuche die Spezifität der genannten Reaktionen nicht bestätigen, da die von BAKER abgewandelte Smith-Dietrich-Färbung (BAKERS saurer Hämatintest) mit negativem Ergebnis verlief. Nach LENNERT (1954/55), der unter anderem auf die Arbeiten von LISON (1934), PEARSE (1953) sowie KUTSCHERA-AICHREGEN (1925) Bezug nimmt, soll die letztgenannte Methode für den Phosphatidnachweis vollkommen sein. Ein Zweifel bleibt bestehen. Löslichkeitsveränderungen durch die Fixierung spielen beim Nachweis der Phosphatide ja eine besonders ungünstige Rolle.

Über die Art des Färbevorganges sind die Ansichten noch geteilt. Während LISON die Fettsäuren der Phosphatide im wesentlichen für die Reaktion verantwortlich macht, lehnt CAIN dies kategorisch ab und schreibt dem Phosphorradikal bzw. der Aminobase die Hauptbedeutung zu (zit. nach LENNERT 1954/55).

Der schwach positive Ausfall der Nilblausulfatfärbung nach Extraktion — auf die Problematik der Extraktionsergebnisse wurde schon hingewiesen — könnte ebenso wie das Ergebnis der Sudanschwarz B-Färbung auch durch das Vorliegen von Lipoproteinverbindungen bedingt sein (EDWARD, BERMES, HUGH und McDONALD 1957). Der Ausfall der PAS-Färbung — auch dessen Verhalten nach der Acetylierung — würde dem nicht widersprechen. HYDEN (1950) kommt auf Grund UV-spektroskopischer Untersuchung des Lipofuscin zu dem Ergebnis, daß ein wesentlicher Teil aus Lipoproteiden besteht, die — verbunden mit einem komplexen Chromatophor — wahrscheinlich zur Gruppe der Pterine gehören. Histochemisch ist eine hinreichend sichere Entscheidung zur Zeit nicht möglich.

Abschließend ist die Frage des Vorkommens von Proteinen zu diskutieren. Daß Eiweiße im Lipofuscin enthalten sind, ist seit den histoenzymatischen Untersuchungen von SACHS (1951) erwiesen. Vermittels Trypsin- und Pepsinverdauung konnte er das lipoides Pigment zerstören. Desgleichen stellten SIEBERT, HEIDENREICH, BÖHMIG und LANG (1955) nach Isolieren des Lipofuscin durch Zentrifugieren und Sedimentieren Proteinsubstanzen mittels der Papierchromatographie dar. — Die histochemischen Ergebnisse sind demgegenüber sehr viel dürftiger. Die Feulgensche Nuclealreaktion und die Färbung mit Methylgrün-Pyronin ergeben einen negativen Ausfall. Tyrosin, Tryptophan und Histidin lassen sich mit der Millonschen und Tetrazonium-Reaktion nicht darstellen. Auch die Ninhydrin- und Alloxan-Schiff-Reaktion auf Aminogruppen verlief negativ wie die Astrablaufärbung (MÜLLER 1958) und die DDD-Reaktion nach BARNETT und SELIGMAN auf S—H- und S—S-Bindungen. Es ist anzunehmen, daß der von SIEBERT u. Mitarb. (1955) gefundene Schwefel in einer histochemisch noch nicht zu fassenden Form eingebaut ist.

Ergänzend seien an dieser Stelle die Untersuchungen über die Histoenzyme von GEDIGK und BONTKE (1956) genannt. Diese Autoren konnten im Bereich des lipoiden Pigmentes saure Phosphatase nachweisen, die gleiche Lagerung wie die Pigmentkörnchen besitzt, jedoch auch außerhalb der Pigmentansammlung im Plasma zu finden ist. Bei jugendlichen Individuen zeigt sich die saure Phosphatase an jener Stelle verdichtet, wo sich später das Lipofuscin abzulagern

pfllegt. Sie diskutieren, ob die Phosphatase für die Bildung des Pigmentes von Bedeutung ist oder ob beide sich unabhängig nur in stoffwechselintensiven Zellbereichen anhäufen. Alkalische Phosphatase, Glucuronidase und Dehydrogenase beobachteten sie nicht. Nach GRAF (1916) ist im Lipofuscin eine nur schwache Oxydasereaktion vorhanden.

Diskussion der Untersuchungsergebnisse

Fassen wir die Ergebnisse unserer histochemischen Untersuchung unter Einbeziehen der in der Literatur niedergelegten Befunde zusammen. Das lipoides Pigment in den Ganglienzellen zeigt eine positive PAS-Reaktion, die durch reaktionsfähige Glykol-Gruppen bedingt ist. Diese sind ihrerseits kohlenhydrathaltigen Verbindungen zuzurechnen. — Es läßt sich ein mit Sudan III färbbares leicht lösliches Lipoid extrahieren, während ein nicht eluierbarer Rest sich mit Sudanschwarz B darstellt. Es fragt sich, ob der nicht extrahierbare Fettanteil autoxydativ aus dem löslichen Fettanteil gebildet wurde, andere physikalisch-chemische Bedingungen die Fette fixieren oder ein Glykolipoid vorliegt. Bei der letztgenannten Stoffgruppe kann es sich aber nicht um Ganglioside oder Cerebroside handeln. Ein Vorhandensein von Phosphatiden ist möglich. — Nach dem Ergebnis der Nilblausulfatfärbung, den von HYDEN (1950) im UV-Spektrogramm erhobenen Befunden und dem Nachweis von Eiweißsubstanzen durch histoenzymatische (SACHS 1951) und papierchromatographische Methoden (SIEBERT u. Mitarb. 1955) sind mit größerer Wahrscheinlichkeit auch Lipoproteide zu vermuten. — Im Bereich des Lipofuscins findet sich saure Phosphatase (GEDIGK und BONTKE 1956) und in geringer Menge Oxydase (GRAF 1916). Auf die Entstehung der Pigmenteigenfarbe werden wir jetzt zu sprechen kommen.

Unsere Untersuchungen an 30 Gehirnen verschiedener Altersstufen zeigen, daß im Laufe der Entwicklung und Alterung in der stofflichen Zusammensetzung des lipoiden Pigmentes der Ganglienzellen gewisse Veränderungen und Verschiebungen eintreten. Diese betreffen ausschließlich den Fettanteil und die Eigenfarbe. Im jugendlichen Alter ist die Eigenfarbe nur sehr gering ausgeprägt. Das Pigment färbt sich mit Sudan III kräftig rot, und das Fett ist fast vollständig zu eluieren, d. h., es bleibt nach der Extraktion kaum ein mit Sudanschwarz B zu färbender Anteil zurück. Die PAS-färbbare Komponente ist im Lipofuscin des jugendlichen Gehirns gut sichtbar. Im Laufe der Alterung — beginnend etwa im 3. und 4. Dezennium — wird der Farbausschlag mit Sudan III nicht mehr so kräftig rot, sondern geht etwas mehr ins Gelbliche, es tritt ein nicht extrahierbares Lipoid sowie deutlicher die gelbe und später manchmal bräunliche Eigenfarbe auf. Der extrahierbare Fettanteil nimmt deutlich ab. Individuelle und hirnregionale Unterschiede sind erheblich.

Es liegt nahe, neben der zeitlichen Beziehung zwischen Veränderung der Lipoidkomponenten und Auftreten der gelben Eigenfarbe auch eine ursächliche zu vermuten. So hat GEDIGK (1958) in neueren Experimenten gezeigt, daß die Entwicklung lipogener Pigmente hauptsächlich an den oxydativen Umbau ungesättigter Fettstoffe gebunden ist. Durch den Oxydationsprozeß färbt sich die Fettsubstanz gelb bis gelbbraun und ist mit Fettlösungsmitteln nicht zu extrahieren. GEDIGK gelangte zu dem Schluß, daß die Pigmenteigenfarbe des Lipofuscins durch derartig oxydativ veränderte Fette bedingt ist und diese der nicht

elulierbaren Lipoidkomponente entsprechen. Auf Grund unserer Untersuchungen am menschlichen Gehirn können wir diese Befunde durchaus bestätigen. Es dürfte sich um den in der Fettchemie schon lange bekannten Prozeß der Autoxydation oder lipoxydasekatalysierten Oxydation handeln.

Die Autoxydation oder die durch Lipoxydase katalysierte Oxydation betrifft die Umwandlung der polyungesättigten Fettsäuren zu nichtlöslichen *cis-trans-* oder *trans-trans-*konjugierten Dien-Hydroperoxyden. Vermutlich geht der Oxydationsvorgang bei der Autoxydation nach Art einer Kettenreaktion vor sich, der bei der Lipoxydase-Reaktion nach anderem Gesetz. Beim letztgenannten Vorgang kommt es im Gegensatz zur Autoxydation zu optisch aktiven Hydroperoxyden und Polymeren, und auch die Kinetik der Lipoxydase-Oxydation entspricht nicht jener der Autoxydation (HOLMAN 1953; LUNDBERG 1956). Welche von beiden Reaktionen beim Lipofuscin vorliegt, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Das Vorkommen von Lipoxydase im Muskel und in manchen anderen Geweben ist nachgewiesen, für die Ganglienzellen unseres Wissens aber noch nicht untersucht worden.

Über das zeitliche Auftreten und die Verteilung des lipoiden Pigmentes im Nervensystem sind wir durch die Arbeiten von PILCZ (1895) sowie von ZEGLIO (zit. nach SCHOLZ 1957) gut unterrichtet. Lipofuscin kann bereits im 7. Fetalmonat im Ganglion cervicale sup. gefunden werden und ist zur Zeit der Geburt konstant dort anzutreffen. Im 7. Lebensmonat ist auch das Ganglion cervicale inf. betroffen. Lipoides Pigment in den Ganglienzellen der unteren Olive soll bereits im 7. Jahr konstant sein. Bei diesem Lebensalter beobachtete PILCZ (1895) das Pigment in den Spinalganglien und vereinzelt in den Vorderhornzellen. Relativ beständig ist es um das 20. Lebensjahr hier wie auch in den motorischen Hirnnervenkernen zu sehen. Es folgen die Strangkerne des Rückenmarkes (27. Jahr), die Beetzschen Pyramidenzellen (29. Jahr) und die kleinen Pyramidenzellen (37. Jahr). Im weiteren kommt es zu einer schnellen Zunahme in allen „lipophilen Ganglienzellen“ (OBERSTEINER 1904) bis zum 50. Jahr, um sich dann nur noch langsam zu vermehren (KELLER 1939). Ausgesprochene individuelle Schwankungen — auch wenn man von der pathologischen Ganglienzellverfettung (SPIELMEYER 1922) absieht — hinsichtlich des zeitlichen Auftretens, des Ausmaßes und der Form der Ablagerung in der Zelle sind zu verzeichnen (SCHOLZ 1957). So fanden wir in Übereinstimmung mit KELLER (1939), daß schon im 1. und 2. Dezennium die Großhirnrinde in einzelnen Areae inkonstant in geringer Menge Lipofuscin besitzen kann.

Außer in den Ganglienzellen ist das lipoides Pigment auch in den Gliazellen — insbesondere jenen der Molekularschicht — und an den Gefäßen zu finden (ODEFEY 1918; SPATZ 1922; SCHOLZ 1957 u. a.), das hinsichtlich seines Auftretens und seiner Verteilung einer Eigengesetzlichkeit unterliegt. Jedoch auch unabhängig von Zellen und Gefäßen trifft man das lipoides Pigment frei in Form von Körnchen und Brocken im Gewebe an (WENDERVIL 1925). Besonders eindrucksvoll sieht man derartige freie Pigmentniederschläge — neben Gliazell- und Gefäßverfettung — in der Bergmannschen Glia-schicht des Kleinhirns mit geringer Streuung in die Molekular- und Körnerschicht des Kleinhirns (STAMMLER 1958). Sie treten nicht vor Ende des 3. Dezenniums auf und sind nach dem 50. Lebensjahr — wenn genügend große Schnitte untersucht werden — in der Mehrzahl der Fälle zu beobachten (Abb. 1). Sie besitzen keine gelbe Eigenfarbe, verhalten sich aber sonst histochemisch wie das Lipofuscin der Zellen. Die Sudanschwarz B-Färbung nach der Extraktion fehlt oder fällt nur schwach

positiv aus. Möglicherweise ist durch die zellunabhängige Lagerung der Oxydationsprozeß verlangsamt. Im Rahmen einer Inaugural-Dissertation wurden diese Ablagerungen von KUHN (1958) untersucht. Nach ihrer Anordnung — im oberflächlichen Kleinhirnmark, der Körner- und Purkinjezellschicht treffen sich zwei arterielle Systeme und anastomosieren miteinander (BARGMANN 1956) — mußte

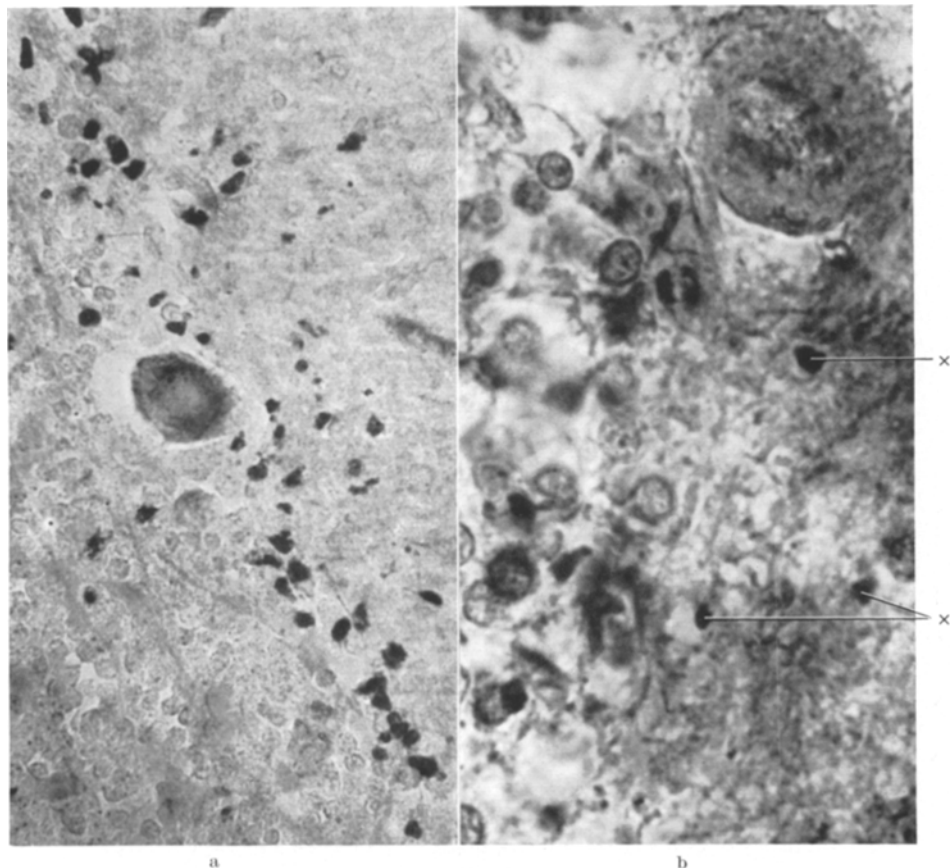


Abb. 1. a „Lipoides Pigment“ in der Bergmannschen Gliaschicht in zum Teil zellunabhängiger Lagerung. Paraffinschnitt. Färbung PAS. Vergr. 1:140. b Scholliges Pigment (X) ohne sichere Beziehung zu den Glia- und Ganglienzellen. Paraffinschnitt. Färbung PAS mit Thioningegenfärbung. Vergr. 1:1000

eine Abhängigkeit von der Gefäßversorgung diskutiert werden. Bemerkenswert ist es auch, daß sie in so reicher Menge in der Nähe der besonders stoffwechselintensiven und relativ lipophoben Purkinjezellen anzutreffen sind. Da eine hinreichend sichere Beziehung zu Gefäßen, Glia- und Ganglienzellen jedoch nicht sicher ist, ist zu erwägen, ob das Lipofuscin nicht auch durch besondere Bedingungen in der Zwischensubstanz entstehen kann oder eine Abhängigkeit von den Zellausläufern besteht.

Über die Aufgaben und Entstehungsweise des Lipofuscins im Nervengewebe ist uns bis heute noch kaum etwas bekannt. Ob man es als Abnutzungs- oder Alterspigment (LUBARSCH 1902), als eine Art Schlackenbildung (RIBBERT 1903),

als Folge eines Mangels von Stoffwechselkatalysatoren oder Fermenten (HÖPKER 1951) auffaßt oder ihnen eine aktivere Rolle im Stoffwechsel zuerkennt, stets kann es sich nicht um mehr als um eine Arbeitshypothese handeln. Die genannten Tatsachen sind nicht zwingend für die eine oder andere der genannten Deutungen. So interpretierte SCHOLZ (1957) unsere heutigen Kenntnisse über die biologische Bedeutung des Lipofuscins in den Ganglienzellen folgendermaßen: „So verbreitet und auffällig die Pigmentablagerung in den Nervenzellen ist und ein so großes theoretisches Interesse sie beansprucht, so scheint ihre Bedeutung für Bestand und Funktion der Nervenzelle doch im umgekehrten Verhältnis dazu zu stehen. Wir sehen, daß Ablagerungen von sog. Abnutzungspigment (Lipofuscin) in den Nervenzellen monströse Ausmaße erreichen können, ohne daß selbst die empfindlichere spezifische nervöse Funktion dadurch aufgehoben wird.“

Zusammenfassung

Das lipoides Pigment in den Ganglienzellen des Gehirns zeigt eine positive PAS-Reaktion, die durch reaktionsfähige Glykolgruppen bedingt ist. Diese sind ihrerseits kohlenhydrathaltigen Verbindungen zuzurechnen. Es läßt sich ein mit Sudan III färbbares leicht lösliches Lipoid extrahieren, während ein nicht eluierbarer Rest sich mit Sudanschwarz B darstellt. Das Vorkommen von Phosphatiden bleibt fraglich. Nach dem Ergebnis der Nilblausulfatfärbungen sowie den von HYDEN (1950) im UV-Spektrogramm, von SACHS (1951) durch histoenzymatische und von SIEBERT u. Mitarb. (1955) durch papierchromatographische Untersuchungen erhaltenen Befunden, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch Lipoproteide im Pigment anzunehmen.

Die Pigmenteigenfarbe wird durch den nicht extrahierbaren, mit Sudanschwarz B färbbaren Lipoidrest bedingt, der im Laufe des Lebens erheblich zunimmt. Hierbei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um oxydierte ungesättigte Fette aus dem ursprünglich löslichen Fettanteil (GEDIGK 1958), vermutlich ein Prozeß nach Art der Autoxydation oder lipoxydasekatalysierten Oxydation.

Außer intracellulärem Vorkommen findet sich das Pigment auch schollig frei im Gewebe, besonders reichlich im Bereich der Bergmannschen Glia-schicht des Kleinhirns. Diesem fehlt die Pigmenteigenfarbe weitgehend wie auch die nicht eluierbare Fettkomponente, während das histochemische Verhalten sonst dem des intracellulär abgelagerten Pigmentes entspricht.

Summary

The lipopigment in the ganglion cells of the brain shows a positive PAS-reaction which is due to reactive glycol groups. These, in turn, are attributable to carbohydrate complexes. A slightly soluble lipid, stainable with Sudan III, can be extracted from these lipopigments, while a non-elutable remainder is demonstrable with Sudan Black B. The occurrence of phosphitides remains questionable. From the results of the Nile-Blue-Sulfate stain, as well as from the findings of HYDEN (1950) made with the UV-spectrogram, from the findings of SACHS (1951) made by histo-enzymatic studies, and those from SIEBERT and co-workers (1955) made by paper chromatographic investigations, it is assumed that with all probability lipoproteins are within the pigment.

The pigment color is due to the non-extractable Sudan Black B stainable lipid remainders, which increase considerably during the course of aging. Here it is with greatest probability a matter of oxidized unsaturated fats developing from the original soluble fat components (GEDIGK 1958), presumably a process of the type of auto-oxidation or lipoxidase catalytic oxidation.

Besides its intracellular occurrence, the pigment is found as well free within the tissues as amorphous deposits. These are especially abundant in the region of the BERGMANN glial layer of the cerebellum. The color of the pigment is considerably lacking, as well as its non-elutable fat components, while its histochemical behavior otherwise corresponds to that of the intracellular pigment deposits.

Literatur

- BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Stuttgart: Georg Thieme 1956. — BRANTE, G.: Gargoylismus als Lipoidose. *Fette u. Seifen* **53**, 457—461 (1951). — BRAUNMÜHL, A. v.: Pathologisch-anatomische Befunde bei der senilen Involution und senilen Entartung. In *Handbuch der speziellen Anatomie und Histologie*, Bd. XIII A1, hrsg. von W. SCHOLZ 1957. — DIEZEL, P. B.: Histochemische Untersuchungen an primären Lipoidosen. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 89—118 (1954). — Bestimmung der Neuraminsäure im histologischen Schnittpräparat. *Naturwiss.* **42**, 487 (1955). — Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipide. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957. — EDWARD, W., JR., BERMES, J. HUGH and K. McDONALD: Fractionation and characterisation of the lipide stain, Sudan Black B. *Arch. Biochem.* **70**, 49—57 (1957). — GEDIGK, P.: Zur Kenntnis lipogener Pigmente. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **42**, 430—434 (1958). — GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Zur Genese der Lipopigmente. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **40**, 244—247 (1956). — GELLERSTEDT, N.: Zur Kenntnis der Hirnveränderungen bei der normalen Altersinvolution. *Upsala Läk.-Fören. Förh.* **38**, 193—408 (1933). — GRAF, S.: Die Naphtholblau-Oxydasereaktion der Gewebszellen nach Untersuchungen am unfixierten Präparat. *Zbl. Path.* **24**, 771—772 (1913). — GRAUMANN, W.: Zur Standardisierung des Schiffschens Reagenz. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 225—226 (1953). — HÖPKER, W.: Die Wirkungen des Glukosemangels auf das Gehirn. Stuttgart: Georg Thieme 1955. — HOLMAN, R. T.: Mode of action of lipoxydase. *Trans. Amer. cer. Chem.* **11**, 135—146 (1953). — HYDEN, H.: Spectroscopic studies on nervecells in development growth and function. Chicago Univ. Press 1950. Zit. nach SCHOLZ 1957. — KAUFMANN, C., P. LEHMANN u. H. BANTECKE: Zur Frage der Extrahierbarkeit der „Organlipide“ mit organischen Lösungsmitteln. *Zbl. Path.* **39**, 232—236 (1927). — KELLER, L.: Menge und Verteilung des lipoiden Pigmentes in der normalen menschlichen Großhirnrinde in verschiedenen Lebensaltern. *Z. Neur.* **164**, 259—272 (1939). — KUHN, I.: Histologische und histochemische Untersuchungen an Ablagerungen in der Bergmannschen Glia-schicht des Kleinhirns. Inaug.-Diss. Köln 1958. — KUTSCHERA-AICHERGEN, H.: Beitrag zur Morphologie der Lipide. *Virchows Arch. path. Anat.* **256**, 569 (1925). — LENNERT, K.: Die Histochemie der Fette und Lipide. *Z. wiss. Mikr.* **62**, 368—393 (1954/55). — LENNERT, K., u. G. WEITZEL: Morphologie und Histochemie der Bürzeldrüse von Enten. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **58**, 208—229 (1952a). — Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 20—29 (1952b). — LILLIE, R. D.: A Nilblue staining technic for the differentiation of melanin and lipofuscins. *Stain Technol.* **31**, 151—152 (1956). — LISON, L.: Histochemie animale. Paris 1953. — LUBARSCH, O.: Über fetthaltige Pigmente. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **13**, 881—883 (1902). — LUNDBERG, W. O.: Durch Lipoxydase katalysierte Oxydation polyungesättigter Fettsäuren. *Fette u. Seifen* **58**, 329—331 (1956). — McMANUS, J. F.: Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature (Lond.)* **158**, 202 (1946). — McMANUS, J. F., and J. CASON: Carbohydrate histochemistry studied by acetylation Techniques. *J. exp. Med.* **91**, 651—654 (1950). — MENSCHIK, Z.: Nilblue histochemical method for phosphorlipids. *Stain Technol.* **28**, 13 (1953). — MÜLLER, W.: Astrablau zur Darstellung des sogenannten Neurosekrets. *Lab.-Blätter* **2**, 3—8 (1957). — OBERSTEINER, H.: Weitere Bemerkungen über die Fett-Pigmentkörnchen im Zentralnervensystem. *Arb. neurol. Inst. Univ. Wien* **11**, 400—406 (1904). — ODEFEY, M.: Untersuchungen über das Vorkommen

fetthaltiger Körner und Pigmente in den nichtnervösen Teilen des Gehirns unter normalen und krankhaften Bedingungen. Arch. Psychiat. Nervenkr. **59**, 10—36 (1918). — PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London 1953. — PILCZ, A.: Beitrag zur Lehre von der Pigmententwicklung in den Nervenzellen. Arb. neurol. Inst. Univ. Wien **3**, 123—139 (1895). — RIBBERT, H.: Die morphologischen Verhältnisse bei Gegenwart von Fett in den Zellen und ihre Verwertung für die Frage nach der Herkunft des Fettes. Verh. Dtsch. Path. Ges. 1903. Zit. nach v. BRAUNMÜHL 1957. — SACHS, H. W.: Histoenzymatische Untersuchungen am Lipofuscin. Westdtsh. Pathologentagg 1951. Zit. nach SCHOLZ 1957. — SCHOLZ, W.: Für die allgemeine Histopathologie degenerativer Prozesse bedeutsame morphologische, histochemische und strukturelphysiologische Daten. In Handbuch der speziellen Anatomie und Histologie, Bd. XIII A1, hrsg. von W. SCHOLZ 1957. — SPATZ, H.: Über Stoffwechseleigentümlichkeiten in den Stammganglien. Z. ges. Neurol. Psychiat. **78**, 641—648 (1922). — STAMMLER, A.: Über die Verteilung der Acetalphosphatide im Zentralnervensystem des Menschen. Dtsch. Z. Nervenheilk. **168**, 305—321 (1952). — Klinik, Pathologie und Probleme der Periarteriitis nodosa des Nervensystems. Heidelberg: Hüthig 1958. — SPIELMEYER, W.: Histopathologie des Nervensystems. Berlin: Springer 1922. — WENDEROVIC, E.: Über die Leitungs- und Zellveränderungen der Hemisphären bei Sclerosis cerebello-pyramido-intercorticalis und über interstitielles sphärisches Fett im Zentralnervensystem. Arch. Psychiat. Nervenkr. **75**, 490—549 (1925). — YASUMA, A., u. T. ICHIKAWA: Ninhydrin-Schiff and Alloxan. Schiff Staining. J. Lab. clin. Med. **41**, 296—299 (1953). — ZEGLIO, P.: La deposizione del pigmento melanico nelle cellule nervose dell'uomo in relazione alla età. Ref. Zbl. ges. Neurol. Psychiat. **65**, 474 (1933).

Dr. A. STAMMLER, Universitäts-Nervenklinik, Köln-Lindenthal, Lindenburg