

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

Über die Entstehung von Lipopigmenten in Muskelfasern*

Untersuchungen beim experimentellen Vitamin E-Mangel der Ratte
und an Organen des Menschen

Von

PETER GEDIGK und ROBERT FISCHER

Mit 10 Textabbildungen in 18 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 1. Juli 1959)

Über die funktionelle Bedeutung des in Parenchymzellen auftretenden fett-haltigen Pigmentes, des Lipofuscins, gehen die Meinungen auch heute noch auseinander, weil wir über seine chemische Zusammensetzung und Entstehungsweise nur lückenhafte Kenntnisse besitzen. Auch die Beziehungen des Lipofuscins zum Ceroidpigment sind noch umstritten. So halten einige Autoren diese Pigmente für identisch oder nehmen an, daß sie ineinander übergehen können. In welcher Weise ein Übergang erfolgen soll, ist allerdings bisher offen geblieben. Dem steht die Ansicht gegenüber, daß es sich um verschiedene Cytoplasmastrukturen handelt; und manchmal wird sogar die Zugehörigkeit der Lipofuscine zu der Gruppe der Lipopigmente in Abrede gestellt (Literatur bei GEDIGK und FISCHER 1958).

Zur Klärung dieser Fragen, und insbesondere zur Aufdeckung der biologischen Bedeutung des Lipofuscins, wäre eine nähere Kenntnis seiner Entwicklung wünschenswert. Da sich in menschlichen Organen das Alter von Zellstrukturen in der Regel nicht genau bestimmen läßt, haben wir versucht, bei Tieren die Entstehung und Alterung der in Muskelfasern bzw. in Parenchymzellen auftretenden Lipopigmente zu verfolgen.

Unter normalen Bedingungen tritt allerdings in den Organen der üblichen Laboratoriumstiere nur wenig Lipofuscin in Erscheinung, dessen Alter zudem — genau wie beim Menschen — häufig nicht sicher zu ermitteln ist. Einen Hinweis für die Lösung dieses Problems fanden wir in Arbeiten über die Organveränderungen beim Vitamin E-Mangelzustand (MARTIN und MOORE 1936, 1939, EINARSON und RINGSTED 1938, BARRIE 1938, HESSLER 1941, HICKMAN und HARRIS 1946, MASON und TELFORD 1947, MEESSEN 1948, RUPPEL 1949, ELFTMAN, KAUNITZ und SLANETZ 1949, AMES und HARRIS 1950, MARKEES 1950, EINARSON 1952, JÜRGENS 1952, BECKMANN 1955, FOLLIS 1957). Unter diesen experimentellen Bedingungen entstehen in Muskelzellen, und zwar sowohl in glatten Muskelfasern als auch in der Herz- und Skelettmuskulatur fetthaltige Pigmente, deren Ähnlichkeit mit dem Lipofuscin von verschiedenen Autoren hervorgehoben worden ist (DE FARIA 1946, ELFTMAN, KAUNITZ und SLANETZ 1949, LINDNER 1957).

Für die Verfolgung der Genese eines fetthaltigen, lipofuscinartigen Pigmentes in Muskelfasern schienen uns daher die Untersuchung der Organe von E-avitaminotischen Tieren besonders geeignet zu sein. Wir haben deshalb bei Ratten, welche eine Vitamin E-arme Diät erhielten, die Entwicklung der entstehenden Lipopigmente in regelmäßigen Zeitabständen untersucht und mit den an Organen des Menschen erhobenen Befunden verglichen.

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

Von besonderem Interesse waren dabei die ersten Entwicklungsstadien des Pigmentes. Des weiteren galt es zu klären, welche Umwandlungen die Pigmentkörnchen im Laufe der Alterung erfahren. Und schließlich war festzustellen, welche Beziehungen zwischen dem Vitamin E-Mangelpigment und anderen Lipopigmenten, nämlich dem Lipofuscin und dem Ceroid, bestehen.

Die Bearbeitung eines derartigen Problems hatte die Anwendung histochemischer Methoden zur Voraussetzung, da es mit diesen Verfahren gelingt, auch die ersten färberisch noch uncharakteristischen Entwicklungsstufen des Pigmentes, also gewissermaßen das Propigment, morphologisch einwandfrei zu erfassen. Außerdem können die bei älteren Versuchstieren dicht nebeneinander liegenden, sehr verschiedenen Altersstufen dieser Pigmente nur mit einer morphologischen Methodik gut voneinander abgegrenzt werden.

Versuchsanordnung und Methoden

I. Tierversuche. 50 vier bis sechs Wochen alte weibliche Wistarratten (Gewicht 80—120 g) wurden mit Vitamin E-armer Diät ernährt, deren Zusammensetzung nach Angaben der Deutschen Hoffmann-La Roche A.G., Grenzach/Baden erfolgte¹. Diese Tiere wurden durch Nackenschlag und Dekapitation am 66., 88., 99., 120., 140., 148., 165., 172., 191., 205., 207., 219., 239., 281., 333., 335., 346., 369., 371., 475. und 482. Tag nach dem Versuchsbeginn getötet. — Zur Kontrolle erhielten 23 weibliche Wistarratten eine Vitamin E-haltige Diät. Ihre Organe wurden nach den gleichen Zeitabschnitten wie bei den Versuchstieren untersucht.

II. Histologische und histochemische Methoden. Die angewandten *histologischen Färbungen sowie die histochemischen Reaktionen zum Nachweis von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, Nucleinsäuren und Enzymen* sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Ihre Durchführung erfolgte nach den Angaben von GOMORI (1953), PEARSE (1953), LILLIE (1954) und GEDIGK (1956).

Die Auswertung histochemischer *Enzymreaktionen* setzt die Berücksichtigung von Kontrollversuchen voraus, die wir in der folgenden Weise durchgeführt haben:

1. Vor allem wurden die Gewebe vor den eigentlichen Fermentnachweisen in verschiedener Weise *vorbekandelt bzw. fixiert*. Dabei legten wir besonderen Wert darauf, die Reaktionen nicht nur an frischen Geweben, d. h. an nativen Gefrierschnitten (Kryostat) vorzunehmen, sondern auch — sofern es möglich war — formalin- und acetontfixiertes Material zu untersuchen, bei dem sich die Diffusion bzw. die Herauslösung des Fermenteiweißes aus dem Schnitt weitgehend verhindern läßt. Einzelheiten der Acetontfixierung und der Paraffineinbettung sind in früheren Arbeiten von GEDIGK und BONTKE (1956, 1957) zu finden. Für die Herstellung formalinfixierter Gefrierschnitte verwendeten wir 4%iges neutrales Formalin, mit dem das Material bei 4° C 5—12 Std lang behandelt wurde.

2. Sofern die Voraussetzungen dafür gegeben waren, wurden die Fermentnachweise stets mit *verschiedenen Methoden* durchgeführt, weil die Möglichkeit, die Lokalisation eines Enzyms durch unterschiedliche chemische Umsetzungen nachzuweisen, eine geradezu ideale Kontrolle der Befunde darstellt. Besonderen Wert haben wir bei den Phosphatasenachweisen auf die Gomori-Methoden gelegt, die nach der Einführung der Azofarbstoffmethoden in der letzten Zeit etwas in den Hintergrund gedrängt worden sind. Die Stärke der von GOMORI entwickelten Nachweisreaktionen beruht auf der Verwendung eines physiologischen Substrates, nämlich des Natrium- β -Glycerophosphates. Da auch die Gomori-Verfahren bei einer sorgfältigen Technik nur sehr kurze Inkubationszeiten (10—20 min) erfordern und unter diesen Bedingungen eine ortsgetreue Lokalisation des Enzymes gewährleisten, dürften sie vielleicht den Azomethoden sogar überlegen sein. So läßt sich z. B. auch bei der Gomori-Reaktion für saure Phosphatase eine Diffusion des Fermentes oder der Reaktionsprodukte des Enzymnachweises in die Zellkerne vermeiden (vgl. Abb. 6a u. b und 7a).

Der Vorteil der Azomethoden beruht auf ihrer einfachen Handhabung, so daß auch der Ungeübte reproduzierbare Ergebnisse erzielen kann. Dem steht jedoch die Verwendung

¹ Der Deutschen Hoffmann-La Roche A.G. Grenzach/Baden, danken wir für die Beratung bei der Herstellung des Futters und der Durchführung der Tierexperimente.

von Substraten mit verhältnismäßig großen, komplexen Molekülen gegenüber, deren Permeabilitätsmöglichkeit unter Umständen beeinträchtigt ist, und die dann mit den Enzymrezeptoren nicht in Wechselwirkung treten können. Nicht zuletzt aber ist auch der Einfluß des verwendeten Diazoniumsalzes auf das Ergebnis des Fermentnachweises in Rechnung zu stellen. — Die gleichen Überlegungen gelten auch für die Esterasenachweisreaktionen, bei denen uns neben den bewährten α -Naphthylacetat- und Naphthol-AS-Acetatverfahren noch die auf einem anderen Prinzip beruhende Bromindoxylmethode zur Verfügung steht (vgl. hierzu EDER 1958 und GÖSSNER 1958).

3. Bei allen Versuchen wurde jeweils ein Schnitt vor dem Enzymnachweis 15 min lang *gekocht* und dann zusammen mit den anderen (nicht inaktivierten) Präparaten weiterbehandelt.

4. Weiterhin führten wir stets Experimente durch, bei denen das *Substrat in der Inkubationslösung weggelassen* wurde, während sonst die Nachweisreaktion in der üblichen Weise vorgenommen wurde.

5. *Zusatz von spezifischen Effektoren.* a) Saure Phosphatase: Natriumfluorid. b) Unspezifische Esterase: Natrium-Taurocholat, Natriumfluorid, Atoxyl, DFP, E 600 (s. GOMORI 1955, STEIGLEDER und SCHULTIS 1957). — Auch die anderen Fermentreaktionen wurden in der üblichen Weise mit und ohne Effektoren durchgeführt.

6. *Diffusionsversuche* (saure Phosphatase und unspezifische Esterase). a) Ein hitzeinaktivierter und ein unbehandelter aktiver Schnitt (z. B. Leber) wurden in Deckglasabstand (etwa 75μ) für 12 Std bei Zimmertemperatur in Phosphatpuffer (pH 5,0 saure Phosphatase und pH 7,2 unspezifische Esterase) nebeneinander gestellt. Anschließend erfolgte der übliche Fermentnachweis. b) Ein hitzeinaktivierter Schnitt wurde zur Hälfte mit einem unbehandelten aktiven Schnitt (z. B. Leber) bedeckt; dann gemeinsame Inkubation.

Untersuchungsergebnisse

I. Untersuchungen am Vitamin E-Mangelpigment. Von sämtlichen Versuchs- und Kontrolltieren wurden zahlreiche Organe untersucht. In Übereinstimmung mit MEESSEN und RUPPEL (1949) stellten wir fest, daß nach allen angewandten histologischen und histochemischen Methoden die Entstehung und die Natur der beim Vitamin E-Mangelzustand in den glatten Muskelfasern, sowie in der Herz- und Skelettmuskulatur auftretenden Lipopigmente stets die gleiche war. Unsere Befunde stimmten daher in den verschiedenen Organen in den wesentlichen Punkten überein. Bei der Beschreibung der Versuchsergebnisse können wir uns deshalb auf die Veränderungen im Uterus beschränken, in dem die Entwicklung der Pigmentkörnchen am stärksten ausgeprägt war und besonders gut demonstriert werden kann.

Nach einer Versuchsdauer von 3–4 Monaten zeigte der Uterus der Vitamin E-frei ernährten Ratten bei der Betrachtung mit bloßem Auge eine ganz schwache gelbliche Färbung, während seine Größe und Gestalt nicht von der Norm abwichen. Die *histologische Untersuchung* ergab bei der Verwendung der Lupenvergrößerung keine wesentlichen Veränderungen. Erst die Betrachtung mit starker Vergrößerung deckte in vereinzelt Muskelfasern an den Polen der Kerne kleine, im Durchmesser $0,5$ – 1μ große Granula auf, welche zwar eine glasige Beschaffenheit besaßen, sich aber bei den üblichen histologischen Methoden, wie Hämatoxylin-Eosin, van Gieson oder Masson-Trichrom färbereisich nicht wesentlich von dem übrigen Cytoplasma unterschieden. Desgleichen wiesen diese Körnchen bei den histochemischen Reaktionen für Proteine, Kohlenhydrate und Lipide im allgemeinen die gleichen Eigenschaften auf wie das übrige Cytoplasma: Bei der Tetrazoniumreaktion für aromatische Aminosäuren wurden sie, genau wie die anderen Zellbestandteile, sehr stark angefärbt. Sie waren Perameisen-

säure-Schiff-negativ, nur ganz schwach PAS-positiv, besaßen keine nennenswerte Affinität für basische Farbstoffe und zeigten kein histochemisch nachweisbares Reduktionsvermögen. Mit Sudanrot und Ölrot ließen sie sich weder am Gefrierschnitt noch am Paraffinschnitt darstellen. Nur bei der Färbung mit Sudanschwarz nahmen sie — zum Unterschied von anderen

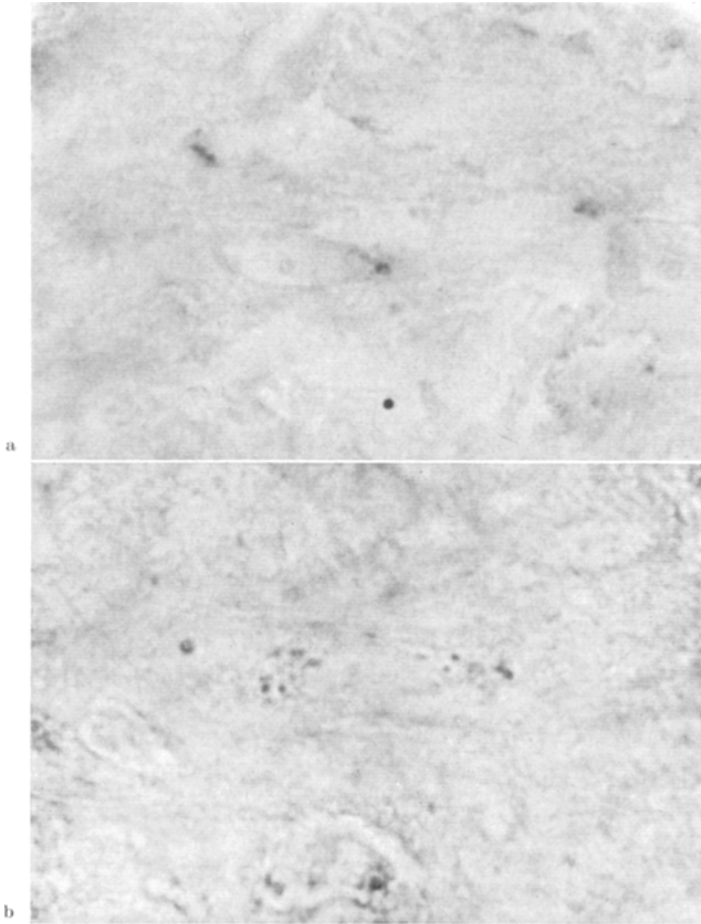


Abb. 1a u. b. Uterusmuskulatur nach 120 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Färbung mit Sudanschwarz, Kernechtrot. Vergr. 2000 \times . Vereinzelte, ganz schwach angefärbte Granula an den Kernpolen

Strukturen — einen schmutzig-grauschwarzen Farbton an. Diese sehr geringe — allein bei der Verwendung von Sudanschwarz in Erscheinung tretende — Sudanophilie kam erst nach der Paraffineinbettung des Gewebes gut zum Ausdruck, bei der durch die Vorbehandlung mit Alkohol, Toluol usw. eine Extraktion der leicht löslichen Lipide erfolgte, während der Fettbaustein der Granula nicht entfernt wurde (Abb. 1a und b). Ein deutliches Bild der Körnchen ließ sich aber im Fluoreszenzmikroskop erzielen, weil sie im UV-Licht oder im Blaulicht in einem weißlichen bis weißlichgelben Farbton aufleuchteten (Abb. 2a und b).

Die beschriebenen perinucleären Granula besaßen noch keine nennenswerte Eigenfarbe und konnten daher strenggenommen nicht als „Pigment“ bezeichnet werden. Die weitere Verfolgung der Organveränderungen beim Vitamin E-Mangelzustand ergab jedoch, daß es sich bei diesen Körnchen um die ersten Entwicklungsstadien des Vitamin E-Mangelpigmentes, also sozusagen um die Pigmentvorstufen bzw. das „Propigment“ handelte.

Außer den Körnchen fanden wir in diesem Stadium des Versuches in einigen Muskelfasern eigentümliche rundliche, gelegentlich zusammenfließende, optisch leere Vacuolen, die manchmal bevorzugt in der Nähe der Kerne lagen. Offenbar handelte es sich bei diesen Gebilden um die von LINDNER (1957) beschriebenen Golgi-Vacuolen. Eine regelmäßige Beziehung dieser Vacuolen zu den Granula war nicht festzustellen, da beide häufig unabhängig voneinander in den Muskelfasern auftraten.

Es sei betont, daß die Mehrzahl der Muskelfasern in diesem Versuchsstadium noch keine Veränderungen zeigte. Auch fluoreszenzmikroskopisch waren in den meisten Muskelzellen noch keine Körnchen nachweisbar.

Auch im Laufe der folgenden Zeit (5—12 Monate nach Versuchsbeginn) blieben die Form und die Größe des Uterus unverändert. Es trat jedoch eine zunehmende gelbe Verfärbung des Myometriums auf, die nach 9 Monaten schon recht ausgeprägt war. Bei der mikroskopischen Untersuchung traf man zu diesem Zeitpunkt in der Schleimhaut unregelmäßig gestaltete, manchmal fast cystisch erweiterte Drüsenlichtungen sowie Hämosiderinablagerungen in den Histiocyten des Stromas. Im Vordergrund standen feingeweblich die intracytoplasmatischen, nunmehr schwach gelblich gefärbten Granula in den Ring- und Längsmuskelschichten des Myometriums. Diese Pigmentkörnchen waren häufig nicht mehr auf die Cytoplasmabezirke in der Umgebung der Kerne beschränkt, sondern füllten manchmal die ganze Muskelfaser aus. Des weiteren hatten die Granula an Größe zugenommen, so daß neben kleineren Körnchen jetzt auch größere Schollen vorhanden waren. Neben den pigmenthaltigen Muskelfasern fanden sich auch zu diesem Zeitpunkt noch einzeln und in Gruppen liegende Muskelzellen, die keine oder doch nur ganz wenige Pigmentkörnchen enthielten. Eine Vacuolenbildung war bei den älteren Tieren nur noch selten vorhanden.

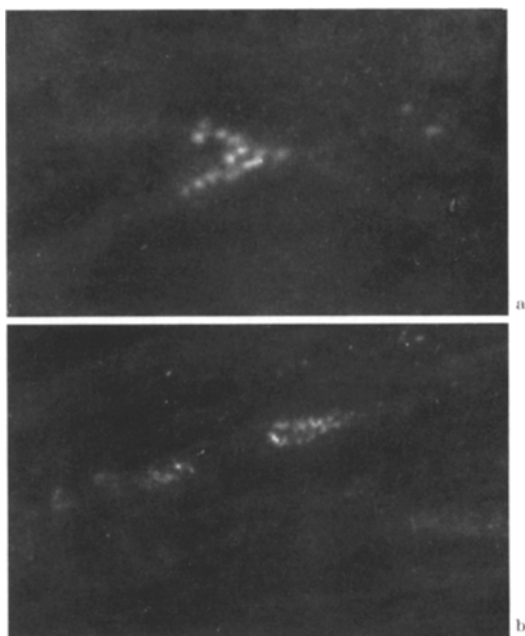


Abb. 2 a u. b. Uterusmuskulatur. Autofluoreszenz, Blaulicht. a Nach 90 Tagen Vitamin E-Mangeldiät. Vergr. 2000 \times . b Nach 120 Tagen Vitamin E-Mangeldiät. Vergr. 1000 \times . Vereinzelt, schwach weiß bis hellgelblich fluoreszierende Granula an den Kernpolen

Die Pigmente nahmen allmählich eine Reihe von kennzeichnenden färberrischen und histochemischen Eigenschaften an. Am Beispiel eines Tieres, das 281 Tage (also etwa 9 Monate) Vitamin E-frei ernährt worden war, sei das Ergebnis unserer Untersuchungen geschildert.

Die Tetrazoniumreaktion für aromatische Aminosäuren war in den Pigmentgranula unverändert sehr stark positiv, die sich bei der Anwendung dieses Verfahrens nach wie vor nicht von den anderen Cytoplasmastrukturen unterschieden. Mit Sudanschwarz wurden sie jetzt im Gefrier- und Paraffinschnittverfahren vielfach stark angefärbt, während ihre Affinität für Sudanrot und Ölrot gering war. Die Perameisensäure-Schiffreaktion für Äthylen-

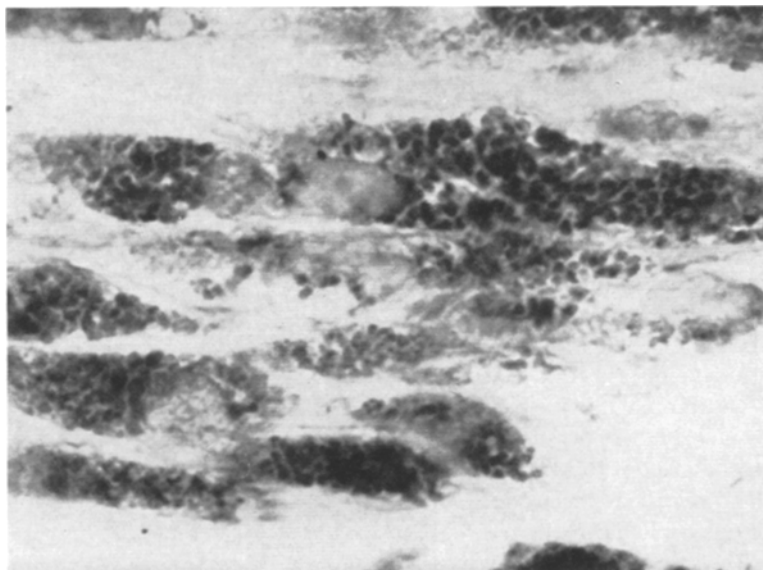


Abb. 3. Uterusmuskulatur nach 475 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Färbung mit Sudanschwarz-Kernechtrot. Vergr. 2000 \times . Die Muskelfasern sind völlig mit kleineren und größeren stark sudanophilen Pigmentkörnchen ausgefüllt

gruppen sowie die PAS-Reaktion für α -Glykolgruppen waren deutlich positiv; und auch Carbonylgruppen ließen sich mit dem Schiff'schen Reagens in geringem Umfang nachweisen. Bei der Prüfung der Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELEN nahm das Pigment einen roten Farbton an. Im Gegensatz zu den ersten Entwicklungsstadien zeigten die Granula nunmehr eine geringgradige Basophilie (Methylenblaubindung bis pH 4,6) und bei dem Test nach CHÉVRE-MONT-FRÉDÉRIC ein deutliches Reduktionsvermögen. Selbst Silbernitrat konnten sie, wenn auch in wechselnder Stärke, reduzieren.

Obwohl der Uterus zu diesem Zeitpunkt (nach 9 Monaten) mit bloßem Auge stark gelb gefärbt erschien, besaßen die Pigmentgranula im histologischen Schnitt nur eine schwache hellgelbliche Eigenfarbe. Diese scheinbare Diskrepanz zwischen dem makroskopischen und mikroskopischen Befund muß wohl darauf zurückgeführt werden, daß die histologische Untersuchung an dünnen Gewebsschnitten vorgenommen wurde, bei denen die Eigenfarbe naturgemäß nicht so deutlich ist, wie bei der Betrachtung des gesamten Organes mit unbewaffnetem Auge. Besonders eindrucksvoll war die sehr starke hellgelbe Autofluoreszenz des Pigmentes (Abb. 4).

In den folgenden Monaten nahm das Ausmaß der Pigmentierung des Myometriums weiter zu. Der Uterus zeigte schon bei der Untersuchung mit freiem Auge eine gelbbraune und schließlich nach 16 Monaten eine fast dunkelbraune Färbung. Nach wie vor wichen seine Form und Größe nicht von der Norm ab. Die histologische Untersuchung des Endometriums ergab außer etwas un-

regelmäßig erweiterten Drüsenschläuchen sowie zahlreichen Hämosiderinpartikeln in den Stromazellen keine Besonderheiten. Im Myometrium hatten die Veränderungen dagegen erheblich zugenommen: Die Muskelfasern waren in der Regel mit Pigmentkörnchen und -schollen vollständig ausgefüllt; nur an wenigen Stellen fanden sich noch pigmentarme oder pigmentfreie Zellen. Bemerkenswert waren die Kernveränderungen, wie Hyperchromatosen, Pyknosen

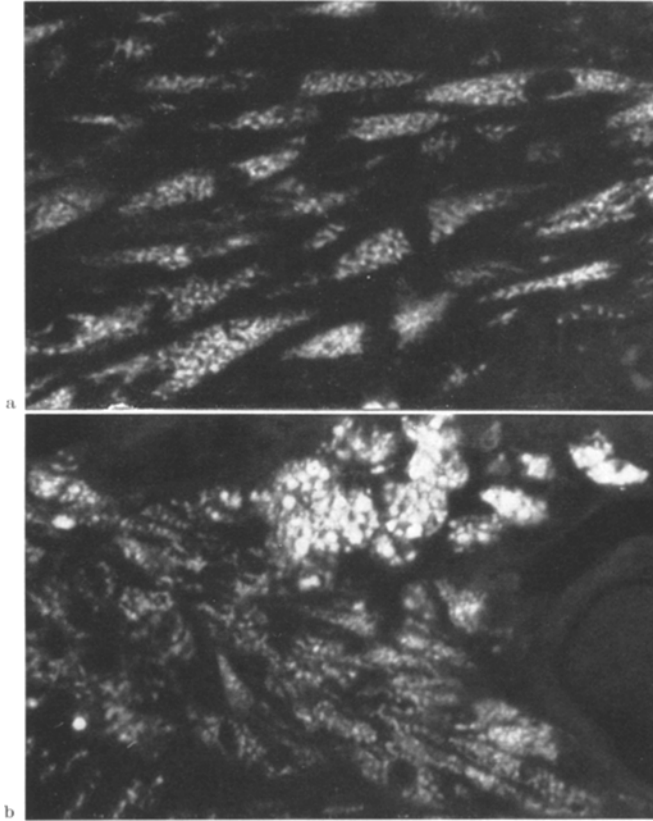


Abb. 4 a u. b. Uterusmuskulatur. Autofluoreszenz, Blaulicht. a Nach 375 Tagen Vitamin E-Mangeldiät. Vergr. 1000 \times . Muskelfasern mit stark fluoreszierenden Pigmenten ausgefüllt. b Nach 486 Tagen Vitamin E-Mangeldiät. Vergr. 1000 \times . Stark fluoreszierende Pigmentkörnchen und -schollen in den Muskelfasern. Daneben Makrophagen mit phagozytiertem Vitamin E-Mangelpigment

und Chromatolysen, auf die bereits MEESSEN und RUPPEL (1949) aufmerksam gemacht hatten. Mit zunehmender Versuchsdauer kam es ferner zum Zerfall einzelner Muskelfasern und schließlich zum Untergang größerer Muskelbezirke. Zwischen den zugrunde gehenden Muskelfasern traten Makrophagen auf, welche das nekrotische Gewebsmaterial wegräumten und sich dann besonders im perivaskulären Bindegewebe anhäuften. Ihr Zelleib enthielt zahlreiche (offenbar phagozytierte) Pigmentgranula.

Im Laufe der Alterung veränderten sich die färberischen und histochemischen Eigenschaften der Pigmentkörnchen weiterhin erheblich. Die ältesten Granula (nach einer Versuchsdauer von 16 Monaten) zeigten dann folgendes Bild:

Bei der Tetrazoniumreaktion nahmen die Pigmente unverändert eine tiefdunkelrote Farbe an. Ihre Sudanophilie hatte zugenommen, so daß sie mit Sudanschwarz am Paraffinschnitt und am Gefrierschnitt gut dargestellt werden konnten (Abb. 3). Ihre Affinität für Sudanrot und Ölrot war allerdings nach wie vor nur gering. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion fiel deutlich positiv aus. Stark wurden die Granula bei der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion und bei der Prüfung der Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN angefärbt.

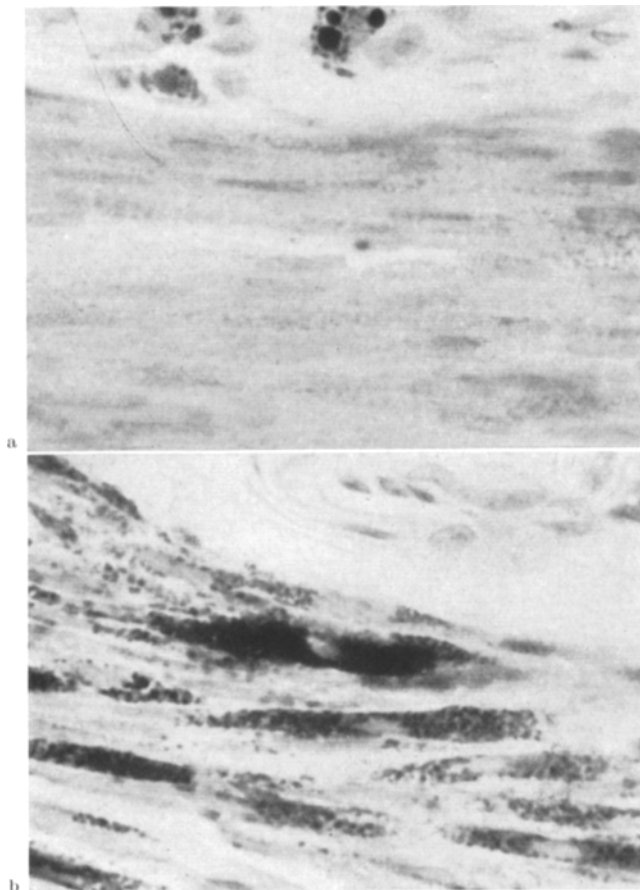


Abb. 5a u. b. Uterusmuskulatur. Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL. Vergr. 1000 \times . a Nach 234 Tagen Vitamin E-Mangeldiät. Die Pigmentkörnchen vermögen die ammoniakalische Silbernitratlösung nicht (bzw. nur in geringem Umfang) zu reduzieren. Die hämosiderinhaltigen Makrophagen am oberen Rand des Bildes werden dagegen deutlich mit Silber imprägniert. b Nach 371 Tagen Vitamin E-Mangeldiät. Starkes Reduktionsvermögen der Pigmentgranula

Auch ihre Basophilie war ausgeprägt: Sie besaßen eine starke Affinität für Toluidinblau, und ihre Methylenblauindefähigkeit ließ sich bis p_H 3,2 verfolgen. Sogar mit dem Kupferphthalocyanin-Farbstoff Astrablau gelang jetzt eine Anfärbung des Pigmentes. Besonders stark hatte das Reduktionsvermögen der Körnchen zugenommen, so daß sie bei dem Ferri-Ferrieyanidtest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC tief blau gefärbt wurden und bei der Silberimprägnation (MASSON-HAMPERL) einen braunschwarzen Farbton annahmen (Abb. 5b). Die gelbe bis gelbbraune Eigenfarbe der Pigmentgranula war jetzt auch im histologischen Schnitt gut erkennbar. Sehr ausgeprägt war ferner ihre gelbe bis gelbbraune Autofluoreszenz (vgl. Abb. 4a und b).

Nach dem Freiwerden der Pigmentkörnchen aus den Muskelfasern und ihrer Phagocytose durch Makrophagen kam es zu einer Verstärkung ihrer Sudanophilie, der Perameisensäure-Schiffreaktion, der Säurefestigkeit, der PAS-Reaktion, der Basophilie und des Reduktionsvermögens. Außerdem gaben sie im Gegensatz zu den Körnchen in den Muskelfasern manchmal eine positive Berliner Blau-Reaktion, deren Intensität allerdings in weiten Grenzen schwankte (RUPPEL 1949, LINDNER 1958). So traf man nebeneinander, und zwar oft in einem Phagocyten, völlig eisenfreie Lipopigmentgranula und Pigmentkörnchen mit einem deutlichen Eisengehalt, welche sich bei der Berliner Blau-Reaktion in einer grünen Mischfarbe darstellten. Die positive Berliner Blau-Reaktion war häufig auf die oberflächlichen Schichten des Pigmentes beschränkt. Außerdem hatte die Zahl der echten Hämosiderinkörnchen zugenommen, die manchmal zusammen mit dem phagocytierten Vitamin E-Mangelpigment in ein- und demselben Makrophagen abgelagert waren.

Die histochemische Untersuchung der *Fermentaktivität* der Uterusmuskelfasern ergab folgende Befunde.

Bei der *Nachweisreaktion für saure Phosphatase* nach GOMORI traten in den Muskelfasern schon nach kurzen Inkubationszeiten braunschwarze, gekörnte Niederschläge auf, die in Gestalt und Anordnung den Lipopigmenten entsprachen (Abb. 6a). Nach längeren Bebrühtungszeiten flossen diese Niederschläge zu homogenen Präzipitaten zusammen (Abb. 6b). Das pigmentfreie Cytoplasma und diejenigen Muskelzellen, die noch keine Pigmentkörnchen enthielten, zeigten nur eine ganz schwache Enzymaktivität (Abb. 6a, 7a u. b und 8). Grundsätzlich das gleiche Ergebnis ließ sich bei der Anwendung der Azomethode erzielen. Diese Verteilung der sauren Phosphataseaktivität trat in dem mit Aceton fixierten und in Paraffin eingebetteten Material ebenso in Erscheinung wie in den nativen oder formalin-fixierten Gefrierschnitten. Nur die Enzymaktivität des pigmentfreien Cytoplasmas war in den Gefrierschnitten etwas stärker als nach der Acetonfixierung und Paraffineinbettung; sie blieb jedoch stets hinter der Fermentaktivität der Pigmentgranula zurück (Abb. 7a und b).

In besonderen Versuchen prüften wir die Frage, ob die Stellen der Phosphataseaktivität mit den in den Muskelfasern gelegenen Pigmenten übereinstimmen. Genau wie bei unseren früheren Versuchen gingen wir dabei so vor, daß an ein- und demselben Schnitt nacheinander die Fermentaktivität und das Pigment dargestellt und photographiert wurden (GEDIGK und BONTKE 1956): Zunächst fertigten wir von den Schnitten, an denen die Reaktion für saure Phosphatase mit der Bleiphosphatmethode nach GOMORI durchgeführt worden war, Photographien an. Dann stellten wir die Schnitte für 10 min in 20%ige Salzsäure, um das Endprodukt des Enzymnachweises, das Bleisulfid, zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate gewässert und zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit Eukitt eingedeckt. In anderen Fällen führten wir nach dem Fermentnachweis in entsprechender Weise eine Färbung mit Sudanschwarz durch. Das Ergebnis wurde dann erneut photographiert (Abb. 8a und b).

Vergleicht man nun das Bild, das sich bei der Phosphatasereaktion ergibt, mit der Photographie eines Fluoreszenzschnittes oder einer Sudanschwarzfärbung des gleichen Präparates, so erkennt man, daß die Enzymaktivität hauptsächlich im Bereich der fluoreszierenden Pigmente auftritt. Dagegen zeigen diejenigen Muskelfasern, in denen noch keine Pigmentgranula entstanden waren, keine oder nur eine geringfügige Aktivität von saurer Phosphatase.

In ganz entsprechender Weise verhielten sich die Muskelzellen auch bei den *Nachweisreaktionen für unspezifische Esterase*: Die Pigmentkörnchen zeigten fast immer (jedoch nicht regelmäßig!) eine deutliche Esteraseaktivität, während das übrige Cytoplasma nur eine schwache, mehr diffuse Fermentreaktion besaß. Dieses Ergebnis war zwar weitgehend unabhängig von der Vorbehandlung des Gewebes und dem angewandten histochemischen Verfahren (Bromindoxyl- bzw. α -Naphthylacetat oder Naphthol-AS-Acetate-Methode) (Abb. 9a und b); es fiel jedoch auf, daß bei der Verwendung von Bromindoxylacetat als Substrat die Zahl

der esterasenegativen Granula besonders groß war, wenngleich die überwiegende Zahl der Körnchen auch bei diesem Verfahren eine deutliche Enzymreaktion aufwies.

5-Nucleotidase war in der gesamten Uterusmuskulatur vorhanden. Diese Fermentreaktion trat an den Pigmentkörnchen und im Bereich des übrigen Cytoplasmas gleich stark in Erscheinung.

Das Myometrium besaß eine starke Aktivität von β -*Glucuronidase*. Das Verhalten der Pigmentkörnchen war wegen der diffusen Reaktion innerhalb der Muskelfasern meistens nicht

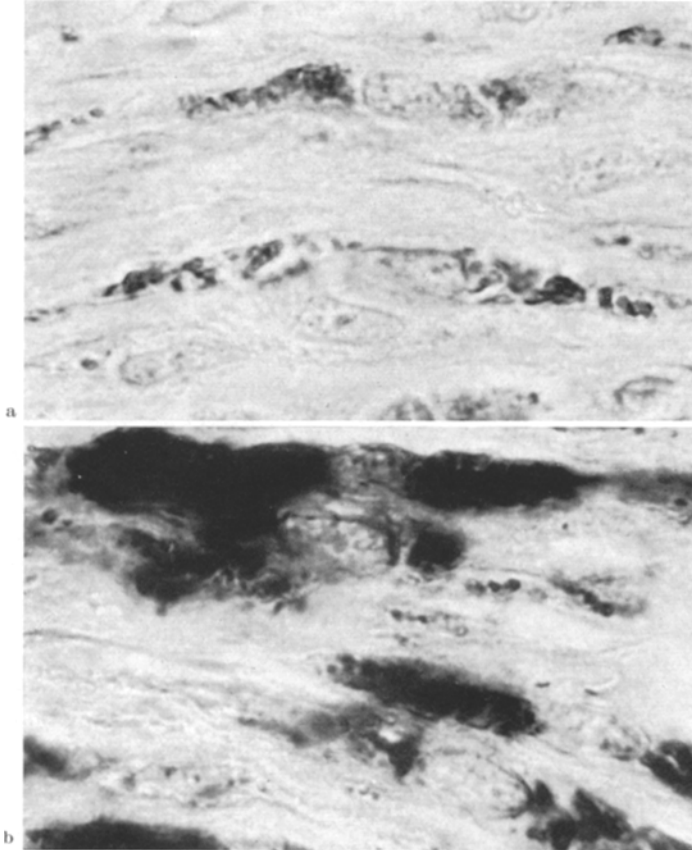


Abb. 6a u. b. Uterusmuskulatur nach 239 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Vergr. 1768 \times . Saure Phosphatase (GOMORI). Hämatoxylin. a Inkubationszeit 40 min. Ausgeprägte Phosphataseaktivität der pigmenthaltigen Cytoplasmabezirke. b Inkubationszeit 3 Std. Zusammenfließen des Bleiphosphatpräzipitats und beginnende Diffusion in die Umgebung. Noch keine „Kernphosphatase“

einwandfrei erkennbar. Gelegentlich traf man jedoch neben den tief dunkelblauen, die Fermentaktivität anzeigenden Präzipitaten Glucuronidase-negative, nur dank ihrer Eigenfarbe sichtbare Pigmentkörnchen.

Sehr ausgeprägt war die *Dehydrogenaseaktivität* der Uterusmuskulatur, welche fast diffus in Erscheinung trat. An den Kernpolen fand sich häufig eine besonders starke Aktivität dieses Enzyms. Trotzdem ließen sich keine sicheren Beziehungen zwischen den Pigmentablagerungen und den Stellen der Fermentreaktion nachweisen. Manchmal war das Pigment eindeutig dehydrogenasenegativ.

Alkalische Phosphatase, Lipase, Phosphoamidase und Aminopeptidase waren in den Uterusmuskelfasern mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachweisbar (Abb. 10).

Die Uterusmuskulatur der *Kontrolltiere* zeigte bei der Nachweisreaktion für saure Phosphatase nach GOMORI und bei der Azomethode sowohl am Paraffinschnitt als auch am nativen Material nur eine ganz schwache diffuse Enzymaktivität. Unspezifische Esterase trat in den Nativ- und in den Paraffinschnitten gleichfalls in Form einer schwachen diffusen Reaktion in Erscheinung. Bei den anderen histochemischen Enzymnachweisen (alkalische Phosphatase, 5-Nucleotidase, Phosphoamidase, Aminopeptidase, β -Glucuronidase, Dehydrogenase) ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Tieren, welche eine Vitamin E-Mangelkost erhielten und den Kontrolltieren.

II. In besonderen Experimenten untersuchten wir histochemisch das *Lipofuscinpigment in einer Reihe von menschlichen Organen*, wie Herz, Leber, Ganglien, Nebenniere, Hoden usw. Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich, daß die Eigenschaften des Lipofuscins deutlichen, offenbar altersbedingten Schwankungen unterworfen sind. Da die an den Lipofuscinen verschiedener Gewebe erhobenen Befunde nicht wesentlich voneinander abwichen, wurden sie zusammengefaßt und in der Tabelle I dem Vitamin E-Mangelpigment und dem Ceroid gegenübergestellt.

Um einen Vergleich zwischen dem enzymatischen Verhalten des Vitamin E-

Mangelpigmentes und den im menschlichen Organismus auftretenden Lipopigmenten zu ermöglichen, haben wir mit neueren Methoden, und zwar vor allem durch die Herstellung nativer Gefrierschnitte im Kryostaten, die bereits früher vorgenommenen Untersuchungen am Lipofuscin und Ceroid des Menschen (GEDIGK und BONTKE 1956) wiederholt und überprüft. Dabei konnten wir die seinerzeit erhobenen Befunde in allen wesentlichen Punkten bestätigen:

Das Lipofuscin zeigte in den untersuchten Organen (Herzmuskel, Leber, Nebenniere, Hoden und sympathische Ganglien) — auch bei der Anwendung verschiedener Methoden —

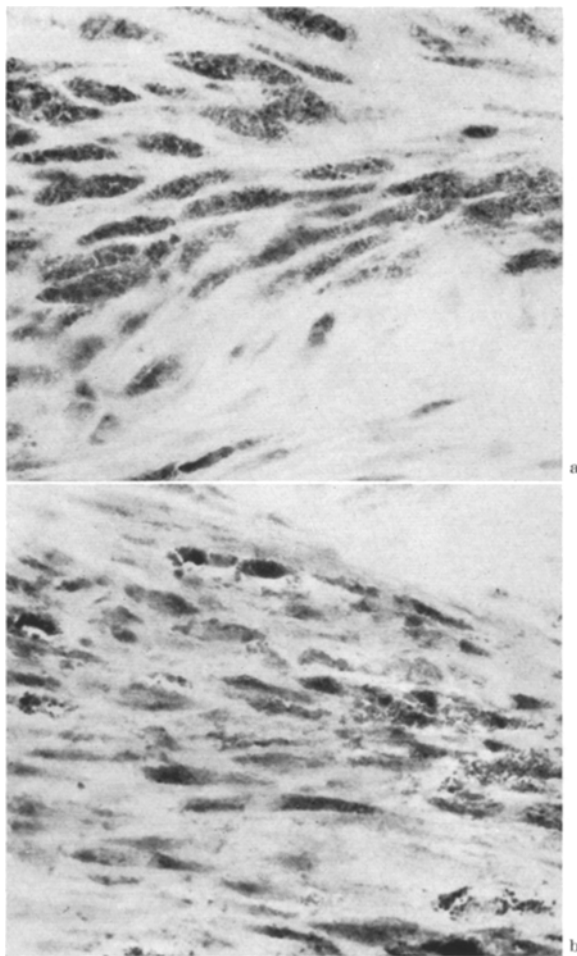


Abb. 7a u. b. Uterusmuskulatur nach 475 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Vergr. 544 \times . Native Gefrierschnitte am Kryostaten. Anschließend 15 min Fixierung in Formalin bei $+4^{\circ}$ C. Saure Phosphatasereaktion. a Gomori-Methode. Inkubationszeit 30 min. Hämatoxylin. b Azomethode. Inkubationszeit 100 min. Hämatoxylin. Starke Aktivität von saurer Phosphatase im Bereich der Pigmentkörnchen

eine deutliche Reaktion der *sauren Phosphatase* und *unspezifischen Esterase*. Zwischen den Gefrierschnitten und dem acetonfixierten, in Paraffin eingebetteten Material fanden sich keine nennenswerten Unterschiede. Nur das die Pigmentkörnchen umgebende, sowie das weiter entfernt liegende Cytoplasma besaß in den nativen Gefrierschnitten eine diffuse En-

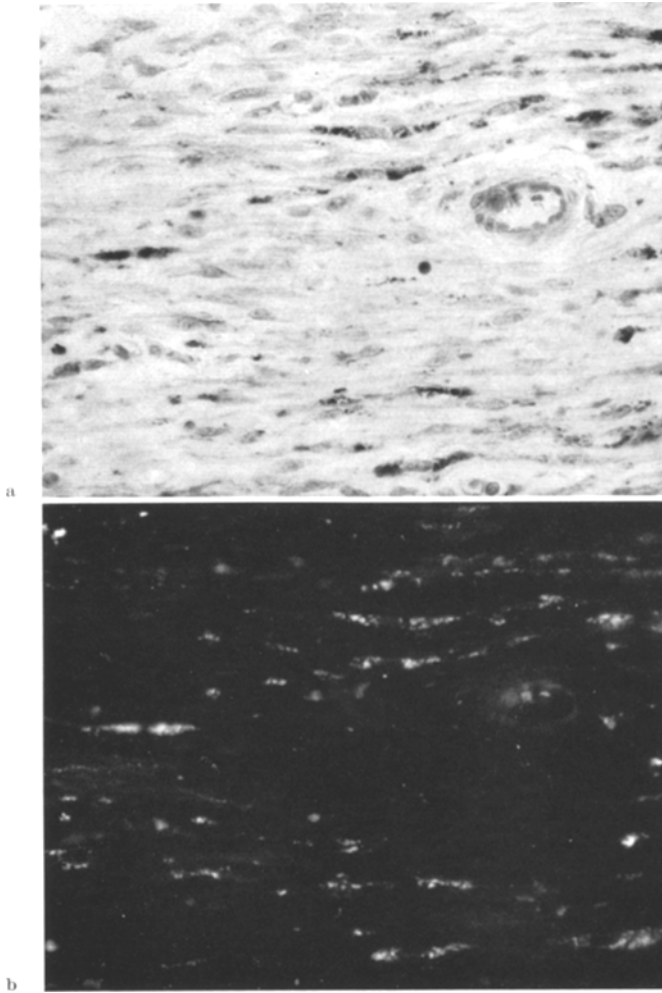


Abb. 8a u. b. Uterusmuskulatur nach 239 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Vergr. 400 \times . a Saure Phosphatase (GOMORI), Inkubationszeit 40 min, Hämatoxylin. b Der gleiche Schnitt wie a nach Entfernung des Bleisulfidniederschlags mit Salzsäure. Autofluoreszenzaufnahme zur Darstellung der Pigmentgranula. Der Vergleich der beiden Bilder zeigt eine weitgehende morphologische Übereinstimmung von Phosphataseaktivität und Pigmentkörnchen

zymaktivität, die wir in dem acetonfixierten und eingebetteten Gewebe entweder gar nicht oder erst bei längeren Inkubationszeiten feststellen konnten.

Genau wie bei unseren früheren Experimenten (GEDIGK und BONTKE 1956) fanden wir in allen Organen stets auch Pigmentkörnchen, in denen sich histochemisch keine unspezifische Esterase nachweisen ließ. Besonders häufig fiel die Esterasereaktion bei der Verwendung von 5-Bromindoxylacetat als Substrat negativ aus, obwohl auch unter diesen Versuchsbedingungen die Mehrzahl der Lipofuscingranula eine deutliche Esteraseaktivität aufwies.

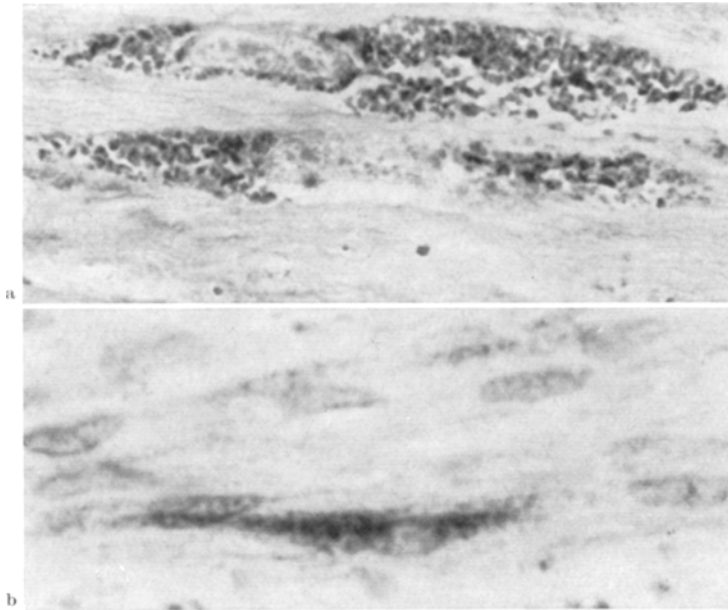


Abb. 9a u. b. Uterusmuskulatur nach 239 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Unspezifische Esterase. a α -Naphthylacetatmethode. Inkubation 1 Std. Hämatoxylin. Vergr. 1560 \times . b Bromindoxylacetat-Methode. Inkubationszeit 2 Std. Kernechtrot. Vergr. 1360 \times . Ausgeprägte Esteraseaktivität im Bereich der Pigmentgranula

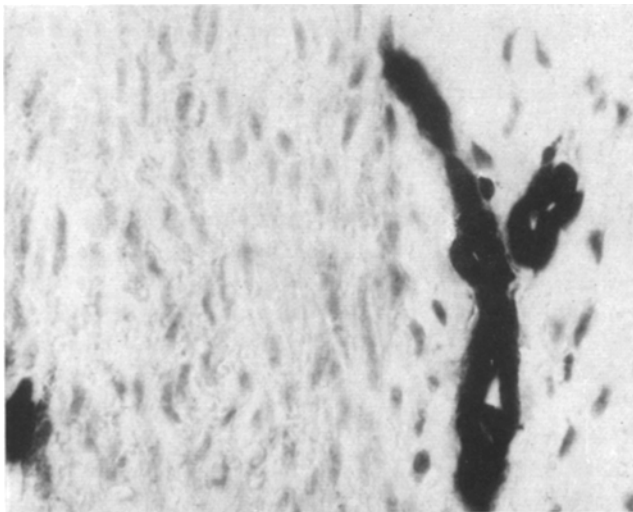


Abb. 10. Uterusmuskulatur nach 475 Tagen Vitamin E-Mangelkost. Alkalische Phosphatase (GOMORI). Inkubationszeit 5 Std. Vergr. 624 \times . Starke Phosphatasereaktion der Capillarendothelien. Keine Enzymaktivität im Myometrium. Beginnende Diffusion wegen der langen Inkubationszeit

Andere Fermente konnten wir auch jetzt in den Lipofuscinkörnchen menschlicher Organe mit histochemischen Methoden nicht nachweisen (s. Tabelle 1). Zur Sicherung der beschriebenen Befunde haben wir die oben angegebenen *Kontrollversuche* durchgeführt (s. S. 432).

Diskussion

1. Welche Hinweise ergeben sich aus unseren Befunden auf die chemische Zusammensetzung des voll ausgeprägten Vitamin E-Mangelpigmentes und des Lipofuscins? (vgl. Tabelle 1). Da die Ergebnisse der durchgeführten histochemischen Reaktionen beim Vitamin E-Mangelpigment und beim Lipofuscin verschiedener Organe in allen wesentlichen Punkten übereinstimmen, können die an diesen Pigmenten erhobenen Befunde gemeinsam diskutiert werden:

Besonders eindrucksvoll fallen in den Pigmentkörnchen die Reaktionen für *Aminosäuren und Proteine* aus. So wird durch die Tetrazoniumreaktion, welche das Vorkommen von aromatischen Aminosäuren anzeigt, stets eine sehr starke Anfärbung der Granula erzielt. Auch andere histochemische Eiweißreaktionen, wie der Ninhydrin-Schiffstest, die Argininreaktion (SAKAGUCHI), die Millonsche Reaktion für Tyrosin, sowie der Sulphydrylnachweis nach BARNETT-SELIGMAN geben positive Resultate. Diese Befunde stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen von GYÖRGY und GOLDBLATT (1942), ENDICOTT und LILLIE (1944), MOORE und WANG (1947), sowie GEDIGK und FISCHER (1958), welche am Vitamin E-Mangelpigment des Uterus und im Ceroid Proteine nachgewiesen haben. Auch das Lipofuscin enthält, wie wir seit langem wissen, Eiweißstoffe (LUBARSCH 1902, 1922, BRAHN und SCHMIDTMANN 1920, 1922, KUTSCHERA-AICHBERGEN 1922, sowie HEIDENREICH und SIEBERT 1955). Eine weitere Charakterisierung der Eiweißbausteine dieser Pigmente ist mit histochemischen Methoden vorerst nicht möglich. Bei einem Teil der Proteine dürfte es sich aber wohl um Ferment-eiweiß handeln (s. S. 447—450).

Wie zu erwarten, ließen sich als weiterer Baustein schwer lösliche bzw. unlösliche *Lipide* nachweisen. Diese Fettkomponente war durch ihren Gehalt an Äthylengruppen gekennzeichnet, so daß angenommen werden muß, daß in ihr reichlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren vorkommen. Genau wie beim Ceroid fanden wir weiterhin Carbonylgruppen (Schiffsche Reaktion), α -Glykolgruppen (PAS-Reaktion) und Carboxylgruppen (Basophilie), die bekanntlich bei der vorsichtigen Oxydation ungesättigter Lipide entstehen können. Auch die Säurefestigkeit (Färbung nach ZIEHL-NEELEN) und das Reduktionsvermögen (Test nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC) dürften an die Lipidkomponente gebunden sein. Bemerkenswert war der positive Ausfall der Bakerschen Reaktion für Phospholipide. Da jedoch die für die Kontrolluntersuchung erforderliche Pyridinextraktion wegen der Unlöslichkeit des Fettbausteines nicht durchführbar war, möchten wir diese Anfärbung der Pigmentgranula mit großer Vorsicht bewerten. Immerhin macht es dieser Befund doch sehr wahrscheinlich, daß den nachgewiesenen ungesättigten Fettstoffen — wenigstens zum Teil — Phospholipide zugrunde liegen. Auch die deutliche Anfärbung mit Luxolfastblue sowie die im Verhältnis zu der starken Anfärbbarkeit mit Sudanschwarz nur geringe Affinität für Sudanrot und Ölrot sprechen für das Vorkommen von Phospholipiden (PEARSE 1953). Mit histochemischen Methoden wird sich diese Frage allerdings vorerst nicht sicher entscheiden lassen, da die derzeitigen Verfahren zur genaueren Abgrenzung bestimmter Lipide im histologischen Schnitt noch nicht zuverlässig genug sind. Wir müssen uns daher auf die Feststellung beschränken, daß im Vitamin E-Mangelpigment und Lipofuscin außer Proteinen sicher schwer lösliche, hoch-ungesättigte und teilweise oxydierte Lipide enthalten sind, und daß es sich

hierbei möglicherweise um Phosphatide handelt. Cholesterin bzw. Cholesterinester waren mit unseren Methoden nicht nachweisbar.

In einer früheren Mitteilung hatten wir die Bedeutung der *Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion* des Ceroids diskutiert (GEDIGK und FISCHER 1958), deren positiver Ausfall auch beim Vitamin E-Mangelpigment und Lipofuscin seit langem bekannt ist. Durch histochemische Untersuchungen ließ sich zeigen, daß die Reaktionsfähigkeit des Pigmentes mit Perjodsäure an benachbarte Hydroxylgruppen gebunden ist. Für die weitere Bewertung der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion ergeben sich beim Vitamin E-Mangelpigment und beim Lipofuscin jedoch die gleichen Schwierigkeiten wie beim Ceroid: Grundsätzlich könnten die mit der PAS-Reaktion nachgewiesenen α -Glykolgruppen einem Kohlenhydrat-(oder Polysaccharid-)baustein angehören, wie es von verschiedenen Autoren vermutet worden ist (ZOLLINGER 1953, LEBLOND u. Mitarb. 1957). Dieser Auffassung steht aber entgegen, daß auch bei der vorsichtigen Oxydation ungesättigter Fettsäuren an den Doppelbindungen benachbarte Hydroxylgruppen entstehen können, die sich bei der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion genauso verhalten wie die α -Glykolgruppen in Polysacchariden. Somit darf eine positive PAS-Reaktion nur dann als Kohlenhydratnachweis gewertet werden, wenn die betreffende Struktur keine ungesättigten Fettsäuren enthält, bzw. wenn sich diese Lipide vor der Perjodsäureoxydation aus dem Schnitt extrahieren lassen (WOLMAN 1950, 1956, GEDIGK 1952, PEARSE 1953). Das ist jedoch weder beim Ceroid noch beim ausgeprägten Vitamin E-Mangelpigment oder beim Lipofuscin möglich. Da wir für das Vorkommen von Kohlenhydraten in den genannten Lipopigmenten — außer der positiven PAS-Reaktion — keine weiteren Anhaltspunkte besitzen, und zudem die Rolle der ungesättigten Fettsäuren und der an ihnen ablaufenden Oxydationsvorgänge für die Entstehung lipogener Pigmente unumstritten ist und durch mehrere voneinander unabhängige Methoden nachgewiesen werden kann, gelangen wir auch bei diesen Experimenten zu dem Schluß, daß die positive PAS-Reaktion an den Fettbaustein des Lipopigmentes gebunden ist. Diese Auffassung wird durch die Beobachtung gestützt, daß die jüngsten Pigmentkörnchen, welche nur sehr wenig Fettstoffe enthalten, auch nur ganz schwach PAS-positiv sind.

Für das Vorhandensein von *Nucleinsäuren* ergaben sich histochemisch keine Anhaltspunkte.

Genau wie im Lipofuscin menschlicher Organe (GEDIGK und BONTKE 1956) ließen sich in dem Vitamin E-Mangelpigment des Rattenuterus *hydrolytische Enzyme*, und zwar *saure Phosphatase* und *unspezifische Esterase* nachweisen. Die Aktivität dieser Fermente war im Bereich der Pigmentkörnchen und -schollen sehr ausgeprägt und hinsichtlich ihrer Intensität mit der histochemisch erfaßbaren Phosphatase- bzw. Esteraseaktivität parenchymatöser Organe durchaus vergleichbar. Das übrige die Pigmentgranula umgebende und auch das weiter entfernt liegende Cytoplasma der Muskelfasern besaß demgegenüber histochemisch nur eine geringfügige Aktivität von saurer Phosphatase und nur eine schwache bis höchstens mittelgradige Esteraseaktivität (Abb. 6—9).

Alkalische Phosphatase (Abb. 10), Phosphoamidase, Aminopeptidase und Lipasen konnten wir mit histochemischen Methoden in dem Vitamin E-Mangelpigment nicht nachweisen. Nicht eindeutig zu klären war das Verhalten der Pigmentkörnchen bei den Nachweisreaktionen für β -Glucuronidase und Dehydrogenasen,

Tabelle I. Übersicht über die histochemischen Eigenschaften und das färberische Verhalten des Ceroids, des Lipofuscins und des Vitamin E-Mangelpigmentes

	Ceroid* (Mensch und Ratte)	Lipofuscin** (Mensch)	Vitamin-E-Mangel-pigment*** (Ratte)
Eigenfarbe	gelblich	gelbbraun	hellgelb bis gelbbraun
Eigenfluorescenz (Blaulicht)	++	+/+++	+++
Färbung mit Sudan III/IV (am Paraffinschnitt)	+++	(+)	(+)
Färbung mit Sudan III/IV nach Extraktion mit einer siedenden Chloroform-Methanolmischung	+++ (unverändert)	(+) (unverändert)	(+) (unverändert)
Färbung mit Sudanswarz (am Paraffinschnitt)	+++	++	+/++
Perameisensäure-Schiffreaktion	++	+/++	+
Perameisensäure-Schiffreaktion nach Bromierung	0	0	0
Schiffreaktion	(+)	0	(+)
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN	+++	++	+/++
Bakersche Reaktion für Phospholipide	0	+/++	++
Färbung mit Luxolfastblue	(+)	+	+
Nachweis von Cholesterin	0	0	0
PAS-Reaktion	+++	++	++
PAS-Reaktion nach Acetylierung	0	0	0
PAS-Reaktion nach Acetylierung und Verseifung	+++	++	++
PAS-Reaktion nach Diastase	+++	++	++
PAS-Reaktion nach Hyaluronidase	+++	++	++
Färbung mit Toluidinblau	++	++/++++	+/++
Färbung mit Toluidinblau nach Methylierung	0	0	0
Färbung mit Methylgrün	++	++	++
Metachromasie (Toluidinblau)	0	0	0
Färbung mit Astrablau	0	0	(+)/+
Methylenblaubindung bis p_H	3,5—3,9	3,9	4,6—3,6
Eisenbindung (Hale)	(+)	+	+/++
Berliner Blau-Reaktion	0	0	0
Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC	+	++	+/++
Reduktionstest nach KCN	++	+++	+++
Reduktionstest nach $HgCl_2$	(+)	(±)	(+)
Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL	0/+	++/++++	++
Tetrazoniumreaktion	++	+++	+++
Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung	0	0	0
Millonsche Reaktion	(+)	(+)?	(+)
Argininreaktion	(+)	(+)?	+
Ninhydrin-Schiffreaktion	(+)	(+)	+

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	Ceroid* (Mensch und Ratte)	Lipofuscin** (Mensch)	Vitamin-E-Mangel-pigment*** (Ratte)
Sulphydrylnachweis nach BARNETT und SELIGMAN	(+)	(+)	(+)
Färbung mit Fastgreen	+	(+)	(+)
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	gelbbraun bis braunrot	braun bis braunrot	braun bis braunrot
van Gieson-Färbung	gelbbraun	graubraun	graubraun
Bindegewebsfärbung nach MASSON	dunkelviolet	dunkelviolet	dunkelviolet

Fermentnachweise

Saure Phosphatase Bleiphosphatmethode (GOMORI) Azofarbstoffmethode	+++	+++	+++
Phosphoamidase (MEYER u. WEINMANN)	+++?	0	0
Alkalische Phosphatase Calcium-Kobaltmethode (GOMORI) Azofarbstoffmethode	0	0	0
Unspezifische Esterase α -Naphthylacetat Naphthol-AS-Acetat 5-Bromindoxylacetat	(+)	++	++
Lipase (GOMORI, PEARSE)	(+)?	0	0
Aminopeptidase (BURSTONE u. FOLK)	++?	0	0
β -Glucuronidase (BURTON u. PEARSE)	0/+?	0/+?	0/+?
Dehydrogenase Neotetrazolium Nitro-Bluetetrazolium	0/+?	0/+?	0/+?

* Die Angaben gelten für ein etwa 46—80 Tage altes Ceroid, das bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose im Mesenterium von Ratten entstanden ist.

** Das Lipofuscin wurde in menschlichen Organen, und zwar im Herzmuskel, in der Leber, im Hoden, in der Nebenniere und im sympathischen Ganglion untersucht. Da die Ergebnisse in den verschiedenen Organen nicht wesentlich voneinander abwichen, wurden sie zu einem Durchschnittswert zusammengezogen.

*** Diese Angaben beziehen sich auf ein Entwicklungsstadium des Vitamin E-Mangel-pigmentes, das etwa dem 281. bis 371. Tag entspricht.

Reaktion: +++ sehr stark, ++ stark, + deutlich positiv, (+) inkonstant oder schwach, 0 negativ. Bei den mit einem Fragezeichen versehenen Ergebnissen der Fermentnachweise war es wegen der schlechten cytologischen Lokalisation der Reaktionsprodukte nicht möglich, die Beziehungen zwischen den Stellen der Fermentaktivität und den Pigmentkörnchen eindeutig zu bestimmen, obwohl die pigmenthaltigen Zellen das betreffende Enzym erhielten (s. S. 447—448).

obwohl die glatten Muskelfasern eine ausgeprägte Aktivität dieser Enzyme aufwiesen. Die Lokalisation der Fermentaktivität ist bei diesen Verfahren aber nicht exakt genug, um zu der Frage Stellung nehmen zu können, ob das Pigment selbst diese Fermente enthält oder nur das umgebende Cytoplasma. Die Reaktion für 5-Nucleotidase ergab eine diffuse Anfärbung der Muskelfasern einschließlich der in ihnen gelegenen Pigmente. Auch diese Methode ist unseres

Erachtens noch nicht für eine cytologische Lokalisation der Enzymaktivität geeignet, so daß die morphologischen Beziehungen zwischen der 5-Nucleotidase und den Pigmentkörnchen vorerst offen bleiben müssen.

Bei den erwähnten negativen Befunden ist in Rechnung zu stellen, daß eine fehlende Fermentreaktion nicht zu bedeuten braucht, daß diese Cytoplasmastrukturen das betreffende Enzym überhaupt nicht enthalten. So ist es durchaus möglich, daß die Aktivität dieser Fermente nur unter der Empfindlichkeitsgrenze der histochemischen Nachweismethode liegt.

Das Ergebnis der Reaktionen für saure Phosphatase und unspezifische Esterase versuchten wir durch *Kontrollen* zu sichern: Zunächst fanden wir, daß diese Fermentreaktionen nach dem Kochen der Schnitte oder bei dem Weglassen des Substrates in der Inkubationslösung stets negativ ausfielen. Auch durch die Vorbehandlung der Präparate mit spezifischen Inhibitoren oder durch den Zusatz von Hemmstoffen zur Inkubationslösung ließ sich die Fermentaktivität beeinflussen. Aus diesen Beobachtungen ergab sich der Schluß, daß der dargestellten Aktivität von saurer Phosphatase und unspezifischer Esterase auch tatsächlich *echte Fermentreaktionen* zugrunde lagen.

Eine *Diffusion und Adsorption der beiden hydrolytischen Enzyme* während der Vorbehandlung des Gewebes oder der Durchführung der histochemischen Reaktionen ließ sich durch die Tatsache ausschließen, daß das Ergebnis des Phosphatase- bzw. Esterasenachweises von der Art der Fixierung weitgehend unabhängig war. Beide Fermentreaktionen des Pigmentes waren in den unfixierten (nativen) Gewebsschnitten ebenso positiv wie nach der Fixierung im eiskalten Formalin oder bei der Verwendung von acetonfixierten Paraffinschnitten.

Ferner zeigte es sich beim partiellen Bedecken eines inaktivierten mit einem voll aktiven Gewebsschnitt, daß bei den üblichen Inkubationszeiten nicht eine Diffusion des Enzymes oder der Reaktionsprodukte der Nachweisverfahren, d. h. ein positiver Reaktionsausfall in dem inaktiven Schnitt erfolgte. Wenn durch ungewöhnlich lange Bebrütungszeiten (12—24 Std) schließlich doch eine Anfärbung des gekochten (inaktiven) Schnittes in der Umgebung des ihn bedeckenden aktiven Präparates eintrat, so färbten sich z. B. bei der Phosphatasereaktion zunächst die Zellkerne. Erst später kam es zu einer Anfärbung des pigmentfreien Cytoplasmas und der Pigmentkörnchen. Das gleiche Ergebnis hatten Versuche, bei denen wir einen aktiven und einen inaktiven Gewebsschnitt im Deckgläschenabstand zusammen in die Reaktionslösung brachten.

Daß die Pigmentgranula keine selektive Affinität für die verwendeten Substrate oder für die intermediär bzw. terminal auftretenden Reaktionsprodukte der Fermentnachweise besaßen, konnte durch die *vergleichende Anwendung verschiedener Methoden erhärtet werden*. So ließ sich z. B. die Aktivität der sauren Phosphatase sowohl mit Natrium- β -Glycerophosphat als Substrat (GOMORI) als auch mit Natrium- α -Naphthylphosphat (Azomethode) nachweisen. In entsprechender Weise konnte der Esterasegehalt mit den Substraten Naphthol-AS-Acetat, α -Naphthylacetat und Bromindoxylacetat demonstriert werden. Obwohl diese Methoden auf verschiedenen Grundlagen beruhen und die bei ihnen benutzten Reagenzien ebenso wie die auftretenden Zwischen- und Endprodukte der Nachweisreaktionen chemisch sehr verschieden sind, erzielten wir

Tabelle 2. *Änderung der histochemischen Eigenschaften des Vitamin B₁₂-Mangelpigmentes im Laufe seiner Alterung*

	108 Tg.	120 Tg.	148 Tg.	191 Tg.	239 Tg.	281 Tg.	335 Tg.	371 Tg.	482 Tg.
Eigenfarbe (im histologischen Schnitt)	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ganzschwach hellgelb	ganzschwach hellgelb	schwach hellgelb	hellgelb	hellgelb bis gelbbraun	gelbbraun
Autofluoreszenz (Blaulicht)	+	+	+	+/++	++	++	++	++	++
Färbung mit Sudan III/IV .	0	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)
Färbung mit Sudanschwarz	(+)	(+)	(+)	+	+	+/++	++	++	++
Perameisensäure-Schiffreaktion	0	0	0	(+)	(+)	+	+	+	+
Periodsäure-Schiffreaktion .	0	(+)	(+)	+	++	++	++	++	++
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN	0	0	0	(+)	(+)	+	+	+	+
Methylenblaubindung bis pH	6,1	6,1	6,1	4,6	4,6	4,6	4,1	3,6	3,2
Färbung mit Toluidinblau .	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Reduktionstest nach CHÉVREMENT-FRÉDÉRIC .	0	0	(+)	(+)	(+)	+	+	+/++	++
Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL . . .	0	0	0	(+)	(+)	+	++	++	++
Tetrazoniumreaktion . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

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

stets im wesentlichen die gleichen Resultate. Eine spezifische Affinität des Pigmentes für die genannten Substanzen kann daher mit weitgehender Sicherheit ausgeschlossen werden.

Schließlich sei daran erinnert, daß HEIDENREICH und SIEBERT (1955) bei der Fraktionierung von Homogenaten menschlicher Herzen im Lipofuscin Proteasen und Esterasen gefunden haben. Auch diese mit völlig anderen Methoden gewonnenen Resultate sprechen für einen Enzymgehalt lipogener Pigmente.

2. *Wie verändert sich das Vitamin E-Mangelpigment im Laufe der Alterung?* (vgl. Tabelle 2.) Zunächst kommt es außer der Vermehrung auch zu einer Vergrößerung der einzelnen Pigmentkörnchen, die schließlich einen Durchmesser von etwa $1-2\mu$ erlangen können. Weiterhin erfolgt mit zunehmender Versuchsdauer auch eine allmähliche Änderung ihrer färberischen und histochemischen Eigenschaften:

Bei den Nachweisreaktionen für *Aminosäuren und Proteine* zeigten die verschiedenen Altersstufen des Pigmentes allerdings ein einheitliches Verhalten. So blieben die Tetrazoniumreaktion, die Argininreaktion und der Ninhydrin-Schiffstest im Laufe der Alterung stets unverändert positiv. Sollten Schwankungen in der Quantität und Qualität des Eiweißbausteines des Vitamin E-Mangelpigmentes auftreten, so sind sie so gering, daß sie mit histochemischen Methoden nicht erfaßt werden.

Demgegenüber ändern sich die Menge und Zusammensetzung des *Lipidbausteines* sehr erheblich: In den ersten Entwicklungsstadien des Pigmentes ist seine *Sudanophilie* außerordentlich gering. Es besitzt nur für Sudanschwarz eine ganz geringe Affinität und kann mit Sudanrot oder Ölot weder am Gefrierschnitt noch am Paraffinschnitt angefärbt werden (Abb. 1a und b). Nach 191 Tagen sind die Granula einwandfrei sudanophil; aber erst nach 281 Tagen gelingt mit Sudanschwarz eine starke Anfärbung (Abb. 3). Synchron mit der Zunahme der Sudanophilie erfolgt eine Vermehrung der reaktionsfähigen, mit der Perameisensäure Schiffreaktion darstellbaren Äthylengruppen.

Bei der Prüfung der *Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN* werden die Pigmentkörnchen anfangs nicht angefärbt. Im Laufe der nächsten Monate erfolgt dann eine Verstärkung dieser Farbreaktion, die nach etwa 371 Tagen ihr Intensitätsmaximum erreicht. Des weiteren läßt sich eine Vermehrung der Oxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren feststellen: Glykolgruppen können mit der *Periodsäure-Leukofuchsinreaktion* nach 3—4 Monaten nur in geringem Umfang nachgewiesen werden. Die PAS-Reaktion nimmt dann an Intensität zu und ist nach 482 Tagen sehr stark positiv.

Die Pigmentgranula sind anfangs nicht *basophil* und verlieren bereits bei p_H 6,1 die Fähigkeit Methylenblau zu binden. Auch mit Toluidinblau werden sie zu diesem Zeitpunkt nur sehr schwach angefärbt. In den folgenden Monaten kommt es zu einer Verstärkung der Methylenblauindefähigkeit, die nach 482 Versuchstagen bis p_H 3,2 verfolgt werden kann. Desgleichen zeigen die alten Pigmentgranula eine starke Affinität für Toluidinblau.

Die jüngsten Pigmentkörnchen weisen weder bei dem Ferrichlorid-Ferricyanidtest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC noch bei der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL ein *Reduktionsvermögen* auf. Im Laufe der Alterung erlangen die Granula die Fähigkeit, Ferricyanidionen und Silbernitrat zu reduzieren. Die

Zunahme der Reduktionsfähigkeit ist am Beispiel der Silberimprägnation in Abb. 5 wiedergegeben.

Bemerkenswert ist die Verstärkung der *Eigenfarbe*, die mit unbewaffnetem Auge und bei der mikroskopischen Untersuchung leicht erkennbar ist. So nehmen die zunächst ungefärbten Granula allmählich eine hellgelbe und schließlich gelbbraune Eigenfarbe an. In entsprechender Weise kommt es im Laufe der Alterung auch zu einer Zunahme der Autofluoreszenz des Pigmentes (Abb. 2, 4a und b).

Verfolgt man die *Enzymaktivität* des Vitamin E-Mangelpigmentes im Laufe seiner Alterung, so ergibt sich folgendes Bild:

Schon in den ersten Entwicklungsstadien der Pigmentgranula ist ihre *saure Phosphataseaktivität* erkennbar, die auch in den alten Pigmentablagerungen unverändert stark in Erscheinung tritt.

Die *Esterasereaktion* ist ebenfalls bereits am Beginn der Pigmententstehung nachweisbar und bleibt in den meisten Granula während der Alterung erhalten. Allerdings findet man neben positiv reagierenden stets auch vereinzelte esterase-negative Körnchen. Obwohl die Zahl der esterasefreien Pigmentgranula im Laufe der Zeit etwas zunimmt, gibt doch auch bei alten Versuchstieren die Mehrzahl der Pigmentkörnchen eine deutliche Esterasereaktion. Zu der an sich naheliegenden Vermutung, daß die Alterung mit einem allmählichen Verlust der Esteraseaktivität einhergeht, kann daher an Hand unserer bisherigen Versuche nicht Stellung genommen werden.

Es liegt auf der Hand, daß unsere Experimente nur einen Einblick in das *Prinzip der Entwicklung* des Vitamin E-Mangelpigmentes ermöglichen. Die Geschwindigkeit dieses Umwandlungsprozesses dürfte dagegen weitgehend von den jeweiligen Versuchsbedingungen, wie der Art des verwendeten Tierstammes, dem Lebensalter, in dem die Tiere auf die Vitamin E-Mangelkost gesetzt worden sind, und vor allem von der Zusammensetzung des Futters abhängen. So zeigte der Vergleich unserer Befunde mit den Arbeiten anderer Autoren, daß die Bildung der Pigmente — ebenso wie andere morphologische Veränderungen — bei unseren Versuchstieren verhältnismäßig spät auftrat und relativ langsam fortschritt, ohne daß sich irgendwelche grundsätzlichen Abweichungen ergeben hätten.

Die Alterung des Vitamin E-Mangelpigmentes geht also — ähnlich wie beim Ceroid — mit erheblichen Änderungen seiner histologischen und histochemischen Eigenschaften einher. Einen Eindruck in das Ausmaß dieser Entwicklungsvorgänge vermittelt ein Vergleich zwischen den nach 4 Monaten gebildeten und den 16 Monate alten Pigmenten (vgl. Tabelle 2). Wie man auf den ersten Blick sieht, sind die Unterschiede zwischen den alten und jungen Pigmentkörnchen so groß, daß man sie — ohne Kenntnis der geschilderten Entwicklungsvorgänge — durchaus für völlig verschiedene Cytoplasmastrukturen halten könnte.

Damit ergibt sich eine Erklärung für die wechselnden Eigenschaften, welche diese Pigmentkörnchen oft innerhalb eines Organes, ja manchmal sogar in ein und derselben Zelle aufweisen. Bei der Prüfung dieser Unterschiede zeigt es sich, daß sie in das von uns experimentell ermittelte Entwicklungsschema hereinpasse. Die Verschiedenheit der Pigmentkörnchen ist daher nicht als Zeichen einer großen Schwankungsbreite in ihrer Zusammensetzung oder als Hinweis auf das Vorkommen verschiedener Pigmentarten zu werten, sondern gibt die Umbauvorgänge wieder, denen sie im Laufe der Alterung unterworfen sind.

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich Folgerungen für die weitere Untersuchung lipogener Pigmente: Bei der Isolierung dieser Cytoplasmastruktur aus Gewebshomogenaten wird man danach trachten müssen, möglichst einheitliche Körnchen, d. h. Granula der gleichen Altersstufe zu gewinnen. Da im Gewebe in der Regel verschieden alte Granula dicht nebeneinander liegen und zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien naturgemäß fließende Übergänge bestehen, läuft man sonst Gefahr, nur Durchschnittswerte zu erzielen und die für das Verständnis der funktionellen Bedeutung dieses Pigmentes wichtigen Umbauvorgänge nicht zu erfassen. Das gleiche gilt für Versuche zur histochemischen Charakterisierung von Lipopigmenten, die ebenfalls nur unter Berücksichtigung der Alterungsvorgänge zu verwertbaren Resultaten führen dürften.

3. *Welche Hinweise ergeben sich auf die formale Genese des Vitamin E-Mangelpigmentes?* Die nach 3—4 Monaten an den Kernpolen der glatten Muskelfasern auftretenden Vorstufen des Pigmentes unterschieden sich histologisch und histochemisch nicht wesentlich von dem übrigen Cytoplasma. Insbesondere fielen die Nachweisreaktionen für Aminosäuren (Proteine) und Kohlenhydrate im Bereich dieser feinen Granula genauso aus wie in anderen Cytoplasmastrukturen. Nur bei der Färbung mit Sudanschwarz gelang am Gefrier- und Paraffinschnitt eine ganz schwache, leicht graue bis grauschwarze Anfärbung der Körnchen. Die Affinität für diesen Fettfarbstoff war jedoch so gering, daß von einer Sudanophilie im üblichen Sinne nicht gesprochen werden konnte.

Mit fortschreitender Versuchsdauer kam es dann zu einer Vergrößerung der Granula und synchron damit zu einer Verstärkung ihrer Sudanophilie und Autofluoreszenz. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich der Schluß, daß *die Pigmentkörnchen durch eine allmähliche Anhäufung von ungesättigten Lipiden im Bereich von eiweißhaltigen Cytoplasmabezirken entstehen*. Es erfolgt also nicht, wie bei einer „degenerativen“ Verfettung von Muskelfasern oder Parenchymzellen, eine einfache Aussonderung von Fett aus dem Cytoplasmaverband und die Bildung von intracytoplasmatischen Fetttropfen, sondern eine Anlagerung von schwer löslichen Fettstoffen an eiweißhaltige, offenbar präformierte Cytoplasmabestandteile. Dadurch erklärt sich auch das unterschiedliche Verhalten der Fetttropfen in „verfetteten“ Muskelfasern oder Epithelzellen auf der einen Seite und der fetthaltigen Pigmentkörnchen auf der anderen Seite. Bei der Behandlung des Gewebes mit organischen Lösungsmitteln, wie z. B. bei der Paraffineinbettung, werden die echten Fetttropfen völlig extrahiert und hinterlassen im Cytoplasma eine ihrer ursprünglichen Größe entsprechende rundliche bis ovale Lücke. Versucht man dagegen die Lipide aus dem Vitamin E-Mangelpigment zu extrahieren (was ohnehin nur in den ersten Entwicklungsstufen — und auch dann meistens nur unvollständig — gelingt), so bleibt ein eiweißhaltiges Körnchen in der Zelle zurück, also gewissermaßen eine Art fettfreier Restkörper des Pigmentes.

Außerdem werden *die abgelagerten ungesättigten Lipide, wie wir seit langem wissen, im Laufe der Zeit oxydiert* (ENDICOTT 1944, DAM und GRANADOS 1945, MASON und EMMEL 1945, MASON, DAM und GRANADOS 1946, BENSLEY 1947, CASSELMAN 1951, GEDIGK und FISCHER 1958). Die dabei entstehenden Oxydationsprodukte sind mit fortschreitender Versuchsdauer in den Körnchen immer deutlicher nachweisbar: So kommt es zu einer Vermehrung der mit der PAS-Technik darstellbaren α -Glykolgruppen, zu einer allmählichen Verstärkung der

Schiffreaktion für Carbonylgruppen und zu einer der Anreicherung von Carboxylgruppen entsprechenden Zunahme der Basophilie. Auch die Reduktionsfähigkeit, welche in den älteren Pigmenten sehr ausgeprägt ist, dürfte an die ungesättigten Lipide und ihre Oxydationsprodukte gebunden sein.

Von unseren Untersuchungen am Ceroid wissen wir, daß der oxydative Umbau ungesättigter Lipide mit einem Verlust ihrer Sudanophilie einhergeht. So hatten die ältesten Ceroidkörnchen schließlich ihre Affinität für Fettfarbstoffe verloren (GEDIGK und FISCHER 1958). Im Gegensatz dazu beobachteten wir beim Vitamin E-Mangelpigment trotz der Vermehrung der Oxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren eine Zunahme seiner Anfärbbarkeit mit Sudanfarbstoffen. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich aber aufklären, wenn man berücksichtigt, daß der Vitamin E-Mangelzustand nicht mit einer plötzlichen und einmaligen Speicherung, sondern einer allmählichen Anhäufung von Lipiden einhergeht. Infolgedessen werden synchron mit der fortschreitenden Oxydation der einmal gespeicherten Lipide ständig neue, noch nicht so weit oxydierte Fettstoffe abgelagert, welche noch eine ausgeprägte Affinität für Fettfarbstoffe besitzen. Offenbar wird die Abnahme der Sudanophilie der schon längere Zeit gespeicherten, oxydierten Fettstoffe durch die neu hinzukommenden, noch sudanophilen Lipide überdeckt und dem histologischen Nachweis entzogen.

Diese Befunde führen zur Erklärung einiger wichtiger Eigenschaften des Vitamin E-Mangelpigmentes:

Von besonderem Interesse ist von jeher die *Eigenfarbe* der fetthaltigen Pigmente gewesen, über deren Natur verschiedene Meinungen geäußert worden sind: Eine Gruppe von Autoren legte der Farbkomponente dieser Pigmente einen eiweißgebundenen oder einen proteinogenen Farbstoff zugrunde, ohne jedoch über seine chemischen Eigenschaften nähere Angaben machen zu können (BRAHN und SCHMIDTMANN 1920, MOORE und WANG 1947). Dem steht die Vermutung gegenüber, daß die Färbung dieser Cytoplasmastrukturen durch Oxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren bedingt wird (DAM und GRANADOS 1945, BENSLEY 1947). Mit eigenen Experimenten haben wir in den vergangenen Jahren versucht, der Klärung dieser Frage näher zu kommen (GEDIGK 1958):

Da alle Lipopigmente ungesättigte Fettsäuren und deren Oxydationsprodukte enthalten, war es naheliegend, deren Rolle bei der Entstehung der Eigenfarbe zu verfolgen. Wir haben deshalb die älteren Versuche von ENDICOTT (1944) und CASSELMAN (1951) mit reinen hochungesättigten Lipiden aufgegriffen und durch die Anwendung moderner Methoden vervollständigt. Vor allem dehnten wir unsere Beobachtungen — im Gegensatz zu den erwähnten älteren Arbeiten — auf einen sehr langen Zeitraum, nämlich $1\frac{1}{2}$ —2 Jahre, aus, weil einige Eigenschaften der Oxydations- und Polymerisationsprodukte von Polyenfettsäuren erst nach mehreren Monaten deutlich in Erscheinung treten. Dabei fanden wir, daß diese an sich ungefärbten (wasserklaren) Lipide bei der vorsichtigen Oxydation in vivo und in vitro in gelbliche und schließlich braun gefärbte Substanzen übergehen, die in allen wesentlichen Eigenschaften, wie der Qualität der Eigenfarbe, der Autofluoreszenz und der Löslichkeit mit den bekannten Lipopigmenten, nämlich dem Lipofuscin, dem Vitamin E-Mangelpigment und dem Ceroid übereinstimmen. Besonders sei hervorgehoben, daß die gelbbraune Farbe der oxydierten Fettstoffe, ebenso wie die Eigenfarbe der Lipopigmente, nicht durch die Einwirkung von

Laugen oder Säuren beeinflusst wurde und gegen Oxydationsmittel resistent war. Auch in dem histochemischen Verhalten, wie der Sudanophilie, der PAS-Reaktion, der Perameisensäure-Schiffreaktion, der Säurefestigkeit, der Basophilie und dem Reduktionsvermögen stimmten die oxydierten und polymerisierten Fettsäuren mit den lipogenen Pigmenten überein. Für die Umwandlung der wasserklaren, leicht löslichen Fettsäureester in unlösliche gelbbraune Substanzen war die Anwesenheit von Proteinen nicht erforderlich.

Des weiteren ließ sich bei Versuchen über die Entstehung des Ceroids bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose nachweisen, daß die Alterung dieses Pigmentes auf dem oxydativen Umbau ungesättigter Lipide beruht, und daß synchron mit diesen Oxydationsvorgängen die gelbe und schließlich gelbbraune Eigenfarbe der Pigmentgranula auftrat (GEDIGK und FISCHER 1958). Die gleiche zeitliche Beziehung zwischen dem oxydativen Umbau des Fettbausteines und dem Auftreten der Eigenfarbe beobachteten wir jetzt bei der Alterung des Vitamin E-Mangelpigmentes: Je weiter die Oxydation der ungesättigten Fettstoffe fortgeschritten war, um so ausgeprägter trat die gelblichbraune Eigenfarbe in Erscheinung. Aus allen diesen Beobachtungen ergibt sich der Schluß, daß der Eigenfarbe des Vitamin E-Mangelpigmentes, ebenso wie der des Ceroids, Oxydations- und Polymerisationsprodukte ungesättigter Fettsäuren zugrunde liegen.

In ganz entsprechender Weise muß auch die gelbliche Eigenfluoreszenz der Pigmentgranula auf ihre Lipidkomponente bezogen werden, da reine oxydierte ungesättigte Lipide nicht nur eine gelbbraune Eigenfarbe, sondern auch eine gelbliche bis gelbbraune Autofluoreszenz besitzen (GEDIGK 1958). Ob allerdings in den Pigmentkörnchen die gelbe Eigenfluoreszenz der oxydierten Fettstoffe noch durch eine Autofluoreszenz der Proteine verstärkt wird, läßt sich nicht sicher entscheiden. Wegen der weißlichen Eigenfluoreszenz der jüngsten Pigmentkörnchen, welche vornehmlich aus Proteinen bestehen und nur sehr wenig Lipide enthalten, wird man das Vorhandensein fluoreszierender Proteine durchaus in Betracht ziehen müssen.

Ein weiteres Problem stellt die zunehmende Unlöslichkeit des Fettbausteines des Vitamin E-Mangelpigmentes dar, der sich ebenso wie beim Lipofuscin und Ceroid, schließlich selbst mit siedenden organischen Lösungsmitteln nicht aus dem histologischen Schnitt extrahieren läßt. Vielfach ist angenommen worden, daß die Löslichkeit dieser Lipide durch ihre Bindung an Eiweißstoffe beeinträchtigt wird (GYÖRGY und GOLDBLATT 1942, ENDICOTT und LILLIE 1944). Andere haben die Vermutung geäußert, daß die ungesättigten Fettstoffe allein durch die Oxydation ihre Löslichkeit verlieren (HASS 1938/39, ENDICOTT 1944, DAM und GRANADOS 1945, CASSELMAN 1951). Bei unseren Experimenten mit reinen (proteinfreien) hochungesättigten Fettsäureestern konnten wir die Befunde der zuletzt genannten Autoren bestätigen. Wir möchten deshalb die Unlöslichkeit des Fettbausteines dieser Pigmente auf ihren oxydativen Umbau und die damit einhergehende Polymerisation zurückführen. Jedenfalls ist für die Erklärung der Unlöslichkeit der Fettstoffe die Annahme einer besonderen Bindung an Proteine nicht erforderlich.

Während bei der Entwicklung des Vitamin E-Mangelpigmentes die Anhäufung und Oxydation von Fettstoffen sinnfällig in Erscheinung treten, vermochten wir mit den üblichen histochemischen Methoden keine quantitativen oder quali-

tativen Veränderungen der *Proteinkomponente* festzustellen. Trotzdem ist die Vermutung naheliegend, daß die durch den Vitamin E-Mangel erzeugte Stoffwechselstörung nicht nur den intermediären Umbau der Lipide beeinträchtigt, sondern auch (direkt oder indirekt) auf die Eiweißkörper des Cytoplasmas und damit auch auf die Proteine des Pigmentes einwirkt. Die Empfindlichkeit der gewöhnlichen cytochemischen Reaktionen für Aminosäuren und Proteine reicht aber wohl nicht aus, um derartige Veränderungen des Eiweißbausteines des Pigmentes zu erfassen. Bemerkenswert ist jedoch das Verhalten der Enzyme, welche einen Teil des Pigmenteiweißes ausmachen: So wird die unspezifische Esterase im Bereich der Pigmentgranula von Inhibitoren weniger leicht beeinflußt als im übrigen Cytoplasma. In ähnlicher Weise vermögen die in den Körnchen enthaltenen Fermente anscheinend Substrate, die normalerweise im Organismus nicht vorkommen und deren chemische Konfiguration von den physiologischen Substanzen abweicht, manchmal etwas schwerer anzugreifen als die außerhalb der Pigmente gelegenen Enzyme. Es wäre vielleicht denkbar, daß durch die Vermischung der Enzyme mit oxydierten und polymerisierten Lipiden sowohl einige Effektoren als auch manche unphysiologischen Substrate mit großen komplexen Molekülen nicht so ohne weiteres mit den Enzymrezeptorgruppen in Wechselwirkung treten können.

Der Enzymgehalt der Pigmentkörnchen wirft die Frage auf, ob diese Granula an besonders stoffwechselaktiven, von vornherein fermenthaltigen Cytoplasma-bezirken gebildet werden oder ob sie mehr oder weniger zufällig an irgendwelchen Stellen im Cytoplasma entstehen und die Enzyme dann in ihrem Bereich erst gebildet werden.

Verfolgt man die morphologische Verteilung der hydrolytischen Enzyme, so zeigt es sich, daß bereits die normalen glatten Uterusmuskelfasern eine schwache diffuse Esteraseaktivität und eine ebenfalls geringfügige Aktivität von saurer Phosphatase besitzen. Diese Fermente sind in den pigmentfreien Muskelzellen auch in der unmittelbaren Umgebung der Zellkerne nachweisbar, in der im Vitamin E-Mangelzustand ungesättigte Lipide bevorzugt angehäuft werden. Allerdings unterscheiden sich diese kernnahe gelegenen Cytoplasmabezirke hinsichtlich ihres Phosphatase- und Esterasegehaltes normalerweise nicht nennenswert von anderen Stellen des Myoplasmas. Sie besitzen aber eine besonders starke Dehydrogenaseaktivität (s. auch PEARSE 1957); und auch wegen ihrer engen räumlichen Beziehung zum Zellkern dürfte es keinem Zweifel unterliegen, daß sie für den Zellstoffwechsel besonders wichtig sind. Mit dieser Annahme stehen die hier elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Golgifelder und Mitochondrien im Einklang. Dementsprechend besitzt auch das Vitamin E-Mangelpigment enge morphologische Beziehungen zu Mitochondrien (LINDNER 1957 und POCHE 1958), in denen nicht nur die Diphosphopyridinnucleotidase und Bernsteinsäureoxydase (GOVIER und JETTER 1948, SJÖSTRAND 1957), sondern auch das Tocopherol lokalisiert sein sollen (SLATER 1959). Alle diese Befunde weisen also darauf hin, daß sich das Vitamin E-Mangelpigment in besonders stoffwechselaktiven fermenthaltigen Cytoplasmagebieten entwickelt, welche wichtige Aufgaben im Zelleben zu erfüllen haben.

Die Ablagerung der ungesättigten Fettstoffe führt dann offenbar in diesen schon von vornherein mit einer reichen Enzymausstattung versehenen

Cytoplasmaanteilen zu einer zusätzlichen Aktivierung von saurer Phosphatase und unspezifischer Esterase. Ob es dabei außerdem noch zu einer direkten Einwirkung des Tocopherolmangels auf diese Fermente kommt, können wir an Hand unserer Experimente nicht entscheiden. Die an Homogenaten der Muskulatur vorgenommenen Untersuchungen, bei denen im Vitamin E-Mangelzustand teils eine Hemmung (SMITH und NEHORAYAN 1958), teils eine Aktivierung (CAREY und DZIEWIATKOWSKI 1949) der sauren Phosphatase festgestellt worden ist, können auf das Pigment selbst nicht übertragen werden, weil bei diesen Experimenten naturgemäß nicht nur die Pigmentkörnchen, sondern auch andere Strukturen, wie pigmentfreies Myoplasma, Zellkerne, Capillaren, Leukocyten, Histiocyten und die im Myometrium reichlich vorhandenen Makrophagen mit erfaßt werden. Das enzymatische Verhalten aller dieser Gewebelemente muß aber bei den Untersuchungen an Homogenaten durchaus in Rechnung gestellt werden, zumal es bekannt ist, daß z. B. in phagocytierenden Zellen allein durch die funktionelle Beanspruchung reaktiv eine Neubildung und Aktivierung von saurer Phosphatase erfolgt (GEDIGK und BONTKE 1957).

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen stellten wir in früheren Untersuchungen an menschlichen Organen fest, daß das Lipofuscin an Stellen des Cytoplasmas entsteht, die im Stoffwechselgeschehen der Zelle eine besondere Rolle spielen und von vornherein eine ausgeprägte Enzymaktivität besitzen bzw. zur selektiven Bildung von Fermenten befähigt sind (GEDIGK und BONTKE 1956).

Überblicken wir zusammenfassend die formale Genese des Vitamin E-Mangelpigmentes, so zeigt es sich, daß seine Entstehung und Entwicklung auf zwei nebeneinander ablaufende Grundvorgänge zurückgeführt werden kann: Erstens werden im Bereich eiweißhaltiger (offenbar präformierter), besonders stoffwechselaktiver Cytoplasmabezirke allmählich ungesättigte Lipide angehäuft. Und zweitens werden diese abgelagerten Fettstoffe in zunehmendem Maße oxidiert und polymerisiert. Dabei entstehen aus den wasserklaren, leicht löslichen Lipiden unlösliche gelbbraun gefärbte fluoreszierende Substanzen, welche dem Pigment die kennzeichnende Eigenfarbe und auch den größten Teil seiner wichtigsten cytochemischen Eigenschaften verleihen. Die Ablagerung der Lipide führt in diesen von vornherein fermenthaltigen Cytoplasmabezirken anscheinend zu einer zusätzlichen Aktivierung und vielleicht auch Neubildung von saurer Phosphatase und unspezifischer Esterase.

4. Die Enzymausstattung des Vitamin E-Mangelpigmentes und des Lipofuscins wirft die Frage auf, ob auch *chemische Beziehungen zwischen den hydrolytischen Fermenten und den gespeicherten Lipiden* bestehen. Die Beantwortung dieser Frage stößt aus mehreren Gründen auf Schwierigkeiten: Zunächst ist die chemische Zusammensetzung des Vitamin E-Mangelpigmentes nur teilweise bekannt (s. S. 444—450); und insbesondere besitzen wir über seine Enzymausstattung nur bruchstückhafte Kenntnisse, da die Zahl der mit histochemischen Methoden nachweisbaren Enzyme vorerst noch sehr gering ist. Außerdem ist die biologische Bedeutung der von uns nachgewiesenen Enzyme noch in vieler Hinsicht ungeklärt (s. HOFFMANN-OSTENHOF 1954). Bei dieser Sachlage wird man zur Frage der Beziehungen zwischen den gespeicherten Lipiden und den in ihrem Bereich nachweisbaren Enzymen nur mit großer Zurückhaltung Stellung nehmen dürfen:

Da das Vitamin E-Mangelpigment und andere lipogene Pigmente trotz ihres Vorkommens in verschiedenen Organen regelmäßig hydrolytische Enzyme enthalten, ist die Annahme nahelegend, daß diese Fermente im intermediären Stoffwechsel der abgelagerten Substanzen eine Rolle spielen. So wäre es denkbar, daß die saure Phosphatase und unspezifische Esterase im Cytoplasma am Um- und Abbau von Phospholipiden beteiligt sind, welche reichlich hoch-ungesättigte Fettsäuren enthalten (DEBUCH 1955) und deren Vorkommen im Vitamin E-Mangelpigment und im Lipofuscin außerordentlich wahrscheinlich ist (s. S. 444). Weiterhin könnte man sich vorstellen, daß bei einem gestörten Lipidstoffwechsel, wie z. B. beim Vitamin E-Mangel, die von Phosphatiden abgespaltenen ungesättigten Carbonsäuren (bzw. deren Ester) bevorzugt in den phosphatase- und esterasehaltigen Cytoplasmabezirken liegenbleiben und zum Pigment umgeformt werden, in deren Bereich sie schon normalerweise umgesetzt werden.

Gegen diese Hypothese läßt sich allerdings einwenden, daß die Hydrolyse der Phosphor-esterbindungen in Phospholipiden durch spezifische Phosphodiesterasen und die Spaltung der Fettsäureesterbindungen von besonderen Carbonsäureesterasen katalysiert werden soll (s. HOFFMANN-OSTENHOF). Obwohl es sehr wahrscheinlich ist, daß wir mit den histochemischen Methoden diese Gruppen von Esterasen, nämlich die Lecithinasen, mit erfassen, wird man doch wegen der oben erwähnten ungeklärten Fragen auch die Möglichkeit in Rechnung zu stellen haben, daß keine direkten chemischen Beziehungen zwischen diesen hydrolytischen Enzymen und den gespeicherten Lipiden bestehen, daß also die saure Phosphatase und die unspezifische Esterase nicht an dem Stoffwechsel der Pigmente bzw. ihrer Vorstufen beteiligt sind. In diesem Fall müßte man annehmen, daß die im Bereich der Pigmente nachgewiesenen Enzyme nur einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung der Cytoplasmabezirke darstellen, in denen die Fettstoffe abgelagert werden.

Obwohl Dehydrogenasen in den Pigmentkörnchen selbst nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden können, ist der Befund interessant, daß die Granula bevorzugt im Bereich von Mitochondrien entstehen, in denen Cytochromoxydase, das Succinoxidasesystem und auch das Vitamin E enthalten sind. Da wir aus biochemischen Untersuchungen wissen, daß das Tocopherol auf die Aktivität oxydierender Enzyme einwirkt und insbesondere bei der Atmungskettenphosphorylierung eine Rolle spielt (MARTIUS 1957, SLATER 1959), ist die Vermutung naheliegend, daß auf diesem Wege im Vitamin E-Mangelzustand der oxydative Umbau der abgelagerten ungesättigten Fettsäuren begünstigt wird (s. auch BECKMANN 1955).

5. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Vitamin E-Mangelpigment und anderen Lipopigmenten? Vergleicht man die färberischen und histochemischen Eigenschaften des Vitamin E-Mangelpigmentes, des Ceroids und des Lipofuscins, so ergibt sich auf den ersten Blick eine weitgehende Übereinstimmung zwischen diesen lipidhaltigen Pigmenten (vgl. Tabelle 1). Alle diese Cytoplasmastrukturen sind durch ihren Gehalt an schwer löslichen, oxydierten ungesättigten Lipiden gekennzeichnet, und alle enthalten Proteine. Auch die an ihnen ablaufenden Alterungsvorgänge stimmen in einer Reihe von wichtigen Punkten überein.

Da die wesentlichen histochemischen Eigenschaften der Lipopigmente an die ihnen gemeinsamen ungesättigten Fettsäuren bzw. deren Oxydationsprodukte gebunden sind, gibt es keine histochemische Reaktion, die für einen bestimmten Pigmenttyp charakteristisch wäre. Die anders lautenden Angaben halten einer kritischen Nachprüfung nicht stand. Sie dürften u. a. wohl darauf beruhen, daß bei vergleichenden Untersuchungen an menschlichen Organen verschiedene Entwicklungsstufen der lipogenen Pigmente einander gegenübergestellt worden sind und grundsätzliche Unterschiede vorgetäuscht haben (vgl. S. 451).

Die fetthaltigen Pigmente, nämlich das Vitamin E-Mangelpigment, das Ceroid und das Lipofuscin, sind also nahe verwandt. Es scheint daher zweckmäßig zu sein, sie unter der Bezeichnung „lipogene Pigmente“ oder „Lipopigmente“ zusammenzufassen, zumal dieser Ausdruck auf die Herkunft und Natur des für

diese Strukturen charakteristischen Farbstoffes hinweist. Unter dem Begriff „Lipopigmente“ würde man demnach gelbe bis gelbbraune, fluoreszierende, intracytoplasmatische Körnchen und Schollen verstehen, die schwer lösliche, ungesättigte Carbonsäuren bzw. deren Ester enthalten und deren Eigenfarbe Oxydations- und Polymerisationsprodukte ungesättigter Fettsäuren zugrunde liegen.

Trotz der nahen Verwandtschaft dieser Pigmente ist aber damit zu rechnen, daß die in den einzelnen Zellen und Organen gespeicherten ungesättigten Fettsäuren jeweils von verschiedenartigen Lipiden, wie Neutralfetten, Phosphatiden, Cerebrosiden usw. herrühren. Auch in der Zahl der C-Atome und der Doppelbindungen sind die abgelagerten Fettsäuren wahrscheinlich von Fall zu Fall verschieden. So hat es sich gezeigt, daß z. B. nicht nur Phosphatide, sondern auch Neutralfette mit reichlich ungesättigten Fettsäuren und Methylester hochungesättigter Fettsäuren in Lipopigmente umgewandelt werden können (ENDICOTT 1944, CASSELMAN 1951, GEDIGK 1958). Denn das allen Lipopigmenten gemeinsame und für ihre Genese wesentliche chemische Substrat sind nicht die Fettstoffe selbst, sondern allein die hochungesättigten (freien oder veresterten) Fettsäuren, die bekanntlich in vielen sehr verschiedenen Lipiden vorkommen. Diese Unterschiede in dem Aufbau der ursprünglich abgelagerten Lipide lassen sich aber im mikroskopischen Präparat zur Zeit noch nicht mit genügender Sicherheit erfassen, zumal auch die entstehenden Oxydationsprodukte der ungesättigten Fettsäuren histochemisch einheitlich sind. Desgleichen können die zweifellos vorhandenen organspezifischen Besonderheiten der Eiweißbausteine mit den derzeitigen Methoden nicht dargestellt werden. Für den grundsätzlichen Bauplan dieser Pigmente und für die an ihnen ablaufenden, an die ungesättigten Fettsäuren gebundenen Entwicklungsvorgänge fallen diese Verschiedenheiten allerdings nicht ins Gewicht.

Während somit das Gemeinsame dieser Pigmentgruppe infolge der in allen vorhandenen oxydierten Fettsäuren klar zutage tritt, spricht aber ihre verschiedenartige kausale und formale Genese doch gegen ihre Identität. Diese Unterschiede werden besonders dann deutlich, wenn man ihre Entstehung verfolgt. Betrachten wir zunächst das *Ceroid*:

Dieses Pigment tritt in den zur Phagocytose befähigten Zellen, also vornehmlich in mesenchymalen Elementen, auf. Es entsteht in der Regel bei der Phagocytose zugrunde gehender fetthaltiger Gewebsanteile, sofern die Oxydation der gespeicherten Lipide durch Blutungen begünstigt wird, oder wenn diese Fettstoffe im Übermaß anfallen und deshalb längere Zeit in den Zellen und im Gewebe liegen bleiben (HAMPERL 1950, HARTROFT 1951, 1953, ZOLLINGER 1953, GEDIGK und FISCHER 1958). Die Ursachen für die Entstehung des Ceroids liegen also in den außerhalb der speichernden Zelle ablaufenden pathologischen Vorgängen. Die Speicherung selbst gehört zu den normalen Aufgaben der Makrophagen, deren Stoffwechsel nur der üblichen funktionellen Belastung ausgesetzt ist.

Die Aufnahme der Lipide in das Cytoplasma der Makrophagen erfolgt sehr schnell, d. h. in der Regel innerhalb weniger Stunden oder höchstens im Laufe von 1–2 Tagen. Sie beginnt, sobald die Zellen mit Fettstoffen in Berührung kommen, und ist beendet, nachdem ihre Speicherkapazität erschöpft ist. Daß man bei der Resorption größerer Fettmassen auch nach Wochen noch phago-

cytierende Zellen antrifft, liegt daran, daß bei der reaktiven Gewebsproliferation ständig neue Mesenchymzellen auftreten und mit der Verarbeitung der Lipide beginnen.

Die ersten Entwicklungsstadien des Ceroids stellen also phagocytierte leicht lösliche Lipidtropfen dar, deren Größe sich im Verlauf der Speicherung meistens nicht mehr nennenswert ändert. Nur gelegentlich kommt es zur Unterteilung größerer Tropfen in kleinere Partikel oder auch zum Zusammenfließen kleinerer Tröpfchen zu großen Kugeln. Die weitere Verarbeitung der Fetttropfen zum Pigment beruht dann hauptsächlich auf dem oxydativen Umbau der ungesättigten Fettsäuren, welche zu unlöslichen, gelbbraun gefärbten, fluorescierenden Substanzen umgelagert werden. Proteine treten erst sekundär zu den gespeicherten Fettstoffen hinzu und spielen mengenmäßig stets nur eine untergeordnete Rolle. Bei großen Lipidtropfen, die vor der Oxydation und Polymerisation nicht unterteilt worden sind, bleibt die Eiweißbeimengung unter Umständen auch ganz aus (GEDIGK und FISCHER 1958).

Ganz anders liegen die Verhältnisse beim *Vitamin E-Mangelpigment*. Es entsteht in glatten Muskelfasern sowie in der Herz- und Skelettmuskulatur bei einem gestörten intermediären Umbau ungesättigter Lipide. Sein Auftreten zeigt also eine die speichernde Zelle selbst betreffende Stoffwechselstörung an.

Die Fettstoffe werden in den Muskelzellen sehr langsam, d. h. im Laufe von Wochen und Monaten, im Bereich von stoffwechselaktiven Cytoplasmabezirken angehäuft, von denen anscheinend ihr Gehalt an Proteinen und Enzymen herührt. Am Anfang der Entwicklung des Vitamin E-Mangelpigmentes finden sich daher nicht wie beim Ceroid intracytoplasmatische Lipidtropfen, sondern eiweißhaltige Cytoplasmastrukturen, also Proteine bzw. Lipoproteide. Während der ganzen Dauer der Stoffwechselstörung schreitet dann die Fettspeicherung fort. Dabei erfolgt nicht nur eine ständige Zunahme der Zahl der Pigmentkörnchen, sondern auch eine Vergrößerung der einmal gebildeten Granula durch eine Vermehrung der abgelagerten Fettstoffe. Außerdem weisen elektronenmikroskopische Untersuchungen auf den Einschluß benachbarter Cytoplasmabezirke in die primären kleinen Pigmentkörnchen hin. An den gespeicherten ungesättigten Fettstoffen laufen dann im Prinzip die gleichen Oxydations- und Polymerisationsvorgänge ab wie beim Ceroid.

Der unterschiedlichen kausalen Genese des Ceroids und des Vitamin E-Mangelpigmentes entspricht also ein unterschiedlicher Entwicklungsablauf. Beide finden ihren Niederschlag in der verschiedenartigen morphologischen Anordnung der Pigmentgranula im Cytoplasma. So wird das Ceroid — genau wie andere phagocytierte Substanzen — ohne ersichtliche Ordnung in Makrophagen abgelagert, deren Zelleib in der Regel auf das dichteste mit den Pigmentkörnchen gefüllt ist. Das Vitamin E-Mangelpigment tritt dagegen in ganz bestimmten, offenbar funktionell wichtigen Cytoplasmabezirken auf: In glatten Muskelfasern findet es sich bevorzugt an den Polen der Zellkerne, denen es hütfenförmig aufsitzt. Auch in quergestreiften Muskeln wird es häufig in der Nachbarschaft der Kerne gebildet; außerdem erfolgt hier seine Ablagerung aber gelegentlich in Randgebieten des Cytoplasmas oder gruppenförmig in umschriebenen Bezirken innerhalb der Muskelfasern. Erst bei längerem Bestehen der Stoffwechselstörungen dehnt sich

die Ablagerungszone dann allmählich aus, um schließlich die Zelle völlig auszufüllen.

Weiterhin erhebt sich die Frage, welche Stellung das *Lipofuscin* (sog. Abnützungspigment) einnimmt, das beim Menschen (und manchmal auch bei Tieren) in Muskelfasern sowie epithelialen Zellen auftritt und welches ebenfalls außer Proteinen ungesättigte Fettsäuren und deren Oxydationsprodukte enthält. Zweifellos würden sich auch in die funktionelle Bedeutung dieses Pigmentes am ehesten Einblicke gewinnen lassen, wenn man seine Vorstufen untersuchen und dann deren weitere Umwandlung während der Alterung verfolgen könnte, zumal seine Zusammensetzung erheblichen, offenbar altersbedingten Schwankungen unterworfen ist (ASCHOFF 1910, HUECK 1921, HAMPERL 1934). Zu den grundsätzlichen Schwierigkeiten, das Alter von Gewebsstrukturen in menschlichen Organen zu bestimmen, kommt nun beim Lipofuscin noch hinzu, daß es verhältnismäßig schnell auf- und abgebaut werden kann, also keinesfalls eine unveränderliche Substanz darstellt (BACHMANN 1953). In der Regel vermögen wir daher nicht den Zeitpunkt anzugeben, wann die zur Ablagerung ungesättigter Lipide führenden Stoffwechselvorgänge eingesetzt haben. Weiterhin ist damit zu rechnen, daß die Oxydation und Polymerisation der Fettsäuren in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechselsituation mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ablaufen. Keineswegs ist man deshalb berechtigt, das Lipofuscin in Organen von Kindern als „junges“ und bei Greisen als „altes“ Pigment zu bezeichnen. — Auch über das manchmal bei Laboratoriumstieren „spontan“ auftretende Lipofuscin können Altersangaben nur mit großen Einschränkungen gemacht werden.

Auf Grund unserer vergleichenden Untersuchungen an menschlichen Organen und am tierexperimentellen Material möchten wir aber trotz dieser Schwierigkeiten versuchen, zu der oben gestellten Frage nach der Genese und Bedeutung dieses Lipopigmentes Stellung zu nehmen.

Wenn man die Entstehung der Lipopigmente vergleicht, so zeigt es sich, daß die kausale Genese des Vitamin E-Mangelpigmentes und des Lipofuscins im Grundprinzip übereinstimmen: Die Bildung des Lipofuscins wird ebenso wie die des Vitamin E-Mangelpigmentes durch eine besondere Situation im intermediären Stoffwechsel der Zelle selbst ausgelöst, während die Ursache für die Ablagerung des Ceroids außerhalb der speichernden Zelle zu suchen ist. Die zur Speicherung ungesättigter Fettsäuren führenden Stoffwechselvorgänge dürften allerdings beim Vitamin E-Mangelpigment und beim Lipofuscin verschieden sein, denn bei der Entstehung des typischen Lipofuscins ist die Mitwirkung eines Vitamin E-Mangelzustandes äußerst unwahrscheinlich (FOLLIS 1957). Des weiteren ist bei den sog. Abnützungspigmenten damit zu rechnen, daß die ihre Bildung verursachenden Stoffwechselvorgänge in den einzelnen Organen und bei den verschiedenen Krankheitszuständen jeweils verschiedene Stellen des intermediären Umbaus der Lipide betreffen, zumal die in den verschiedenartigen hochdifferenzierten Parenchymzellen gespeicherten und zum Pigment umgelagerten ungesättigten Fettsäuren wahrscheinlich auch von unterschiedlichen Lipiden stammen (S. 458). Somit repräsentiert der Vitamin E-Mangelzustand anscheinend nur eine von

vielen Störungsformen, die zur Ablagerung von ungesättigten Lipiden in Muskelfasern und Parenchymzellen führen können.

Auch in der formalen Genese besteht zwischen dem Lipofuscin und dem Vitamin E-Mangelpigment eine weitgehende Übereinstimmung. So fanden wir in früheren Experimenten, daß die Bildung des Lipofuscins in der Leber und in anderen Organen gleichfalls im Bereich eiweißhaltiger präformierter Cytoplasmastrukturen erfolgt, welche von vornherein eine ausgesprochene Stoffwechselaktivität besitzen (GEDIGK und BONTKE 1956). Beide Pigmente enthalten dementsprechend — im Gegensatz zum Ceroid — reichlich Proteine, die beim Lipofuscin ebenso wie in den ersten Entwicklungsstadien des Vitamin E-Mangelpigmentes ganz im Vordergrund stehen. Genau wie das Vitamin E-Mangelpigment wird also das Lipofuscin nicht durch die intraplasmatische Aussonderung von Lipiden in Form von Fetttropfen gebildet. Mit dieser Feststellung steht die Tatsache im Einklang, daß es bisher in keinem Fall möglich war, in Muskelfasern oder epithelialen Zellen den Übergang einer feintropfigen Verfettung in Lipofuscinablagerungen nachzuweisen. Meistens treten die Pigmente sogar an anderen Cytoplasmastellen auf als die bei der Hypoxämie oder anderen Störungen entstehende Verfettung. So sei z. B. an die verschiedenartige Lokalisation des Lipofuscins und der kleintropfigen Verfettung im menschlichen Herzmuskel erinnert. Das gleiche gilt auch für die Lipofuscinablagerungen in anderen Organen, wie im Zentralnervensystem, in der Nebenniere, im Hoden usw., die zwar nicht solch eine kennzeichnende cytologische Anordnung besitzen, deren grundsätzliche Übereinstimmung mit dem Pigment der Herz- und Skelettmuskulatur aber seit langem unumstritten und durch zahlreiche morphologische und cytochemische Befunde belegt ist. Als Ausdruck dieser formalen Genese ist das Lipofuscin in seinem morphologischen Verhalten den ersten Stadien des Vitamin E-Mangelpigmentes sehr ähnlich. Beide Lipopigmente entstehen z. B. in Muskelzellen nicht regellos im Cytoplasma, sondern gruppenförmig in umschriebenen Zellbezirken; und submikroskopisch besitzen beide enge Beziehungen zu Mitochondrien (LINDNER 1957 und POCHE 1958).

Das Lipofuscin hat also auch das Grundprinzip der formalen Genese mit dem Vitamin E-Mangelpigment gemeinsam und unterscheidet sich in dieser Hinsicht ebenfalls vom Ceroid. Ob das Vitamin E-Mangelpigment deshalb am Beginn seiner Entwicklung mit dem Lipofuscin vielleicht sogar identisch ist, steht noch dahin. In den späteren Entwicklungsstadien finden sich aber zweifellos Unterschiede zwischen ihnen:

So zeigt das Vitamin E-Mangelpigment nach längerer Versuchsdauer eine Neigung zur Verklumpung und zur Bildung großer Schollen, die man beim Lipofuscin nicht oder doch nur selten beobachtet. Möglicherweise hängt die Entstehung größerer Pigmentschollen mit der Nekrobiose der Muskelfasern zusammen, die man bei allen Tieren findet, die lange Zeit (1—1½ Jahre) eine Vitamin E-arme Kost erhalten haben. Dagegen geht die Lipofuscinablagerung beim Menschen ohne sichtbare Schädigung der speichernden Zelle einher. Dieser Unterschied beruht sicher darauf, daß beim länger andauernden Vitamin E-Mangelzustand schwerste intermediäre Stoffwechselstörungen entstehen, die nicht allein den Umbau der Lipide, sondern auch den Eiweiß- und Kohlenhydrat-

stoffwechsel betreffen und schließlich zum Zelltod führen (vgl. hierzu BECKMANN 1955).

Außerdem sind die alten Pigmentgranula beim Vitamin E-Mangel deutlich sudanophil, während man in menschlichen Organen gelegentlich tief braun gefärbte, also offenbar alte Lipofuscinkörnchen trifft, die nur noch eine sehr geringe Affinität für Fettfarbstoffe besitzen. Diese Verschiedenheit läßt sich dadurch erklären, daß beim Vitamin E-Mangel während der ganzen Versuchsdauer immer wieder neue sudanophile Fettstoffe abgelagert werden, so daß auch die ältesten Körnchen neben den bereits weitgehend oxydierten und polymerisierten, d. h. nicht mehr mit Sudan färbbaren Fettstoffen, stets auch noch weniger oxydierte (sudanophile) Lipide enthalten. Wegen der Kurzlebigkeit der Versuchstiere ist es bisher nicht gelungen, das Schicksal älterer Vitamin E-Mangelpigmente nach dem Aufhören der Stoffwechselstörung zu verfolgen. Es ist aber damit zu rechnen, daß das Vitamin E-Mangelpigment ebenfalls seine Sudanophilie verlieren würde, wenn keine neuen Fettstoffe mehr hinzutreten könnten und nur noch der zur Polymerisation führende oxydative Umbau der einmal gespeicherten Fette ablief. Beim Abnützungspigment des Menschen werden dagegen die zur Ablagerung der Fettstoffe führenden Stoffwechselvorgänge sicher gelegentlich für eine mehr oder weniger lange Zeit unterbrochen, so daß die bereits gebildeten Granula nicht durch zusätzliche Anhäufungen von Lipiden vergrößert werden. An diesen Pigmenten würde dann — wenn die Voraussetzungen für ihren Abbau nicht gegeben sind — nur der oxydative Umbau der gespeicherten Fettstoffe weiter ablaufen, der schließlich zum Verlust der Sudanophilie führt, ohne daß weitere, noch nicht oxydierte, sudanophile Lipide neu hinzutreten.

Trotz der weitgehenden Ähnlichkeit der morphologischen Anordnung des Lipofuscins und des Vitamin E-Mangelpigmentes in glatten Muskelfasern bestehen aber doch in quergestreiften Muskeln gewisse Unterschiede zwischen ihnen. Zwar tritt das Vitamin E-Mangelpigment auch hier bevorzugt an den Kernpolen auf; es ist aber nicht unbedingt an die Nachbarschaft der Kerne gebunden und wird, wie z. B. im Herzmuskel, gelegentlich auch in umschriebenen anderen Gebieten der Muskelfasern gebildet.

Überblicken wir diese Befunde, so wird deutlich, daß das Vitamin E-Mangelpigment und das Lipofusein zwar in einer Reihe von Einzelheiten ihres morphologischen Verhaltens und ihrer Genese etwas voneinander abweichen, daß aber die beobachteten Unterschiede zwischen ihnen keineswegs auf eine grundsätzliche Verschiedenheit hinweisen. Beide Pigmente stimmen vielmehr in ihren wesentlichen Eigenschaften sowie im Grundprinzip ihrer kausalen und formalen Genese überein, während sich beide in den gleichen Punkten vom Ceroid unterscheiden. Man könnte deshalb das Vitamin E-Mangelpigment vielleicht als eine besondere Form des Lipofuscins bezeichnen.

6. *Welche Rückschlüsse ergeben sich aus den vorliegenden Untersuchungen auf die biologische Bedeutung des Lipofuscins (des sog. Abnützungspigmentes)?*

Die in diesem Pigment abgelagerten Oxydations- und Polymerisationsprodukte ungesättigter Fettsäuren treten beim normalen Fettstoffwechsel nicht auf. Wegen ihrer schweren Löslichkeit dürften sie dem Erhaltungs- und Funktionsstoffwechsel der Zelle nicht zur Verfügung stehen und keinesfalls eine Art Reservematerial

darstellen. Auch für die Annahme, daß dieses Pigment eine für das Zelleben als Katalysator notwendige Substanz darstellt, ergeben sich keine Anhaltspunkte. Die im Lipofuscin enthaltenen Fermente sind auch nicht ein Zeichen für irgendwelche Aufgaben, die es im Zellstoffwechsel zu erfüllen hätte, sondern ein Hinweis für die funktionelle Bedeutung der Cytoplasmabezirke, in denen diese Substanzen abgelagert werden. Mit dieser Folgerung stehen die elektronenmikroskopischen Befunde im Einklang, bei denen im Lipofuscin — ebenso wie beim Vitamin E-Mangelpigment — kein Molekülgitter oder ein anderer submikroskopischer Ordnungszustand gefunden wurde (LINDNER 1954, 1957, 1958, POCHÉ 1958), so wie es sonst bei funktionell bedeutungsvollen Cytoplasmastrukturen der gleichen Größenordnung der Fall ist. Schließlich sei an das seit langem bekannte gehäufte Auftreten dieser Pigmente bei abzehrenden Krankheiten und bei zunehmendem Alter erinnert. Alle morphologischen und chemischen Daten weisen somit darauf hin, daß es sich bei den im Lipofuscin enthaltenen oxydierten und polymerisierten ungesättigten Fettsäuren um Schlacken des intermediären Lipidstoffwechsels handelt, die unter besonderen Stoffwechselbedingungen in einzelnen Zellen mehr oder weniger schnell angehäuft werden und unter Umständen auch wieder weggeräumt werden können.

Auf den ersten Blick könnte gegen diese Folgerungen vielleicht ins Feld geführt werden, daß Lipofuscinkörnchen in geringem Umfang manchmal schon bei Kindern auftreten und scheinbar zur regulären Ausstattung bestimmter Zellen gehören. Tatsächlich besteht aber zwischen diesen Beobachtungen kein Widerspruch, denn es ist ohne weiteres vorstellbar, daß die Stoffwechselsituationen, welche zur intraplasmatischen Ablagerung und zum oxydativen Umbau ungesättigter Fettsäuren führen, manchmal sehr frühzeitig (auch im jugendlichen Organismus) auftreten und daß diese Schlackenstoffe — sofern die Voraussetzungen für ihren Abbau nicht gegeben sind — im Cytoplasma unter Umständen lange liegen bleiben. Die Funktion der Zelle wird durch die Lipofuscinablagerungen in der Regel nicht beeinträchtigt — genauso wie auch viele andere Cytoplasmaeinschlüsse, z. B. Eisenpigmente oder Fetttropfen, das Zelleben normalerweise nicht gefährden. Keineswegs sind wir deshalb berechtigt, eine lipofuscinhaltige Zelle als funktionsuntüchtig oder gar als „degeneriert“ zu bezeichnen.

Mit dem Nachweis, daß der Entstehung des Lipofuscinpigmentes eine Anhäufung von Schlacken des intermediären Zellstoffwechsels zugrunde liegt, kehren wir nach langen Umwegen zu einer Anschauung zurück, die schon vor Jahrzehnten von ASCHOFF, HUECK u. a. vertreten worden ist. Wir vermögen jedoch heute die Art der Stoffwechselvorgänge etwas genauer zu bestimmen und die Richtigkeit dieser Auffassungen durch Stoffwechselversuche im Tierexperiment und mit modernen morphologischen Methoden zu begründen.

Überblicken wir abschließend die im Tierexperiment und an Organen des Menschen erhobenen Befunde, so zeigt es sich, daß die Lipopigmente trotz des ihnen allen gemeinsamen Gehaltes an oxydierten, gelbbraun gefärbten ungesättigten Lipiden, d. h. trotz der für sie alle charakteristischen Farbkomponente, nicht einheitlich sind. Es lassen sich vielmehr zwei Grundtypen lipogener Pigmente voneinander abgrenzen, welche eine unterschiedliche kausale und formale Genese aufweisen und dementsprechend auch eine verschiedene biologische Bedeutung besitzen.

Der eine Typ der Lipopigmente tritt in Makrophagen bzw. in den zur Phagocytose befähigten Zellen auf. Dieses Pigment entsteht vornehmlich bei der Resorption fetthaltiger Gewebsanteile, und zwar besonders dann, wenn die Oxydation der Lipide durch Blutungen begünstigt wird, oder wenn es aus irgendeinem Grunde zur Autoxydation der Fettstoffe kommt. Seiner formalen Genese liegt also hauptsächlich ein oxydativer Umbau phagocytierter ungesättigter Lipide zugrunde. Proteine treten hier erst sekundär zu den gespeicherten Fettstoffen hinzu und spielen stets nur eine untergeordnete Rolle. In Übereinstimmung mit den Angaben in der modernen Literatur möchten wir dieses „mesenchymale“ *Lipopigment* als „Ceroid“ bezeichnen, zumal dieser Ausdruck auf die wachsartige und glänzende Beschaffenheit der voll ausgebildeten Granula hinweist, welche durch ihren relativ hohen Gehalt an unlöslichen Lipiden bedingt ist. Um Mißverständnisse bei der biologischen Interpretierung dieser Cytoplasmastrukturen zu vermeiden, sollte der Ausdruck „Ceroid“ für diesen Pigmenttyp aber auch dann verwendet werden, wenn die Oxydation und Polymerisation der Fettstoffe im Laufe der Alterung so weit fortgeschritten ist, daß sie ihre Sudanophilie und ihr wachsartiges Aussehen verloren haben.

Mit dem mesenchymalen Lipopigment ist das „Hämo-fuscin“ älterer Autoren identisch (vgl. hierzu PEARSE 1953, ZOLLINGER 1953, GEDIGK und FISCHER 1958). Da wir heute wissen, daß dieses Pigment auch unabhängig von Blutungen auftreten kann, erscheint es zweckmäßig, den präjudizierenden Begriff „Hämo-fuscin“ aufzugeben und an seiner Stelle den die histologischen und histochemischen Eigenschaften besser treffenden Namen „Ceroid“ zu benutzen.

Der andere Typ der Lipopigmente findet sich in Muskelfasern und Parenchymzellen. Er wird bei einem gestörten intermediären Umbau ungesättigter Lipide gebildet, die allmählich im Bereich eiweißhaltiger stoffwechselaktiver Cytoplasma-bezirke abgelagert und oxydiert werden. Hier stehen Proteine von Anfang an quantitativ im Vordergrund, von denen offenbar auch der Gehalt dieser Pigmente an Enzymen herrührt. Diese „parenchymatösen“ *Lipopigmente* sollten mit dem traditionellen Namen „Lipofuscin“ belegt werden, und zwar unabhängig davon, ob sie in epithelialen Zellen oder in quergestreiften bzw. glatten Muskelfasern auftreten. Die von Fall zu Fall wechselnde Sudanophilie dieser Strukturen wäre bei ihrer Nomenklatur ebenfalls nicht zu berücksichtigen, da ihre Affinität für Fettfarbstoffe, ebenso wie viele andere cytochemische Eigenschaften, von den dargelegten Entwicklungs- und Alterungsvorgängen abhängig ist und nicht auf prinzipielle Unterschiede hinweist.

Das beim experimentellen Vitamin E-Mangel in Muskelfasern gebildete Pigment besitzt zwar einige morphologische sowie kausal- und formalgenetische Besonderheiten und sollte deshalb nicht mit den üblichen Lipofuscinen, d. h. den sog. Abnutzungspigmenten, vollkommen identifiziert werden. Es stellt jedoch offenbar nur eine Variante der Lipofuscine dar. Um seine Verschiedenheit vom mesenchymalen Lipopigment zum Ausdruck zu bringen, möchten wir es nicht als Ceroid bezeichnen; und zwar auch dann nicht, wenn es im Laufe seiner Entwicklung einmal besonders reichlich sudanophile Lipide enthält und vorübergehend eine fast wachsartige Beschaffenheit besitzt.

Weitere Spielarten des Lipofuscins scheinen das von DUBIN und JOHNSON (1954) sowie HAMPERL (1957) in der Leber bei chronischem nichthämolytischem

Ikterus beschriebene Pigment und das von EHRENBAND und BURCKHART (1959) unlängst beobachtete eisenhaltige lipofuscinähnliche Pigment in der menschlichen Leber zu sein.

Zusammenfassung

Beim experimentellen Vitamin E-Mangel entstehen in glatten und quergestreiften Muskelfasern gelbe bis gelbbraune, fluoreszierende Lipopigmente. Sie enthalten Proteine sowie ungesättigte Lipide. Ihrer Eigenfarbe liegen Oxydations- und Polymerisationsprodukte hochungesättigter Fettsäuren zugrunde. Außerdem lassen sich im Bereich der Pigmentkörnchen Enzyme, und zwar vor allem saure Phosphatase und unspezifische Esterase, nachweisen.

Mit zunehmender Versuchsdauer kommt es zu einer Vermehrung und Vergrößerung der Pigmentkörnchen sowie zu einer charakteristischen Änderung ihrer färberischen und cytochemischen Eigenschaften. Dieser Umwandlung des Pigmentes liegen zwei nebeneinander ablaufende Vorgänge zugrunde: Erstens werden beim Vitamin E-Mangelzustand im Bereich eiweißhaltiger, stoffwechselaktiver Cytoplasmabezirke allmählich ungesättigte Lipide angehäuft, und zweitens werden diese abgelagerten Fettstoffe in zunehmendem Maße oxydiert und polymerisiert.

Zwei Grundtypen lipogener Pigmente lassen sich voneinander abgrenzen.

1. Lipopigmente, welche in Makrophagen bzw. in den zur Phagocytose befähigten Zellen nach Resorption fetthaltiger Gewebsanteile auftreten. Proteine kommen erst sekundär hinzu und spielen mengenmäßig stets eine untergeordnete Rolle. Dieses „mesenchymale“ Lipopigment sollte mit dem nichts präjudizierenden Ausdruck „Ceroid“ bezeichnet werden.

2. Lipopigmente in Muskelfasern und epithelialen Zellen bei einem gestörten intermediären Umbau ungesättigter Lipide. Diese Fettstoffe werden allmählich im Bereich stoffwechselaktiver, eiweißhaltiger Cytoplasmastrukturen angehäuft und oxydiert. Hier stehen Proteine quantitativ im Vordergrund. Für dieses „parenchymatöse“ Lipopigment wäre unabhängig von seinem jeweiligen Entwicklungsstadium der traditionelle Name „Lipofuscin“ zu wählen. Das Vitamin E-Mangelpigment besitzt einige formal- und kausalgenetische Besonderheiten; es stellt anscheinend aber nur eine Variante der Lipofuscine dar.

Summary

In experimental vitamin E-deficiency yellow to yellow-brown fluorescing lipopigments are formed in smooth and cross-striated muscle fibers. These pigments contain proteins as well as unsaturated lipids. Their color is due to the oxidation and polymerization products of poly-unsaturated fatty acids. In addition, enzymes can be demonstrated in the locality of the pigment granules, these being primarily acid phosphatase and non-specific esterase.

With prolongation of the experiment both multiplication and enlargement of the pigment granules occur, as well as a characteristic change in their color and cytochemical qualities. This alteration of the pigment is the result of two processes taking place simultaneously. First of all, in the state of vitamin E

deficiency unsaturated lipids are accumulated gradually in the region of protein-containing metabolically active cytoplasmic foci. Secondly, these deposited fat substances are oxidized and polymerized in increasing amounts.

Two basic types of lipogenous pigments can be differentiated from one another:

1. Lipopigments, which appear in macrophages after resorption of fat-containing tissue particles, or in those cells able to phagocytize. Proteins are added only secondarily, and always play quantitatively a subsidiary role. This "mesenchymal" lipopigment should be referred to with the non-biasing term as "ceroid".

2. Lipopigments in muscle fibers and in parenchymal cells in a disturbed intermediary transformation of unsaturated lipids. These fat substances are gradually accumulated in the region of the metabolically active protein-containing cytoplasmic structures, and are oxidized. Here proteins stand quantitatively in the foreground. For this "parenchymatous" lipopigment one should select the traditional term "lipofuscin", independent of its respective stage of development. The vitamin E deficiency pigment possesses some morphologic and etiologic particularities; it apparently represents, however, only a variant of the lipofuscin.

Literatur

- AMES, S. R., and P. L. HARRIS: Recent developments in the chemistry and metabolism of vitamin E. *Internat. Z. Vitaminforsch.* **22**, 26 (1950). — ASCHOFF, L.: Zur Morphologie der lipoiden Substanzen. *Beitr. path. Anat.* **47**, 1—50 (1910). — BACHMANN, K. D.: Über das Lipofuscin der Leber. *Virchows Arch. path. Anat.* **323**, 133—142 (1953). — BARRIE, M. M. O.: Vitamin E-deficiency in the rat. III. Fertility in the female. *Biochem. J.* **32**, 2134 (1938). — BECKMANN, R.: Vitamin E (Physiologie, pathologische Physiologie und klinische Bedeutung). *Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch.* **7**, 1—166 (1955). — BENSLEY, R. R.: *Anat. Rec.* **98**, 609 (1947). *Zit. nach* PEARSE. — BRAHN, B., u. M. SCHMIDTMANN: Pigmentstudien. Zur Kenntnis des Melanins und des braunen Abnützungspigmentes. *Virchows Arch. path. Anat.* **227**, 137—145 (1920). — Zur Pigmentfrage. *Virchows Arch. path. Anat.* **239**, 488—490 (1922). — CASSELMAN, W. G. B.: The in vitro preparation and histochemical properties of substances resembling ceroid. *J. exp. Med.* **94**, 549—562 (1951). — CAREY, M. M., and D. D. DZIEWLATKOWSKI: The adenosintriphosphatase (acid and alkaline) activity of muscle homogenates from rabbits on a vitamin E-deficient diet. *J. biol. Chem.* **179**, 119 (1949). — DAM, H., and H. GRANADOS: Peroxidation of body fat in vitamin E-deficiency. *Acta physiol. scand.* **10**, 162—171 (1945). — Role of unsaturated fatty acids in changes of adipose and dental tissues in vitamin E-deficiency. *Science* **102**, 327—328 (1945). — DEBUCH, H.: Biochemie der Lipide. *Acta histochem. (Jena)* **2**, 135—148 (1955). — DUBIN, J. N., and F. B. JOHNSON: *Medicine* **3**, 155 (1954). *Zit. nach* HAMPERL 1957. — EDER, M.: Histochemische Fermentnachweise. Ihre Bedeutung in der Pathologie. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**, 374—394 (1958). — EHRENBRAND, F., u. TH. BURKHART: Ablagerung eines eisenhaltigen lipofuscinähnlichen Pigmentes in der menschlichen Leber. *Ärzt. Forsch.* **13**, 149—157 (1959). — EINARSON, L.: Criticizing review of the concepts of the neuro-muscular lesions in experimental vitamin E-deficiency, preferably in adult rats. *Acta psychiat. scand. Suppl.* **78**, 1—76 (1952). — EINARSON, L., and A. RINGSTED: Effect of chronic vitamin E-deficiency on the nervous system and the skeletal musculature in adult rats. Copenhagen and London 1938. — ELFTMAN, H., H. KAUNITZ and C. A. SLANETZ: Histochemistry of uterine pigment in vitamin E-deficient rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **52**, 72—79 (1949). — ENDICOTT, K. M.: Similarity of the acid-fast pigment ceroid and oxidized unsaturated fat. *Arch. Path. (Chicago)* **37**, 49—53 (1944). — 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). — FARIA, J. L. DE: Uterine and vaginal changes in vitamin E deficiency. *J. Amer. med. Ass.* **131**, 626 (1946). — FOLLIS jr.,

R. H.: Deficiency disease. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1957. — GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* **30**, 1057—1065 (1952). — Histochemische Methoden. In: *Biochemisches Taschenbuch*, S. 855—891. Berlin: Springer 1956. — Zur Kenntnis lipogener Pigmente. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**, 430—434 (1958). — 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). — GEDIGK, P., u. R. FISCHER: Über die Entstehung des Ceroidpigmentes bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 341—370 (1958). — GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* **1**, 48—96 (1958). — GOMORI, G.: *Microscopical histochemistry*. Chicago, Ill.: University Press 1953. — *Histochemistry of human esterases*. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 479—484 (1955). — GOVIER, W. M., u. N. S. JETTER: The effect of a α -Tocopherol Phosphate on Diphosphopyridine-Nucleotidase. *Science* **107**, 146 (1948). — GRANADOS, H., and H. DAM: On the histochemical relation between peroxydation and the yellow-brown pigment in the adipose tissue of vitamin E-deficient rats. *Acta path. microbiol. scand.* **27**, 591—596 (1950). — 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). — GRÖRGY, P., and H. GOLDBLATT: Observations on the conditions of dietary hepatic injury (necrosis, cirrhosis) in rats. *J. exp. Med.* **75**, 355—368 (1942). — HAMPERL, H.: Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **292**, 1 (1934). — Über fluoreszierende Körnchenzellen „Fluorocyten“. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 32—47 (1950). — Chronischer nicht hämolytischer Ikterus mit Ablagerung eines eigentümlichen Pigmentes in der Leber. *Klin. Wschr.* **35**, 177 (1957). — HARTROFF, 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). — HASS, G. M.: Tissue reactions to natural oils and fractions thereof. *Arch. Path. (Chicago)* **26**, 955—965 (1938). — Intracellular transformation of unsaturated fatty acids and esters. *Arch. Path. (Chicago)* **26**, 1196—1207 (1938). — Membrane formation at lipid-aqueous interfaces in tissues. *Arch. Path. (Chicago)* **27**, 177—198 (1939). — HEIDENREICH, O., u. G. SIEBERT: Untersuchungen am isolierten unveränderten Lipofuscin der Herzmuskulatur. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 112—126 (1955). — HESSLER, W.: Effect de la carence en vitamin E sur la structure et la réactivité de l'utérus de la rate. *Z. Vitaminforsch.* **11**, 9 (1941). — HICKMAN, K. C. D., and P. L. HARRIS: Tocopherol interrelationships. *Adv. Enzymol.* **6**, 469 (1946). — HOFFMANN-OSTENHOR, O.: *Enzymologie*. Wien: Springer 1954. — HUECK, W.: Die pathologische Pigmentierung. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie von KREHL-MARCHAND*, Bd. 3, S. 298—481. 1921. — JÜRGENS, R.: Symptomatologie und Therapie der E-Avitaminose. In K. LANG u. R. SCHOEN, *Die Ernährung*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — KUTSCHERA-AICHBERGEN, H.: Über Melanin und über das braune Abnützungspigment. *Frankfurt. Z. Path.* **27**, 21—55 (1922). — 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). — LILLIE, R. D.: *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: Blakiston & Co. 1954. — LINDNER, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchung von braunen fluoreszierenden Pigmenten bei Vitamin E-Mangel. *Ärztl. Forsch.* **8**, 505—513 (1954). — Die submikroskopische Struktur der pigmenthaltigen glatten Muskelzellen im Uterus von Vitamin E-Mangel-Ratten. *Beitr. path. Anat.* **117**, 1—16 (1957). — Der elektronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 46—91 (1958). — LISON, L.: *Histochemie et cytochimie animales*. Paris: Gauthier-Villars 1953. — LUBARSCH, O.: Über fetthaltige Pigmente. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **13**, 881—883 (1902). — Über das sogenannte Lipofuscin. *Virchows Arch. path. Anat.* **239**, 491 (1922). — MARKEES, S.: Über Vitamin E. Experimentelle Ergebnisse und therapeutische Erfahrungen. *Int. Z. Vitaminforsch.* **22**, 335 (1950). — MARTIN, A. J. P., u. T. MOORE: Changes in the uterus and kidneys in rats kept on a Vitamin E-free diet. *Chem. and Ind.* **55**, 236 (1936). — Some effects of prolonged vitamin E-deficiency in the rat. *J. Hyg. (Lond.)* **39**, 643 (1939). — MARTIUS, C.: Die oxydative Phosphorylierung und ihre hormonelle Steuerung. *Klin. Wschr.* **35**, 223—225

(1957). — MASON, K. E., H. DAM and H. GRANADOS: Histological changes in adipose tissue of rats fed a vitamin E-deficient diet high in cod liver oil. *Anat. Rec.* **94**, 265 (1946). — MASON, K. E., and A. F. EMMEL: Vitamin E and muscle pigment in the rat. *Anat. Rec.* **92**, 33—60 (1945). — MASON, K. E., and I. R. TELFORD: Some manifestations of vitamin E-deficiency in the monkey. *Arch. Path.* **43**, 363—373 (1947). — MEESSEN, H.: Organveränderungen chronisch Vitamin E-frei ernährter Ratten. *Ärztl. Forsch.* **2**, 98 (1948). — MOORE, T., and Y. L. WANG: *Brit. J. Nutr.* **1**, 53 (1947). Zit. nach LINDNER 1954. PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and applied*, London 1953. — Intracellular localisation of dehydrogenase systems using monotetrazolium salts and metalchelation of their formazan. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 515—527 (1957). — POCHÉ, R.: Submikroskopische Beiträge zur Pathologie der Herzmuskelzelle bei Phosphorvergiftung, Hypertrophie, Atrophie und Kaliummangel. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 165—248 (1958). — RUPPEL, W.: Organveränderungen bei E-avitaminotischen Ratten. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **206**, 584—601 (1949). — SJÖSTRAND, F. S.: Die funktionelle Bedeutung des Ultrafeinbaues von Gewebezellen. *Klin. Wschr.* **35**, 237—250 (1957). — SLATER, E. C.: Possible role of vitamin E in respiratory chain. Vortr. 4. Internat. Kongr. für Biochemie in Wien 1958. Ref. *Klin. Wschr.* **37**, 411 (1959). — SMITH, L. C., and S. NEHORAYAN: Effect of vitamin E-deficiency and dietary glycine on tissue phosphatase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **98**, 40—42 (1958). — STEIGLEDER, G. K., u. K. SCHULTIS: Zur Histochemie der Esterasen der Haut. *Arch. klin. exp. Derm.* **205**, 196—211 (1957). — WOLMAN, M.: Staining of lipids by the periodic-acid-Schiffreaktion. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **75**, 583—585 (1950). — The lipids stained by the periodic acid-Schiff technique. *Stain Technol.* **31**, 241—245 (1956). — ZOLLINGER, H. U.: Lokalisation und Bedeutung des Ceroidpigmentes. *Schweiz. Z. allg. Path.* **16**, 1026—1040 (1953).

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