

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. LINZBACH)

Zur Morphologie und Histochemie der Lipide normaler Säugerlebern bei künstlicher Autolyse

Von

D. SINAPIUS und H. KALBFLEISCH

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. September 1962)

Die zuerst von HAUSER (1885) beobachtete Erscheinung, daß während künstlicher Autolyse in den Leberzellen vorher unsichtbare Fette auftreten, wurde zunächst als Fettneubildung gedeutet (HAUSER 1885, LINDEMANN 1899). Chemische Analysen (KRAUS 1887, SIEGERT 1902, OHTA 1910, SHIBATA 1911, HESS und SAXL 1908) haben diese Annahme widerlegt, weil die Gesamtmenge der Fettsäuren während der Autolyse nicht größer wird, also offenbar nur Lipide sichtbar gemacht werden, die schon vorher im Cytoplasma fein verteilt, fest gebunden und nicht färbbar vorhanden waren. Seither gilt die künstliche Autolyse als Methode zur Darstellung maskierter invisibler Fette.

Obwohl diese als Myeline bezeichneten Lipide schon seit langem bekannt sind, hat erst FEYRTER (1956) in einer neueren Arbeit erhebliche Unterschiede ihrer Menge, Lokalisation und Verteilung im Lappchen von Leichenlebern beschrieben und offen gelassen, ob dem eine unterschiedliche Fermentaktivität oder örtlich wechselnde Mengen des Ausgangsmaterials zugrunde liegen. Welche Fermente bei künstlicher Autolyse der Leberfette wesentlich sind, ist noch nicht histochemisch untersucht.

Künstliche Autolyse ist heute nicht mehr die einzige Methode zur Sichtbarmachung fein verteilter Fettstoffe. Die Darstellung gelingt auch fluoreszenzmikroskopisch (BERG 1951) und färbereich (SINAPIUS 1961). Über die Beziehungen zwischen Autolysefetten und fein verteilten leicht extrahierbaren sudanophilen Lipiden ist noch nichts bekannt.

Neben den eigentlichen Autolyselipiden (Myelinen) haben Autolyseveränderungen an den Fetttropfen der Leber kaum Beachtung gefunden. Die vollständige Auflösung von Fetttropfen bei künstlicher Autolyse ist wohl bekannt, Vorstadien und andere Veränderungen sind aber noch nicht genügend untersucht.

Alle durch Autolyse bedingten Änderungen im färbereich, histochemischen und physikalischen Verhalten der tropfigen und nicht tropfigen Lipide der Leber haben praktische Bedeutung, weil mit ihnen auch im Sektionsmaterial zu rechnen ist.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde versucht, folgendes zu klären:

1. Lokalisation, Verteilung und Menge von Autolyselipiden in der Leber verschiedener Säugetiere, vor allem von Schlachttieren.
2. Histochemie der Autolyselipide auch mit Anwendung neuer Methoden.
3. Beziehungen zwischen Autolyselipiden und färbereich darstellbaren fein dispersen Lipiden.

4. Autolyseveränderungen an den Fetttropfen der Leber bei physiologischer Verfettung.

5. Histochemie fettspaltender Enzyme bei künstlicher Autolyse der Leber.

Material und Methodik

Das Untersuchungsmaterial umfaßt Lebern von mehr als 100 Schweinen, 10 Kälbern, 10 Rindern, 10 Schafen, 5 Kaninchen und 5 Ratten.

2—5 mm dicke Gewebstücke wurden unmittelbar nach der Schlachtung den Lebern entnommen und der künstlichen Autolyse in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37° unterworfen. Von jeder Leber wurde außerdem Kontrollmaterial ohne Autolyse sofort in 4%iges Formalin eingelegt.

Bei 10 Schweinelebern wurden Gewebstückchen gleichzeitig teils unter sterilen Bedingungen, teils unsteril autolysiert und die Ergebnisse anschließend verglichen. Bei allen übrigen Fällen wurde auf sterile Versuchsbedingungen verzichtet, weil sie in Übereinstimmung mit den Beobachtungen FEYRTERS das Untersuchungsergebnis nicht erkennbar beeinflussen.

Das Material wurde nach Autolysezeiten von 3, 6, 10, 24 und 48 Std, bei einzelnen Fällen auch nach 3—7tägiger Autolyse für 12—24 Std in 4%igem Formalin fixiert.

Die Plasmareaktion wurde an nativen Gefrierschnitten, alle übrigen Färbungen und Reaktionen wurden an formolfixierten 10 μ starken Gefrierschnitten durchgeführt.

Außerdem wurden native Gefrierschnitte flottierend der Autolyse in Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten unterworfen und anschließend mit 0,01%igem Methylviolett im Einschußverfahren gefärbt.

Ergebnisse

1. Autolyselipide (*allgemeine Beobachtungen*)

In Leberzellen mit und ohne Fetttropfen bilden sich bei künstlicher Autolyse abgrenzbare Lipidteilchen (Autolyselipide im engeren Sinne), die sich mit kolloidalem Sudan Schwarz B anfärben. Gleichzeitig wird die durch fein disperse Lipide hervorgerufene diffuse Schwärzung des übrigen Cytoplasmas erheblich abgeschwächt. Autolyselipide bestehen, wie die lichtmikroskopische Betrachtung bei starken Vergrößerungen lehrt, aus sehr kleinen Einzelteilchen mit einem Durchmesser zwischen 0,2 und 0,6 μ , durchschnittlich 0,4 μ (Abb. 1). Diese Teilchen neigen dazu, sich örtlich zusammenzulagern, ohne miteinander zu verschmelzen und bilden dadurch vielgestaltige Formationen, deren feinkörnige Struktur bei starken Vergrößerungen an ausreichend dünnen Gefrierschnitten meist gut zu erkennen ist. Typische Aggregationsformen der Autolyselipide sind unter anderem Kreise an der Außenseite der Kernmembran, verzweigte Längsreihen und unregelmäßige, unscharf begrenzte Haufen, die aus vielen Einzelteilchen bestehen. In 24stündiger Autolyse entwickeln sich oft eigenartige polymorphe Gebilde von 0,5—1,0 μ Durchmesser mit scharfen intensiv schwarzen Randkonturen und blaßgrauem oder farblosem Zentrum, die, wie stärkste lichtmikroskopische Vergrößerungen zeigen, auch aus feinsten Körnchen zusammengesetzt sind. Haufenförmige Ansammlungen von Autolysekörnchen mit dichtem Zentrum und aufgelockerter Randzone liegen am Schnitt oft teilweise außerhalb der Leberzellen über den Sinusoiden und überschreiten gelegentlich mit einem Durchmesser von mehr als 30 μ die Grenzen einzelner Leberzellen (Abb. 1b).

Innerhalb der Leberzellen liegen die Autolysekörnchen unregelmäßig verstreut (diffusocellulär) (Abb. 1a), entlang den Sinusoiden perlschnurähnlich aufgereiht (pericapillär) (Abb. 4 und 6), in der Umgebung der Galleepillaren bzw. zwischen

ihnen (peribilär) (Abb. 1c) oder herdförmig angehäuft (Abb. 1b). Von diesen vier Grundformen der intracellulären Lokalisation können jeweils zwei in einer Zelle oder Zellgruppe kombiniert auftreten, so z.B. die pericapilläre mit einer geringen diffusocellulären, die diffusocelluläre mit der herdförmigen und die peribiläre mit einer geringen diffusocellulären, nicht dagegen die pericapilläre mit der peribilären oder der herdförmigen Lokalisation.

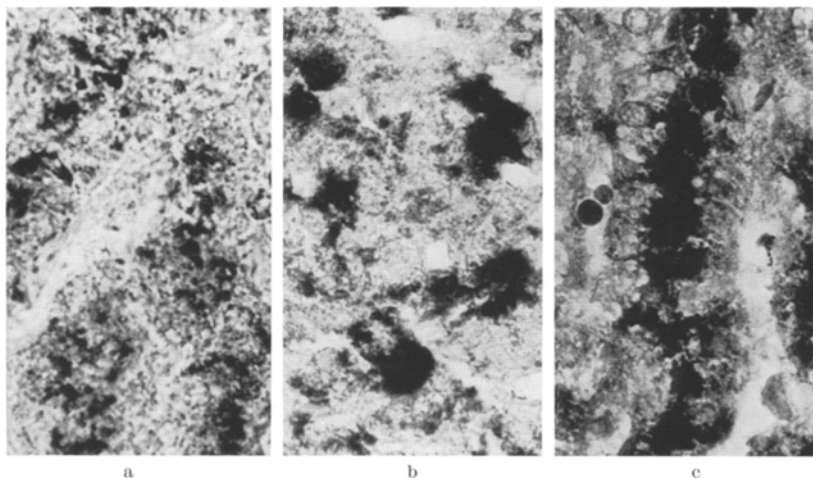


Abb. 1. a Spärliche peribiläre und diffusocelluläre Autolysolipidkörnchen in Läppchenabschnitt ohne Fetttropfen. b Herdförmige Anhäufung von Autolysolipiden (Leberzellen ohne Fetttropfen, Sternzellenverfettung). c Starke peribiläre Anhäufung von Autolysolipiden (Leberzellen ohne Fetttropfen). Autolyse 24 Std. — Schweineleber. Sudanschwarz B 0,5 % in 55 %igem Alkohol. 650fach

2. Färberische und histochemische Eigenschaften der Autolysolipide

Unter den Sudanfarbstoffen ist *Sudanschwarz B* in kolloidaler Lösung zur Darstellung der Autolysolipide am besten geeignet.

Tabelle. Färberisches und histochemisches Verhalten der Autolysolipide

1. Sudan III	Ø
2. Sudanschwarz B 0,2 % in 70 %igem Alkohol	(+)
3. Sudanschwarz B 0,5 % in 55 %igem Alkohol	+
4. Benzpyren-Coffein (BERG)	+
5. Nilblausulfat 0,03 % pH 2,3 (Citratpuffer)	+ (blau)
6. Methylviolett 0,01 % pH 2,0	+
7. Kresylviolett-Weinsäure nach FEYRTER	+
8. Thionin-Weinsäure nach FEYRTER	+
9. Perjodsäure-Leukofuchsin (PAS)-Reaktion	+
10. PAS-Reaktion nach Bromierung (15 min)	(+)
11. Perameisensäure-Leukofuchsin (PFAS)-Reaktion	+
12. PFAS-Reaktion nach Bromierung (15 min)	(+)
13. UV-Schiff-Reaktion nach BELT und HAYES	+
14. Chromierungsverfahren	+
15. Cholesterinnachweis (FEIGIN)	Ø
16. Plasmalreaktion (native Gefrierschnitte)	Ø
17. Fettsäurenachweis nach MEYER-BRUNOT	+
18. Methylenblaubindung	bis pH 2,5

Sudan III färbt auch in kolloidaler Lösung nach ROMEIS oder nach FROBOESE und SPRÖHNLE nur einen geringen Teil der Autolysolipide und auch diesen nur sehr schwach an, ist also nicht brauchbar. Auch Sudanschwarz B in der üblichen gesättigten (0,2 %igen) Lösung

erfaßt höchstens einen geringen Teil der Autolyselipide. Mit einer kolloidalen, also stark übersättigten 0,5%igen Lösung von Sudanschwarz B in 55%igem Alkohol lassen sich dagegen die Autolyselipide in den ersten 24 Std künstlicher Autolyse vollständiger und präziser, als mit allen anderen allgemeinen und speziellen Methoden darstellen. Die Lösung färbt schon in frühen Stadien der Autolyse die feinsten Lipidteilchen deutlich an und ist hierin allen anderen Darstellungsmethoden überlegen. Um unspezifische Färbefeffekte abgrenzen zu können, empfiehlt es sich, gleichzeitig einen extrahierten Kontrollschnitt mitzufärben. Färbungen mit kolloidalem Sudanschwarz B lassen eindeutig erkennen, daß mit dem Auftreten der Autolyselipide die diffuse Sudanophilie der fein dispersen Lipide abbläßt.

Zu den allgemeinen Darstellungsmethoden rechnet auch die Fluorochromierung der Autolyselipide durch Benzpyren-Coffein (BERG). Die Methode ist aber hier nicht zu empfehlen, weil sie die feinsten Lipidkörnchen nicht präzise erfaßt, und die Präparate nicht haltbar sind. Eigenfluoreszenz besitzen die Autolyselipide nicht.

Die Autolyselipide lassen sich in 10 min leicht mit Methanol-Chloroform 1:1 *extrahieren*. Nach Extraktionen mit Aceton und Äthanol zeigen 10 μ starke Gefrierschnitte dagegen noch schwach sudanophile Reste der körnigen Lipide.

Mit *Chromierungsverfahren* lassen sich die Autolyselipide kontrastreich darstellen; die feinsten Körnchen im Frühstadium der Autolyseveränderungen werden aber nicht erfaßt.

Die Chromierung kann nach der alten Vorschrift von SMITH-DIETRICH erfolgen. Kürzer und nicht weniger zuverlässig ist die Chromierung mit 5%iger Chromsäure, wie oben bereits zur Darstellung der feindispersen Lipide empfohlen. Durch beide Chromierungsverfahren, deren relative Spezifität als Lipidfärbung durch eine gleichzeitige Extraktionskontrolle gesichert wird, färben sich die Autolyselipide tiefschwarz oder dunkelblauschwarz an und heben sich dadurch kontrastreich vom übrigen nur schwach gelbbraunlichen Cytoplasma ab.

Die Autolyselipide lassen sich auch mit *basischen Farbstoffen* anfärben, so z. B. mit saurem Kresylviolett und Thionin im Einschlußverfahren nach FEYTER, mit Methylviolett, Methylenblau und mit Nilblausulfat. Bis 24 Std nach Autolysebeginn gelingt mit 0,01%igem Methylviolett bei p_H 2,0 eine nahezu elektive Darstellung der Autolyselipide, weil das übrige Gewebe weitgehend ungefärbt bleibt. Autolyselipide zeichnen sich also durch eine ausgesprochene Basophilie aus. Nilblausulfat färbt sie bis p_H 2,3 intensiv blau an.

Autolyselipide verhalten sich bei der UV-Schiff-, bei der PAS- und der PFAS-Reaktion positiv, werden also rot getönt. Die Reaktionen werden durch Bromierung weitgehend blockiert.

Durch die Fettsäurereaktion nach MEYER-BRUNOT werden die Lipidkörnchen braun oder braungelb dargestellt.

Nach Autolysezeiten von 2—7 Tagen können sich vornehmlich bei tropfenförmiger Leberzellverfettung folgende *Eigenschaften der Autolyselipide ändern*: Die Färbbarkeit mit kolloidalem Sudanschwarz B und die Basophilie nehmen erheblich ab. Die Körnchen färben sich mit kolloidalem Sudanschwarz B oft nur noch grau oder grauschwärzlich und verwaschen an. Sie lassen sich mit Methylviolett nicht mehr bei p_H 2,0, sondern relativ schwach bei p_H 2,3 und kräftig erst bei p_H 3,0, mit Nilblausulfat bei p_H 2,3 rötlich und erst bei p_H 3,2 blau anfärben. Mit abnehmender Basophilie schwindet auch die Perjodatreaktivität der Körnchen. Durch die Fettsäurereaktion nach MEYER-BRUNOT werden dagegen auch bei längeren Autolysezeiten alle Lipidteilchen präzise und zunehmend intensiv braun dargestellt. Darüber hinaus zeigen Lebern mit tropfiger Verfettung bei Behandlung nach MEYER-BRUNOT meist örtlich begrenzte dichte Ansammlungen

dunkelbrauner Fetteilchen, die durch keine andere Färbung und Reaktion erfaßt werden.

Die Prüfung der *Methylenblaubindung* von Tropfextrakten hat folgendes ergeben: In Lebern ohne Leberzellverfettung bleibt die Basophilie der Aceton-Tropfextrakte bei Autolyse unverändert, während die der Chloroformextrakte bei tiefen p_H -Werten etwas abnimmt (von p_H 2,3 auf 2,8). Bei Leberzellverfettung wird die Basophilie von Chloroformextrakten durch längere Autolyse (48 Std) von p_H 3,3 auf p_H 4,2 eindeutig abgeschwächt.

3. Autolyseveränderungen an den Fetttropfen der Leberzellen und der Kupfferschen Sternzellen

Bei künstlicher Autolyse *ändern* sich im Verlauf weniger Stunden die *Färbbarkeit* mit basischen Farbstoffen und das Verhalten der Tropfen bei der Fettsäure-Reaktion nach MEYER-BRUNOT.

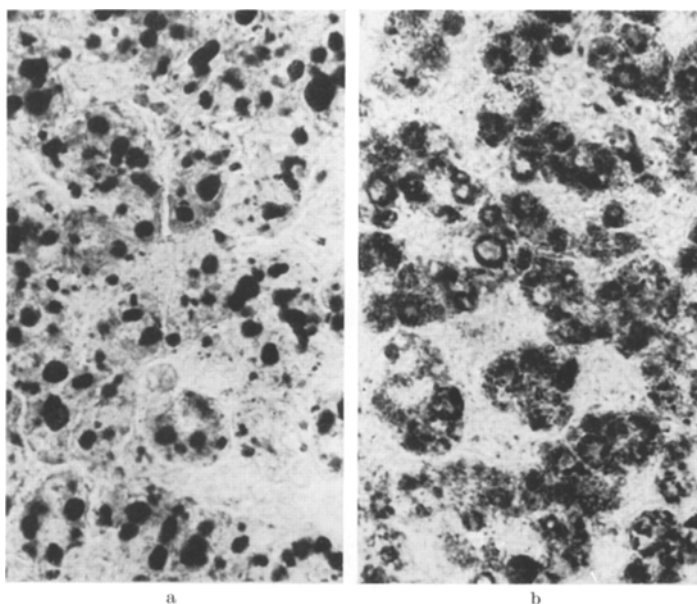


Abb. 2. Autolysebefund (b) bei starker pericapillärer und diffusocellulärer Leberzell- und bei Sternzellenverfettung. (a) Auflösung der großen Fetttropfen (Konturen!). Diffusocelluläre Autolysekörnung. Autolyse 24 Std. Kalbsleber. Sudanschwarz B 0,5 % in 55 %igem Alkohol. 600fach

Native Gefrierschnitte wurden 4, 10 und 20 Std auf Pufferlösung vom p_H 3, 5, 7 und 9 schwimmend bei 40° im Wärmeschränk aufbewahrt und danach mit 0,01 %igem Methylviolett vom p_H 2,8 nach dem Einschlußverfahren gefärbt. Nach 4 Std sind zunächst nur die Tropfen der p_H 5-Schnitte, nach 20 Std auch die der p_H 3-Schnitte und (teilweise) die der p_H 7-Schnitte basophil. Nach Aufbewahrung bei p_H 9 bleibt die Basophilie aus.

Die Entwicklung der autolytischen Basophilie hängt also wesentlich von der umgebenden aktuellen Reaktion ab. Sie bleibt vollständig aus, wenn für 3—5 min in 1 %igem Sublimat fixiert oder der Inkubationslösung E 600 (10^{-4} mol) zugesetzt wird. Auch wenn das Material als Gewebstück mindestens 12 Std bei 40° der Autolyse unterworfen und dann nach 3stündiger Formol-Fixation untersucht wird, färben sich die Tropfen lebhaft mit basischen Farbstoffen an. Alle basophilen

Tropfen verhalten sich bei der Fettsäurereaktion nach MEYER-BRUNOT stark positiv, d.h. nehmen einen gelbbraunen bis dunkelbraunen Farbton an. Die Farbintensität ist am Rand der Tropfen meist am stärksten. Die Methylenblaubindung der basophilen Tropfen ist relativ schwach und reicht höchstens bis pH 4,0.

Fetttropfen können schon in frühen Autolysestadien im Zentrum *abblassen*, bis sich schließlich nur noch ihre Randkonturen anfärben (Abb. 2). Beschränkt sich diese Abblassung auf eine Tropfenhälfte, dann bleiben halbmond- oder sichel-

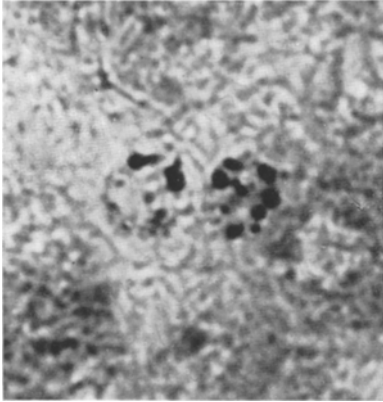


Abb. 3. Feintropfiger Zerfall basophiler Fettropfen der Sternzellen nach 7 Std Autolyse. Schweineleber. Sudanschwarz B 0,5 % in 55 %igem Alkohol. 1000fach

förmige Resttropfen erhalten. Alle Tropfenreste (Randkonturen, Halbmonde und Sichel) sind basophil, also z. B. mit Methylviolett bis pH 2,0 und mit Nilblausulfat bei pH 2,3 in blauem Farbton färbbar und verhalten sich bei der Reaktion nach MEYER-BRUNOT, die Randkonturen darüber hinaus auch bei UV-Schiff-Reaktion positiv. Erscheinungen der Abblassung entwickeln sich oft bereits in den ersten sechs Autolysestunden an einem Teil der Tropfen, vorwiegend der Lappchenperipherie und des intermediären Lappchenabschnitts.

Fettropfen können schon in den ersten sechs Autolysestunden in zahlreiche kleine basophile Lipidtröpfchen und -körnchen

zerfallen, in den Kupfferschen Sternzellen oft in 10—20 Tröpfchen unterschiedlicher Größe, die sich bei Färbungen mit kolloidalem Sudanschwarz B und mit basischen Farbstoffen sehr deutlich abheben (Abb. 3). In den Leberzellen sammeln sich die durch Auflösung freiwerdenden kleinen Tröpfchen manchmal als dichter Saum am Rand der abgeblähten Tropfen an.

4. Die Lipaseaktivität

Die Lipaseaktivität wurde an nativen und an Gefrierschnitten fixierten Materials (3 Std in 10%igem Formalin) mit der Metallsalzmethode (Bleisulfidmethode) nach GOMORI (1945) und der Azofarbstoffmethode nach NACHLAS und SELIGMAN (1949) geprüft.

Native und in dieser Weise fixierte Schnitte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lipaseaktivität bei beiden Methoden nur wenig. Die 3stündige Formalinfixierung bewirkt also keine wesentliche Abschwächung der gestaltlich faßbaren Fermentaktivität. Mit beiden Methoden bilden sich in jeder normalen Leber körnige Reaktionsprodukte an den Leberzellen und den Sternzellen bzw. dicht neben diesen Zellen. Die Gesamtmenge der Reaktionsprodukte hängt einerseits von der Fermentaktivität des Gewebes, andererseits auch von der Untersuchungsmethodik ab. Feinere örtliche Unterschiede der Lipaseaktivität ließen sich nur bei einer abgeschwächten Azofarbstoffreaktion (NACHLAS und SELIGMAN) erfassen (zwei Tropfen einer 1%igen Lösung von 1-Naphthylacetat auf 10 cm^3), wenn kurz (3—5 min) inkubiert wurde.

Bei konstanter Anwendung dieser Methode ergaben sich folgende Beziehungen zwischen der Stärke und Lokalisation der physiologischen tropfigen Verfettung, der Autolyseverfettung und der Lipaseaktivität: a) Je stärker die tropfige Ver-

fettung und die Autolyseverfettung, desto größer die Gesamtmenge der Fermentreaktionsprodukte; b) Zellen und Zellteile mit reichlich fein dispersen Fetten besitzen meist eine stärkere Lipaseaktivität als andere; c) In unmittelbarer Umgebung der Fetttropfen und im Bereich örtlicher Anhäufungen von Autolyselipiden besteht eine verstärkte Lipaseaktivität. Bei pericapillärer Verfettung und pericapillärer Autolysekörnelung liegen also die Reaktionsprodukte der Azofarbstoffmethode vorwiegend pericapillär.

Zur weiteren Klärung der Beziehungen zwischen Lipaseaktivität und Autolyseveränderungen wurde die *Wirkung der Esteraseinhibitoren* E 600 und Diisopropyl-fluorophosphat (DFP) an nativen Schnitten während der Autolyse bei 37° geprüft (Konzentration der Inhibitoren 10^{-4}). Während Kontrollschnitte von Lebern mit starker pericapillärer Verfettung nach 2—3 Std schon einige Autolysekörnchen und nach 6 Std zahlreiche basophile Tropfen zeigten, entwickelten sich bei Zusatz von E 600 auch nach längeren Autolysezeiten nur spärliche Autolyselipide und keine Basophilie der Fetttropfen. Durch DFP wurde die Autolyse nicht beeinflusst.

5. Die Autolysemuster

Je nach der Menge und Verteilung der Autolyselipide und dem Ausmaß der Fetttropfenveränderungen entwickelt sich spätestens in 24 Std Autolyse ein Autolysemuster, das mit geringen Abweichungen in allen Läppchen wiederkehrt und von der jeweiligen Lipaseaktivität und der Menge und Lokalisation der färbaren Lipide vor der Autolyse abhängt. Auch zwischen dem zeitlichen Ablauf der Autolyseveränderungen und dem Verfettungstypus bestehen Beziehungen. In 24 Std entwickeln sich vor allem folgende Autolysemuster:

a) Bei Lebern ohne Fetttropfen der Leberzellen, aber mit Sternzellen-Fetttropfen: Frühzeitige Auflösung der Sternzellen-Tropfen oft schon 3—6 Std nach Beginn, relativ späte Entwicklung und geringe Menge der Autolyselipide (vollständiges Autolysemuster oft erst nach 20—24 Std) meist diffusocelluläre (Abb. 1a) oder herdförmige (Abb. 1b), seltener peribiläre (Abb. 1c) Lokalisation der Autolyselipide, gleichmäßige Verteilung dieser Formen in Leberläppchen und gleichmäßig geringe Lipaseaktivität (bevorzugt an den Sternzellen) im ganzen Läppchen.

b) Bei Lebern mit geringer peripherer pericapillärer Leberzellverfettung: Beginn der Autolyseveränderungen nach 3 Std mit Auflösung der Sternzellentropfen und Entwicklung peripherer pericapillärer Autolysekörnchen, nach 24 Std pericapilläre Autolyselipide in der Peripherie und gemischt diffusocellulär-herdförmige oder peribiläre Autolysekörnelung im übrigen Läppchen (Abb. 6), Menge der Autolyselipide in der Peripherie eindeutig größer als in den Zentren, in der Peripherie auch vorwiegend pericapillär verstärkte Lipaseaktivität und Vermehrung fein disperser Lipide. Bei Lebern mit geringer pericapillärer Leberzellverfettung im ganzen Läppchen Ausdehnung der peripheren Autolyseveränderungen des Typus b auf das ganze Läppchen.

c) Bei Lebern mit mittelstarker bis starker pericapillärer Leberzellverfettung im ganzen Läppchen unter Bevorzugung der Peripherie: Beginn der Autolyseveränderungen schon nach 3 Std, pericapilläre Autolysekörnelung im ganzen Läppchen, sekundär diffusocelluläre in der Peripherie (Abb. 4), relativ große Menge der Autolyselipide vor allem in der Peripherie, zunächst zunehmende

Basophilie der Fetttropfen, später Abblassung und Auflösung der Tropfen, starke besonders pericapilläre Lipaseaktivität (Abb. 5).

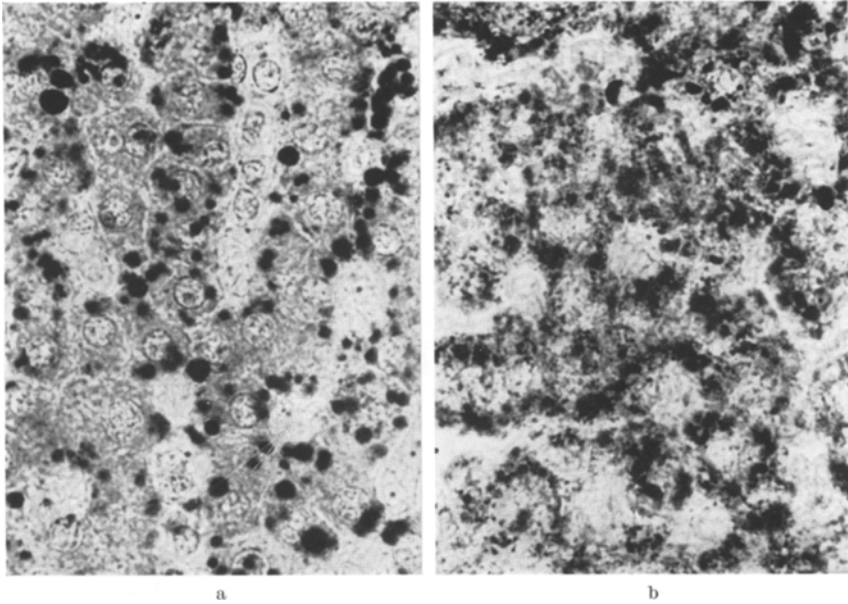


Abb. 4a u. b. Autolysebefund (b) bei mittelstarker pericapillärer Leberzell- und bei Sternzellenverfettung (a). — b Fast vollständige pericapilläre und geringe diffusocelluläre Autolysekörnelung. Auflösung der Fetttropfen. Autolyse 24 Std. Schweineleber. Sudanschwartz B 0,5 % in 55 %igem Alkohol. 600fach



Abb. 5. Starke pericapilläre Lipaseaktivität bei pericapillärer Autolysekörnelung (Abb. 4). Schweineleber. Azofarbstoffmethode (NACHLAS u. SELIGMAN). Gefrierschnitt nach 3stündiger Fixation in 10 %igem Formalin

Aus den Beobachtungen ergeben sich folgende Regeln: Die rein diffusocelluläre, herdförmige und peribiläre Autolyseverfettung entwickelt sich ausschließlich in Lebern und Lappenabschnitten ohne tropfige Leberzellverfettung bei

relativ geringer Lipaseaktivität. Sie beginnt relativ spät, frühestens nach 10 Std Autolyse und ist oft erst nach 24 Std vollständig.

Pericapilläre Autolyseverfettung entsteht immer in Lebern und Lappenabschnitten mit einer mindestens geringen (unterbrochenen) pericapillären tropfigen Verfettung bei pericapillärer Vermehrung der fein dispersen Lipide und vorwiegend pericapillär verstärkter Lipaseaktivität, und nur ausnahmsweise örtlich begrenzt in Leberzellen ohne Fetttropfen, aber mit gleichfalls kräftiger diffuser Sudanophilie. Sie beginnt oft schon nach 2—3 Std Autolyse und kann schon nach 10 Std

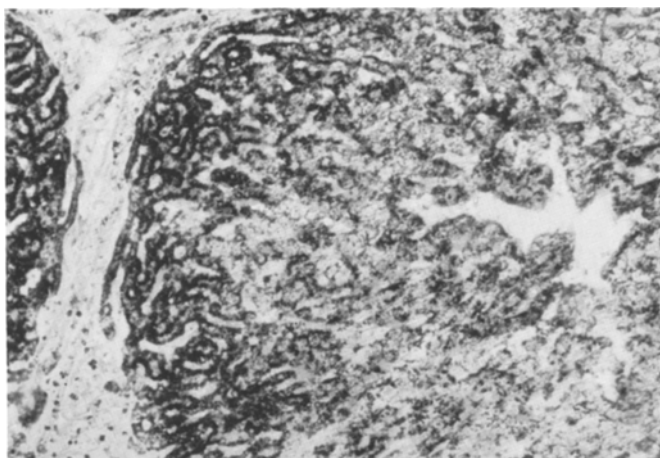


Abb. 6. Unterschiedliche Menge und Verteilung der Autolyselipide im Lappen: Peripherie mit reichlich pericapillären, intermediär und zentraler Abschnitt mit spärlichen Autolyselipiden. Autolyse 24 Std. Schweineleber. Sudanschwarz B 0,5 % in 55 %igem Alkohol. 120fach

nahezu vollständig sein. Die Gesamtmenge der Autolyselipide ist bei pericapillärer Autolyseverfettung größer als bei den anderen Formen; je größer die Gesamtmenge, desto früher beginnt die Autolysekörnelung.

Gleichzeitig mit der Autolysekörnelung lösen sich die basophilen Tropfen der Sternzellen und der Leberzellen unter charakteristischen Zwischenstadien auf, und zwar um so rascher, je stärker die Basophilie vor der Autolyse.

Diskussion

1. Zur Methodik

Für die praktische Anwendung der künstlichen Autolyse zur Fettdarstellung ist eine möglichst einfache und zuverlässige Methode zweckmäßig, in der Autolysezeit, Autolysetemperatur, Autolysemilieu und Färbemethode festgelegt sind.

Die *Autolysezeit* muß so bemessen sein, daß die Autolyselipide in ihrer charakteristischen Form und Verteilung möglichst vollständig sind, das Autolysebild (Autolysemuster) andererseits nicht durch Sekundärveränderungen verwischt wird. Diese Zeit ist meist nach 24 Std erreicht. FEYRTER (1956) hat an Leichenlebern gelegentlich bereits nach 3 Std künstlicher Autolyse den Beginn der fettigen Körnelung gesehen. Auch nach eigenen Beobachtungen beginnt die Autolysekörnelung manchmal schon nach 2—3 Std Autolyse, in anderen Fällen allerdings wesentlich später.

Die künstliche Autolyse läßt sich durch höhere *Temperaturen* beschleunigen. Da hiermit aber keine methodischen Vorteile verbunden sind, sollte an der Standardtemperatur von 37° festgehalten werden.

Da die Einwirkung wäßriger Lösungen die Gefahr des Fettschwundes durch Quellung und Auflösung mit sich bringt, verdient die Autolyse in der *feuchten Kammer* den Vorzug.

Die *färberische Darstellung* der Autolyselipide ist einfach und mit verschiedenen Methoden möglich. Unter den seit langem bekannten Lipidfärbungen ist Nilblausulfat zur Darstellung der Autolyselipide gut brauchbar. Daneben hat sich vor allem Methylviolet in 0,01%iger saurer Lösung (pH 2,8) bewährt. Sudan-schwarz B ist nur in kolloidaler Lösung geeignet.

2. Entstehung der Autolyselipide

Als Matrix der Autolyselipide werden seit KRAUS (1887), SIEGERT (1902) u. a. Fette angesehen, die im Cytoplasma fein verteilt und mit Sudan III nicht färbbar sind, daher als fest gebunden und maskiert gelten.

Nach dem Ergebnis eigener Untersuchungen ist aber ein Teil dieser diffusen Fettstoffe leicht extrahierbar und mit kolloidalem Sudanschwarz B färbbar, also weder fest gebunden, noch maskiert. Neben diesen „fein dispersen“ enthält das Cytoplasma wahrscheinlich auch fest gebundene Lipide, die schwer extrahierbar, nicht färbbar und mit Recht als maskiert zu bezeichnen sind. Die regelmäßige Abschwächung der diffusen Sudanophilie bei künstlicher Autolyse weist darauf hin, daß die fein dispersen Lipide an der Entwicklung der Autolysekörnehen beteiligt sind. Fein disperse und Autolyselipide stimmen auch in wesentlichen färberischen und histochemischen Eigenschaften überein, so vor allem in ihrer Basophilie, in ihrem Verhalten bei der UV-Schiff-Reaktion und bei Chromierungsverfahren. Die Mitwirkung maskierter (also fest gebundener, nicht färbbarer) Fettstoffe ist möglich, aber nicht bewiesen.

Die Autolysekörnelung wird, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, durch fermentative Hydrolyse der Triglyceride eingeleitet. Hemmung oder Inaktivierung der hierfür verantwortlichen fettspaltenden Enzyme (Lipasen und Esterasen) verhindert daher auch die Autolyse. Für eine fermentative Spaltung von Lipoid-Eiweißverbindungen liefern die Beobachtungen keinen Anhaltspunkt, zumal eine feste Proteinbindung für die leicht extrahierbaren feindispersen Lipide als wesentliches Ausgangsmaterial der Autolyselipide nicht anzunehmen ist.

Die daran anschließende Verteilungsänderung der Fette im Cytoplasma ist am besten durch kolloidchemische Zustandsänderungen zu erklären.

Die Verteilung von Fettgemischen im Cytoplasma kann als Emulsion von Fett in Wasser aufgefaßt werden, deren Stabilität von der Anwesenheit hydrophiler Kolloide (Proteine, Phosphatide) wesentlich abhängt (DEGKWITZ 1929). H-Ionen wirken nach DEGKWITZ der Dispersion von Fett in Wasser entgegen. Bei einem Kationenüberschuß kann es zur Entladung und zum Zusammenfließen der Fettmassenteile kommen (DEGKWITZ 1929).

Bei einer Zunahme der H-Ionen-Konzentration infolge hydrolytischer Fettspaltung sind diese Voraussetzungen gegeben. Das Zusammenfließen diffus verteilter Lipide zu gestaltlich abgrenzbaren Teilchen wäre dann eine sekundäre Folge der fermentativen Fettspaltung.

3. Mengenunterschiede der Autolyselipide

Autolyselipide bilden sich oft an *bestimmten* Orten der Leberzelle, z.B. pericapillär. Ihre Menge ist darüber hinaus oft auch innerhalb des Läppchens und bei mehreren Lebern verschieden. Die Mengenunterschiede beruhen in erster Linie auf solchen der Fermentaktivität. Bei pericapillärer Autolyseverfettung bilden sich die Reaktionsprodukte der Azofarbstoffmethode z.B. bevorzugt pericapillär. Spärliche Autolyselipide entsprechen einer geringen, reichliche einer starken Lipaseaktivität.

Andererseits hängt die Stärke der Lipaseaktivität und damit auch die Menge der Autolyselipide mit der Menge der fein dispersen Lipide zusammen. In Zellen mit stärkerer diffuser Sudanophilie und verstärkter UV-Schiff-Reaktion, wie sie vor allem in der Läppchenperipherie oft vorkommen, entwickeln sich mehr Autolyselipide als an anderer Stelle. Ebenso entsprechen einer pericapillären Vermehrung der fein dispersen Lipide und der Lipaseaktivität auch pericapilläre Ansammlungen von Autolyselipiden. Die Beobachtungen sprechen für eine enge Wechselbeziehung oder Abhängigkeit zwischen Lipaseaktivität und fein dispersen Lipiden, die weiterer Klärung bedürfen.

Mengenunterschiede der Autolyselipide spiegeln sich auch im zeitlichen Ablauf der Autolyseveränderungen wider. Starke Autolysekörnclungen beginnen früher als schwache. Bei pericapillärer Körnclung bilden sich hier auch die ersten Körnchen, lange bevor das übrige Läppchen entsprechende Autolyseveränderungen zeigt. Bei geringer Autolysekörnclung entstehen die ersten Körnchen bedeutend später als bei starker Körnclung.

Anhäufungen von Autolyselipiden, die an der Grenze benachbarter Zellen liegen oder die Ausdehnung einer Zelle überschreiten, sind wahrscheinlich aus den fein dispersen Lipiden mehrerer Zellen durch Aggregation und Adsorption von Lipidteilchen entstanden. Mit ihnen ist vor allem beim herdförmigen Typus der diffusocellulären Autolyseverfettung zu rechnen. Wieweit Adsorptionserscheinungen sonst das Autolysebild beeinflussen und vergrößern, bestehende Mengenunterschiede also betonen und verstärken, ist schwer zu entscheiden.

Nicht jede örtliche Anhäufung von Autolyselipiden kann durch entsprechende Unterschiede der Fermentaktivität und der fein dispersen Fette erklärt werden. Sind aber derartige Unterschiede gestaltlich nachzuweisen, dann kommen sie auch stets im Autolysebild zum Ausdruck.

4. Beziehungen zwischen fein dispersen Lipiden und Fetttropfen der Leberzellen

Zwischen der physiologischen pericapillären Verfettung der Schlachttierleber und der Form und Stärke der Autolyseverfettung ergeben sich folgende Beziehungen: Die pericapilläre (körnige) Autolyseverfettung kommt überhaupt nur bei Tieren vor, die auch eine tropfige pericapilläre Verfettung unter physiologischen Bedingungen häufig entwickeln (z.B. Schwein und Kalb). Auch bei der Autolyseverfettung dieser Tiere überwiegt die periphere, pericapilläre Form, herrscht also der gleiche qualitative und quantitative Gegensatz zwischen Peripherie und Zentrum wie bei der tropfigen intravitalen Verfettung. Bei tropfiger (pericapillärer) Verfettung entwickeln sich meist reichlich pericapilläre Autolyselipide

zwischen den Fetttropfen, also in den Lücken der pericapillären Säume. Pericapilläre Autolyselipide kommen schließlich auch ohne Fetttropfen, diese aber nicht ohne Autolyselipide vor. Danach ist anzunehmen, daß der tropfigen Verfettung eine pericapilläre Vermehrung fein disperser Lipide vorausgeht.

5. Die Zusammensetzung der Autolyselipide

Nach Angaben von FAIRBAIRN (1945) ist während der Autolyse eine Verminderung der Phosphatide und Neutralfette bei gleichzeitiger Vermehrung freier Fettsäuren anzunehmen. HARTMANN und KLETT (1960) haben dagegen neuerdings über eine begrenzte Phosphatidneubildung in der Autolyse und über eine gleichzeitige Verminderung der freien Fettsäuren berichtet. Eine Nachprüfung dieser Beobachtungen scheint um so wichtiger, als der Energielieferant für eine autolytische Phosphatidsynthese ungeklärt ist und eine Verminderung der freien Fettsäuren während der Autolyse allen bisherigen Erfahrungen widerspricht. Die histochemische Untersuchung ist zwar nicht geeignet, geringe Änderungen der Phosphatidmengen zu erfassen. Sie hat aber bewiesen, daß die Autolyseveränderungen an den Fetten ohne fermentative Fettspaltung nicht in Gang kommen und daher mit der Freisetzung (Vermehrung) der freien Fettsäuren beginnen. Auch die färbereiche und histochemische Untersuchung von Tropfextrakten spricht für eine Vermehrung der freien Fettsäuren durch Lipolyse und für eine gleichzeitige Abnahme der Phosphatide und Neutralfette. Tropfextrakte autolysierter Lebern enthalten oft reichlich Fettsäurekristalle, wie sie FEYRTER (1956) auch an Einschlußpräparaten gesehen hat. Das Ergebnis chemischer Organanalysen und der Untersuchung von Tropfextrakten gilt nur für das Gesamtgemisch der extrahierten Fette autolysierter Lebern. Es ist zwar anzunehmen, aber doch nur durch histotopographische Untersuchungen zu beweisen, daß die Autolysekörnchen gleich oder ähnlich zusammengesetzt sind, wie der Gesamtextrakt, nämlich wesentlich aus Phosphatiden, Neutralfetten und freien Fettsäuren.

Eine streng spezifische histochemische Reaktion auf Phosphatide ist nicht bekannt. Alle bisherigen Methoden, darunter auch das angeblich spezifische Chromierungsverfahren nach BAKER, sind empirischen Ursprungs und mit erheblichen Fehlerquellen behaftet. Für den Phosphatidgehalt der Autolysekörnchen sprechen ihre starke Basophilie und die positive UV-Schiff-Reaktion als Ausdruck saurer Gruppen und zahlreicher Doppelbindungen, wie sie den Phosphatiden eigen sind. Wahrscheinlich enthalten die Autolysekörnchen auch Neutralfette, die sich leider nicht exakt nachweisen lassen.

Für eine autolytische Trennung von Phosphatiden und Neutralfetten ergibt sich also kein Anhalt. Beide Fraktionen gehen vielmehr, soweit sie nicht lipolytisch zerfallen, unverändert als Gemisch in die Autolysekörnchen über.

Für den Fettsäuregehalt der Autolysekörnchen spricht ihre Entstehung auf Grund fermentativ hydrolytischer Fettspaltung. Der Nachweis der Fettsäuren stützt sich in erster Linie auf die sehr zuverlässige und empfindliche Reaktion nach MEYER-BRUNOT, obwohl diese Reaktion wahrscheinlich auch andere saure Gruppen erfaßt. Die Basophilie der Fettsäuren (unter anderem die Blaufärbung mit Nilblausulfat nach LENNERT und WEITZEL 1952) ist diagnostisch im phosphatreichen Gemisch nicht verwertbar, weil auch Phosphatide basophil sind. Bei

längeren Autolysezeiten nehmen die Basophilie und die UV-Reaktivität vor allem dann ab, wenn eine erhebliche tropfenförmige physiologische Verfettung bestand. Da nicht steril gearbeitet wurde, spielen bei dieser Veränderung wahrscheinlich bakteriell bedingte Spaltungen bis zu kleinen Bausteinen eine wesentliche Rolle. Die für die UV-Schiff-Reaktion verantwortlichen Doppelbindungen nehmen dabei offenbar erheblich ab.

6. Autolyseveränderungen an den Fetttropfen

Alle Fetttropfen der normalen Schlachttierleber werden durch künstliche Autolyse basophil, d. h. bei tiefem p_H mit basischen Farbstoffen färbbar und verhalten sich bei der Fettsäurereaktion nach MEYER-BRUNOT positiv. Da diese Veränderungen nur bei erhaltener Lipaseaktivität auftreten, also durch entsprechende Inhibitoren (z. B. E 600) verhindert werden können, müssen sie durch hydrolytische Spaltung der Triglyceride und Freisetzung von Fettsäuren innerhalb der Tropfen bedingt sein. Auch das Auftreten saurer Gruppen innerhalb der Fetttropfen ist also ein Nachweis der Fermentaktivität. Durch weitere Untersuchungen an menschlichen Lebern wird zu klären sein, ob sich alle Fetttropfen so verhalten bzw. wovon das unterschiedliche Verhalten abhängt.

Nach DIETRICH (1903) und DIETRICH und HEGLER (1904) verschwinden zugleich mit dem Auftreten der Autolyselipide die sudanophilen Neutralfette. Diese Beobachtung kann nur mit Einschränkungen bestätigt werden. Die Auflösung ist nicht gesetzmäßig mit dem Auftreten von Autolyselipiden gekoppelt, sondern vollzieht sich in unterschiedlichem Tempo und Ausmaß, kann z. B. nach 48 Std noch weitgehend fehlen, in anderen Fällen nach wenigen Stunden Autolyse schon nahezu vollständig sein. Oft beschränkt sich die Auflösung auf das Zentrum, und der Randsaum der Tropfen bleibt erhalten. Die Grundlagen dieser Tropfenauflösung sind noch ungeklärt. Die bei der fermentativen Hydrolyse freiwerdenden Fettsäuren sind nicht wasserlöslich. Die Hydrolyse führt aber vielfach über die Zwischenstufen der Di- und Monoglyceride, die relativ gut wasserlöslich sind und emulgierende Eigenschaften besitzen. Darüber hinaus ist es denkbar, daß die Fettsäuren auf fermentativem Wege weiter abgebaut werden. Entsprechende Untersuchungen stehen noch aus.

7. Schlußfolgerungen

Es bestehen keine Bedenken, die künstliche Autolyse zum Nachweis der Lipase-(Esterase-)Aktivität heranzuziehen und die bestehenden Methoden dadurch zu ergänzen. FEYRTER hat neben der Fermentabhängigkeit auch quantitative Beziehungen zwischen den Autolyselipiden und dem Phosphatidgehalt der betreffenden Leber zur Diskussion gestellt. Tatsächlich besteht auch offenbar ein Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Menge der Autolyselipide, der Fermentaktivität und der Menge der relativ phosphatidreichen fein dispersen Lipide, deren örtliche Vermehrung jedenfalls im Autolysebild zum Ausdruck kommt. Wir wissen freilich nicht und können es dem histologischen Bild und dem histochemischen Untersuchungsergebnis nicht ansehen, ob bei geringer Fermentaktivität und daher geringer Menge der Autolyselipide auch die Phosphatide vermindert sind. Es wäre also zumindest verfrüht, aus dem Autolysebild Schlüsse

auf den Phosphatidgehalt zu ziehen, bevor nicht durch chemische Untersuchungen hierfür eine bessere Grundlage geschaffen ist.

Dagegen läßt sich wahrscheinlich schon jetzt aus dem Autolysebild als dem Spiegel der Fermentaktivität auf die Situation des Fettstoffwechsels in der Leber schließen. Die ausgeprägte tropfige Verfettung der Schweineleber ist z.B. stets von einer starken Fermentaktivität und daher ausgeprägten Autolyseveränderungen an Tropfen und fein dispersen Fetten begleitet und daher sicher Ausdruck einer gesteigerten Fettverarbeitung.

Zusammenfassung

Die bei künstlicher Autolyse auftretenden Lipidteilchen entstehen durch Zusammenlagerung leicht extrahierbarer fein disperser Fette, sind diffusocellulär, pericapillär oder unregelmäßig herdförmig, seltener peribiliär lokalisiert und neigen zur örtlichen Aggregation. Sie sind ein Gemisch aus reichlich Fettsäuren, Phosphatiden und (wahrscheinlich) Neutralfetten. Geeignete Darstellungsmethoden werden beschrieben.

Fetttröpfchen werden bei künstlicher Autolyse bereits in wenigen Stunden infolge Fettsäurebeimengung basophil und dann oft bis auf einen schmalen Randsaum aufgelöst. Alle Autolyseveränderungen an den Fetten werden durch hydrolytische Fettspaltung eingeleitet und sind Ausdruck der Lipase- bzw. Esteraseaktivität. Die dadurch bedingte Säuerung bewirkt das Zusammenfließen der Fettmassenteilchen zu typischen Autolysekörnchen.

Menge der Autolyselipide, Verteilung im Läppchen und intracelluläre Lokalisation sind auch in der normalen Leber der einzelnen Species verschieden und hängen vor allem von der Lipaseaktivität, aber auch von der Menge der fein dispersen Lipide ab.

The Morphology and Histochemistry of the Lipids of Normal Mammalian Liver during Artificial Autolysis

Summary

The lipids appearing with artificial autolysis develop by the aggregation of readily extractable, finely dispersed fats. The lipids may be diffusely cellular, may be located around capillaries or irregularly deposited, are seldom localized about the bile ducts, and tend to accumulate focally. They are an admixture of abundant fatty acids, phosphatides, and probably neutral fats. With artificial autolysis, droplets of fat become basophilic in a few hours as a consequence of admixture with fatty acids, and then often become dissolved except for a small peripheral rim. All autolytic changes in the fats, representative of the lipase activity (esterase) are ushered in by hydrolytic breakdown of the fat. The acidification thus brought about induces a confluence of the particles of fat to form typical autolytic granules. The quantities of the autolytic lipid, the distribution into lobules, and the intracellular localization are different in the normal liver of the individual species, and depend especially on the lipase activity; however, also on the amount of finely dispersed lipid.

Literatur

- BAKER, J. R.: The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. micr. Sci.* **87**, 441—470 (1946).
- BERG, N. O.: A histological study of masked lipids. Copenhagen: Munksgaard 1951.
- DEGKWITZ, R.: Zur physikalischen Chemie der Zellfette. *Klin. Wschr.* **48**, 2224—2229 (1929).
- FAIRBAIRN, D.: Free fatty acids in animal tissues. *J. biol. Chem.* **157**, 645 (1945).
- FEYRTER, F.: Über die chromotrope myelinige Entmischung der Leberzellen des Menschen durch künstliche Autolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **329**, 121—140 (1956).
- Über die chromotrope Körnelung der Leberzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 364—377 (1956).
- FROBOESE, C., u. G. SPRÖHNLE: Untersuchungen zur Theorie und Technik der Sudanfärbung. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **14**, 13—49 (1928).
- GOMORI, G.: The microtechnical demonstration of sites of lipase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **58**, 362—364 (1945).
- HARTMANN, F., u. H.-J. KLETT: Histochemische, lipidbiochemische und enzymatische Untersuchungen während der Autolyse der Rattenleber. *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr.* **20**, 251—256 (1960).
- HAUSER, H.: Über das Vorkommen von Mikroorganismen in lebendem Gewebe gesunder Thiere. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **20**, 162—202 (1885).
- HESS, L., u. P. SAXL: Experimente an autolisierenden Organen. *Wien. klin. Wschr.* **21**, 486—487 (1908).
- KRAUS, FR.: Über die in abgestorbenen Geweben spontan eintretenden Veränderungen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **22**, 174—200 (1887).
- KRONTOWSKI, A.: Zur Morphologie der lipoiden Substanzen autolysierter und fettig degenerierter Organe. *Z. Biol.* **54**, 479—526 (1910).
- LENNERT, K., u. G. WEITZEL: Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 20—29 (1952).
- LINDEMANN, W.: Über pathologische Fettbildung. *Beitr. path. Anat.* **25**, 329—430 (1899).
- LIPP, W.: Histochemische Methoden. Lieferung XVII. München: Oldenbourg 1959.
- NACHLAS, M. M., and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of esterase. *J. nat. Cancer Inst.* **9**, 415—425 (1949).
- OHTA, K.: Über das Verhalten des Organfettes bei der Autolyse und antiseptischem Aufbewahren. *Biochem. Z.* **29**, 1—12 (1910).
- ROMEIS, B.: Weitere Untersuchungen zur Theorie und Technik der Sudanfärbung. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **16**, 525—585 (1929).
- SHIBATA, N.: Das Verhalten des Fettes tierischer Organe bei antiseptischer Aufbewahrung. *Biochem. Z.* **31**, 321—335 (1911).
- SIEGERT, F.: Das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Leber. *Beitr. chem. Physiol. Path.* **1**, 114—120 (1902).
- SINAPIUS, D.: Über Chromierungsverfahren zur Lipiddarstellung. *Histochemie* **2**, 217—233 (1961).
- Zur Darstellung maskierter Fette der Leber. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **45**, 297—298 (1961).

Prof. Dr. D. SINAPIUS,
Pathologisches Institut der Universität, 34 Göttingen, Goßlerstr. 10