

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

Die Fette der Leichenleber bei spontaner und künstlicher Autolyse **Beitrag zur Topographie der Esteraseaktivität**

Von
D. SINAPIUS

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1963)

Die künstliche Autolyse der Leber ist seit langem (HAUSER) als Darstellungsmethode invisibler fein verteilter cellulärer Fette bekannt. FEYRTER hat die dabei auftretenden Fette (Myeline) an Leichenlebern systematisch untersucht, dabei erhebliche Unterschiede ihrer Menge und Lokalisation festgestellt und zum weiteren Studium mit neueren Methoden angeregt. Untersuchungen an der normalen Säugerleber (SINAPIUS und KALBFLEISCH) haben gezeigt, daß alle Autolyseveränderungen der Fette von der Aktivität fettspaltender Enzyme abhängen und durch hydrolytische Freisetzung von Fettsäuren eingeleitet werden. Es blieb offen, wie weit dabei auch ein örtlich wechselnder Phosphatidgehalt der Leberzellen von Bedeutung ist.

Eine Bestätigung dieser Beobachtungen an der menschlichen Leber schien notwendig, und es war damit vor allem zu klären, ob die erkannte Abhängigkeit der Autolyseveränderungen auch für die vielfältigen Verfettungsformen und für andere pathologische Veränderungen der menschlichen Leber gilt. In diesem Sinne soll versucht werden, folgende Einzelfragen zu beantworten:

1. Welche Beziehungen bestehen zwischen der histochemisch nachweisbaren Esterase-Aktivität und dem Ergebnis künstlicher Autolyse an Leichenlebern?

2. Welche Bedeutung hat der intravitale Gehalt an Fetttropfen und Lipofuscin für das Autolyseergebnis?

3. Wird der Autolysebefund, vor allem die Menge der Autolyselipide, durch andere Leberveränderungen, evtl. auch durch das Grundleiden, beeinflusst?

4. Welche Rolle spielt der Phosphatidgehalt der Leberzellen für das Autolyseergebnis; ist die künstliche Autolyse als Phosphatiddarstellungsmethode brauchbar?

5. Ist künstliche Autolyse als Nachweis der Esterase-Aktivität geeignet, und was sagt das Ergebnis über die Topographie der Enzymaktivität aus?

Da bei künstlicher Autolyse oft schon 3 Std nach Beginn typische Veränderungen an den Fetten auftreten (FEYRTER, SINAPIUS und KALBFLEISCH), ist am Sektionsmaterial auch mit gleichartigen postmortalen Spontanveränderungen zu rechnen, über deren Häufigkeit und praktische Bedeutung nichts bekannt ist. Wir haben versucht, diese Frage zu beantworten und die ursächlichen Faktoren zu klären.

Material und Methode

Das Material stammt von 92 nichtausgewählten Sektionsfällen vom Neugeborenen- bis zum Greisenalter. Leberstückchen einer Kantenlänge von 5—10 mm und einer Stärke von etwa 2 mm wurden in der feuchten Kammer bei 38° für $2\frac{1}{2}$ —3, für 5, 8 und 20 Std aufbewahrt, danach 3 Std in 10%igem neutralem Formalin fixiert und an 10 μ dicken Gefrierschnitten neben Kontrollen ohne Autolyse untersucht. Die Sektionen wurden frühestens 5, meist 12—20 Std nach dem Tode durchgeführt.

Färbungen und Reaktionen. Sudan Schwarz B 0,2% in 70%igem Alkohol, Sudan Schwarz B 0,5% in 55%igem Alkohol, Sudan III, Methylviolett 0,01% bei pH 2,6, Fettsäure-Reaktion nach MEYER-BRUNOT, UV-Schiff-Reaktion nach BELT und HAYES, Chromierungsverfahren mit 0,5%iger Chromsäure (10 min) (Nachbehandlung nach BAKER), Reaktion auf unspezifische Esterase nach NACHLAS und SELIGMAN (Azofarbstoffmethode).

Beobachtungen und Ergebnisse

I. Zur allgemeinen Morphologie und Histochemie der Autolyseveränderungen an den Fetten

Wir verweisen auf das Ergebnis unserer Untersuchungen an Tierlebern (SINAPIUS und KALBFLEISCH) und begnügen uns an dieser Stelle mit einer Zusammenfassung und mit einigen Ergänzungen. Wie bei der Tierleber umfassen die Autolyseveränderungen der Fette auch in der Leber des Menschen die Bildung von körnigen Autolyselipiden (Myelinen) und Alterationen der Fetttropfen. Hinzu kommen durch hydrolytische Fettspaltung freigewordene Fettsäurekörnchen (FSK), die zwar auch an der autolysierten Tierleber vorkommen, aber als solche bisher nicht erkannt und beschrieben wurden.

1. Fettsäurekörnchen (FSK) (Abb. 1a). Bei spontaner und künstlicher Autolyse bilden sich bereits in den Frühstadien feine, etwa 0,5—3 μ im Durchmesser große Lipidteilchen, die in unregelmäßigen Formen, bald als kurze plumpe Stäbchen, bald als rundliche Körnchen oder polygonale Teilchen auftreten und zur örtlichen Aggregation in Form kleiner, höchstens kernflächengroßer Haufen neigen. Die Darstellung dieser FSK ist nur mit der Fettsäure-Reaktion nach MEYER-BRUNOT gelungen (in einem bräunlichen Farbton). Sie wurden durch keinen anderen Lipidnachweis erfaßt. Die Fettsäure-Reaktion ist nur nach kurzer Formol-Fixation positiv (im Rahmen der Untersuchungen 3 Std). Die Zahl der Körnchen ist schon erheblich vermindert, wenn Gefrierschnitte etwa 3 Std lang in A. dest. aufbewahrt werden. Nach 24 Std in A. dest. oder Formalin (10%) sind keine Körnchen mehr nachweisbar. Die FSK liegen meist unregelmäßig verstreut, niemals ausgesprochen peribillär, selten bevorzugt perivascular und an der Zelloberfläche.

2. Autolyselipide (Myeline). Autolyselipide (früher meist: Myeline) entstehen durch Zusammenlagerung vorher fein verteilter Fette zu größeren Teilchen im Cytoplasma und bilden auch größere haufenförmige Ansammlungen (Größe der Einzelteilchen mindestens 0,4 μ , der Haufen höchstens 30 μ). Der Befund der menschlichen Leber entspricht in dieser Hinsicht dem der Tierlebern.

Auch in der Leber des Menschen liegen die Autolyselipide diffusocellulär, herdförmig angehäuft, perivascular oder peribillär, außerdem gelegentlich haufenförmig im Bereich verfetteter Sternzellen mit teilweiser Überlagerung der Ränder benachbarter Leberzellen. Als wesentliche färberische und histochemische Eigenschaften, die auch für die Autolyselipide der menschlichen Leber gelten, wurden Färbbarkeit mit koll. Sudan Schwarz B, positive Fettsäure-Reaktion, Basophilie und UV-Reaktivität beschrieben. Saure Gruppen und Doppelbindungen kennzeichnen also die Autolyselipide.

Zur Ergänzung und Berichtigung der früheren Angaben ist folgendes hinzuzufügen:

1. Durch Benzpyren-Coffein werden Autolyselipide nur schwach oder gar nicht, jedenfalls stets erheblich schwächer fluorescierend als Neutralfetttropfen, dargestellt.

2. Bei der Fettsäure-Reaktion nach MEYER-BRUNOT heben sich die Autolyselipide kurz (etwa 3 Std) in Formalin fixierter Lebern schlecht von den gleichzeitig in großer Menge gebildeten kleinen Fettsäureteilchen ab. Ein klares Bild der eigentlichen „Myelin“-Teilchen ergibt sich erst nach mehrtägiger Formalinfixation, wenn die FSK geschwunden sind. Doch ist dann auch die Intensität

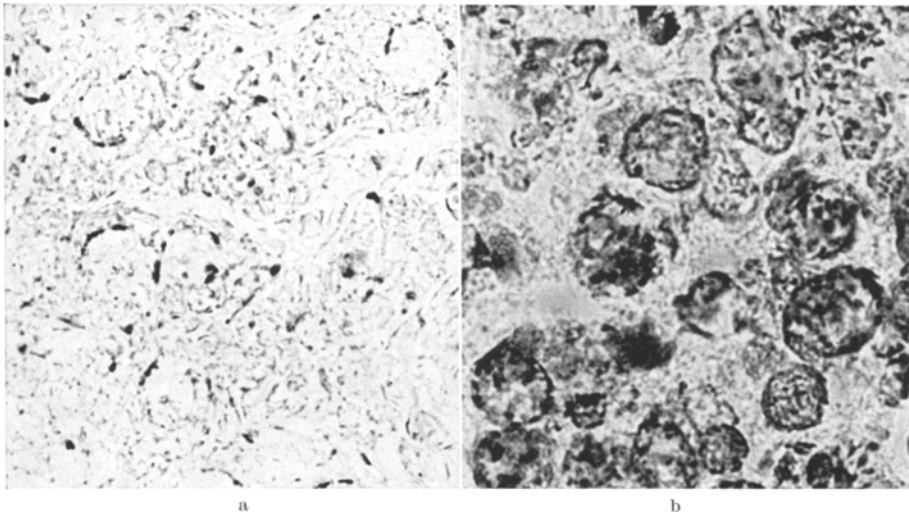


Abb. 1. a Frühstadium *spontaner* Autolyse (Fettsäurekörnchen am Rand der Tropfen und spärlicher diffus) bei mitteltropfiger peripherer Verfettung. 640fach. b Künstliche Autolyse 20 Std mit intensiver Fettsäure-Reaktion vor allem am Rand der Tropfen bei großtropfiger zentraler Verfettung. 680fach. Fettsäure-Reaktion (MEYER-BRUNOT)

der Fettsäure-Reaktion bis zu einem gelblichen oder blaßbraunen Farbton hin abgeschwächt.

3. Die Chromierung mit 5%iger Chromsäure nach kurzer (dreistündiger) Formalinfixierung hat sich als sehr präzise Darstellungsmethode bewährt. Sie gibt die besten Kontraste und verdient vor allem den Vorzug, wenn es sich darum handelt, den zeitlichen Ablauf der Autolyseveränderungen zu erfassen. Der Chromierungseffekt (Hämatoxylinlack) ist gegenüber der differenzierenden Einwirkung von Borax-Ferricyanid sehr beständig. Die Autolyselipide besitzen also unter der Voraussetzung einer nur kurzen Formalinfixierung ein starkes Chrombindungsvermögen.

3. Veränderungen an den Fettropfen. In den früher untersuchten Tierlebern waren Basophilie, positive Fettsäure-Reaktion, Abblassung und Auflösung die wichtigsten Fettropfenveränderungen. Es handelte sich hier aber nur um kleine Fettropfen bei physiologischer Verfettung.

In den Leberzellen des Menschen spielt die Auflösung der Fettropfen als Autolyseveränderung nur bei kleinen und kleinsten Tropfen eine Rolle. Dagegen lösen sich die Tropfen der Sternzellen wie in der Tierleber meist schon in frühen

Autolysestadien auf. Auch größere Tropfen der Leberzellen zerfallen gelegentlich in zahlreiche kleinere, ohne vollständig zu verschwinden, vor allem bei disseminierter mittel- bis großtropfiger Einzel- oder Gruppenverfettung.

Die meisten Fetttropfen bleiben bei der Autolyse zumindest in ihren Umrissen, meist vollständig, erhalten, ändern aber ihre färberischen und histochemischen Eigenschaften.

Als früheste und häufigste Veränderung werden (meist schon 3 Std nach Autolysebeginn) durch die Fettsäure-Reaktion (MEYER-BRUNOT) freie Fettsäuren im Randsaum der Tropfen durch eine entweder gleichmäßig strichförmige, körnig unterbrochene (Abb. 1a) oder unregelmäßig breite und teilweise gebuchtete Braunfärbung (Abb. 1b) dargestellt. Später reagiert auch der Rest (das Zentrum) positiv (Abb. 1b). Gleichzeitig werden die Tropfen in wechselnder Intensität basophil und durch Methylviolett färbbar. Bei der Chromierung nimmt der Randsaum einen intensiv blauschwarzen, der übrige Tropfen einen blaßgräubläulichen Farbton an. Kleine Tropfen werden oft vollständig blauschwarz. Dem Chromierungsbefund der Fetttropfen entspricht die UV-Reaktivität: was sich bei der Chromierung blauschwarz anfärbt (Randsäume oder ganze Tropfen), reagiert bei der UVS-Reaktion nach BELT und HAYES deutlich positiv.

Bei unterschiedlicher Tropfengröße werden kleine Tropfen in der Regel früher und stärker verändert als große, und der Randsaum wiederum früher und intensiver als das Tropfenzentrum.

II. Beziehungen zwischen Autolysebefund, Verfettung und Esteraseaktivität

1. Vorbemerkungen. Durch künstliche Autolyse lassen sich in jeder Leber Veränderungen der tropfenförmigen und fein dispersen Fette hervorrufen, die oft schon nach 2½ Std Autolyse deutlich, regelmäßig nach 5 Std zumindest herdförmig und spätestens nach 20 Std voll ausgeprägt und in großer Menge nachzuweisen sind. Die Menge fettiger Autolyseprodukte nimmt stets mit der Dauer der Autolyse erheblich zu und ist oft nach 20 Std so groß, daß feinere intracelluläre und intraacinäre Unterschiede verwischt werden. Zur Erfassung dieser Unterschiede sind daher auch kürzere Autolysezeiten nötig. Die Menge und Verteilung fettiger Autolyseprodukte und in gewissem Umfang auch der zeitliche Ablauf der Autolyseveränderungen hängen, wie zu zeigen sein wird, entscheidend von dem gestaltlich faßbaren Lipid- und Lipopigmentgehalt der einzelnen Leberzelle und von der Enzymaktivität ab. Das Autolysemuster wechselt dementsprechend mit dem örtlichen Verfettungszustand der Leberzellen oft innerhalb eines Läppchens.

Da spontane und künstliche Autolyse der Leberfette auch von altersmäßig bedingten Unterschieden der Enzymaktivität abhängen, wurden Lebern aus dem Neugeborenen-, Säuglings- und Kindesalter in einer besonderen Gruppe zusammengefaßt.

Grundformen cellullärer Verfettung:

a) Leberzellen ohne gestaltlich faßbare Lipide und Lipofuscin. b) Leberzellen mit Lipofuscin bzw. dessen Vorstufen und feinen Fetttropfen. c) Kleintropfige perivasculäre, eventuell sekundär diffusocelluläre Verfettung. d) Mittel- bis großtropfige perivasculäre, teilweise sekundär diffusocelluläre Verfettung. e) Großtropfige Verfettung. f) Sternzellenverfettung.

Bei etwa 60% der untersuchten Lebern bestanden *spontane* Autolyseveränderungen der Fette, die aber nur bei 15% einen stärkeren Grad erreicht hatten und über die unter Ziff. 7 berichtet wird. Die nachfolgende Beschreibung der künstlichen Autolyse berücksichtigt nur Lebern ohne oder mit nur geringen spontan autolytischen Veränderungen.

2. Künstliche Autolyse und Esteraseaktivität bei den Grundtypen cellulärer Verfettung. *a) Leberzellen ohne Fetttropfen und Lipofuscin.* Nach $2\frac{1}{2}$ Std Autolyse meist nur spärliche regellos diffusocelluläre FSK und einzelne zunächst unregelmäßig verteilte Autolysekörnchen. Nach 20 Std meist größere Teilchen von $3\text{--}12\ \mu$ Durchmesser. Lipidfreie Cytoplasmateile zwischen den Autolysepartikeln in den meisten Zellen deutlich erkennbar. In glykogenreichen Zellen besonders spärliche und überwiegend kleine Autolysekörnchen (Einzelbeobachtung).

Esteraseaktivität. Reaktionsprodukte regellos diffusocellulär verteilt.

b) Leberzellen mit Lipofuscin und kleinen Fetttropfen. Lipofuscin entweder in kleinen Haufen zentrocellulär, reihenförmig peribiliär oder diffusocellulär. Autolysekörnchen in *enger Anlehnung* an die Lipofuscinpartikel und gleicher Verteilung. Die zentrocelluläre und peribiliäre Lokalisation der Autolyselipide trotz erheblicher Vermehrung auch nach 20 Std Autolyse noch sehr deutlich, die Lipofuscinpartikel überdeckt, die einzelnen Autolysekörnchen nicht mehr deutlich voneinander abzugrenzen. — Beim diffusocellulären Typus nach 20 Std Autolyse meist das ganze Cytoplasma mit Autolyselipidkörnchen vollgestopft, die Gesamtmenge eindeutig größer als beim zentrocellulären und peribiliären Typus.

Esteraseaktivität. Reaktionsprodukte bei zentrocellulärer und peribiliärer Lipofuscinanhäufung genau entsprechend lokalisiert, beim diffusocellulären Typus unregelmäßig verteilt, sehr dicht.

Zeitlicher Ablauf. Unregelmäßig, die ersten Autolyseveränderungen aber meist schon nach $2\frac{1}{2}$ Std, beim diffusocellulären Typus rascher voranschreitend als beim zentrocellulären und peribiliären.

c) Kleintropfige perivaskuläre Verfettung. Bevorzugt perivaskuläre, dem Verfettungstyp entsprechende Autolysekörnelung, diese andererseits niemals ohne eine wenn auch nur geringe perivaskuläre Verfettung, die allerdings oft nur bei Färbungen mit Sudan Schwarz B, nicht mit Sudan III zu sehen ist. Die kleinen Fetttropfen schon in frühen Autolysestadien basophil; zwischen ihnen dicht aneinandergereiht Autolyselipidkörnchen. Die Fetttröpfchen oft nicht mehr abzugrenzen, weil sie die gleichen färberischen und histochemischen Eigenschaften annehmen wie die Autolyselipidkörnchen. Außer den bevorzugt perivaskulären auch diffusocelluläre Autolysefettteilchen in wechselnder Menge. Menge der Autolyselipide stets relativ groß.

Zeitlicher Ablauf. Beginn meist schon nach $2\frac{1}{2}$ Std, rasches Fortschreiten, perivaskuläre Autolysekörnelung nach 5 Std stets vollständig, nach 20 Std durch Vermehrung der diffusocellulären Teilchen oft undeutlich.

Esteraseaktivität. Bevorzugt perivaskulär, gering diffusocellulär. Reaktionsprodukte vor allem am Rand und in der näheren Umgebung der Fetttröpfchen, dann auch zwischen ihnen.

d) Mitteltropfige perivaskuläre Verfettung. Veränderungen an den Fetttropfen im Vordergrund. Beginn mit scharfen Randkonturen der Tropfen bei

Fettsäure-Reaktion. Nach 3 Std schwache, nach 5 Std stärker ausgeprägte Basophilie aller Tropfen. Dazwischen nur sehr spärliche oder gar keine Autolysokörnchen. Nach 20 Std etwas stärkere UV-Reaktivität der Tropfen, besonders an den Rändern, etwas deutlichere Graublau-Färbung bei der Chromierung, aber unverändert spärliche Autolyselipidkörnchen.

Esteraseaktivität. Bevorzugt am Rand der Tropfen, gering diffusocellulär.

e) Großtropfige Verfettung. Nur Veränderungen an den Fetttropfen, keine oder (selten) sehr spärliche feinkörnige Autolyselipide. Beginn mit Randkonturen bei Fettsäure-Reaktion (Abb. 1b), dann Ausdehnung der positiven Reaktion auf den ganzen Tropfen und zunehmende Basophilie. — Je größer der Fetttropfen,

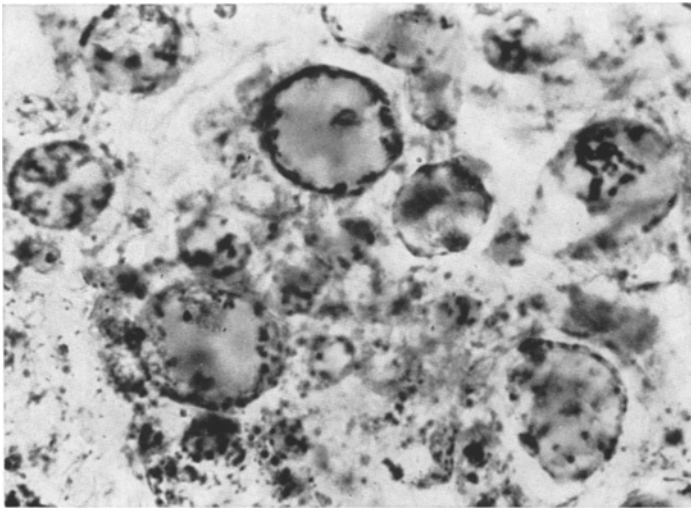


Abb. 2. S. 837/62 (63 J.). Herdförmige großtropfige Verfettung bei Lebercirrhose. Reaktionsprodukte der unspezifischen Esterase-Reaktion vorwiegend am Rand der Fetttropfen. 900fach

desto schwächer die Basophilie und desto geringer die Intensität der Fettsäure-Reaktion.

Esteraseaktivität. Bevorzugt am Rand der Fetttropfen in Form oft dicht aneinandergereihter körniger Reaktionsprodukte (Abb. 2), erheblich spärlicher am übrigen Tropfen. An kleineren Tropfen reichlicher Reaktionsprodukte als an großen.

f) Sternzellenverfettung. Ansammlung haufenförmiger Autolyselipide im Bereich der Sternzellen. Die Fetttropfen der Sternzellen meist nach 3 Std in kleinere Tröpfchen zerfallen, dann von Autolyselipiden allmählich überdeckt.

Esteraseaktivität. Neben diffusocellulären bevorzugt körnige Reaktionsprodukte im Bereich der verfetteten Sternzellen.

3. Kombination der Grundformen im Läppchen. Die Grundformen sind im Läppchen fast immer wechselnd kombiniert, die Formen 2b und c (Lipofuscin und kleintropfige perivaskuläre Verfettung) auch oft in der einzelnen Zelle. Oft treten drei, gelegentlich sogar vier oder fünf Grundformen nebeneinander herdförmig oder systematisiert in Anlehnung an bestimmte Läppchenabschnitte auf. An den häufigsten und für die Fragestellung wichtigsten Kombinationen sollen

der zeitliche Ablauf beschrieben und die quantitativen Unterschiede der Autolyseveränderungen beurteilt werden.

a) *Läppchenzentren*: zentrocelluläres oder peribiliäres Lipofuscin (einschl. Vorstufen und kl. Tröpfchen). *Läppchenperipherie*: Zellen ohne Tropfen und Fuscin (zehn Fälle). — Autolyse: Bei gleicher Autolysezeit in den fuscineichen Zentren stets *erheblich* mehr Autolyselipide als in der Peripherie (Abb. 3). Beginn in den Zentren frühestens nach $2\frac{1}{2}$ Std, spätestens nach 5 Std.

b) *Läppchenzentren*: reichlich diffusocelluläres Lipofuscin und kleintropfige perivasculäre oder diffusocelluläre eventuell auch Sternzellenverfettung. *Läppchenperipherie*: Wechselnder Befund, stets geringere Verfettung (Zellen ohne

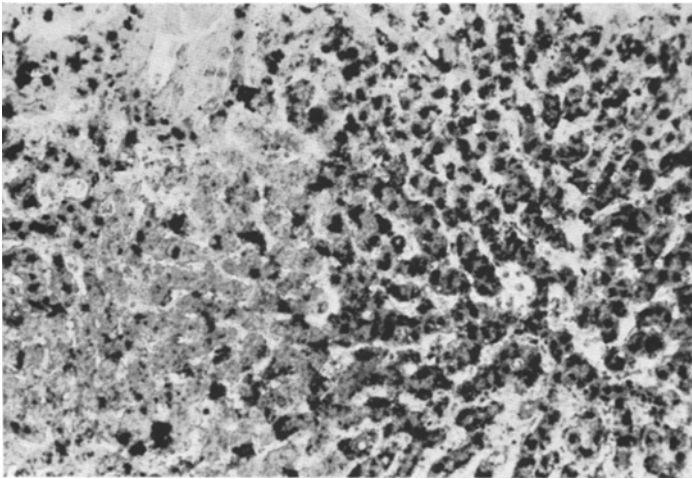


Abb. 3. S. 362/63 (62 J.). In den Läppchenzentren zentrocelluläres haufenförmiges Lipofuscin. Künstliche Autolyse 5 Std: Autolyselipide im Bereich des Lipofuscins, reichlicher im Zentrum (rechts). Spärliche Autolyselipide in fetttröpfen- und fuscinfreien Zellen der Peripherie (links). Chromierung 115fach

Tropfen und Fuscin, zentrocelluläres oder peribiliäres Fuscin, geringe kleintropfige perivasculäre Verfettung (19 Fälle) (Abb. 4). — Autolyse: In den Zentren sehr reichlich Autolyselipide, in der Peripherie *erheblich* weniger. Beginn stets in den Zentren, meist schon nach $2\frac{1}{2}$ Std.

c) *Herdförmige kleintropfig perivasculäre Verfettung* bei Zellen ohne Tropfen und Fuscin in der näheren Umgebung (sieben Fälle) (Abb. 5). *Autolyse*: in den Herden *erheblich* mehr Autolyselipide als in der Umgebung; Beginn stets früher, in den Herden meist nach $2\frac{1}{2}$ Std deutlich, nach 5 Std regelmäßig voll ausgeprägt.

d) *Teils klein-, teils mittel- bis großtropfige perivasculäre Verfettung* (Abb. 6). Beispiel S.-Nr. 360/63: *Läppchenzentren*: Starke klein- bis höchstens mittel-tropfige perivasculäre Verfettung, gleichzeitig diffusocelluläres Lipofuscin. *Intermediär*: Hochgradige mittel- bis großtropfige perivasculäre Verfettung. *Peripherie*: Geringe kleintropfige perivasculäre Verfettung (Abb. 6 links). — *Autolyse*: Reichlich Autolyselipide in der Peripherie, etwas weniger im Zentrum, keine intermediär. Beginn nach 3 Std mit peripherer perivasculärer Autolysekörnelung

(Abb. 6 rechts), dann Autolyselipide in den Zentren nach 5 Std, gleichzeitig Basophilie und Fettsäurenachweis an den Fetttropfen der intermediären Zone (hier auch nach 20 Std keine Autolyselipide).

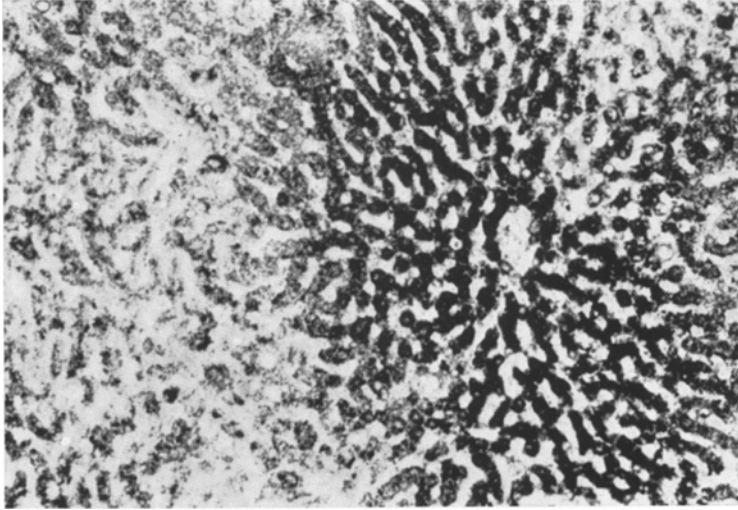


Abb. 4. S. 369/63 (76 J.). Künstliche Autolyse 8 Std. Starke zentrale Autolysekörnelung bei diffusocellulärem Lipofuscin und kleinen Tröpfchen, spärliche Autolyselipide in der Peripherie (fetttröpfen- und lipofuscinfreie Zellen). Chromierung. 120fach

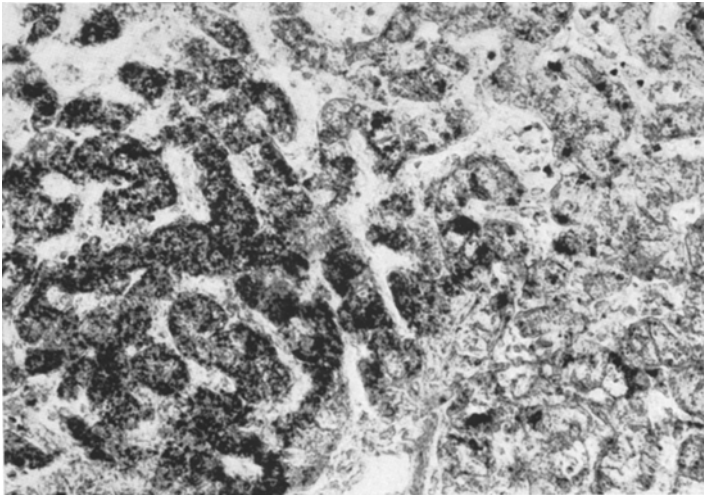


Abb. 5. S. 286/63 (86 J.). Künstliche Autolyse 3 Std. Frühe Autolysekörnelung im Bereich herdförmiger perivaskulärer Verfettung (links), keine Autolyselipide in fetttröpfchenfreien Zellen (rechts). Chromierung. 220fach

e) Herdförmige großtropfige Verfettung (zwölf Fälle). *Autolyse*: Autolyselipide fehlen oft vollständig oder sind sehr spärlich (erheblich spärlicher als in Zellen ohne Fetttropfen und ohne Fuscine) (Abb. 7). Beginn in den Herden meist erheblich später als bei allen übrigen Formen, oft erst nach 8 Std, mit Basophilie, Fettsäurenachweis und Blautönung der Fetttropfen bei Chromierung.

f) *Disseminierte große Fetttropfen* vor allem in den Zentren bei zentraler kleintropfig-perivaskulärer Verfettung und Lipofuscin. *Autolyse*: Beginn erheblich früher als beim herdförmigen Typus (e), meist zugleich mit perivaskulärer bis

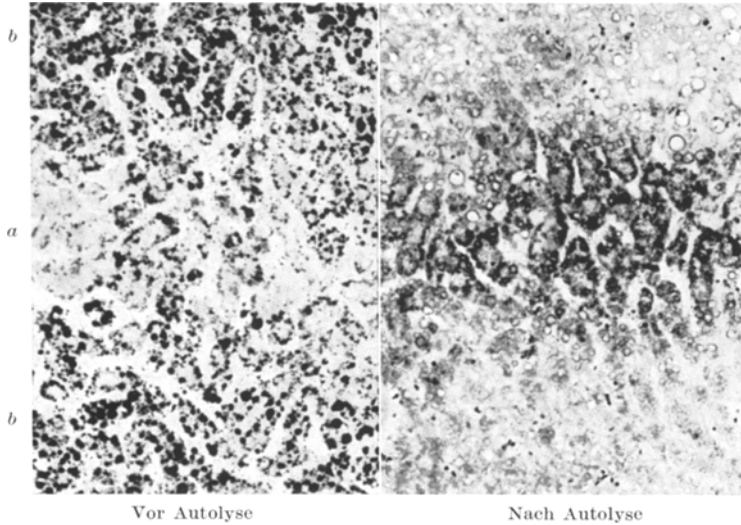


Abb. 6. S. 360/63 (60 J.). Links: peripherer (a) und intermediärer (b) Läppchenabschnitt bei geringer perivaskulärer peripherer und starker intermediärer Verfettung *vor* der Autolyse. Sudan Schwarz B. Rechts: entsprechende Stelle nach künstlicher Autolyse 3 Std. Autolysekörnchelung nur in der Peripherie (kleintropfige Verfettung, starke Esteraseaktivität!). Chromierung. 108fach

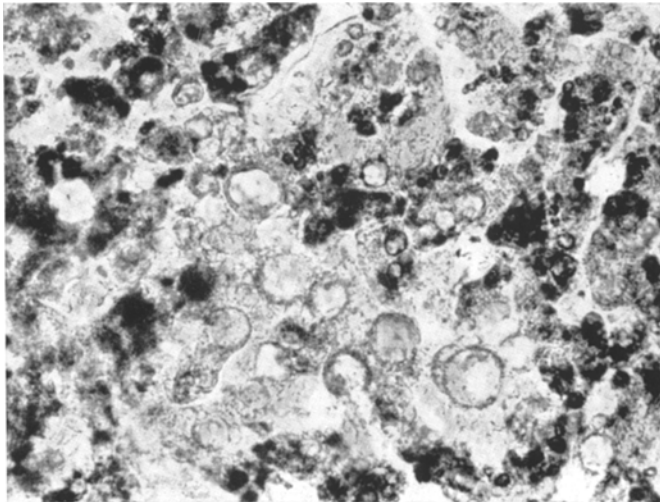


Abb. 7. S. 272/63 (48 J.). Herdförmige großtropfige Verfettung. Künstliche Autolyse 20 Std. Keine Autolyselipide im Verfettungsherd, spärliche in benachbarten Zellen ohne Fetttropfen. Chromierung. 350fach

diffusocellulärer Autolysekörnchelung im übrigen Zentrum oder wenig später. Stark ausgeprägte Veränderungen an den disseminierten Tropfen vor allem bei Chromierung, dabei dicke blauschwarze Randsäume, Zerfall in viele kleine Tröpfchen und Körnchen, intensive graublaue Färbung des übrigen Tropfens.

4. Beziehungen zur Grundkrankheit und zu Leberveränderungen. Lokalisation, Menge und zeitlicher Ablauf der Autolyseveränderungen werden, soweit erkennbar, durch Grundkrankheit und Leberveränderungen nicht beeinflusst. Herdförmig scharf begrenzte perivaskuläre Verfettungen zeigen auch bei Lebercirrhosen (fünf Beobachtungen) starke Esteraseaktivität und reichlich Autolyselipide. Über das Verhalten von Lebernekrosen kann noch nichts ausgesagt werden, weil die Beobachtungen hierfür nicht ausreichen.

5. Verfettungstypus und Menge der Autolyselipide (Übersicht). Nach der Menge der Autolyselipide ergibt sich folgende Reihenfolge:

	Menge der Autolyselipide
Großtropfige Verfettung	0—(+)
Starke mitteltropfige perivaskuläre Verfettung	0—(+)
Zellen ohne Fetttropfen und ohne Lipofuscin	+
Zellen mit zentrocellulärem und peribiliärem Lipofuscin	++
Zellen mit reichlich diffusocellulärem Lipofuscin und kleinen Fetttropfen . .	+++
Kleintropfige perivaskuläre Verfettung	+++
Kombination von diffusocellulärem Lipofuscin und kleintropfig perivaskulärer Verfettung	++++

Die disseminierte Einzel- und Gruppenverfettung läßt sich in dieser Übersicht nicht unterbringen, weil dabei Autolyselipide keine wesentliche Rolle spielen, sondern die Basophilie und Auflösung großer Fetttropfen im Vordergrund steht.

6. Autolysebefund bei Kindern. Beobachtungen an 15 Neugeborenen (darunter 8 Frühgeborenen und einem Totgeborenen), 5 Säuglingen im Alter zwischen 2 und 10 Monaten und 2 Kindern im Alter von 5 und 7 Jahren: Bei 3 Frühgeborenen mittelstarke klein- bis höchstens mitteltropfige perivaskuläre, bei allen übrigen Neugeborenen geringe, meist unterbrochene kleintropfige perivaskuläre Verfettung; bei 2 Säuglingen starke mitteltropfige perivaskuläre, bei einem Fall periphere perivaskuläre und bei 2 Fällen geringe bis höchstens mittelstarke kleintropfig perivaskuläre Verfettung.

Die Lokalisation der Autolyseveränderungen stimmt ebenso wie bei Erwachsenen mit den Maxima der Esteraseaktivität und mit der intravitalen Fettablagerung weitgehend überein. Gegenüber der Erwachsenenleber sind aber Esteraseaktivität und Menge der Autolyselipide und Fettsäurekörnchen *erheblich* geringer. Bei geringer (unterbrochener) perivaskulärer Verfettung entwickelt sich eine relativ schwache und spät, frühestens nach 7 Std, beginnende Autolysekörnelung. Menge der Autolyselipide und Esteraseaktivität nehmen mit der Verstärkung der kleintropfigen perivaskulären Verfettung zu. Erst bei hochgradiger mitteltropfiger perivaskulärer Verfettung (zwei Fälle aus dem Säuglingsalter) fehlen wie bei entsprechenden Befunden der Erwachsenenleber die Autolyselipide völlig, und die Autolyseveränderungen an den Fetttropfen beginnen erst 7 Std nach Autolysebeginn.

7. Beziehungen zwischen spontaner Autolyse, Verfettungstypus und Esteraseaktivität. Der Befund spontaner Autolyse mit seinen Beziehungen wurde an der ersten Gruppe unseres Materials (53 Fälle) ausgewertet. Die Einteilung nach 4 Schweregraden berücksichtigt Fettsäurekörnchen (FSK) als früheste und geringste und typische Autolysekörnchen als bereits voll ausgeprägte Veränderung.

Häufigkeit: Unter 53 Fällen 32mal spontane Autolyseveränderungen an den Lipiden (etwa 60%).

Davon:

I. Grades (nur FSK)	7
II. Grades (FSK + spärlich Autolyselipide)	14
III. Grades (FSK + reichlich Autolyselipide)	8
IV. Grades (weit fortgeschrittene Veränderungen, Maceration).	3

26 Fälle mit zumindest herdförmiger kleintropfig perivascularer Verfettung zeigten 20mal spontane Autolyse, 27 Restfälle nur 12mal, 22 Fälle mit spontaner Autolyse II.—III. Grades 18mal kleintropfig perivascularer Verfettung eventuell kombiniert mit diffusocellulärem Lipofuscin.

Spontane Autolyse der Fette entwickelt sich also vor allem und am stärksten in Lebern, die auch die stärksten Veränderungen bei künstlicher Autolyse und die stärkste Esteraseaktivität aufweisen und tritt in den Herden und Läppchenabschnitten der kleintropfig perivascularer Verfettung bzw. diffusocellulären Lipofuscinansammlung meist zuerst auf, vor allem in den Läppchenzentren.

Besprechung

1. Autolyse als Nachweismethode fettspaltender Enzyme. Alle Autolyseveränderungen an den Fetten der normalen Säugerleber hängen von der Aktivität fettspaltender Enzyme ab (SINAPIUS und KALBFLEISCH). Diese Schlußfolgerung aus dem histochemischen Nachweis freier Fettsäuren, aus der topographischen Übereinstimmung mit den Aktivitätsmaxima der Esterasen und der blockierenden Wirkung von E 600 gilt auch für die Leber des Menschen unter normalen und pathologischen Verhältnissen.

Der Wert der künstlichen Autolyse als Enzymnachweis hängt davon ab, wie lange die Esteraseaktivität post mortem zumindest wenig verändert erhalten bleibt, welche Empfindlichkeit und topographische Genauigkeit sie erreicht und ob sie eine wenigstens grobe quantitative Beurteilung erlaubt.

Nach KLEIN, WIDMER und GROSSMANN ändert sich die Aktivität der Lipasen, nach GÖSSNER die der unspezifischen Esterasen in den ersten 12 Std post mortem kaum, später nur langsam.

Mit der Methode nach GOMORI läßt sich in jeder normalen Leberzelle Lipaseaktivität nachweisen (KLEIN et al., EGER et al.). — Auch bei der Azofarbstoffmethode (Nachweis unspezifischer Esterasen) bilden sich nach unseren Beobachtungen in jeder Leberzelle Reaktionsprodukte. Dementsprechend entwickeln sich in allen Zellen Autolyseveränderungen, wenn die Autolyse lange genug (bis zu 20 Std) ausgedehnt wird und empfindliche histochemische Nachweismethoden Verwendung finden (unter anderen Fettsäurenachweis, Chromierung). Die künstliche Autolyse ist also als Nachweis fettspaltender Enzyme nicht weniger empfindlich und zuverlässig als enzymhistochemische Methoden; sie erlaubt allerdings nicht, die Wirkung verschiedener hydrolytischer Enzyme zu unterscheiden. Hierfür sind aber auch die verfügbaren enzymhistochemischen Methoden noch unzureichend.

Bei der künstlichen Autolyse werden feinere Unterschiede hydrolytischer Aktivität in der Zelle und im Läppchen verwischt, wenn zu lange autolysiert wird und dadurch zu reichlich Autolyseprodukte angehäuft werden. Bei zeitlicher Abstufung, d. h. erheblicher Verkürzung der Autolysezeit, lassen sich aber

selbst feine Unterschiede erfassen. Es gilt als Regel, daß die Autolyse am Ort stärkster Aktivität beginnt und sich erst dann, oft sehr viel später, auch auf die Orte schwächerer Aktivität ausdehnt. Hierin liegt die Stärke der zeitlich abgestuften Autolyse als Nachweis fettsplaltender Enzyme, und sie ist in dieser Hinsicht sogar der abgeschwächten Azofarbstoffmethode überlegen, mit deren Ergebnis sie sonst quantitativ und topographisch ziemlich genau übereinstimmt.

2. Topographie der Esteraseaktivität in der Leberzelle und im Leberläppchen unter normalen und pathologischen Verhältnissen. In der Leber des Menschen bilden sich die Produkte der unspezifischen Esterase-Reaktion und der künstlichen Autolyse zwar nicht ausschließlich, aber doch bevorzugt zwischen den häufig perivascularär liegenden kleinen Fetttropfen, am Rand aller Fetttropfen und (wie bereits von GEDIGK und BONTKE beschrieben) am Lipofuscin. Innerhalb der Zelle ergeben sich daher Aktivitäts-Maxima am Rand der Fetttropfen und je nach dem Verfettungstypus wechselnd perivascularär, zentrocellulär und peribiliär. Sind kleine Fetttropfen und Lipofuscin in der Zelle gleichmäßig (diffuso-cellulär) verteilt, dann fehlen auch ausgeprägte Maxima der Esteraseaktivität und der Autolyseveränderungen, und die Zellen sind mit Autolyselipiden gleichmäßig dicht angefüllt. Die engen topographischen Beziehungen zwischen Esteraseaktivität und allen tropfenförmigen Fetten und Lipopigmenten weisen auf die Bedeutung jener Enzyme im cellulären Fettstoffwechsel und auf ihre wesentliche Mitwirkung bei der Fettverarbeitung hin. Sie sagen über die Bildungsstätte der Enzyme nichts aus.

Wahrscheinlich hat der Rand der Fetttropfen als bevorzugter Ort der Esteraseaktivität auch eine andere Zusammensetzung als das Zentrum, wie sich aus seiner stärkeren UV-Reaktivität, der etwas intensiveren Basophilie und dem stärkeren Chrombindungsvermögen schließen läßt. Ein größerer Phosphatidgehalt in der Grenzschicht zwischen Fetttropfen und umgebendem Cytoplasma ist danach anzunehmen.

Auch innerhalb des Läppchens kommen beträchtliche Aktivitätsunterschiede vor. Eine gewisse Bevorzugung der Läppchenzentren gilt für die unspezifische Esteraseaktivität. Das Aktivitätsmaximum liegt aber, abhängig vom Verfettungstypus, oft auch in einem anderen Läppchenabschnitt, etwa in der Peripherie oder intermediär. Wenn die Zellen im ganzen Läppchen frei von Fetttropfen und Lipofuscin sind (was selten der Fall ist), fehlt ein intraacinäres Aktivitätsmaximum; Reaktionsprodukte der Esterasereaktion und Autolyseveränderungen sind dann im ganzen Läppchen gleichmäßig verteilt.

Zellen ohne Fetttropfen und ohne Lipofuscin sind durch eine relativ geringe Esteraseaktivität und entsprechend geringe Menge der Autolyselipide gekennzeichnet. Da am Lipofuscin eine erheblich stärkere Aktivität herrscht, ergibt sich daraus ein häufiges Maximum im Läppchenzentrum als bevorzugtem Ort der Lipofuscinablagerung.

Nach KLEIN et al. sollen sich hoher Fett- und hoher Lipasegehalt nicht decken, soll die Aktivität bei starker Verfettung aber vermindert sein. EGER et al. haben im Beginn experimenteller Verfettung eher eine Zunahme und erst nach mehrmaliger Vergiftung und bei hochgradiger Verfettung eine Abnahme der histochemisch nachweisbaren Lipaseaktivität gesehen.

Die Aktivität unspezifischer Esterasen ist, abgesehen vom örtlichen Maximum am Tropfenrand, bei kleintropfiger Verfettung stets verstärkt. Das Auftreten kleiner Fetttropfen in der Leberzelle (meist perivascular oder diffusocellulär) ist von einem adaptiven Anstieg der Enzymaktivität an und zwischen diesen Tropfen begleitet. Bei der daran anschließenden Fettverarbeitung bleibt die Esteraseaktivität hoch und ist noch am Lipofuscin als Nebenprodukt der Fettverarbeitung erhalten. Erst wenn bei starker perivascularer Verfettung eine bestimmte Größe der Fetttropfen überschritten ist, nimmt die Esteraseaktivität sowohl am einzelnen Tropfenrand als auch im ganzen Verfettungsbereich erheblich ab. Dementsprechend entwickeln sich nur sehr spärliche oder keine Autolyselipide und eine nur schwache Basophilie der Fetttropfen. Bei schweren großtropfigen Verfettungen erreicht die Aktivität und mit ihr der Autolysebefund schließlich ein Minimum.

In der Neugeborenen- und Säuglingsleber ist die physiologische Esteraseaktivität allgemein erheblich geringer als beim Erwachsenen. Aber auch für sie gilt die adaptive Zunahme der Aktivität im Rhythmus der Fettverarbeitung bei kleintropfiger perivascularer Verfettung und ihre Abnahme bei großtropfiger Verfettung als Zeichen der Störung.

Bei der Rückbildung großtropfiger Verfettungen scheint sich die zu erwartende Zunahme der Esteraseaktivität zunächst auf den Tropfenrand zu beschränken. Sie äußert sich in besonders früher und intensiver Basophilie der Tropfen, gelegentlich kombiniert mit deren Zerfall in kleinere Tröpfchen.

PRINZ (1958) hat auf Problematik und Bedeutung der Fetttropfenrückbildung hingewiesen. Nach seinen Beobachtungen können bei der Rückbildung auch intravital Veränderungen der Fetttropfen im Sinne der Fettspaltung auftreten. Wir halten es für möglich, daß diese Veränderungen (insbesondere die Basophilie) bei der erhöhten Enzymaktivität doch postmortal während der Präparation und Färbung in heißem Nilblausulfat entstanden sind, also nur indirekt auf den Abbau der Tropfen hinweisen.

3. Autolysebefund und Phosphatidgehalt der Leberzellen. FEYRTER hat die künstliche Autolyse als Phosphatidnachweis zur Diskussion gestellt, weil sich die Autolyselipide (Myeline) durch Zusammenlagerung fein verteilter phosphatidreicher Gemische bilden.

Die Histochemie der Autolyselipide erlaubt zwar nur sehr begrenzte Rückschlüsse auf ihre Zusammensetzung, läßt aber doch wenigstens indirekt auf einen relativ großen Phosphatidgehalt schließen (SINAPIUS und KALBFLEISCH).

Trotzdem ist die künstliche Autolyse nur dann als indirekter Phosphatidnachweis in der Leber brauchbar, wenn Phosphatidgehalt und Esteraseaktivität auch quantitativ voneinander abhängen. Nach unseren Beobachtungen ist das nicht immer der Fall.

Nur bei großtropfiger Verfettung entspricht der geringen Esteraseaktivität und geringen Menge der Autolyselipide auch ein verminderter Phosphatidgehalt, wie aus dem Ergebnis chemischer Analysen geschlossen werden kann (HARTMANN und FLECK). — Für Zellen ohne Fetttropfen bzw. Lipofuscin, in denen gleichfalls Esteraseaktivität und Autolyselipidmenge relativ gering sind, darf dagegen kein herabgesetzter Phosphatidgehalt angenommen werden. Denn die für phosphatidreiche fein disperse Lipidgemische charakteristischen Färbungen und Reaktionen sind nach bisherigen Erfahrungen nicht abgeschwächt. Trotz geringer Esteraseaktivität und Menge der Autolyselipide dürfte der Gesamtphosphatidgehalt in Lebern ohne tropfige Verfettung nicht herabgesetzt sein. — Auf der anderen Seite wäre es nicht begründet,

bei starker Esteraseaktivität und großer Autolyselipidmenge eine entsprechende Phosphatidvermehrung anzunehmen.

Die örtliche Menge der Autolyselipide erlaubt also keine Rückschlüsse auf den Phosphatidgehalt der Zellen. Esteraseaktivität und Phosphatidgehalt bestimmen zwar den Autolyselipidgehalt der Zellen, hängen aber nicht quantitativ gesetzmäßig miteinander zusammen. Die künstliche Autolyse ist daher als quantitativer Phosphatidnachweis nicht geeignet.

4. Spontane Autolyse. Spontan autolytische Fettveränderungen sind nach eigenen Erfahrungen bei höchstens 60% nicht ausgewählter Sektionsfälle zu erwarten, aber meist nur geringfügig, nur bei 15% der Lebern stärker ausgeprägt und bei einem Drittel der Fälle mit wechselnd starker Autolyselipidkörnelerung verbunden. Art und Häufigkeit der Veränderungen waren bisher nicht bekannt, weil sie am Hämatoxylin- und Sudan-III-Schnitt nicht zu sehen sind.

Für die Entwicklung spontaner Autolysefettveränderungen ist naturgemäß die Stärke der Esteraseaktivität am wichtigsten. Daher sind Säuglingslebern mit ihrer allgemein schwachen Aktivität selten und Lappchenzentren mit hoher Aktivität etwa bei kleintropfiger Verfettung häufig befallen. — Die Enzymwirkung hängt entscheidend von der Temperatur und die spontane Autolyse daher vor allem vom Abfall der Körpertemperatur post mortem ab. Bei künstlicher Autolyse entwickeln sich an Orten hoher Esteraseaktivität bei 38° meist schon in 3 Std ausgeprägte Autolyseveränderungen an den Lipiden. Da mit dieser Temperatur vor allem bei hoher Ausgangstemperatur (z. B. hohem Fieber), erhöhter Außentemperatur (Sommer!) und starkem subcutanem Fettpolster 3—4 Std nach dem Tode meist noch zu rechnen ist, müßten spontane Veränderungen der Fette eigentlich häufiger und stärker ausgeprägt sein, als es der Fall ist. Vielleicht wird die Enzymwirkung unmittelbar nach dem Tode durch körpereigene Inhibitoren für begrenzte Zeit gehemmt, bevor sie sich voll autolytisch entfalten kann. Jedenfalls scheint der autolytische Effekt der Esterasen in den ersten Stunden nach dem Tode geringer zu sein als später. Bei der Häufigkeit spontaner Fettautolyse kann die Diagnose intravital entstandener Fette mit ähnlichen Eigenschaften (Basophilie, Fettsäure-Reaktion, phosphatidreiche Gemische) an der Leichenleber problematisch sein. So hat z. B. FEYRTER offengelassen, wie weit bei der von ihm beschriebenen chromotropen lipoidigen Körnelung der Leberzellen autolytische Veränderungen im Spiele sind. Nach unseren Beobachtungen ist hiermit zu rechnen. Letzten Endes wird sich nur an Biopsien sicher entscheiden lassen, ob und in welchem Umfang basophile Tropfen und Körner auch intra vitam vorkommen.

Zusammenfassung

Bei spontaner und künstlicher Autolyse der menschlichen Leichenleber entstehen histochemisch nachweisbar a) freie Fettsäureteilchen, b) Autolyselipide (Myeline) durch Zusammenlagerung fein disperser Fette und c) freie Fettsäuren in den Fetttropfen. Alle Autolyseveränderungen hängen von der Aktivität fettspaltender Enzyme ab, beginnen am Ort stärkster Aktivität oft schon nach 2—3 Std und stimmen topographisch und quantitativ mit der Lokalisation unspezifischer Esterasen überein. Ihre Maxima liegen am Rand der Fett-

tropfen, an und zwischen kleinen Fetttropfen und am Lipofuscin. In Zellen ohne Fetttropfen bzw. Lipofuscin ist die Esteraseaktivität gering, bei großtropfiger Verfettung noch schwächer, bei kleintropfigen Verfettungen und Zellen mit diffusocellulärem Lipofuscin dagegen am höchsten. In der Säuglingsleber ist die physiologische Aktivität erheblich geringer als beim Erwachsenen. Der Autolysebefund wird durch Grundleiden, Todesursache und cirrhotischen Umbau der Leber nicht erkennbar beeinflusst. — Spontan autolytische Fettveränderungen waren an 32 von 53 Sektionsfällen vor allem bei und im Bereich hoher Esteraseaktivität nachzuweisen. — Künstliche Autolyse ist als quantitativer Phosphatidnachweis nicht geeignet.

Fats of the Postmortem Liver in Spontaneous and Artificial Autolysis: A Contribution to the Topography of Esterase Activity

Summary

In spontaneous and artificial autolysis of the human postmortem liver the following fats may be demonstrated histochemically: a) particulate, free fatty acids, b) lipids of autolysis (myelins) resulting from the accumulation of finely dispersed fats, and c) free fatty acids in the fat droplets. All the changes of autolysis depend on the activity of fat splitting enzymes; the changes begin where the activity is greatest, often within 2 to 3 hours. They correspond topographically and quantitatively to the localization of non-specific esterases. The maximal esterase activity is located at the margin of the fat droplets, at and between small droplets of fat, and at lipofuscin. In cells without fat droplets or lipofuscin the esterase activity is slight. In fatty metamorphosis with large vacuoles of fat the activity is even less, but in that with tiny vacuoles or in cells with diffuse, intracellular lipofuscin the activity is greatest. In the infant's liver the physiological activity is considerably less than in adults. The result of autolysis is not noticeably influenced by the primary disease, by the cause of death, or by cirrhotic changes of the liver. Spontaneous autolytic changes of fat were demonstrable in 23 of 53 autopsies, especially at or in the region of elevated esterase activity. Artificial autolysis is not suitable as a quantitative demonstration of phosphatide.

Literatur

- EGER, W., W. KING u. R. SCHRÖDER: Beiträge zum Verhalten der Lipasen, insbesondere der Leber, unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Acta histochem.* (Jena) **6**, 17—35 (1958).
- FEYRTER, F.: Über die chromotrope Körnelung der Leberzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 364—377 (1956).
- Über die chromotrope myelinige Entmischung der Leberzellen des Menschen durch künstliche Autolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **329**, 121—140 (1956).
- Über die chromotrope myelinige Entmischung der Leberzellen des Tieres durch künstliche Autolyse. *Z. Zellforsch.* **45**, 51—59 (1956).
- GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten. *Z. Zellforsch.* **44**, 495—518 (1956).
- GÖSSNER, W.: Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen und Esterasen während der Autolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 304—331 (1955).
- GOMORI, G.: Distribution of lipase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch. Path.* **41**, 121—129 (1946).

- HARTMANN, F., u. U. FLECK: Vergleichende chemische und histologische Analyse der Leberverfettung. *Klin. Wschr.* **30**, 652—654 (1952).
- HAUSER, H.: Über das Vorkommen von Mikroorganismen in lebendem Gewebe gesunder Tiere. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **20**, 162—202 (1885).
- KLEIN, H., H. WIDMER u. L. GROSSMANN: Die histochemische Bestimmung der Lipaseaktivität der Leber. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **88**, 295—300 (1952).
- NACHLAS, M. M., and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of esterase. *J. nat. Cancer Inst.* **9**, 415—425 (1949).
- PRINZ, F.: Über den gestaltlichen Abbau großer Fetttropfen in Leberzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 616—622 (1958).
- SINAPIUS, D., u. H. KALBFLEISCH: Zur Morphologie und Histochemie der Lipide normaler Säugerlebern bei künstlicher Autolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 311—325 (1963).

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