

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin im Städt. Krankenhaus Westend  
(Direktor: Prof. Dr. W. MASSHOFF)

## Morphologische und lipidechemische Untersuchungen zur Autolyse von Leber und Pankreas

Von

W. MASSHOFF, F. LINDLAR und H. J. STOLPMANN

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. August 1963)

Unsere Untersuchungen befassen sich mit der Frage nach den gestaltlichen und biochemischen Veränderungen in Zellen und Geweben, die der „Selbstauflösung“ anheimfallen. Bei der „Selbstauflösung“ im lebenden Organ bzw. Gewebe können bekanntlich auto- und heterolytische Effekte interferieren, wir versuchten letztere durch bestimmte Voraussetzungen soweit wie möglich auszuschließen.

Die licht- und phasenmikroskopischen Strukturveränderungen während der Autolyse sind von E. MÜLLER umfassend dargestellt worden. Ältere Studien über die Autolyse haben sich vornehmlich mit den Veränderungen des Kohlenhydrat- und Eiweißbestandes der Zelle befaßt. Unsere Studien sollen sich in erster Linie dem Verhalten der lipiden Bestandteile, im besonderen der Phosphatide, zuwenden. Die Phosphatide nehmen eine Sonderstellung unter den Fettstoffen ein, da sie bis zu 95% an endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien und Kerne nicht nur gebunden, sondern an deren Strukturbildung wesentlich beteiligt sind.

HAUSER hat 1886 erstmalig die während der Autolyse auftretende sogenannte Fettphanerose beschrieben. KAWAMURA konnte bereits 1911 mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes Neutralrot eine mit fortschreitender Autolyse zunehmende Rotfärbung der Fetttropfen feststellen, die er auf die Freisetzung von Fettsäuren bezog. In neuerer Zeit hat FEYTER unter anderem bei der Autolyse der menschlichen Leber mit der von ihm eingeführten Weinsteinsäure Thionin-Einschlußfärbung chromotrope Substanzen dargestellt. Da diese Substanzen auch im lebenden Gewebe auftreten, lassen sie sich nicht sicher von der tropfigen myelinigen Entmischung des Cytoplasmas bei der natürlichen oder künstlichen Autolyse abgrenzen. SINAPIUS u. a. fanden bei der Autolyse von Säugetierlebern eine primär noch nicht nachweisbare Basophilie der Fetttropfen. Durch geeignete Verfahren, unter anderem unter Verwendung des basischen Anilinfarbstoffes Methylviolettl bei konstanten  $p_H$ -Werten zwischen 2,4 und 3,0 und Kontrollversuchen mit Fermentblockern konnten diese Untersucher die Freisetzung von Fettsäuren bei der autofermentativen Fettspaltung histochemisch verfolgen. Nach den Untersuchungen von SINAPIUS kann kein Zweifel bestehen, daß es sich bei den histochemisch darstellbaren lipiden Zellveränderungen um sehr komplexe Vorgänge handelt.

Wir wollen mit unseren Untersuchungen zeigen, daß hierbei hydrolytischen Prozessen mit dem Auftreten von Phosphatidspaltprodukten einschließlich freien Fettsäuren eine besondere Bedeutung zukommt. Die Kenntnis der von uns erhobenen Befunde im Verlauf der Autolyse ist nicht nur morphologisch von Interesse, sondern auch eine unbedingte Voraussetzung für die Deutung lipidechemischer Untersuchungen.

### Material und Methodik

Wir untersuchten Pankreas und Leber eines 5 Jahre alten gesunden Hundes, der in Pentothal-Narkose durch Herzschnitt getötet worden war. Die Gewebsementnahmen erfolgten unmittelbar nach der Tötung, dann in Minuten und größer werdenden Abständen bis zu 6 Tagen. Die Organteile wurden bei 20° C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Für die histologische Untersuchung wurde das Gewebe in der üblichen Weise fixiert, in Paraffin eingebettet oder gefriergeschnitten und nach verschiedenen Methoden gefärbt. Für die elektronenmikroskopischen Zwecke wurden die Gewebsstückchen in den gleichen Zeitabständen bis zu 24 Std entnommen, in gepufferter Osmiumsäure fixiert, nach Entwässerung in Methacrylat eingebettet, mit dem Porter-Blum-Mikrotom geschnitten und mit dem Siemens-Elektronenmikroskop UM 100 bei einer Strahlspannung von 60 kV untersucht<sup>1</sup>.

Die lipidchemische Aufarbeitung erfolgte nach der Methode von FOLCH, die Papierchromatographie der Lipidextrakte auf Kieselgelpapier nach THIELE und WOBER. Sämtliche Extrakte wurden im Lösungsmittelgemisch A, ein Teil im Gemisch B als mobiler Phase chromatographiert. Außerdem wurden bei mehreren Proben zweidimensionale Chromatogramme in den Fließgemischen A und C angefertigt. Zur Identifizierung der aufgetrennten Lipide dienten  $R_F$ -Wert, Vergleiche mit Testsubstanzen<sup>2</sup>, ferner sog. Zusatzversuche mit diesen Substanzen sowie folgende Färbungen: Bromthymolblau (JATZKEWITZ) und Phosphor-ammoniummolybdat (KAUFMANN) zur Darstellung sämtlicher Lipide, Ninhydrinfärbung zum Nachweis von Phosphatiden mit primären Aminogruppen, Molybdatophosphorsäure für den Cholin- und fuchsin-schweflige Säure für den Plasmalogen-Nachweis (s. THIELE u. WOBER).

Zur quantitativen Auswertung der papierchromatographisch auftretenden Flecke wurden diese im Anschluß an die unbeständige Bromthymolblaufärbung sofort mit dem Bleistift markiert, nach dem Trocknen ausgeschnitten und durch dreimaliges Auskochen mit methanolischer Säure extrahiert. In den zur Trockne eingedampften Extrakten wurde nach der Veraschung mit konz. Schwefelsäure der Lipoid-Phosphor nach der Methode von FISKE und SUBBAROW spektrophotometrisch bestimmt. Aus den P-Werten wurde nach Umrechnung mit den üblichen Faktoren für jeden Fleck der entsprechende Phosphatidwert ermittelt. Zur quantitativen Bestimmung der Phosphatide in den verschiedenen Gesamtlipidextrakten wurden aliquote Mengen abpipettiert, nach dem Verdampfen des Lösungsmittels gewogen und nach der angegebenen Methode der Phosphor bestimmt. Zur Errechnung der Gesamtphosphatide wurden die Phosphor-Werte mit dem Faktor 25 multipliziert.

### Ergebnisse

*Lichtmikroskopisch* sind erwartungsgemäß in den entnommenen Organanteilen nach Minuten bis zu etwa 6 Std, abgesehen von einer graduell verschiedenen Aufquellung, keine wesentlichen Strukturabwandlungen festzustellen. Erst nach 6 Std kann man eine gewisse Verdichtung des normal gleichmäßig granulären Cytoplasma der Zellen von Pankreas und Leber, eine zunehmende Kernwandhyperchromasie und eine geringe Verkleinerung der Zellen mit gleichzeitiger Erweiterung des extracellulären Raumes beobachten. Gleichzeitig treten vermehrt feine sudanophile Granula in den Sternzellen der Leber und in den basalen gefäßnahen Abschnitten der Pankreaszellen auf. Nach 24 Std sind Zunahme der Sudanophilie, Homogenisierung des Cytoplasmas, Kernwandhyperchromasie

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. J. H. HELMCKE, Direktor des Instituts für Mikromorphologie der Max-Planck-Gesellschaft, und Herrn Prof. Dr. W. SCHWARZ, Direktor der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität, Berlin-Dahlem, danken wir für ihre Unterstützung.

<sup>2</sup> Für die Überlassung von Testsubstanzen sind wir Frau Prof. Dr. H. DEBUCH vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln, Herrn Prof. Dr. L. HÖRHAMMER, Direktor des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, sowie der Firma A. Nattermann & Cie., Köln-Braunsfeld, sehr zu Dank verpflichtet.

und Unschärfe der Zellgrenzen verstärkt. Nach dem 3. Tag lösen sich allmählich die Parenchymzellen auf, bis schließlich nur noch das bindegewebige Gerüst und eine nicht oder kaum anfärbbare amorphe Masse mit einzelnen sudanophilen Tropfen übrigbleiben.

**Elektronenmikroskopischer Befund.** Das Cytoplasma der lebensfrischen normalen Pankreas- und Leberzellen enthält besonders in Kernnähe reichlich längs- und quergetroffenes, nicht

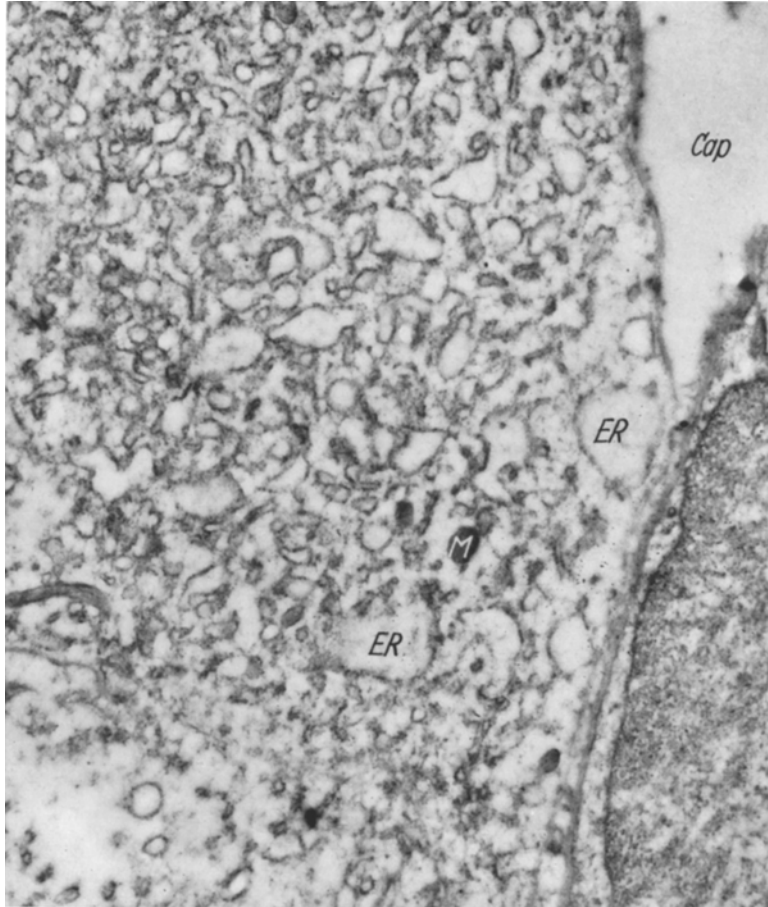


Abb. 1. Exokrine Pankreaszelle nach 90 min. Zisternenartig erweitertes endoplasmatisches Reticulum (ER) besonders in Capillarnähe (Cap.). Mitochondrien unverändert (M). Vergr. 20 000fach

erweitertes endoplasmatisches Reticulum (ER) mit sehr viel RNS-Granula. Dazwischen liegen in den Pankreaszellen durchschnittlich  $0,5 \mu$  große, von einer zarten Membran umschlossene Cymogengranula mit einer homogenen dichten Matrix. Mitochondrien langgestreckt oder oval und mit typischen Cristae. Perinucleärer Raum nicht erweitert. Im feingranulären Karyoplasma der Leber- und Pankreaszellen häufiger ein oder zwei Kernkörperchen in der Nähe der Kernwand.

Nach 60 min sind in den isolierten Zellverbänden die ersten Veränderungen am ER nachweisbar. Das ER ist zisternenartig erweitert, stellt ein durch eine einfache Membran begrenztes System von Hohlräumen dar und zeigt eine deutliche Verminderung der RNS-Granula. Um die Cymogengranula der Pankreas

zellen hat sich ein schmaler optisch leerer Spalt eingestellt, die Masse der Granula scheint abgenommen zu haben. Kerne und Mitochondrien sind unverändert.

Nach 90 min haben sich die genannten Veränderungen besonders in den in Capillarnähe gelegenen Zellen verstärkt (Abb. 1). In den blasigen Räumen des ER liegen feinstgranuläre wenig dichte Partikel, der Schwund von RNS-Granula

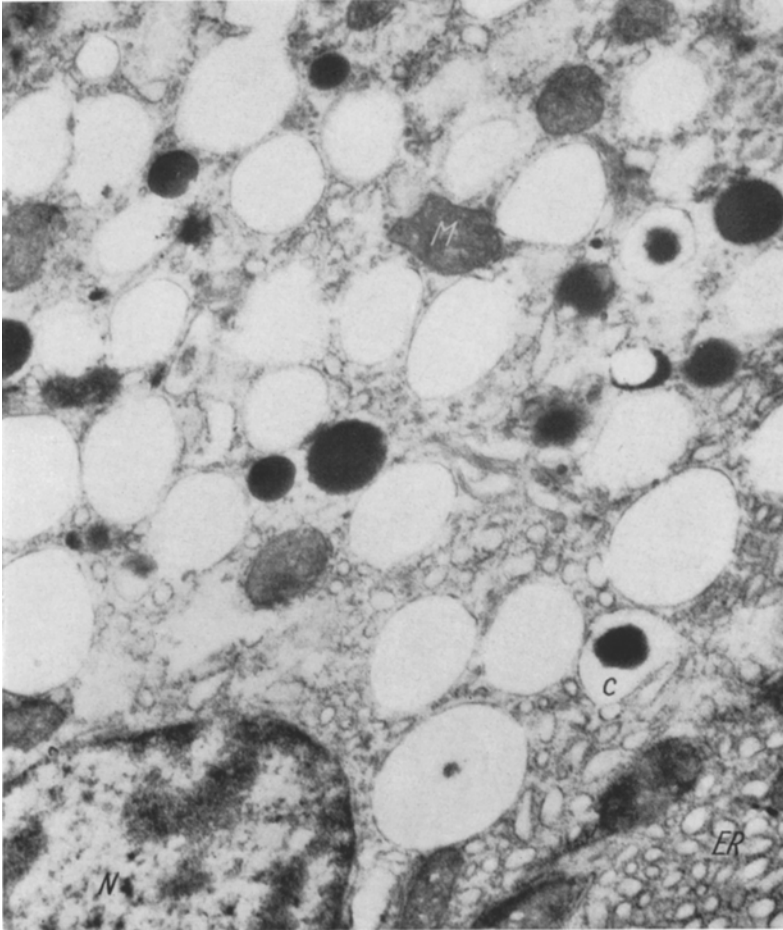


Abb. 2. Exokrine Pankreaszelle nach 120 min. Beginnende Verdichtung der Kernwandzone (N). Verkleinerung der Cymogengranula (C) bei erhaltener Grenzmembran. Vergr. 38 550fach

hat zugenommen. Der perinucleäre Raum ist manchmal etwas erweitert. Kerne und Mitochondrien immer noch unauffällig.

Nach 2 Std treten in den nicht auffällig erweiterten Membranen des ER gelegentlich feinstnetzige elektronendichte Substanzen auf. Die Membranen haben ihre übliche scharfe Zeichnung stellenweise verloren und erscheinen verwaschen. Einzelne Mitochondrien haben Kugelform angenommen, ihre Cristae sind nur noch in den Randzonen erhalten, die Matrix ist im übrigen mehr oder weniger homogen. In den Pankreaszellen haben sich die Räume um die Cymogen-Granula vergrößert, die Granula selbst sind eindeutig verkleinert, ihre Membran ist aber noch leidlich erhalten (Abb. 2).

Nach 3 Std ist in einigen Zellen das ER noch auffallend gut erhalten, in anderen jedoch schon aufgelöst und in Bruchstücke zerfallen. Nunmehr sind auch die Kerne verändert, ihr Plasma ist aufgelockert, offenbar entmischt, die Kernwand verbreitert, ihr sind Teile des entmischten Karyoplasma angelagert, die Zellbegrenzung hat ihre ursprüngliche Form weitgehend behalten.

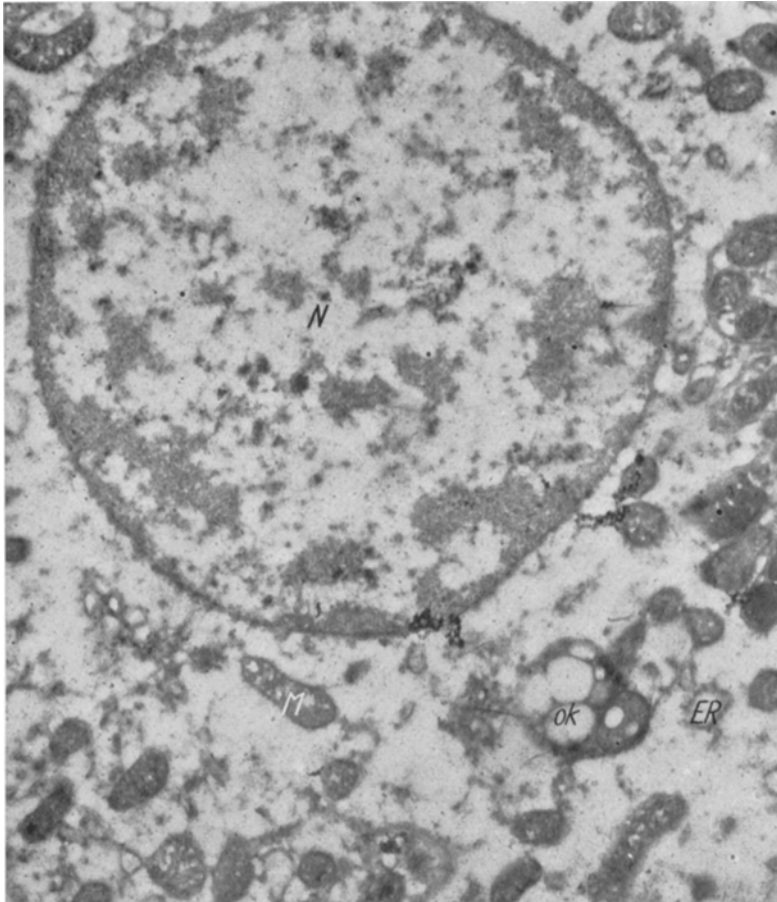


Abb. 3. Leberzelle nach 180 min. Verdichtung der Kernwandzone (N). Vacuolen in der Matrix der Mitochondrien (M). Vereinzelte erhaltene Membranen des ER. Aufhellung des Cytoplasma. Unregelmäßig große vacuoläre osmiophile Körperchen (oK). Vergr. 17850fach

Nach 6 Std liegen die Mitochondrien anscheinend ungeordnet im Cytoplasma, zeigen eine vacuolige Umwandlung der feingranulären Matrix, ihre Membran und Reste der Cristae sind noch darstellbar. Es erscheinen nunmehr im Cytoplasma verschieden große, von einer einfachen Membran begrenzte Bläschen, die offensichtlich aus dem ER stammen, und ferner einige unterschiedlich große, z.T. vacuolige und stärker osmiophil sich verhaltende Teilchen (Abb. 3). Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß nach 6 Std neben stärker desintegrierten Zellen solche anzutreffen sind, die noch weitgehend von der Autolyse verschont und fast normal zu sein scheinen.

Nach 24 Std wird die Desorganisation der Zellen evident. Die Mitochondrien sind stark vacuolisiert, ihre Lamellen verwaschen und zum Teil aufgelöst. Die Membranen des ER sind weitgehend fragmentiert und unscharf, regellos gelagert. Daneben erscheinen im Cytoplasma reichlich granuläre Gebilde verschiedener Größe und unregelmäßig gestaltete bis  $1\ \mu$  große osmiophile Partikel. Die Kernwand ist verbreitert und unregelmäßig verdichtet, das Karyoplasma aufgequollen, fast gleichmäßig homogen und hell ohne darstellbare Einzelbestandteile. Die Cymogen-Granula sind aus den Pankreaszellen vollständig geschwunden. Die Begrenzung von Leber- und Pankreaszellen läßt sich bis 24 Std deutlich nachweisen; die Zellmembranen haben ihre Kontinuität behalten, zeigen aber eine allmählich zunehmende Auflockerung und Unschärfe.

**Chemischer Befund.** Im Pankreas findet sich, wie aus Abb. 4 hervorgeht, innerhalb der ersten 8 Std ein Phosphatidabfall von anfänglich rund 70% auf 40%. Im Laufe von 6 Tagen sinkt der Phosphatidgehalt (bezogen auf Gesamtlipide) weiter ab bis auf 12%. In der Leber ist der Phosphatidabfall in den ersten 8 Std von 63% auf 54% nicht so stark.

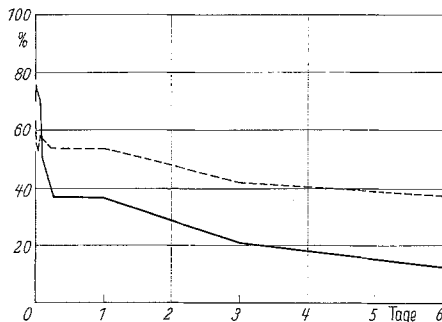


Abb. 4. Phosphatide in Prozent der Gesamtlipide während der Autolyse von Pankreas — und Leber - - -

Tabelle. a) Zusammensetzung der Phosphatide in Prozent während der Autolyse des Pankreas

	Frisch	15 min	60 min	90 min	120 min	360 min	1 Tag	3 Tage	6 Tage
Colamin-Kephalin . . .	14,8	13,1	14,5	14,7	16,4	16,3	16,5	7,2	4,2
Lecithinfraktion . . .	66,9	67,9	66,5	64,8	65,3	64,2	62,7	14,4	11,0
Sphingomyelin . . .	7,0	7,0	6,9	9,2	7,1	7,0	7,9	24,0	32,8
Lysophosphatide . . .	2,6	3,3	2,5	2,1	2,6	2,3	4,1	47,2	44,5
Monophosphoinositid . .	8,7	8,7	9,6	9,2	8,6	10,2	8,8	7,2	7,5

b) Zusammensetzung der Phosphatide in Prozent während der Autolyse der Leber

	Frisch	60 min	120 min	1 Tag	6 Tage
Colamin-Kephalin . . .	24,9	23,0	23,9	21,8	19,6
Lecithinfraktion . . .	58,8	60,0	59,5	57,4	52,4
Sphingomyelin . . .	7,8	8,3	8,0	8,5	10,5
Lysophosphatide . . .	1,4	2,4	2,6	4,1	8,7
Monophosphoinositid . .	7,1	6,3	6,0	8,2	8,8

Abb. 5 gibt ein eindimensionales Papierchromatogramm der Gesamtlipide des Pankreas und der Leber wieder und zeigt das Verhalten der Lipidfraktionen, soweit diese durch Bromthylmolblau darstellbar sind. Aus der Tabelle a u. b ist die prozentuale Verschiebung in der Phosphatidzusammensetzung ersichtlich. Die Lecithin-Fraktion besteht zum überwiegenden Teil aus dem cholinpositiven Lecithin, zum kleineren Teil aus einer ninhydrin- und Schiff-positiven Substanz.

Bei dieser zweiten Komponente dürfte es sich um Colamin-Plasmalogen handeln (s. später). Die Lysophosphatide bilden im mit Bromthymolblau gefärbten Chromatogramm einen einzigen gelben Fleck. Dieser setzt sich jedoch aus dem cholinpositiven Lysolecithin und dem ninhydrinpositiven Lysokephalin zusammen. Weiterhin findet sich bei  $R_F$ -Werten um 0,20—0,23 ein P-haltiger, ninhydrin-, cholin- und Schiff-negativer Fleck, der sich wie Monophosphoinositid verhält. Es kann z.Z. noch nicht entschieden werden, ob dieser Fleck nicht auch Diphosphoinositide einschließt. Aus der Tabelle ersieht man ferner, daß nach 24 Std im

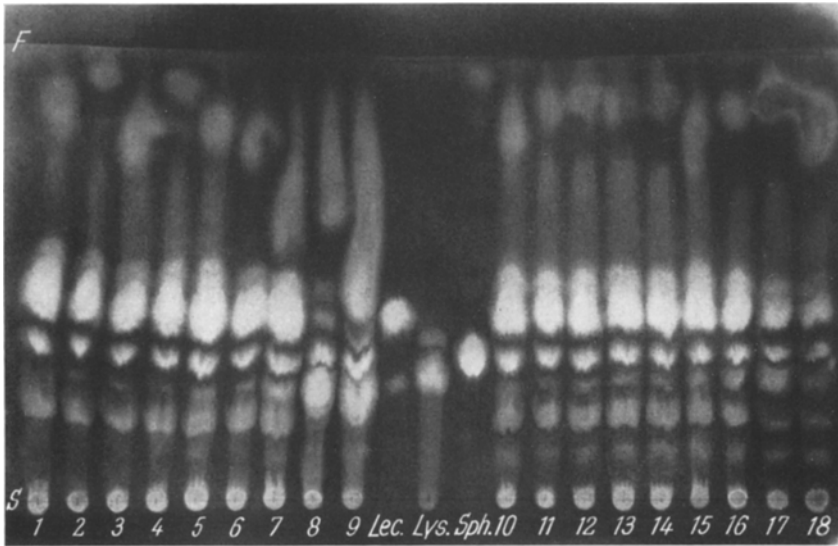


Abb. 5. Eindimensionales Papierchromatogramm der Gesamtlipide des Pankreas (1—9) und der Leber (10—18) unmittelbar nach der Tötung (Auftragstelle 1 bzw. 10) und nach Autolyse (15, 30, 90, 120 min, 6, 24, 72 und 144 Std, Auftragstellen 2—9 bzw. 11—18). Testsubstanzen: Lecithin mit Spur Lysolecithin (*Lec.*), Lysokephalin mit wenig Sphingomyelin (*Lys.*), Sphingomyelin (*Sph.*). Kieselgel-papier Schleicher & Schüll 289. Lösungsmittelgemisch A.  $6\frac{1}{2}$  Std bei  $0^{\circ}\text{C}$  aufsteigend. Bromthymolblaufärbung. Auftragsmenge jeweils mit gleichem Gehalt an Gesamtlipiden. Testsubstanz Lysokephalin etwas weiter gewandert als die gleiche Substanz in den Lipidgemischen. Bei den aufgetrennten Gesamtlipidextrakten handelt es sich bei dem unmittelbar vor dem Lecithin auftretenden Fleck um Colamin-Kephalin. S Start; F Front

Pankreas sehr stark und in der Leber weniger stark sowohl das Colamin-Kephalin als auch die Lecithinfraction abnehmen, während die Lysophosphatide zunehmen. Die Zunahme des papierchromatographisch einheitlichen Sphingomyelin ist nur relativ. Sie wird dadurch vorgetäuscht, daß mit der Abnahme von Lecithin und Kephalin die Lysophosphatide nicht genau reziprok, sondern weniger stark zunehmen, weil ein Teil der Lysophosphatide weiter zu nichtlipoiden Produkten abgebaut wird.

Das Chromatogramm der Gesamtlipide nach der Ninhydrinfärbung gibt die Abb. 6 wieder. Nach 6 Std (Auftragstelle 6 bzw. 15) sind noch keine lipoiden Abbauprodukte nachweisbar. Nach 3 und 6 Tagen (Auftragstellen 8 und 9 bzw. 17 und 18) treten mehrere Flecke auf, die erwartungsgemäß im Pankreas am intensivsten sind. Abb. 7 zeigt dieselben ninhydrinpositiven Flecke, zweidimensional getrennt nach 6tägiger Autolyse. Während im frischen Pankreaslipidextrakt stets nur 3 Flecke (Colamin-Kephalin, Colamin-Plasmalogen und ein Fleck an der Auftragstelle) erscheinen, stellen sich nach 6tägiger Autolyse neun klar voneinander

getrennte Flecke dar, von denen bisher als ninhydrin-positiver Fleck nur ein einziger identifiziert werden konnte, nämlich Lysokephalin.

Auf die Wiedergabe des auf Plasmalogen gefärbten eindimensionalen Chromatogrammes soll verzichtet werden. Es findet sich hierbei ein sehr intensiver Fleck im Lecithinbereich, der nach ein-tägiger Autolyse vollständig verschwindet. Da dieser auch mit Ninhydrin eine positive Reaktion gibt, besteht kaum ein Zweifel, daß es sich um Colamin-Plasmalogen handelt. Lysophosphatide und andere Phosphatidabbauprodukte stellen sich bei der Plasmalogenfärbung nicht dar.

### Besprechung

Die Deutung der licht- und elektronenmikroskopischen Befunde an autolisierenden Zellen ist ohne biochemische Daten und entsprechende Korrelierung mit der Morphologie unvollkommen und hypothetisch.

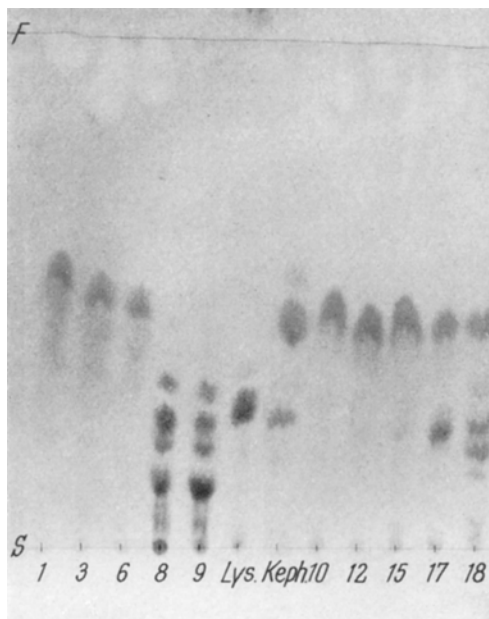


Abb. 6. Eindimensionales Papierchromatogramm der Gesamtlipide des Pankreas (links) und der Leber (rechts). Ninhydrinfärbung. Verfahren und Numerierung entsprechend Abb. 5. Testsubstanzen: Lysokephalin (Lys.) und Colamin-Kephalin mit wenig Lysokephalin (Keph.).

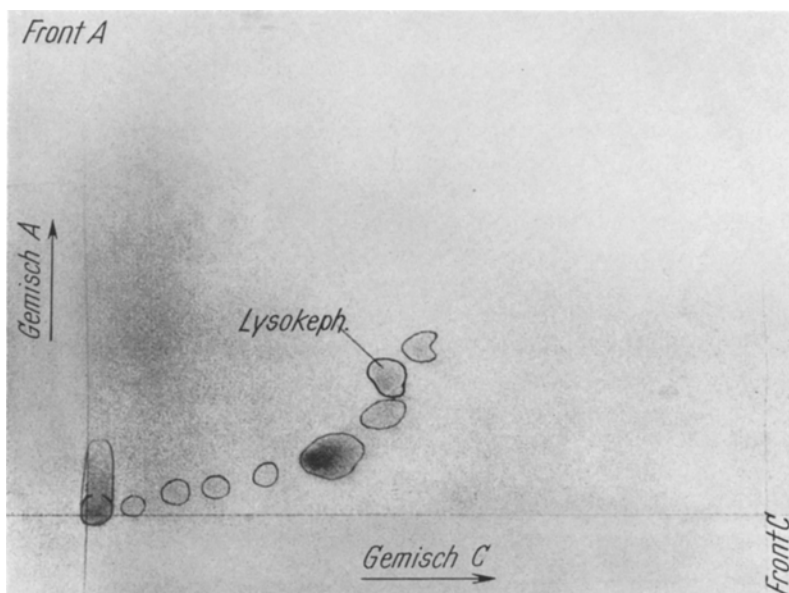


Abb. 7. Zweidimensionales Papierchromatogramm (Fließgemische A und C) der Gesamtlipide des Pankreas nach 6-tägiger Autolyse. Ninhydrinfärbung. (Erläuterung s. Text)



Nach unseren Befunden erleiden die isolierten Leber- und Pankreaszellen in einer dem intermediären Leben entsprechenden Phase Veränderungen, die sich zunächst an den Membranen des ER äußern und in einer blasigen Auftreibung sowie einem Verlust an RNS-Granula bestehen. Unter der Intermediärphase verstehen wir den zwischen Individualtod einerseits und dem tatsächlichen Zelltod andererseits liegenden Zeitraum. In Parallele zur Intermediärphase bei der Leiche sprechen wir bezogen auf Zellen des lebenden Organismus von einer perimortalen Phase, wie kürzlich für die besonderen Gegebenheiten bei den Zuständen von „Vita reducta“ dargelegt wurde (MASSHOFF).

Das ER erweist sich damit als ein sehr empfindliches Strukturgebilde, was auch für die lebende Zelle von Bedeutung sein dürfte. Dies ist in der Tat der Fall und auch nach eigenen bioptischen Untersuchungen an der Leber bei deren voller Funktionstüchtigkeit erwiesen (REMMER und MERKER; MASSHOFF; MASSHOFF und STOLPMANN. Nach diesen Befunden haben gewisse Strukturstörungen an den Membranen des ER als reversibel zu gelten.

Die sich Schritt für Schritt danach einstellenden Veränderungen an den anderen Zellorganellen münden schließlich in die völlige Auflösung der zelligen Struktur ein, wie schon CAMERON gezeigt hat. Ein wichtiges Merkmal für die Irreversibilität der Strukturbeeinträchtigung scheint das Auftreten von bestimmten osmophilen Produkten zu sein.

Als auffälliges und allgemein-pathologisch interessantes Phänomen verdient der Befund Beachtung, daß sich die Autolyse an gleichartigen Zellen, in unserem Falle exokrinen Pankreaszellen, nicht gleichmäßig und gleichzeitig einstellt. Dies könnte in dem Sinne zu deuten sein, daß der jeweilige Zustand im Funktionscyclus der hochspezialisierten Zellen den Start der Autolyse beeinflußt. Für die Katabiose von Zellen in vivo werden vergleichbare Voraussetzungen wohl auch eine Rolle spielen.

Die Erweiterung des ER als initiale Strukturbeeinflussung dürfte auf eine Veränderung des intracellulären osmotischen Druckes zurückzuführen sein. Die Aufrechterhaltung dieses Druckes ist an Energie gebunden, die im wesentlichen von  $O_2$ -abhängigen, an den Cristae intermitochondriales lokalisierten Fermentsystemen aufgebracht wird. Aus der akuten Ernährungsnot der Zelle resultiert offenbar als erstes eine Störung im Wasserhaushalt, wie auch aus anderen elektronenmikroskopischen Untersuchungen hervorgeht. Dabei könnte es sich einmal um eine Verschiebung von intracellulärem Wasser oder aber um eine Aufnahme von Wasser aus dem extracellulären Raum handeln, im letztgenannten Fall würde sich eine Vergrößerung der Zelle ergeben. Der Einstrom extracellulärer Flüssigkeit bei gestörter Permeabilität der Zellmembran ist wahrscheinlicher, da die Erweiterung des ER in der Zellperipherie und besonders in der Nähe von Capillaren eintritt, auch wenn eine merkliche Vergrößerung der Zelle nicht nachweisbar ist. Auf jeden Fall wird mit einer Änderung des Flüssigkeitsgehaltes der Zellen eine Ionenverschiebung und damit auch eine Änderung des pH verbunden sein.

Der danach allmählich in Gang kommende fermentative Abbau geht gewissermaßen gestuft vor sich; nach Beeinträchtigung des ER folgt etwa gleichzeitig jene der mitochondrialen Cristae und des Kernes, die wie das ER zunächst ebenfalls eine Störung der Wasserverteilung aufweisen. Mit der Störung der Membranstrukturen und ihrer Schritt für Schritt erfolgenden Auflösung geht eine Art

von Entmischung im Cytoplasma und im Kern mit dem Auftreten nicht definierbarer Partikel einher. Nach der 6. Std schreitet die fermentative Desorganisation der Zelle rasch fort, allerdings bleibt die Zellmembran verhältnismäßig lange erhalten. Ähnliche Befunde wurden von DAVID und CAESAR erhoben. Der elektronenoptische Nachweis von osmiophilen Teilchen im Cytoplasma schon nach 6 Std verdient im Hinblick auf den chemischen Befund Beachtung. Diese osmiophilen Substanzen, offensichtlich hervorgegangen aus der Desintegration der lipidhaltigen Membranen, sind sicher die Grundlage für die lichtmikroskopisch erst später nachweisbaren sudanophilen Bestandteile. Über die Art und Weise der fermentativen Zerstörung der Zellstrukturen läßt sich selbstverständlich elektronenmikroskopisch im einzelnen nichts aussagen.

Nach biochemischen Untersuchungen von MAJNO steigen die extrahierbaren Peptide, d.h. aus Proteinen stammende Bestandteile, bis zur 6. Std post mortem an, um dann abzunehmen, was der Freisetzung von Strukturproteinen aus den zerstörten Membranen entsprechen könnte. In annähernd entsprechender Weise fallen auch die Phosphatide als strukturgebundene und strukturbildende Lipide in den ersten 6—8 Std ab, wie wir durch quantitative Bestimmung des Lipoid-Phosphors aus Extrakten der Gesamtlipide bewiesen haben. Auffallend ist aber die zeitliche Diskrepanz zwischen dem starken Abfall der Phosphatide in den ersten 6—8 Std und dem papierchromatographisch nicht vor 12—24 Std zu führenden Nachweis nennenswerter Mengen von Abbauprodukten der Phosphatide. Dieses auffällige Verhalten könnte sich biochemisch so erklären lassen, daß in den ersten Stunden post mortem Phosphatidabbauprodukte, z.B. Lysophosphatide, einen weiteren Abbau zu nichtlipoiden Stoffen erfahren und sich deshalb dem papierchromatographischen Nachweis entziehen. Nach 12—24 Std sind die betreffenden Enzyme offenbar erschöpft. Es bleiben deshalb wahrscheinlich lipoide Abbauprodukte liegen und werden nunmehr im Lipidchromatogramm nachweisbar. Diese Deutung findet elektronenoptisch eine gewisse Stütze; solange es nämlich noch Membranen des ER mit den entsprechenden an ihnen lokalisierten Fermentsystemen gibt, geht der Phosphatidabbau weiter bis zu nichtlipoiden Stoffen. Die Phosphatidabbauprodukte werden erst chemisch nachweisbar, wenn die Membransysteme vor allem des ER zerstört sind, was nach 12 und mehr Stunden der Fall ist.

Nach biochemischen Untersuchungen anderer Autoren bestehen 30% des Trockengewichtes der Mikrosomen aus Phosphatiden, was etwa 65% der Gesamtphosphatide des Cytoplasma entspricht. Für den Anfall von Phosphatidabbauprodukten nach den ersten 6 Std ist in Rechnung zu stellen, daß die Mitochondrienmembranen hauptsächlich aus Phosphatiden bestehen und diese erst um diese Zeit der Zerstörung anheimfallen.

Die von uns biochemisch erwiesene Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Dauer der Autolyse ist mit enzymhistochemischen Befunden von GÖSSNER gut in Einklang zu bringen. GÖSSNER fand erst 12 Std nach der Tötung der Tiere eine einwandfreie Änderung der Aktivität und auch der Lokalisation von Phosphatasen und Esterasen und bringt dies mit den zu diesem Zeitpunkt histologisch nachweisbaren Strukturzerstörungen in Zusammenhang. Der Abbau der Neutralfette wurde von uns nicht näher untersucht.

Nach dem reichlichen Auftreten von Zwischenprodukten erscheint ein komplexer Mechanismus der Phosphatidspaltung (vgl. Abb. 7) als ziemlich sicher. Bei diesem Mechanismus dürfte die Phospholipase A (Lecithinase A), die für die

Abspaltung des ersten Fettsäuremoleküls aus Esterphosphatiden verantwortlich ist (s. bei PEZOLD), eine Rolle spielen. Dadurch entstehen aus Lecithinen und Kephalingen Lysolecithin bzw. Lysokephalin. Die Phospholipase A kommt in zahlreichen tierischen Geweben vor, ihre stärkere Anreicherung im Pankreas des Menschen wurde kürzlich von MAGEE nachgewiesen. Augenscheinlich ist deswegen auch nach unseren Befunden der Phosphatidabbau im Pankreas viel intensiver als in der Leber. Ein weiterer Punkt beim Phosphatidabbau betrifft die Abspaltung von Aldehyd aus Plasmalogen. Nach dem Ergebnis der Papierchromatographie gewinnt man den Eindruck, daß mehr Lysokephalin als Lysolecithin entsteht (s. auch KLENK), obwohl ursprünglich das Organ wesentlich mehr Lecithin als Kephalin enthält und mehr Lecithin als Kephalin abgebaut wird (vgl. Tabelle a). Danach kann nicht Lysokephalin ausschließlich durch Wirkung der Phospholipase A auf Kephalin (besonders Colamin-Kephalin) entstanden sein, vielmehr muß eine weitere Quelle für die Entstehung von Lysokephalin gefordert werden. THIELE hat in reaktionskinetischen Untersuchungen zur Plasmalogenspaltung gezeigt, daß neben der enzymatischen sowohl eine spontane als auch eine säurekatalytische Abspaltung des Aldehyd aus Plasmalogen bei pH 3,5 und weniger in Betracht zu ziehen ist. Bei der während der Autolyse auftretenden Acidose dürfte deshalb auch diese Form für die Umwandlung von Plasmalogen in Lysophosphatide, insbesondere von dem am weitesten verbreiteten Colamin-Plasmalogen in Lysokephalin verantwortlich sein. Nur durch die Beteiligung dieses Mechanismus wird die starke Zunahme von Lysokephalin nach ein- und mehrtägiger Autolyse von Pankreas und Leber verständlich.

Stabilere Lipide von der Art des Sphingomyelin oder der Inosit-Phosphatide scheinen vom Abbau wenigstens in den ersten 6 Tagen der Autolyse nicht in nennenswertem Umfang betroffen zu sein. Auch das Cholesterin und seine Ester verändern sich nach eigenen orientierenden Untersuchungen am Pankreas ebenso wie nach den Befunden von KLENK an der Leber des Menschen nicht wesentlich.

Unsere auf das Verhalten der Lipide ausgerichteten Untersuchungen zeigen erwartungsgemäß, daß mit der aus zahlreichen morphologischen und chemischen Analysen bekannten Desintegration des Eiweißes der Zelle während der Autolyse auch eine solche der Zelllipide einhergeht, ergeben darüber hinaus, daß der Lipidabbau an die Auflösung bestimmter lamellärer Strukturen gebunden ist. An diesen spielen sich offenbar die für das Leben von Zellen entscheidenden Vorgänge ab, was — auf die Verhältnisse in vivo übertragen — für die Frage der Reversibilität oder Irreversibilität katabiotischer Zellprozesse nicht ohne Bedeutung sein dürfte.

### Zusammenfassung

Autolysierende Zellen aus Pankreas und Leber vom Hund wurden licht-, elektronenmikroskopisch und lipidchemisch untersucht, um die strukturellen Störungen mit dem Verhalten der Zelllipide zu korrelieren.

Submikroskopisch treten als erstes Änderungen in der Flüssigkeitsverteilung der Zelle auf, nach etwa 6 Std beginnt die am endoplasmatischen Reticulum einsetzende, dann langsam fortschreitende Desintegration der lamellären Zellstrukturen.

Mit der Beeinträchtigung der fermenttragenden Membransysteme kommt es nach lipidchemischen Analysen zu einem Phosphatidsturz. Erst nach etwa 12 Std

werden papierchromatographisch Phosphatidabbauprodukte nachweisbar und zwar besonders reichlich Lysolecithin und Lysokephalin. Die zeitliche Inkongruenz wird mit dem Abbau von Phosphatiden bis zu nichtlipoiden Produkten durch bis dahin erhalten gebliebene fermenthaltige Zellorganellen erklärt.

Die beim Abbau von Phosphatid und Neutralfett in größeren Mengen freigesetzten höheren ungesättigten Fettsäuren sind für die zunehmende Sudanophilie während der Autolyse mitverantwortlich. Osmiophile Substanzen als gestaltetes Substrat der Sudanophilie treten elektronenoptisch nach etwa 6 Std auf.

### Autolysis of liver and pancreas. Morphology and Chemistry of Lipids

#### Summary

Autolyzing pancreatic and liver cells from a dog were examined by light- and electron microscopy and tested for their lipid contents. The first changes observed by electron microscopy concern the distribution of fluid within the cell. After six hours a disintegration of the endoplasmic reticulum begins, which then slowly spreads to involve the lamellar structures of the cell.

Analyses for lipid contents show a drop in phosphatides after the enzyme bearing lamellar systems have become affected. After approximately 12 hours products of the degradation of phosphatides can be demonstrated by paper chromatography. Among these, lysolecithine and lysocephaline are especially abundant. This time difference may be explained by the activity of preserved enzyme bearing cell particles which promote the breakdown of phosphatides into non-lipoid degradation products.

The increase in sudanophilia accompanying autolysis is due to the liberation of long chain unsaturated fatty acids which result from the breakdown of phosphatides and neutral fat. Osmiophilic substances, representing morphologically the sudanophilia, appear electron-microscopically after about six hours.

#### Literatur

- CAMERON, G. R.: Pathology of the cell, p. 295—303. Edinburgh and London 1952.  
— The chemistry of the injured cell, p. 97—100, edit. N. S. KUGELMASS. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1962.
- CAESAR, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei der Autolyse in vivo. Verh. dtsch. Ges. Path. **45**, 278 (1961).
- DAVID, H.: Zur Abhängigkeit postmortaler Kern- und Mitochondrienveränderungen von der Art des Einbettungsmittels (Methacrylat und Polyester). The Proc. of the European Regional Conference on Electron Microscopy, Delft 1960, edit. A. L. HOUWINK und B. J. SPIT, vol. II, p. 623—625, publish. by De Nederlandse Vereniging voor Electronenmicroscopie, Delft.
- FEYRTER, F.: Über die chromatropen Körnelung der Leberzellen. Virchows Arch. path. Anat. **328**, 364—377 (1956).  
— Über die chromatropen myelinige Entmischung der Leberzellen des Menschen durch künstliche Autolyse. Virchows Arch. path. Anat. **329**, 121—140 (1956).
- FOLCH, J., M. LEES and G. H. SLOANE STANLEY: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. biol. Chem. **226**, 497—509 (1957).
- GÖSSNER, W.: Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen und Esterasen während der Autolyse. Virchows Arch. path. Anat. **327**, 304—313 (1955).
- HAUSER, G.: Über das Vorkommen von Mikroorganismen im lebenden Gewebe gesunder Thiere. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **20**, 162—202 (1886).

- JATZKEWITZ, H., u. E. MEHL: Zur Dünnschichtchromatographie der Gehirn-Lipoide, ihrer Um- und Abbauprodukte. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **320**, 251—257 (1960).
- KAUFMANN, H. P., Z. MAKUS u. F. DEICKE: Die Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet. II. Mitt. Trennung der Cholesterin-Fettsäureester. *Fette u. Seifen* **63**, 235—238 (1961).
- KAWAMURA, R.: Die Cholesterinesterverfettung (Cholesterinsteatose). Eine differentialdiagnostische morphologische Studie über die in menschlichen und tierischen Geweben vorkommenden Lipoide. Jena: Gustav Fischer 1911.
- KLENK, H. D.: Diss. Köln 1963 (in Vorbereitung).
- MAGEE, W. L., J. GALLAT-HATCHARD, H. SANDERS and R. H. S. THOMPSON: The purification and properties of phospholipase A from human pancreas. *Biochem. J.* **83**, 17—25 (1962).
- MAJNO, G., M. LA GATTUTA and T. E. THOMPSON: Cellular death and necrosis: Chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch. path. Anat.* **333**, 421—465 (1960).
- MASSHOFF, W.: Allgemeine und spezielle Pathologie der Vita reducta. *Kongreßber. inn. Med.* **69**, 59—84 (1963).
- , u. H. J. STOLPMANN: Elektronenmikroskopische Befunde in Leberbiopsien nach exogener Intoxikation. *Klin. Wschr.* **42**, 21 (1964).
- PEZOLD, F.: Lipide und Lipoproteide im Blutplasma, 1. Aufl. S. 66—67. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961.
- REMMER, H., u. H. J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). *Klin. Wschr.* **41**, 276 (1963).
- SINAPIUS, D.: Autofermentative Basophilie, Quellung und Auflösung von Fetttropfen der fixierten Leber. *Histochemie* **3**, 150—169 (1962).
- , u. H. KALBFLEISCH: Zur Morphologie und Histochemie der Lipide normaler Säugerlebern bei künstlicher Autolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 311—325 (1963).
- SJÖSTRAND, F. S.: The ultrastructure of the ground substance of the cytoplasm. In: *Fine structure of cells*. Union internat. des sciences biologiques, internat. union of biological sciences, Ser. B, No 21, Symposium held on the VIIIth congr. of cell biology, Leiden 1954, p. 222—228. Groningen (Netherlands): P. Noordhoff Ltd.
- THIELE, O. W.: Untersuchungen über die Plasmalabspaltung in wäßrigen Phosphatid-Solen. *Biochemistry of lipids*, p. 102—104. Oxford: Pergamon-Press 1960.
- u. W. WÖBER: Zur papierchromatographischen Trennung von Phosphatiden auf einem neuartigen Kieselgelpapier. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **326**, 89—93 (1961).

Professor Dr. W. MASSHOFF,  
Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin  
im Städt. Krankenhaus Westend,  
1 Berlin 19, Spandauer Damm 130