

Aus den Pathologischen Instituten der Universitäten Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)
und Marburg (Direktor: Prof. Dr. P. GEDIGK)

Über die formale Genese lipogener Pigmente Untersuchungen mit Estern hochungesättigter Fettsäuren

Von

PETER GEDIGK und WINFRIED PLOCH* **

Mit 11 Textabbildungen, davon 3 farbigen

(Eingegangen am 12. September 1964)

Die fetthaltigen Pigmente Lipofuscin und Ceroid sind einem Alterungsprozeß unterworfen, in dessen Verlauf ihre morphologischen, histochemischen und färbereichen Eigenschaften weitgehend verändert werden [ASCHOFF, HAMPERL, PEARSE, GEDIGK (3)]. Besonders eindrucksvoll ist der Umbau ihres Lipidbausteines, der in „alten“ Pigmenten manchmal mengenmäßig scheinbar in den Hintergrund tritt und mit den üblichen Methoden schließlich nicht mehr nachweisbar ist. Diese Tatsache hat auch in der jüngsten Zeit zu sehr verschiedenen Auffassungen über die biologische Bedeutung der Lipopigmente, und zwar besonders des Lipofuscins, geführt. So ist einerseits die Ansicht vertreten worden, daß Lipide nicht regelmäßig, sondern nur vorübergehend oder zufällig in diesen Strukturen vorkommen, und daß demnach besondere Beziehungen dieser Pigmente zum Fettstoffwechsel unwahrscheinlich sind [LUBARSCH (1, 2); BRAHN und SCHMIDTMANN (1, 2); KUTSCHERA-AICHBERGEN; HEIDENREICH und SIEBERT]. Demgegenüber wird von anderen Autoren dem Fettbaustein und den an ihm ablaufenden Oxydationsvorgängen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Lipopigmente beigemessen [CIACCIO (1); SACHS; ENDICOTT; DAM und GRANADOS (1, 2); MASON und EMMEL; MASON, DAM und GRANADOS; GRANADOS u. Mitarb.; BENSLEY; CASSELMAN; ALPERT; TAPPEL; GEDIGK und BONTKE (1, 2); GEDIGK (3); GEDIGK und FISCHER (1, 2); NOVIKOFF (1, 2); WOLMAN und SHOSHAN; MILDVAN und STREHLER; STREHLER; WOLMAN (4)].

Ältere und neue Versuche zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung von isolierten Lipopigmentgranula, welche vielleicht zur Klärung dieser Fragen hätten beitragen können, ergaben wegen der Schwierigkeit, reines, unverändertes Lipofuscin zu gewinnen, und in Anbetracht der Unlöslichkeit des Lipidbausteines keine befriedigenden Resultate [BRAHN und SCHMIDTMANN; (1, 2) ENDICOTT und LILLIE; DAM und GRANADOS; MOORE und WANG; HEIDENREICH und SIEBERT]. Diese Probleme traten besonders in einer sehr gründlichen Arbeit von SIEBERT, DIEZEL, JAHR, KRUG, SCHMITT, GRÜNBERGER und BOTTKE zutage. So zeigte es sich, daß auch diese Untersuchungen nicht an ganz unveränderten Pigmenten vorgenommen wurden, weil an den isolierten Granula elektronenmikroskopisch keine Innenstruktur erkennbar war, während die Vielfalt der submikroskopischen Formationen in Lipofuscinen durch zahlreiche Arbeiten bekannt und bestätigt worden ist (Literatur bei GEDIGK und WESSEL). Die chemische Aufarbeitung des isolierten Pigmentes ergab, daß neben Proteinen und extrahierbaren Lipiden ca. 30% des Trockengewichtes von einer in Wasser, Säuren und organischen Lösungsmitteln selbst in der Wärme unlöslichen Substanz eingenommen wurde. In dieser von den Autoren als „schwarzer Rückstand“ bezeichneten Substanz ließ sich zwar neben Schwefel und Indolkörpern — wie zu erwarten — Stickstoff nachweisen;

* Herrn Prof. Dr. H. HAMPERL zum 12. 9. 1964 gewidmet.

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

eine weitere chemische Charakterisierung dieser amorphen Masse war aber wegen ihrer Unlöslichkeit erschwert bzw. unmöglich. Vor allem war es nicht gelungen, eine einwandfreie Identifizierung der wiederholt nachgewiesenen ungesättigten Lipide und ihrer Oxydations- und Polymerisationsprodukte vorzunehmen, eben weil ihre Aufarbeitung wegen ihrer Unlöslichkeit aus methodischen Gründen undurchführbar war.

Neue Ergebnisse erzielten MILDVAN und STREHLER; STREHLER und MILDVAN (1, 2); HENDLEY, STREHLER, REPORTER und GEE sowie STREHLER, welche in isolierten Lipofuscingranula des menschlichen Myocards fluoreszierende Phospholipide mit den chromatographischen Eigenschaften von autoxydiertem Kephalin fanden. In späteren Experimenten bestätigten HENDLEY u. Mitarb. (2, 3) die Pigmentierung des Lipidextraktes der Granula und beobachteten die stärkste spezifische Fluoreszenz in der Cardiolipinfraction. — Ein weiterer Fortschritt gelang unlängst BJÖRKERUD (1, 2), der die Zusammensetzung des aus dem menschlichen Herzmuskel isolierten Lipofuscins mit modernen Methoden, und zwar besonders durch chromatographische Verfahren, analysierte. Er fand neben Lipiden und Proteinen ein harzartiges, auch bei der sauren Hydrolyse resistentes Material, dessen nähere Charakterisierung offen bleiben mußte. Als wesentliche Lipide wurden Cholesterinester, Triglyceride, Cholesterin, Kephaline, Lecithin und Sphingomyelin nachgewiesen. Daneben zeigten sich kleine Mengen von Sulfatiden und Spuren einer Substanz, der wahrscheinlich Ganglioside zugrunde lagen. Die Eigenfarbe und die Fluoreszenz wurden in der Lipidfraction beobachtet, obwohl viele identifizierte, offenbar niedermolekulare Lipide weder gefärbt waren noch eine Eigenfluoreszenz besaßen.

Die Problematik der an isolierten Pigmenten gewonnenen Analysendaten wird besonders deutlich, wenn man diese in den letzten zwei Jahren mit modernen Methoden erzielten Resultate vergleicht: So schwanken die Angaben über den Lipidgehalt der Pigmentgranula zwischen 19% (SIEBERT u. Mitarb.), 24–40% [HENDLEY u. Mitarb. (3)] und 51% [BJÖRKERUD (2)]. Für die Proteine werden folgende Werte angegeben: 50% (SIEBERT u. Mitarb.), 43–58% [HENDLEY u. Mitarb. (3)] und 30% [BJÖRKERUD (2)]. Den unlöslichen Rückstand fanden die genannten Autoren in einer Menge von 30%, 10–20% bzw. 9%. Ganz entsprechend uneinheitlich sind die Angaben über die Zusammensetzung der Lipidbausteine und den Aminosäuregehalt.

In Anbetracht dieser Befunde schien es angezeigt, Experimente mit reinen, ungesättigten Fettsäureestern durchzuführen und deren Schicksal im Gewebe zu verfolgen, um so vielleicht auf einem indirekten Weg einen weiteren Einblick in die Bedeutung dieser Substanzen für die kausale und formale Genese von Lipopigmenten zu gewinnen. Parallel zu unseren Tierversuchen über die Entstehung des Ceroids bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose [GEDIGK und FISCHER (1)] und des Lipofuscins im Vitamin-E-Mangelzustand [GEDIGK und FISCHER (2) sowie GEDIGK und WESSEL] injizierten wir deshalb Ester ungesättigter Fettsäuren in die Subcutis von Mäusen und beobachteten ihre Verarbeitung im Cytoplasma von Makrophagen. Außerdem prüften wir die Änderung ihrer histochemischen Eigenschaften auf Objektträgerausstrichen, d.h. ihren ohne die Mitwirkung einer lebenden Substanz ablaufenden oxydativen Umbau.

Unsere Experimente galten somit der Frage, welche Rolle ungesättigte Lipide bei der Entstehung der Lipopigmente spielen, und wieweit der früher nachgewiesene Alterungsprozeß tatsächlich auf einer Oxydation und Polymerisation dieser Fettstoffe beruht. Von besonderem Interesse waren die nach einer längeren Versuchsdauer auftretenden Oxydationsprodukte der ungesättigten Fettsäureester, weil sich gerade in alten Pigmenten ein tiefgreifender chemischer und struktureller Umbau vollzieht. Wir dehnten deshalb unsere Beobachtungen auf einen verhältnismäßig langen Zeitraum, nämlich $1\frac{1}{2}$ –2 Jahre, aus. Außerdem sollte geklärt werden, welche chemischen und histochemischen Eigenschaften der Lipopigmente an ihre Lipidkomponente gebunden sind.

Versuchsanordnung und Methoden

Für die Tierversuche verwendeten wir 10—15 Wochen alte weiße Inzuchtmäuse (18—22 g), die Würfelfutter (Latz-Standardkost nach Bahner) erhielten. Zusätzlich wurden Karotten und Salatblätter gegeben. Diesen Tieren verabfolgten wir durch subcutane Injektionen folgende Fettsäureester:

I. Insgesamt 51 Tieren wurden je 0,2 ml einer 15%igen wäßrigen Emulsion von *reinen Methylestern hochungesättigter C₂₀- und C₂₂-Polyensäuren* aus Lebertran (JZ 307) injiziert¹. Diese Substanz wurde nach verschiedener Vorbehandlung verwendet:

a) 17 Tiere erhielten eine 15%ige Emulsion der reinen, unveränderten, in Stickstoffatmosphäre aufbewahrten (wasserklaren) Substanz.

b) Die gleiche Substanz (wie unter a)) ließen wir bei Zimmertemperatur 6—8 Monate unter Luftzutritt stehen. Sie färbte sich dabei gelblich und wurde dann 17 Tieren zu je 0,2 ml in einer 15%igen Emulsion subcutan verabfolgt.

c) Die gleiche Substanz (wie unter a)) wurde mit H₂O₂ behandelt und als 15%ige Emulsion 17 Tieren zu je 0,2 ml in die Subcutis injiziert.

Tötung der Tiere jeweils am 2., 4., 7., 14., 21., 28., 44., 50., 60., 75., 100., 150., 220., 300., 360., 400., 430. Versuchstag.

II. 19 Tieren verabfolgten wir 0,2 ml einer 10%igen Emulsion von *Lebertran* (DAB VI). Tötung der Tiere wie unter I.

III. 14 Tieren wurde je 0,2 ml einer Mischung von Lebertran und α -Tokopherol (gleiche Teile 10%ige wäßrige Lebertranemulsion (DAB VI) und reines α -Tokopherol [Merck 500 949]) verabfolgt.

Tötung der Tiere nach 10, 20, 40, 75, 100, 200, 230 Versuchstagen.

IV. 14 Tieren wurde α -Tokopherol injiziert; und zwar 7 Tieren 0,2 ml Tokopherol als reine Substanz und 7 Tieren in einer 10%igen wäßrigen Emulsion zu 0,2 ml.

Tötung der Tiere nach 10, 30, 45, 60, 100 und 150 Tagen.

V. Je 0,15—0,2 ml einer 10%igen wäßrigen Emulsion von Palmitinsäuremethylester injizierten wir 13 Tieren.

Tötung der Tiere am 14., 20., 30., 45., 50., 60., 75., 90., 125., 150. Versuchstag.

Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet. Im Bereich der Lipidablagerungen präparierten wir die Rückenhaut unter Mitnahme der oberflächlichen Lagen der langen Rückenmuskulatur ab. Die stecknadelkopf- bis reiskorngroßen Granulome, welche sich nach der Injektion ungesättigter Fettsäureester gebildet hatten, ließen sich durch ihre gelbbraune Eigenfarbe leicht auffinden. Die anderen Granulome waren dank ihrer weißlichen Farbe gut erkennbar.

Die abpräparierten Gewebstücke fixierten wir größtenteils 16—24 Std in einer 10%igen neutralen Formalinlösung (10 ml 40%iges Formalin, 10 ml 10%iges CaCl₂, 10 ml 10%iges CdCl₂ wurden mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt). Davon stellten wir in der üblichen Weise Gefrierschnitte und Paraffinschnitte her. Daneben wurden kleinere Gewebstücke in Äthanol fixiert und in Paraffin eingebettet. Ein Teil des Materials wurde frisch, d.h. ohne vorherige Behandlung mit Fixierungsmitteln, für die Herstellung nativer Gefrierschnitte (Kryostat) verwendet.

Die angewandten *histochemischen Reaktionen* und histologischen Färbungen sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Ihre Durchführung erfolgte nach den Angaben von PEARSE (1), GEDIGK (2) sowie GEDIGK und TOTÓVIĆ.

An einem Teil der Granulome wurden histochemische Reaktionen zum *Nachweis von Enzymen* durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in einer früheren Arbeit veröffentlicht worden [GEDIGK und BONTKE (2)].

Untersuchungsergebnisse

I. Methylester ungesättigter Fettsäuren und Lebertran

Die Speicherung sowie die extra- und intracelluläre Umwandlung der verschiedenen Methylester ungesättigter Fettsäuren und des Lebertranes erfolgte in

¹ Herrn Prof. Dr. Dr. E. KLENK und Frau Prof. Dr. H. DEBUCH, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln, danken wir für die liebenswürdige Überlassung von Substanzproben dieser Fettsäure-Methylester und für die Beratung bei der Durchführung der Experimente.

prinzipiell gleichartiger Weise. Wir beschränken uns deshalb auf die Beschreibung der Ergebnisse, die bei der Verabfolgung von reinen, ungesättigten Fettsäureestern erzielt wurden:

4—14 Tage nach der Injektion fanden wir die Fettsäureester in den Saftspalten des subcutanen Bindegewebes teils als Tropfen und teils als geschichtete Membranen (Abb. 1a). Nach dem Abklingen der exsudativen Gewebsreaktion kam es — genau wie bei der Ablagerung anderer Fremdkörper — zu einer Proliferation histiocytärer Elemente und zur Sprossung von Capillaren. In diesem resobierenden Granulationsgewebe traten Histiocyten mit den injizierten Fettsäureestern in enge Berührung und phagocytierten kleinere und größere Partikel. Nicht selten bildeten sich Fremdkörperriesenzellen. Im Cytoplasma der mononucleären Phagocyten und der Riesenzellen traten dann Lipidtropfen auf, die histochemisch folgende wesentliche Eigenschaften besaßen (vgl. Tabelle 2):

Die intracytoplasmatischen Lipidtropfen waren sehr stark sudanophil. Bei der Einbettung des Gewebes in Paraffin wurden sie größtenteils aus dem Schnitt gelöst, so daß im Cytoplasma der phagocytierenden Zellen kleine Hohlräume auftraten. Einige Fetttropfen waren aber schon nach dieser kurzen Zeit in den üblichen organischen Lösungsmitteln nicht mehr löslich und blieben auch im Paraffinschnitt erhalten (Abb. 1b). Sie gaben eine starke Perameisensäure-Schiff-Reaktion und eine deutliche bis starke Reaktion für Peroxyde. Mit der Bakerschen Reaktion waren sie dunkel-grauschwarz gefärbt. Dagegen besaßen sie keine Eigenfarbe und zeigten nur eine ganz schwache weißliche bis hellgelbe Eigenfluorescenz. Mit dem Schiffschen Reagens und bei der Färbung nach ZIEHL-NEESEN wurden sie anfangs nicht angefärbt. Bei der PAS-Reaktion stellten sie sich zunächst nur sehr schwach oder überhaupt nicht dar (Abb. 2a). Eine nennenswerte Affinität für basische Farbstoffe (Abb. 3a) und ein Reduktionsvermögen (Abb. 4a und 5a) waren histochemisch nicht nachweisbar. Die Reaktionen zum Nachweis von Aminosäuren und Proteinen waren fast stets negativ.

Die extracellulär in den Saftspalten liegenden Lipidmassen und die intracytoplasmatischen Lipidtröpfchen zeigten histochemisch in allen wesentlichen Punkten das gleiche Verhalten.

Nach 44—60 Tagen fanden sich im Bereich der Injektionsstellen zahlreiche mononucleäre Phagocyten und Fremdkörperriesenzellen, welche die in den Saftspalten liegenden teils amorphen und teils membranartig angeordneten Lipidmassen abbauten. Das Cytoplasma der phagocytierenden Zellen war auf das dichteste mit kleinen und großen lipidhaltigen Granula angefüllt. Diese hatten in der Zwischenzeit ihre färberischen und histochemischen Eigenschaften geändert (vgl. Tabelle 1 und 2):

Die lipidhaltigen Granula ließen sich mit Fettlösungsmitteln nicht mehr aus dem Gewebe extrahieren und blieben auch im Paraffinschnitt erhalten. Mit Sudanfarbstoffen wurden sie sehr stark angefärbt (Abb. 1c). Sie besaßen eine hellgelbe Eigenfarbe und eine hellgelbe Autofluorescenz (Blaulicht). Die Eigenfarbe und die Eigenfluorescenz wurden durch die Behandlung der Schnitte mit Fettlösungsmitteln nicht abgeschwächt. Mit dem Schiffschen Reagens wurden die Körnchen deutlich gefärbt. Die Bakersche saure Hämateinmethode ergab eine grauschwarze Farbe. Die PAS-Reaktion, die Perameisensäure-Schiff-Reaktion und die Prüfung der Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEESEN fielen sehr stark positiv aus. Peroxyde waren mit histochemischen Methoden nach 44 Tagen noch in geringem Umfang, nach 60 Tagen nicht mehr nachweisbar. Die lipidhaltigen Granula besaßen nunmehr eine Affinität für basische Farbstoffe; ihre Methylenblaubindfähigkeit ließ sich bis pH 3,5 verfolgen. Durch den Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC wurden sie stark angefärbt. Dagegen ergab die Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL ein negatives Resultat. Die Reaktionen für Aminosäuren und Proteine fielen nicht einheitlich aus: In den großen intracytoplasmatischen Fettkugeln waren die Eiweißreaktionen stets negativ. Die kleineren Granula gaben dagegen mitunter eine positive Tetrazoniumreaktion und eine schwache Ninhydrin-Schiff-Reaktion. Auch der Argininnachweis fiel oft schwach positiv aus.

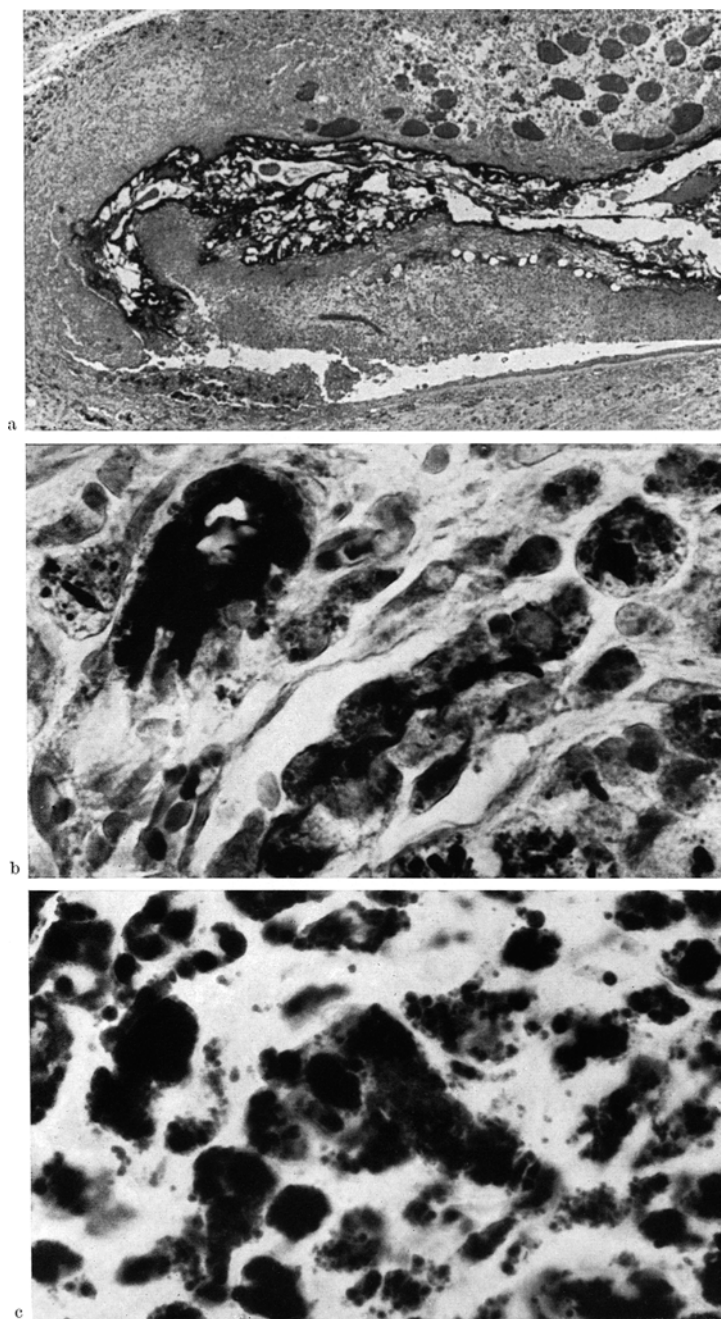


Abb. 1a—c. Verarbeitung eines ungesättigten Fettsäureesters in der Subcutis (der gleiche Versuch wie Abb. 2, 3, 4, 5, 9 und 10). Paraffinschnitte. Färbung mit Sudanschwarz und Kernechtrot. a 4 Tage nach der Injektion: In den Saftspalten liegen die Fettsäureester teils als geschichtete Membranen und teils tropfenförmig; bei der Paraffineinbettung werden sie noch teilweise aus dem Schnitt gelöst. In der Umgebung Ansammlungen von Makrophagen und Histiocyten. Vergr.: 45fach. b 7 Tage nach der Injektion. Die Phagocyten wandern an die in den Saftspalten liegenden, teils amorphen, teils membranartig gefalteten Fettsäureester heran und nehmen bereits einzelne Lipidpartikel in ihr Cytoplasma auf. Vergr.: 700fach. c 44 Tage nach der Injektion finden sich im Cytoplasma der Phagocyten dicht gelagerte, verschieden große Tropfen des Fettsäuremethylesters, welche bereits zum Ceroidpigment umgeformt sind. Vergr.: 900fach

Die extracellulär liegenden Methylester der ungesättigten Fettsäuren hatten ebenfalls ihre Löslichkeit verloren. Sie waren jedoch nur ganz schwach gelblich gefärbt; auch ihre Eigenfluoreszenz zeigte einen mehr weißen bis gelblichweißen Farbton. Die Prüfungen der Basophilie und des Reduktionsvermögens fielen weit schwächer aus als bei den phagocytierten Lipiden. Wie zu erwarten, waren die Reaktionen für Aminosäuren (Proteine) negativ. Bei den übrigen histochemischen Reaktionen unterschieden sie sich noch nicht nennenswert von den intracytoplasmatischen Lipidgranula.

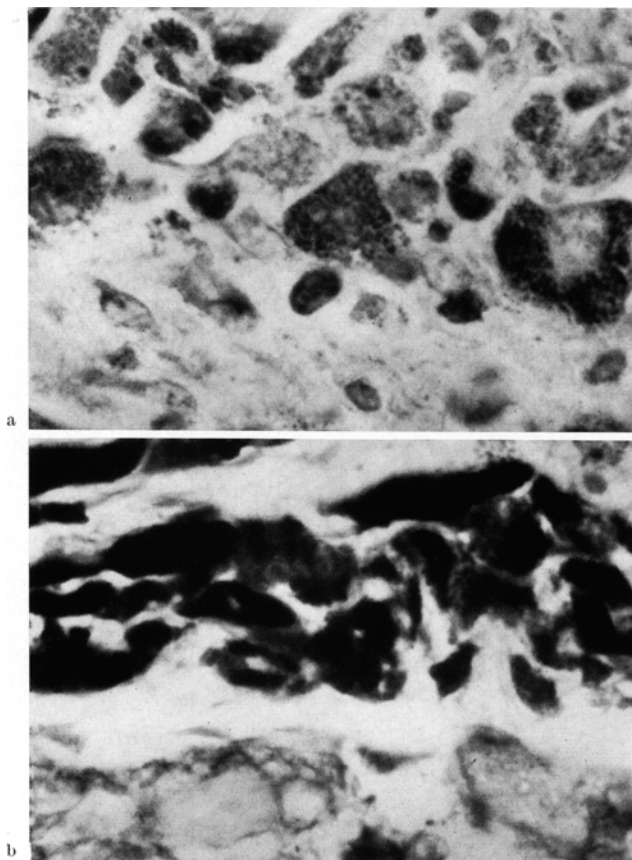


Abb. 2a u. b. Phagocyten bei der Speicherung des gleichen ungesättigten Fettsäureesters (der gleiche Versuch wie in Abb. 1, 3, 4, 5, 9 und 10), Paraffinschnitte, PAS-Reaktion. Vergr.: 900fach. a 14 Tage nach der Injektion. Die Lipidtröpfchen sind teils ungefärbt, teils geben sie schon eine mehr oder weniger deutliche PAS-Reaktion. b 360 Tage nach der Injektion. Sehr starke PAS-Reaktion der intracytoplasmatischen Pigmentkörnchen (oben). Schwächere Reaktion der nicht phagocytierten amorphen Fettsäureester in den Saftspalten (unten)

In der folgenden Zeit (nach 7—14 Monaten) schritten die Resorption und Phagocytose der in den Gewebsspalten abgelagerten Lipide nur noch langsam fort. Die in das Cytoplasma eingeschlossenen größeren Lipidtröpfchen wurden in zunehmendem Maße in kleinere Partikel unterteilt, so daß sich in ein und derselben Zelle nebeneinander lipidhaltige Granula von verschiedener Größe fanden. Ihre färberischen und histochemischen Eigenschaften hatten sich weiterhin verändert, und zwar um so stärker, je kleiner sie waren. Sie gaben jetzt folgende histochemische Reaktionen (vgl. Tabelle 2):

Nach wie vor waren die Granula in organischen Lösungsmitteln unlöslich und nach der Paraffineinbettung ebenso gut erhalten wie in den Gefrierschnitten. Ihre Sudanophilie war

Tabelle 1

Übersicht über die histochemischen Eigenschaften und das färberische Verhalten reiner Methylester ungesättigter Fettsäuren, des Ceroids, des Lipofuscins und des Vitamin E-Mangelpigmentes

Färbungen und histochemische Reaktionen	Methylester polyungesättigter Fettsäuren			Ceroid (Mensch und Ratte) ⁴	Lipofuscin (Mensch)	Vitamin E-Mangelpigment (Ratte) ⁵
	Objektträger-ausstrich ¹	Im Interstitium der Subcutis (extracellulär) abgelagert (Maus) ²	Im Cytoplasma von Makrophagen gespeichert und zum Pigment umgeformt (Maus) ³			
Eigenfarbe	gelb	hellgelb	hellgelb	gelblich	gelbbraun	hellgelb bis gelbbraun
Eigenfluoreszenz (Blaulicht)	+++	+++	+++	++	+ / +++	+++
Färbung mit Sudan III/IV (am Paraffinschnitt) . .	+++	+++	+++	+++	(+)	(+)
Färbung mit Sudan III/IV nach Extraktion mit einer siedenden Chloroform-Methanolmischung . . .		+++ (unverändert)	+++ (unverändert)	+++ (unverändert)	(+) (unverändert)	(+) (unverändert)
Färbung mit Sudanschwarz (am Paraffinschnitt) . .	+++	+++	+++	+++	++	+ / ++
Perameisensäure-Schiffreaktion	+++	+++	+++	++	+ / ++	+
Perameisensäure-Schiffreaktion nach Bromierung		0	0	0	0	0
Schiffreaktion	(+)	0	+	(+)	0	(+)
Peroxydnachweis (DAM u. GRANADOS)	0 / (+)	+	(+) / 0	0	0	0
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN	+++	++	+++	+++	++	+ / ++
Bakersche Reaktion für Phospholipide	+	+(grauschwarz)	+ / 0	0	+ / ++ (grauschwarz)	++ (grauschwarz)
Färbung mit Luxolfastblue		++	0 / (+)	(+)	+	+
Nachweis von Cholesterin .		0	0	0	(+) / 0	0
PAS-Reaktion	+++	++	+++	+++	++	++
PAS-Reaktion nach Acetylierung	0	0	0	0	0	0
PAS-Reaktion nach Acetylierung und Verseifung. .	+++	++	+++	+++	++	++
PAS-Reaktion nach Diastase		++	+++	+++	++	++
PAS-Reaktion nach Hyaluronidase		++	+++	+++	++	++
Färbung mit Toluidinblau .	+++	(+)	++	++	+++ / ++++	+ / ++

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Färbungen und histochemische Reaktionen	Methylester polyungesättigter Fettsäuren			Ceroid (Mensch und Ratte) ⁴	Lipofuscin (Mensch)	Vitamin E-Mangel-pigment (Ratte) ⁵
	Objekt-träger-aus-strich ¹	Im Inter-stitium der Subcutis (extracellulär) abgelagert (Maus) ²	Im Cyto-plasma von Makrophagen gespeichert und zum Pigment umgeformt (Maus) ³			
Färbung mit Toluidinblau nach Methylierung . . .		0	0	0	0	0
Färbung mit Methylgrün .	++	+	++	++	++	++
Metachromasie (Toluidinblau)	0	0	0	0	0	0
Färbung mit Astrablau . .	(+)	0	0	0	0	(+)/+
Methylenblaubindung bis pH		4,8—4,5	3,5	3,9—3,5	3,9	4,6—3,6
Eisenbindung (HALE) . .	(+)	(+)	+	(+)	+	+/++
Berliner Blau-Reaktion . .	0	0	0	0	0	0
Reduktionstest nach CHÈVRE-MONT-FRÉDÉRIC . .	+	(+)	++	+	++	+/++
Reduktionstest nach KCN .	++	+	+++	++	+++	+++
Reduktionstest nach HgCl ₂	(+)/0	(+)/0	++/+	(+)	(+)	(÷)
Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL . . .	0/+	0	0	0/+	++/+++	++
Tetrazoniumreaktion . . .		0	(+)	++	+++	+++
Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung		0	0	0	0	0
Millonsche Reaktion . . .		0	0/(+)	(+)	(+)?	(+)
Barnett- und Seligmansche Reaktion, SH-Gruppen .	0	0	0/(+)	(+)	(+)?	(+)
Argininreaktion		0	0/(+)	(+)	(+)?	+
Ninhydrin-Schiff-Reaktion.		0	0/(+)	(+)	(+)	÷
Hämatoxylin-Eosin-Färbung		hellgelb	gelbbraun bis braunrot	gelbbraun bis braunrot	braun bis braunrot	braun bis braunrot
Van Gieson-Färbung . . .		gelb	gelbbraun	gelbbraun	grau-braun	grau-braun
Bindegewebsfärbung nach MASSON			dunkel-violett	dunkel-violett	dunkel-violett	dunkel-violett

¹ Die Angaben beziehen sich auf Methylester polyungesättigter Fettsäuren, die 12—14 Monate bei Zimmertemperatur mit Luftsauerstoff oxydiert wurden.

² 12—14 Monate nach der Injektion in die Subcutis von Mäusen.

³ 44—60 Tage nach der subcutanen Injektion.

⁴ 46—80 Tage altes Ceroid.

⁵ 281—371 Tage altes Vitamin E-Mangelpigment.

Reaktion; +++ = sehr stark; ++ = stark; + = deutlich positiv; (+) = inkonstant oder schwach; 0 = negativ.

stark herabgesetzt. Die größeren Körnchen ließen sich nur noch mit Sudanschwarz, jedoch nicht mehr mit Sudanrot darstellen, während die kleineren Granula ihre Affinität für Sudanfarbstoffe völlig verloren hatten und weder mit Sudanrot noch mit Sudanschwarz angefärbt werden konnten (Abb. 9). Die kleinen Granula besaßen eine gelbbraune bis tiefbraune Farbe (Abb. 9 und 10) und leuchteten im Blaulicht nur noch schwach dunkelbraun auf. Mit dem

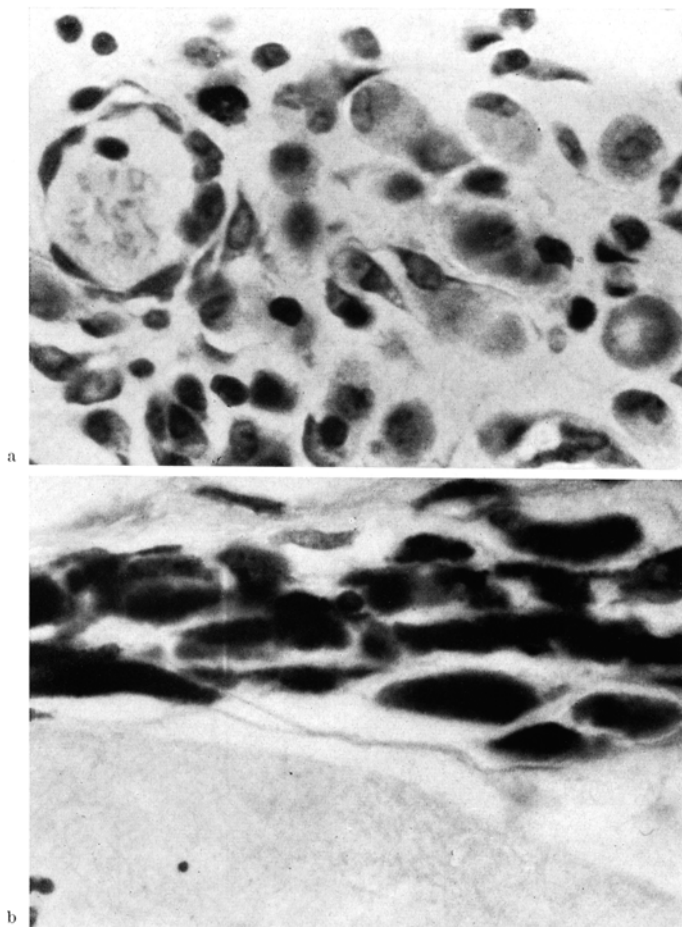


Abb. 3a u. b. Phagocyten bei der Verarbeitung von ungesättigten Fettsäureestern (der gleiche Versuch wie in Abb. 1, 2, 4, 5, 9 und 10). Färbung mit einer $4 \cdot 10^{-4}$ m Methylenblaulösung, die mit Acetatpuffer auf pH 3,9 eingestellt wurde. a 14 Tage und b 360 Tage nach Versuchsbeginn. Deutliche Zunahme der Methylenblaubindfähigkeit der intracytoplasmatisch gespeicherten Lipide im Laufe der Alterung. Keine Basophilie der nicht phagocytierten, extracellulären Fettsäureester (unten). Vergr.: 900fach

Schiffschen Reagens ließ sich nur eine sehr schwache Färbung erzielen. Der saure Hämatein-Test nach BAKER ergab eine schwachgraue Farbe und fiel manchmal negativ aus. Auch die Perameisensäure-Schiff-Reaktion war erheblich schwächer geworden. Die Reaktion für Peroxyde fiel stets negativ aus. Unverändert sehr stark positiv waren die PAS-Reaktion (Abb. 2b) und die Färbung nach ZIEHL-NEELSEN. Die Affinität für basische Farbstoffe nahm weiter zu; selbst bei pH 2,2 war noch eine Methylenblaubindung nachweisbar (Abb. 3b). Das Reduktionsvermögen (Test nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC) war erheblich verstärkt (Abb. 4b). Auch bei der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL wurden die Granula jetzt sehr stark geschwärzt (Abb. 5b). Bei den Nachweisreaktionen für Aminosäuren und Proteine erzielten wir

uneinheitliche Resultate: Während in den größeren Lipidtröpfchen keine Eiweißstoffe nachweisbar waren, fielen diese Reaktionen in den kleinen Körnchen meistens positiv aus.

Die in den Saftspalten liegenden Lipidmassen waren prinzipiell den gleichen Veränderungen unterworfen wie die intracytoplasmatisch gespeicherten Lipide. Allerdings liefen die Umbauvorgänge hier wesentlich langsamer ab. Dies kam in der noch nach einem Jahr sehr starken

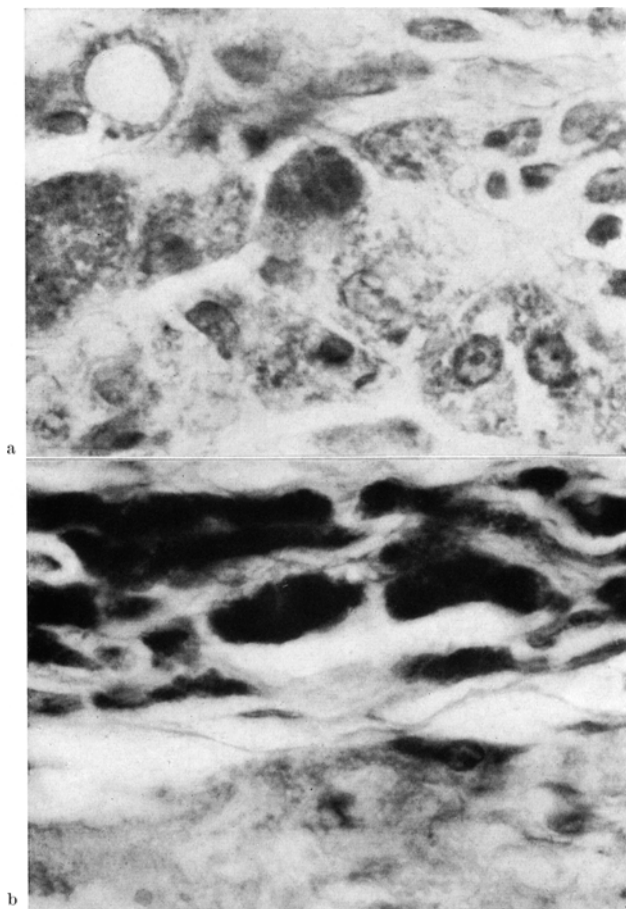


Abb. 4a u. b. Phagocyten bei der Verarbeitung eines ungesättigten Fettsäureesters (der gleiche Versuch wie Abb. 1, 2, 3, 5, 9 und 10). Paraffinschnitte. Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC. Kernechtrot. Vergr.: 900fach. a 14 Tage und b 360 Tage nach der Injektion. Das zunächst (nach 14 Tagen) nur schwache Reduktionsvermögen der intracytoplasmatisch gespeicherten Lipidtröpfchen ist nach 12 Monaten sehr ausgeprägt. Dagegen besitzen die in den Saftspalten liegenden amorphen Lipidmassen auch nach einer langen Versuchsdauer nur eine schwache Reduktionsfähigkeit (unten)

Sudanophilie (Abb. 9), der ausgeprägten Perameisensäure-Schiff-Reaktion sowie der deutlichen Peroxydreaktion zum Ausdruck. Mit dem Bakerschen sauren Hämatest wurden sie dunkel-grauschwarz gefärbt. Die extracellulär abgelagerten Lipide besaßen nach 12—14 Monaten nur eine schwache hellgelbe Eigenfarbe, keine nennenswerte Affinität für basische Farbstoffe und nur ein geringes Reduktionsvermögen. Auch die PAS-Reaktion und die Färbung nach ZIEHL-NEELSEN fielen schwächer aus als bei den phagocytierten ungesättigten Fettsäureestern (vgl. Abb. 2b, 3b, 4b, 5b). Schließlich fehlte ihnen die Beimengung von Aminosäuren und Proteinen; nur in den oberflächlichen Schichten der extracellulären Lipidablagerungen waren die Reaktionen für Aminosäuren und Proteine manchmal schwach positiv.

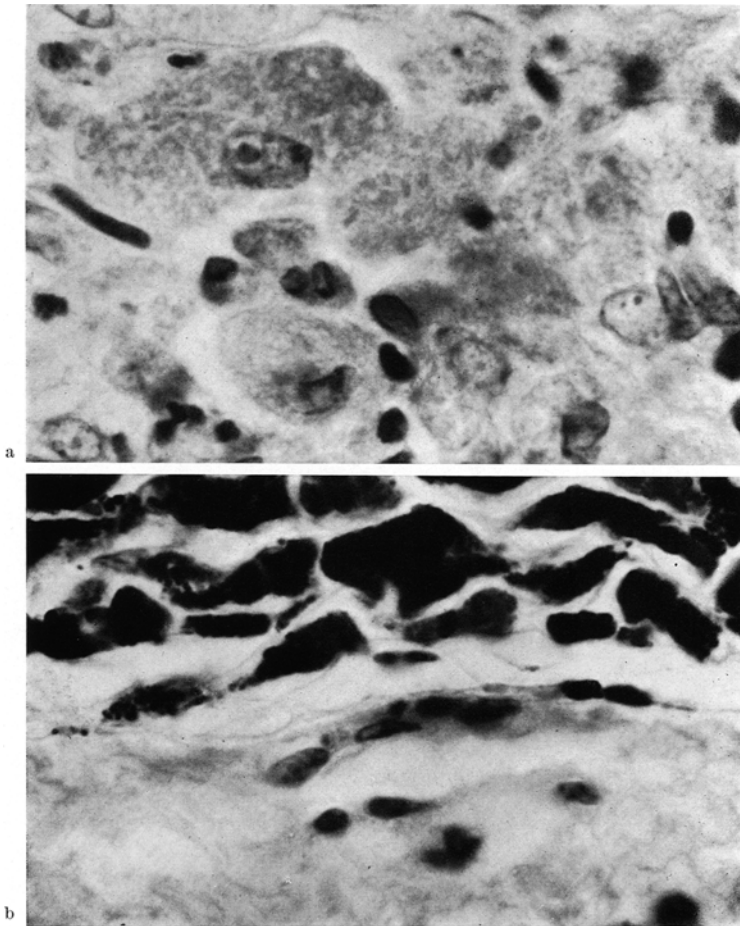


Abb. 5a u. b. Phagocyten bei der Verarbeitung eines ungesättigten Fettsäureesters (der gleiche Versuch wie Abb. 1, 2, 3, 4, 9 und 10). Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL. Vergr.: 900fach. a 14 Tage nach der Injektion. Die phagocytierten Fettsäureester vermögen noch nicht die ammoniakalische Silberlösung zu reduzieren. b 360 Tage nach Versuchsbeginn. Ausgeprägtes Reduktionsvermögen der Pigmentgranula (oben). Keine nennenswerte Reduktionsfähigkeit der nicht phagocytierten Lipidmassen (unten)

II. Mischungen von Methylestern hochungesättigter Fettsäuren bzw. Lebertran mit Tokopherol

In weiteren Experimenten verfolgten wir die Resorption und Verarbeitung von Methylestern hochungesättigter Fettsäuren und von Lebertran, die vor der subcutanen Injektion mit α -Tokopherol vermischt wurden. Dabei erhoben wir folgende Befunde:

Die Fettsäureester-Tokopherolgemische lagen anfangs ebenso wie die reinen Fettsäureester als große Tropfen in den Saftspalten der Subcutis. Im Gegensatz zu den reinen ungesättigten Lipiden wurden die Gemische aber zunächst nur in geringem Umfang in das Cytoplasma von Phagocyten aufgenommen. Im Interstitium bildeten sich vielmehr kleinere und größere lipidhaltige Seen bzw. Cysten, deren Wand anfangs von einem lockeren und später von einem faserreichen Bindegewebe eingenommen wurde (Abb. 6a).

Erst 2—3 Monate nach der Injektion der Fettsäureester-Tokopherolgemische änderte sich das Bild allmählich. In der Wand der Cysten und in ihrer Nachbarschaft traten in zunehmendem Maße mononucleäre Phagocyten und Fremdkörperriesenzellen auf, deren Cytoplasma mit Lipidtropfen angefüllt war (Abb. 6b). Diese besaßen die gleichen Eigenschaften wie die intracytoplasmatischen Granula, welche wir bei der Verabreichung reiner Methyl-ester hochungesättigter Fettsäuren beobachtet hatten. Sie waren auch den gleichen Umbauvorgängen unterworfen. Gleichzeitig kam es zu einer allmählichen Rückbildung der Cysten. Nach etwa 6—8 Monaten fand sich dann im Bereich der injizierten Fettsäuremethylester-Tokopherolgemische nur noch eine dichte Ansammlung von Fibroblasten und Makrophagen mit lipidhaltigen intracytoplasmatischen Granula (Abb. 6c). Weder morphologisch noch histochemisch unterschieden sich diese alten Fettsäureester-Tokopherol-Granulome von den durch reine Fett-

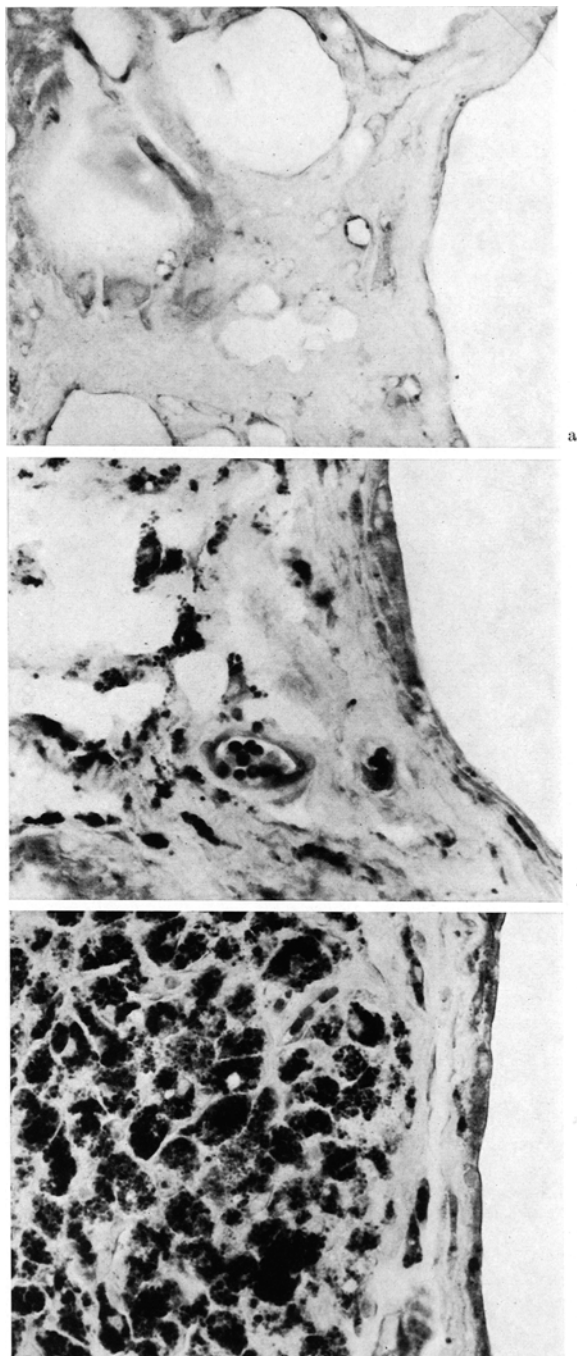


Abb. 6a—c. Verarbeitung eines Lebertran-Tokopherolgemisches (0,1 ml einer 10 %igen wäßrigen Lebertranemulsion und 0,1 ml reines Tokopherol). Paraffinschnitte, Färbung mit Sudanschwarz und Kernechtrot. Vergr.: 450fach. a 40 Tage nach Versuchsbeginn finden sich im Bereich der Injektionsstelle kleinere und größere lipidhaltige Cysten. Keine Bildung von oxydierten, unlöslichen Fettsäureestern im Interstitium. Keine ceroidhaltigen Phagocyten. b 75 Tage nach der Injektion zeigen sich in der Wand der Cysten vereinzelte Phagocyten, welche unlösliche Tropfen des oxydierten ungesättigten Fettsäureesters enthalten. c 200 Tage nach dem Versuchsbeginn sind die Cysten zum großen Teil verschwunden. An ihrer Stelle finden sich dichte Ansammlungen von Phagocyten, deren Cytoplasma mit Ceroidkörnchen gefüllt ist

säureester erzeugten Granulationsgeweben. Ihre Entwicklung war nur um mehrere Monate verzögert.

III. Reines Tokopherol

Zur Kontrolle untersuchten wir 14 Tiere, denen reines Tokopherol subcutan injiziert worden war. Dabei fanden sich in der Subcutis nur zahlreiche tokopherolhaltige Cysten, die durch schmale, bindegewebige Septen voneinander getrennt wurden. Die intracytoplasmatische Tokopherolspeicherung trat demgegenüber in den Hintergrund. Nur ganz gelegentlich zeigten sich in einzelnen Zellen kleine, offenbar tokopherolhaltige Tröpfchen. Makrophagen mit gespeicherten, schwerlöslichen Lipiden waren weder bei den jüngeren noch bei den älteren Versuchstieren vorhanden.

IV. Palmitinsäuremethylester

Einer anderen Gruppe von Versuchstieren (13 Mäuse) injizierten wir in die Subcutis Emulsionen von reinem Palmitinsäureester. Nach einer kurzen exsudativen Gewebsreaktion ent-

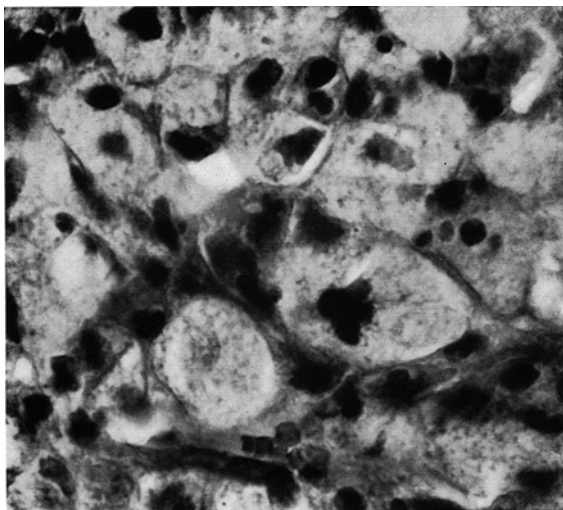


Abb. 7. Speicherung von reinem Palmitinsäuremethylester. 45 Tage nach der subcutanen Injektion. Paraffinschnitt. Färbung mit Sudan-schwarz und Kernechtrot. Vergr.: 900fach. Die in den Phagocyten als Tropfen abgelagerten gesättigten Fettsäureester wurden bei der Einbettung in Paraffin extrahiert. Das Cytoplasma ist dann von rundlichen Lücken durchsetzt und besitzt ein schaumiges Aussehen. Keine Bildung von unlöslichen Lipiden im Interstitium. Keine Pigmentkörnchen

wickelte sich an den Injektionsstellen ein typisches Fremdkörpergranulationsgewebe. Der implantierte gesättigte Fettsäureester wurde dabei in dem Cytoplasma der Mesenchymzellen in Form kleiner, sudanophiler Tröpfchen abgelagert, die sich mit organischen Lösungsmitteln sowohl in den jüngeren als auch in den alten Granulomen ohne weiteres extrahieren ließen. In Paraffinschnitten war das Cytoplasma der Phagocyten daher von rundlichen Lücken durchsetzt. Nicht selten kam es zur Bildung von Toutonschen Riesenzellen mit mittelständigen Kernen. In keinem Stadium dieser

Versuchsgruppe traten im Cytoplasma oder in den Saftspalten unlösliche, fluoreszierende Lipide auf (Abb. 7).

V. Autoxydation hochungesättigter Fettsäuren auf Objektträgerausstrichen

Weitere Untersuchungen galten der Frage nach dem färberischen Verhalten der in vitro entstehenden Oxydations- und Polymerisationsprodukte von reinen Estern hochungesättigter Fettsäuren. Bei diesen Versuchen wurden einzelne Tropfen der Fettsäureester auf Objektträger gebracht und durch Luftsauerstoff bei 37° C oxydiert. In verschiedenen Zeitabständen führten wir an diesen Aus-

strichen eine Reihe von histologischen Färbungen und histochemischen Reaktionen durch. Zur Kontrolle nahmen wir die gleichen Untersuchungen an Objektträgerausstrichen von Fettsäureester-Albumingemischen vor. Als wesentliche Resultate dieser Versuche seien hervorgehoben (vgl. Tabelle 1):

Reine (nicht oxydierte) Methylester hochungesättigter Fettsäuren sind in Fettlösungsmitteln gut löslich, sehr stark sudanophil und ungefärbt (wasserklar). Sie zeigen eine weißliche Autofluoreszenz. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion ist sehr stark positiv, die PAS-Reaktion negativ oder nur ganz schwach positiv. Der Bakersche saure Hämatest färbt sie dunkel-grauschwarz. Bei dem Test nach CHÈVREMENT-FRÉDÉRIC und bei der Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL weisen sie nur ein geringes Reduktionsvermögen auf; schließlich besitzen sie keine nennenswerte Affinität für basische Farbstoffe.

Mit zunehmender Oxydation verlieren die ungesättigten Fettsäureester ihre Löslichkeit und Sudanophilie. Sie gehen auch in siedenden organischen Lösungsmitteln nicht mehr in Lösung. Die Löslichkeit in Alkali bleibt etwas länger erhalten; sie geht aber schließlich auch verloren. Mit Sudanfarbstoffen können die ältesten Oxydationsstadien, d. h. die stark oxydierten und polymerisierten Fettsäureester, nicht mehr gefärbt werden. — Synchroon mit der Oxydation nehmen sie zunächst eine hellgelbe, später eine gelbbraune und schließlich eine dunkelbraune Farbe an (Abb. 11). — Außerdem besitzen sie eine deutliche Autofluoreszenz, deren Farbton allmählich von Weiß über Hellgelb zu einem tiefen Gelb übergeht. Mit dem Auftreten der Braunfärbung der oxydierten ungesättigten Fettsäureester kommt es zu einem Nachlassen der Eigenfluoreszenz, so daß die tief dunkelbraun gefärbten Fettsäureester im UV- und im Blaulicht nur noch schwach aufleuchten. — Die PAS-Reaktion nimmt anfangs zu; die gelblich gefärbten Oxydationsprodukte der Fettsäuremethylester werden nach der Behandlung mit Perjodsäure mit dem Schiffschen Reagens tief dunkelrot gefärbt. Dann erfolgt allmählich eine Abschwächung der Reaktionsfähigkeit mit Perjodsäure, so daß die dunkelbraunen Fettsäureester nur noch eine schwache bzw. gar keine PAS-Reaktion aufweisen. — Die positive Perameisensäure-Schiff-Reaktion ändert sich in den Anfangsstadien der Oxydation nicht nennenswert. Die braungefärbten Fettsäureester verlieren dann jedoch die Fähigkeit, mit Perameisensäure unter Bildung von Schiff-positiven Carbonylgruppen zu reagieren. — Außerdem treten mit zunehmender Oxydation eine sehr starke Basophilie und ein ausgeprägtes Reduktionsvermögen auf.

Vermischt man die Fettsäuremethylester mit *Serumalbuminen*, so werden ihre Oxydation und die damit einhergehenden Änderungen ihrer chemischen und histochemischen Eigenschaften sowie die Entstehung der Eigenfarbe deutlich beschleunigt. Der oxydative Umbau erfolgt aber — soweit sich das mit histochemischen Methoden verfolgen läßt — prinzipiell in der gleichen Weise wie bei den reinen ungesättigten Fettsäureestern.

Diskussion

I. Wie werden die Ester hochungesättigter Fettsäuren im Gewebe verarbeitet?

Die im Cytoplasma von Makrophagen als kugelförmige Einschlüsse abgelagerten ungesättigten Fettsäureester werden allmählich zu einem Pigment verarbeitet, wobei

es zu einer bemerkenswerten Änderung ihrer färberischen und histochemischen Eigenschaften kommt:

Die anfangs leicht löslichen, sudanophilen, ungefärbten Fettsäureester verlieren ihre Löslichkeit in Fettlösungsmitteln sowie ihre Affinität für Sudanfarbstoffe. Gleichzeitig nehmen sie allmählich eine gelbe und schließlich eine gelbbraune bis dunkelbraune Eigenfarbe an. Ganz entsprechend ändern sich die Qualität und Intensität ihrer Autofluoreszenz. Sehr ausgeprägt ist die Zunahme ihrer Basophilie und ihres Reduktionsvermögens. Auch die Nachweisreaktionen für Äthylengruppen, Peroxyde und α -Glykolgruppen sowie der Bakersche saure Hämateintest ergeben in Abhängigkeit von dem Stadium der Pigmentbildung unterschiedliche Resultate (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2. Änderung der histochemischen Eigenschaften des phagocytierten ungesättigten Fettsäureesters bei der Umformung zum Ceroidpigment

Histologische Eigenschaften und histochemische Reaktionen	Tage nach der Injektion des ungesättigten Fettsäuremethylesters								
	4	14	21	44	60	75	100	220	430
Eigenfarbe	ungefärbt	ganz schwach hellgelb	ganz schwach hellgelb	schwach hellgelb	hellgelb	gelbbraun	gelbbraun	braun	braun
Autofluoreszenz .	(+) weißgelblich	+ hellgelb	++ hellgelb	++ hellgelb	+++ hellgelb	+++ gelbbraun	+++ gelbbraun	+ braun	(+) braun
Färbung mit Sudanschwarz .	+++	+++	+++	+++	++	++/+	+	(+)/0	0
Perameisensäure-Schiff-Reaktion .	++	++	+++	+++	+++	++	++	+	+
Perjodsäure-Schiff-Reaktion .	(+)	+ / ++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Peroxydnachweis .	+	++	++	(+)	0	0	0	0	0
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Methylenblaubindung bis pH .	4,5	3,5	3,5	3,5	3,5	2,9	2,9	2,2	2,2
Färbung mit Toluidinblau . .	(+)	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Reduktionstest nach CHÉVRE-MONT-FRÉDÉRIC	0	(+)	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL . . .	0	0	0	0	0	+	++	+++	+++
Tetrazoniumreaktion	0	0	0	0/(+)	(+)	(+)	(+)	+	+

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

Die in den Saftspalten liegegebliebenen ungesättigten Fettsäureester werden ebenfalls allmählich umgeformt. Sie bilden in Gruppen liegende, wellenförmige Membranen, die sich dem Zug der Bindegewebsfasern anpassen, also in der Subcutis meistens parallel zur Hautoberfläche angeordnet sind. Während man in den ersten Tagen und Wochen noch die Phagocytose von extracellulären Fettsäureestern durch histiocytäre Elemente beobachten kann, werden im Laufe der Zeit immer weniger Fettsäureester von den Zellen aufgenommen. Anscheinend werden diese Lipide mit zunehmender Versuchsdauer für die Phagocyten schwerer angreifbar.

Gleichzeitig werden auch die chemischen und histochemischen Eigenschaften der extracellulär gelegenen Fettsäureester verändert; und zwar laufen an ihnen Umbauvorgänge ab, die weitgehend denen der intracytoplasmatischen Fettsäureester entsprechen. Die Alterung geht jedoch erheblich langsamer vonstatten (vgl. Abb. 2b, 3b, 4b, 5b, 9).

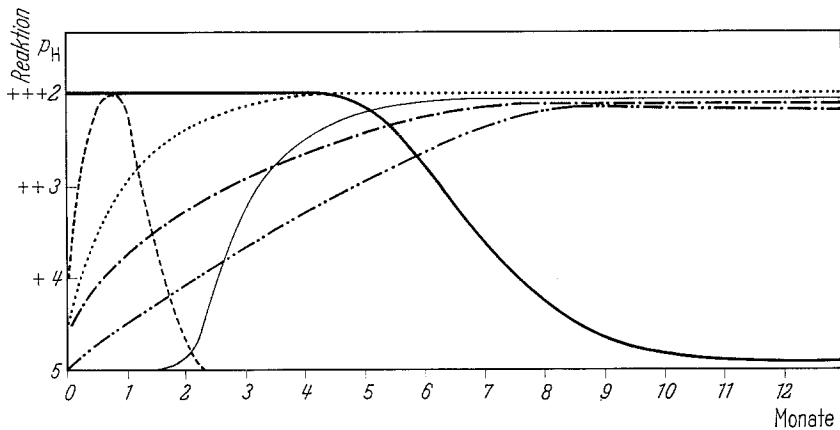


Abb. 8. Änderung der histochemischen Eigenschaften der Pigmentgranula nach der Injektion einer Lebertrans-
emulsion. (Andere Versuchsanordnung als in den Abb. 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10 und in der Tabelle 2). — Sudan-
ophilie; — — — — — Eigenfarbe; — · — · — Basophilie; · · · · · Reduktionsvermögen (CHÈVREMENT); — — — Silber-
imprägnation (MASSON-HAMPERL); - - - Peroxydreaktion

Überblickt man diese Befunde (Tabelle 1), so zeigt sich, daß das bei der Injektion hochungesättigter Fettsäureester entstehende Pigment in allen wesentlichen färberischen und histochemischen Eigenschaften mit den beiden Grundtypen lipogener Pigmente, nämlich mit dem bei der Phagocytose ungesättigter Lipide entstehenden Ceroid und mit dem in Muskelfasern sowie in Parenchymzellen auftretenden Lipofuscin, übereinstimmt. Wie zu erwarten, entspricht seine formale Genese dem Ceroid und nicht dem Lipofuscin [GEDIGK und FISCHER (2)].

Diese Experimente stehen im Einklang mit älteren Beobachtungen von ASCHOFF; HUECK (1, 2) und HAMPERL (1) sowie mit den von SACHS anhand eines umfangreichen autoptischen und bioptischen Materials gewonnenen Befunden. SACHS gelang es schon damals auf Grund seiner Untersuchungen an menschlichen Organen, und zwar vor allem an Herzen von Individuen verschiedener Altersstufen und bei verschieden alten Pigmentablagerungen in der Leber, eine geschlossene Reihe von Übergängen aufzustellen, die von „intrazellulären Fettkörnchen mit geringer Eigenfarbe, aber schon deutlicher Eigenfluoreszenz, welche sich von gewöhnlichen Muskelfetttröpfchen unterscheiden — über ein fettreiches Fuscine, gekennzeichnet durch eine Eigenfluoreszenz und eine auch der Fettlösung standhaltende Eigenfarbe — zu einem fettarmen oder sogar sudan-negativen Fuscine verlief, das sich vom Melanin abgrenzen ließ“.

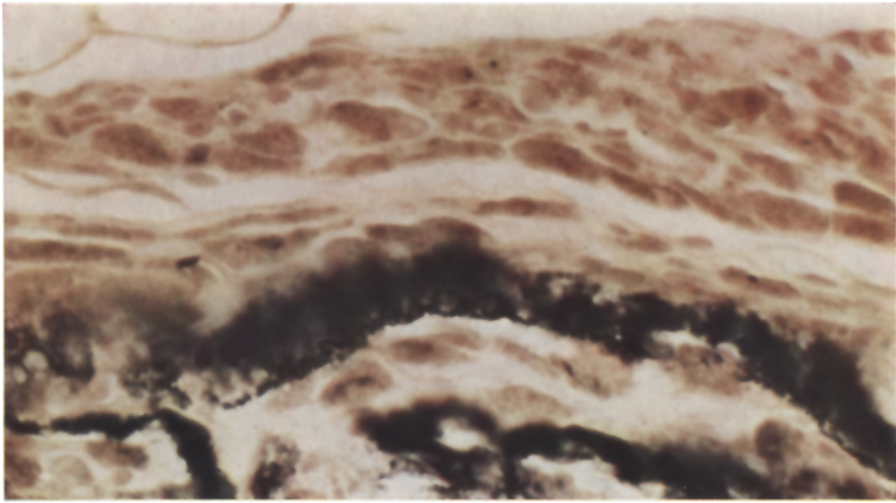


Abb. 9. 360 Tage nach der Injektion von ungesättigten Fettsäureestern. Färbung mit Sudanschwarz. Die Phagocyten enthalten reichlich braune, nicht mehr mit Sudanschwarz färbbare Pigmentkörnchen und Schollen (oben). Die in den Gewebsspalten liegendegebliebenen, nicht phagocytierten Lipidmassen (unten) sind sehr stark mit Sudanschwarz angefärbt. Der gleiche Versuch wie in Abb. 1, 2, 3, 4, 5 und 10. Vergr. 1000fach

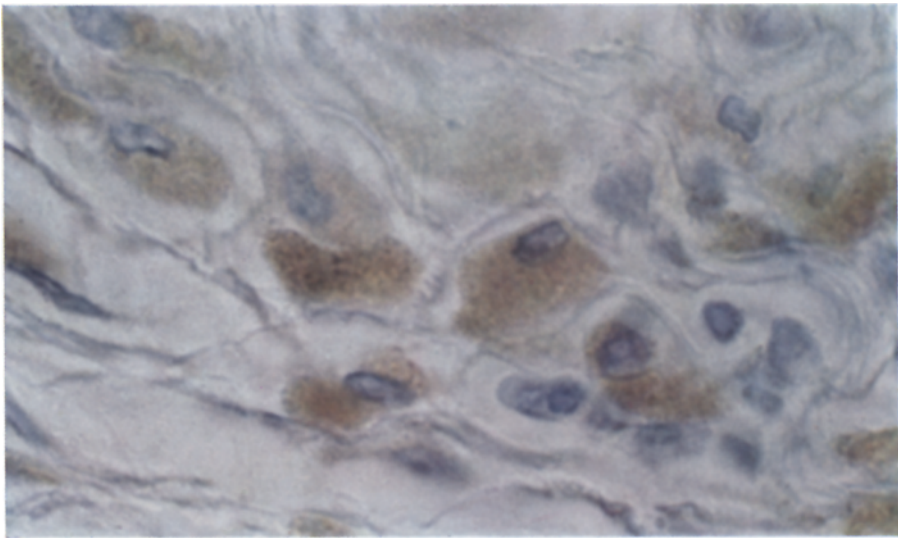


Abb. 10. Lipopigmenthaltige Zellen 360 Tage nach Versuchsbeginn. Coelestinblau-Hämalaun. Vergr.: 1200fach. Deutliche Braunfärbung der Pigmentkörnchen. Der gleiche Versuch wie in den Abb. 1, 2, 3, 4, 5 und 9

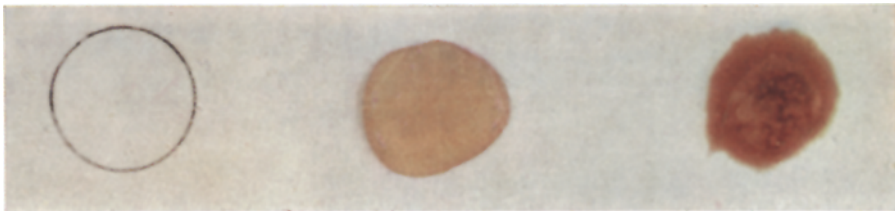


Abb. 11. Autoxydation reiner ungesättigter Fettsäureester. Linker Kreis: Völlig ungefärbter Fettsäureester bei Versuchsbeginn, auf der grauen Unterlage kaum erkennbar und durch schwarzen Kreis markiert. — Mitte: Gelbe Färbung nach 8 Monaten. Luftsauerstoff, 37° C. — Rechts: Dunkelbraune Färbung nach 18 Monaten. Luftsauerstoff, 37° C

Durch die lücken- und stufenlose Registrierung der einzelnen Stadien der Pigmententstehung ergibt sich anhand unserer Befunde nunmehr eine Reihe von Schlußfolgerungen:

Die Experimente mit chemisch reinen, ungesättigten Fettsäureestern zeigen — entsprechend den Untersuchungen am Ceroid und am Vitamin-E-Mangelpigment [GEDIGK und FISCHER (1, 2)] und ebenso wie die Beobachtungen an anderen Lipopigmenten [WOLMAN und SHOSHAN; PEARSE (1) WOLMAN (4)] —, daß die wechselnden Eigenschaften lipogener Pigmente in der Regel nicht als Hinweis auf das Vorkommen verschiedener Pigmentarten zu werten sind, sondern meistens nur an verschiedene Entwicklungsstadien ein und desselben Pigmentes gebunden sind. Jedenfalls lassen sich die beim Menschen vorkommenden, manchmal recht unterschiedlichen Lipopigmente ohne weiteres in die von uns dargelegten Entwicklungsschemata einordnen. In welchem Ausmaß sich die färberischen und histochemischen Eigenschaften der ungesättigten Fettsäureester bei ihrer Umwandlung zum Pigment ändern, zeigt die Gegenüberstellung der kurze Zeit nach Versuchsbeginn (4—14 Tage) im Cytoplasma sichtbaren Lipidtröpfchen und der „alten“, nach 14 Monaten Versuchsdauer gebildeten Pigmente, die man ohne Kenntnis der geschilderten Entwicklungsvorgänge für zwei grundverschiedene Strukturen halten würde (vgl. Tabelle 2 sowie Abb. 8).

Ferner ergeben sich Folgerungen für die chemischen Untersuchungen isolierter Pigmentgranula. In früheren Mitteilungen hatten wir bereits darauf hingewiesen, daß zur Erzielung biologisch verwertbarer Resultate das Alter der untersuchten Pigmente zu berücksichtigen ist und möglichst Pigmentkörnchen verschiedener Altersstufen getrennt analysiert und miteinander verglichen werden sollten. Dem steht aber entgegen, daß bei jedem Isolierungsverfahren, wie SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. selbst betonen, fast zwangsläufig eine Art „Unterfraktionierung“ der Granula erfolgt, bei der sich in der Regel nur ein Mittelwert gewinnen läßt, und bei dem besonders die ersten Entwicklungsstadien, u. U. aber auch die ältesten Körnchen nicht genügend berücksichtigt werden können. Besondere Bedeutung wird bei weiteren Versuchen zur Isolierung der Pigmentkörnchen der genaueren chemischen Charakterisierung der ungesättigten Lipide zukommen, deren quantitative und qualitative Bestimmung jedoch schwierig ist, weil sie wegen ihrer schlechten Löslichkeit bei den üblichen Extraktionsverfahren meistens nur unvollkommen oder gar nicht erfaßt werden (SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb.). Erste — allerdings noch etwas widerspruchsvolle — Angaben enthalten die neueren Arbeiten von HENDLEY u. Mitarb. (2, 3) sowie von BJÖRKERUD (2) (s. S. 101).

II. Wie sind die Änderungen der histochemischen Eigenschaften der gespeicherten ungesättigten Fettsäureester und ihre Umwandlung zu Pigmenten zu erklären?

Die Verfolgung der formalen Genese des Ceroidpigmentes und des Vitamin-E-Mangelpigmentes hatte ergeben, daß *die Entstehung und Alterung dieser Cytoplasmastrukturen hauptsächlich auf der Oxydation und Polymerisation ungesättigter Lipide beruhen* [PEARSE (1); GEDIGK (3); GEDIGK und FISCHER (1, 2); WOLMAN und SHOSHAN]. Diese Schlußfolgerung läßt sich jetzt anhand der Untersuchungen mit reinen Estern hochungesättigter Fettsäuren bekräftigen.

So wurde die Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren für die Genese lipogener Pigmente — in Übereinstimmung mit ENDICOTT und CASSELMAN — durch den

Befund bestätigt, daß bei der vorsichtigen Oxydation ungesättigter Lipide auch *in vitro*, d. h. ohne Mitwirkung irgendwelcher anderer organischer Stoffe, Substanzen entstehen, welche in allen wesentlichen Eigenschaften den Lipopigmenten Ceroid und Lipofuscin entsprechen. Dabei ist hervorzuheben, daß entsprechend den Befunden von CASSELMAN und TAPPEL eine Mischung der Fettsäureester mit Eiweißstoffen die Oxydation und Polymerisation zwar beschleunigte, für die Entstehung der gefärbten Oxydationsprodukte aber nicht erforderlich war.

Weiterhin zeigte es sich, daß die histochemischen Vorgänge bei der Speicherung der ungesättigten Fettsäureester auf der einen Seite und bei der Alterung des Ceroids und des Lipofuscins auf der anderen Seite in ganz analoger Weise abliefen. Stets traten die gleichen Oxydationsprodukte der Polyenfettsäuren auf, wie Peroxyde, α -Glykolgruppen, Carbonylgruppen und Carboxylgruppen, die auch von FARMER und SUTTON; ROSS u. Mitarb. sowie ELLIS bei der Autoxydation ungesättigter Lipide gefunden wurden. Die instabilen Zwischenprodukte des oxydativen Umbaus verschwanden dann im Laufe der Zeit, während sich die weniger gut angreifbaren Gruppen, wie u. a. die Carbonyl- und vor allem die Carboxylgruppen, mehr und mehr anhäuften.

Daß die geschilderte Entstehung und Umwandlung der Pigmente tatsächlich auf einer Oxydation der gespeicherten ungesättigten Fettsäuren beruht, ließ sich durch weitere Kontrollversuche sichern: Wurden die ungesättigten Lipide vor der subcutanen Injektion mit α -Tokopherol gemischt, so blieb die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren zunächst aus. Erst wenn das Tokopherol nach einigen Wochen im Gewebe zerstört war, kam der oxydative Umbau der Fettsäuren zum Pigment in Gang. Subcutan injizierte, gesättigte Lipide, wie z. B. Palmitinsäuremethylester, wurden zwar ebenfalls als Tropfen im Cytoplasma von Makrophagen abgelagert; sie verloren jedoch nicht ihre Löslichkeit und wurden auch bei einer langen Versuchsdauer nicht zu einem Pigment umgeformt.

Über die Einzelheiten der Oxydationsvorgänge können wir anhand unserer Versuche keine näheren Angaben machen und vorerst nur Hypothesen äußern. Es ist aber anzunehmen, daß bei der Oxydation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren schwerlösliche, stabile *cis-trans* oder *trans-trans* konjugierte Polyen-Hydroperoxyde entstehen. Grundsätzlich wird man dabei zwei Reaktionsmechanismen in Rechnung stellen müssen, die sich auch hinsichtlich ihrer Kinetik voneinander unterscheiden: Erstens könnte eine einfache Autoxydation der Lipide erfolgen. Zweitens wird man im Gewebe eine durch Lipoxydase katalysierte Oxydation der ungesättigten Fettsäureester in Betracht zu ziehen haben. Dabei entstehen im Gegensatz zur Autoxydation optisch aktive Hydroperoxyde und Polymere (HOLMAN, LUNDBERG). Welcher von den beiden Reaktionsmechanismen jeweils vorliegt, bleibt durch weitere Experimente zu klären. Die Tatsache, daß sowohl *in vitro* bei der Oxydation ungesättigter Fettsäuren als auch aus den in den Saftspalten extracellulär liegen gebliebenen ungesättigten Lipiden gelbe bis gelbbraune fluoreszierende Substanzen entstehen, welche in allen wesentlichen Eigenschaften mit dem aus phagocytierten ungesättigten Fettsäureestern entstehenden Pigment übereinstimmen, legt die Annahme nahe, daß unter unseren Versuchsbedingungen vornehmlich eine Autoxydation der Lipide erfolgt. Demgegenüber wird man in Zellen und Geweben, in denen das Vorkommen von Lipoxydase nachgewiesen ist, auch mit einer durch dieses Enzym gesteuerten Oxydation der ungesättigten Lipide rechnen müssen. Das dürfte besonders bei der in Muskelfasern und Parenchymzellen stattfindenden Oxydation abgelagerter, ungesättigter Lipide, also bei der Entstehung des Lipofuscins, der Fall sein. In histologischen Schnittpräparaten, d. h. mit histochemischen Methoden, gelingt es allerdings nicht, diese beiden Oxydationsmechanismen und die bei ihnen entstehenden Reaktionsprodukte zu unterscheiden.

III. Welche Rückschlüsse lassen sich aus dem Ergebnis histochemischer Reaktionen auf das Alter einzelner Pigmentkörnchen ziehen?

Der allmähliche oxydative Umbau der Lipopigmente legt die Frage nahe, ob es möglich ist, aus dem Resultat histochemischer Reaktionen auf das Alter einzelner Pigmentablagerungen zu schließen. Dabei ist zunächst zu berücksichtigen, daß die vorliegenden Experimente nur das Prinzip des Umbaus der Pigmente darlegen, also nur hinsichtlich der Art der Alterung Allgemeingültigkeit besitzen. Die Geschwindigkeit, mit der die Oxydation und Polymerisation der ungesättigten Fettsäureester erfolgt, kann jedoch nur auf die von uns gewählten Versuchsbedingungen bezogen werden. So ist zu erwarten, daß die Zeit, welche für die Oxydation der Lipide benötigt wird, von verschiedenen Faktoren abhängt, wie z. B. von der Art des gespeicherten ungesättigten Lipids, von dem Organ bzw. der Zelle, in der die Speicherung erfolgt, und schließlich von dem Ausmaß der Gewebsschädigung und der Blutung, welche mit der Bildung der Pigmente einhergehen und sowohl verzögernd als auch beschleunigend wirken können. Somit werden stets nur ganz allgemein gehaltene Aussagen über das Alter von Pigmentablagerungen möglich sein; und meistens wird man nur eine grobe Schätzung vornehmen können. [Vergleiche hierzu das histochemische und färberische Verhalten der in Tabelle 1 angeführten, in verschiedenen Organen abgelagerten Pigmente sowie die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Alterung, die trotz gleicher Versuchsbedingungen bei einem verschiedenartigen Ausgangsmaterial, z. B. Methylestern polyungesättigter Fettsäuren und Lebertran, bestehen (Tabelle 2 und Abb. 8)].

Verhältnismäßig einfach ist die Beurteilung des *Ceroids*, das durch eine einmalige, zeitlich umschriebene Inkorporation von Lipiden in das Cytoplasma von Makrophagen gebildet wird [GEDIGK und FISCHER (1)]. Für dieses Pigment lassen sich auf Grund unserer Befunde folgende Regeln aufstellen: Eine ausgeprägte Sudanophilie, ein reichlicher Gehalt an Peroxyden, eine schwache gelbliche Eigenfarbe, eine geringe Affinität für basische Farbstoffe und ein schwaches Reduktionsvermögen sind kennzeichnend für „junge“ Pigmente. Ganz entsprechend ist ein Pigment um so „älter“, je geringer seine Anfärbbarkeit mit Sudanfarbstoffen, je dunkler seine gelbbraune Eigenfarbe und je ausgeprägter seine Basophilie und sein Reduktionsvermögen sind.

Wesentlich schwieriger sind die Verhältnisse bei den *Lipofuscinen* und beim Vitamin-E-Mangelpigment, welche in Parenchymzellen und Muskelfasern auftreten. Die formale Genese dieser Pigmente ist dadurch gekennzeichnet, daß die Ablagerung von Lipiden nicht als einmaliger, zeitlich begrenzter Vorgang erfolgt, sondern daß im Bereich eiweißhaltiger Cytoplasmabezirke eine allmähliche, sich über Monate und u. U. Jahre erstreckende Anhäufung von ungesättigten Lipiden stattfindet [GEDIGK und FISCHER (2); GEDIGK und WESSEL]. Synchron mit der fortschreitenden Oxydation und Polymerisation der einmal gespeicherten Lipide werden also in ein und demselben Pigmentkörnchen ständig neue, noch nicht so weit oxydierte Fettstoffe abgelagert. Diese besitzen noch eine ausgeprägte Affinität für Fettfarbstoffe und überdecken daher lichtmikroskopisch bei einer Sudanfärbung in der Regel die schon längere Zeit gespeicherten, nicht mehr sudanophilen Lipide. Eine Anfärbbarkeit mit Fettfarbstoffen ist beim Lipofuscin also kein

Beweis dafür, daß es sich um ein „junges“ Pigment handelt. Dagegen kann das Fehlen der Sudanophilie — ebenso wie beim Ceroid — als Zeichen eines „alten“ Pigmentes gewertet werden. — Für die Eigenfarbe gelten beim Lipofuscin die gleichen Regeln wie beim Ceroid, weil die frisch gespeicherten, noch ungefärbten Lipide meistens nicht das Zutagetreten der dunklen Eigenfarbe älterer Lipidablagerungen beeinträchtigen. Auch der Nachweis der Basophilie und des Reduktionsvermögens der „alten“ oxydierten Lipidanhäufungen wird durch das negative Verhalten der noch nicht oxydierten Lipide nicht behindert. Für die Lipofuscine läßt sich also die Regel aufstellen, daß ein Pigmentkörnchen um so älter ist, je dunkler seine Eigenfarbe und je ausgeprägter seine Basophilie sowie sein Reduktionsvermögen sind, während die Anfärbbarkeit mit Sudanfarbstoffen nur in begrenztem Umfang zur Altersbestimmung herangezogen werden kann.

Die anderen histochemischen Reaktion, wie die PAS-Reaktion, die Perameisensäure-Schiff-Reaktion, die Färbung nach ZIEHL-NEELSEN oder die Prüfung der Löslichkeit usw., sind bei dem derzeitigen Stand der methodischen Möglichkeiten unseres Erachtens noch nicht für die Schätzung des Alters der Pigmentkörnchen geeignet. Es ist aber denkbar, daß sich durch den Ausbau quantitativer histochemischer Methoden hier ein Fortschritt erzielen ließe.

IV. Welche histochemischen Schlußfolgerungen ergeben sich anhand der Reaktionen an ungesättigten Fettsäureestern und Lipopigmenten?

Die Experimente mit reinen, ungesättigten Fettsäureestern geben uns die Möglichkeit, einige *histochemische Reaktionen* zu überprüfen und die färberischen Eigenschaften der Lipopigmente genauer zu interpretieren.

Die *positive PAS-Reaktion* des Ceroids und des Lipofuscins ist seit langem bekannt und in den vergangenen Jahren wiederholt diskutiert worden. Eine Reihe von Autoren vermutete, daß die mit der PAS-Reaktion nachgewiesenen benachbarten Hydroxylgruppen einem Kohlenhydratbaustein, d.h. einem Glykoproteid oder einem Glykolipid angehören (ZOLLINGER; LEBLOND u. Mitarb.; STAMMLER). Demgegenüber wurde von CIACCIO (2, 3, 4), CASSELMAN, PEARSE (1) sowie GEDIGK und FISCHER (1, 2) die positive PAS-Reaktion der Lipopigmente auf Oxydationsprodukte ungesättigter Lipide bezogen, da es bekannt ist, daß bei einer vorsichtigen Oxydation ungesättigter Fettsäuren an den Doppelbindungen benachbarte Hydroxylgruppen oder Oxyketogruppen entstehen können, die sich bei der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion genauso verhalten wie die benachbarten Hydroxylgruppen von Polysacchariden [WOLMAN (1—3); GEDIGK (1); LISON; RAVIOLA und RAVIOLA]. Durch die an reinen Fettsäureestern erhobenen Befunde ließ sich diese Ansicht bestätigen: Die ungesättigten Fettsäureester waren sowohl bei der Speicherung und Verarbeitung im Cytoplasma von Makrophagen als auch nach der allmählichen Oxydation durch Luftsauerstoff auf Objektträgerausstrichen sehr stark PAS-positiv. Allerdings färbten sie sich nur dann bei der PAS-Methode an, wenn sie zuvor durch Autoxydation, enzymatisch oder durch verschiedene Oxydationsmittel oxydiert wurden, d.h. nachdem an ihren Doppelbindungen benachbarte Hydroxylgruppen bzw. Oxyketogruppen entstanden waren. — Wenn man nun in Rechnung stellt, daß für das Vorkommen von Kohlenhydraten in Lipopigmenten an sich keine Anhaltspunkte bestehen (SIEBERT, DIEZEL, JAHR, KRUG, SCHMITT, GRÜNBERGER und BOTCKE), während ihr Gehalt an ungesättigten,

oxydierten, mit Perjodsäure reaktionsfähigen Fettsäuren unumstritten ist, so dürfte es keinem Zweifel unterliegen, daß die positive PAS-Reaktion der Lipopigmente an Oxydationsprodukte ihrer Fettbausteine gebunden ist.

Die *Perameisensäure-Schiff-Reaktion* dient zur histochemischen Darstellung von Äthylengruppen, welche durch Perameisensäure zu Schiff-positiven Aldehyden oxydiert werden (LILLIE). Außerdem entstehen bei der Perameisensäureoxydation aus SS- (und SH)-Gruppen Sulfon- und Sulfinsäuren, welche eine ausgeprägte Basophilie besitzen und u. U. ebenfalls mit dem Schiffschens Reagens angefärbt werden [PEARSE (1)]. Wie zu erwarten, ließen sich auch in unseren Experimenten ungesättigte Fettsäureester mit diesem Verfahren *in vitro* und *in vivo* stark anfärben. Die positive Perameisensäure-Schiff-Reaktion der Lipopigmente wurde durch die vorherige Bromierung der Schnitte, nicht aber durch die Behandlung mit Sublimat blockiert. Außerdem führte die Perameisensäureoxydation nur zu einer geringfügigen Zunahme der Basophilie dieser Pigmente. Wenn man weiterhin berücksichtigt, daß die Nachweisreaktionen für SS- und SH-Gruppen, wie die Methode nach BARNETT und SELIGMAN, beim Ceroid und Lipofuscin negative oder nur ganz schwach positive Resultate geben [s. auch GEDIGK und FISCHER (2) sowie ISSIDORIDES und SHANKLIN], so kann es als gesichert gelten, daß mit der Perameisensäure-Schiff-Reaktion im Ceroid und im Lipofuscin ungesättigte Fettsäuren bzw. deren Ester und nicht SS- und SH-Gruppen dargestellt werden.

Daß die positive *Schiff-Reaktion* ebenso wie die *Pseudoplasmaalkalreaktion* an Carbonylgruppen gebunden sind, welche bei der Oxydation der ungesättigten Lipide entstehen, dürfte keinem Zweifel unterliegen [PRETL; FIRMINGER; ARAGONA und BARONE; SULKIN (1, 2); ZORZOLI (2); GEDIGK und FISCHER (1, 2); WOLMAN (4), sowie RAVIOLA und RAVIOLA].

In bestimmten Polymerisationsstufen können die oxydierten ungesättigten Lipide eine positive *Feulgenreaktion* geben, sich mit *Methylgrün* anfärben lassen und unter Umständen sogar im *UV-Licht* ein ähnliches Absorptionsspektrum geben wie die DNS. WOLMAN und SHOSHAN haben in sorgfältigen Untersuchungen demonstriert, daß diese Eigenschaften in Strukturen, welche oxydierte und polymerisierte Lipide enthalten, keine Beweise für das Vorhandensein von Nucleinsäuren sind und die Wege zur Unterscheidung dieser Stoffe dargelegt. Auch SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. fanden im isolierten Lipofuscin keine Nucleinsäuren.

Auf die Anfärbbarkeit der Lipopigmente mit der *Ziehl-Neelsen-Methode* ist schon oft hingewiesen worden. Unsere Experimente, bei denen die oxydierten ungesättigten Fettsäureester im Gewebe und auf Objektträgerausstrichen eine positive Reaktion gaben, stehen im Einklang mit den Arbeiten von REEVES und ANDERSON; CASSELMAN sowie BERG. Diese Autoren gelangten ebenfalls zu dem Schluß, daß die Säurefestigkeit von Gewebsstrukturen auf der Anwesenheit von hochmolekularen ungesättigten Fettsäuren und ihren Oxydationsprodukten, wie multiplen Carboxylgruppen, beruht.

Die *Saure Hämatein-Methode* von BAKER (1, 2) wird für die histochemische Darstellung von Phosphorlipiden verwendet und gilt als relativ spezifisch, sofern das Vorliegen von Nichtfettstoffen ausgeschlossen werden kann [CAIN; LISON; PEARSE (1)]. Sie beruht darauf, daß Phosphorlipide bzw. die in ihnen enthaltenen polyungesättigten Fettsäuren mit Bichromat oxydiert werden. Dabei erfolgt gleichzeitig eine Polymerisation der entstehenden Oxydationsprodukte, welche

ihre Löslichkeit verlieren und sich mit Chrom verbinden. Das gebundene Chrom wird anschließend durch eine schwarze oder blauschwarze Färbung demonstriert, welche durch die Verbindung mit Hämatoxylin entsteht. Bereits PEARSE (1) wies aber darauf hin, daß unter Umständen auch andere Lipide angefärbt werden, jedoch eher mit einem grauen Farbton. Neuere Untersuchungen von HOLZINGER; CHAYEN, BITENSKY und LONG sowie RAVIOLA und RAVIOLA legten in eindrucksvollen Experimenten die Abhängigkeit der Sauren Hämatein-Methode nach BAKER von der Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren mit mehreren Doppelbindungen dar. Durch die Bromierung der Lipide ließ sich die Reaktionsfähigkeit bei der Sauren Hämatein-Methode unterdrücken. Unsere Experimente standen mit diesen Befunden im Einklang: Die in der Subcutis extracellulär abgelagerten wenig oxydierten Methylester der ungesättigten Fettsäuren wurden im histologischen Schnittpräparat deutlich grauschwarz dargestellt. Auch die auf Objektträgern ausgestrichenen kaum oxydierten Fettsäureester wurden im Gegensatz zu den Befunden von CASSELMAN angefärbt. Die im Cytoplasma von Makrophagen gespeicherten und oxydierten ungesättigten Fettsäureester gaben anfangs eine deutlich positive, im Laufe der Alterung jedoch eine schwache oder sogar manchmal eine negative Reaktion. Diese Beobachtungen bestätigten schließlich auch frühere Befunde, daß der Ausfall der Bakerschen Reaktion an Lipopigmenten uneinheitlich ist [GEDIGK und FISCHER (2); WOLMAN (4)].

Bemerkenswert ist die Anfärbbarkeit der ungesättigten Fettsäureester mit dem *Kupferphthalocyaninfarbstoff Luxol-Fast-Blue*. Besonders stark wurden die extracellulär abgelagerten oxydierten Lipide gefärbt, während die Farbreaktion bei den intracytoplasmatisch gespeicherten Fettsäureestern nicht einheitlich ausfiel und nur bei einer mittleren Versuchsdauer (44—100 Tage) ein positives Ergebnis gab. Diese Befunde stehen zu der Annahme im Widerspruch, daß die Luxol-Fast-Blue-Methode für Phosphorlipide, Lipoproteide oder cholinhaltige Verbindungen weitgehend spezifisch ist [PEARSE (1, 2)]. Unsere Experimente zeigen vielmehr, daß auch reine Methylester ungesättigter Fettsäuren bei einem bestimmten Oxydations- und Polymerisationsgrad mit diesem Kupferphthalocyaninfarbstoff zu reagieren vermögen.

Sehr charakteristisch ist die Fähigkeit der ungesättigten Fettsäureester und Lipopigmente, *Ferricyanidionen* (*Schmorlsche Reaktion*, *Test nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC*) und *ammoniakalische Silbernitratlösungen* (*Silberimprägnation nach MASSON-HAMPERL*) zu reduzieren. Beide Reduktionstests haben in die histochemische Methodik Eingang gefunden. Die Ferri-Ferricyanidreaktion wird zum Nachweis von Sulfhydrylgruppen verwandt; die argentaffine Reaktion soll für die Darstellung von Phenolen geeignet sein. An der Spezifität dieser Reaktionen sind aber von jeher Zweifel geäußert worden [s. hierzu PEARSE (1), GEDIGK (2) sowie GEDIGK und TOTVIĆ]. Die vorliegenden Experimente unterstreichen die Berechtigung dieser Bedenken, da es sich gezeigt hat, daß nicht nur die oben genannten Substanzen, sondern auch ungesättigte Fettsäureester von einem gewissen Oxydations- und Polymerisationsgrad an in vivo und in vitro bei beiden Reduktionstests eine stark positive Reaktion geben.

Dabei ist der Hinweis von ZORZOLI (1, 3) interessant, daß in Lipopigmenten offenbar Carbonylgruppen für einen Teil des Reduktionsvermögens verantwortlich sind. Daneben spielen aber zweifellos auch Äthylengruppen, sowie u. U.

auch Epoxyde eine Rolle. Jedenfalls gelingt es mit Hilfe der Ferri-Ferrieyanidreaktion und der Silberimprägnation somit nur, eine ganz allgemeine Aussage über die Reduktionsfähigkeit eines Gewebeelementes zu machen. Eine nähere Charakterisierung der reduzierenden Stoffe ist nur bei gleichzeitiger Verwendung anderer histochemischer Verfahren möglich.

Die ungesättigten Fettsäureester nahmen nach der subcutanen Injektion — ebenso wie bei der Einwirkung von Luftsauerstoff *in vitro* — allmählich *saure Eigenschaften* (Basophilie) an, die offensichtlich an ihre Oxydationsprodukte, und zwar besonders an die bei der Oxydation entstehenden Carboxylgruppen, gebunden waren. Mit dieser Schlußfolgerung steht der Befund im Einklang, daß sich durch die Behandlung der Schnitte mit Methanol im sauren Milieu, bei der vornehmlich die Carboxylgruppen verestert werden, die Affinität der Lipopigmente für basische Farbstoffe fast völlig unterdrücken läßt. Recht wahrscheinlich ist es aber, daß sich bei der Oxydation und Polymerisation der ungesättigten Fettsäuren außerdem noch 1.3-Diketone und Enol-Gruppen bilden, welche ebenfalls basische Farbstoffe binden können (LISON; RAVIOLA und RAVIOLA). Mit histochemischen Methoden gelingt es vorerst jedoch nicht, diese Gruppen in Lipopigmenten nachzuweisen.

Die oxydierten und polymerisierten ungesättigten Fettsäureester besitzen die Fähigkeit, kolloidales, dialysiertes Eisen zu binden. So werden bei der *Hale-Reaktion* die im Interstitium extracellulär abgelagerten oxydierten Lipide ebenso wie die intracytoplasmatischen lipidhaltigen Granula angefärbt. Auch die Objektträgerausstriche der oxydierten Lipide zeigen eine Eisenaffinität. Diese Befunde weisen erneut auf die geringe Spezifität der Hale-Methode hin, die keineswegs selektiv für die Darstellung von sauren Mucopolysacchariden in Gewebsschnitten geeignet ist, wie es schon von GEDIGK (1) und PEARSE (1) hervorgehoben wurde. Neben verschiedenen Proteinen, Mucopolysacchariden, Nucleoproteiden und Phosphorsäureestern lassen sich — wie die vorliegenden Experimente zeigen — auch oxydierte ungesättigte Lipide anfärben. Die Halesche Methode kann also nur ganz allgemein zum Nachweis der „Eisenbindefähigkeit“ von Strukturen verwendet werden.

Durch die Versuche mit reinem Fettsäureester wird auch die *Unlöslichkeit* des Fettbausteines der Lipopigmente verständlich. In Übereinstimmung mit HASS (1, 2); ENDICOTT; DAM und GRANADOS sowie CASSELMAN fanden wir, daß reine ungesättigte Fettsäuren — im Gewebe und im Reagenzglas — durch die Oxydation und Polymerisation ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln verlieren. Da es sich gezeigt hat, daß die Lipopigmente synchron mit der fortschreitenden Alterung nicht mehr mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können, liegt der Schluß nahe, daß ihre Unlöslichkeit ebenfalls durch den oxydativen Umbau und die Polymerisation ihres Lipidbausteines verursacht wird. Ob außerdem noch eine Bindung der oxydierten Lipide an Proteine vorliegt, durch welche zusätzlich ihre Löslichkeit beeinträchtigt wird, läßt sich anhand unserer Experimente nicht entscheiden. So wäre es vielleicht möglich, daß die Löslichkeit frisch abgelagerter, noch nicht oxydierter Fettstoffe, d. h. relativ „junger“ Pigmente, durch die Adsorption an Proteine herabgesetzt wird. Auch eine Copolymerisation mit Proteinen könnte die Löslichkeit der oxydierten Lipide u. U. zusätzlich beeinflussen (s. S. 126). Für die Erklärung der Unlöslichkeit

des Fettbausteines der voll entwickelten Lipopigmente ist die Annahme einer besonderen Bindung an Eiweißstoffe aber nicht notwendig.

Wie zu erwarten, verlieren die oxydierten ungesättigten Fettsäureester mit der abnehmenden Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln die Fähigkeit, Sudanfarbstoffe zu lösen. Dementsprechend ist auch die geringe bzw. fehlende *Sudanophilie* vieler Lipopigmente als Ausdruck des oxydativen Umbaus ihrer Lipidkomponente und nicht als Hinweis auf das Fehlen von Lipiden zu werten. Diese Schlußfolgerung steht mit der Tatsache im Einklang, daß die *Sudanophilie* in histologischen Schnittpräparaten gerade bei den Pigmentkörnchen fehlt, die intensiv braun gefärbt, stark basophil und gut mit Silber imprägnierbar sind, in denen also die Oxydation und Polymerisation des Lipidbausteines besonders weit fortgeschritten sind.

Für die Histologie sowie für die histochemische Methodik ergibt sich aus diesen Befunden der Hinweis, daß im Cytoplasma Strukturen vorkommen können, welche durch die Ablagerung ungesättigter Lipide gebildet werden, und die als wesentliche Bestandteile auch Lipide und deren Oxydationsprodukte enthalten, ohne daß ihr Lipidbaustein mit den üblichen Methoden, wie der Extrahierbarkeit mit organischen Lösungsmitteln oder der *Sudanophilie*, noch nachweisbar sein muß. Die Unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln und das Fehlen der *Sudanophilie* müssen somit nicht Beweise gegen die lipode bzw. lipogene Natur von Cytoplasmastrukturen sein. Ob man dann allerdings im Sinne einer klaren biochemischen Definition diese nicht mehr extrahierbaren Oxydations- und Polymerisationsprodukte ungesättigter Lipide noch als „Lipide“ bezeichnen sollte, steht noch dahin. Besser wäre es wohl, von „*lipogenen*“ Substanzen zu sprechen oder die Strukturen mit dem Präfix „*Lipo*“ zu versehen (wie Lipopigment oder Lipofuscin), um auf diese Weise ihre Herkunft darzulegen.

V. An welche Substanzen ist die Eigenfarbe der Lipopigmente gebunden?

Über die Natur der *Eigenfarbe* fetthaltiger Pigmente, und zwar besonders des Lipofuscins, ist in den vergangenen Jahrzehnten trotz vieler Untersuchungen keine Klärung erzielt worden. Im wesentlichen stehen sich folgende Ansichten gegenüber: Von einer Reihe von Autoren wurden der Farbkomponente dieser Pigmente eiweißgebundene oder proteinogene Farbstoffe zugrunde gelegt [BRAHN und SCHMIDTMANN (1, 2); KUTSCHERA-AICHBERGEN; MOORE und WANG; DIEZEL]. So wurde die Vermutung geäußert, daß die Bildung der Farbkomponente auf der Oxydation und Polymerisation von Polyphenolen zu Melanin beruhen könnte. Auch die Befunde von HEIDENREICH und SIEBERT sowie SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb., welche in isolierten Pigmentgranula u.a. Schwefel und Indolkörper feststellten, ließen an Beziehungen zwischen Lipofuscin und Melanin denken.

Gegen die Melannatur der Lipofuscine lassen sich neben den bereits von HUECK (2), SACHS und PEARSE (1) angeführten Argumenten sowie unseren eigenen Befunden aber auch Analysendaten und Beobachtungen heranziehen, welche unlängst von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. gewonnen und von diesen Autoren selbst nachdrücklich hervorgehoben worden sind. So enthält der sog. „schwarze Rückstand“ des Pigmentes, in dem möglicherweise melaninartige Bausteine vorkommen, nur etwa ein Drittel des Stickstoffes, der von MASON für die Grundeinheit des

Melanins errechnet wurde. Auch der Gehalt an Eisen, Zink und Kupfer ist wesentlich geringer, als er in den Melaningranula tierischer Organe obligat gefunden wurde (MASON). Für das Vorkommen melaninartiger Substanzen wäre schließlich der Nachweis relativ tyrosinreicher Proteine von Bedeutung, die durch eine Polyphenoloxydase (Tyrosinase) unter der Bildung von Doparesten sowie in Gegenwart von schwefelhaltigen Substanzen zu Melanin oxydiert werden können (MASON). Die Analysendaten von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. gaben für einen Gehalt der Pigmentgranula an relativ tyrosinreichen Proteinen aber keinen Anhaltspunkt. Der Gesichtspunkt, daß man Anfangsstadien des Lipofuscins untersuchen müßte, um gegebenenfalls noch nicht oxydiertes, tyrosinreiches Protein finden zu können, ist insofern nur bedingt stichhaltig, weil auch in „alten“ Pigmentgranula stets noch neues, zum Pigment umzuformendes Material abgelagert wird, wie es sich licht- und elektronenmikroskopisch ohne weiteres nachweisen läßt [GEDIGK und FISCHER (2) sowie GEDIGK und WESSEL, s. auch hierzu S. 119]. So findet man — wie wir es unlängst dargelegt hatten, und wie es auch von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. nachgewiesen wurde — in Übereinstimmung mit den genannten elektronenmikroskopischen Beobachtungen selbst in älteren Pigmentgranula neben den oxydierten und polymerisierten, stark gefärbten unlöslichen Lipiden stets noch leicht extrahierbare, offenbar frisch abgelagerte ungesättigte Lipide, die noch nicht oder doch noch nicht wesentlich dem Oxydations- und Polymerisationsprozeß unterworfen sind. Und schließlich ist die oft bestätigte Beobachtung (s. auch SACHS) hervorzuheben, daß sich an den Stellen der Melaninneubildung — wie z.B. bei Neugeborenen — keine Lipide nachweisen lassen, während gerade das „junge“ Lipofuscin durch seinen Lipidgehalt gekennzeichnet ist und am Anfang der Lipofuscinentwicklung stets Lipide vorhanden sind.

Aus allen diesen Gründen wird von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. betont, daß ihre Befunde nur mit der „Annahme vereinbar“ sind, daß im sog. „schwarzen Rückstand“ des Lipofuscins melaninartige Substanzen vorkommen können. Es handelt sich dabei aber eher um einen Indizienbeweis, auf dessen Lücken in der sehr kritischen Arbeit bereits nachdrücklich hingewiesen wird. So wird an einer anderen Stelle besonders hervorgehoben, daß die typischen Melaningranula, wie sie z.B. in Melanomen vorkommen, „mit Sicherheit vom Lipofuscin unterschieden sind“.

Demgegenüber haben schon DAM und GRANADOS (1, 2) sowie BENSLEY Oxydations- und Polymerisationsprodukte ungesättigter Fettsäuren als Farbkompone[n]te des Ceroid- und Lipofuscinpigmentes angesehen. Auf Grund eigener Untersuchungen am Ceroid, am Vitamin-E-Mangelpigment und Lipofuscin [GEDIGK und FISCHER (1, 2)] sowie in Anbetracht der jetzt vorliegenden Experimente gelangen wir zu der gleichen Auffassung wie diese Autoren; durch die Untersuchungen von STAMMLER wurden diese Beobachtungen kurze Zeit später bestätigt. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wies unlängst BJÖRKERUD (2) in dem Lipidextrakt der Lipofuscingranula eine Eigenfarbe und Eigenfluoreszenz nach. Die Tatsache, daß die meisten von diesem Autor identifizierten Lipide weder gefärbt waren noch fluorescierten, steht zu diesen Schlußfolgerungen nicht im Widerspruch, weil die der chemischen Analyse zugänglichen Fettstoffe naturgemäß noch löslich und somit nicht polymerisiert waren. — In diesem Zusammenhang

ist die Feststellung von RAVIOLA und RAVIOLA bemerkenswert, daß sich die ungesättigten Lipide in der Neurohypophyse ebenfalls durch Autoxydation verfärben.

Damit erhebt sich die Frage nach der *chemischen Konstitution der Farbkomponte der Lipopigmente*. Nach den oben beschriebenen Befunden liegt es auf der Hand, daß es sich hierbei nicht um eine einheitliche Substanz mit genau bestimm- baren Stoffwerten, wie Molekulargewicht, Schmelzpunkt usw., handeln kann. Es liegt vielmehr stets eine Mischung von farbigen Oxydationsprodukten der un- gesättigten Fettsäuren vor, deren Oxydationsstufe und Polymerisationsgrad von Fall zu Fall und je nach dem Alter der Granula durchaus verschieden sein dürften. Wie bereits auf S. 118 betont, ist die Aufklärung ihrer näheren chemischen Struk- tur noch nicht erfolgt und stößt wegen ihrer Unlöslichkeit nach wie vor auf große methodische Schwierigkeiten, so daß wir uns vorerst auf die Feststellung be- schränken müssen, daß es sich bei diesen *Farbstoffen um Oxydations- und Poly- merisationsprodukte ungesättigter Lipide* handelt.

Betrachtet man zusammenfassend die älteren Beobachtungen und die jetzt neu erhobenen Befunde, so dürfte es kaum einem Zweifel unterliegen, daß unge- sättigte Lipide durch Oxydations- und Polymerisationsvorgänge in typische gelb bis gelbbraun gefärbte Lipopigmente, wie Ceroid und lipofuscinartige Pigmente, umgewandelt werden können, und zwar gleichviel, ob Proteine fehlen oder primär bzw. sekundär vorhanden sind. Berücksichtigt man ferner die Tatsache, daß aus tyrosinreichen Proteinen oxydativ (s. oben) zwar melaninartige Stoffe oder sogar typisches Melanin, nicht aber Lipofuscine entstehen, so könnte man auf den ersten Blick vielleicht annehmen, daß die Situation nunmehr eindeutig zugunsten der „Lipidtheorie“ geklärt ist.

Trotzdem möchten wir aber die Möglichkeit nicht einfach ausschließen, daß neben den im Vordergrund stehenden Oxydations- und Polymerisationsprodukten der ungesättigten Lipide in den noch unvollständig charakterisierten Proteinen des Lipofuscins bzw. in dem sog. „schwarzen Rückstand“ der Pigmente auch melaninartige Substanzen vorkommen. Hierfür lassen sich nicht nur die Untersuchungen von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. anführen. Auch TAPPEL; VENOLIA und TAPPEL sowie KURODA, MISHIRO und OSHIMA halten es für möglich, daß es bei der Mischung von ungesättigten Fettsäureestern mit Proteinen zu einer Copolymerisation der beiden Komponenten kommt, bei der in den von den Lipiden eingeschlossenen Proteinen auch „Melanoidine“ bzw. melaninartige Stoffe entstehen können. Auf entsprechende Verbindungen zwischen Proteinen und Lipiden wies in einer neueren Arbeit auch BJÖRKSTEN hin.

Diese unlängst auch von SIEBERT diskutierte Möglichkeit würde sehr zur Klärung der von ihm und seinen Mitarbeitern erhobenen Befunde beitragen und sich mit den älteren und den jetzt vorliegenden, an reinen ungesättigten Fett- säureestern und Fettsäureproteingemischen erzielten Resultaten zwanglos in Einklang bringen lassen. Auch wir haben ja festgestellt, daß sich die Oxydation und Polymerisation der ungesättigten Lipide durch eine Mischung mit Proteinen beschleunigen läßt. Es liegt aber auf der Hand, daß es sich hierbei vorerst nur um die Diskussion einer Hypothese handelt, zumal sich dieses Problem wegen der Unlöslichkeit der entstehenden farbigen Oxydationsprodukte der beiden

Stoffgruppen aus methodischen Gründen im Augenblick noch nicht verbindlich lösen läßt.

Jedenfalls muß das Resultat unserer Experimente, daß lipogene Pigmente allein aus oxydierten und polymerisierten ungesättigten Fettsäureestern entstehen *können*, und daß diese Stoffe für ihre wesentlichen histochemischen Eigenschaften verantwortlich sind, nicht zwangsläufig besagen, daß eventuell vorhandene Proteine sich nicht an diesem Oxydationsprozeß der Lipide durch eine Art Copolymerisation beteiligen, und daß dabei nicht unter Umständen auch melaninartige Substanzen entstehen. Proteine sind für die Bildung von Lipopigmenten zwar nicht unbedingt erforderlich; es könnte aber durchaus sein, daß sie manchmal im Cytoplasma gewissermaßen sekundär an der Pigmentbildung mitwirken.

Vielleicht läßt sich das Problem auch durch die Beobachtungen von HAMMERBECK einer Lösung näher bringen, der im Lipofuscin neben den lipogenen auch proteinogene Farbstoffe nachzuweisen glaubte. Ob es sich dabei aber um den oft erwähnten [SACHS; WOLMAN (4)] sudannegativen Pigmentkern handelt, steht noch dahin, weil sich der Nachweis verschieden intensiv gefärbter, histochemisch und morphologisch unterschiedlicher Farbkomponenten im Lipofuscin (KUTSCHERA-AICHBERGEN; SACHS; HAMMERBECK) auch ohne weiteres durch das Vorkommen verschieden alter Lipidablagerungen in ein und demselben Pigmentgranulum, d.h. unterschiedlicher Oxydations- und Polymerisationsgrade der ungesättigten Lipide lichtmikroskopisch [GEDIGK und FISCHER (2)] und elektronenmikroskopisch (GEDIGK und WESSEL) erklären läßt. Schließlich ist hervorzuheben, daß die histochemischen Eigenschaften dieses scheinbar proteinogenen „Farbstoffes“ mit denen der fortgeschrittenen Oxydationsstufen der hochpolymerisierten, nicht mehr sudanophilen Lipide weitgehend übereinstimmen.

VI. Bedeutung der Proteine für die formale und kausale Genese der Lipopigmente

In einer früheren Mitteilung [GEDIGK und FISCHER (2)] hatten wir darauf hingewiesen, daß die lipogenen Pigmente trotz des ihnen allen gemeinsamen Gehaltes an oxydierten ungesättigten Fettsäuren nicht einheitlich sind. Es ließen sich zwei Grundtypen von Lipopigmenten voneinander abgrenzen, und zwar erstens das in Makrophagen bzw. in den zur Phagocytose befähigten Zellen auftretende *Ceroid* und zweitens die in Muskelfasern und epithelialen Zellen gebildeten Pigmente, nämlich die *Lipofuscine* sowie das *Vitamin E-Mangelpigment*.

Wie bereits betont, enthalten beide Typen lipogener Pigmente außer oxydierten Lipiden noch Proteine [GEDIGK (3); s. hierzu auch die zusammenfassende Darstellung von WOLMAN (4)]. Im Anschluß an die eben erfolgte Diskussion erhebt sich nunmehr die Frage, in welchem Umfang diese Eiweißstoffe an dem Aufbau der Pigmentkörnchen beteiligt sind, und welche Rolle sie bei der formalen und kausalen Genese der Lipopigmente spielen. Die Untersuchung der Entwicklung der Lipopigmente deckt in dem Verhalten ihrer Eiweißbausteine bemerkenswerte Unterschiede auf:

Das *Ceroid* entsteht bei der Resorption fetthaltiger Gewebsbestandteile [HAMPERL (2); HARTROFT (1, 2); GEDIGK und FISCHER (1)] und tritt in Form kleiner Tröpfchen bzw. Granula in Makrophagen auf. Eiweißstoffe treten nur sekundär zu den phagocytierten und oxydierten Lipiden hinzu und fallen mengenmäßig nicht ins Gewicht. Bei den großen Lipidtropfen kann die Beimengung von Proteinen unter Umständen ganz unterbleiben bzw. sich auf die oberflächlichen Schichten der Granula beschränken.

Welche Bedeutung dieser Eiweißbaustein des Ceroids besitzt, läßt sich noch nicht mit Sicherheit sagen. Da sich im Ceroidpigment bzw. in seiner unmittelbaren Nachbarschaft hydrolytische Enzyme nachweisen lassen, dürfte es sich bei diesen Proteinen zum Teil um Fermenteiweiß handeln, das von der Zelle bereitgestellt wird und wahrscheinlich an der Verarbeitung der Lipide beteiligt ist [GEDIGK und BONTKE (1)]. Diese Schlußfolgerung wird durch die Tatsache erhärtet, daß die Zelle auch an andere, bei der Phagocytose entstandene Cytoplasmainschlüsse Enzyme abgibt [GEDIGK und BONTKE (2)].

Ein grundsätzlich anderes Verhalten des Eiweißbausteines finden wir bei den in Parenchymzellen und Muskelfasern auftretenden *Lipofuscinen*. Schon quantitativ spielen Proteine in ihnen eine größere Rolle. So ist es in Anbetracht der vorliegenden histochemischen und elektronenmikroskopischen Befunde erwiesen, daß die Lipofuscine neben Lipiden reichlich Proteine enthalten. Nach den — allerdings vorerst noch nicht übereinstimmenden — Untersuchungen von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb.; HENDLEY u. Mitarb. (2, 3) sowie BJÖRKERUD (2) an isolierten Lipofusinkörnchen sollen Eiweißstoffe etwa 30—58% des Trockengewichtes einnehmen, während der Gehalt an extrahierbaren Lipiden zwischen 19 und 51% liegt, und 9—30% auf den unlöslichen sog. „schwarzen Rückstand“ fallen, in dem dann neben oxydierten und polymerisierten, ungesättigten, unlöslichen Lipiden (30—60%) vielleicht noch ein melaninartiges Material vorkommt.

Die Eiweißstoffe des Lipofuscins haben sicher von vornherein eine andere funktionelle Bedeutung als die Proteinkomponente des Ceroidpigments. Offenbar handelt es sich um Bestandteile von stoffwechselaktiven, enzymhaltigen Cytoplasmabezirken bzw. Zellorganellen, in deren Bereich bei der Entwicklung des Lipofuscins Lipide abgelagert und oxydiert werden. Über die Natur dieser Cytoplasmastrukturen gehen die Meinungen noch auseinander. (Siehe hierzu die neuere elektronenmikroskopische Literatur bei GEDIGK und WESSEL 1964.)

Nach den vorliegenden licht- und elektronenmikroskopischen Befunden sind die Proteine dieser Cytoplasmabezirke bzw. Organellen zunächst gewissermaßen nur die Grundsubstanz, in deren Bereich die Lipide allmählich zum Pigment umgeformt werden. Vielleicht wird ein Teil der Proteine dabei im Sinne der oben beschriebenen Copolymerisation oxydativ mit umgewandelt und trägt dann neben den im Vordergrund stehenden gefärbten, oxydierten und polymerisierten ungesättigten Lipiden mit zu der Eigenfarbe bei.

Während die *kausale Genese* des Ceroids als weitgehend gelöst angesehen werden kann [s. S. 127 sowie GEDIGK und FISCHER (1)], ist die Ursache für die Entstehung der Lipofuscine noch nicht geklärt, d.h. es ist die Frage offen, warum ungesättigte Lipide unter Bedingungen, welche offenbar nicht immer im strengen Sinne pathologisch sein müssen, dem normalen Stoffwechsel entgehen und dann der Oxydation und Polymerisation anheimfallen.

GEDIGK und FISCHER (2) sowie WOLMAN (4) haben die verschiedenen Möglichkeiten diskutiert. Neben dem Fehlen von Stoffen, welche als Antioxydantien wirken (z.B. Vitamin E), könnte das vermehrte Auftreten von Oxydations-Katalysatoren (Hämoglobin, Metalle usw.) eine Rolle spielen. Auch der Zeitfaktor scheint von Bedeutung zu sein, wie WOLFSON, WILBUR und BERNHEIM in der regenerierenden Rattenleber zeigten: Der Gehalt an Lipidperoxyden war am niedrigsten, wenn die Zahl der Mitosen am größten war. Man könnte also annehmen,

daß die Möglichkeit zur Oxydation ungesättigter Lipide in der Zelle um so größer ist, je länger sie dort im oxydierbaren Zustand liegenbleiben. Das scheint dann der Fall zu sein, wenn die Lipidbildung oder -ablagerung schneller vor sich geht oder länger andauert als der Stoffwechsel oder der Abtransport der Lipide. Unter diesen Bedingungen können die ungesättigten Lipide unter Umständen von ihrem normalen Stoffwechsel abweichen und oxydiert werden.

BERN, NANDI, CAMPBELL und PISSOT nahmen ähnliche Gründe für die Lipofuscin-entstehung in der Nebenniere an. Das Pigment entstand offenbar dann, wenn die Zellen nicht imstande waren, die Lipide richtig abzugeben oder abzubauen. Ganz entsprechend wurde die kausale Genese des Lipofuscin in der Nebenniere von DEANE erklärt, wo es sich bevorzugt in Zellen entwickelt, welche reichlich hochungesättigte Lipide enthalten.

Wegen des großen Anteiles der Proteine in den Lipofuscinen wurde gelegentlich angeregt, diese gefärbten Strukturen als „proteinogene“ Pigmente zu bezeichnen. Ferner wurde empfohlen, nur von „Fuscinen“ zu sprechen, da viele Pigmentkörnchen das Präfix „Lipo-“ in Anbetracht der geringen bzw. manchmal sogar fehlenden Sudanophilie zu Unrecht besitzen würden. Von anderen werden zur Vermeidung dieser Schwierigkeiten die Bezeichnungen „Abnützungs- oder Alterspigment“ bzw. „wear- and tear-pigment“ vorgezogen. Gegen diese Vorschläge lassen sich aber Einwände vorbringen.

Zunächst darf bei der systematischen Einordnung und Bezeichnung eines Pigmentes das Mengenverhältnis seiner einzelnen Bausteine keine Rolle spielen, da die Zusammensetzung ein und desselben Pigmenttyps — wie wir es weiter oben für Lipopigmente und an anderer Stelle für Eisenpigmente dargelegt haben — nicht konstant ist, sondern in Abhängigkeit von der Art des speichernden Organes und von dem Alter der Pigmente u. U. erhebliche Unterschiede aufweist. Auch die kausale Genese sollte bei der Nomenklatur von Pigmenten nicht ausschlaggebend sein; wissen wir doch, daß aus sehr verschiedenartigen Ursachen gleichartige Pigmente entstehen können [GEDIGK und STRAUSS; GEDIGK und FISCHER (2)]. Zudem ist in vielen Fällen die Entstehungsursache ohnehin umstritten oder unbekannt. Es ist daher ratsam, die Bezeichnung eines Pigmentes nach der chemischen Natur der im Vordergrund stehenden Farbkomponente vorzunehmen. Der Farbstoff ist in der Regel nicht nur für die Auffindung der Pigmentgranula ausschlaggebend; er ermöglicht auch die systematische Zusammenfassung verwandter Pigmente und gibt am ehesten einen Hinweis auf die Natur der zur Pigmentbildung führenden Stoffwechselvorgänge.

Da aber die Eigenfarbe des in Parenchymzellen und Muskelfasern auftretenden sog. Abnutzungspigmentes ebenso wie seine wichtigsten morphologischen, histochemischen und chemischen Eigenschaften hauptsächlich an die Lipidkomponente und deren Oxydationsprodukte gebunden sind, ist die traditionelle Bezeichnung „Lipofuscin“ trotz der möglicherweise noch nebenbei auftretenden melanoiden Copolymerisationsprodukte mit Proteinen nach wie vor durchaus berechtigt und treffend.

Zusammenfassung

Im Cytoplasma von Makrophagen abgelagerte Ester hochungesättigter Fettsäuren werden zu einem Pigment umgeformt, das in allen wesentlichen färberischen und histochemischen Eigenschaften mit den im Organismus vorkommenden

Lipopigmenten, dem Ceroid, den Lipofuscinen und dem Vitamin E-Mangelpigment, übereinstimmt.

Mit zunehmender Versuchsdauer erfahren die gespeicherten ungesättigten Fettsäureester — genau wie die natürlich vorkommenden Lipopigmente — eine charakteristische Änderung ihrer färberischen und histochemischen Eigenschaften: Sie verlieren ihre Löslichkeit und Sudanophilie, sie nehmen eine gelbe bis gelbbraune Eigenfarbe an, sie zeigen ein deutliches Reduktionsvermögen sowie eine starke Basophilie. Dieser Umwandlung liegt hauptsächlich eine allmähliche Oxydation und Polymerisation der ungesättigten Fettsäureester zugrunde.

Die PAS-Reaktion sowie die reduzierenden und sauren Eigenschaften der Lipopigmente sind an Oxydationsprodukte der ungesättigten Lipide gebunden. Auch die Farbkomponente lipogener Pigmente ist vornehmlich ein Oxydations- und Polymerisationsprodukt ungesättigter Fettsäuren.

Die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren läuft *in vivo* und *in vitro* prinzipiell gleichartig ab. Nur die Geschwindigkeit des oxydativen Umbaus ist im tierischen Gewebe größer als im Reagensglas. Durch die Mischung mit Proteinen läßt sich eine Beschleunigung der Oxydation und Farbbildung erzielen.

Außer den ungesättigten Fettsäureestern enthalten die Lipopigmente Eiweißstoffe. Bei dem in phagocytierenden Zellen entstehenden Ceroid spielen Proteine nur eine untergeordnete Rolle und können u. U. ganz fehlen. Sie stellen offenbar Reaktionsprodukte der phagocytierenden Zellen auf die in das Cytoplasma eingeschlossenen Lipide dar. Demgegenüber stehen Proteine bei den in Parenchymzellen gebildeten Lipofuscinen mengenmäßig im Vordergrund. Sie sind Bestandteile von stoffwechselaktiven, enzymhaltigen Cytoplasma-bezirken bzw. Zellorganellen, in deren Bereich die zum Pigment umgewandelten Lipide abgelagert werden. Dabei ist es denkbar, daß ein Teil dieser Proteine durch eine Art Copolymerisation im Sinne von SIEBERT, DIEZEL u. Mitarb. zu melaninartigen Substanzen umgeformt wird.

The Formal Genesis of Lipogenic Pigments. Studies with Esters of Highly Unsaturated Fatty Acids

Summary

Esters of highly unsaturated fatty acids stored in the cytoplasm of macrophages are changed into a pigment which conforms in all essential tinctorial and histochemical properties to the lipopigments occurring in the organism: with ceroid, with the lipofuscins, and with the pigment of vitamin E deficiency.

With an increase in the duration of the experiment, the stored unsaturated fatty acid esters undergo — exactly like the naturally occurring lipopigments — a characteristic change in their tinctorial and histochemical properties. They lose their solubility and sudanophilia, they take on a yellow to yellow-brown color, and they show a distinct capacity for reducing, as well as an intense basophilia. This change is primarily due to a gradual oxidation and polymerization of the unsaturated fatty acid esters.

The PAS reaction and the reducing and acid properties of the lipopigment are bound to oxidation products of the unsaturated lipids. In addition, the color component of the lipogenic pigments is, above all, an oxidation and polymerization product of unsaturated fatty acids.

The oxidation of the fatty acids takes place *in vivo* principally the same as *in vitro*. Only the speed of the oxidative change is greater in animal tissue than in the test tube. When proteins are added, an acceleration of the oxidation and of the color production is produced.

In addition to the unsaturated fatty acid esters the lipopigments contain protein substances. In the formation of ceroid in phagocytic cells, proteins play only a subordinate part and may, under certain circumstances, be entirely lacking. They represent apparently products of reaction of the phagocytizing cells on lipids enclosed within the cytoplasm. In contrast, proteins of the lipofuscins formed within the parenchymal cells quantitatively predominate. They represent components of metabolically active, enzyme-containing regions of cytoplasm and cell organelles, where the lipids, which have been changed to pigment, are deposited. At the same time, it is plausible, that a part of these proteins is changed by a type of copolymerization (in the sense of SIEBERT, DIEZEL and coworkers) into melanin-like substances.

Literatur

- ALPERT, M.: Hormonal induction of deposition of ceroid pigment in the mouse. *Anat. Rec.* **116**, 469—493 (1953).
- ARAGONA, F., e P. BARONE: Sui pigmenti lipidici di origine ematica nei loro rapporti con le lipofuscine. *Riv. Anat. pat.* **6**, 1017—1026 (1953).
- ASCHOFF, L.: Zur Morphologie der lipoiden Substanzen. *Beitr. path. Anat.* **47**, 1—50 (1910).
- BAKER, J.R.: (1) The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. mic. Sci.* **87**, 441—470 (1946).
- (2) Further remarks on the histochemical recognition of lipine. *Quart. J. mic. Sci.* **88**, 463 (1947).
- BENSLEY, R.R.: On the nature of the pigment of mitochondria and of submicroscopic particles in the hepatic cell of the guinea pig. *Anat. Rec.* **98**, 609—619 (1947).
- BERG, J.W.: Chemistry of acid-fastness. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **84**, 196—198 (1953).
- BERN, H.A., S. NANDI, R.A. CAMPBELL, and L.E. PISSOT: The effects of hormones and other agents on weight changes and on ceroid deposition induced by oestrogen administration and by hypophysectomy in the adrenal glands of BALB/c Crgl mice. *Acta endocr. (Kbh.)* **31**, 349—383 (1958).
- BJÖRKERUD, S.: (1) Studies of lipofuscin granules of human cardiac muscle. I. The isolation of the granules. *Exp. molec. Path.* **3**, 369—376 (1964).
- (2) Studies of lipofuscin granules of human cardiac muscle. II. Chemical analysis of the isolated granules. *Exp. molec. Path.* **3**, 377—389 (1964).
- BJÖRKSTEN, J.: Aging: Present status of our chemical knowledge. *J. Amer. Geriat. Soc.* **10**, 125—139 (1962).
- BRAHN, B., u. M. SCHMIDTMANN: (1) Pigmentstudien. Zur Kenntnis des Melanins und des braunen Abnutzungspigmentes. *Virchows Arch. path. Anat.* **227**, 137—145 (1920).
- (2) Zur Pigmentfrage. *Virchows Arch. path. Anat.* **239**, 488—490 (1922).
- CAIN, A.J.: The histochemistry of lipids in animals. *Biol. Rev.* **25**, 73—112 (1950).
- CASSELMAN, W.G.B.: The *in vitro* preparation and histochemical properties of substances resembling ceroid. *J. exp. Med.* **94**, 549—562 (1951).
- CHAYEN, J., L. BITENSKY, and C. LONG: The acid haematein method and the detection of masked Lipid. II. *Internat. Kongr. für Histo- und Cytochemie*, S. 148—149. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
- CIACCIO, C.: (1) Untersuchungen über die Autooxydation der Lipoidstoffe und Beitrag zur Kenntnis einiger Pigmente (Chromolipoide) und Pigmentkomplexe. *Biochem. A.* **69**, 313—333 (1915).
- (2) Contributo all' istochimica dei lipoidi. I. Struttura dei cromolipoidi. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **26**, 534—535 (1950).
- Virchows Arch. path. Anat., Bd. 339*

- CIACCIO, C.: (3) Contributo all' istochimica dei lipidi. II. Ulteriori ricerche tendenti ad indagare la struttura dei cromolipidi. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **27**, 874—875 (1951).
- (4) Contributo all'istochimica dei lipidi. III. Ricerche sue granuli π di Reich. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **27**, 876—878 (1951).
- DAM, H.: Relationship of vitamin E-deficiency to tissue peroxides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **52**, 195—199 (1949).
- , and H. GRANADOS: (1) Peroxidation of body fat in vitamin E-deficiency. *Acta physiol. scand.* **10**, 162—171 (1945).
- (2) Role of unsaturated fatty acids in changes of adipose and dental tissues in vitamin E-deficiency. *Science* **102**, 327—328 (1945).
- DEANE, H.W.: The adrenocortical hormones; their origin, chemistry, physiology, and pharmacology. In: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk, Teil I*, S. 56—58. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
- DIEZEL, P.B.: Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipide. — Eine histochemische Studie an den primären Lipoidosen und den Entmarkungskrankheiten des Nervensystems. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- ELLIS, G.W.: Autoxidation of the fatty acids. 3. The oily products from elaidic and oleic acids. The formation of monoacyl derivatives of dihydroxystearic acid and of $\alpha\beta$ -unsaturated keto acids. *Biochem. J.* **46**, 129—141 (1950).
- ENDICOTT, K.M.: Similarity of the acid-fast pigment ceroid and oxidized unsaturated fat. *Arch. Path.* **37**, 49—53 (1944).
- , and R.D. LILLIE: Ceroid, the pigment of dietary cirrhosis of rats, its characteristics and its differentiation from hemofuscin. *Amer. J. Path.* **20**, 149—153 (1944).
- FARMER, E.H., and D.A. SUTTON: The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part IV. The isolation and constitution of photochemically-formed methyl oleate peroxide. *J. chem. Soc.* **1**, 119—122 (1943).
- FIRMINGER, H.I.: Apparent identity of pigmented lipid in cells in adrenal gland and interstitium of testis of mice following administration of stilbesterol. *J. Nat. Cancer Inst.* **13**, 225—227 (1952).
- GEDICK, P.: (1) Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* **30**, 1057—1065 (1952).
- (2) Histochemische Methoden. In: *Biochemisches Taschenbuch*, S. 855—891. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- (3) Zur Kenntnis lipogener Pigmente. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **42**, 430—434 (1958).
- , u. E. BONTKE: (1) Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten. *Z. Zellforsch.* **44**, 495—518 (1956).
- (2) Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538—568 (1957).
- , u. R. FISCHER: (1) Über die Entstehung des Ceroidpigmentes bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 341—370 (1958).
- (2) Über die Entstehung von Lipopigmenten in Muskelfasern. Untersuchungen beim experimentellen Vitamin E-Mangel der Ratte und an Organen des Menschen. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 431—468 (1959).
- , u. G. STRAUSS: Zur formalen Genese der Eisenpigmente. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 172—190 (1954).
- , u. V. TOTVIĆ: Histochemische Methoden. In: *Biochem. Taschenbuch*, 2. Teil, S. 437—494. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
- , u. W. WESSEL: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes im Myometrium der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 367—382 (1964).
- GRANADOS, H., and H. DAM: On the histochemical relation between peroxidation and the yellow-brown pigment in the adipose tissue of vitamin E-deficient rats. *Acta path. microbiol. scand.* **27**, 591—596 (1950).
- K.E. MASON, and H. DAM: Histological changes in adipose tissue of rats receiving a vitamin E-deficient diet containing highly unsaturated fatty acids. *Acta path. microbiol. scand.* **24**, 86—95 (1947).

- HAMMERBECK, W.: Die Fuscinkörner (Abbauskörner) des menschlichen Herzmuskels. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **100**, 305—326 (1960).
- HAMPERL, H.: (1) Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **292**, 1—51 (1934).
- (2) Über fluoreszierende Körnchenzellen „Fluorocyten“. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 32—47 (1950).
- HARTROFF, W. S.: (1) In vitro and in vivo production of ceroid like substances from erythrocytes and certain lipids. *Science* **113**, 673—674 (1951).
- (2) Pathogenesis and significance of hemoceroid and hyaloceroid. Two types of ceroid like pigments found in human atheromatous lesions. *J. Geront.* **8**, 158—166 (1953).
- HASS, G. M.: (1) Tissue reactions to natural oils and fractions thereof. *Arch. Path.* **26**, 956—965 (1938).
- (2) Intercellular transformations of unsaturated fatty acids and esters. *Arch. Path.* **26**, 1196—1207 (1938).
- (3) Membrane formation at lipid-aqueous interfaces in tissues. *Arch. Path.* **27**, 177—198 (1939).
- HEIDENREICH, O., u. G. SIEBERT: Untersuchungen am isolierten unveränderten Lipofuscin aus Herzmuskulatur. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 112—126 (1955).
- HENDLEY, D. D., B. L. STREHLER, M. C. REPORTER, and M. V. GEE: (1) Further studies on human cardiac age pigment. *Fed. Proc.* **20** (1), 298 (1961) (Abstract).
- A. S. MILDVAN, M. C. REPORTER, and B. L. STREHLER: (2) The properties of isolated human cardiac age pigment. I. Preparation and physical properties. *J. Geront.* **18**, 144—150 (1963a).
- — — — (3) The properties of isolated human cardiac age pigment. II. Chemical and enzymatic properties. *J. Geront.* **18**, 250—259 (1963b).
- HOLCZINGER, L.: The reaction of unsaturated fats with the acid hematein test. *Histochemie* **4**, 120—122 (1964).
- HOLMAN, R. T.: Mode of action of lipoxydase. *Trans. Amer. Ass. Cereal Chemists* **11**, 135—146 (1953).
- HUECK, W.: (1) Pigmentstudien. *Beitr. path. Anat.* **54**, 68—232 (1912).
- (2) Die pathologische Pigmentierung. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie von KREHL-MARCHAND*, Bd. 3, S. 298—481. 1921.
- ISSIDORIDES, M., and W. M. SHANKLIN: Histochemical reactions of cellular inclusions in the human neurone. *J. Anat. (Lond.)* **95**, 151—159 (1961).
- KURODA, K., Y. MISHIRO, and M. OSHIMA: Effect of oxydation of oil on the formation of protein membrane around oil droplet. *Tokushima J. exp. Med.* **5**, 1—7 (1958).
- KUTSCHERA-AICHBERGEN, H.: Über Melanin und über das braune Abnützungspigment. *Frankfurt. Z. Path.* **27**, 21—55 (1922).
- LEBLOND, C. P., R. E. GLEGG, and D. EIDINGER: Presence of carbohydrates with free 1,2-glycolgroups in sites stained by the periodic acid-Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 445—458 (1957).
- LILLIE, R. D.: Ethylenic reaction of ceroid with performic acid and Schiff-reagent. *Stain Technol.* **27**, 37—45 (1952).
- LISON, L.: *Histochimie et cytochimie animales*. Paris: Gauthier-Villars 1953/1960.
- LUBARSCH, O.: (1) Über fetthaltige Pigmente. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **13**, 881—883 (1902).
- (2) Über das sogenannte Lipofuscin. *Virchows Arch. path. Anat.* **239**, 491—503 (1922).
- LUNDBERG, W. O.: Durch Lipoxydase katalysierte Oxydation polyungesättigter Fettsäuren. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **58**, 329—331 (1956).
- MASON, H. S.: Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Advanc. Enzymol.* **16**, 105—184 (1955).
- MASON, K. E., H. DAM, and H. GRANADOS: Histological changes in adipose tissue of rats fed a vitamin E-deficient diet high in cod liver oil. *Anat. Rec.* **94**, 265—287 (1946).
- , and A. F. EMMEL: Vitamin E and muscle pigment in the rat. *Anat. Rec.* **92**, 33—60 (1945).

- MILDEVAN, A. S., and B. L. STREHLER: Fluorescent lipids from heart age pigment. *Fed. Proc.* **19** (1), 231 (1960) (Abstract).
- MOORE, T., and Y. L. WANG: Formation of fluorescent pigment in vitamin E-deficiency. *Brit. J. Nutr.* **1**, 53—64 (1947).
- NOVIKOFF, A. B.: (1) The biochemical cytology of liver. *Bull. N.Y. Acad. Med.* **35**, 67—70 (1959).
- (2) Lysosomes and related particles. In: J. BRACHET and A. MIRSKY, *The cell*, vol. II, p. 423—488. New York and London: Academic Press 1961.
- PEARSE, A. G. E.: (1) Histochemistry. Theoretical and applied. London: Churchill 1953/1960.
- (2) Copper phthalocyanins as phospholipid stains. *J. Path. Bact.* **70**, 554—557 (1955).
- PRETL, K.: Zur Frage des Lipoid- und Lipoproteinstoffwechsels der menschlichen Vorsteherdrüse. *Virchows Arch. path. Anat.* **315**, 229—249 (1948).
- RAVIOLA, E., and G. RAVIOLA: Histochemistry of rat neurohypophyseal pituicyte lipid granules. Autoxidation of unsaturated fats during fixation. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 176—187 (1963).
- REEVES, R. E., and R. J. ANDERSON: The chemistry of the lipides of tubercle bacilli XLVII. The composition of the avian tubercle bacillus Wax. *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 858—861 (1937).
- ROSS, J., A. I. GEBHART, and J. F. GERECHT: The autoxidation of methyl oleate. *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 282—286 (1949).
- SACHS, H. W.: Über die autogenen Pigmente, besonders das Lipofuscin und seine Abgrenzung vom Melanin. *Beitr. path. Anat.* **108**, 267—314 (1943).
- SIEBERT, G.: Persönliche Mitteilung 1964.
- P. B. DIEZEL, K. JAHR, E. KRUG, A. SCHMITT, E. GRÜNBERGER u. I. BOTTKÉ: Isolierung und Eigenschaften von Lipofuscin aus Herzgewebe des Menschen. *Histochemie* **3**, 17—45 (1962).
- SULKIN, N. M.: (1) Histochemical studies of the pigments in human autonomic ganglion cells. *J. Geront.* **8**, 435—445 (1953).
- (2) The properties and distribution of PAS-positive substances in the nervous system of the senile dog. *J. Geront.* **10**, 135—144 (1955).
- STAMMLER, A.: Histochemische Untersuchungen des „lipoiden Pigmentes“ in den Ganglienzellen des Gehirns. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 347—357 (1959).
- STREHLER, B. L.: Time, cells and aging, p. 181—188. New York and London: Academic Press 1962.
- , and A. S. MILDEVAN: (1) Studies on the chemical properties of lipofuscin age pigment. In *Proceed. 5th Intern. Gerontol. Congr. San Francisco (Calif.) 1960*.
- (2) Studies on the chemical properties of lipofuscin age pigment. In: *Biological aspects of aging* (N. W. SHOCK, ed.), p. 174—181. New York: Columbia University Press 1962.
- TAPPEL, A. L.: Studies on the mechanism of vitamin E-action. III. In vitro Copolymerization of oxidized fats with protein. *Arch. Biochem.* **54**, 266—280 (1955).
- VENOLIA, A. W., and A. L. TAPPEL: Brown-colored oxypolymers of unsaturated fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **35**, 135—138 (1958).
- WOLFSON, N., K. M. WILBUR, and F. BERNHEIM: Lipid peroxide formation in regenerating rat liver. *Exp. Cell Res.* **10**, 556—558 (1956).
- WOLMAN, M.: (1) Staining of lipids by the periodic-acid-Schiff-reaction. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **75**, 583—585 (1950).
- (2) The lipids stained by the periodic-acid-Schiff-technique. *Stain Technol.* **31**, 241—245 (1956).
- (3) The use of chemical agents in the histochemical demonstration of lipids. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **2**, 140—154 (1961).
- (4) Histochemistry of lipids in pathology. In: *Handbuch der Histochemie*, Bd. V/2. Stuttgart: Gustav Fischer 1964.
- , and S. SHOSHAN: The chromolipoids: Dependence of histochemical characteristics on the degree of polymerization and their differentiation from DNA. *Histochemie* **2**, 69—75 (1960).

- ZOLLINGER, H. U.: Lokalisation und Bedeutung des Ceroidpigmentes. Schweiz. Z. allg. Path. **16**, 1026—1040 (1953).
- ZORZOLI, G. C.: (1) Considerazioni sulle reazioni argentaffine ed argentiche di Bignardi applicate allo studio dei pigmenti cromolipoidi. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **28**, 87—90 (1952a).
- (2) Considerazioni sulla reazione di Albert e Leblond mediante la 2.4 dinitrofenilidrazina applicata allo studio dei pigmenti cromolipoidi. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **28**, 315—317 (1952b).
- (3) Considerazioni sulla reazione di Schmorl applicata allo studio dei pigmenti cromolipoidi. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **28**, 1073—1075 (1952c).

Prof. Dr. P. GEDIGK
Pathologisches Institut der Universität
3550 Marburg/Lahn, Robert Koch-Str. 5
Priv.-Doz. Dr. W. PROCH
Institut für Gerichtliche Medizin der Universität
5300 Bonn, Stiftsplatz 12