

Aus dem Hirnpathologischen Institut der Deutschen Forschungsanstalt  
für Psychiatrie (MAX-PLANCK-Institut) München (Direktor: Prof. Dr. W. SCHOLZ)

## Über histologische Methoden in der Differentialdiagnose von Leukodystrophien und Lipoidosen

Von  
**TH. v. HIRSCH und J. PEIFFER**

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 20. Oktober 1955)

Bei den diffusen Sklerosen beobachtet man im Zusammenhang mit der für diese Krankheitsgruppe charakteristischen, mehr oder weniger ausgeprägten Zerstörung der Markscheiden das Auftreten reichlicher Mengen lipoider Substanzen in gliogenen Abräumzellen. Diese lipoiden Substanzen werden im allgemeinen als Abbaustoffe der Markscheiden-lipoide angesehen und wir wissen, daß sie sich in ihrem färberischen Verhalten und in ihrer chemischen Beschaffenheit von dem Lipoidbestand der gesunden Markscheiden unterscheiden. Wir kennen mindestens zwei untereinander wesentlich verschiedene Gruppen derartiger Abbaustoffe: einerseits die *sudanophilen Abbaustoffe*, welche bei der multiplen und der konzentrischen Sklerose, der SCHILDERSchen Krankheit und der VAN BOGAERTSchen Leukoencephalitis, sowie bei jeder sekundären Degeneration und Erweichung vorkommen; andererseits die nicht oder nur sehr schwach sudanophilen Lipoide, welche für manche der degenerativen diffusen Sklerose (Leukodystrophien) wie auch für die Lipoidosen charakteristisch sind und in der neuropathologischen Literatur oft als *Prälipoid* bezeichnet werden. In der vorliegenden Arbeit soll der Versuch gemacht werden, die bekannten färberischen Methoden zur Darstellung der Lipoide so abzuändern, daß sie in höherem Maße als bisher den Charakter von histochemischen Methoden erlangen und uns dadurch dem Ziel nähern, bei der histopathologischen Untersuchung auch die chemische Beschaffenheit der lipoiden Substanzen besser beurteilen zu können.

### Chemische Grundlagen

Zunächst soll ein kurzer Überblick gegeben werden über die Art und Menge der Lipoide im weitesten Sinne, welche durch chemisch-analytische Methoden im normalen Gehirn nachgewiesen worden sind. Es sind

hier in erster Linie die Arbeiten von KLENK (1953), BRANTE (1949), JOHNSON, McNABB u. ROSSITER (1948, 1949, 1950) und CUMINGS (1953) zu nennen, in welchen auch Hinweise auf die umfangreiche ältere Literatur zu finden sind. Diese chemischen Methoden erlauben wohl eine getrennte Untersuchung von Rinde und Mark, nicht aber eine Aufgliederung nach einzelnen morphologischen Strukturelementen. Die Untersuchungen von LETTERER (1937) über die Myelinisierung der Markfasern während des Wachstums junger Tiere geben aber ein Beispiel dafür, daß chemisch-analytische Methoden durch Parallelversuche mit der histologischen Färbetechnik in wertvoller Weise ergänzt werden können.

Die wichtigsten Lipoide des normalen Gehirns sind: Das Cholesterin, die Glycerinphosphatide (Lecithine und Kephaline), die Sphingomyeline und die Cerebroside. In Tab. 1 ist nach JOHNSON, McNABB u. ROSSITER

Tabelle 1. *Lipoidgehalt in Rinde und Mark von Neugeborenen und Erwachsenen. Mittelwerte aus je fünf Gehirnen. Die Zahlen bedeuten den Prozentgehalt, bezogen auf wasserfreies Gewebe. Nach JOHNSON, McNABB and ROSSITER (1949)*

	Neugeborene		Erwachsene	
	Rinde	Mark	Rinde	Mark
freies Cholesterin	5,03 ± 0,35	6,70 ± 0,33	6,17 ± 0,20	14,08 ± 0,55
Cholesterinester	0,06 ± 0,04	0,30 ± 0,07	0,10 ± 0,05	0,26 ± 0,22
Lecithin . . .	7,81 ± 0,45	9,07 ± 0,28	6,25 ± 0,63	4,63 ± 0,34
Kephalin . . .	10,46 ± 1,08	11,57 ± 0,58	11,71 ± 0,40	12,39 ± 0,83
Sphingomyelin .	1,30 ± 0,46	1,40 ± 0,58	3,03 ± 0,29	6,82 ± 0,67
Cerebrosid . . .	5,64 ± 0,91	6,21 ± 0,39	5,54 ± 0,80	16,28 ± 0,99
Summe . . .	30,30	35,25	32,80	54,46
Wasser . . .	974 ± 69	982 ± 72	534 ± 10	240 ± 6

ihr prozentualer Anteil im wasserfreien Gewebe von Rinde und Mark bei Neugeborenen und Erwachsenen wiedergegeben. Man erkennt, daß bei den Neugeborenen, wo die Markfasern noch nicht myelinisiert sind, Rinde und Mark ziemlich ähnlich zusammengesetzt sind und sich auch von der Rinde Erwachsener nicht stark unterscheiden. Im Mark der Erwachsenen findet man hingegen, als Folge der nunmehr vollständigen Ausbildung der Markscheiden, eine sehr auffällige Zunahme von Cholesterin, Sphingomyelen und Cerebrosiden. Diese drei Lipoide sind daher in erster Linie als die Markscheidenlipoide anzusehen, während es wohl noch nicht ganz geklärt ist, in welchem Umfang auch Glycerinphosphatide in der Markscheide eine Rolle spielen. Es verdient besonders hervorgehoben zu werden, daß im normalen Gehirn innerhalb der Versuchsfehler keine Cholesterinester gefunden wurden. Ebenso konnten Glycerin-Fettsäure-Ester

(Synonyme: Triglyceride oder Neutralfette<sup>1)</sup> nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Es ist hier wohl am Platze, die einzelnen Hirnlipoide hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und Löslichkeitseigenschaften, von welchen wir später noch Gebrauch machen werden, kurz zu charakterisieren.

Das *Cholesterin* ist ein einfacher ungesättigter sekundärer Alkohol  $C_{27}H_{46}O$ . Es ist (ebenso wie Cholesterinester und Triglyceride) in allen Fettlösungsmittern löslich, z. B. in Alkohol, Äther, Petroläther, Chloroform, Pyridin, insbesondere auch in Aceton, welches die übrigen Hirnlipoide bei Zimmertemperatur nicht löst.

Die *Glycerinphosphatide* (Lecithine und Kephaline) bestehen aus Glycerinphosphorsäure, in welcher die beiden noch verfügbaren Hydroxylgruppen des Glycerins mit Fettsäuren verestert sind, während die Phosphorsäure noch mit einem basischen Bestandteil, ebenfalls in esterartiger Bindung, verknüpft ist. Der basische Bestandteil der Lecithine ist Cholin (Dimethyläthanolamin); die Kephaline enthalten statt dessen teilweise Colamin (Äthanolamin), teilweise Serin ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxy-propionsäure). Die Fettsäuren der Glycerinphosphatide sind hauptsächlich Palmitin-, Stearin- und Ölsäure, also dieselben Fettsäuren, welche als Triglyceride im Depotfett vorkommen. Eine besondere Gruppe bilden die Acetylphosphatide, in welchen die zwei Fettsäurereste durch einen Aldehydrest ersetzt sind. Alle Glycerinphosphatide sind bei Zimmertemperatur in Aceton unlöslich; in Äther, Petroläther, Chloroform, Pyridin sind sie löslich. Alkohol löst reines Lecithin, nicht aber reines Kephalin. Aus einem Gemisch mit anderen alkohollöslichen Lipoiden wird aber auch Kephalin von Alkohol aufgenommen.

Die *Sphingomyeline* sind ebenfalls Phosphatide. Sie enthalten aber kein Glycerin, sondern einen einfach ungesättigten, zweiwertigen Aminoalkohol: das Sphingosin  $C_{18}H_{37}O_2N$ . Die Aminogruppe des Sphingosins ist an einen Fettsäurerest gebunden (hauptsächlich Stearinsäure), eine der beiden alkoholischen Hydroxylgruppen ist mit Cholinphosphorsäure verestert, die zweite Hydroxylgruppe ist frei. Die Sphingomyeline sind bei Zimmertemperatur in Aceton, Äther, Petroläther unlöslich; in Alkohol, Chloroform, Pyridin sind sie in der Wärme gut, bei Zimmertemperatur in geringerem Maße löslich. Das beste Lösungsmittel ist Methylalkohol-Chloroform (3:1).

Die *Cerebroside* enthalten denselben Sphingosin-Fettsäure-Anteil wie die Sphingomyeline, an die Stelle der Cholinphosphorsäure ist aber ein Zuckerrest getreten und zwar Galaktose. Als Fettsäure findet man hier nicht Stearinsäure, sondern fast ausschließlich höhere Fettsäuren mit 24gliedriger Kohlenstoffkette, nämlich Lignocerinsäure  $C_{24}H_{48}O_2$ ,  $\alpha$ -Oxylignocerinsäure (Cerebronsäure)  $C_{24}H_{48}O_3$  und die ungesättigten Säuren Nervonsäure  $C_{24}H_{46}O_2$  und  $\alpha$ -Oxynervensäure  $C_{24}H_{46}O_3$ . Bei einem Teil der Cerebroside des Gehirns ist eine Hydroxylgruppe des Galaktoserestes mit Schwefelsäure verestert, wodurch das Molekül stark saure Eigenschaften bekommt. Die Cerebroside haben ähnliche Löslichkeitseigenschaften wie die Sphingomyeline. Im Vergleich zu diesen sind sie in Methylalkohol-Chloroform weniger gut, in Pyridin besser löslich.

Noch zuckerreichere Lipide kommen zwar nicht in der weißen Substanz, wohl aber in der grauen Substanz in geringer Menge vor. Bei gewissen Lipoidspeicherkrankheiten, insbesondere bei der infantilen amaurotischen Idiotie, findet

<sup>1</sup> Die in der Neuropathologie gelegentlich anzutreffende Gleichsetzung von sudanophilen Abbaustoffen mit „Neutralfett“ ist nicht berechtigt, da auch die in pathologischen Fällen häufig auftretenden Cholesterinester „sudanophil“ sind, d. h. sich mit Sudanrot rot färben.

man sie in beträchtlichen Mengen in den Ganglienzellen. Es sind dies die *Ganglioside*, welche ähnlich den Cerebrosiden gebaut sind, aber diesen gegenüber die dreifache Menge Hexosen und außerdem noch eine Polyoxyaminosäure, die Neuraminsäure, enthalten. In ihrer Löslichkeit verhalten sich die Ganglioside ähnlich wie Sphingomyeline und Cerebroside. Während diese letzteren von Aceton in der Siedehitze gelöst werden und beim Abkühlen wieder ausfallen, sind die Ganglioside auch in siedendem Aceton sehr schwer löslich. Gereinigte Ganglioside lösen sich in Wasser zu einer klaren kolloidalen (nicht dialysierbaren) Lösung von ausgesprochen saurer Reaktion. Mit dem kolloidalen Charakter ihrer Wasserlöslichkeit hängt es wohl zusammen, daß die Ganglioside bei Fällen von infantiler amaurotischer Idiotie auch in altem formalinfixiertem Gewebe noch erhalten sind (KLENK 1947). Nach eigenen Erfahrungen kann man bei infantilen amaurotischen Idiotien Schnitte von formalinfixiertem Material 24 Std in dest. Wasser bei 90° vorbehandeln, ohne daß dadurch der färberische Nachweis der Speicherstoffe beeinträchtigt würde.

Die Veränderungen im Lipoidbestand der weißen Substanz, welche als Folge von pathologischen Entmarkungsprozessen auftreten, sind von BRANTE (1949) und CUMINGS (1953) chemisch untersucht worden an Fällen von diffuser Sklerose (sudanophiler Typ) und multipler Sklerose. In Tab. 2 sind Ergebnisse von CUMINGS in abgekürzter Form wiedergegeben. Man sieht, daß innerhalb der Entmarkungsherde sämtliche

Tabelle 2. *Lipoidgehalt im Mark bei multipler und diffuser Sklerose. Die Zahlen bedeuten den Prozentgehalt, bezogen auf frisches formalinfixiertes Gewebe. Fall 1 u. 2: Multiple Sklerose; Fall 3: Diffuse Sklerose vom sudanophilen Typ. Nach CUMINGS (1953)*

Fall		freies Cholesterin	Cholesterin-Ester	Lecithin	Kephalin	Sphingomyelin	Cerebrosid
1.	normales Mark . . .	2,8	0,0	1,70	1,06	2,04	3,5
	Entmarkungsherd . . .	1,17	1,67	0,46	1,04	0,8	1,2
2.	normales Mark . . .	3,81	0,25	0,93	2,45	2,40	4,23
	Entmarkungsherd . . .	1,08	1,76	0,34	0,99	0,49	0,58
3.	normales Mark . . .	3,7	0,2	1,0	2,0	1,9	2,3
	frühes Entmarkungsstadium . . .	1,74	1,56	0,78	0,76	0,8	1,2
	spätes Entmarkungsstadium . . .	1,2	1,8	0,53	0,73	0,54	1,03

normalen Hirnlipoide im Vergleich zum normalen Mark stark abgenommen haben, während gleichzeitig Cholesterinester, welche im normalen Mark überhaupt nicht vorkommen, in beträchtlichen Mengen auftreten. Triglyceride sind auch hier nicht gefunden worden.

Die chemische Untersuchung des zeitlichen Ablaufes eines Entmarkungsprozesses ist bei der experimentellen WALLERSchen Degeneration von peripheren Nerven an Versuchstieren von BRANTE (1949) und JOHNSON, McNABB u. ROSSITER (1949, 1950) durchgeführt worden. Bei peripheren Nerven findet man unter den Lipoiden auch beträchtliche Mengen

von Triglyceriden, welche aber sicher nicht aus der Markscheide, sondern aus Ablagerungen von Depotfett innerhalb des perineuralen Bindegewebes stammen und auch im Verlauf der WALLERSchen Degeneration sich nicht in gesetzmäßiger Weise verändern. Sie können hier außer Betracht bleiben. Die Abb. 1 zeigt in eindrucksvoller Weise, wie die Abnahme der Markscheidenlipoide von einer Neubildung von Cholesterinestern begleitet ist, deren Menge am 16. Tage ihren Höhepunkt erreicht und dann nur sehr langsam abnimmt.

Nach dem Ergebnis der angeführten chemischen Untersuchungen muß es als erwiesen gelten, daß die sudanophilen Abbaustoffe, welche bei der multiplen Sklerose, bei den sudanophilen Typen der diffusen Sklerose und bei der experimentellen WALLERSchen Degeneration im histologischen Schnittpräparat beobachtet werden, aus Cholesterinestern bestehen und nicht aus Triglyceriden.

Angesichts der Tatsache, daß die typischen Markscheidenlipoide, nämlich Cholesterin, Sphingomyeline und Cerebroside, kein Glycerin enthalten, erscheint es auch als durchaus natürlich, daß beim primären Markscheidenzerfall keine Triglyceride als Zwischen- oder Endprodukte des Abbaus entstehen. Andererseits ist es mit dieser Auffassung durchaus vereinbar, daß z. B. bei vollständigen Erweichungen oder Nekrosen aus den im Hirngewebe vor allem außerhalb der Markscheiden verbreiteten Glycerinphosphatiden Triglyceride gebildet werden können.

Die chemische Natur der Speicherstoffe der *Lipoidosen* ist vor allem durch die Arbeiten von KLENK (1939, 1947) weitgehend aufgeklärt worden. Im Zentralnervensystem spielt in erster Linie die Speicherung von Gangliosiden bei der infantilen amaurotischen Idiotie und von Sphingomyelin bei der NIEMANN-PICKSchen Lipoidose eine Rolle. Die bei der *Leukodystrophie* auftretenden Abbau- bzw. Speicherstoffe sind dagegen bisher nicht chemisch untersucht worden. Die Tatsache, daß sie sich mit Sudan- und Scharlachrot nicht wie die eigentlich „sudanophilen“

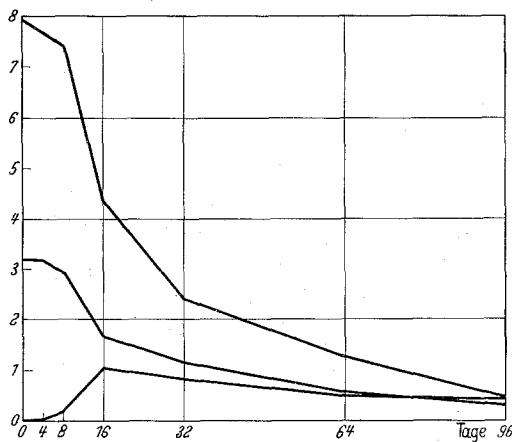


Abb. 1. WALLERSche Degeneration des N. ischiadicus der Katze. Veränderung des Lipoidgehaltes, ausgedrückt in Prozenten des Erstgewichtes des intakten Vergleichsnerven, während eines Zeitraumes von 96 Tagen. Obere Kurve: Summe der typischen Markscheidenlipoide (freies Cholesterin + Sphingomyelin + Cerebrosid). Mittlere Kurve: freies Cholesterin. Untere Kurve: Cholesterinester.

Nach JOHNSON, McNABB u. ROSSITER (1949)

Cholesterinester und Neutralfette rot, sondern nur sehr schwach orange-gelb färbten, hatte ALZHEIMER veranlaßt, sie als „Prälipoide“ zu bezeichnen. ALZHEIMER war es auch, der 1910 erstmals die Eigenschaft dieser Stoffe beschrieb, sich mit basischen Anilinfarbstoffen metachromatisch braun anzufärben. Seine Annahme, daß sie chemisch zu der Protagonfraktion<sup>1</sup> gehören, blieb für Jahrzehnte die einzige Äußerung zur Frage ihrer chemischen Natur.

Nachdem wir nun wissen, daß die eingangs erwähnten sudanophilen Abbaustoffe im wesentlichen aus Cholesterinestern bestehen, handelt es sich darum, einerseits die Cholesterinester, andererseits die „Prälipoide“ der Leukodystrophien und Lipoidosen färberisch so darzustellen, daß das histologische Bild auch über die chemische Natur der dargestellten Lipoide einigen Aufschluß gibt und eine gewisse Differenzierung verschiedener Prälipoide erlaubt.

### Histologische Färbemethoden

*Cholesterinester.* Zur ihrer Darstellung kommen in erster Linie die „Fettfarbstoffe“ Scharlach, Sudanrot B und Sudanschwarz B in Frage. Für die Charakterisierung als Cholesterinester ist Sudanschwarz B insofern wenig geeignet, als es praktisch alle lipoiden Substanzen mit großer Intensität anfärbt. Scharlach und Sudanrot B geben wohl eine Abstufung der Farbintensität bei verschiedenen Lipoiden; sie reicht indessen nicht aus, um mit Sicherheit z. B. zwischen Cholesterinestern und Triglyceriden zu unterscheiden. Eine als Kriterium sehr wertvolle Eigenschaft der Cholesterinester ist aber ihre Doppelbrechung, welche von KAISERLING (1910), ASCHOFF (1909) und KAWAMURA (1911), hauptsächlich bei Fällen von chronischer Nephritis und von Atherosklerose der Gefäße zu ihrer Erkennung benutzt und eingehend untersucht worden ist<sup>2</sup>. Sie fanden, daß Cholesterinester im frischen, unfixierten Gewebe immer die Form von doppelbrechenden Tröpfchen (flüssigen Sphärokristallen) haben, welche zwischen gekreuzten Polarisatoren hell mit einem dunklen Kreuz erscheinen. Durch die postmortale Abkühlung und die Fixierung in Formalin werden die Tröpfchen in nadelförmige Kristalle umgewandelt, welche zwar auch doppelbrechend sind, aber kein typisches Merkmal haben, um sie von ähnlichen Kristallen anderer Zusammensetzung zu unterscheiden. Beim Erwärmen in Wasser oder Glycerin verlieren sowohl die Tröpfchen

<sup>1</sup> Die von LIEBREICH (1865) eingeführte Bezeichnung Protagon umfaßt diejenige Lipoidfraktion, die nach erschöpfernder Ätherextraktion mit siedendem Alkohol extrahiert werden kann. Nach unserer heutigen Kenntnis umfaßt sie Sphingomyeline, Cerebroside und Ganglioside.

<sup>2</sup> KAISERLING schreibt wörtlich: „Als man es nicht besser wußte, nannte man diese Stoffe Fett, und als man es besser wissen konnte, blieb der Name Fett bei der Mehrzahl der Menschen.“

als auch die nadelförmigen Kristalle bei etwa 40° ihre Doppelbrechung, indem sie zu isotropen flüssigen Tröpfchen schmelzen. Bei anschließender Abkühlung kehrt die Doppelbrechung wieder und zwar zunächst immer in Form der sehr charakteristischen flüssigen Sphärokristalle, die sich lange in dieser Form halten. Es ist allgemein anerkannt, daß Triglyceride niemals in dieser Form erscheinen, sondern entweder als flüssige, nicht doppelbrechende Tropfen oder als Kristalle mit gewöhnlicher Doppelbrechung (LISON 1953).

Die Umwandlung der Cholesterinester in die charakteristischen Sphärokristalle wird durch die Sudanfärbung nicht beeinträchtigt und kann gleichzeitig mit dieser erfolgen. Wir färben zu diesem Zweck mit Scharlach oder Sudanrot B bei einer Temperatur von 60°. Hierbei ist es wichtig, alkoholhaltige Lösungsmittel zu vermeiden, weil sie die Lipide teilweise herauslösen und ihre Doppelbrechung zerstören können. Aus diesem Grund verwenden wir gesättigte — übrigens sehr niedrigprozentige — Lösungen des Farbstoffs in einer Mischung von Glykol und Diglykol (9:1). Cholesterinester und Triglyceride werden intensiv rot gefärbt und können in der beschriebenen Weise durch ihre Doppelbrechung unterschieden werden. Selbstverständlich muß man damit rechnen, daß durch ihre Lagerung im Inneren von Abräumzellen die freie Ausbildung der Sphärokristalle behindert sein kann. Die Erfahrung an einer großen Zahl von Schnitten hat aber gezeigt, daß immer so zahlreiche wohlgebildete Sphärokristalle neben schlecht erkennbaren Formen zu sehen sind, daß man über das Vorliegen von Cholesterinestern nicht im Zweifel sein wird.

Neben den Cholesterinestern als typischen Produkten des Markscheidenabbaues wollen wir auch die noch erhaltenen Markscheiden in anderer Farbe zur Darstellung bringen. Hierzu machen wir eine Gegenfärbung mit Perjodsäure-Leucofuchsin (PAS), welche eine intensive violettrote Markscheidenfärbung ergibt. Da Markscheidenquerschnitte und auch morphologisch veränderte Markscheiden (z. B. Markkugeln) ebenfalls Doppelbrechung mit dunklem Kreuz zeigen und somit bei oberflächlicher Betrachtung mit den Sphärokristallen der Cholesterinester verwechselt werden könnten, ist es nicht unwichtig, solche Unklarheiten durch die PAS-Gegenfärbung auszuschließen. Diese bringt noch den weiteren Vorteil mit sich, daß sie die mit Scharlach oder Sudanrot B nur sehr schwach anfärbbaren Ganglioside bei Fällen von amaurotischer Idiotie und Gargoylismus (DIEZEL 1954) und die Prälipoide bei Leukodystrophien intensiv anfärbt. Auf diese Weise ermöglicht die Scharlach-PAS-Färbung viel umfassendere Aussagen als eine gewöhnliche „Fettfärbung“.

*Prälipoide.* Während Scharlach oder Sudanrot B die Prälipoide der Leukodystrophien nur sehr schwach anfärbten, werden sie durch Sudan-

schwarz B und auch mit PAS gut dargestellt. Beide Färbungen sind aber zu wenig spezifisch, um die Prälipoide der Leukodystrophien rein färberisch von anderen lipoiden Substanzen unterscheiden zu können. Wir haben aus diesem Grunde versucht, die erstmalig von ALZHEIMER (1910) beobachtete metachromatische Färbung mit basischen Farbstoffen für unsere Zwecke auszubauen.

Die von NISSL angegebene Färbung mit basischen Farbstoffen wird normalerweise in wässriger Lösung ausgeführt. Es tritt dabei eine starke Überfärbung ein, welche eine anschließende Differenzierung in Alkohol notwendig macht. An Gefrierschnitten von formalinfixiertem Material werden auch die Markscheiden und ein Teil der sonstigen Lipoide angefärbt, im Verlauf der Differenzierung aber durch den Alkohol wieder herausgelöst. Mit dieser Methode — welche an sich nicht eine Lipoiddarstellung, sondern eine Zellfärbung bezweckt — hat ALZHEIMER (1910) die Beobachtung gemacht, daß die Prälipoide bei Anwendung von Toluidinblau, Kresylviolett oder Thionin eine sehr bemerkenswerte und ungewöhnliche braune metachromatische Färbung annehmen. Diese Tatsache kann zu einer spezifischen Darstellungsmethode für die Prälipoide benutzt werden, wenn man die Differenzierung mit Alkohol wegläßt und die Färbebedingungen so abändert, daß von vorneherein keine Überfärbung eintritt.

Wir färben mit einer Lösung von Kresylviolett in 1% Essigsäure. Die saure Reaktion der Färbelösung ( $p_{\text{H}}$  etwa 2,7) verhindert eine Überfärbung. Man erhält auf diese Weise eine zartblaue Zellfärbung, die Markscheiden erscheinen in einem rötlichen metachromatischen Farbton. Die typische Farbe der Prälipoide der Leukodystrophien ist ein helleres oder dunkleres Braun, während sie an den Herdändern oder dort, wo der Krankheitsprozeß offenbar weniger weit fortgeschritten ist, den rötlichen Ton der Markscheiden annehmen. Ganglioside werden bei Fällen von infantiler amaurotischer Idiotie intensiv blauviolett gefärbt. Cholesterinester und Triglyceride bleiben farblos. Man erhält so eine schöne farbliche Differenzierung verschiedener Lipoide, die mit Sudanschwarz oder PAS alle gleichartig gefärbt wären. Bringt man einen mit Kresylviolett in essigsaurer Lösung gefärbten Schnitt in verdünntes Ammoniakwasser, so schlägt die Farbe der Markscheiden und der rot gefärbten Prälipoide in blau um, während die ausgesprochen braunen Prälipoide ihre Farbe behalten. Ganglioside geben nur eine geringe Änderung der Farbnuance gegen blau. In verdünntes Essigwasser zurückgebracht, wird die ursprüngliche Farbe wieder hergestellt und man kann dies beliebig oft wiederholen.

Wir haben eine Reihe von basischen Farbstoffen ausprobiert. Nach unseren Erfahrungen gibt Kresylviolett die schönsten und haltbarsten Färbungen. Nur die als metachromatisch bekannten Farbstoffe geben eine gute Differenzierung; die

anderen färben alle Lipoide, einschließlich der Prälipide, gleichartig orthochromatisch an. Statt Essigsäure kann man zur Einstellung des sauren  $\text{pH}$ -Wertes auch andere organische oder anorganische Säuren verwenden.

Die beschriebene Färbemethode ist mit einigen bekannten Verfahren vergleichbar. Bei der Nilblausulfat-Methode (CAIN 1950) wird in wässriger Lösung gefärbt und nachträglich mit 1% Essigsäure differenziert. Die hier interessierenden Lipoide werden intensiv blau gefärbt, zeigen aber keine Metachromasie, weil Nilblausulfat zu den nicht metachromatischen basischen Farbstoffen gehört. Bei der Einschlußfärbung von FEYRTER (1936, 1942) wird mit Thionin in einer wässrigen Lösung von Weinsäure gefärbt. FEYRTER hebt besonders hervor, daß seine metachromatische Färbung nur „in der spaltförmigen Kammer zwischen Objektträger und Deckglas“ gelingt, nicht aber bei gewöhnlicher Färbung in der Färbewanne. Insofern kann seine Methode nicht mit der unsrigen gleichgesetzt werden. Auch die Einwände von PISCHINGER (1943) gegen die Färbung von FEYRTER stützen sich auf Versuche, die nur bei Einschlußfärbung gelingen. BRANTE (1951, 1952) wandte die Methode erfolgreich bei Untersuchungen über Gargoylismus an. In neuerer Zeit haben WISLOCKY u. SINGER (1950) und NOBÄCK (1954) eine metachromatische Markscheidenfärbung mit Toluidinblau in saurer Lösung verwendet, welche im Prinzip mit unserer Methode übereinstimmt. Sie wurde nur zum Studium normaler Markscheiden und der WALLERSchen Degeneration peripherer Nerven verwendet.

Eine systematische Variierung des  $\text{pH}$ -Wertes der Färbelösung von saurer bis zu alkalischer Reaktion haben wir mit verschiedenen Pufferlösungen durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit gewöhnlichem (nicht kohlensäurefreiem) destilliertem Wasser angesetzt und der  $\text{pH}$ -Wert mit dem Spezial-Indicatorpapier von Merck bestimmt. Es zeigte sich, daß bei gleichbleibendem  $\text{pH}$  der Ausfall der Färbung sehr stark von der Wahl der Pufferlösung abhängig ist. So kann man z. B. mit einem nicht zu verdünnten Essigsäure-Natriumacetat-Puffer, dessen  $\text{pH}$  auf den Wert 5,2 des gewöhnlichen destillierten Wassers eingestellt ist, gute Färbungen bekommen, während destilliertes Wasser ohne Puffer starke Überfärbung gibt. In einem Citronensäure-Natriumcitrat-Puffer desselben  $\text{pH}$ -Wertes fällt hingegen der Farbstoff zum größten Teil aus, so daß diese Kombination als Färbelösung nicht brauchbar ist. Die besten Resultate haben wir mit Mischungen von Essigsäure und Triäthanolamin erhalten, welche bei geeigneter Konzentration im Bereich von  $\text{pH} = 4$  bis 9 gute Färbungen geben (siehe Abschnitt Färbetechnik). Für die Darstellung der Prälipide der Leukodystrophien ist besonders der  $\text{pH}$ -Bereich von 7—9 interessant. Hier werden die Markscheiden blau und die Prälipide gelb gefärbt, und die blaue Zellfärbung ist intensiver als in saurer Lösung. Der bei Färbung in essigsaurer Lösung etwas störende Umstand, daß ein Teil der Prälipide in demselben purpurroten Farbton wie die Markscheiden gefärbt wird, fällt hier weg.

### Lösungsversuche und histochemische Deutung

Um zu einer gewissen chemischen Gruppendifferenzierung zu gelangen, behandelten wir die formalinfixierten Schnitte vor der Färbung mit verschiedenen Lipoidlösungsmitteln.

Schnitte von Leukodystrophien, Fällen von infantiler amaurotischer Idiotie und Normalfällen (Markscheiden) wurden 24 Std bei Zimmertemperatur in das betreffende Lösungsmittel gebracht, dann in Wasser gewaschen und mit Kresylviolett in essigsaurer Lösung gefärbt. In allen Fällen war nach Vorbehandlung mit Aceton allein oder mit Aceton und anschließendem Äther die Färbbarkeit voll erhalten. Andererseits

erhielten wir nach Vorbehandlung mit Pyridin oder Alkohol-Chloroform (3:1) oder 96% bzw. 75% Alkohol nur noch eine zartblaue Zellfärbung, während das Myelin der Markscheiden sowie die Prälimpoide der Leukodystrophien und infantilen amaurotischen Idiotien färberisch nicht mehr dargestellt waren. Sie waren offensichtlich herausgelöst worden.

Aus den eingangs gemachten Angaben über die Löslichkeiten der bekannten Hirnlipoide geht hervor, daß Sphingomyeline, Cerebroside und Ganglioside untereinander so ähnliche Löslichkeiten haben, daß sie durch Lösungsversuche am Schnitt nicht mit Sicherheit voneinander unterschieden werden können und daß ihre gemeinsamen Löslichkeitseigenschaften mit dem Ergebnis der soeben beschriebenen Lösungsversuche übereinstimmen. Wir wissen, daß die rote Markscheidenfärbung sehr wahrscheinlich auf die im Myelin enthaltenen Cerebroside bzw. ihre sauren Schwefelsäureester zurückzuführen ist (WISLOCKY u. SINGER 1950) und daß die Speicherstoffe der infantilen amaurotischen Idiotien in der Hauptsache aus Gangliosiden bestehen (KLENK 1947). Die Prälimpoide der Leukodystrophien könnten also nach ihrer Löslichkeit Glykolipoide sein und somit den Cerebrosiden und Gangliosiden nahestehen; sie könnten aber auch zu den Sphingomyelinen gehören. Das Verhalten der Sphingomyeline gegenüber der sauren Kresylfärbung konnten wir nicht untersuchen, weil uns kein geeignetes Material zur Verfügung stand. Es ist wahrscheinlich, daß sie ungefärbt bleiben, denn BRANTE (1949) hat gezeigt, daß mit der Einschlußfärbung von FEYRTER nur Cerebroside und Ganglioside gefärbt werden, nicht aber Sphingomyeline. Dieser Punkt muß aber noch experimentell geklärt werden. Wenn wir vorläufig Sphingomyeline als unwahrscheinlich außer Betracht lassen, bleibt für die sich metachromatisch braun färbenden Prälimpoide der Leukodystrophien nur noch die Gruppe der Glykolipoide übrig. Ihre Färbbarkeit in saurer Lösung spricht dafür, daß es sich, ähnlich wie bei Cerebrosiden und Gangliosiden, um Glykolipoide mit ausgesprochen sauren Eigenschaften handelt. Die braune Färbung, im Gegensatz zur roten Farbe der Cerebroside und zur blauvioletten Farbe der Ganglioside, deutet allerdings darauf hin, daß eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung zu erwarten ist.

Glykolipoide sind durch eine positive PAS-Reaktion ausgezeichnet, während Sphingomyeline sich nach DREZEL (1954) negativ verhalten. In der Tatsache, daß die Prälimpoide der Leukodystrophien durch die PAS-Färbung gut dargestellt werden, erblicken wir eine Bestätigung dafür, daß es sich nicht um Sphingomyeline, sondern um Glykolipoide handelt.

Es ist verschiedentlich davor gewarnt worden, aus Lösungsversuchen Schlüsse auf die Zusammensetzung von Lipoiden zu ziehen. So hat BRANTE (1949) Lösungsversuche von WEIL an frischen Gehirnen nachgeprüft und dabei unter anderem in der Acetonfraktion bedeutende Mengen von Cerebrosiden gefunden. Hierzu ist zu

bemerken, daß seine Acetonfraktion I größere Mengen von Wasser aus dem frischen Gehirn und seine aus der Acetonfällung des alkoholischen Extraktes stammende Acetonfraktion II entsprechende Mengen Alkohol enthalten haben muß. Nach unseren eigenen Versuchen an formalinfixierten Schnitten hat Aceton-Wasser (3:1) im Gegensatz zu wasserfreiem Aceton dasselbe Lösungsvermögen wie Alkohol. Der Zusatz von Wasser ersetzt gewissermaßen die im wasserfreien Aceton fehlenden freien Hydroxylgruppen. Hierdurch wird das Auftreten von Cerebrosiden in Wasser bzw. Alkohol enthaltenden Acetonfraktionen durchaus erklärlieh. Wir glauben, daß Lösungsversuche bei geeigneter Wahl von Art und Reihenfolge der Lösungsmittel wertvolle Aufschlüsse geben können, zumindest in solchen Fällen, wo es sich nicht um komplizierte Lipoide handelt.

Wir haben zur Beurteilung unserer Lösungsversuche nicht nur die Kresylfärbung, sondern auch die Färbung mit PAS und Sudanschwarz B herangezogen. In allen Fällen, wo die Kresylfärbung nach Vorbehandlung mit Lösungsmitteln eindeutig negativ war, gaben PAS und Sudanschwarz B eine zwar abgeschwächte, aber noch deutliche Färbung. Dies gilt mit gewissen quantitativen Unterschieden für die Prälipide der Leukodystrophien und der infantilen amaurotischen Idiotien und für die Markscheiden. Ähnliche Beobachtungen sind von NOBACK u. MONTAGNA (1952) und DIEZEL (1954) beschrieben worden. In diesen Fällen zeigt also die Kresylfärbung eine größere Spezifität als PAS oder Sudanschwarz B. Es bleibt indessen noch die Frage offen, ob außer den durch die Kresylfärbung darstellbaren löslichen Lipoiden noch andere, sehr schwer lösliche, vorhanden sind, wofür die noch nach der Anwendung von Lipidlösungsmitteln positiv bleibenden PAS- und Sudanschwarz-B-Färbungen sprechen könnten.

### Histopathologische Ergebnisse

Wir konnten 8 Fälle von Leukodystrophie mit prälipoidem Abbau untersuchen. Charakteristisch war überall das Fehlen von Cholesterinestern, welche — wie früher u. a. von VAN BOGAERT u. SCHOLZ (1932) und WICKE (1938) beschrieben — höchstens vereinzelt im adventitiellen Raum gefunden wurden, und das reichliche Auftreten von Prälipoiden, die sich mit der Kresylmethode metachromatisch braun bis purpurn anfärbten. Die Prälipide waren in gliogenen Körnchenzellen granulär gespeichert. Oft waren diese prälipoidbeladenen Körnchenzellen in der Umgebung von Gefäßen besonders dicht gelagert und von rein brauner Farbe, während sie außerhalb dieser Bereiche zwischen erhaltenen Markscheiden eingelagert waren und auch ihre Färbung alle möglichen Übergänge von braun bis zur Purpurfarbe der Markscheiden zeigte. Die einzelnen Fälle variierten von vollständiger Entmarkung mit massenhaftem Auftreten rein brauner Prälipide bis zu mäßiger Auflockerung der Markscheiden und vorwiegend purpurnen Prälipoiden. Die U-Fasern waren immer mehr oder minder gut erhalten.

EINARSON (1938, 1942) unterscheidet zwischen Leukodystrophien mit metachromatischen und solchen mit prälipoiden (nicht metachromatischen) Abbauprodukten. Wir haben die beschriebene metachromatische Färbung der Prälipide in allen von uns untersuchten Fällen gefunden. Darunter befanden sich auch die als typisch für prälipoiden Abbau geltenden Fälle von VAN BOGAERT u. SCHOLZ (1932), SCHOLZ (1933), VAN BOGAERT u. BERTRAND (1933) und WICKE (1938). Wir glauben daher, daß die in der Literatur teils als prälipoid, teils als metachromatisch beschriebenen Substanzen, die sich topographisch entsprechen, identische Stoffe sind, deren Identität nur durch die Verschiedenheit der angewandten Methoden nicht immer nachweisbar war.

In allen Fällen von Leukodystrophie fanden wir auch in den *Ganglienzellen* bestimmter Kerngebiete ein braun metachromatisches Lipoid, welches sich in seinen färberischen und Löslichkeitseigenschaften genau so verhielt wie die braun metachromatischen Prälipide in den Entmarkungsgebieten. Prädilektionsstelle für diese granuläre Speicherung in den Ganglienzellen war der Nucl. dentatus. Gelegentlich sah man sie auch in den Brückenkernen, im Nucl. ambiguus, in den Oliven, im Thalamus und im Pallidum. Wichtig scheint uns, daß diese braun metachromatischen Speicherstoffe in den Ganglienzellen auch derjenigen Fälle gefunden wurden, bei denen man innerhalb des Marklagers nur vereinzelt braun metachromatische Lipoide fand. Eine derartige Speicherung in den Ganglienzellen bei Leukodystrophie ist schon mehrfach beschrieben worden, insbesondere von NISSL (1910), WITTE (1921), WICKE (1938), VAN BOGAERT u. DEWULF (1939), CABDONA (1939), NORMAN (1947), BRAIN u. GREENFIELD (1950), LESLIE (1952). Wir glauben, daß die Speicherung braunmetachromatischer Lipoide in den Ganglienzellen bestimmter Kerngebiete eine regelmäßige Begleiterscheinung der braunmetachromatischen Lipoide ist, welche im Marklager meist im Inneren von Gliazellen gefunden werden. Eine Lipoidspeicherung in Ganglienzellen ist bislang nur von den Lipoidosen her bekannt. Wir pflichten daher der Auffassung von NORMAN bei, der — wie früher schon WICKE — eine Annäherung der Leukodystrophien an die Lipoidosen befürwortet.

Bei Vergleichsuntersuchungen an 4 Fällen von Morbus SCHILDERS, 3 VAN BOGAERTSchen Leukoencephalitiden, 2 konzentrischen und zahlreichen multiplen Sklerosen, sowie 15 Fällen von Ödemnekrosen, lobären Sklerosen, Koagulationsnekrosen, involutiven Entwicklungen mit reichlich Lipofuscin, Myoklonusepilepsie, narbigen Myelinisierungen wie Status marmoratus und Normalfällen verschiedener Altersstufen konnten wir bei Kresylfärbung niemals eine braune Metachromasie finden. Bei den entzündlichen Entmarkungsprozessen war der Abbau der Markscheiden ähnlich wie bei jeder Erweichung von der Bildung

von Cholesterinestern begleitet, die bei Scharlach-PAS-Färbung deutlich zu erkennen waren.

Die *Leukodystrophien vom Globoidzelltyp* verhalten sich bei Färbung mit Kresylviolett ganz anders als die Leukodystrophien mit prälipoidem Abbau. Bei zwei untersuchten Fällen konnten wir keinerlei braunmetachromatische Prälipoide finden. Die Globoidzellen werden gut dargestellt und zwar im selben Farbton wie die Zellfärbung. Durch Vorbehandlung mit den im vorigen Abschnitt genannten Lösungsmitteln wird der Ausfall der Färbung nicht beeinflußt. Es sind also weder in den Globoidzellen, noch in den Ganglien- oder Gliazellen feststellbare Mengen solcher Lipoide gespeichert, welche durch die saure Kresylfärbung dargestellt werden können. Bei Anwendung von PAS oder Sudanschwarz B oder der gekoppelten Tetrazoniumreaktion wurden aber die Globoidzellen deutlich gefärbt. Wir möchten aus diesem Tatbestand vorläufig noch keine Folgerungen bezüglich der in den Globoidzellen enthaltenen Stoffe ziehen. Wir beschränken uns auf die Feststellung, daß der Globoidzelltyp der Leukodystrophien sich vom prälipoiden Typ nicht nur morphologisch, sondern auch histochemisch sehr deutlich unterscheidet.

Zum Schluß soll noch erwähnt werden, daß wir vor kurzem einen Fall von diffuser Sklerose untersucht haben, der auch bei eingehender Untersuchung keinerlei entzündliche Veränderungen aufwies. Er zeigte aber keine braune Metachromasie, sondern typisch sudanophile Abbauprodukte, vorwiegend als Cholesterinester. Man muß also wohl mit der Möglichkeit rechnen, daß es eine Form der degenerativen Entmarkungskrankheiten gibt, bei welcher der Markscheidenabbau den normalen Weg über Cholesterinester geht.

### Färbetechnik

Zum Färben werden Gefrierschnitte von formalinfixiertem Material verwendet. Die Schnitte werden unaufgezogen gefärbt und nach dem Aufziehen sofort eingedeckt, ohne sie mit Fließpapier abzutrocknen oder sie sonst an trocknen zu lassen.

*Sudanrot-PAS.* Schnitte aus Wasser über Glykol-Wasser (1:1) und Glykol in folgende Färbelösung bringen:

Glykol	90 cm <sup>3</sup>
Diglykol	10 cm <sup>3</sup>
Sudanrot B (oder Scharlach R)	0,01 g

Der Farbstoff wird durch Erwärmen auf etwa 100° C gelöst und gibt eine klare Lösung, welche bei Zimmertemperatur gesättigt ist. 10 min bei 60° C färben, auf Zimmertemperatur abkühlen und in dest. Wasser waschen. Zur PAS-Gegenfärbung 5 min in eine 0,5% wäßrige Lösung von Perjodsäure ( $HJ_4 \cdot 2H_2O$ ) bringen, in dest. Wasser waschen, 15 min in SCHIFFScher Lösung färben, je 5 min in drei durch Mischen von 5 cm<sup>3</sup> n-HCl, 5 cm<sup>3</sup> 10% Natriumpyrosulfatlösung und 90 cm<sup>3</sup> dest. Wasser frisch hergestellten Waschbädern waschen und in dest. Wasser spülen.

Eindecken in wasserfreiem Glycerin ( $d = 1,26$ ). Präparat beschweren und das überschüssige Glycerin in laufendem Wasser abwaschen. Umranden mit Paraffin oder besser mit folgendem schnell trocknendem Lack:

Chlorbenzol	20 cm <sup>3</sup>
Colophonium, hell	8 g
Polyvinylbutyral <sup>1</sup>	2 g

Herstellung der SCHIFFSchen Lösung: 10 cm<sup>3</sup> n-HCl, 5 cm<sup>3</sup> 10% Natriumpyrosulfatlösung und 85 cm<sup>3</sup> dest. Wasser mischen und 0,2 g basisches Fuchsin (Pararosanilin) zufügen. Durch Stehen über Nacht löst sich das Fuchsin zu einer hellgelben Lösung, die durch Zugabe von etwas Aktivkohle und Filtrieren vollständig farblos wird. Lösung im Dunkeln aufbewahren.

Zum Einschließen verwenden wir statt Glycerin auch das früher beschriebene Glycerin-Phthalsäure-Einschlußmittel (v. HIRSCH u. HAGER 1955). Es hat den Vorteil, daß der Schnitt besser aufgehellt wird und daß in den vollständig entmarkten und daher ungefärbten Gebieten die Gliazellen und -fasern im Phasenkontrastbild besser zu erkennen sind. Umranden wie oben.

*Sudanschwarz B.* Schnitte aus Wasser über Glykol-Wasser (1:1) und Glykol in folgende Färbelösung bringen:

Glykol	100 cm <sup>3</sup>
Sudanschwarz B	0,05 g

Der Farbstoff wird durch Erwärmen auf etwa 100°C gelöst und gibt eine bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung. 10 min bei 60° färben, auf Zimmertemperatur abkühlen und in dest. Wasser waschen. Eindecken nur in wasserfreiem Glycerin, Umranden wie oben.

*Kresylviolett.* 10 min bei 60° in folgenden Lösungen färben, auf Zimmertemperatur abkühlen und in dest. Wasser waschen. Eindecken nur in wasserfreiem Glycerin, Umranden wie oben.

Kresylviolett	0,02 g
1% Essigsäure	100 cm <sup>3</sup>

*Gepuffertes Kresylviolett.* Durch Änderung des Konzentrationsverhältnisses Eisessig/Triäthanolamin wird der pH-Wert der Färbelösung verändert. Durch Änderung der absoluten Konzentration von Eisessig und Triäthanolamin — bei gleichbleibendem Konzentrationsverhältnis und gleichbleibender Farbstoffkonzentration — ändert sich die Färbekraft der Lösung und zwar so, daß eine Erhöhung der Konzentration eine Abnahme der Färbekraft bewirkt. Folgende Tabelle gibt die Zusammensetzung einiger bewährter Färbelösungen. Nach obigen Gesichtspunkten kann man nach Bedarf sinngemäße Abänderungen vornehmen.

*Tabelle 3*

	pH	4	5	7	9
Lösung A	cm <sup>3</sup> Aqua dest.	94	85	85	90
	cm <sup>3</sup> Eisessig	6	15	15	10
	g Kresylviolett	0,04	0,04	0,04	0,04
Lösung B	cm <sup>3</sup> Aqua dest.	98	85	70	60
	cm <sup>3</sup> Triäthanolamin	2	15	30	40

<sup>1</sup> Pioloform BL, Dr. Alexander Wacker GmbH, München.

Die Lösungen A und B werden getrennt hergestellt. Dann wird Lösung B in Lösung A gegossen (nicht umgekehrt), kurz durchgeschüttelt und nicht filtriert. Die Färbelösungen sind haltbar und können mehrfach verwendet werden. Nur die auf  $\text{pH} = 9$  eingestellte Lösung hält sich nicht und ist stets frisch anzusetzen. Sollte sich mit der Zeit ein Farbstoffniederschlag bilden, so wird er nicht abfiltriert, sondern durch Erwärmen auf etwa  $60^\circ \text{C}$  wieder aufgelöst. Färben, Eindecken und Umrunden wie oben. Ergebnis der Färbung:

$\text{pH 4}$ : Ähnlich wie bei der Färbung in 1% Essigsäure. Die Färbung ist aber intensiver und kann mit Vorteil angewendet werden bei Schnitten, die sich schlecht anfärben. Bei sehr altem Formolmaterial färben sich manchmal insbesondere die Markscheiden schlecht an, obwohl sie erhalten sind. In diesen Fällen findet man regelmäßig in großer Menge die u. a. von **TEBELIS** (1938) beschriebenen, stark doppelbrechenden sogenannten Fettplaques. Ihr Auftreten scheint nicht nur von der Dauer, sondern auch von der Art der Fixierung — z. B. Verwendung nicht neutralen Formols — abzuhängen.

$\text{pH 5}$ : Bei Fällen von Leukodystrophie sind die Prälimpoide gut gefärbt, bei sehr schwacher Färbung der Markscheiden.

$\text{pH 7—9}$ : Schöne zarte Färbungen. Markscheiden blau, Prälimpoide der Leukodystrophien gelb, Ganglienzellen gut gefärbt. Besonders hervorzuheben ist, daß bei astocytärer Glia die Kerne, Plasmaleiber und Fasern sehr schön angefärbt werden, was im sauren Bereich nicht der Fall ist. Gespeicherte Lipoide bei amaurotischer Idiotie werden meist im sauren Bereich besser dargestellt.

### Zusammenfassung

Einer Übersicht über die chemische Zusammensetzung der Markscheidenlipoide folgt die Angabe von Färbemethoden, die bei einfacher Anwendbarkeit neben der Beurteilung der Gewebsverhältnisse auch gewisse Aussagen über die chemische Gruppenzugehörigkeit der sogenannten Prälimpoide der Leukodystrophien und Lipoidosen erlauben. Das Ergebnis dieser Methoden spricht gegen die Berechtigung einer Unterscheidung prälimpoider von metachromatischen Leukodystrophieformen. Die mit Bildung von Globoidzellen einhergehende Form unterscheidet sich morphologisch und histochemisch von den metachromatischen Leukodystrophien.

### Literatur

- ALZHEIMER**, A.: Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe. Nissl-Alzheimer Arbeiten **3**, 521 (1910). — **ASCHOFF**, L.: Zur Morphologie der lipoiden Substanzen. Zieglers Beitr. **47**, 1 (1901). — **VAN BOGAERT**, L., et J. **BERTRAND**: Les leucodystrophies progressives familiales. Rev. neur. **1933/II**, 251. — **VAN BOGAERT**, L., and A. **DEWULF**: Diffuse progressive leucodystrophy in the adult with production of metachromatic degeneration products. Arch. Neur. (Am.) **42**, 1083 (1939). — **VAN BOGAERT**, L., u. W. **SCHOLZ**: Klinischer, genealogischer und pathologisch-anatomischer Beitrag zur Kenntnis der familiären diffusen Sklerose. Z. Neur. **141**, 510 (1932). — **BRAIN**, W. R., and J. G. **GREENFIELD**: Late infantile metachromatic Leucoencephalopathy with primary degeneration of the interfascicular oligodendroglia. Brain **73**, 291 (1950). —

BRANTE, G.: Gargoylismus als Lipoidose. *Fette u. Seifen* **53**, 457 (1951). — Gargoylismus — a Mucopolysaccharidosis. *The Scandinav. J. of Clin. a. lab. Invest.* **4**, 43 (1952). — Studies on lipids in the nervous system with special reference to quantitative chemical determination and topical distribution. *Acta physiol. Scandinav.* (suppl. 63) **18**, 1 (1949). — CAIN, A. J.: The histochemistry of lipoids in animals. *Biol. Rev. of Camb. Philos. Soc.* **25**, 73 (1950). — CARDONA, F.: Istopatologia della malattia di SCHILDER familiare. *Rivista de Patologia nervosa e mentale* **54**, 1 (1939). — CUMINGS, J. N.: The cerebral lipids in disseminated sclerosis and amaurotic family idiocy. *Brain* **76**, 551 (1953). — DIEZEL, P. B.: Histochemicaler Nachweis des Gangliosids in Ganglien und Gliazellen bei amaurotischer Idiotie und Isolierung der lipoidspeichernden Zellen nach der Methode von M. BEHRENS. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **171**, 344 (1954). — Histochemische Untersuchungen an primären Lipoidosen: Amaurotische Idiotie, Gargoylismus, NIEMANN-PICKSche Krankheit, GAUCHERSche Krankheit, mit besonderer Berücksichtigung des Zentralnervensystems. *Virchows Arch.* **326**, 89 (1954). — Histochemische Untersuchungen an den Globoidzellen der familiären infantilen diffusen Sklerose vom Typus KRABBE. *Virchows Arch.* **327**, 206 (1955). — EINARSON, L., u. A. V. NEEL: Beitrag zur Kenntnis sklerosierender Entmarkungsprozesse im Gehirn, mit besonderer Berücksichtigung der diffusen Sklerose. *Acta Jutlandica* **10**, 2 (1938). — Contribution to the study of diffuse brain sclerosis with a comprehensive review of the problem in general and a report of two cases. *Acta Jutlandica* **14**, 2 (1942). — FEYTER, F.: Über ein sehr einfaches Verfahren der Markscheidenfärbung, zugleich eine neue Art der Färberei. *Virchows Arch.* **296**, 645 (1936). — Über chromotrope Lipoide und Lipoproteide. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **51**, 610 (1942). — v. HIRSCH, TH., u. H. HAGER: Über die kombinierte Anwendung von Phasenkontrast- und Polarisationsbild in der Histopathologie des Zentralnervensystems. *Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur.* **193**, 146 (1955). — JOHNSON, A. C., A. R. McNABB and R. J. ROSSITER: Lipids of normal brain. *Biochem. J.* **43**, 573 (1948). — Lipids of peripheral nerve. *Biochem. J.* **43**, 578 (1948). — Concentration of lipids in the brain of infants and adults. *Biochem. J.* **44**, 494 (1949). — Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian degeneration: I. Lipids. *Biochem. J.* **45**, 500 (1949). — Chemistry of Wallerian degeneration. *Arch. of Neur.* **64**, 105 (1950). — KAISERLING, C.: Nachweis, Vorkommen und Bedeutung der Zell-Lipoide. *Klin. Wschr.* **1910**, 2156. — KAWAMURA, R.: Die Cholesterinesterverfettung. *Jena* **1911**. — KLENK, E.: NIEMANN-PICKSche Krankheit und amaurotische Idiotie. *Z. physiol. Chem.* **262**, 128 (1939). — Über die Verteilung der Neuraminsäure im Gehirn bei der familiären amaurotischen Idiotie und bei der NIEMANN-PICKSchen Krankheit. *Z. physiol. Chem.* **282**, 84 (1947). — Die Lipoide im chemischen Aufbau des Nervensystems. *Naturwissenschaften* **40**, 449 (1953). — LESLIE, D. A.: Diffuse progressive metachromatic Leucoencephalopathy. *J. of Path.* **64**, 841 (1952). — LETTERER, E.: Über Zunahme des Gehirns an Phosphatiden während des Wachstums. Ein Vergleich chemisch-analytischer und histochemisch-färberischer Methodik. *Verh. dtsch. path. Ges.* **30**, 183 (1937). — LISON, L.: *Histochemie et Cytochimie animales*. Paris 1953. — NISSL, F.: in *Enzyklopädie d. mikr. Technik*, 2. Auf. Berlin 1910. Art. Nervensystem, S. 284. — NOBACK, C. R.: Metachromasia in the nervous system. *J. of Neuropath.* **13**, 161 (1954). — NOBACK, C. R., and W. MONTAGNA: Histochemical studies of the myelin sheath and its fragmentation products during Wallerian degeneration. *J. Comp. Neur.* **97**, 211 (1952). — NORMAN, R. M.: Diffuse progressive metachromatic leucoencephalopathy: A form of SCHILDER's disease related to the lipoidoses. *Brain* **70**, 234 (1947). — PISCHINGER, A.: Der Formaldehyd als Ursache für die besonderen Erscheinungen bei der Einschlußfärbung (FEYTER). *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **53**, 46 (1943). — SCHOLZ, W.: Über Wesen, nosologische und pathogenetische Bedeutung der atypischen Abbauvorgänge bei den familiären

104 v. HIRSCH u. PEIFFER: Differentialdiagnose von Leukodystrophien u. Lipoidosen

Markerkrankungen. *Msch. Psychiatr.* **86**, 111 (1933). — *TEBELIS*, F.: Über Fixierungsartefakte im Zentralnervensystem. *Z. Neur.* **162**, 767 (1938). — *WICKE*, R.: Ein Beitrag zur Frage der familiären diffusen Sklerosen einschließlich der *PELZÄUS-MERZBACHERSchen* Krankheit und ihrer Beziehung zur amaurotischen Idiotie. *Z. Neur.* **162**, 741 (1938). — *WISLOCKY*, G., and M. *SINGER*: The basophilic and metachromatic staining of myelin sheaths and its possible association with a sulfatide. *J. Comp. Neurol.* **92**, 71 (1950). — *WITTE*, F.: Über pathologische Abbauvorgänge im Zentralnervensystem. *Münch. med. Wschr.* **1921**, 69.

Dr. THEO VON HIRSCH, Dr. JÜRGEN PEIFFER, München 23, Kraepelinstr. 2