

Assoc. **36**, 46 (1960). — 13. LUSHBOUGH, C. H., B. S. HELLER, E. WEIR, B. S. SCHWEIGERT, J. Amer. dietet. Assoc. **40**, 35 (1962). — 14. MEYER, J. A., E. J. BRISKEY, W. G. HOEKSTRA und K. G. WECKEL, Food Technol. **17**, 119 (1963). — 15. COVER, S., E. M. DILSAVER, R. M. HAYS und W. H. SMITH, J. Amer. dietet. Assoc. **25**, 949 (1949). — 16. FENTON, F. und R. S. HARRIS in: Nutritional Evaluation of Food Processing. S. 391 (New York und London 1960). — 17. STROHECKER, R. und H. M. HENNING, in: Vitaminbestimmungen, S. 68 (Weinheim 1963). — 18. PYKE, M., Biochem. J. **34**, 1341 (1940). — 19. HEINEMANN, W. W., M. E. ENSMINGER, T. C. CUNHA und E. C. MCULLOCH, J. Nutrit. **31**, 107 (1946). — 20. MILLER, D. C. und SAMULE H. WOKK, J. Animal Sci. **5**, 350 (1946). — 21. HARTZLER, E., W. ROSS und E. L. WILLET, Food Res. **14**, 15 (1949). — 22. RICE, E. E., M. E. DALY, J. F. BEUK und H. E. ROBINSON, Arch. Biochemistry **7**, 239 (1945). — 23. KUNKEL, W., Z. Ernährungswiss. **6**, 39 (1965). — 24. KUNKEL, W., Z. Ernährungswiss. **6**, 84 (1965).

Anschrift des Verfassers:

Dr. W. KUNKEL, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität des Saarlandes,  
6650 Homburg/Saar

*Aus dem Physiologisch Chemischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)*

## **Histochemische Untersuchungen über Lipidablagerungen in Rattenorganen nach der Verfütterung von dimeren Fettsäuren**

Von W. GRIEM

Mit 1 Abbildung und 2 Tabellen

(Eingegangen am 10. Mai 1966)

In Fortführung unserer Untersuchungen über die Verträglichkeit von unbehandelten und behandelten Fetten untersuchten wir auch die Wirkung von dimeren Fettsäuren auf den Organismus, die ein charakteristisches Reaktionsprodukt bei der Hitzepolymerisierung von Fetten sind. In dieser Arbeit wollen wir unsere histochemischen Untersuchungsergebnisse über die nach der Verfütterung dimerer Fettsäuren nachgewiesenen Lipidablagerungen bekanntgeben.

Die Versuchsratten erhielten in einem langfristigen Fütterungsversuch, der insgesamt 32 Wochen dauerte, 5% dimere Fettsäuren, während die Kontrolltiere 5% eines raffinierten, unbehandelten Sojaöles zur Grundkost bekamen. Bei den physiologischen Untersuchungen, über die CZOK, GRIEM, KIECKEBUSCH, BÄSSLER und LANG (1964) berichteten, zeigten die Versuchsratten gegenüber den Kontrolltieren Wachstumsverzögerungen, verschlechterte Futtereffizienz, Verschlechterung des Grundumsatzes, Senkung der Körpertemperatur und Störungen der Leberfunktion. FRICKER, SCHÄFFNER und LANG (1964) stellten bei biochemischen Untersuchungen fest, daß eine Verfütterung von dimeren Fettsäuren eine Erniedrigung des Gesamtfettgehaltes der Tiere und eine Änderung der Fettsäurezusammensetzung des Körperfettes bewirkt. Außerdem wird ein sehr geringer Anteil der verfütterten Säuren in das Körperfett eingebaut.

### Methoden

Die Organe der mit Äther getöteten Tiere wurden in 5%igem neutralem Formalin fixiert. Von ihnen wurden Gefrier- und Paraffinschnitte angefertigt. Die durchgeführten Färbemethoden, histochemischen Reaktionen und Löslichkeitsuntersuchungen sind aus den Tab. 1 und 2 zu entnehmen.

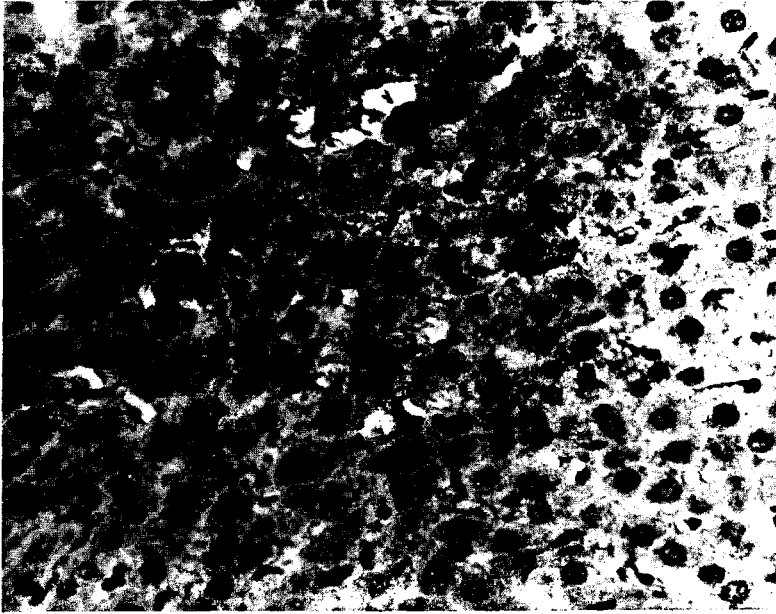


Abb. 1. Lipidablagerungen in den KUPFFERSchen Sternzellen der Leber von Ratten nach einer langfristigen Verfütterung von dimeren Fettsäuren. Die auf der Abbildung als schwarze Körnchen wiedergegebenen Ablagerungen füllen teilweise das gesamte Cytoplasma der KUPFFERSchen Sternzellen aus (Färbung: Hämatoxylin; Vergr. etwa 300fach)

### Ergebnisse

Bei den mikroskopischen Untersuchungen der Organe ließen sich in den Lebern, Nieren, Milzen und Herzen keine entzündlichen oder degenerativen Veränderungen feststellen. Jedoch ist im Lebergewebe der mit der Dimerenfraction gefütterten Tiere bei den männlichen und weiblichen Tieren ein Pigment nachweisbar. Es liegt vornehmlich im Cytoplasma der KUPFFERSchen Sternzellen (Abb. 1), jedoch kann man es auch in den Bindegewebszellen der GLISSONschen Dreiecke und in den Endothelzellen der Kapillaren und größeren Gefäße finden. Die Pigmentablagerungen konnten wir ferner in den Nieren, Milzen und in der Herzmuskulatur nachweisen. In den Nieren liegen sie als kleine kugelige Körperchen im Cytoplasma der Zellen der Tubuli contorti I, sowie in den umgebenden Bindegewebszellen größerer Gefäße, teilweise auch in deren Endothelzellen. Auch in der Herzmuskulatur können die Pigmentkörnchen in den Endothelzellen der Gefäße und im Cytoplasma an den Kernpolen nachgewiesen werden. In den Milzen findet man die Pigmente in den Retikulumzellen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe sind keine Pigmentablagerungen in den Organen festgestellt worden.

Bei der histologischen Untersuchung der Hoden zeigten die Organe der Tiere der Dimerengruppe eine starke Störung der Spermiogenese. In den Samenkanälchen lagen lediglich Spermiogonien und Spermiozyten. Dagegen fanden sich in den Samenkanälchen der Kontrollgruppe unzählige, vollausgereifte Spermien.

*Tabelle 1.* Färberisches Verhalten und histochemische Eigenschaften von Lipidmaterial das nach der Verfütterung dimerer Fettsäuren an Ratten in den Zellen des RES abgelagert wurde

Methode	Ergebnis
Eigenfarbe	braun-dunkelbraun
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	braun
Azan-Färbung	braun
Van Gieson-Färbung	braun
Eigenfluoreszenz, UV-Licht	grün
Eigenfluoreszenz, Blaulicht	gelbgrün
Untersuchung im polarisierten Licht	doppelbrechend
Turnbullblau-Reaktion	blau
Berlinerblau-Reaktion	negativ
Reaktion auf Kupfer	negativ
Reaktion auf $\text{PO}_4$	negativ
Ninhydrin-Reaktion	negativ
MILLONSche Reaktion	negativ
PAS-Reaktion (HOTCHKISS)	rötlich
PAS-Reaktion nach Acetylierung	rötlich
PAS-Reaktion nach Entacetylierung	rötlich
Perameisensäure-Leukofuchsin-Reaktion	rötlich
Reaktion mit SCHIFFSchem Reagenz	negativ
Färbung mit Sudan III	braun
Färbung mit Scharlachrot	braun
Färbung mit Scharlachrot, nach Oxalsäurebehandlung	rot
Färbung mit Nilblau	z. T. blau
Färbung mit Sudanschwarz	schwarz
Lipoidfärbung nach FEYTER	z. T. rötlich
Seifennachweis (MEYER-BRUNOT) mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}$	braun
Seifennachweis (MEYER-BRUNOT) mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	gelb
Seifennachweis (OKAMOTO, NEDA und KATO)	rötlich

Bei den histologischen Untersuchungen zeigten die Pigmentablagerungen eine braune bis dunkelbraune Eigenfarbe. Die größeren Schollen des Pigmentes nahmen im Gegensatz zu den kleinsten Pigmentkörnern bei der Färbung der Präparate mit Scharlachrot und Sudan III den Farbstoff nicht an. Erst nach der Vorbehandlung der Schnitte mit Säuren, die eine Abspaltung des anorganischen Anteils bewirken, ließen sich auch die größeren Lipidschollen mit

Scharlachrot anfärben. Mit Nilblau konnten ebenfalls nur die kleineren Pigmentkörnchen angefärbt werden. Jedoch zeigten sämtliche Ablagerungen nach der Färbung der Präparate mit Sudanschwarz einen intensiven schwarzen Farbton. Hervorzuheben ist noch, daß die Pigmente erst nach einer Säurevorbehandlung fluoreszierten. Ferner fielen die Ninhydrin- und die MILLONsche Reaktion negativ aus. Als anorganischer Anteil wurde in den Lipidablagerungen lediglich Eisen nachgewiesen. Die durchgeführten histochemischen Reaktionen zum Nachweis von Seifen waren positiv. Eine Übersicht über die färberischen und histochemischen Eigenschaften gibt die Tab. 1 wieder.

Tabelle 2. Die Löslichkeit von Lipidmaterial in Säuren, Laugen und Fettlösungsmitteln, das nach der Verfütterung dimerer Fettsäuren an Ratten in den Zellen des RES abgelagert wurde

Lösungsmittel	Länge der Einwirkungszeit in Std.	Temperatur in °C	Löslichkeit
Pyridin	24	20	+++++
Alkohol	24	60	++++
Äther-Chloroform	24	60	++++
Chloroform-Alkohol	24	60	++++
1 n HCl	24	20	+
2 n HCl	24	20	+
1 n HNO <sub>3</sub>	24	20	+
3 n CH <sub>3</sub> COOH	24	20	+
1/10 n NaOH	2	20	+++
1/10 n KOH	2	20	+++
1 n HNO <sub>3</sub> + 1/10 n NaOH	24 u. 2	20	+++++
1 n HNO <sub>3</sub> + 1/10 n KOH	24 u. 2	20	+++++
2 n HCl + 1/10 n NaOH	24 u. 2	20	+++++
2 n HCl + 1/10 n KOH	24 u. 2	20	+++++

Zeichen für die Löslichkeit: + = schlecht ↔ +++++ = gut

Das Verhalten der Pigmente bei einer Behandlung der histologischen Präparate in Säuren, Laugen und Fettlösungsmitteln ist aus der Tab. 2 zu entnehmen. Interessant ist, daß diese Pigmente im Gegensatz zu den Lipidablagerungen, die nach der Verfütterung von autoxydierten und bestrahlten Fetten bei unseren Ratten auftraten, leicht mit Fettlösungsmitteln aus dem histologischen Schnitt zu entfernen waren. Sie zeigten aber auch, wie die anderen Lipidablagerungen, bei der kombinierten Säure-Lauge-Behandlung die größte Löslichkeit, während durch eine alleinige Säuren- oder Laugenbehandlung die Löslichkeit nur schlecht bis mittelgradig war.

### Besprechung der Befunde

Aus den Untersuchungsergebnissen ist zu entnehmen, daß dimere Fettsäuren vom Organismus schlecht in den Stoffwechsel eingebaut werden können,

d. h. nur teilweise zur Energiegewinnung ausgenutzt werden. Aus diesem Grunde findet man bei der histologischen Untersuchung der Organe nach langfristiger Verfütterung in den Zellen des RES und in Orgazellen Lipidablagerungen, die auch als exogene Pigmente zu bezeichnen sind. Sie enthalten, wie die histochemischen Reaktionen zeigen, einen organischen und einen anorganischen Anteil. Die organischen Substanzen lassen sich mit Fettfarbstoffen gut anfärben. Besonders leicht gelingt die Fettanfärbung nach der Abspaltung des anorganischen Anteils mit Hilfe von Säuren. Der positive Ausfall der PAS-Reaktion nach der Azetylierung und der Perameisensäure-Leukofuchsin-Reaktion deutet an, daß der organische Anteil aus ungesättigten Fettsäuren besteht. Als anorganischen Anteil haben wir nur Eisen nachweisen können. Wir nehmen an, daß die Fettsäuren sich im Organismus mit dem Eisen verbinden, und daß die Pigmente als metallseifenähnliche Verbindungen aufzufassen sind. Unsere Annahme stützt sich auf unsere Löslichkeitsversuche, in denen wir Säuren, Laugen und Fettlösungsmittel bei bestimmten Temperaturen und nur kurze Zeit auf die Pigmente einwirken ließen. So sind z. B. durch die alleinige Einwirkung von Laugen die Pigmente in kurzer Zeit nur schwer aus den histologischen Schnitten zu entfernen. Die Löslichkeit der Lipidablagerungen erhöht sich aber beträchtlich, wenn man im wäßrigen Milieu die Schnitte zuerst mit Säuren behandelt und so das Eisen aus den Pigmenten entfernt. Der zurückbleibende Fettanteil ist danach leicht mit KOH oder NaOH verseifbar. Diese Seifen sind aber im Gegensatz zu Metallseifen wasserlöslich und lassen sich gut aus den Schnitten extrahieren. Unsere Annahme, daß es sich bei den Pigmenten um Metallseifen handelt, wird auch durch die positiven Reaktionen der Seifennachweise bekräftigt. Zwar dienen diese Reaktionen in erster Linie zur histochemischen Darstellung freier Fettsäuren, man kann sie aber auch zum Nachweis von Seifen benutzen. Hierbei nutzt man die chemische Eigenschaft von Seifen aus, die leicht mit Schwermetallen Verbindungen eingehen. Bei den ursprünglichen Reaktionen werden zuerst die freien Fettsäuren an Calcium gebunden und so in unlösliche Kalkseifen überführt. In einer zweiten Reaktion entfernt man das Calcium mit Hilfe von Blei- oder Kupfersalzen und erhält dadurch unlösliche Metallseifen. Der Metallanteil wird dann durch bestimmte Reaktionen sichtbar gemacht. Mit den Pigmenten haben wir einerseits die Originalmethoden angewendet, andererseits haben wir sie sofort mit Blei- oder Kupferniträt zusammengebracht. Bei sämtlichen Reaktionen war der gleiche Erfolg zu beobachten und die Schwermetalle lagerten sich schon bei Zimmertemperatur an die Pigmente an. Wir können daher aufgrund der histochemischen Reaktionen und der Löslichkeitsuntersuchungen, ähnlich wie bei früheren Untersuchungen (GRIEM 1963) sagen, daß die von uns beobachteten Pigmente in den Zellen des RES als eisenhaltige Metallseifen aufzufassen sind. Aus diesem Grunde erklärt sich auch ihre Unlöslichkeit im Säugetierorganismus.

Zusammenfassend kann man aufgrund unserer bisher durchgeführten Versuche sagen, daß dimere Fettsäuren für den Säugetierorganismus schädlich sind. Neben den klinischen Erscheinungen (Wachstumsverzögerungen, verschlechterter Futtereffizienz, Verschlechterung des Grundumsatzes, Senkung der Körpertemperatur, Störung der Leberfunktion) finden sich bei den pathologisch-histologischen Untersuchungen der männlichen Tiere noch deutliche Störungen der Spermiogenese, und bei sämtlichen Ratten lassen sich außerdem

in den Organen Lipidablagerungen nachweisen. Diese liegen in den Zellen des RES und in Organzellen. Die Befunde der durchgeführten Reaktionen und der Löslichkeitsuntersuchungen besagen, daß es sich bei diesen abnormen Pigmenten um Metallseifen handelt. Dies erklärt die schwere Löslichkeit und damit die Ablagerung in den Organen.

### *Zusammenfassung*

Die langfristige Verfütterung dimerer Fettsäuren ist für Ratten schädlich. Das bei den Tieren in den Zellen des RES und Organzellen gefundene Pigment verhält sich bei den durchgeführten histochemischen Reaktionen und bei Löslichkeitsuntersuchungen wie Metallseifen.

### *Literatur*

1. CZOK, G., W. GRIEM, W. KIECKEBUSCH, K. H. BÄSSLER und K. LANG, Z. Ernährungswiss. 5, 80 (1964).
2. FRICKER, A., E. SCHÄFFNER und K. LANG, Ernährungswiss. 5, 1 (1964).
3. GRIEM, W., Virch. Arch. 336, 592 (1963).

## TAGUNGSBERICHTE

### **Bericht über die Stärke-Tagung der Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung e. V. in Verbindung mit der Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung, Detmold, vom 27. bis 29. April 1966**

Von W. NIERLE (Detmold)

Zur 17. Stärke-Tagung waren neben zahlreichen Teilnehmern aus dem Inland mehr als 100 Ausländer erschienen.

Durch seinen ausgezeichneten Vortrag über Betriebspsychologie und Betriebsführung verstand es Prof. HERWIG aus Braunschweig, den gesamten Zuhörerkreis zu fesseln. Durch wissenschaftliche Analyse der menschlichen Arbeit wurde die Notwendigkeit einer möglichst weitgehenden wechselseitigen Anpassung zwischen Mensch und Arbeit aufgezeigt. In faszinierender Art verstand es Prof. HERWIG, die sich daraus ergebenden einzelnen Problembereiche, wie Anpassung der Arbeitsbedingungen, Gestaltung von Werkzeug, Maschinen, Arbeitsplatz und Umgebung, verbesserte Arbeitsleistung durch verringerte Belastung und Ermüdung, sowie Probleme der Menschenführung zu erläutern.

In humorvoller Art verstand es Prof. K. HEYNS, Hamburg, das schwierige Gebiet der Massenspektrometrie der Kohlenhydrate auch dem rein wissenschaftlichen Fragen etwas entfernter Stehenden klar verständlich zu machen. Die unter Zufuhr von Energie auftretenden Molekülfragmentierungen vermitteln neue Einsichten auch in die Eigenschaften der Kohlenhydrate. Anhand von vornehmlich in seinem Institut erarbeiteten Zerfallreihen kann u. a. zwischen Pyranose-Furanoseform der Pentosen und Hexosen sowie zwischen Aldosen und Ketosen unterschieden werden. Die Kombination mit der Gaschromatographie hat sich auch auf dem Kohlenhydratgebiet als besonders leistungsfähig erwiesen, wie am Beispiel der Zuckerpyrolyse und der Maillard-Reaktion gezeigt wurde.

Über Stärkekörner als Phasenobjekte referierte Prof. CZAJA, Aachen, wobei er näher auf die Schichtenbildung der Körner durch Salzsäurebehandlung einging.

Prof. SCHUTZ, Mulhouse, legte in seinem Vortrag „Wissenschaftliches und Praktisches über die Rheologie von Stärkelösungen“ die theoretischen Grundlagen einer praktischen