

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn  
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL).

## Zur Histochemie des Hämosiderins\*.

Von

PETER GEDIGK und GÜNTER STRAUSS.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Mai 1953.)

Während unsere Kenntnis über die Physiologie und Pathologie des Eisenstoffwechsels in den letzten Jahren durch eine Reihe von grundlegenden Untersuchungen bereichert worden ist, gehen die Ansichten über den chemischen Aufbau des Hämosiderins noch auseinander. Eine Einmütigkeit finden wir nur bei den Angaben über die Eisenkomponente des Pigmentes. Sie soll als Ferrioxhydroxyhydrat vorliegen, das durch Alterung allmählich in das stabile Kristallgefüge des Limonits und des Goethits übergeht (BEHRENS und ASHER; SCHWIETZER). Dagegen ist es nach wie vor umstritten, welche Substanzen sich außer dem Eisen an dem Aufbau des Hämosiderins beteiligen. Die meisten Untersucher vertreten die Ansicht, daß im Hämosiderin eine mehr oder weniger feste Eisen-Eiweißverbindung vorliegt. Vielfach wird auch Fettstoffen eine besondere Rolle beim Aufbau des Pigmentes zugesprochen [HUECK (1), (2)].

Zur Klärung dieser Fragen haben wir in den vorliegenden Untersuchungen eine nähere histochemische Charakterisierung des Hämosiderins vorgenommen. Unsere besondere Aufmerksamkeit galt dabei denjenigen Substanzen, die neben dem Eisen im Hämosiderin vorkommen und beim Aufbau des Pigmentes eine Rolle spielen.

Wir sind ferner der Frage nachgegangen, ob das Pigment in den verschiedenen Organen und Zellen die gleichen histochemischen Eigenschaften besitzt.

### *Material.*

Wir haben bei unseren Experimenten im wesentlichen die Hämosiderinablagerungen in der menschlichen Leber, in der Milz und im Knochenmark untersucht. Das Material stammte von Verstorbenen, die entweder an einer hämosiderotischen Lebercirrhose gelitten hatten, oder bei denen während einer langen Krankheit sehr viele Bluttransfusionen durchgeführt werden mußten. Außerdem standen uns hämosiderintragende Zellen bei einer alten Hirnblutung, in einem hämosiderotischen Granulationsgewebe, sowie Herzfehlerzellen in einer Stauungslunge zur Verfügung. Die Organe wurden in Formalin oder Alkohol fixiert und in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet.

---

\* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, der wir für ihre Hilfe sehr danken.

Es sei darauf hingewiesen, daß nur frisches, gut erhaltenes Material für die Pigmentuntersuchungen geeignet ist. An Organen, die durch längeres Liegen nach dem Tode bereits Zersetzungserscheinungen zeigen, können irreführende Ergebnisse erzielt werden.

### Methoden.

1. *Darstellung des Eisens im Schnitt.* Zum histochemischen Nachweis des Eisens haben wir die *Berliner Blau*- und die *Turnbull-Blaureaktion* verwandt (ROULET). Für die genaue Lokalisation der grobkörnigen Eisenablagerung genügte in vielen Fällen schon eine einfache Kernfärbung mit Hämatoxylin.

2. *Die Darstellung der Polysaccharide* erfolgte mit der *Perjodsäure-Leukofuchsin-technik*, (PAS-Reaktion [McMANUS, LILLIE (1) und HOTCHKISS]). Bei diesem Verfahren werden die Hexosepolysaccharide mit Perjodsäure zu polymeren Aldehyden oxydiert und dann mit dem SCHIFFSchen Reagens im Schnitt sichtbar gemacht. Über die Leistungsfähigkeit und die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode ist an anderer Stelle berichtet worden [GEDIGK (1), (2)]. Wir haben uns im wesentlichen an die Arbeitsvorschrift von HOTCHKISS und PEARSE (3) gehalten: 1. Schnitte entparaffinieren und in 70%igen Alkohol bringen. 2. Perjodsäurelösung (A) (10 min). 3. 70%iger Alkohol (kurz spülen). 4. Reduzierende Lösung nach HOTCHKISS (B) (1 min). 5. 70%iger Alkohol (kurz spülen). 6. SCHIFFSches Reagens (20 min). 7. Fließendes Wasser (20 min). 8. Kernfärbung mit 0,5%igem Coelestinblau ( $\frac{3}{4}$  min) und MAYERSchem Hämalaun ( $\frac{3}{4}$  min). 9. 2%iger Salzsäurealkohol (kurz differenzieren). 10. Entwässern und in Canadabalsam einbetten.

(A) Herstellung der Perjodsäurelösung: Zu 400 mg Perjodsäure ( $\text{HJO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) werden 10 ml dest. Wasser und 5 ml m/5 Natriumacetat hinzugegeben. Dann mit reinem, absolutem Äthanol auf 50 ml auffüllen. — Die Lösung muß bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt werden und ist etwa 1–2 Wochen haltbar.

(B) Herstellung der HOTCHKISS-Lösung: Zu 1,0 g Kaliumjodid und 1,0 g Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) werden 30 ml reiner, absoluter Äthanol, 20 ml dest. Wasser und 0,5 ml 2n-Salzsäure hinzugegeben. — Der sich bildende Schwefelniederschlag kann vernachlässigt werden.

3. *Das Acetylierungsverfahren nach McMANUS und CASON* dient zur histochemischen Unterscheidung zwischen PAS-positiven Glykolen, Aminoalkoholen und Äthylengruppen. Hierbei werden die PAS-positiven Glykole und Aminoalkohole durch die Einwirkung einer Essigsäureanhydrid-Pyridinlösung acetyliert und somit für die Perjodsäureoxydation blockiert (A). Die unter Umständen gleichfalls mit der PAS-Technik erfaßten Äthylenverbindungen werden nicht angegriffen und bleiben daher oxydierbar. Sie lassen sich auf diese Weise von den Glykolen und Aminoalkoholen trennen. Behandelt man die acetylierten Schnitte mit 0,1 n Kalilauge (B), so werden die veresterten Glykole verseift, während die acetylierten Aminogruppen stabil sind und ihre Reaktionsfähigkeit nicht wieder erlangen. Auf diese Weise gelingt eine Unterscheidung zwischen den PAS-positiven Glykolen und den PAS-positiven Aminoalkoholen.

Das Verfahren der reversiblen Acetylierung haben wir genau nach den Angaben von McMANUS und CASON durchgeführt. Im Gegensatz zu LILLIE (2) und in Übereinstimmung mit den Angaben von McMANUS und CASON haben wir die PAS-positiven Glykole stets durch eine Acetylierung von 45 min Dauer blockieren können.

*Durchführung der reversiblen Acetylierung.* (A) Die Schnitte werden in Wasser gebracht und bei Zimmertemperatur für 45 min in eine Essigsäureanhydrid-Pyridin-

lösung gestellt (13 ml Essigsäureanhydrid + 20 ml Pyridin). Anschließend in Wasser spülen. Dann PAS-Reaktion.

(B.) Zunächst Acetylierung in der Essigsäureanhydrid-Pyridinlösung wie unter (A.) Schnitte in Wasser spülen. Dann werden die Schnitte für 45 min bei Zimmertemperatur in 0,1 n Kalilauge gebracht. Anschließend in Wasser spülen und PAS-Reaktion.

4. *Die Messung der Basophilie* beruht auf einer bei verschiedenem  $p_H$  vorgenommenen Prüfung der Bindefähigkeit einzelner Gewebselemente für basische Farbstoffe [PISCHINGER (1), (2)]. Die Schnitte werden dabei in gepufferte Methylenblaulösungen gebracht, die alle die gleiche Farbstoffkonzentration und Ionenstärke besitzen und sich nur durch ihre Wasserstoffionenkonzentration unterscheiden. Als Maß für die Basophilie wird diejenige Wasserstoffionenkonzentration angesehen, bei der die sichtbare Bindefähigkeit für Methylenblau erlischt [PEARSE (1), (2)].

Den Angaben von DEMPSEY und Mitarbeitern, sowie PEARSE (1), (2) entsprechend haben wir  $5 \cdot 10^{-4}$  m-Methylenblaulösungen benützt, die mit Glykokoll- bzw. Acetat- oder Phosphatpuffer auf das jeweilige  $p_H$  eingestellt worden waren. Die gepufferten Farbstofflösungen hatten eine Ionenstärke von 0,01. Die Schnitte wurden für 24 Std bei  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  in diese Methylenblaulösungen gebracht.

Anschließend wurden die Schnitte schnell entwässert und in Canadabalsam eingeschlossen.

Eine Besprechung der Leistungsfähigkeit und der Fehlermöglichkeiten dieses Verfahrens befindet sich an anderer Stelle [GEDIGK (1)].

5. *Die Prüfung der Eisenbindung des Gewebes* (HALE) beruht auf der Behandlung der Schnitte mit einer sauren Lösung von kolloidalem, dialysiertem Eisen. Das Eisen wird vornehmlich von den Sulfat- und Carboxylgruppen der sauren Mucopolysaccharide gebunden und dann mit der Berliner Blaureaktion im Schnitt nachgewiesen. Wir haben uns im wesentlichen an die Arbeitsvorschrift von RINEHART und ABUL-HAJ gehalten: 1. Schnitte entparaffinieren und in 70%igen Alkohol bringen. 2. 3%ige Essigsäurelösung (1 min). 3. Für 30 min in die Eisenlösung bringen (4 Teile kolloidale Eisenlösung auf einen Teil Eisessig). 4. Mehrfaches Waschen in Wasser, bis die Schnitte farblos sind. 5. Berliner Blaureaktion. 6. Aufsteigende Alkoholreihe, Canadabalsam.

Herstellung der kolloidalen Eisenlösung: 275 g granuliertes Ferrichlorid werden in einem Liter Wasser gelöst. Zugabe von 400 ml Glycerin und 100 ml 28%igem Ammoniak. Das sich bildende Präzipitat wird durch Umrühren gelöst. Dann weitere Zugabe von je 50, 30, 20 und 20 ml Ammoniak. Dazwischen wird bis zur vollständigen Lösung des Präzipitates jeweils 10–15 min umgerührt. Die Lösung ist dann klar, dunkelrotbraun. Dann Einbringen der Eisenlösung in einen nahtlosen Cellophanschlauch und Dialysieren gegen das 3–4fache Volumen destillierten Wassers. Die Außenflüssigkeit wird im Laufe von 3 Tagen etwa 10mal gewechselt. Während des Dialysierens nimmt das Volumen der Eisenlösung um das 3fache zu. Daher darf der Dialysierschlauch nur bis zu 30% seines Fassungsvermögens gefüllt werden. Die dialysierte Eisenlösung ist über Monate gut haltbar.

6. *Histoenzymatische Analyse mit Hyaluronidase*. Bei der histochemischen Anwendung von Hyaluronidasen sollen die mesenchymalen, sauren Mucopolysaccharide aus dem Schnitt entfernt und somit im indirekten Verfahren nachgewiesen werden [LAVES (1), (2)]. Die Wirksamkeit der Hyaluronidasen ist auf saure Polysaccharide mesenchymaler Herkunft beschränkt. Die epithelialen Mucopolysaccharide werden nicht angegriffen. Über die Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens ist gleichfalls an anderer Stelle berichtet worden [GEDIGK (1)].

Wir haben bei unseren Experimenten 0,2%ige Hyaluronidaselösungen<sup>1</sup> verwandt, denen zu 0,9% Kochsalz hinzugesetzt worden war. Das  $p_H$  der Fermentlösung betrug 5,8. Die Schnitte wurden 24 Std bei  $37^{\circ} \pm 1^{\circ} C$  bebrütet.

Bei jedem Versuch wurde die Aktivität der Hyaluronidase geprüft: Wir haben die Hyaluronidase bei allen Experimenten gleichzeitig auf Trachealknorpel einwirken lassen und die Abnahme der Basophilie der Knorpelgrundsubstanz als Maß für die Fermentaktivität angesehen. Ferner haben wir Schnitte des Untersuchungsmaterials gleichzeitig 24 Std mit einer hyaluronidasefreien Kochsalzlösung bebrütet, um die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung der Fermentlösung auszuschalten.

7. *Histochemische Analyse mit Diastase.* Bei der Behandlung der Schnitte mit Diastase soll das Glykogen aus dem Schnitt entfernt und somit von anderen Polysacchariden abgegrenzt werden. Wir haben uns bei unseren Versuchen im wesentlichen nach den Angaben von LILLIE und GRECO gerichtet: Die Schnitte wurden 1 Std bei  $37 \pm 1^{\circ} C$  mit einer 1%igen Diastaselösung bebrütet, der wir zu 0,8% Kochsalz hinzugesetzt hatten und die mit 0,1 m Phosphatpuffer auf  $p_H$  6,8 eingestellt worden war.

8. *Darstellung der Lipide mit Sudanschwarz B nach LISON.* Die Schnitte werden 30 min mit einer gesättigten Sudanschwarz B-Lösung in 70%igem Alkohol gefärbt. Kernfärbung mit Kernechtrot.

9. *Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion.* Dieses Verfahren beruht auf der Oxydation von Äthylenverbindungen durch Perameisensäure und der anschließenden Darstellung der hierbei gebildeten Aldehyde mit fuchsin-schweiflicher Säure [LILLIE (3)].

Wir stimmen nicht mit der Auffassung von LILLIE überein, daß bei der Perameisensäure-Schiffreaktion ausschließlich Äthylenverbindungen dargestellt werden und glauben, daß daneben auch in geringem Maße noch andere Gruppen, u. a.  $\alpha$ -Glykole, zu Schiff-positiven Aldehyden oxydiert werden können. Zur Ausschaltung dieser Nebenreaktion haben wir deshalb vor der Perameisensäureoxydation die Hydroxylgruppen im Schnitt acetyliert (vgl. Abschnitt 3) und somit für die Oxydation blockiert. Die Anwendungsmöglichkeiten der Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion sind gleichfalls an anderer Stelle diskutiert worden [GEDIGK (1)].

Wir haben das Verfahren im wesentlichen nach den Angaben von LILLIE (3) durchgeführt: 1. Schnitte entparaffinieren und in Wasser bringen. 2. Acetylieren wie bei Abschnitt 3. 3. Perameisensäurelösung (90 min bei Zimmertemperatur). 4. Fließendes Wasser (10 min). 5. SCHIFFSches Reagens (20 min). 6. 3mal in 0,5%iger Natriumbisulfidlösung je 2 min waschen. 7. Fließendes Wasser (10 min). 8. Kernfärbung mit Coelestinblau-Hämalaun wie bei der PAS-Reaktion. — Eine Färbung des Protoplasmas mit Pikrinsäure haben wir nicht durchgeführt, weil hierdurch schwächere Perameisensäure-Leukofuchsinreaktionen verdeckt werden können.

Herstellung der Perameisensäurelösung: Zu 8 ml 90%iger Ameisensäure werden 31 ml 30%iges Wasserstoffsuperoxyd und 0,22 ml konz. Schwefelsäure hinzugegeben. Da sich die Hauptmenge der Persäure erst nach  $1\frac{1}{2}$  Std bildet, wird das Reagens 30 min vor Gebrauch angesetzt. Es muß ferner für jeden Versuch neu hergestellt werden.

10. *Enteisenen der Schnitte.* Zur Entfernung des Eisens aus dem Hämosiderin haben wir die Schnitte  $1\frac{1}{2}$  Std bei Zimmertemperatur mit

<sup>1</sup> Wir haben bei unseren Versuchen Testeshyaluronidase benutzt, die uns von der Sehering A.G., Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden ist.

20%iger Salzsäure behandelt. Nach dieser Zeit ließ sich im Schnitt mit der Berliner Blau- oder Turnbullblaureaktion kein Eisen mehr nachweisen, während das Gewebe noch gut erhalten war. Versuche, mit schwächeren Salzsäurekonzentrationen das Eisen aus dem Gewebe zu entfernen, haben sich nicht bewährt. Die dann erforderliche Verlängerung der Salzsäureeinwirkung führt leicht zur Zerstörung des Gewebes, das dann für die weitere histochemische Untersuchung unbrauchbar ist. Auch der Zusatz von Äthanol zu der Salzsäure ist nicht zweckmäßig. Das Eisen läßt sich mit einer Salzsäure-Äthanolmischung zwar erheblich schneller und mit geringeren Salzsäurekonzentrationen entfernen. Das Gewebe wird hierbei jedoch stärker angegriffen als bei der Verwendung von alkoholfreier Salzsäure.

Die Salzsäureeinwirkung auf das Gewebe ist in jedem Falle ein schwerer Eingriff, der eine Reihe von histochemischen Veränderungen zur Folge hat und daher unter Umständen zu Fehlschlüssen führen könnte. Es mußte daher die Frage geklärt werden, wieweit diese Veränderungen die Ergebnisse der übrigen Untersuchungsmethoden beeinflussen, und ob womöglich in den hämosiderintragenden Zellen oder in dem Pigment selbst irreführende Kunstprodukte entstehen.

Zunächst haben wir festgestellt, daß die Zellkerne nach der Salzsäureeinwirkung eine deutliche *Reaktion mit dem SCHIFFschen Reagenz* geben, wie es der Feulgenreaktion entsprechend zu erwarten war. Das Protoplasma der Mesenchym- und der Epithelzellen sowie die Interzellularsubstanzen sind nach der Salzsäurebehandlung jedoch nicht Schiffpositiv. Auch in dem Hämosiderinpigment entstehen durch die Salzsäureeinwirkung keine freien Aldehyde.

Zweitens mußte der Frage nachgegangen werden, ob sich das Verhalten der einzelnen Gewebelemente bei der *PAS-Reaktion* ändert. Wir haben hierbei zum Vergleich die Reaktionsweise der Knorpelgrundsubstanz, des epithelialen Schleims, des Protoplasmas in verschiedenen Mesenchym- und Epithelzellen, sowie der kollagenen Fasern geprüft und in keinem Fall eine wesentliche Änderung in der Färbbarkeit mit der Perjodsäure-Leukofuchsin-technik gefunden. Das Verhalten des Hämosiderinpigmentes soll später besprochen werden.

Der geringe Einfluß der Salzsäure auf die Gewebsstrukturen und auf ihre Reaktionsweise mit Perjodsäure-Leukofuchsin darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß eine Reihe von Eigenschaften der Zellelemente, wie z. B. ihre *isoelektrischen Punkte*, durch die Salzsäureeinwirkung erheblich geändert werden. Es muß mit Sicherheit angenommen werden, daß einzelne Peptid- und Glykosidbindungen aufgespalten und auch an den Polysacchariden Hexosebausteine und Schwefelsäuregruppen abgespalten werden.

Um einen Maßstab für den Einfluß der Salzsäureeinwirkung auf die *Basophilie* der Gewebselemente zu erhalten, haben wir bei verschiedenem  $p_H$  die Methylenblaubindefähigkeit der Knorpelgrundsubstanz, des epithelialen Schleims, sowie verschiedener Epithelzellen vor und nach der Salzsäurebehandlung der Schnitte geprüft.

Dabei haben wir festgestellt, daß die Methylenblaubindefähigkeit des Schleimes nach  $1\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung von 20%iger Salzsäure bei  $p_H$  3,3 erlischt, während sie im unbehandelten Schnitt selbst bei  $p_H$  2,8 noch deutlich nachweisbar ist. Die Knorpelgrundsubstanz bindet auch nach Salzsäurebehandlung noch bei  $p_H$  2,8 reichlich Methylenblau. Im Vergleich zum unbehandelten Schnitt ist die Farbstoffbindung in dem sauren Bereich jedoch deutlich abgeschwächt.

Die Methylenblaubindefähigkeit der Kerne und des Protoplasmas der Nierenepithelien und der Leberzellen ist im unbehandelten Schnitt bis  $p_H$  2,8 bzw. 3,8 nachweisbar. Demgegenüber erlischt sie nach Salzsäurebehandlung bereits zwischen  $p_H$  5,0 und 6,0.

Aus diesen Versuchen muß der Schluß gezogen werden, daß die isoelektrischen Punkte der Mucopolysaccharid-Eiweißkomplexe und der Nucleoproteide durch die Salzsäurebehandlung in alkalischer Richtung verschoben werden. Von besonderer Bedeutung erscheint uns die Beobachtung, daß die Mucopolysaccharide bei der Einwirkung der Salzsäure weit weniger angegriffen werden als die Nucleinsäuren des Kernes und des Protoplasmas.

Bei allen Untersuchungen am eisenfreien Hämosiderin haben wir uns stets durch Kontrollschnitte davon überzeugt, daß bei der Salzsäureeinwirkung das Eisen vollständig aus dem Gewebe entfernt worden ist.

### *Untersuchungsergebnisse.*

#### I.

Unsere Untersuchungen zielten zunächst darauf ab, die *Reaktion des unbehandelten, d. h. noch eisenhaltigen Hämosiderins* festzulegen, wobei sich gewisse Unterschiede zwischen dem in Mesenchymzellen und dem in Epithelzellen, z. B. in den Leberzellen, gelegenen Hämosiderin ergaben.

Wie bereits HAMPERL (3) hervorgehoben hatte, geben die hämosiderinhaltigen *Mesenchymzellen* nach der Behandlung mit *Perjodsäure eine deutliche Schiff-Reaktion*. An dem Pigment selbst wird die bei der PAS-Reaktion erzeugte Rotfärbung vielfach durch die braune Eigenfarbe des Eisens überdeckt. Häufig läßt es sich überhaupt nicht mit Sicherheit entscheiden, ob die Eisenschollen und Körnchen mit der PAS-Methode angefärbt werden.

Wir haben dann die hämosiderintragenden Mesenchymzellen der *reversiblen Acetylierung* nach McMANUS und CASON unterworfen. Dabei verschwindet die PAS-Reaktion des Pigmentes und des benachbarten

Protoplasmas nach der Behandlung mit Essigsäureanhydrid völlig und tritt nach der Verseifung mit verdünnter Kalilauge wieder unverändert in Erscheinung.

Die Prüfung der *Basophilie* ließ sich an dem eisenhaltigen Pigment nicht durchführen, da die braune Eigenfarbe des Pigmentes die Methylenblaubindung überdeckte und vor allem bei niedrigem  $p_H$  nicht deutlich erkennen ließ.

Die Hämosiderinschollen lassen sich ferner häufig mit *Toluidinblau* anfärben. Wegen der Eigenfarbe des Pigmentes konnten wir jedoch nicht feststellen, ob dieser Thiazinfarbstoff ortho- oder metachromatisch gebunden wird.

Bei der Bebrütung mit *Hyaluronidase* und *Diastase* haben wir keine Veränderung der cytologischen und cytochemischen Eigenschaften des eisenhaltigen Pigmentes beobachtet.

Die in den Mesenchymzellen liegenden Hämosiderinschollen lassen sich ferner deutlich mit *Sudanschwarz B* anfärben. Der Ausfall der *Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion* ließ sich an dem eisenhaltigen Hämosiderin wegen der Eigenfarbe des Pigmentes nicht beurteilen. Das unbehandelte Pigment besitzt keine Autofluoreszenz. Dieser Befund darf nicht überraschen, denn wir wissen, daß Eisen als Schwermetall die Fluoreszenz auslöscht.

Im Gegensatz zu dem mesenchymalen Hämosiderin ist das in *Leberzellen* liegende Pigment PAS-negativ. Auch das die Hämosiderinkörnchen umgebende Protoplasma läßt sich mit der Perjodsäure-Leukofuchsin-technik nicht verstärkt anfärben. Die Färbbarkeit des epithelialen Hämosiderins mit Sudanschwarz B war — im Gegensatz zum mesenchymalen — nicht eindeutig zu beurteilen.

## II.

Als nächster Schritt war das Substrat zu untersuchen, das *nach Entfernung des Eisens* aus dem Hämosiderin als *ungefärbter Restkörper* bzw. als *Trägersubstanz* zurückbleibt. Erleichternd ist es für diese Untersuchungen, daß dabei die sonst störende Eigenfarbe des Pigmentes wegfällt. Andererseits sind aber durch die vorangegangene Behandlung mit 20%iger Salzsäure Veränderungen hervorgerufen, die man bei der Bewertung der Ergebnisse in Rechnung stellen muß.

Der in den *Mesenchymzellen* liegende eisenfreie Restkörper des Pigmentes läßt sich mit der *Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion* leuchtend rot anfärben. Die PAS-positiven Substanzen treten in diesen Zellen als Schollen und Körnchen in Erscheinung und zwar vornehmlich an denjenigen Stellen, an denen zuvor Pigmentschollen gelegen haben (Abb. 1 und 2). Auffallend ist der Befund, daß auch in den *Epithelzellen* (*Leberzellen*) der eisenfreie Restkörper des Hämosiderins im Gegensatz zu dem unbehandelten Pigment eine deutliche PAS-Reaktion gibt. Wie aus den

Abb. 3 und 4 hervorgeht, liegen die PAS-positiven Körnchen auch in den Epithelzellen genau an den Stellen, an denen ursprünglich Pigment-

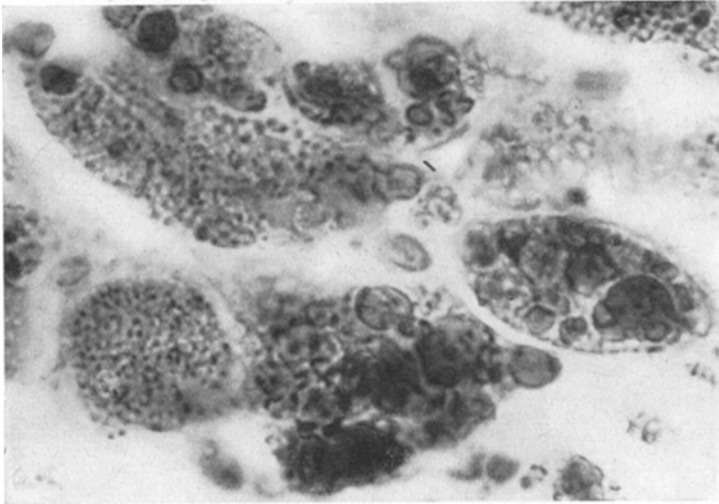


Abb. 1. Hämosiderinkörner und -schollen in den Mesenchymzellen eines periportalen Feldes. Hämosiderotische Lebercirrhose. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergrößerung: 1145  $\times$ .

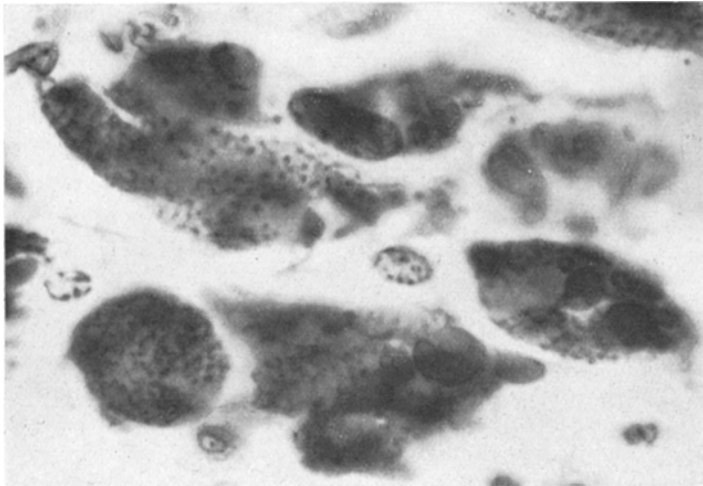


Abb. 2. Die gleichen Zellen wie in Abb. 1 nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion. Stark PAS-positive Körner und Schollen in gleicher Verteilung wie die Eisenablagerungen in Abb. 1.

körnchen vorhanden waren. Die PAS-positiven Restkörper des Pigmentes ließen sich sowohl in den Mesenchym- als auch in den Epithelzellen reversibel acetylieren.



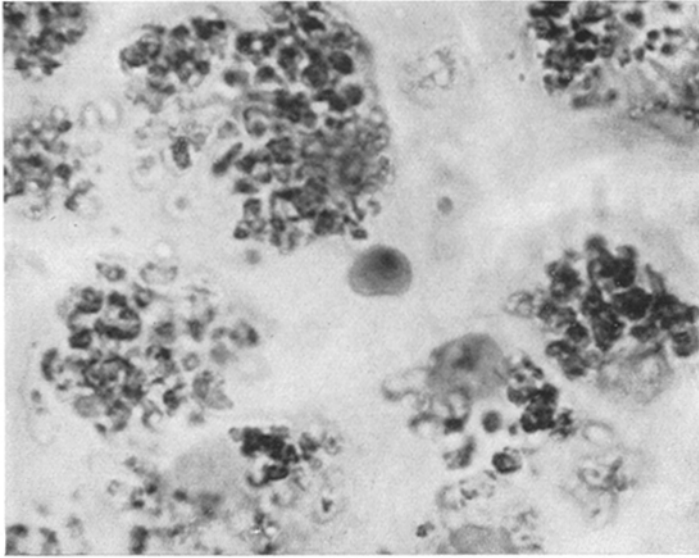


Abb. 3. Hämosiderinkörner in Leberzellen. Hämosiderotische Lebercirrhose. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergrößerung: 1425  $\times$ .

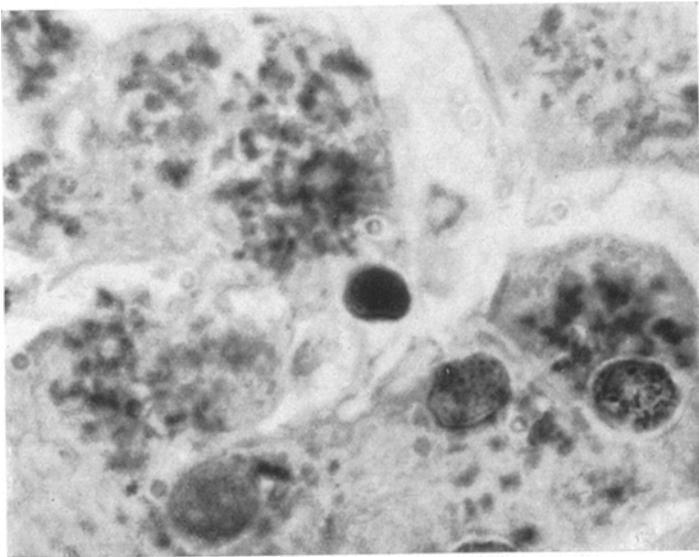


Abb. 4. Die gleichen Zellen wie in Abb. 3 nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion. PAS-positive Körner in gleicher Verteilung wie die Eisenablagerungen in Abb. 3.

Die Messung der *Basophilie* nach PISCHINGER (1), (2) und PEARSE (1), (2) ergab bei dem eisenfreien mesenchymalen und epithelialen Pigment noch

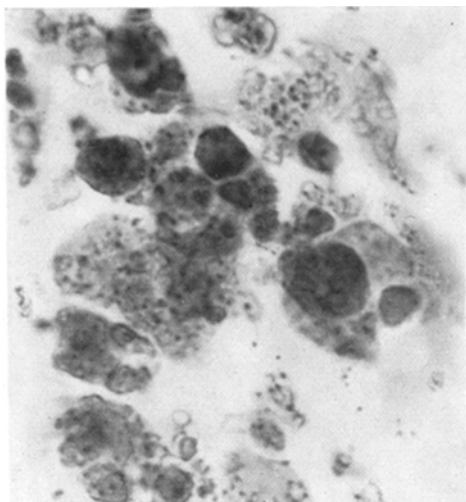


Abb. 5. Hämosiderinkörner und -schollen in den Mesenchymzellen eines periportalen Feldes. Hämosiderotische Lebercirrhose. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergrößerung: 1145  $\times$ .

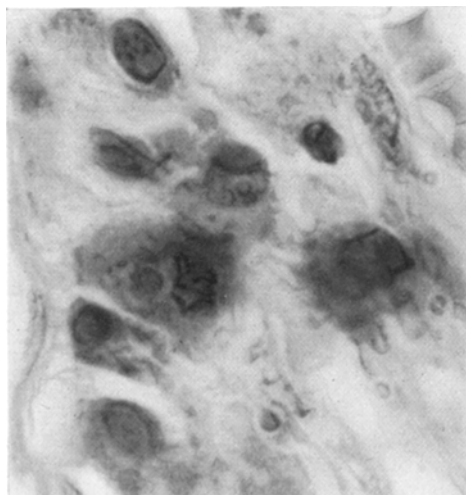


Abb. 6. Die gleichen Zellen wie in Abb. 5 nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender Behandlung des Schnittes mit kolloidalem Eisen. Berliner Blaureaktion. Der eisenfreie Restkörper des Hämosiderins hat sich erneut mit Eisen beladen.

eine Methylenblaubindefähigkeit bei  $p_H$  3,6—4,0 (Formalinfixierung), bzw. bei  $p_H$  4,6—4,8 (Alkoholfixierung). Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß die Messung der Basophilie an dem mit Salzsäure behandelten Schnitt keine sichere Aussage über die Lage des isoelektrischen Punktes der Gewebselemente erlaubt. Wir dürfen aus der Methylenblaubindefähigkeit in diesem niedrigen  $p_H$ -Bereich nur auf die saure Eigenschaft des eisenfreien Restkörpers des Pigmentes schließen.

Das eisenfreie mesenchymale und epitheliale Hämosiderin bindet *Toluidinblau*. Es ist uns jedoch nicht gelungen, die eisenfreien Restkörper mit diesem Thiazinfarbstoff metachromatisch anzufärben.

Bei Einwirkung von *Testeshyaluronidase* auf das eisenfreie Pigment nimmt die Methylenblaubindefähigkeit des Restkörpers des mesenchymalen Hämosiderins etwas ab, die Anfärbbarkeit mit Methylenblau erlischt bereits bei  $p_H$  4,8 (Formalinfixierung).

Die Bebrütung der Schnitte mit *Diastase* ändert die PAS-Reaktion des mesenchymalen und epithelialen Hämosiderins nicht.

Behandelt man hämosiderinhaltige Gewebsschnitte, aus denen das Eisen mit Salzsäure entfernt worden war, mit *kolloidalen Eisenlösungen*,

so zeigt es sich, daß der eisenfreie Restkörper des Pigmentes sowohl in den Mesenchym- als auch in den Epithelzellen eine ausgesprochene

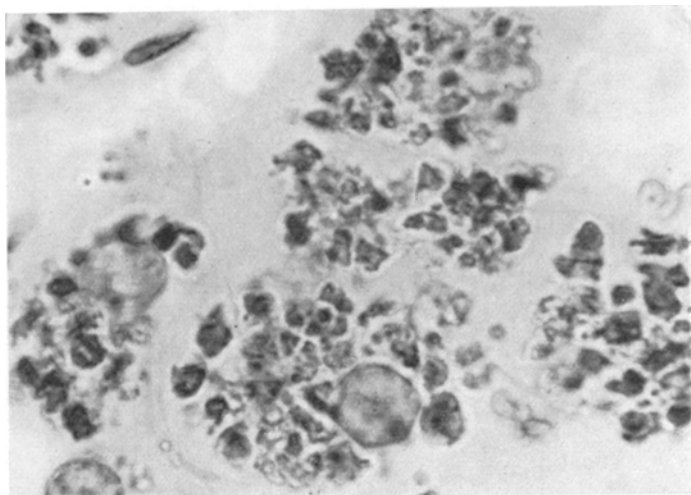


Abb. 7. Hämosiderinkörner in Leberzellen. Hämosiderotische Lebercirrhose. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Vergrößerung: 1425  $\times$ .

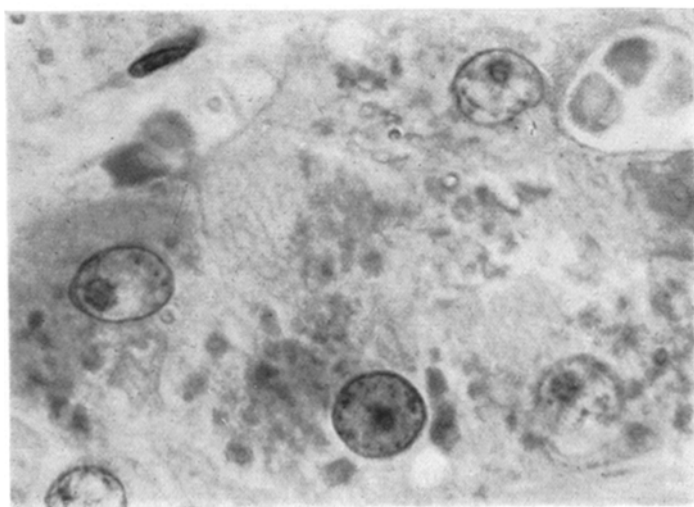


Abb. 8. Die gleichen Zellen wie in Abb. 7 nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließender erneuter Beladung des eisenfreien Restkörpers des Pigmentes mit Eisen. Berliner Blauraktion. Eisenablagerung in annähernd gleicher Anordnung wie in Abb. 7.

Affinität für Eisen besitzt: *Er läßt sich erneut mit Eisen beladen*, wie aus den Abb. 5—8 hervorgeht.

Das *eisenfreie mesenchymale Pigment* läßt sich — ebenso wie das eisenhaltige — deutlich mit *Sudanschwarz* anfärben (Abb. 9). Der eisenfreie Restkörper zeigt jedoch nur eine sehr schwache Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion.

Wir haben ferner die Beobachtung von HAMPERL (1) bestätigen können, daß das mesenchymale Pigment nach der Entfernung des Eisens eine schwache gelbbraune *Eigenfluoreszenz* besitzt.

Die eisenfreien Mesenchymzellen enthalten fluorescierende Schollen und Körnchen, die in ihrer Form und Lage den ursprünglich in diesen

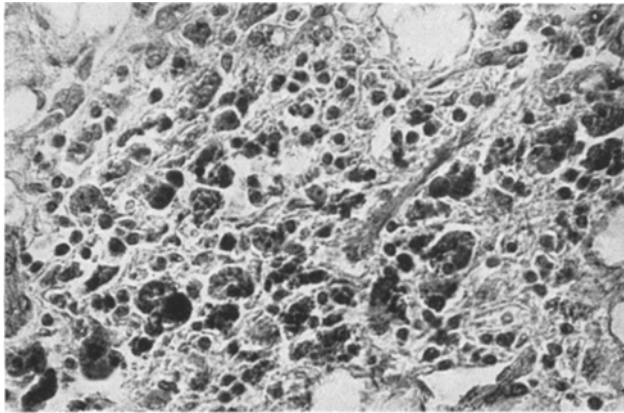


Abb. 9. Hämosiderintragende Mesenchymzellen in einem periportalen Feld bei hämosiderotischer Lebercirrhose. Entfernung des Eisens mit Salzsäure und anschließende Färbung mit Sudanschwarz B. Der eisenfreie Restkörper des Hämosiderins ist schwarz gefärbt. Vergrößerung: 360 ×.

Zellen vorhandenen Eisenablagerungen entsprechen. Die gelbbraune Eigenfluoreszenz des eisenfreien Restkörpers ähnelt in ihrer Farbqualität der Fluoreszenz des *Ceroids*. Sie ist jedoch erheblich schwächer.

Eine weitere Übereinstimmung in dem Verhalten der beiden Pigmente besteht darin, daß die *Lipidkomponenten* nicht mit Fettlösungsmitteln aus dem Schnitt extrahiert werden können. Auch nach 48stündigem Kochen der Schnitte in einer Chloroform-Methanolmischung im Rückfluß war der eisenfreie Restkörper der Hämosiderins, ebenso wie das Ceroid, noch mit Sudanschwarz anfärbbar. Beide Pigmente zeigten nach der Behandlung mit siedenden Fettlösungsmitteln unverändert ihre Eigenfluoreszenz.

Das unbehandelte und das eisenfreie mesenchymale Hämosiderin können ferner, genau wie das Ceroid, mit *Carbolfuchsin* nach ZIEHL-NEELSEN dargestellt werden. Bei der Bindegewebsfärbung mit dem Azangemisch und der Trichromfärbung mit Anilinblau nach MASSON

wird der eisenfreie Restkörper des Hämosiderins ebenso wie das Ceroid schmutzig blauviolett gefärbt.

Das *eisenfreie epitheliale Pigment* läßt sich zwar gleichfalls mit Sudan-schwarz und Carbofuchsin färben, es besitzt jedoch keine Eigenfluoreszenz. Der Ausfall der Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion und der Bindegewebsfärbung nach MASSON war nicht eindeutig zu beurteilen.

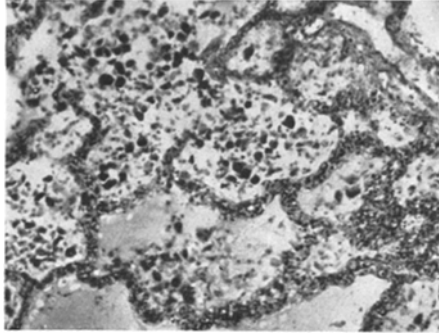


Abb. 10. „Herzfehlerzellen“ in einer Stauungslunge. Entfernung des Eisens mit Salzsäure. Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion. Der eisenfreie Restkörper des Pigmentes ist leuchtend rot gefärbt. Vergrößerung: 80  $\times$ .

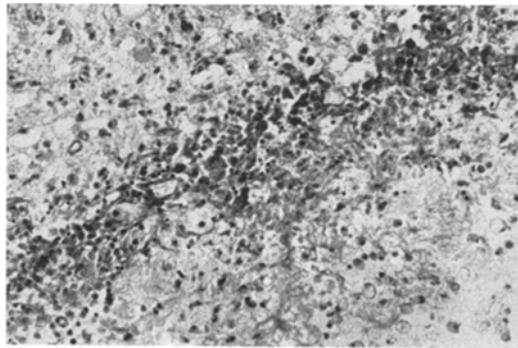


Abb. 11. Hämosiderintragende Zellen am Rande einer älteren Hirnblutung. Entfernung des Eisens mit Salzsäure. Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion. Der eisenfreie Restkörper des Pigmentes ist leuchtend rot gefärbt. Vergrößerung: 80  $\times$ .

Das Ergebnis unserer histochemischen Untersuchungen an dem eisenhaltigen und dem eisenfreien Hämosiderin ist in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellt.

Das Hämosiderinpigment in den Mesenchymzellen der verschiedensten Organe (Leber, Milz, Knochenmark) und im hämosiderotischen Granulationsgewebe zeigt die gleichen histochemischen Eigenschaften. Ebenso verhält sich das Hämosiderin in den pigmentbildenden Zellen am Rande einer Hirnblutung und in den Herzfehlerzellen der Stauungslunge (Abb. 10 und 11).

Tabelle 1.

| Histochemische Reaktion  | Hämosiderin<br>in Mesenchymzellen |                               | Hämosiderin<br>in Leberzellen |           |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|
|  | eisenhaltig                       | eisenfrei                     | eisen-<br>haltig              | eisenfrei |
| PAS . . . . .  | ++                                | +++                           | —                             | +         |
| PAS nach Diastase . . . . .                                      | ++                                | +++                           | —                             | +         |
| PAS nach Acetylierung . . . . .                                  | —                                 | —                             | —                             | —         |
| PAS nach Acetylierung und Ver-<br>seifung . . . . .              | ++                                | ++                            | —                             | +         |
| Schiffreaktion . . . . .   | —                                 | —                             | —                             | —         |
| Methylenblaubindung bis $p_H$ (For-<br>malinfixierung) . . . . . | ?                                 | 3,6—4,0                       | ?                             | 3,6—4,0   |
| Methylenblaubindung bis $p_H$ nach<br>Hyaluronidase . . . . .    | ?                                 | 4,8                           |                               |           |
| Eisenbindung (HALL) . . . . .                                    |                                   | ++                            |                               | ++        |
| Sudanschwarz B . . . . .   | +                                 | +                             | (+)                           | +         |
| Perameisensäure-Schiff-Reaktion .                                | ?                                 | (+)                           | ?                             | (—)       |
| Autofluoreszenz . . . . .  | —                                 | +                             | —                             | —         |
| Färbung mit Karbol-Fuchsin nach<br>ZIEHL-NEELEN . . . . .        | ++                                | ++                            | ?                             | +         |
| Bindegewebefärbung nach MASSON                                   | schmutzig<br>braun-<br>violett    | schmutzig<br>blau-<br>violett | ?                             | ?         |
| Sudanschwarz nach Kochen mit<br>Chloroform/Methanol . . . . .    | +                                 | +                             | (+)                           | +         |
| Autofluoreszenz nach Kochen mit<br>Chloroform/Methanol . . . . . | —                                 | +                             | —                             | —         |
| gek. Tetrazoniumreaktion . . . . .                               | ?                                 | +                             | ?                             | +         |

*Besprechung.*

I. Bei den älteren Untersuchungen zur histochemischen Charakterisierung des Hämosiderins ist die Aufmerksamkeit vornehmlich auf das Eisen gerichtet worden. Demgegenüber ist die Frage unbeantwortet geblieben, *welche anderen Substanzen sich neben dem Eisen am Aufbau des Pigmentes beteiligen*. Auf Grund unserer Befunde können wir zu diesem Problem wie folgt Stellung nehmen:

1. In den hämosiderinhaltigen Zellen und im Hämosiderinpigment selbst sind PAS-positive Substanzen nachzuweisen. Das Ergebnis weiterer histochemischer Untersuchungen, wie der Nachweis der reversiblen Acetylierung und der Resistenz gegen Diastase, sowie der Befund, daß der sehr starken PAS-Reaktion nur eine schwache Sudanophilie gegenübersteht, legen den Schluß nahe, daß es sich bei diesen PAS-positiven Stoffen um *Mucopolysaccharide* oder *Glykoproteide* handelt.

Wegen der Basophilie des eisenfreien Restkörpers und der Angreifbarkeit der Trägersubstanz durch Hyaluronidase vermuten wir, daß es sich bei dieser Kohlenhydratkomponente um eine *saures Mucopolysaccharid* handelt.

Das Fehlen der metachromatischen Färbbarkeit des eisenfreien Restkörpers des Hämosiderins spricht nicht gegen die Annahme, daß der PAS-positiven Komponente des Pigmentes ein hochmolekularer Schwefelsäureester, also ein mit Schwefelsäure verestertes, saures Mucopolysaccharid zugrunde liegt. Das Ausbleiben der metachromatischen Färbbarkeit der eisenfreien Trägersubstanz könnte durchaus eine Folge der Salzsäureeinwirkung sein, bei der eventuell vorhandene, als Ester gebundene Schwefelsäuregruppen aus den Mucopolysaccharidmolekeln abgespalten worden sind.

Gegen die Auffassung, daß es sich bei dem Polysaccharidbaustein des Pigmentes um ein *saures* Mucopolysaccharid handelt, könnte schließlich ins Feld geführt werden, daß die Basophilie des eisenfreien Restkörpers des Hämosiderins möglicherweise an die Lipide und nicht an die Polysaccharide gebunden ist. In diesem Fall wäre die PAS-Reaktion des Hämosiderins auf ein neutrales Polysaccharid, d. h. auf ein Muco- oder Glykoprotein, die Basophilie jedoch auf ein saures Lipid zurückzuführen. Da aber der ausgeprägten Basophilie der organischen Trägersubstanz nur eine relativ schwache Anfärbbarkeit mit Sudanschwarz gegenübersteht, halten wir die Annahme für gerechtfertigt, daß die saure Eigenschaft des eisenfreien Pigmentes an den Polysaccharidbaustein gebunden ist, und daß somit der PAS-positiven Komponente des Hämosiderins ein *saures* Polysaccharid zugrunde liegt.

Eine eindeutige Klärung dieser Frage wird jedoch erst möglich sein, wenn es gelungen ist, die Lipidkomponente des Hämosiderins aus dem Schnitt zu entfernen und dann an der lipidfreien organischen Trägersubstanz des Pigmentes die Basophilie zu prüfen.

2. Bereits vor 40 Jahren hat HUECK (1) die Vermutung ausgesprochen, daß im Hämosiderin noch eine *Lipidkomponente* vorhanden sei. Diese Annahme konnten wir bei unseren Untersuchungen jetzt bestätigen. Das epitheliale und das mesenchymale Pigment lassen sich deutlich mit Sudanschwarz anfärben (Abb. 9). Die eisenfreien Restkörper zeigen jedoch nur eine sehr schwache Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion. Sie enthalten also offenbar sehr wenig ungesättigte Carbonsäuren.

Die Lipidkomponente des mesenchymalen Hämosiderins stimmt in einer Reihe von Eigenschaften mit dem *Ceroidpigment* überein. Da auch das Ceroid vornehmlich in der Nähe von Blutungen auftritt [HAMPERL (2)] wird man an die Möglichkeit denken müssen, daß es sich bei den Lipidkomponenten des Hämosiderins und des Ceroids um zwei nahe verwandte, vielleicht sogar um die gleichen Stoffe handelt.

3. Mit Hilfe der gekuppelten Tetrazoniumreaktion (DANIELLI) waren in dem eisenfreien Restkörper des Hämosiderins auch *Proteine* nachzu-

weisen. Über diese Beobachtungen soll in einer späteren Mitteilung gesondert berichtet werden.

II. Unsere Untersuchungen haben schließlich in zwei Punkten *Unterschiede zwischen dem in Mesenchymzellen liegenden Hämosiderin und dem Pigment in Leberzellen* ergeben:

1. Diese Verschiedenheit betrifft zunächst die *Polysaccharidbausteine*. Sie lassen sich im eisenhaltigen mesenchymalen Hämosiderin ohne weiteres mit der Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion darstellen, nicht dagegen in dem unbehandelten epithelialen Pigment. Erst nach der Entfernung des Eisens aus dem Schnitt geben beide Pigmenttypen in der gleichen Weise eine deutliche PAS-Reaktion.

Aus diesen Befunden muß wohl der Schluß gezogen werden, daß sich die Mucopolysaccharide des mesenchymalen Pigmentes von denen des epithelialen strukturell unterscheiden. Wir vermögen jedoch mit unseren Methoden nicht zu entscheiden, worin diese strukturelle Verschiedenheit besteht.

2. Das mesenchymale Pigment unterscheidet sich ferner durch seine Lipidkomponente von dem Hämosiderin der Leberzellen. Es zeigt im Gegensatz zu dem epithelialen Pigment nach Entfernung des Eisens eine schwache Autofluoreszenz.

III. Auf Grund unserer Untersuchungen vermögen wir schließlich zu der Frage Stellung zu nehmen, *ob sich das Hämosiderin ausschließlich aus Stoffen zusammensetzt, die als Abbauprodukte der Erythrocyten anzusehen sind, oder ob auch die hämosiderintragenden Zellen ihrerseits Substanzen zum Aufbau des Pigmentes liefern.*

1. Es liegt auf der Hand, daß die *Polysaccharide* von den ortsständigen, hämosiderintragenden Zellen gebildet werden und nicht als Abbauprodukte der Erythrocyten angesehen werden dürfen. Insbesondere muß auch die basophile Eigenschaft der Trägersubstanz des Hämosiderins, die — wie wir vermuten — an die Polysaccharidkomponente gebunden ist, auf eine aktive Leistung der eisenverarbeitenden Zelle zurückgeführt werden. Man muß wohl annehmen, daß das beim Blutzerfall freiwerdende Eisen zunächst durch die sauren Gruppen der Zellen gebunden wird, und daß bei einem großen Eisenangebot eine vermehrte Bildung von basophilen Stoffen erfolgt. Das vermehrte Auftreten dieser sauren Substanzen wäre also sozusagen als eine Reaktion der Zelle auf die Anwesenheit des Eisens aufzufassen. Da es sich bei der hämosiderotischen Eisenablagerung um Ferrioxyhydrat, also um einen basischen Stoff, handelt, könnte man die Neubildung basophiler Substanzen (saurer Mucopolysaccharide) durch die hämosiderintragenden Zellen gewissermaßen als den Versuch zu einer „intracellulären Neutralisierung“ des Ferrioxyhydrates ansehen.



Die Möglichkeit einer chemischen Wechselwirkung zwischen der Eisenkomponente des Hämosiderins auf der einen und den sauren Polysacchariden auf der anderen Seite haben wir im übrigen bei unseren Experimenten zeigen können. Der eisenfreie Restkörper des Pigmentes besitzt eine ausgesprochene Affinität für Eisen und läßt sich — seinem im sauren Bereich gelegenen isoelektrischen Punkt entsprechend — ohne weiteres wieder mit Eisen beladen.

2. Die Frage nach der Herkunft der *Proteine* und *Lipide* läßt sich nicht ohne weiteres beantworten. Wir können vorerst nicht entscheiden, ob diese Stoffe Abbauprodukte der Erythrocyten darstellen und zusammen mit dem Eisen abgelagert werden, oder ob sie beim Blutzerfall metabolisch in den Zellen entstehen.

### *Zusammenfassung.*

1. Das Hämosiderinpigment enthält außer der Eisenkomponente Polysaccharide, Proteine und Lipide, die sich mit histochemischen Methoden im histologischen Schnitt darstellen lassen.

Nach Entfernung des Eisens mit Salzsäure zeigt der organische Restkörper des Pigmentes eine deutliche Basophilie. Wir vermuten, daß die saure Eigenschaft des eisenfreien Trägersubstanz an die Polysaccharidkomponente gebunden ist, und nehmen daher an, daß es sich bei diesem Kohlenhydrat um eine saures Mucopolysaccharid handelt.

2. Der eisenfreie Restkörper des Hämosiderins besitzt auf Grund seiner sauren Eigenschaft eine Affinität für Eisen. Er kann erneut mit Eisen beladen werden.

3. Es wurden Unterschiede zwischen dem in Mesenchymzellen und dem in Leberzellen abgelagerten Pigment gefunden.

### **Literatur.**

- BEHRENS, M., u. TH. ASHER: Z. physiol. Chem. **220**, 97 (1933). — DANIELLI, J. F.: Symposia Soc. Exper. Biol. **1**, 101 (1947). — DEMPSEY, E. W., and M. SINGER: Endocrinology **38**, 270 (1946). — DEMPSEY, E. W., H. BUNTING, M. SINGER and G. B. WISLOCKI: Anat. Rec. **98**, 417 (1947). — DEMPSEY, E. W., M. SINGER and G. B. WISLOCKI: Stain technol. **25**, 73 (1950). — GEDIGK, P.: (1) Klin. Wschr. **1952**, 1057. — (2) Verh. deutsch. Ges. Path. **1952**. — HALE, C. W.: Nature (Lond.) **157**, 802 (1946). — HAMPERL, H.: (1) Virchows Arch. **292**, 1 (1934). — (2) Virchows Arch. **318**, 32 (1950). — (3) Diskussionsbemerkung zum Vortrag GEDIGK, Verh. deutsch. Ges. Path. **1952**. — HOTCHKISS, R. D.: Arch. of Biochem. **16**, 131 (1948). — HUECK, W.: (1) Beitr. path. Anat. **54**, 68 (1912). — (2) In KREHL-MARCHAND, Allgemeine Pathologie, Bd. III, S. 2. 1921. — LAVES, W.: (1) Klin. Wschr. **1948**, 1534. — (2) Verh. deutsch. Ges. Path. **1948**, 134. — LILLIE, R. D.: (1) J. Labor. a. Clin. Med. **32**, 910 (1947). — (2) Stain Technol. **26**, 123 (1951). — (3) Stain Technol. **27**, 37 (1952). — LILLIE, R. D., and I. GRECO: Stain Technol. **22**, 67 (1947). —

LISON, L., et DAGNELIE: *Bull. Histol. Appl.* **12**, 85 (1935). — McMANUS, J. F. A.: *Nature (Lond.)* **158**, 202 (1946). — McMANUS, J. F. A., and J. E. CASON: *J. of Exper. Med.* **91**, 651 (1950). — PEARSE, A. G. E.: (1) *J. Clin. Path.* **2**, 81 (1949). — (2) *J. of Path.* **62**, 351 (1950). — (3) *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London: J. & A. Churchill Ltd. 1953. — PISCHINGER, A.: (1) *Z. Zellforsch.* **3**, 169 (1926). — (2) *Pflügers Arch.* **217**, 205 (1927). — RINEHART, J. F., and S. K. ABUL-HAJ: *Arch. of Path.* **52**, 189 (1951). — ROULET, F.: *Methoden der Pathologischen Histologie*, S. 217. Wien: Springer 1948. — SCHWIETZER, C. H.: *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, 17.

Dr. PETER GEDIGK, Patholog. Institut der Universität Marburg/Lahn.

---