

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Die Verarbeitung und Speicherung von phagocytiertem Eisen im elektronenmikroskopischen Bild*

Von

WOLFGANG WESSEL und PETER GEDIGK

Mit 12 Textabbildungen in 29 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 28. August 1959)

Das Depoteisen wird in den speichernden Zellen in zwei verschiedenen Formen, und zwar als Ferritin und als Siderinpigment (Hämosiderin) abgelagert. In beiden Fällen liegt eine Bindung des gespeicherten Schwermetalloxydes an organische Substanzen vor. Im Ferritin sind die Eisenhydroxydmicellen an das Protein Apoferritin gebunden (LAUFBERGER 1937, KUHN u. Mitarb. 1940, sowie GRANICK 1946—1949), im Siderin an eine organische Trägersubstanz, welche eiweißgebundene Mucopolysaccharide (bzw. Mucoproteide) und in geringem Umfang auch Lipide enthält (GEDIGK u. Mitarb. 1953—1958, sowie GöSSNER 1953). Seit langem ist es bekannt, daß beide Depoteisenfraktionen unter Umständen ineinander übergehen können.

Seit der Entdeckung von FARRANT (1954) u. a., daß sich die Eisenmicellen des Ferritins und Siderins im Gewebsschnitt elektronenoptisch direkt darstellen lassen, ist wiederholt versucht worden, die intracelluläre Ablagerung und Speicherung des Eisens auch im submikroskopischen Bild zu verfolgen (SCHULZ 1956, 1957; BESSIS und BRETON-GORIUS 1957; GIESEKING 1957; STOECKENIUS 1957; RICHTER 1957, 1958, 1959; LINDNER 1958 u. a.). Die hierbei erzielten Ergebnisse waren jedoch bisher uneinheitlich: So konnte weder über den Eintritt des Eisens in die Zelle noch über die Natur der am Umbau und an der Speicherung des Eisens beteiligten Cytoplasmastrukturen eine Einigkeit erzielt werden. Weiterhin war die Frage offengeblieben, in welcher Weise in diesen Zellen gegebenenfalls eine Umwandlung des Siderins in das Ferritin erfolgt. Und schließlich blieben die näheren Beziehungen zwischen den lichtmikroskopisch nachgewiesenen Trägersubstanzen des Siderins und den von ihnen gebundenen Eisenmicellen zu klären.

Um zur Lösung dieser Probleme beizutragen, versuchten wir zunächst das Schicksal des phagocytierten Eisens im Tierexperiment zu verfolgen. Diese Versuchsanordnung hatte den Vorteil, daß die Auseinandersetzung der Zelle mit dem anflutenden Eisen unmittelbar, d. h. ohne die Zwischenschaltung des Transporteiweißes des Blutes, des Transferrins, erfolgte, und daß das Alter der jeweils untersuchten intracellulären Eisenablagerungen genau festlag. Dem steht allerdings gegenüber, daß diese Beobachtungen nur einen Einblick in die Vorgänge bei der Eisenspeicherung von Phagocyten, bzw. von den zur Phagocytose befähigten Zellen gewähren, und vorerst noch keine Rückschlüsse auf die Speicherung und Verarbeitung des Eisens in Parenchymzellen zulassen.

* Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Versuchsanordnung und Methoden

Bei allen Versuchen verwendeten wir 10—20 Wochen alte weiße Inzuchtmäuse, welche eine Mischkost (Würfelfutter, sowie zusätzliche Salatblätter und Karotten) erhielten. In der ersten Versuchsgruppe injizierten wir 30 Tieren je 0,2 ml einer 0,6%igen und 30 weiteren Tieren 0,2 ml einer 0,02%igen Lösung von kolloidalem Eisen unter die Rückenhaut. Bei einer zweiten Gruppe von Experimenten verabfolgten wir subcutan 30 Mäusen 0,2 ml einer 20%igen Suspension von Rinderhämoglobin (Merck) und weiteren 30 Tieren je 0,2 ml einer 5%igen Hämoglobinsuspension in physiologischer Kochsalzlösung. 3, 4, 5, 6, 10, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 Tage nach der Injektion töteten wir die Tiere durch Nackenschlag und präparierten sofort die dunkelbraun gefärbten Granulome aus der Subcutis heraus. Die Fixierung erfolgte in einem Gemisch von gepufferter 1%iger Osmiumsäure und 1%iger Kaliumbichromatlösung. Anschließend wurde das Material mit Alkohol entwässert und in einem Gemisch von Methyl- und Butylmethacrylat (1:5) eingebettet. Die Blöcke wurden mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom geschnitten und teils mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop EM 8, teils mit einem Siemens-Elmiskop untersucht.

Von allen Versuchstieren wurde Gewebe zur lichtmikroskopischen Untersuchung entnommen. Dieses Material wurde vor und nach der Extraktion des Eisens (20%ige Salzsäure oder 5%ige Oxalsäure) mit Hämatoxyl-Eosin, Sudanschwarz, Gallocyanin-Chromalaun, sowie mit der PAS-Technik und der Feulgenreaktion gefärbt.

Untersuchungsergebnisse

A. Verarbeitung und Speicherung des injizierten kolloidalen Eisens. Die zur Injektion verwendete *kolloidale Eisenlösung* enthält fadenförmige Eisenhydroxyd-micellen, deren Durchmesser etwa 30 Å beträgt. Ihre Länge variiert in weiten Grenzen; sie überschreitet jedoch im allgemeinen nicht 150 Å. In Abständen von etwa 30—40 Å besitzen die Micellen punktförmige Verdichtungen (Abb. 1 b).

Wenige Tage nach der subcutanen Injektion trifft man das Eisen als fast homogene Massen in den Saftspalten; die scharf konturierte Gestalt der ursprünglichen Eisenpartikelmicellen ist nicht mehr zu erkennen. An diese Fremdkörper wandern dann Makrophagen heran und dringen durch Membranfaltung mit den Ausläufern ihres Cytoplasmas in ihn ein. Dabei bilden sich tiefe Zellbuchtungen, in denen amorphe Eisenansammlungen liegen. Der Übertritt des Eisens in das Cytoplasma erfolgt, wie die Abb. 1 a erkennen lässt, überwiegend durch *Membranvesiculation* (BENNET 1956, PALADE 1956, BESSIS und BRETON-GORIUS 1957): Die das Eisen umschließenden Einbuchtungen der Zellmembran werden an der Peripherie abgeschnürt und verlieren dadurch ihre Verbindung mit dem extracellulären Raum (Abb. 1 a). Auf diese Weise entstehen im Zelleib unregelmäßig begrenzte, etwa 0,5—1 μ große eisenhaltige Vacuolen, die anfangs nur eine ganz feine begrenzende Membran besitzen, bei der es sich um Reste der Zellmembran handeln könnte. Schon nach wenigen Tagen werden die Vacuolen mit einer einfachen, aber ziemlich dicken Membran versehen. In späteren Stadien trifft man mitunter auch mehrere konzentrisch angeordnete Membranen, welche die Eisenansammlungen gegen das übrige Cytoplasma abgrenzen und manchmal an die äußere Membranstrukturen der Mitochondrien erinnern (Abb. 2 und 4 a). Diese intracytoplasmatischen Eisenanhäufungen, deren Größe an der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens liegt (0,5—1 μ), werden wir in Anlehnung an RICHTER im folgenden als Siderosomen bezeichnen.

Bei einem großen Eisenangebot lagern sich gelegentlich mehrere Siderosomen zu Schollen zusammen (Abb. 3), in denen man meistens noch gut die ursprünglichen Siderosomen mit ihren Membranen erkennt. Die Zusammenlagerung von

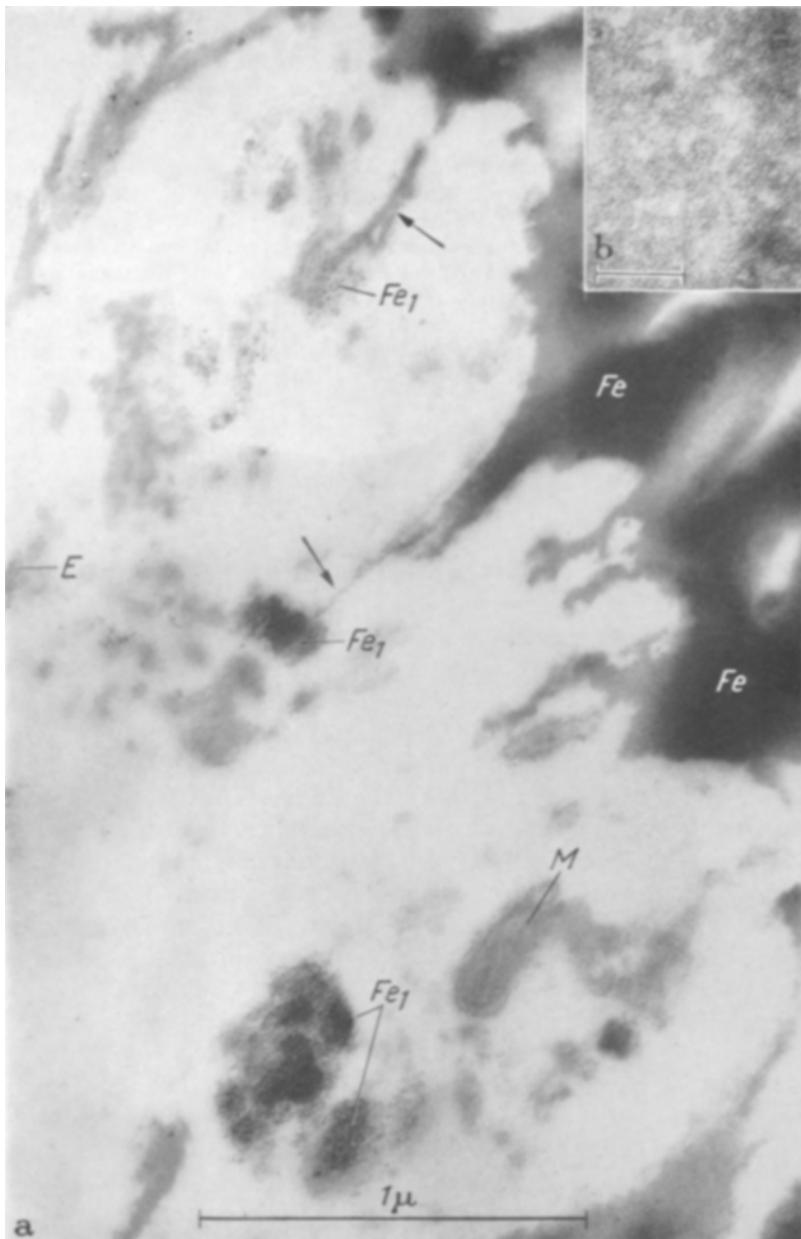


Abb. 1. a Junges Eisengranulom (20 Tage) nach der Injektion von kolloidalem Eisen. Das im Zwischengewebe liegende Eisen (Fe) wird auf dem Wege der „Membranvesikulation“ in das Cytoplasma der Makrophagen hineingezogen. Dabei verliert das Eisen seine fast homogene Struktur und erscheint dann in Form von feinkörnigen, dicht zusammenliegenden Massen (Fe_1), die oft noch über tiefe Membranfalten (→) mit den großen interstitiellen Eisenmassen in Verbindung stehen. Die Fe -Partikel im Cytoplasma haben eine Größe von etwa 60–80 Å. Mitochondrien (M); Ergastoplasm (E), Vergr. 50000fach. b Kolloidales Eisen vor der Injektion (auf Objekträgernetz aufgetropft). Die Eisenmicellen sind fadenförmig und haben einen Durchmesser von 20–30 Å. Ihre Länge variiert sehr stark. Siemens-Elmiskop; Vergr. 100000fach

Siderosomen ist wahrscheinlich reversibel, denn aus dem großen scholligen Verband können sich offenbar kleinere Eisenanhäufungen ablösen, um als Sidero-

somen wieder in der Zelle zu erscheinen. In älteren Eisengranulomen sind nämlich derartige große Schollen nur noch sehr selten zu finden.

Mit dem Übertritt in das Cytoplasma ändert sich das morphologische Bild des abgelagerten Eisenhydroxyds. Die zunächst fast homogen erscheinenden, dicht

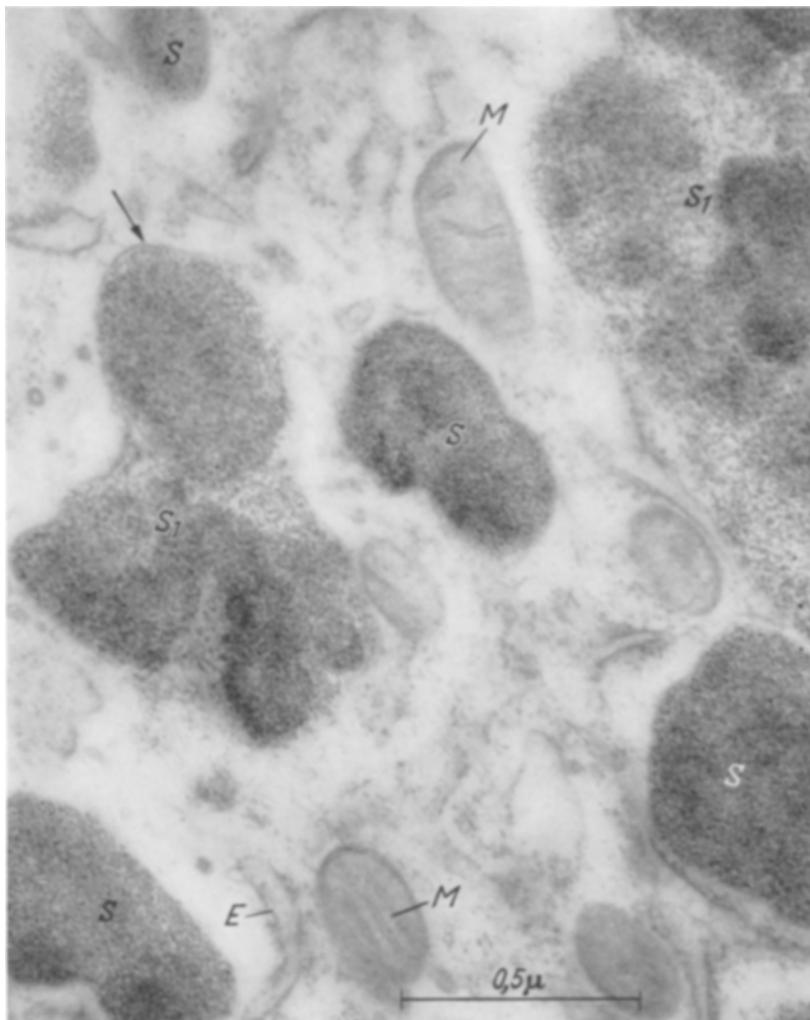


Abb. 2. Älteres Eisengranulom (2 Monate) nach Injektion von kolloidalem Eisen. Im Cytoplasma des hier abgebildeten Makrophagen zahlreiche Siderosomen (S), die sich bei starkem Eisenangebot oft zu großen Schollen (S_1) zusammenlagern. Dabei bleibt die Abgrenzung der einzelnen Siderosomen meist deutlich sichtbar. Die Eisenansammlungen sind stets von einer einfachen oder manchmal auch mehrschichtigen Membran (\rightarrow) umgeben. In den Siderosomen bestehen die Eisenpartikel aus kommaförmigen Gebilden mit wechselnder Länge. Das im Cytoplasma feinverteilte Eisen hingegen erscheint punktförmig und hat große Ähnlichkeit mit Ferritin-Partikeln. Die Mitochondrien (M) sind stets frei von Eisen. Siemens-Elmiskop; Vergr. 80000fach

gepackten Eisenmassen werden in den intracytoplasmatischen Vacuolen sehr bald wieder aufgelockert. Die Eisenpartikel erscheinen dann als dichte, komma- bis fadenförmige etwa 150–200 Å lange Gebilde, die zunächst offenbar die kleinste elektronenmikroskopisch auflösbare Einheit des phagocytierten Eisens darstellen.

Zwischen ihnen findet sich eine verhältnismäßig kontrastarme homogene Masse (Abb. 2—4).

In der Regel liegen die Eisenmicellen innerhalb der Siderosomen, daneben trifft man aber auch kleine Micellen isoliert im Hyaloplasma. Sie besitzen dann

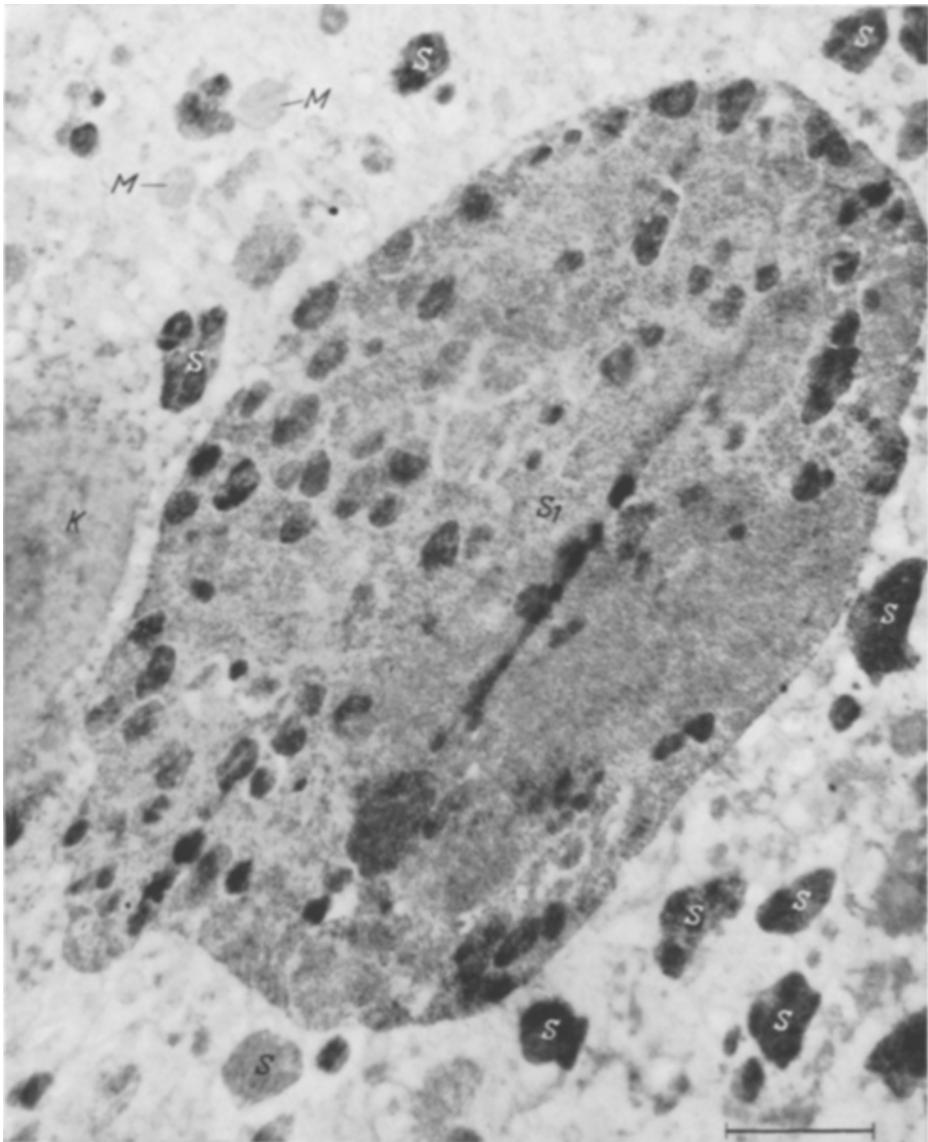


Abb. 3. Eisengranulom (5 Monate) nach der Injektion von kolloidalem Eisen. In der Zelle eine große Eisenscholle (S_g), die sich aus zahlreichen kleineren Siderosomen zusammensetzt. Die Mitochondrien (M) speichern kein Eisen! Siderosomen (S). Zellkern (K). Zeiss EM 8; Vergr. 30 000fach

nicht die längliche Form wie in den Siderosomen, sondern erscheinen als punktförmige, manchmal viereckige Teilchen, die eine große Ähnlichkeit mit den Eisenmicellen des Ferritins haben (Abb. 2).

Mit zunehmendem Alter (nach 1—2 Monaten) kommt es infolge des Auseinanderweichens der Eisenaggregate zu einer weiteren Auflockerung der Siderosomen, deren Größe zunächst im wesentlichen unverändert bleiben. Dabei erfolgt eine Vermehrung der die Eisenteilchen einhüllenden Grundsubstanz, die jetzt teils elektronenoptisch relativ dicht, teils eher kontrastarm erscheint. Vermutlich handelt es sich hierbei um Anteile der organischen Trägersubstanz des Eisenpigmentes (Abb. 2—4, vgl. S. 526). In noch älteren Granulomen (nach 5 bis 8 Monaten) findet man gelegentlich einen Umbau der fadenförmigen Aggregate in mehr punktförmige viereckige, etwa 55 Å große Gebilde, die nach Form und Größe den Eisenmicellen des Ferritins entsprechen (Abb. 5 a und b).

In alten Eisengranulomen können die Siderosomen dichte, homogene rundliche Gebilde enthalten, bei denen es sich um Lipidansammlungen handeln dürfte (Abb. 4b). — Bei einigen Siderosomen sieht man im Zentrum eine dichte Zusammenlagerung des Eisens und um diesen dichten „Kern“ eine lockere Außenzone. Dadurch entsteht der Eindruck, daß diese Siderosomen appositionell gewachsen sind.

Bei allen Untersuchungen fiel auf, daß sich die Mitochondrien nicht an der Eisenspeicherung beteiligten.

Bei der Osmiumfixierung kann das reduzierte Osmium in der Zelle zu einer Überlagerung der Eisenstrukturen führen, so daß eine Unterscheidung zwischen Osmium- und Eisenteilchen schwierig würde, zumal ja anzunehmen ist, daß eine ebenfalls Osmium reduziert. Unsere Versuche, das Material mit Formalin

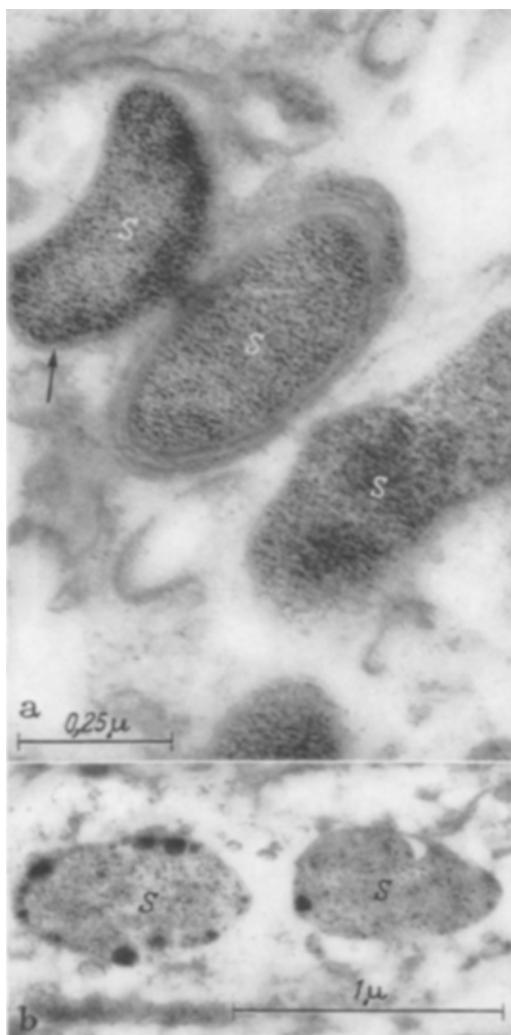


Abb. 4. a Altes Eisengranulom (6 Monate) nach Injektion von kolloidalem Eisen. Die Siderosomen (S) sind von einer dicken Membran umgeben, die teilweise aus zwei Lamellen (→) aufgebaut ist. Eines der Siderosomen wird von etwa sechs konzentrischen Membranen umschlossen, zwischen denen vereinzelt Eisenpartikel liegen. Vergr. 80000fach. Siemens-Elmiskop. b Zellausschnitt eines Granuloms (5 Monate) nach Injektion von kolloidalem Eisen. In den Randpartien der Siderosomen (S) dichte osmophile, runde Bezirke. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um kleine Ansammlungen von Lipiden, die in alten Granulomen häufig auftreten. Zeiss EM 8; Vergr. 35000fach

die Trägersubstanz des Siderinpigmentes ebenfalls Osmium reduziert. Unsere Versuche, das Material mit Formalin

zu fixieren, ergaben jedoch wenig zufriedenstellende Resultate. Die Eisenmicellen liegen dann in den Randpartien der Siderosomen, während das Zentrum

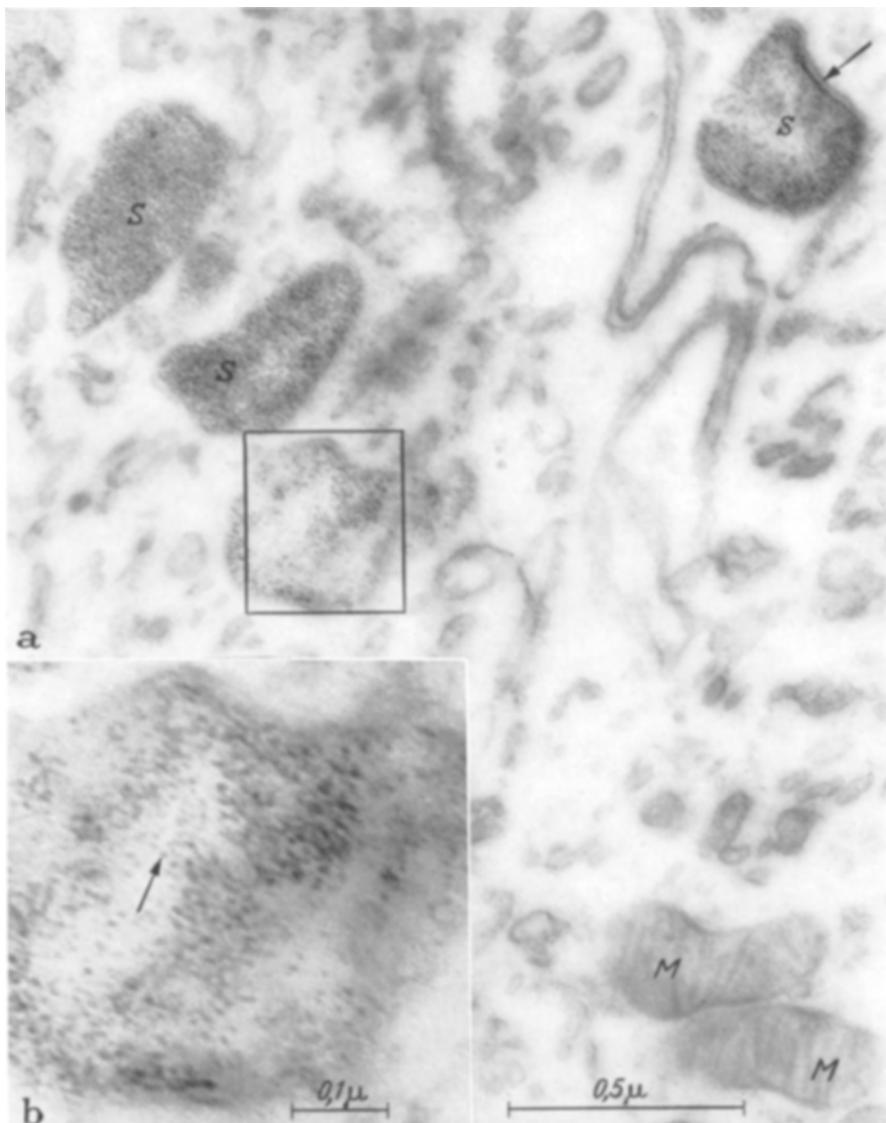


Abb. 5. a Altes Eisengranulom (5 Monate) nach der Injektion von kolloidalem Eisen. In einem der beiden Siderosomen Einlagerung einer homogenen Substanz und Auflockerung der Eisenpartikel, bei denen es sich nach Form und Größe teilweise um Ferritinstrukturen handelt. Siderosomen (S); Mitochondrien (M) frei von Eisen. Vergr. 60000fach. Siemens-Elmiskop. b Ausschnitt aus Abb. 5a. Innerhalb der viereckigen Micellen ist häufig eine deutliche Vierergruppierung erkennbar, unter anderem an der mit (→) bezeichneten Stelle. Vergr. 120000fach. Siemens-Elmiskop

strukturlos erscheint (Abb. 6). Dies könnte vielleicht zu der Vermutung führen, daß sich die Trägersubstanz in der Mitte der Siderosomen befindet, während sich das Eisen ringsum anlagert. Nach der Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure stellte es sich aber heraus, daß zwar das Ergasto-

plasma die Mitochondrien und auch die Randzone der Siderosomen stärker gefärbt wurden, ihre Mitte jedoch nach wie vor leer erschien. Daraus ist wohl zu schließen, daß die Formalinfixierung zu einer Verlagerung des Eisens und seiner Trägersubstanzen in die Randbezirke der Siderosomen führt und diesen Bildern nur ein Fixierungsartefakt zugrunde liegt.

B. Verarbeitung und Speicherung des injizierten Hämoglobins. Die auf einen Objektträger aufgetropfte Hämoglobinlösung erscheint im Vergleich zu der oben beschriebenen kolloidalen Eisenlösung weniger kontrastreich. Die einzelnen Eisenaggregate sind etwa 3–4 mal so groß wie die anorganischen Eisenmicellen (Abb. 7b): Sie besitzen eine Länge von 400 und einen Durchmesser von etwa 200 Å. In ihnen kann man jedoch mitunter noch Untereinheiten von 80 Å erkennen.

Nach der *subcutanen Injektion* liegt das Hämoglobin zunächst als fast homogene Masse in den Gewebsspalten. Der Übertritt in das Cytoplasma der Makrophagen vollzieht sich nach dem gleichen Prinzip wie bei dem kolloidalen Eisen. In Abb. 7a und 8 erkennt man, wie einzelne Zellen gegen das im Zentrum des Bildes liegenden Hämoglobin vordringen, wobei die Zellmembranen tiefe Einbuchtungen bilden und den Fremdkörper über den Mechanismus der Membranvesikulation in das

länglichen Fe-Teilchen, die bei dichtester Packung einen Abstand von etwa 50 Å haben. Zeiss EM 8; Vergr. 30 000fach. b Zellausschnitt eines Granuloms nach Injektion von kolloidalem Eisen (1 Monat). (Formalinfixierung und Nachkontrastierung mit Phosphorwolframsäure). Es stellen sich nur die Randpartien der größeren Siderosomen (S) dar, während die Zentren meist leer erscheinen. Offenbar wandert das Eisen bei der Formalinfixierung in die Randpartien der Siderosomen. Zeiss EM 8; Vergr. 22 000fach

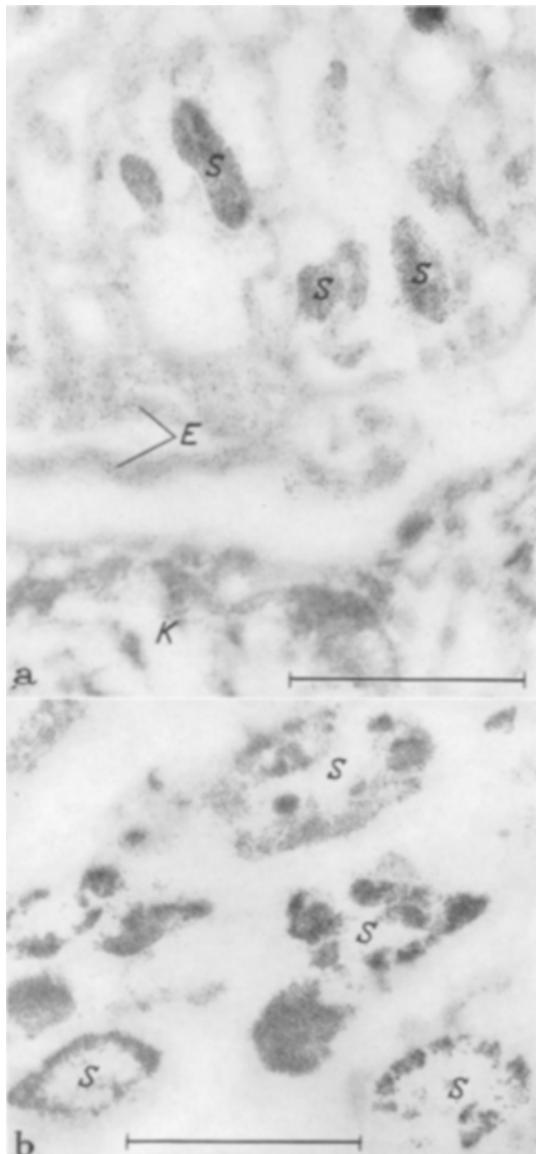


Abb. 6. a Zelle eines Eisengranuloms nach Injektion von kolloidalem Eisen (5 Monate). Formalinfixierung. Das lamelläre Ergastoplasm (E) speichert Eisen in feinverteilter Form, das eine große Ähnlichkeit mit Ferritin besitzt. Daneben Siderosomen (S) mit größeren Ferritinpartikeln. b Zellausschnitt eines Granuloms nach Injektion von kolloidalem Eisen (1 Monat). (Formalinfixierung und Nachkontrastierung mit Phosphorwolframsäure). Es stellen sich nur die Randpartien der größeren Siderosomen (S) dar, während die Zentren meist leer erscheinen. Offenbar wandert das Eisen bei der Formalinfixierung in die Randpartien der Siderosomen. Zeiss EM 8; Vergr. 22 000fach

Cytoplasma einschleusen. Besonders deutlich wird dieser Vorgang in Abb. 8. Hier wurde offenbar die phagocytierende Zelle bei der Gewinnung des

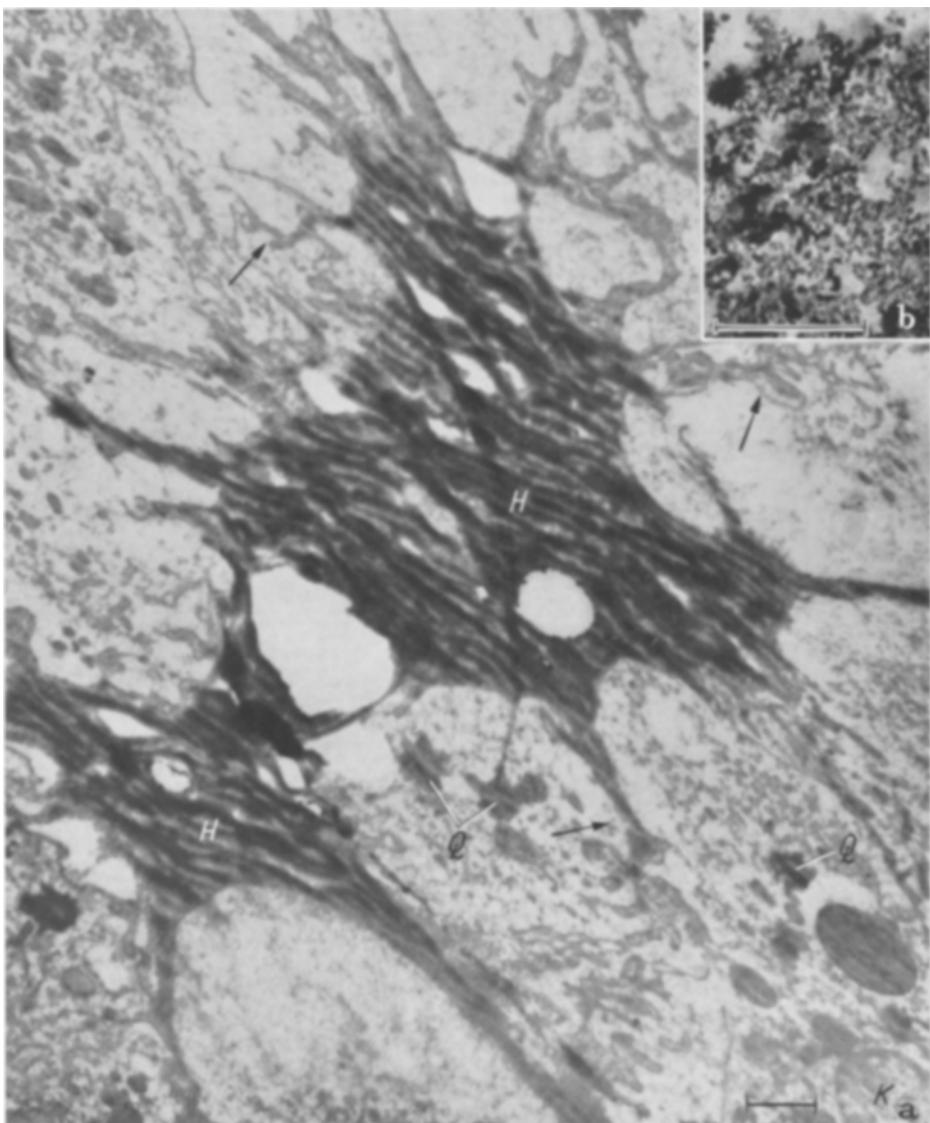


Abb. 7. a Granulom 14 Tage nach der subcutanen Injektion von Rinder-Hb (Übersicht). Die Zellen wandern gegen die im Interstitium liegenden Hb-Massen (H) vor, wobei die Zellmembranen tiefe Buchten bilden (→), in denen Hb-Partikel liegen. Querschnitte der Buchten (Q). Es handelt sich hier nicht um Fetttropfen! Auf den interstitiellen Hb-Bezirken deutliche Schwingungsartefakte. Zellkern (K). Zeiss EM 8; Vergr. 9000fach. b Rinderhämoglobin vor der Injektion. Aufgetropft auf ein Objektträgernetz. Die Fe-Partikel haben eine Länge von etwa 400 Å und eine Dicke von etwa 200 Å

Materials von dem extracellulär liegenden Hämoglobin abgezogen, so daß zwischen beiden ein breiter Spalt entstand. Diese künstlich erzeugte Gewebslücke wird von hämoglobinhaltigen Straßen durchzogen, welche zu den bereits in Abschnürung begriffenen Einbuchtungen in der Zellmembran hinführen.

Auf der rechten Seite des Bildes sind bereits vollständig abgeschnürte Anteile des Cytoplasmas zu finden. Ein Unterschied zwischen der Aufnahme des anorganischen und organischen Eisens in die Zelle besteht nur insofern, als das Eisenhydroxyd eher in kleinen Portionen in die Zelle gelangt, während das Hämoglobin in etwas größeren zusammenhängenden Klumpen aufgenommen wird.

Diese primären, in intracytoplasmatischen Vacuolen liegenden Eisenansammlungen werden zunächst nur von einer schmalen, wenig kontrastgebenden Mem-

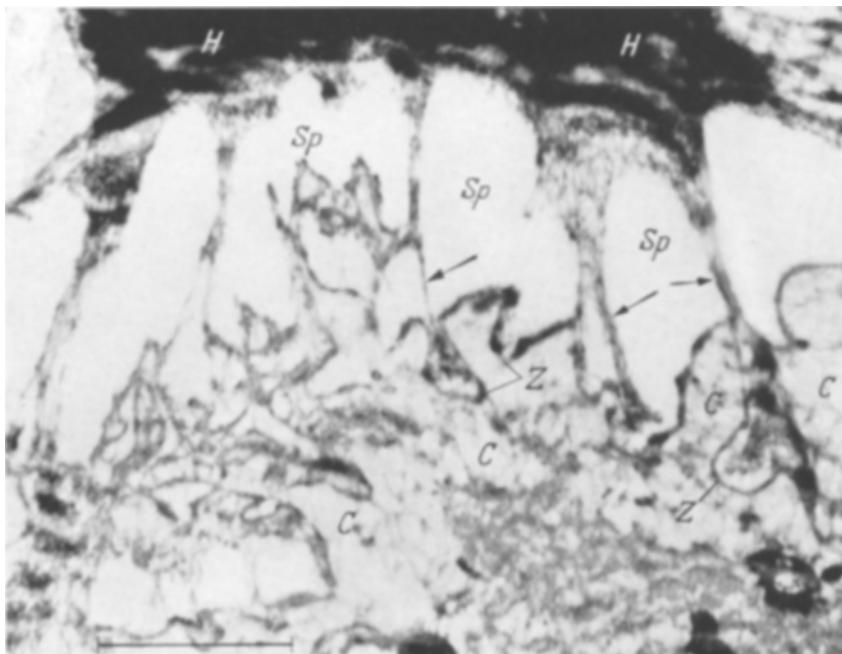


Abb. 8. Makrophage 14 Tage nach der Injektion von Rinder-Hämoglobin. Bei der Präparation wurde die Zelle zufällig von dem interstitiellen Hb (H) abgezogen, wodurch ein Spalt zwischen beiden entstand (Sp). Man erkennt deutlich die aus Hb-Teilchen bestehenden Straßen (→), die diesen Spalt-Raum durchziehen und zu tiefen Einbuchtungen der Zellmembran (Z) hinführen. Auf diese Weise wird die Phagocytose der Hb-Teilchen durch „Membranvesikulation“ vorbereitet. Cytoplasma (C). Zeiss EM 8; Vergr. 25 000fach

bran umgeben, die sich dann allmählich verdickt. In Form und Größe entsprechen sie weitgehend den bereits bei der Verarbeitung des kolloidalen Eisens beschriebenen Siderosomen (Abb. 9 und 10). Genau wie diese vermögen sie sich auch zu größeren Schollen zusammenzulagern. In älteren Stadien können in der verdichteten Grundsubstanz der Siderosomen manchmal Membranstrukturen auftreten, die zuweilen sogar die Gestalt der Cristae mitochondriales nachahmen. In Abb. 10a sind diese Membranen angedeutet wiedergegeben.

Sehr deutlich ist der Umbau des phagocytierten Hämoglobins, der bereits kurz nach der Aufnahme in das Cytoplasma erfolgt. Die anfangs fast amorphen Hämoglobinmassen werden aufgelockert, indem zwischen den eisenhaltigen Partikeln eine relativ kontrastarme, homogene Grundsubstanz in Erscheinung tritt. Gleichzeitig verdichtet sich das Eisen in Form von bis etwa 200 Å langen Micellen, die — genau wie bei dem injizierten kolloidalen Eisen — zunächst ein komma- bis fadenförmiges Aussehen besitzen.

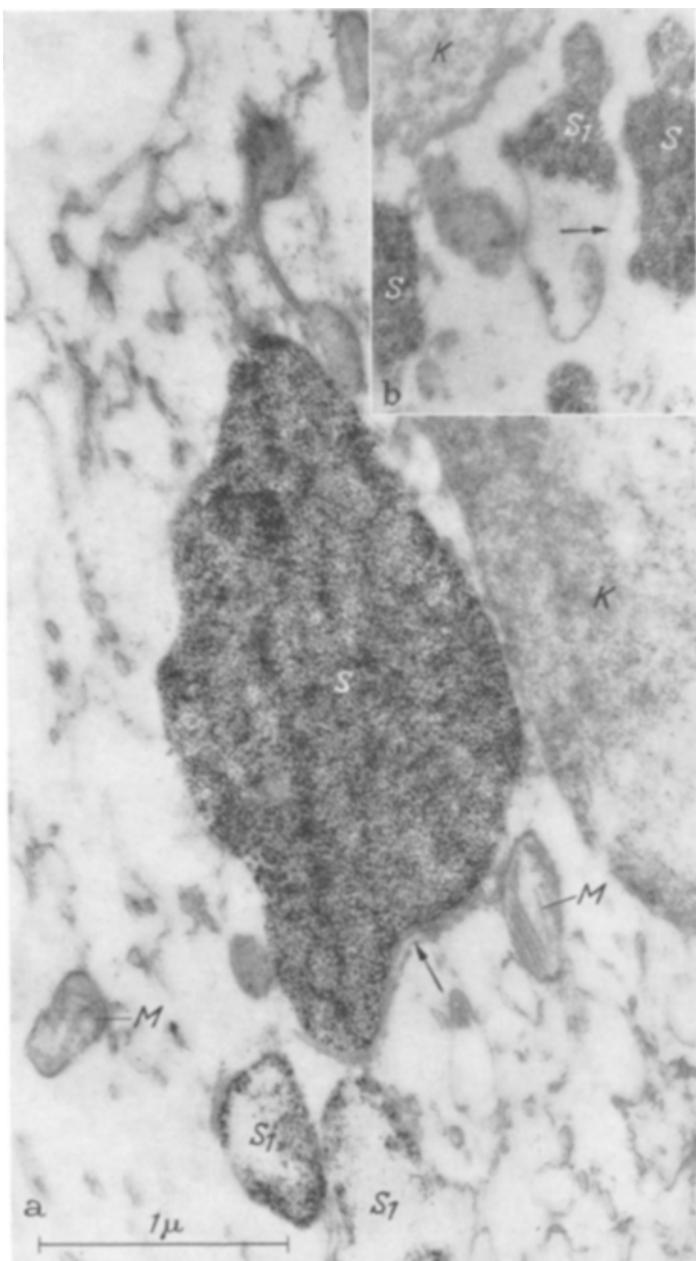


Abb. 9. a Zelle eines Granuloms 3 Monate nach subcutaner Injektion von Rinder-Hb. Neben dem Zellkern (K) eine große Eisenscholle (S), die von einer mehrschichtigen Membran eingeschlossen wird (\rightarrow). Daneben zwei kleinere Siderosomen (S_1), die ihr Eisen größtenteils abgegeben haben, besonders im Zentrum. In dem rechten Siderosom wurde das Eisen offenbar schon als Ferritin gespeichert. Zeiss EM 8; Vergr. 32000fach. b Zelle eines Eisengranuloms 3 Wochen nach der subcutanen Injektion von Rinder-Hb. Die durch Membranvesikulation eingeschleusten Eisenpartikel liegen in dichten Ansammlungen [Siderosomen (S)] zusammen und sind von einer einfachen Membran umgeben. Bei „ S_1 “ hat sich ein Siderosom teilweise entleert, während die Membran als leere Hülle (\rightarrow) im Cytoplasma liegt. Die Siderosomen stellen keine präformierten Cytoplasmastrukturen wie etwa Mitochondrien oder Cytosomen dar. Zellkern (K). Zeiss EM 8; Vergr. 30000fach

Im Laufe der Alterung kommt es dann zu einer allmählichen Vermehrung und Verdichtung der Grundsubstanz der Siderosomen, so daß die Eisenmicellen noch weiter auseinanderrücken. Die ursprünglich komma- bis fadenförmigen Micellen werden dabei zu fast punktförmigen, etwa 55 Å großen Gebilden umgelagert, die in ihrer Gestalt dem Eisenbaustein des Ferritins entsprechen (Abb. 10 a und b).

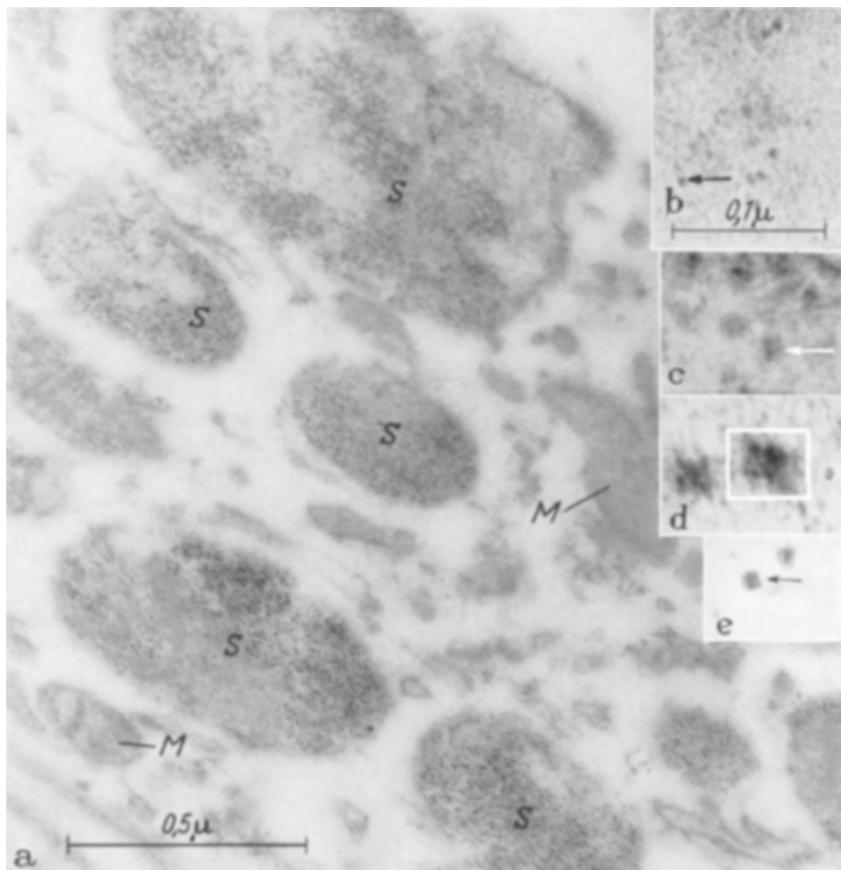


Abb. 10. a Zelle eines Eisengranuloms 14 Tage nach Injektion ganz geringer Mengen von Rinder-Hgb. Schneller Umbau der großen, länglichen Eisenpartikel in die punktförmigen Ferritin-Teilchen. Die Siderosomen (S), welche kurz nach ihrer Entstehung, d. h. nach der Phagocytose der Fe-Partikel noch keine elektronenoptisch nachweisbare Grundsubstanz besaßen, enthalten jetzt eine homogene, leicht osmiophile Substanz, in welcher mitunter Doppelmembranen oder unregelmäßige Membransysteme auftreten. Dies kann leicht dazu führen, daß man die Siderosomen für eisenspeichernde Mitochondrien hält. Die Mitochondrien (M) selbst sind auch hier frei von Eisen. Siemens Elmiskop, Vergr. 60000fach. b—e Eisenpartikel eines Siderosoms bei starker Vergrößerung. Der Pfeil bezeichnet die Vierergruppe einer Ferritin-Micelle. b Vergr. 200000fach, c Vergr. 500000fach, d Vergr. 650000fach, e Vergr. 450000fach. Siemens-Elmiskop

Mitunter kommt es vor, daß sich ein Siderosom teilweise von Eisenpartikeln entleert und nur noch die Membran als leerer Schlauch im Cytoplasma sichtbar ist (Abb. 9 b).

Wie beim kolloidalen Eisen, so zeigen auch hier die Siderosomen manchmal Besonderheiten, wie Zusammenlagerungen zu großen Eisenschollen, appositionelles Wachstum und Einlagerung runder Lipidbezirke. Bei der Formalin-

fixierung kommt es ebenfalls zu einer Ansammlung des Eisens in den Randbezirken.

Die nicht in den Siderosomen eingeschlossenen, sondern frei im Cytoplasma liegenden Eisenpartikel zeigen bereits 3—6 Tage nach der Injektion des Hämoglobins eine deutliche Umwandlung in punktförmige, dem Ferritin entsprechende Partikel. Besonders zu den Ergastoplasmamembranen hat das Eisen offenbar eine gewisse Affinität, da es sich dort oft anlagert. Die Mitochondrien haben sich dagegen auch in diesem Untersuchungsgut nicht an der Eisenspeicherung beteiligt.

C. Cytologische Besonderheiten der eisenspeichernden Zellen. Die Makrophagen sind zunächst arm an Cytoplasmastrukturen (Abb. 2), entwickeln aber im Laufe der Zeit ein hochdifferenziertes Cytoplasma. In einigen Granulomen schienen zwei Formen von eisenverarbeitenden Mesenchymzellen aufzutreten: der eine Zelltyp, welcher zahlenmäßig ganz im Vordergrund stand, enthielt sehr reichlich Siderosomen und wies nur wenig lamelläres Ergastoplasma auf. Die andere, vereinzelt auftretende Zellart war durch einen großen Ergastoplasmareichtum gekennzeichnet und besaß nur einen spärlichen Gehalt an Siderosomen. Das Eisen war hier vielfach in feinverteilter Form an den Ergastoplasmalamellen angelagert. Auch lichtmikroskopisch waren zwei Arten von eisenhaltigen Zellen zu erkennen, die sich durch das Ausmaß der Eisenspeicherung und die Basophilie des Cytoplasmas voneinander unterschieden. Auf Grund unserer bisherigen Untersuchungen scheint es sich bei diesen Makrophagen nicht um zwei verschiedene Zelltypen, sondern um Spielarten der gleichen phagocytierenden Mesenchymzelle zu handeln, die sich wahrscheinlich ineinander umwandeln können und nur verschiedene Entwicklungsstufen der gleichen speichernden Zelle entsprechen. Diese Frage bedarf noch der weiteren Bearbeitung.

Nach längerer Versuchsdauer kam es in den Makrophagen nicht selten zu einem Auseinanderweichen der Ergastoplasmalamellen, zwischen denen weite, leere Räume entstanden. Auch die Mitochondrien zeigten dann manchmal eine ballonförmige Aufreibung; und etwa gleichzeitig traten auch Kernverdichtungen im Sinne einer Pyknose auf. Diese offensichtlich regressiven Veränderungen gingen mit einer allmählichen Verminderung der Zellzahl in alten Eisenablagerungen einher, in denen das ursprünglich zellreiche Granulationsgewebe einem mehr zellarmen, faserreichen Bindegewebe Platz machte. Anscheinend handelt es sich bei diesen Cytoplasmaveränderungen um Begleiterscheinungen der Nekrose der Makrophagen.

Außer in den phagocytierenden Zellen fanden wir auch in den *Basalmembranen der kleineren Gefäße* kleinste, feinverteilte Eisengranula. Die Gefäßendothelien enthielten dagegen nur außerordentlich wenig Eisen, und zwar auch dann, wenn die Zellen in der Umgebung dicht mit Siderosomen angefüllt sind.

In jüngeren Granulomen traten im Cytoplasma einzelner eisenspeichernder Zellen manchmal 100 Å breite Fasern auf, die eine ganz schwache Oberflächenosmierung, jedoch keine periodische Unterteilung besaßen. Mit zunehmendem Alter der Eisenablagerung nahmen die Zahl und Größe dieser Fasern zu, die schließlich eine kräftige Osmiumaffinität ihrer Oberfläche sowie eine Breite von 200 Å aufwiesen und dann nicht mehr intracellulär, sondern im Interstitium auftraten.

Bei den Versuchen mit Hämoglobin war das Eisen nach etwa 3 Monaten fast vollständig abgeräumt. An die Stelle des eisenspeichernden Granuloms war ein faserreiches Bindegewebe getreten. Die Fasern haben eine Dicke von etwa 500—800 Å und besitzen eine Periode von etwa 400 Å. Man kann auf Längsschnitten innerhalb der Periode eine dichte „D-Zone“ und eine helle „H-Zone“ unterscheiden, wobei die D-Zone aus zwei und die H-Zone aus vier Untereinheiten besteht (Abb. 11).

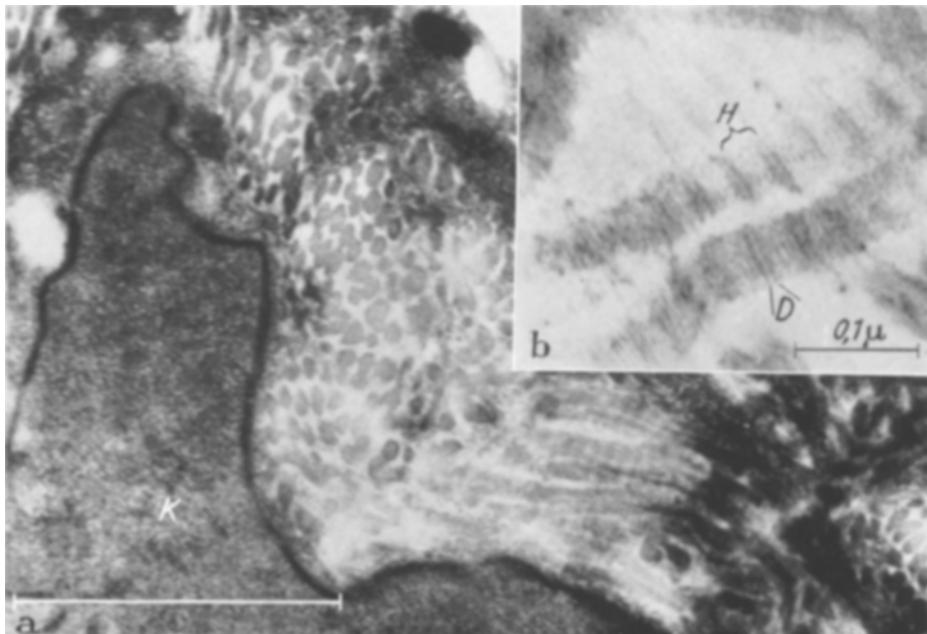


Abb. 11 a u. b. Eisengranulom nach vollständigem Abbau des injizierten Rinder-Hb. Die Makrophagen sind durch Bindegewebszellen ersetzt. Links im Bild ein Fibroblast mit schmalem Cytoplasma- saum und gelapptem Zellkern (K). Rings um den Fibroblast zahlreiche kollagene Fasern. Vergr. 42000fach. Siemens-Elmiskop. In der rechten oberen Bildecke eine Ausschnittsvergrößerung zweier kollagener Fasern mit einer Periode von etwa 400 Å. Die D-Zone (D) besteht aus 2 dunklen, breiten und die H-Zone (H) aus 4 helleren Streifen von etwa 30 Å Dicke. Vergr. 160000fach. Siemens-Elmiskop

Diskussion

1. Wie gelangt das Eisen in die Zelle?

Nach unseren Befunden werden das in der Subcutis abgelagerte kolloidale Eisen und Hämoglobin zum weitaus größten Teil — wenn nicht sogar ausschließlich — durch die Vesikulation der Zellmembran in das Cytoplasma der Makrophagen eingeschleust (vgl. Abb. 12, s. S. 509 und S. 515). Eine unmittelbare Diffusion von Eisenmicellen durch die Zellmembran in das Cytoplasma — so wie es GLESEKING (1957, 1958) bei der intratrachealen Verabfolgung von kolloidalem Eisen und anderen Fremdstoffen in Alveolardeckzellen beschrieben hat —, beobachteten wir bei unseren Versuchsbedingungen nicht.

Nur bei den isoliert im Grundcytoplasma der Speicherzellen liegenden und manchmal an die Ergastoplasmalamellen adsorbierten Eisenmicellen könnte man vielleicht an eine unmittelbare Permeation kleinstter Eisenpartikel durch die

Zellmembran denken. Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß diese isolierten Eisenmicellen ebenfalls durch Membranvesikulation in die Zelle gelangt und nur aus Siderosomen abgesprengt worden sind.

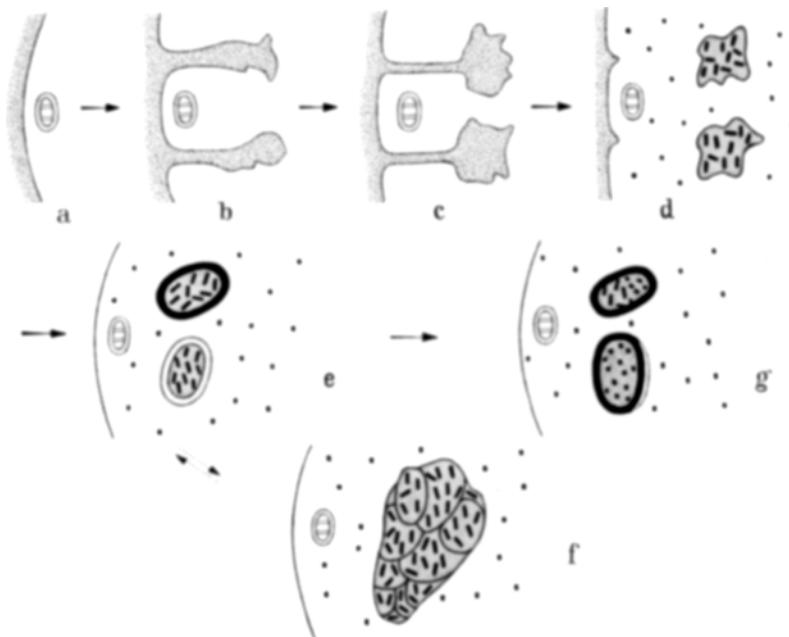


Abb. 12 a—g. Schematische Darstellung der Phagocytose und Verarbeitung von anorganischem und organischem Eisen in Makrophagen. Die phagocytierende Zelle dringt durch gesteigerte Membranfaltung mit den Ausläufern ihres Cytoplasmas in das injizierte, in dichter Packung liegende Eisen ein. Es entstehen tiefe Einbuchtungen der Zellmembran, in denen Anhäufungen des eisenhaltigen Materials liegen (a und b). In der Zellperipherie werden diese Buchten allmählich verschmäler (c) und durch nachfolgende Abschnürung in das Zellinnere aufgenommen (d). Die in Vakuolen liegenden, nunmehr intracytoplasmatischen Eisenansammlungen (Siderosomen) werden anfangs nur von einer ganz zarten Membran umgeben, bei der es sich offenbar um Reste der abgeschnürten Zellmembran handelt (d). Später erfolgt eine Verstärkung dieser Membran, die manchmal auch in konzentrische Lamellen aufgespalten wird (e). Bei einem großen Eisenangebot können sich die Siderosomen reversibel zu größeren Schollen zusammenlagern (f). — Die Eisenpartikel werden im Laufe der Zeit umgebaut, und zwar zunächst zu faden- bis kommaförmigen 150 Å langen Micellen (d—f) und schließlich zu den viereckigen, punktförmigen 55 Å großen Micellen des Ferritins. Gleichzeitig wird von der Zelle an die Siderosomen die organische Trägersubstanz abgegeben. (Diffuse Grautönung in d—g).
 ■ verabfolgte Eisenlösung, ▨ 150 Å lange Eisenmicellen, ▨ 55 Å große Micellen des Ferritins

2. Wo wird das Eisen in der Zelle abgelagert?

In Übereinstimmung mit SCHULZ (1956—1958), GIESEKING (1957, 1958), LINDNER (1958), RICHTER (1957—1959) u. a. stellten wir fest, daß phagocytiertes Eisen hauptsächlich in 0,1—1 μ großen, gut abgegrenzten, intracytoplasmatischen Körpern abgelagert wird, die wir in Anlehnung an RICHTER (1957) als Siderosomen bezeichnet haben. Über die Natur dieser Speicherorganellen gehen die Ansichten noch auseinander. So ist es insbesondere noch ungeklärt, wie sich Siderosomen neu bilden, und aus welchen Vorstufen sie gegebenenfalls entstehen. Die verschiedenen Meinungen lassen sich in zwei Punkten zusammenfassen: Eine Gruppe von Autoren führt die Siderosomen auf vorgebildete Cytoplasmaorganellen zurück, welche ein besonderes Speicherungsvermögen besitzen und bei der Verarbeitung des Eisens ihre Gestalt und Zusammensetzung ändern sollen.

Andere vertreten die Ansicht, daß die speichernden Granula durch den Vorgang der Phagocytose neu entstehen, daß ihnen also nicht präformierte strukturelle Differenzierungen des Cytoplasmas zugrunde liegen. Im einzelnen beruhen diese Anschauungen auf folgenden Beobachtungen:

RICHTER (1957, 1958) fand in den Siderosomen von Parenchymzellen der Leber von Reticulumzellen der Milz und von Tubulusepithelien der Niere kurze Membranstrukturen, die an die Christae mitochondriales erinnerten. Da die eisenhaltigen Zellgranula außerdem in ihrer Größe weitgehend den Mitochondrien entsprachen, hielt er es für möglich, daß sie aus diesen Zellorganellen entstanden wären. Ihre uneinheitliche Struktur führte er auf Entwicklungs- und Alterungsvorgänge zurück, die mit der Eisenverarbeitung und Speicherung einhergehen sollten. BESSIS und BRETON-GORIUS (1957) wiesen auf die Eisenspeicherung von Mitochondrien von Erythroblasten hin. Auch nach CAROLI u. Mitarb. (1957) wird Eisen in Mitochondrien abgelagert. Demgegenüber betont aber MILLER (1958), daß die Deutung der Speichergranula als veränderte Mitochondrien noch nicht als gesichert gelten dürfte. Weder morphologisch noch biochemisch ist es nach der Ansicht dieses Autors gerechtfertigt, Mitochondrien generell als Speicherorganellen zu bezeichnen. Auch GIESEKING (1957, 1958) hebt ausdrücklich hervor, daß phagocytiertes Eisenhydroxyd keine Beziehungen zu Mitochondrien erkennen läßt.

SCHULZ (1956) ordnete die eisenhaltigen Cytoplasmagranula den Cytosomen zu, die nicht nur der Speicherung von Eisenhydroxyd dienen, sondern auch andere Substanzen, wie kolloidale Kieselsäure (POLICARD und Mitarb. 1957) und Eiweißstoffe aufnehmen. An Hand von Untersuchungen am Alveolarepithel stellte SCHULZ (1958) eine Entwicklungsreihe der Cytosomen auf, deren Grundform mit den von RHODIN (1954) in Bürstensaumzellen von Tubulusepithelien der Mäuseiere, sowie mit den von ROUILLER und BERNHARD (1956) in regenerierenden Leberzellen und nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung als „Microbodies“ beschriebenen Gebilden identisch sein soll. Besonders interessant ist die Beobachtung, daß in „Microbodies“ auch Doppelmembranen auftreten können (GANSLER und ROUILLER 1956, ROUILLER und BERNHARD 1956, SCHULZ 1958). Vielfach wird daher angenommen, daß diese corpusculären Cytoplasmaelemente auch Vorstufen von Mitochondrien sein können.

GIESEKING (1957, 1958) beobachtete in Alveolardeckzellen der Lunge bei der Resorption und Speicherung von kolloidalem Eisen und anderen Metallhydroxyden, daß diese Fremdkörper keine Beziehungen zu präformierten strukturellen Differenzierungen des Cytoplasmas besaßen, sondern in zunächst wasserhaltigen Vacuolen abgelagert wurden, die bei der Pinocytose entstanden waren. Diese intracytoplasmatischen Hohlräume erwiesen sich als sehr beständig und stellten auch die Sammelplätze für die zunächst diffus im Cytoplasma abgelagerten Metallteilchen dar, die sich dann sekundär in ihrem Inneren anreicherten. Hier erfolgte auch die weitere Verarbeitung der Fremdkörper.

PALADE (1956) fand im Cytoplasma von Makrophagen der Milz 0,1—1 μ große polymorphe Gebilde, die er als „round bodies“ oder „residual bodies“ bezeichnete. Sie enthielten eine feinkörnige, sehr dichte Substanz, bei der es sich nach der Ansicht dieses Autors wahrscheinlich um gespeichertes Eisen, und zwar um Ferritin und Hämosiderin handelte. PALADE, vermutete, daß diese eisenhaltigen Körper bei der Phagocytose entstehen und möglicherweise Reste von Vacuolen darstellen. In Leberzellen beschrieben PALADE und SIEKERTZ (1956) den „residual bodies“ weitgehend ähnelnde osmophile peribiliäre Körper („dense peribiliar bodies“) von rundlicher Gestalt, die bevorzugt um die Gallencapillaren angeordnet sind. Ihre Gestalt war uneinheitlich; nicht selten enthielten sie auch kleine, kontrastreiche Granula von 40—80 Å Durchmesser, denen möglicherweise organische Metallverbindungen zugrunde lagen. (Entsprechende Beobachtungen veröffentlichten ROUILLER (1956), FAWCETT (1955), sowie GANSLER und ROUILLER (1956).

NOVIKOFF, BEAUFAY und DE DUVE (1956) beschrieben in einer Lysosomenfraktion der Rattenleber 0,25—0,5 μ große, vielgestaltige Körper („dense bodies“) mit kontrastreichen Partikeln von durchschnittlich 56—76 Å Durchmesser, die sie für Ferritin hielten. Sie gelangten zu der Ansicht, daß die von ROUILLER (1956) beschriebenen „dense bodies“ den Lysosomen der Biochemiker entsprechen. Bemerkenswert ist der Hinweis von BENNETT (1956), daß die von NOVIKOFF u. Mitarb. untersuchten Lysosomen anderen intracytoplasmatischen Gebilden weitgehend ähneln, welche bei der Phagocytose und Pinocytose entstehen. Er

vermutet, daß den Lysosomen kondensiertes phagocytiertes (bzw. pinocytiertes) Material zugrunde liegt, und nimmt an, daß ihre Enzymausstattung der Verarbeitung und dem Abbau dieser Substanzen dient.

Vergleicht man unsere Befunde mit den erwähnten früheren Untersuchungen, so zeigt es sich, daß *phagocytiertes Eisenhydroxyd und Hämoglobin nicht in präformierten corpuskulären Cytoplasmaorganellen abgelagert werden*. In Übereinstimmung mit GIESEKING (1957, 1958) fanden wir in keinem Stadium der Eisenverarbeitung Beziehungen des in die Makrophagen eingeschleusten Eisens zu Mitochondrien¹. Des weiteren erfolgte die Ablagerung des Eisenhydroxyds auch nicht im Bereich von präformierten osmiophilen Körpern (oder in „Microbodies“), zumal diese Cytoplasmastrukturen in Makrophagen des Fremdkörpergranulationsgewebes nicht in nennenswertem Umfang vorkommen. Es würde auch dem ökonomischen Prinzip der Zelle widersprechen, hochwertige Speicherorganellen gewissermaßen auf Vorrat, d. h. ohne unmittelbaren Bedarf anzulegen. In Übereinstimmung damit stellten wir in früheren Experimenten fest, daß auch die bei Phagocytose erforderliche Enzymausstattung der Zelle erst im Augenblick des Bedarfs gebildet wird (GEDICK und BONTKE 1957).

Die eisenspeichernden Zellgranula (Siderosomen) gehen vielmehr aus den bei der Phagocytose durch Membranvesikulation gebildeten eisenhaltigen Vacuolen hervor. Durch die lückenlose Verfolgung der einzelnen Entwicklungsstadien der Eisenverarbeitung in Makrophagen ließ sich die allmähliche Umwandlung der primären Cytoplasmavacuolen in Eisenspeichergranula (Siderosomen) zeigen. Diese behalten auch später weitgehend die äußere Form der primären Ablagerungsorte bei. Die bei der Membranvesikulation gebildeten eisenhaltigen Vacuolen stellten also die Cytoplasmazentren dar, in denen die Speicherung und weitere Verarbeitung des Eisens stattfindet. Dabei wird einerseits ein Umbau der Eisenmicellen vorgenommen, und andererseits die begrenzende Membran verstärkt sowie organisches Material vom übrigen Cytoplasma an die Vacuolen abgegeben (vgl. Abb. 12).

Einen Umbau dieser Siderosomen in Mitochondrien, der auch von vorneherein aus biologischen Gründen wenig Wahrscheinlichkeit hätte, war in keinem Stadium der Versuche feststellbar. Keinesfalls möchten wir die in älteren Siderosomen gelegentlich auftretenden Membranstrukturen in diesem Sinne deuten. — In keinem Fall haben wir auch eine sekundäre Zusammenlagerung von einzeln in das Cytoplasma gelangten Eisenmicellen zu Siderosomen beobachtet.

Auch HARFORD, HAMLIN und PARKER (1957) gelangten bei Versuchen mit kolloidalem Gold zu der Ansicht, daß es sich bei diesem metallspeichernden „globoid structures“ nicht um Mitochondrien, sondern um umgewandelte, durch Pinocytose in das Cytoplasma aufgenommene goldhaltige Vacuolen handelt. Diese erhalten in späteren Stadien eine dichtere Grundsubstanz und können unter Umständen unregelmäßige Membranstrukturen entwickeln.

Bei dem Vergleich unserer Befunde mit den von GIESEKING (1957, 1958), LINDNER (1958), RICHTER (1957—1958) und SCHULZ (1956—1958) veröffent-

¹ Während der Drucklegung dieser Arbeit ist eine Veröffentlichung von BESSIS erschienen [J. biophys. biochem. Cytol. 6, 237—239 (1959)]. — Dabei wurde gefunden, daß — ähnlich wie wir es bei unseren Experimenten in Makrophagen beobachteten — auch die Reticulumzellen der Milz das Eisen in unregelmäßig begrenzten Depots und nicht in Mitochondrien ablagerten. Zur Genese dieser Eisenansammlungen ließ sich an Hand dieser Versuche nicht Stellung nehmen.

lichten Bildern fällt die weitgehende Ähnlichkeit, ja vielfach sogar die Übereinstimmung zwischen den unter verschiedenen Versuchsbedingungen entstandenen eisenspeichernden Zellgranula auf. Bei den in Makrophagen verschiedener Organe gebildeten Siderosomen ist diese Feststellung an sich nicht überraschend, wenn man berücksichtigt, daß die kausale und formale Genese dieser Granula im Prinzip stets die gleiche ist: Sie entstehen in den zur Phagocytose befähigten Zellen bei einem großen örtlichen Angebot von eisenhaltigen anorganischen oder organischen Substanzen. Auch die Einschleusung dieser Stoffe in das Cytoplasma der Speicherzellen dürfte — genau wie bei unseren Experimenten — stets zum überwiegenden Teil auf dem Weg der Membranvesikulation erfolgen.

Den Unterschied zwischen den Befunden von GIESEKING, bei denen die groben Eisenpartikel in nicht präformierten Cytoplasmavacuolen lagen und den Ergebnissen von SCHULZ, LINDNER u. a., welche das Eisen bereits in Siderosomen mit dichter Grundsubstanz und teilweise ferritinartiger Struktur fanden, möchten wir in Anbetracht unserer Experimente darauf zurückführen, daß verschiedene Stadien ein und desselben Umbauvorganges erfaßt wurden. Diese Möglichkeit ist, wie wir auch bei unseren Versuchen gesehen haben, dadurch gegeben, daß die Geschwindigkeit des Umbauvorganges in Makrophagen je nach den Versuchsbedingungen stark wechselt kann, so daß auch nach gleichen Beobachtungszeiten unter Umständen verschiedene Entwicklungsstadien erfaßt werden.

Besonders interessant ist aber auch die weitgehende Ähnlichkeit der Siderosomen in Makrophagen mit den von RICHTER beschriebenen eisenspeichernden Granula in den Zellen der physiologischen Speicherorgane, wie Leber, Milz und Niere. Denn es ist recht unwahrscheinlich, daß auch das Eisen, welches durch das Transporteiweiß Siderophilin an die Parenchymzellen herangeführt wird, auf dem Weg der Membranvesikulation in das Cytoplasma gelangt und in pinocytotisch entstandenen Vacuolen angehäuft wird. Ungeklärt ist auch noch die Frage, in welchen Cytoplasmabezirken die in die Parenchymzellen aufgenommenen Eisenmicellen primär abgelagert werden, und auf welche Weise sie sich zu größeren granulären Ansammlungen (Siderosomen) zusammenfügen. Die von RICHTER (1957, 1958) zunächst geäußerte Vermutung, daß in diesen Zellen die Eisenverarbeitung in Mitochondrien erfolgt, ist nicht unwidersprochen geblieben; und in einer neueren Arbeit (1959) nimmt dieser Autor es auch nicht mehr als gesichert an, daß den Siderosomen der Parenchymzellen tatsächlich umgeformte Mitochondrien zugrunde liegen. Jedenfalls bedarf diese Frage dringend der weiteren Bearbeitung.

In jedem Fall hat es aber den Anschein, daß die eisenspeichernden Granula trotz ihrer unterschiedlichen kausalen und möglicherweise auch verschiedenartigen formalen Genese zu sehr ähnlichen, oft elektronenoptisch und histochemisch nicht mehr voneinander zu unterscheidenden Endprodukten, nämlich den Siderosomen, umgeformt werden. Offenbar vermögen also in Granula verschiedener Herkunft und Genese, wie es LINDNER (1958) schon vermutete, gleichartige Stoffwechselvorgänge abzulaufen. Auf diese Weise könnte man sich vorstellen, daß durchaus verschiedene Arten der Eisenangebote und der Eisenaufnahme schließlich morphologisch und biochemisch zu der gleichen oder sehr ähnlichen Form der Eisenspeicherung führen.

3. Wie verändern sich die Eisenmicellen während der Phagocytose und Speicherung?

Die Mesenchymzellen prägen die in ihr Cytoplasma eingeschleusten, ursprünglich sehr unterschiedlichen Eisenpartikel zunächst zu uniformen faden- bis kommaförmigen etwa 150—200 Å großen Micellen und schließlich zu den 55 Å großen Micellen des Ferritins um. Beiden sieht man elektronenoptisch schließlich nicht mehr ihre Herkunft an. Auch der Abstand dieser kleinen Eisen- teilchen voneinander stimmt in den Eisenablagerungen verschiedener Herkunft weitgehend überein.

Unterschiede bestehen nur in der Geschwindigkeit des Eisenumbauens, die offenbar von zwei Faktoren abhängt: Einmal übt die Art des verabfolgten Eisens einen Einfluß aus; und zwar insofern, als anorganisches Eisen sehr viel langsamer umgelagert wird als Hämoglobineisen. Zur gleichen Feststellung sind wir bereits früher bei lichtmikroskopischen Untersuchungen über die Eisenspeicherung gelangt (GEDIGK und STRAUSS 1954). Offenbleiben muß jedoch vorerst die Frage, warum die nach der Verabfolgung von kolloidalem Eisen und bei der Verarbeitung von Hämoglobin zunächst auftretenden faden- bis kommaförmigen Micellen trotz ihrer elektronenoptisch gleichen Struktur verschieden schnell weiterverarbeitet werden. Vielleicht bestehen doch Unterschiede in dem inneren Gefüge dieser Micellen, die mit unseren Methoden noch nicht erfaßt werden können. Außerdem spielt die Menge des injizierten Eisens eine Rolle, denn der Umbau der Eisenpartikel geht nach der Verabfolgung kleiner Eisenmengen stets sehr viel schneller vor sich als bei der Verarbeitung größerer Eisenangebote.

4. Wo lassen sich die organischen Bestandteile (Trägersubstanzen) des Eisenpigmentes nachweisen?

In der jüngsten Zeit sind die organischen Bausteine des Eisenpigmentes an menschlichen Organen und im Tierexperiment näher untersucht worden (GEDIGK u. Mitarb. 1953—1958, sowie GÖSSNER 1953). Dabei zeigte es sich, daß die Sideringranula außer Proteinen eine stark PAS-positive Substanz enthalten. Die nähere histochemische Charakterisierung ergab, daß die mit der Perjodsäureoxydation erfaßten α -Glykolgruppen einem Mucopolysaccharid oder einem Mucobzw. Glyko)proteid angehören. Daneben fanden sich in geringerem Umfang (und keinesfalls regelmäßig) schwer lösliche Fettstoffe. Weiterhin wurde lichtmikroskopisch nachgewiesen, daß sich die Proteine und Polysaccharide im Cytoplasma der Speicherzellen genau im Bereich des gespeicherten Eisenhydrates befanden und eine ausgesprochene Affinität für kolloidales Eisen besaßen: Nach der Entfernung des Eisens mit Salzsäure oder mit Oxalsäure konnte der eisenfreie Restkörper ohne weiteres wieder mit Eisen beladen werden. Die Bildung der organischen Trägersubstanz des Siderinpigmentes wurde als Reaktion der Zelle auf die Ablagerung von überschüssigem, nicht durch Apoferritin gebundenen Eisens gedeutet. Während das Apoferritin speziell auf die Speicherung des Eisens und auf die besonderen Erfordernisse des Eisenstoffwechsels zugeschnitten ist, handelt es sich bei der Trägersubstanz nicht um eine Besonderheit des Eisenpigmentes, sondern um ein „unspezifisches“ Zellprodukt, das zur Bindung verschiedenartiger anorganischer Stoffe befähigt ist (GEDIGK 1955, 1958).

WÖHLER und BIELIG (1959) beschrieben unlängst in isolierten Siderinpartikeln der Milz einen Desoxyribonucleoidgehalt von 25%, der ungefähr dem DNS-Gehalt von Zellkernen

entspricht. Der nach der Entfernung des Eisens zurückbleibende organische Restkörper müßte demnach sogar 60% DNS enthalten. Obwohl das gelegentliche Vorkommen kleinerer DNS-Mengen im Cytoplasma durchaus bekannt ist, wäre ein derartiger hoher Gehalt an Desoxyribonucleinsäuren in Cytoplasmastrukturen doch ungewöhnlich. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß weder mit Gallocyanin-Chromalaun noch mit der Feulgenreaktion im Siderin Desoxyribonucleinsäuren nachweisbar sind, obwohl der Nucleinsäurenachweis unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Methoden in anderen Strukturen bekanntlich keinerlei Schwierigkeiten bereitet und sogar der quantitativen Auswertung zugänglich ist. Daher ist die Vermutung naheliegend, daß diese zweifellos exakten chemischen Analysen doch nicht an reinen („unveränderten“) Pigmentkörnchen vorgenommen worden sind, und daß das Ergebnis dieser Untersuchungen durch Artefakte beeinträchtigt worden ist, die bei der Aufarbeitung des Gewebes und der Isolierung einzelner Zellstrukturen manchmal zustande kommen und sich mikroskopisch unter Umständen nicht ohne weiteres nachweisen lassen. Jedenfalls hat die Meinung, daß im Siderin 25%, d. h. in seiner Trägersubstanz 60% DNS enthalten sind, wenig Wahrscheinlichkeit für sich und bedarf dringend der Nachprüfung.

Von besonderem Interesse ist die Frage nach der submikroskopischen Erfassung der Trägersubstanz des Siderins. GLESEKING (1957, 1958) beobachtet in den metallhydroxydhaltigen Vacuolen der Alveolardeckzellen der Lunge eine Anreicherung und Verdichtung von cytoplasmatischen Substanzen, die schließlich als homogene Masse die intracytoplasmatischen Hohlräume ganz ausfüllten. Die Autorin nahm an, daß diese elektronenoptisch homogen erscheinenden, zu den Metallhydroxydablagerungen sekundär hinzutretenden Stoffe mit der histochemisch nachgewiesenen organischen Trägersubstanz identisch sind. Auch MILLER (1958) hält es für wahrscheinlich, daß die organischen Trägersubstanzen in den Siderosomen, d. h. in den eisenspeichernden Granula selbst lokalisiert sind.

Im Uterus normaler und vitamin-E-frei ernährter Ratten fand LINDNER (1958) in den Makrophagen zwischen glatten Muskelfasern neben Lipopigmenten auch reichlich Eisenpigmentkörnchen. Submikroskopisch zeigten sich innerhalb und neben den Sideringranula homogene graue Substanzen, die möglicherweise der organischen Trägersubstanz entsprachen. Allerdings wurde die Deutung dieser Befunde dadurch erschwert, daß im Uterus vitamin-E-frei ernährter Ratten neben echten Eisenpigmentkörnchen auch lipogene Pigmente abgelagert werden. Vor allem treten beide Pigmenttypen nicht selten in ein und denselben Phagozyten auf, so daß es unter Umständen zu einer engen räumlichen Beziehung zwischen den gespeicherten Fettstoffen und dem abgelagerten Eisen sowie seiner organischen Trägersubstanz kommt. Außerdem wird manchmal das beim Gewebsuntergang frei werdende Eisen von der Oberfläche der gelblichen bis gelblichbraunen Lipopigmentkörnchen adsorbiert. Die submikroskopische Unterscheidung zwischen den echten Trägersubstanzen des Siderinpigmentes und den mehr oder weniger zufällig, und an sich unabhängig von der Eisenablagerung auftretenden Lipopigmenten (Begleitstoffe), dürfte deshalb unter diesen Versuchsbedingungen recht schwierig sein.

Da zwischen den beiden Speicherformen des Eisens, dem Ferritin und dem Hämosiderin, enge funktionelle Beziehungen bestehen (HEILMEYER 1957), ist wiederholt die Vermutung geäußert worden, daß in dem organischen Anteil des Siderinpigmentes auch Apoferritin enthalten ist (FINCH u. Mitarb. 1950, GRANICK 1946—1954, SHODEN u. Mitarb. 1953, RICHTER 1957—1959), oder daß vielleicht Abbauprodukte dieses Proteins zum Aufbau der Trägersubstanz des

Siderins mitverwendet werden. Die bisherigen Versuche, Apoferritin in den isolierten Sideringranula chemisch nachzuweisen, haben jedoch keine einheitlichen Resultate geliefert: Während BEHRENS und TAUBERT (1952) im isolierten Hämosiderin kein Ferritin fanden, gelang unlängst WÖHLER und BIELIG (1958) der Nachweis von Apoferritin oder von Bruchstücken dieses Proteins im isolierten Hämosiderin der Milz.

Auch submikroskopisch ist mehrfach versucht worden, Ferritin in Eisenpigmentgranula direkt darzustellen. Streng genommen beschränken sich diese Untersuchungen aber auf den Nachweis der Eisenmicellen, da eine unmittelbare Beobachtung des Eiweißanteils des Ferritins wegen seines schwachen elektronenoptischen Kontrastes bisher nicht möglich war. Somit ist auch eine eindeutige submikroskopische Abgrenzung des Apoferritins von der gleichfalls elektronenoptisch nicht ohne weiteres sichtbaren Trägersubstanz des Siderins nicht gelungen.

Alle elektronenmikroskopischen Angaben über die organische Komponente des Ferritins stützen sich daher letzten Endes bloß auf die Messung der Größe und Form der Eisenmicellen und auf die Ermittlung ihres Abstandes voneinander (vgl. LINDNER): Der Durchmesser des Ferritins beträgt 94 ± 5 Å, die in ihm enthaltenen Eisenmicellen besitzen einen Durchmesser von 55 Å. Wenn daher im Cytoplasma liegende Eisenmicellen dieselbe Form und Größe wie im Ferritin besitzen und in einem Abstand von 90–100 Å zusammenliegen, so wird im allgemeinen angenommen, daß es sich um Ferritin handelt, daß also die zwischen den Eisenpartikeln liegenden homogenen, relativ kontrastarmen Massen Apoferritin darstellen. Liegen die Micellen dichter beieinander, so kann es sich aus räumlichen Gründen nicht um Ferritin handeln, weil diese Moleküle einen größeren Durchmesser haben. Den zwischen ihnen auftretenden homogenen Stoffen dürfte dann die Trägersubstanz des Siderins zugrunde liegen. Schwieriger wird die Frage, wenn die Eisenmicellen einen größeren Abstand als 90–100 Å voneinander haben. In diesem Fall läßt sich elektronenoptisch über die Natur der die Eisenmicellen umhüllenden Stoffe vorerst keine sichere Aussage machen.

Betrachten wir unter diesem Gesichtspunkt unsere Befunde, so zeigt es sich, daß die Eisenmicellen der früheren Stadien in ihrer Größe erheblich schwanken und einen Durchmesser von etwa 150 Å aufweisen. Ihr Abstand voneinander beträgt etwa 150 Å. Da sich diese Micellen in Form und Größe deutlich von dem Eisenbaustein des Ferritins unterscheiden, kann es sich bei den zwischen ihnen liegenden Stoffen keinesfalls um Apoferritin handeln. Vielmehr ist anzunehmen, daß diese Micellen in die „Trägersubstanz“ eingebettet sind. In älteren Granulomen finden sich in den Siderosomen aber stets auch punktförmige Eisenpartikel, in denen nicht selten auch die typischen 4 Untereinheiten der Eisenmicellen des Ferritins erkennbar sind. Es ist daher naheliegend, daß es sich bei einigen Partikeln um den Eisenbaustein des Ferritins und bei ihrem Proteinkontakt demnach um Apoferritin handelt.

Da die Micellen aber häufig einen viel größeren Abstand als 100 Å besitzen, ist es sehr unwahrscheinlich, daß die zwischen ihnen gelegene Grundsubstanz nur Apoferritin darstellt, weil die Bildung dieses hochwertigen Proteins immer nur in dem Umfang erfolgt, wie es zur Eisenbindung benötigt wird. Aus diesen Gründen möchten wir annehmen, daß die beschriebene Grundsubstanz der

Siderosomen zwar auch Apoferritin enthält, daß es sich aber hauptsächlich um die lichtmikroskopisch nachgewiesenen Trägersubstanzen handelt.

Dabei ist die Tatsache bemerkenswert, daß offenbar nicht nur die Parenchymzellen und retikuloendothelialen Elemente der typischen Eisendepotorgane, wie Leber, Niere und Milz, das Speichereiweiß Apoferritin bilden können, sondern daß auch die aus Histiocyten entstehenden Makrophagen eines subcutanen Fremdkörpergranuloms zur Synthese dieses hochwertigen Proteins befähigt sind.

An Hand unseres Materials haben wir außerdem danach getrachtet, durch vergleichende lichtmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen eine Lokalisation der organischen Trägersubstanz des Siderinpigmentes vorzunehmen.

Dabei stellten wir fest, daß synchron mit dem Nachweis der PAS-positiven Trägersubstanz des Eisenpigmentes in den durch Membranvesikulation gebildeten intracytoplasmatischen, eisenhaltigen Vacuolen allmählich eine homogene Substanz von mittlerer elektronenoptischer Dichte auftrat. Durch das Eindringen dieser Stoffe in die Eisenkonglomerate wurden die Eisenmicellen, welche zunächst sehr dicht gepackt nebeneinanderlagen, auseinander gedrängt und waren dann deutlich einzeln erkennbar. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen und Schlußfolgerungen von GIESEKING möchten wir deshalb annehmen, daß es sich bei diesen in die Vacuolen eindringenden homogenen Stoffen um die von den Makrophagen gebildete organische Trägersubstanz des Siderins handelt. Außerhalb der Siderosomen waren derartige homogene Stoffe von entsprechender optischer Dichte nicht nachweisbar.

Bei diesen Deutungen muß jedoch einschränkend berücksichtigt werden, daß sich die „Identifizierung“ der Trägersubstanzen im elektronenmikroskopischen Bild zunächst auf zwei Beobachtungen stützt, nämlich erstens auf das gleichzeitige Auftreten der lichtmikroskopisch nachweisbaren organischen Bestandteile des Siderins und der elektronenoptisch sichtbaren „homogenen, grauen“, also schwach osmiophilen Stoffe in den Siderosomen und zweitens auf die engen morphologischen Beziehungen, welche diese mit verschiedenen Methoden dargestellten Substanzen zu den Eisenablagerungen aufweisen. Wegen des Fehlens submikroskopisch anwendbarer Reaktionen zum topochemischen Nachweis von Proteinen und Kohlenhydraten ist ein direkter Vergleich der lichtmikroskopischen und elektronenoptischen Bilder derzeit noch nicht möglich.

5. Welche Folgen haben die Eisenablagerungen für die speichernden Zellen?

Unmittelbar nach der subcutanen Injektion der Eisenlösungen und des Hämoglobins zeigen die in ihrem Bereich liegenden Zellelemente, und insbesondere auch die Makrophagen, eine Unschärfe der cytologischen Membranstrukturen (z. B. Ergastoplasmalamellen und Mitochondrien). Diese Veränderungen, die auch bei anderen regressiv veränderten Zellen auftreten, dürften der Ausdruck für eine Zellschädigung durch das in großen Mengen eingeführte Eisen sein. Später, nach Anhäufung des Eisens in Siderosomen waren derartige pathologische Transformationen des Ergastoplasmas und der Mitochondrien nicht mehr zu sehen.

Somit hat es den Anschein, daß das anorganische Eisenhydroxyd, welches im freien Zustand wegen seiner Affinität zu den verschiedensten Proteinen im

Zellinneren durch Inaktivierung lebenswichtiger Fermente zweifellos zur Zellschädigung führen müßte, in den bei der Phagocytose gebildeten primären Vacuolen zunächst durch die Reste der umgrenzenden Zellmembran und dann durch die von der Zelle um die Siderosomen gebildete dicke Membran am Eindringen in das Grundcytoplasma gehindert wird. Kurze Zeit später wird es dann durch die in die Vacuolen eindringende Trägersubstanz gebunden und unschädlich gemacht.

In den Makrophagen älterer Granulome (nach 5 Monaten), also nach dem Abtransport eines großen Teiles des gespeicherten Eisens, kam es gelegentlich infolge des Auseinanderweichens von Ergastoplasmalamellen zur Bildung weiter, elektronenoptisch leerer Räume. Daneben fand sich eine Schwellung und manchmal sogar eine ballonförmige Aufreibung der Mitochondrien. Gleichzeitig traten pyknotische Kernverdichtungen auf. Diese regressiven Veränderungen waren anscheinend ein Ausdruck für die Nekrobiose der speichernden Zellen. Der Zelluntergang wurde aber nicht durch die Eisenablagerung selbst ausgelöst, sondern dürfte vielmehr eine Art „Alterserscheinung“ darstellen und nur der Ausdruck für die allmähliche Rückbildung der Eisengranulome sein, die sich schließlich in ein faserreiches („ruhendes“) Bindegewebe umwandeln.

Gleichzeitig beobachteten wir im Cytoplasma einzelner eisenspeichernder Zellen etwa 80 Å breite, nicht periodisch unterteilte Fasern mit schwacher Oberflächenosmierung. In den älteren Granulomen nahmen sie an Zahl, Größe und Dicke zu. Vielleicht handelt es sich bei diesen Gebilden um eine Art Vorstufe der kollagenen Fibrillen, wie wir es auch in Deciduazellen beobachten konnten (WESSEL). Ihre Entstehung beruht zweifellos nicht auf einer spezifischen Wirkung des phagozytierten Eisens, sondern stellt eine allgemeine Reaktion der mesenchymalen Zellelemente (Fibroblasten) von Fremdkörpergranulomen dar, in denen mit zunehmendem Alter reichlich kollagene Fasern auftreten (Abb. 11).

Zusammenfassung

Subcutan injiziertes anorganisches und organisches Eisen wird von den phagozytierten Zellen auf dem Weg der Invagination und Vesikulation der Zellmembran in das Cytoplasma eingeschleust. Die hierbei entstehenden „primären“ intracytoplasmatischen eisenhaltigen Vacuolen werden allmählich unter gleichzeitiger Verstärkung ihrer begrenzenden Membran in Siderosomen umgebaut; sie stellen also die Cytoplasmazentren dar, in denen die Verarbeitung und Speicherung des Eisens erfolgt.

Dabei werden die Eisenpartikel zunächst zu etwa 150 Å langen Micellen umgelagert. Gleichzeitig gibt die Zelle in die Vacuolen ein relativ kontrastarmes organisches Material ab, welches die Micellen umgibt und offenbar Anteile der organischen Trägersubstanz des Eisenpigmentes darstellt. Nach längerer Versuchsdauer erfolgte eine allmähliche Umwandlung der Eisenpartikel in die 55 Å großen, viereckigen Micellen des Ferritins, in denen vielfach deutlich die typische Vierergruppierung nachweisbar war.

Präformierte Cytoplasmaorganellen, wie Mitochondrien, „Microbodies“ usw. nahmen in keinem Stadium der Experimente an der Verarbeitung und Speicherung des Eisens teil.

Die Verarbeitung des anorganischen (kolloidalen) Eisens und des Hämoglobin-Eisens erfolgte in prinzipiell der gleichen Weise. Den gespeicherten Eisen-

micellen und den Siderosomen ist schließlich ihre Herkunft nicht mehr anzusehen. Ein Unterschied besteht nur in der Geschwindigkeit der Eisenverarbeitung, und zwar insofern, als das organisch gebundene Eisen des Hämoglobins erheblich schneller umgebaut wird als das anorganische kolloidale Eisen.

Summary

Organic and inorganic iron injected subcutaneously is engulfed by phagocytizing cells by means of the invagination and vesiculation of the cell membrane into the cytoplasm. The "primary" iron-containing vacuoles formed in this manner are gradually transformed into siderosomes by the simultaneous increase in their limiting membranes; these vacuoles thus represent the cytoplasmic centers where the digestion and storage of iron occur. The iron particles become surrounded by micelles measuring about 150 Å. At the same time the cell gives off into the vacuoles a relatively contrast-poor, organic material which encloses the micelles. This material apparently represents components of the "carrier-substance" (Trägersubstanz) of the iron pigment. In prolonged experiments a gradual transformation of the iron particles into four-cornered ferritin micelles, of 55 Å size, occurs, in which the typical quadruplets can be often clearly demonstrated.

Preformed cytoplasmic organelles, such as mitochondria, "microbodies", etc. did not take part in the digestion and storage of iron in any stage of the experiments.

The digestion of the inorganic (colloidal) iron and the hemoglobin iron occurs essentially in the same manner. The origin of the phagocytized micelles of iron and of the siderosomes can not be distinguished. A difference in the rapidity of the iron digestion, however, exists; the organically-bound iron of the hemoglobin is broken down considerably faster than the colloidal inorganic iron.

Literatur

- BEHRENS, M., u. M. TAUBERT: Über Beziehungen zwischen Hämösiderin und Ferritin. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **289**, 116 (1952). — BENNETT, H. S.: The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanism for active transport and iron pumping. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 99 (1956). — BESSIS, M., u. J. BRETON-GORIUS: *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **244**, 2846 (1957). — Iron particles in normal erythroblastes and normal and pathological erythrocytes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 503—505 (1957). — Trois aspects du fer dans deux coupes d'organes examinées au microscope électronique (ferritine et dérivés) dans les cellules intestinales, les erythroblastes et les cellules réticulaires. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **245**, 1271 (1957). — CAROLI, J., J. BERNHARD, M. BESSIS, A. COMBRISSE, R. MALASSENET et J. BRETON-GORIUS: *Presse méd.* **65**, 1991 (1957). — FARRANT, J. L.: An electron microscopic study of ferritin. *Biochim. biophys. Acta* **13**, 569 (1954). — FAWCETT, D. W.: Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J. nat. Cancer Inst.* **15**, Suppl., 5, 1475 (1955). — FINCH, C. A., D. M. HEGSTEDT, T. D. KINNEY, E. THOMAS, C. E. RATH, D. HASKINS, S. FINCH and R. G. FLUHARTY: Iron metabolism and the pathophysiology of iron storage. *Blood* **5**, 983 (1950). — GANSLER, H., et C. ROUILLER: Modifications physiologiques et pathologiques du chondriome. *Schweiz. Z. Path.* **19**, 217 (1956). — GEDIGK, P.: Zur Histochemie der Fremdkörperreaktionen. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **39**, 206 (1955). — Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigmentes. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 1—45 (1958). — GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538—568 (1957). — GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur Histochemie des Hämösiderins. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **37**, 240 (1953).

Virchows Arch. path. Anat. **324**, 373 (1953). — Zur formalen Genese der Eisenpigmente. Virchows Arch. path. Anat. **326**, 172 (1954). — GIESEKING, R.: Elektronenoptische Beobachtungen der Stoffaufnahme in die Alveolarwand. Verh. dtsch. Ges. Path. **41**, 336 (1957). — Aufnahme und Ablagerung von Fremdstoffen in der Lunge nach elektronenoptischen Untersuchungen. Ergeb. allg. Path. path. Anat. **38**, 92 (1958). — GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis einer organischen Trägersubstanz im Hämosiderinpigment. Virchows Arch. path. Anat. **323**, 685 (1953). — GRANICK, S.: Ferritin its properties and significance for iron metabolism. Chem. Rev. **38**, 379 (1946). — Iron metabolism and hemochromatosis. Bull. N.Y. Acad. Med. **25**, 403 (1949). — Structure and physiological functions of ferritin. Physiol. Rev. **31**, 489 (1951). — Iron metabolism. Bull. N.Y. Acad. Med. **30**, 81 (1954). — HARFORD, C. G., A. HAMLIN and E. PARKER: Electron microscopy of Hela cells after ingestion of colloidal gold. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 749—756 (1957). — HEILMEYER, L.: Das Eisen. Funktion und Stoffwechsel der Schwermetalle. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. IV/2, S. 4. 1957. — HIRSCH, G. CHR.: Der Mineralstoffwechsel der Zelle. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. I/1, S. 309. 1955. — Allgemeine Stoffwechselmorphologie des Cytoplasmas. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. II/1, S. 92. 1955. — KUHN, R., N. A. SØRENSEN u. L. BIRKHOFER: Über die Eisenproteide der Milz. Der Bauplan des Ferritins. Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 823 (1940). — LAUFBERGER, L.: Sur la cristallisation de la ferritine. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **19**, 1576 (1937). — LINDNER, E.: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe. Ergeb. allg. Path. path. Anat. **38**, 46 (1958). — MILLER, F.: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild. Verh. dtsch. Ges. Path. **42**, 261 (1958). — NOVIKOFF, A. B., H. BEAUFAY and C. DE DUVE: Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 179 (1956). — PALADE, G. E.: The endoplasmic reticulum. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 85 (1956). — PALADE, G. E., and P. SIEKEVIETZ: Liver microsomes an integrated morphological and biochemical study. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 171 (1956). — POLICARD, A., A. COLLET et S. PREGERMAIN: Structures alvéolaires normales du poumon examinées au microscope électronique. Sem. Hôp. Paris 7, 385 (1957). — Electron microscope studies on alveolar cells from mammals. Proceed. Stockholm Conf. Uppsala 1957, S. 244. — Observations au microscope electronique sur le modifications du cytoplasma au contact des particules de silice colloïdale. Exp. Cell. Res. **12**, 400 (1957). — RHODIN, J.: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Stockholm: Actiebolaget Godvie 1954. — RICHTER, G. W.: A study of hemosiderosis with the aid of electron microscopy. With observations on the relationship between hemosiderin and ferritin. J. exp. Med. **106**, 203 (1957). — Electron microscopy of hemosiderin: Presence of ferritin and occurrence of crystalline lattices in hemosiderin deposits. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 55 (1958). — The cellular transformation of injected colloidal iron complexes inter ferritin and hemosiderin in experimental animals. A study with the aid of electron microscopy. J. exp. Med. **109**, 197 (1959). — ROUILLER, C.: Les canalicules biliaires. Acta anat. (Basel) **26**, 94 (1956). — ROUILLER, C., and W. BERNHARD: Microbodies and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 355 (1956). — SCHULZ, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der normalen Lunge und der Lunge bei Mitralstenose. Virchows Arch. path. Anat. **328**, 582 (1956). — Vergleichende elektronenmikroskopische Beobachtungen zur intracellulären Eisenablagerung. Exp. Cell. Res. **11**, 651 (1957). — Die Pathologie der Cytosomen im Alveolarepithel der Lunge und die Frage der Mitochondrienentwicklung. 7. Tagg Dtsch. Ges. Elektronenmikroskopie, Darmstadt 23.—25. Sept. 1957. — Die Pathologie der Mitochondrien im Alveolarepithel der Lunge. Beitr. Path. Anat. **119**, 45 (1958); Die submikroskopische Pathologie der Cytosomen in den Alveolarmakrophagen der Lunge. Beitr. path. Anat. **119**, 71 (1958). — SHODEN, A. B., W. GABRIO and C. A. FINCH: The relationship between ferritin and hemosidrin in rabbits and men. J. biol. Chem. **204**, 823 (1953). — WESSEL, W.: Die menschlichen Deciduazellen und ihre „Kollageneinschlüsse“ im Elektronenmikroskop. Virchows Arch. path. Anat. **332**, 224—235 (1959). — WÖHLER, F., u. H. BIELIG: Über die Natur des Hämosiderins. In W. KEIDERLING, Eisenstoffwechsel, S. 82—92. Stuttgart: Georg Thieme 1959.