

Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. A. LAUCHE †) und dem Pathologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Ultraviolettmikrospektrophotometrische Untersuchungen am Eisenpigment*

Von

M. SCHREIBER, W. SANDRITTER und P. GEDIGK

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. April 1960)

In den Depoteisenfraktionen Ferritin und Hämosiderin ist das gespeicherte Eisen an organische Substanzen gebunden. Im Ferritin erfolgt eine Bindung der Eisenmicellen an das Protein Apoferritin, im Hämosiderin an die organische Trägersubstanz, welche Proteine und Polysaccharide sowie in geringem Umfang auch Lipide enthält (GEDIGK u. Mitarb. 1953—1958, GöSSNER 1953). Während über den Polysaccharidbaustein des Eisenpigmentes, bei dem es sich in Anbetracht seiner histochemischen Eigenschaften um Mucopolysaccharide oder Muco-(bzw. Glyko-)proteide handelt, eingehende Untersuchungen vorliegen, besitzen wir bisher nur spärliche Kenntnisse von der Proteinkomponente. Wir haben deshalb versucht, mit Hilfe der Ultraviolettmikrospektrophotometrie eine nähere Charakterisierung dieser Eiweißstoffe vorzunehmen und gleichzeitig die spektralen Eigenschaften des Eisenpigmentes zu klären.

Material und Methoden

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir Eisenpigmentablagerungen in der menschlichen Milz. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der operativen Entnahme in neutralem Formalin fixiert und in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet. Außerdem standen uns Eisenpigmentablagerungen bei Mäusen zur Verfügung, welche wir durch die subcutane Injektion von kolloidalem Eisen erzeugt hatten.

Histochemische Methoden. *Extraktion des Eisens.* 5%ige Oxalsäure: 3—5 Std sowie 20%ige Salzsäure: 1 $\frac{1}{2}$ Std.

Die Extraktion des Eisens mit Salzsäure wurde nur zur Kontrolle durchgeführt. Für die Darstellung der Nucleinsäuren war dieses Verfahren nicht geeignet, da hierbei zu einem erheblichen Teil Desoxyribonucleinsäure in Lösung geht. So nimmt die Extinktion von Zellkernen bei λ 265 m μ im Mittel um 58% ab (s. Tabelle 2).

Extraktion der Nucleinsäuren. Ribonuclease Worthington: 0,1%, 1 $\frac{1}{2}$ Std, 37°C, dest. Wasser; Trichloressigsäure: 5%, 15 min, 90°C.

Die *UV-Messungen* nahmen wir an 3 μ dicken Paraffinschnitten mit einem UV-Mikrospektrographen vor (SANDRITTER 1958). Arbeitsbedingungen: Achromatische Optik Zeiss, Kondensor NA 035, Objektiv nA 085, Okular $\times 10$. Die Meßwerte wurden durch Photometrie der photographischen Platten gewonnen, wobei für jede UV-Aufnahme ein Stufenkeil als Referenzsystem diente. Die Auswertung der Platten erfolgte mit einem Mikrodensitometer (Einzelheiten der Technik s. SANDRITTER 1958).

Die Messungen erfolgten an 10 verschiedenen Pigmentkörnchen und Schollen von etwa 40 μ Durchmesser, wobei die Meßlinien im Abstand von 2 μ gelegt wurden. Die Größe der Meßblende betrug 1 μ .

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

Des weiteren wurden mit den üblichen histochemischen Methoden die früheren Untersuchungen zur Darstellung von Proteinen, Kohlenhydraten, Nucleinsäuren und Lipiden wiederholt und überprüft. Besonderer Wert wurde auf folgende Methoden gelegt: Die Tetrazoniumreaktion, die Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion, die Feulgenreaktion, die Gallocyanin-Chromalaun- und die Toluidinblaufärbung sowie die Färbung mit Sudanschwarz. Weiterhin wurde die Eisenbindefähigkeit des eisenfreien Restkörpers des Hämosiderins geprüft (Einzelheiten der Methodik s. GEDIGK u. STRAUSS 1953, 1954 sowie GEDIGK 1956).

Untersuchungsergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen galten zunächst der Frage, in welchen Wellenlängenbereichen das unveränderte Eisenpigment im Gewebe absorbiert. Abb. 1 und 2 zeigen, daß das Pigment im kurzweligen UV-Licht bei $\lambda 265 \text{ m}\mu$ eine extrem hohe, nicht mehr meßbare Absorption aufweist. Mit zunehmender Wellenlänge fällt die Extinktion steil ab; im Bereich von 330—340 m μ tritt jedoch ein zweites, etwas schwächeres Maximum auf. Die Lage dieses Maximums ist nicht in allen Fällen gleich. Es kann, vielleicht abhängig vom Alter und der Größe der Granula, zwischen 330 bis 400 m μ Wellenlänge liegen. Im gesamten sichtbaren Bereich liegt keine meßbare Absorptionsbande vor. Die gleichen spektralen Eigenschaften hat, wie Abb. 1 zeigt, eine 0,1%ige saure Lösung von Ferrihydroxyd.

Im Vergleich dazu ermittelten wir bei drei Wellenlängen im kurzen UV-Bereich

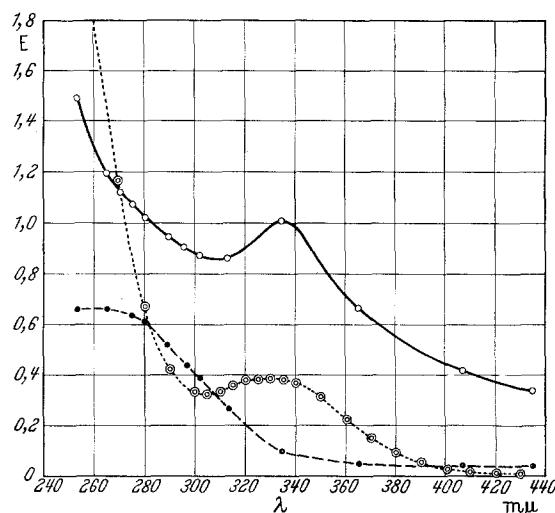


Abb. 1. Extinktionskurven von Hämosideringranula der Milz vor Oxalsäureextraktion ○—○ und nach Oxalsäureextraktion ●—●, ○---○ Extinktionskurve einer sauren 0,1 % Fe(OH)_3 -Lösung in 1 cm Schichtdicke

Tabelle 1. Ergebnis der Messungen am Eisenpigment in der Milz

Vorbehandlung	E $\lambda 265 \text{ m}\mu$	E $\lambda 280 \text{ m}\mu$	E $\lambda 313 \text{ m}\mu$
Eisenextraktion mit Oxalsäure. Sonst keine weitere Behandlung			
1	0,66	0,61	0,27
2	0,63	0,64	0,38
3	0,44	0,40	0,27
4	0,56	0,46	0,25
5	0,48	0,43	0,17
Mittelwert	0,55	0,51	0,27
Eisenextraktion mit Oxalsäure. Ribonuclease			
1	0,56	0,56	0,27
2	0,56	0,56	0,34
3	0,36	0,40	0,24
4	0,48	0,47	0,26
5	0,42	0,43	0,15
Mittelwert	0,48	0,48	0,25
Eisenextraktion mit Oxalsäure. Trichloressigsäure			
1	0,58	0,54	0,34
2	0,56	0,52	0,36
3	0,42	0,34	0,24
4	0,48	0,43	0,28
5	0,42	0,40	0,23
Mittelwert	0,49	0,45	0,29

(λ 265, 280 und 313 m μ) die Absorption des Pigmentes nach der Extraktion des Eisens mit Oxalsäure. Wie Tabelle 1 und Abb. 1 zeigen, war die Extinktion bei λ 265 m μ in den meisten Fällen nur gering höher als bei λ 280 m μ . Die Ribonucleasebehandlung wirkte nur eine geringgradige Abnahme der Extinktion bei λ 265 m μ (0,07 im Mittelwert). Nach der Einwirkung von Trichloressigsäure blieb die Extinktion bei diesen beiden Wellenlängen praktisch erhalten; lediglich bei 313 m μ stieg sie etwas an (Zunahme der Lichtstreuung). Daraus geht hervor, daß die Trägersubstanz des Eisenpigmentes — in Übereinstimmung mit dem positiven Ausfall der Tetrazoniumreaktion — tyrosin- und

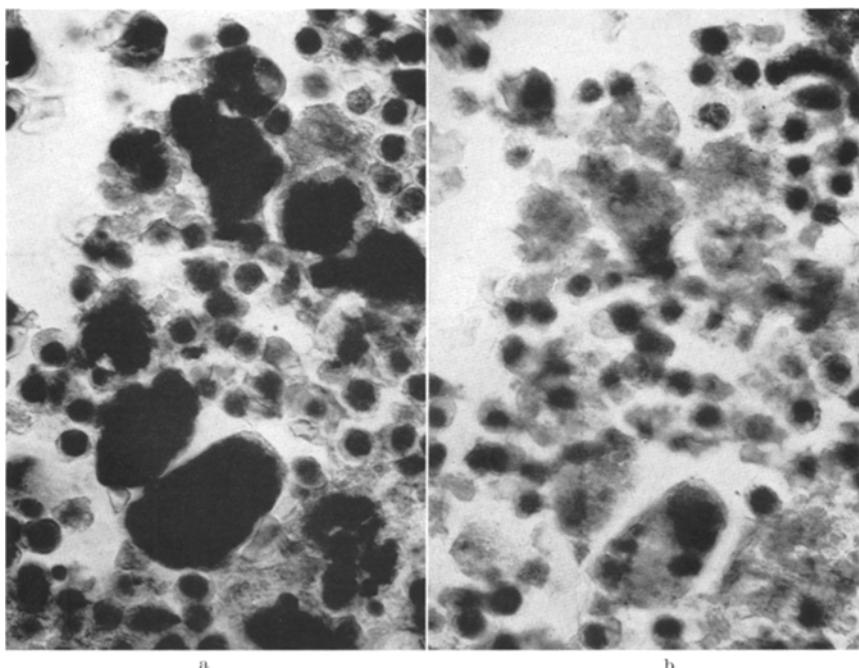


Abb. 2 a u. b. Photographie im ultravioletten Licht (λ 265 m μ) von Eisenpigment der Milz vor Extraktion mit Oxalsäure a, und nach der Extraktion b. Vergrößerung etwa 500fach

tryptophanhaltige Eiweißkörper enthält. Über das Vorkommen von Ribonucleinsäuren (RNS) läßt sich bei diesen Messungen keine sichere Aussage machen, weil die geringe Abnahme der Extinktion bei λ 265 m μ nach Behandlung mit Ribonuclease noch innerhalb der Fehlerbreite der Methodik liegt und Oxalsäure zu einer deutlichen Lösung von RNS führt. Das Vorhandensein von nennenswerten RNS-Mengen ist aber schon deshalb unwahrscheinlich, weil in dem unveränderten (nicht mit Oxalsäure behandelten) Eisenpigment keine für die RNS kennzeichnende Farbreaktion positiv ausfällt. Jedenfalls ergeben auch unsere Berechnungen, daß die Konzentration der RNS höchstens eine Größenordnung von $0,02 - 0,04 \times 10^{-12}$ g/m μ^2 aufweisen könnte. Im Vergleich dazu ermittelten wir durch die Messungen bei λ 280 m μ einen wesentlich höheren Proteingehalt, und zwar in einer Größenordnung von $2 - 3 \times 10^{-12}$ g/m μ^2 .

Bezogen auf die Proteinkomponente könnte demnach der Gehalt an RNS (sofern überhaupt RNS vorhanden sein sollten!) höchstens 1% betragen. Ver-

gleichsweise dazu findet man in einem Zellkern eine Proteinkonzentration von $2-4 \times 10^{-12} \text{ g}/\mu^2$ und eine DNS-Konzentration von $0,2-0,4 \times 10^{-12} \text{ g}/\mu^2$. Die Proteinkonzentration war in der Trägersubstanz also etwa ebenso groß wie im Zellkern, während Nucleinsäuren (in diesem Fall RNS) höchstens ein Zehntel dieser Menge ausmachten.

Das Ergebnis der Messungen nach der Behandlung mit Trichloressigsäure ergab, daß die Trägersubstanz keine Desoxyribonucleinsäuren (DNS) enthält. Auf den ersten Blick könnte man vielleicht vermuten, daß durch die Eisenextraktion mit Oxalsäure auch DNS in Lösung gegangen sei. Diese Möglichkeit wurde ausgeschlossen, indem mehrere Zellkerne vor und nach der Behandlung mit Oxalsäure gemessen wurden (Tabelle 2). Wie auch Abb. 2 ohne weiteres erkennen läßt, geht aber die DNS unter diesen Bedingungen praktisch nicht in Lösung. Die Abnahme der mittleren Extinktion bei $\lambda 265 \text{ m}\mu$ beträgt nur 0,08 (s. Tabelle 2).

Diese Schlußfolgerung steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der bewährten histochemischen Verfahren, wie z. B. der Gallocyanin-Chromalaunfärbung und der Feulgenreaktion. Diese Reaktionen geben am Hämosiderin sowohl in nichtvorbehandelten Gewebsschnitten als auch nach der Entfernung des Eisens ein eindeutig negatives Resultat, obwohl der Nucleinsäurennachweis unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Methoden in anderen Strukturen bekanntlich keine Schwierigkeiten bereitet und sogar der quantitativen Auswertung zugänglich ist. Dabei bereitet es in der Regel keine Schwierigkeiten, die manchmal auftretende, offenbar auf der Anwesenheit von Carbonylgruppen beruhende „Pseudo-Feulgen-Reaktion“ auszuschalten. Daß auch die positive Perjodsäure-Leukofuchsinsreaktion nicht etwa an Nucleinsäuren gebunden sein kann, lehrt ein Blick auf ihre chemische Struktur. Weder die Desoxyribose noch die Ribose besitzen im Nucleotidverband reaktionsfähige, benachbarte Hydroxylgruppen, welche für die Reaktionen mit Perjodsäure verantwortlich sein könnten. In Übereinstimmung damit reagieren auch Nucleinsäuren weder im Reagensglas noch im Gewebeschnitt mit Perjodsäure unter Aldehydbildung. Ganz ähnliche Verhältnisse sind im übrigen bei den Oxyaminosäuren gegeben, deren reaktionsfähige Gruppen im Polypeptidverband durch Peptidbindungen in Anspruch genommen und damit für die Perjodsäureoxydation blockiert sind. Die wenigen reaktionsfähigen Oxyaminogruppen am Ende von Polypeptidketten fallen praktisch nicht ins Gewicht und sind mit dieser Methodik nicht nachweisbar. Darüber hinaus ist es durch ausgedehnte biochemische und histochemische Untersuchungen bekannt, daß im histologischen Schnittpräparat, in dem niedermolekulare Stoffe bekanntlich nicht berücksichtigt zu werden brauchen, nur Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Glykoproteide, Glykolipide und eventuell oxydierte ungesättigte Fettsäuren eine positive PAS-Reaktion geben. Ausführliche Darstellungen dieser Probleme und Literatur-

Tabelle 2. *UV-photometrische Messungen an Kernen von Lymphocyten der Milz vor und nach Behandlung mit Oxalsäure und Salzsäure*

Art der Behandlung	n	E $\lambda 265 \text{ m}\mu$	E $\lambda 280 \text{ m}\mu$	E $\lambda 313 \text{ m}\mu$
Unbehandelt . . .	{ 10 }	0,98	0,74	0,01
Oxalsäure-Extraktion		0,90	0,72	0,02
Unbehandelt . . .	{ 11 }	1,05	0,84	0,02
HCl-Extraktion . .		0,45	0,42	0,03

angaben sind an anderen Stellen zu finden (HOTCHKISS 1948, GEDIGK 1952 GOMORI 1953, PEARSE 1953, 1960, LEBLOND u. Mitarb. 1957).

Durch Untersuchungen am isolierten Eisenpigment der Milz konnte LUDEWIG (1957) diese histochemischen Befunde bestätigen. Er fand im Hämosiderin neben Proteinen einen Polysaccharidbaustein, der Hexosamin, Galactose, Mannose und Fucose enthielt. Nach der Ansicht dieses Autors handelt es sich dabei um die mit der Perjodsäure-Leukofuchsinsreaktion nachgewiesene Kohlenhydratkomponente des Eisenpigmentes.

Demgegenüber beschrieben unlängst WÖHLER und BIELIG (1959) an isolierten Hämosiderinpartikeln der Milz einen Desoxyribonucleotidgehalt von 25%, der ungefähr der in Zellkernen vorkommenden DNS-Menge entsprach. Der organische Restkörper des Eisenpigmentes müßte demnach sogar 60% DNS enthalten, also erheblich mehr als ein Zellkern. Obwohl das gelegentliche Auftreten kleinerer DNS-Mengen im Cytoplasma beschrieben worden ist, wäre ein so hoher Gehalt an Desoxyribonucleinsäuren in Cytoplasmastrukturen doch sehr ungewöhnlich und hätte wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Wenn man weiterhin berücksichtigt, daß mit verschiedenen, sehr empfindlichen und spezifischen Methoden, wie z.B. der Feulgenreaktion, der Galloxyanin-Chromalaunfärbung und der UV-Mikrospektrophotometrie, im Eisenpigment keine Nucleinsäuren und insbesondere auch keine Desoxyribonucleinsäuren nachweisbar sind, so ist die Vermutung naheliegend, daß die zweifellos exakten chemischen Analysen doch nicht an reinen („unveränderten“) Pigmentgranula vorgenommen worden sind. Man muß wohl annehmen, daß diese Resultate durch Artefakte beeinträchtigt worden sind, die bei der Aufarbeitung des Gewebes und der Isolierung der einzelnen Zellstrukturen unter Umständen auftreten und, wie die Erfahrung lehrt, mikroskopisch manchmal nicht ohne weiteres nachweisbar sind. Im Gegensatz dazu beziehen sich die unseren Untersuchungen zugrunde liegenden qualitativen und quantitativen Methoden stets auf das jeweilige morphologische Substrat, d. h. in diesem Falle auf das Hämosiderinpigment und seine Trägersubstanz.

Zusammenfassung

Das Eisenpigment zeigt bei der mikroskopischen Untersuchung im UV-Licht eine ausgesprochene Absorption bei λ 265 m μ und im Bereich von 330 bis 400 m μ .

Nach der Extraktion des Eisens mit Oxalsäure oder mit Salzsäure findet sich noch eine geringfügige Absorption im Bereich von λ 265 m μ und λ 280 m μ , die auf das Vorhandensein der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan hinweist.

Desoxyribonucleotide lassen sich im organischen Restkörper des Eisenpigmentes weder mit den üblichen histochemischen Methoden noch mit der UV-Mikrospektrophotometrie nachweisen.

Die bei der Bestimmung der Ribonucleinsäuren gemessenen Werte sind so gering, daß sie noch in der Fehlerbreite der Methodik liegen und keine sicheren Rückschlüsse auf das Vorhandensein von RNS erlauben. Bezogen auf die Proteinkonzentration könnte der Gehalt an RNS höchstens 1% betragen.

Die früher durchgeföhrten histochemischen Untersuchungen an Eisenpigmenten wurden bestätigt: Neben Proteinen läßt sich ein Polysaccharidbaustein nachweisen, bei dem es sich um Mucopolysaccharide oder um Muco- (bzw. Glyko-)proteide handelt. Daneben finden sich im geringen Umfang schwer lösliche Lipide.

Summary

In UV microscopy iron pigment shows a distinct absorption at a wave length of 265 m μ and between the wave lengths 330 m μ to 400 m μ . After the extraction of the iron with either oxalic acid or HCl there is still a slight absorption in the region of 265 m μ and 280 m μ , due to the presence of tyrosine and tryptophane.

Desoxyribonucleotides can not be demonstrated in the organic remnant of the iron pigment, either with the usual histochemical methods or with UV microspectrophotometry.

The values for the ribonucleic acids are so infinitesimal, that they lie well within the range of error for the method used; therefore, no definite conclusions on the presence of RNS can be made. The content of the RNS at most may be 1%, considering the concentration of the protein.

Earlier histochemical studies carried out on the iron pigment have been confirmed. Besides the protein, a polysaccharide can be demonstrated which is either a mucopolysaccharide or a mucoprotein (glycoprotein). In addition, there is a lipid in small amounts which is poorly soluble.

Literatur

- GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. Klin. Wschr. **30**, 1057—1065 (1952).
- GEDIGK, P.: Histochemische Methoden. In: Biochemisches Taschenbuch, S. 855—891. Berlin: Springer 1956.
- GEDIGK, P.: Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigments. Ergebni. allg. Path. path. Anat. **38**, 1—45 (1958).
- GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur Histochemie des Hämosiderins. Verh. dtsch. Ges. Path. **37**, 240 (1953). Virchows Arch. path. Anat. **324**, 373 (1953).
- GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur formalen Genese der Eisenpigmente. Virchows Arch. path. Anat. **326**, 172 (1954).
- GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis einer organischen Trägersubstanz im Hämosiderinpigment. Virchows Arch. path. Anat. **323**, 685 (1953).
- GOMORI, G.: Microscopical Histochemistry Chicago, Ill.: University Press 1953.
- LEBLOND, C. P., R. E. GLEGG and D. EIDINGER: Presence of carbohydrates with free 1,2-glykolgroups in sites stained by the periodic acid-Schiff technique. J. Histochem. Cytochem. **5**, 445—458 (1957).
- LUDEWIG, S.: Hemosiderin. Isolation from horse spleen and characterization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **95**, 514—517 (1957).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London 1953 u. 1960.
- SANDRITTER, W.: Ultraviolettmikrospektrophotometrie. In Handbuch der Histochemie, Bd. I/1, S. 220—338. Stuttgart: Gustav Fischer 1958.
- WÖHLER, F., u. H. BIELIG: Über die Natur des Hämosiderins. In W. KEIDERLING, Eisenstoffwechsel, S. 82—92. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Professor Dr. W. SANDRITTER und Dr. M. SCHREIBER
Pathologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Gartenstr. 229
Privatdozent Dr. P. GEDIGK
Pathologisches Institut der Universität, Bonn a. Rh.-Venusberg