

Aus den Pathologischen Instituten der Universitäten Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)
und Marburg (Direktor: Prof. Dr. P. GEDIGK)

Elektronenmikroskopische Untersuchung des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes im Myometrium der Ratte

Von
PETER GEDIGK und WOLFGANG WESSEL*, **

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Oktober 1963)

Im Vitamin-E-Mangelzustand werden in den glatten Muskelfasern des Uterus ungesättigte Lipide abgelagert, aus denen durch allmähliche Oxydation und Polymerisation gelbbraune Pigmentgranula entstehen. Im Laufe dieses Entwicklungsvorganges kommt es zu einer erheblichen Änderung der chemischen Eigenschaften des Pigmentes. Morphologisch und histochemisch entspricht das Vitamin-E-Mangel-Pigment weitgehend den in Parenchymzellen auftretenden Lipofuscinen (GEDIGK und FISCHER 1959; dort weitere Literatur).

Obwohl das Vitamin-E-Mangel-Pigment und einzelne Lipofuscine schon Gegenstand elektronenmikroskopischer Untersuchungen waren, wurde bisher die Frage nach dem Ort der Lipidspeicherung im Cytoplasma nicht geklärt. Das lag offenbar daran, daß in der Regel „alte“ Pigmentkörnchen zur Untersuchung gelangten, welche keine sicheren Rückschlüsse auf die formale Genese erlaubten.

Einige Autoren hielten das Vitamin-E-Mangel-Pigment, ebenso wie die Lipofuscine, für transformierte Mitochondrien (HESS 1955, LINDNER 1957, POCHE 1958, 1962, DUNCAN, NALL und MORALES 1960, ASHFORD und PORTER 1962, GHOSH, Bern, GHOSH und NISHIOKA 1962). Demgegenüber lehnten BJÖRKERUD und CUMMINS 1963 sowie MALKOFF und STREHLER (1963) auf Grund neuer Untersuchungen Beziehungen des Lipofuscins zu Mitochondrien ab. HAMMERBECK (1960) stellt bei den Lipofuscinen des Herzmuskels eine Entstehung aus Myofibrillen zur Diskussion. Auch Beziehungen zum Golgi-Apparat (GATENBY 1950, 1953, BONDAREFF 1957) wurden angenommen. POCHE (1958) wies auf die Möglichkeit hin, daß Lipofuscincgranula vielleicht aus gespeicherten Neutralfetttropfen entstehen können. Schließlich legten die Untersuchungen von ESSNER und NOVIKOFF (1961) eine enge Beziehung zwischen Lipofuscinen und Lysosomen nahe.

Zur Klärung dieser Fragen verfolgten wir elektronenmikroskopisch die Entwicklung des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes bei Ratten, da sich im Tierexperiment genauer als bei der Untersuchung menschlicher Organe die verschiedenen Altersstufen der Pigmente definieren lassen. Besonderen Wert legten wir dabei auf die ersten Entwicklungsstadien der Pigmentgranula, welche am ehesten Hinweise auf den Ort der Lipidspeicherung in dem Cytoplasma geben dürften. Und schließlich sollte die Feinstruktur des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes mit den bekannten submikroskopischen Bildern anderer Lipopigmente verglichen werden.

* Herrn Prof. Dr. H. E. BOCK zum 60. Geburtstag gewidmet.

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

Versuchsanordnung und Methoden

50 4—6 Wochen alte, weibliche Wistaratten (Gewicht 80—120 g) wurden mit Vitamin-E-ärmer Diät ernährt, wobei die Kost nach Angaben der Deutschen Hoffmann-La Roche A.G., Grenzach/Baden, zusammengesetzt war. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 66, 90, 104 132, 207, 220, 240, 250, 303, 350, 400 und 475 Tagen. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Anteile des Myometriums in 2%iger gepufferter Osmiumsäure fixiert und in typischer Weise in Metacrylat eingebettet. Neben dem üblichen, mit Osmiumsäure fixierten und mit Uranylacetat behandelten Material untersuchten wir auch Schnitte, welche zusätzlich mit Bleihydroxyd kontrastiert waren, um eine bessere Darstellung schwach osmiophiler Strukturen zu erreichen. Die mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom angefertigten Dünnschnitte untersuchten wir in einem Siemens-Elmiskop I.

Ergebnisse

1. Nach 66-tägigem Vitamin-E-Mangel zeigten die Uterusmuskelzellen im wesentlichen noch den gleichen Aufbau wie bei den Kontrollen. Gelegentlich beobachtete man jedoch in der stoffwechselaktiven Zone an den Kernpolen zwischen den Mitochondrien kleine Ansammlungen eines feingranulierten, offenbar lipidhaltigen osmiophilen Materials, welches von keiner begrenzten Membran umgeben wurde. Wie sich im Laufe der Versuche herausstellte, entstanden in diesen Gebieten die Pigmentgranula; sie sollen deshalb als „Propigmentzonen“ bezeichnet werden. Besonders deutlich stellten sich diese Gebiete bei der Nachkontrastierung mit Bleisalzen dar, während sie bei den bloß mit Osmium „angefärbten“ und mit Uranylacetat nachkontrastierten Präparaten nur angedeutet zu erkennen waren. Neben den schwach osmiophilen Propigmentzonen sah man mitunter schon Granula, welche sich stellenweise durch eine dünne, etwas unscharfe Membran abgrenzten und bereits eine dichtere, körnige, offenbar lipidhaltige Innenstruktur besaßen. Außerdem enthielten die Granula in vereinzelten Fällen etwas größere homogene osmiophile Partikel (Abb. 1). Zwischen dem 66. und 132. Versuchstag nahmen die Propigmentzonen an Zahl nur wenig zu, so daß sie bei der geringen Dicke der elektronenmikroskopischen Schnitte nur selten angetroffen wurden.

Nach einer mittleren Versuchsdauer (etwa zwischen dem 132. und 250. Tag), setzte eine besonders lebhafte Neubildung von Propigmentzonen ein, wie es die Abb. 2 zeigt. Dabei traten die Propigmentzonen und die reiferen Pigmentgranula nicht nur in Kernnähe, sondern auch im übrigen Cytoplasma auf. Eine direkte Beteiligung der Mitochondrien, d. h. eine Speicherung der Lipide in Mitochondrien oder eine Entstehung der Pigmentgranula aus Mitochondrien bzw. deren hypothetischen Vorstufen, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Granula zeigten auch keine Ähnlichkeiten oder strukturelle Beziehungen zu anderen Cytoplasmaorganellen, wie zu Golgi-Elementen oder zum Ergastoplasma.

Die einzelnen Pigmentgranula nahmen im Laufe ihrer Reifung unter zunehmender Ablagerung feingranulärer und manchmal feinfädiger Lipide an Osmophilie zu und wiesen dann in einer grauen Grundsubstanz stellenweise eine dichte körnige Struktur auf, die besonders durch die Kontrastierung mit Bleihydroxyd hervorgehoben wurde (Abb. 2). So zeigt die Abb. 2 mehrere Reifestadien des Pigmentes von den Propigmentzonen bis zu den ausgereiften Pigmentgranula nebeneinander.

Außerdem entstanden in den zunächst feingranulierten Pigmentkörnchen unregelmäßige fädige Strukturen, die auf den ersten Blick zu Verwechslungen mit

Cristae mitochondriales Anlaß geben könnten (Abb. 3). Bei stärkerer elektronenmikroskopischer Vergrößerung erwiesen sie sich als kettenartige Aneinanderlagerungen punktförmiger, stark osmiophiler Gebilde, bei denen es sich offenbar um Polymerisationsprodukte der zunächst in feingranulierter Form abgelagerten Lipide handelte.

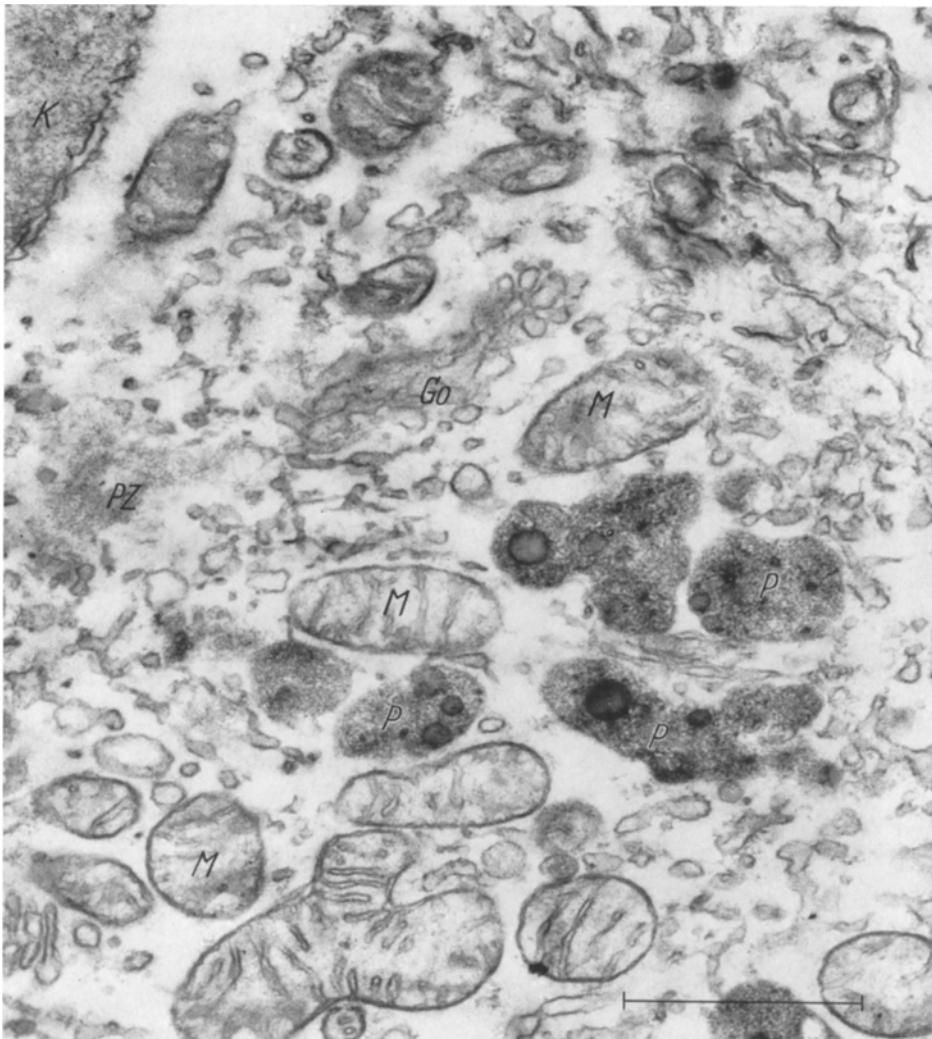


Abb. 1. Kernnahe Cytoplasmazone einer Muskelzelle nach 132-tägigem Vitamin-E-Mangel mit Mitochondrien, Golgi-Elementen (*Go*), Propigmentzonen (*PZ*) und Pigmentgranula in verschiedenen Reifestadien (*P*). Einige der sonst feinkörnigen Granula enthalten homogene dichte Bezirke. Zellkern (*K*), Mitochondrien (*M*). Vergr. 40000fach. Bleikontrastierung

Betrachtet man die Uterusmuskelzellen bei einer Versuchsdauer von mehr als 300 Tagen, so fiel schon bei Übersichtsvergrößerungen auf, daß die Muskelzellen und das Zwischengewebe stark aufgelockert waren. Die an sich schon schwach gefärbten Myofibrillen hatten einen deutlichen Kontrastverlust erlitten. An den Kernpolen lagen neben wenigen Mitochondrien sehr zahlreiche Lipopigment-

granula (Abb. 4a). Bei stärkerer Vergrößerung zeigte es sich, daß die Mitochondrien größtenteils spärliche und etwas unregelmäßig verlaufende Cristae besaßen.

Die Pigmentgranula waren im allgemeinen von doppelter bis dreifacher Größe der Mitochondrienanschnitte. Sie wurden oft von einer einfachen Membran umgeben und hatten eine dichte, feinkörnige Struktur. Ihre Grundsubstanz zeigte eine deutliche Zunahme an elektronenmikroskopischer Dichte. Einzelne Granula wiesen an ihrem Inneren cristaeähnliche, an Doppelmembranen erinnernde Elemente auf, bei denen es sich — wie bereits weiter oben dargelegt — offenbar

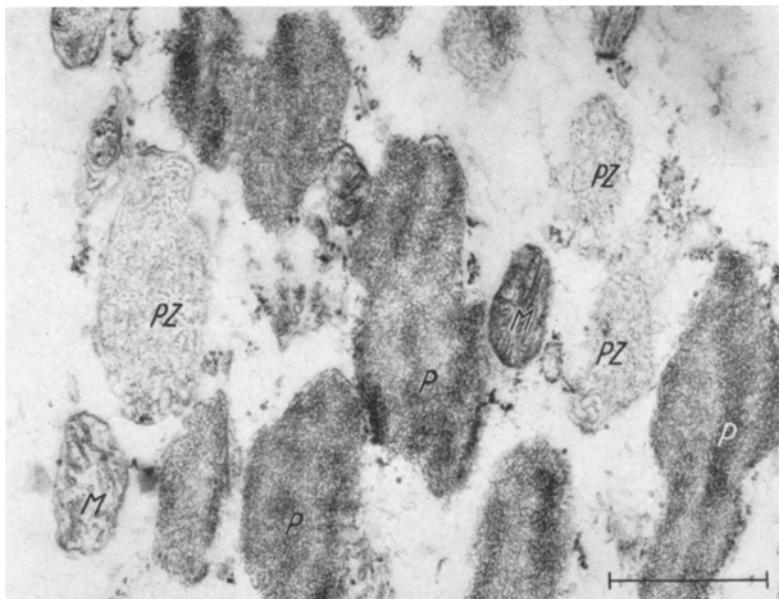


Abb. 2. Cytoplasma einer Muskelzelle mit intensiver Neubildung von Pigmentgranula nach 207 Tagen Vitamin-E-Mangel. Durch Bleikontastierung werden die im Hyaloplasma entstehenden Propigmentzonen (PZ) deutlich hervorgehoben. Sie besitzen eine unscharfe Abgrenzung und bestehen aus einem locker gefügten feingranulären oder feinfädigen Material. Die reiferen Pigmentgranula (P) werden aus stark kontrastierten fädigen und körnigen Elementen in dichter Packung aufgebaut. Mitochondrien (M). Vergr. 18 000fach. Bleikontastierung

um kettenartig aneinander gereihte Molekülaggregate von stärkerer Osmophilie handelte.

In späteren Stadien, die dem 350.—400. Versuchstag entsprachen, zeigten die Pigmentgranula eine zentrale Auflockerung bei gleichzeitiger Abnahme oder gar Verschwinden der Polymerisatketten (Abb. 4b). Dabei ließen sich mit starker elektronenmikroskopischer Vergrößerung vereinzelte Ferritinpartikel erkennen.

Es ist hervorzuheben, daß bei unserer Versuchsanordnung etwa vom 350. Tag an kaum Propigmentzonen als Zeichen einer Pigmentneubildung nachzuweisen waren. Im Vordergrund standen die beschriebenen regressiven Veränderungen an den vorhandenen Granula (Abb. 4b).

Um den 475. Versuchstag kam es zu einem Untergang vieler Muskelfasern, während die Granula in größere, teils homogene und teils gleichmäßig gekörnte Schollen zerfielen. Ihre äußere Form und ihre Innenstruktur waren in diesen Spätstadien weitgehend einheitlich (Abb. 5).

2. In früheren lichtmikroskopischen Befunden konnte gezeigt werden, daß bei älteren Versuchstieren viele Muskelfasern zerfielen. Dabei wurden die Pigmentkörnchen teilweise mit dem Säftestrom abtransportiert; vorwiegend wurden

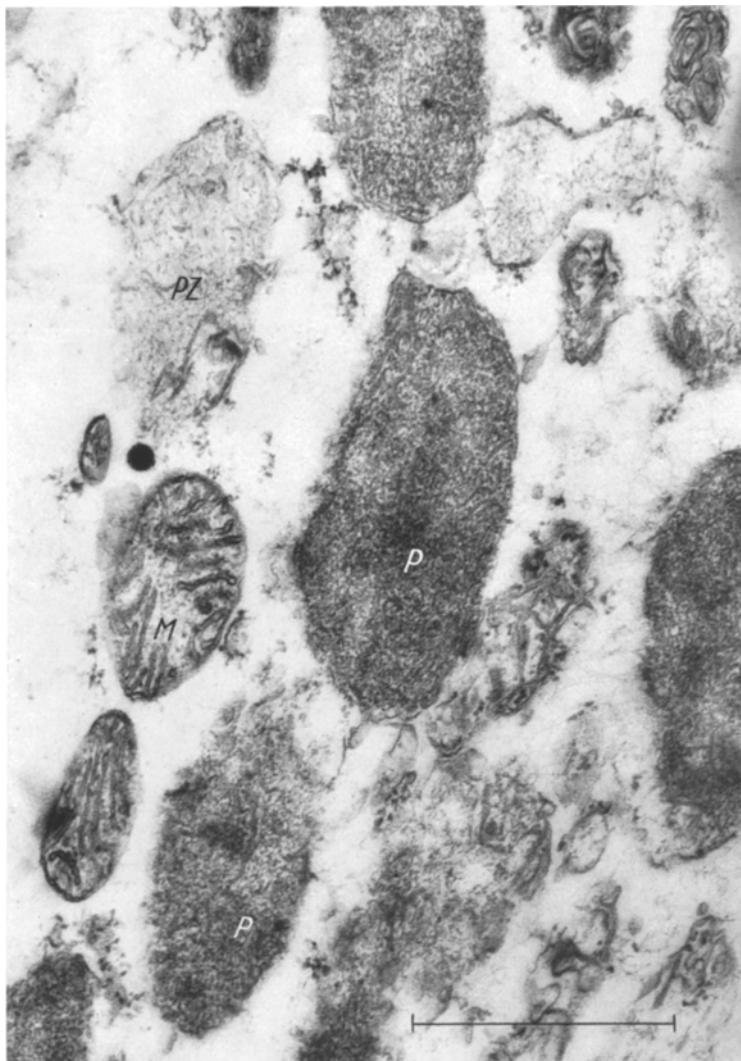


Abb. 3. Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer Uterusmuskelzelle nach 300 Tagen Vitamin-E-Mangel. In den ursprünglich feinkörnigen Pigmentgranula (P) haben sich durch Aneinanderlagerung kleiner Grundeinheiten unterschiedliche lange Ketten gebildet, die mitunter an Cristae mitochondriales erinnern. Daneben eine Propigmentzone (PZ) und Mitochondrien (M). Vergr. 35000fach.
Bleikontrastierung

sie aber von *phagocytierenden Zellen* aufgenommen, deren Cytoplasma schließlich zahlreiche fluoreszierende Pigmentgranula enthielt (GEDICK u. FISCHER 1959, s. dort Abb. 4b, S. 437). Elektronenmikroskopisch sammelte sich das aus Muskelzellen stammende Material im Cytoplasma der Makrophagen in Form kleiner Granula an, die in ihrem Aufbau zunächst an die vorher beschriebenen Pigment-

granula in den Muskelfasern erinnerten. Sie besaßen feingranulierte Zentren mit einzelnen Ferritinpartikeln und größeren lipidhaltigen Tropfen in den peripheren Anteilen. Diese Tropfen nahmen dann an Zahl und Größe zu, bis sie die

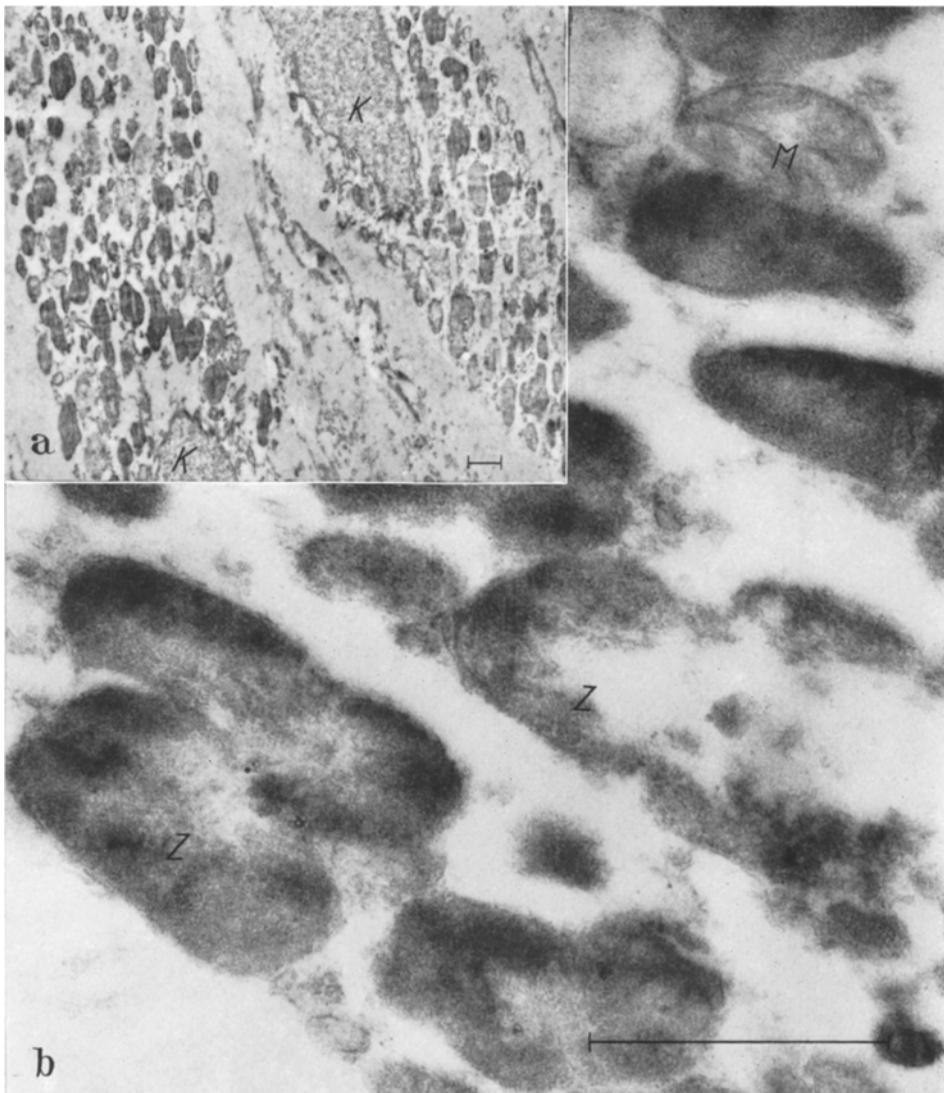


Abb. 4a. Zwei Uterusmuskelzellen nach 300tägigem Vitamin-E-Mangel. Das Cytoplasma enthält an den Kernpolen zahlreiche Pigmentgranula. Zellkern (K). Vergr. 6000fach

Abb. 4b. Cytoplasma einer Uterusmuskelzelle nach 350tägigem Vitamin-E-Mangel. Die in Abb. 3 erkennbaren Ketten treten nicht mehr so deutlich hervor. Die größeren Granula beginnen bereits zu zerfallen (Z). Mitochondrien (M). Vergr. 50 000fach. Bleikontrastierung

Granula ganz ausfüllten und sich schließlich zu großen, auch lichtmikroskopisch deutlich erkennbaren Schollen zusammenlagerten. Die Pigmentgranula zeigten in den Makrophagen einen bemerkenswerten Formenreichtum, der vor allem auf dem weiteren Umbau der dichten osmiophilen Lipidablagerungen beruhte

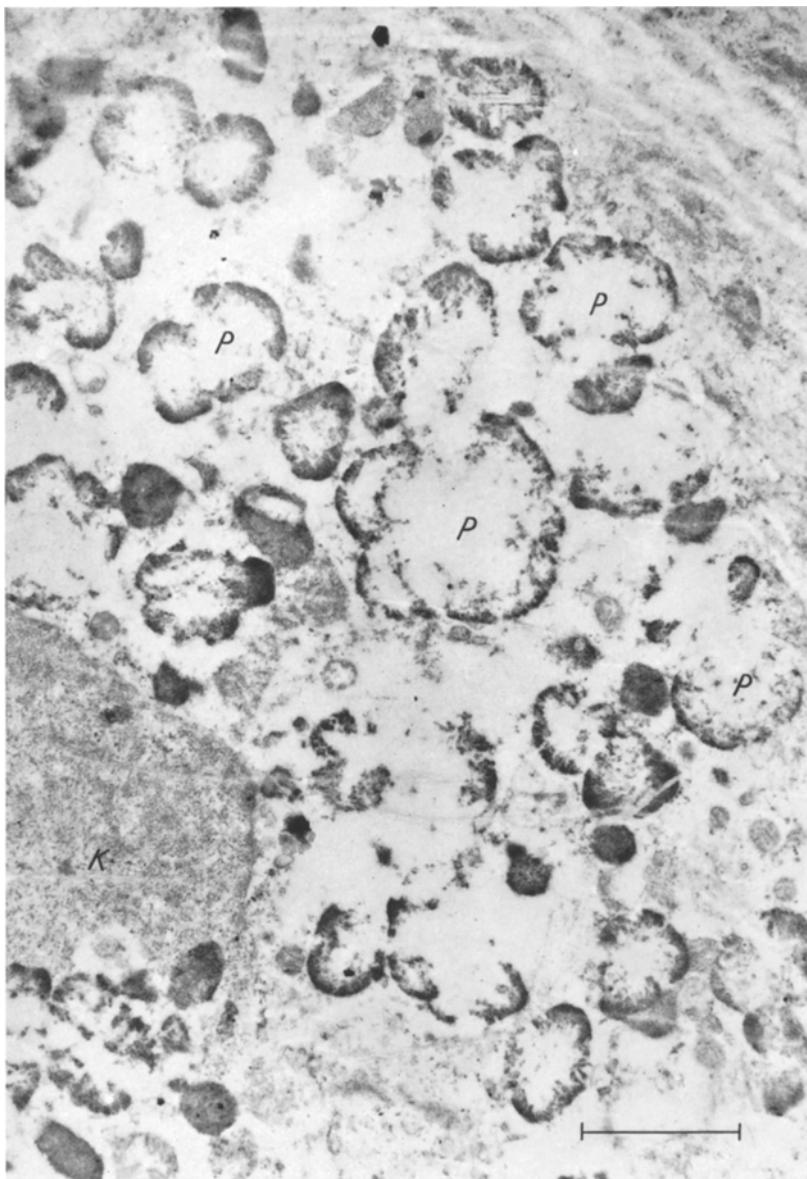


Abb. 5. Uterusmuskelzelle nach 475-tägigem Vitamin-E-Mangel. Durch den beginnenden Zerfall der Zelle stellen sich die Kern- und Cytoplasmastrukturen unscharf dar und besitzen einen geringen Kontrast. Stellenweise erscheint das Cytoplasma leer. Von den Pigmentgranula (P) ist nur noch die Peripherie erkennbar, während sich die zentralen Anteile bereits aufgelöst haben. Zellkern (K). Vergr. 12 000fach. Bleikontrastierung

(Abb. 6): In den Tropfen entstanden helle Streifen, die wahrscheinlich auf einen kettenartigen Einbau von proteidreichem und damit weniger osmiophilem Material zurückzuführen waren. Diese „Ketten“ besaßen meist eine konstante Breite von 80—100 Å. Die auf diese Weise gebildeten periodischen Strukturen erinnerten an „negative“ Myelinfiguren (Abb. 6). Einige lipidhaltige Tropfen

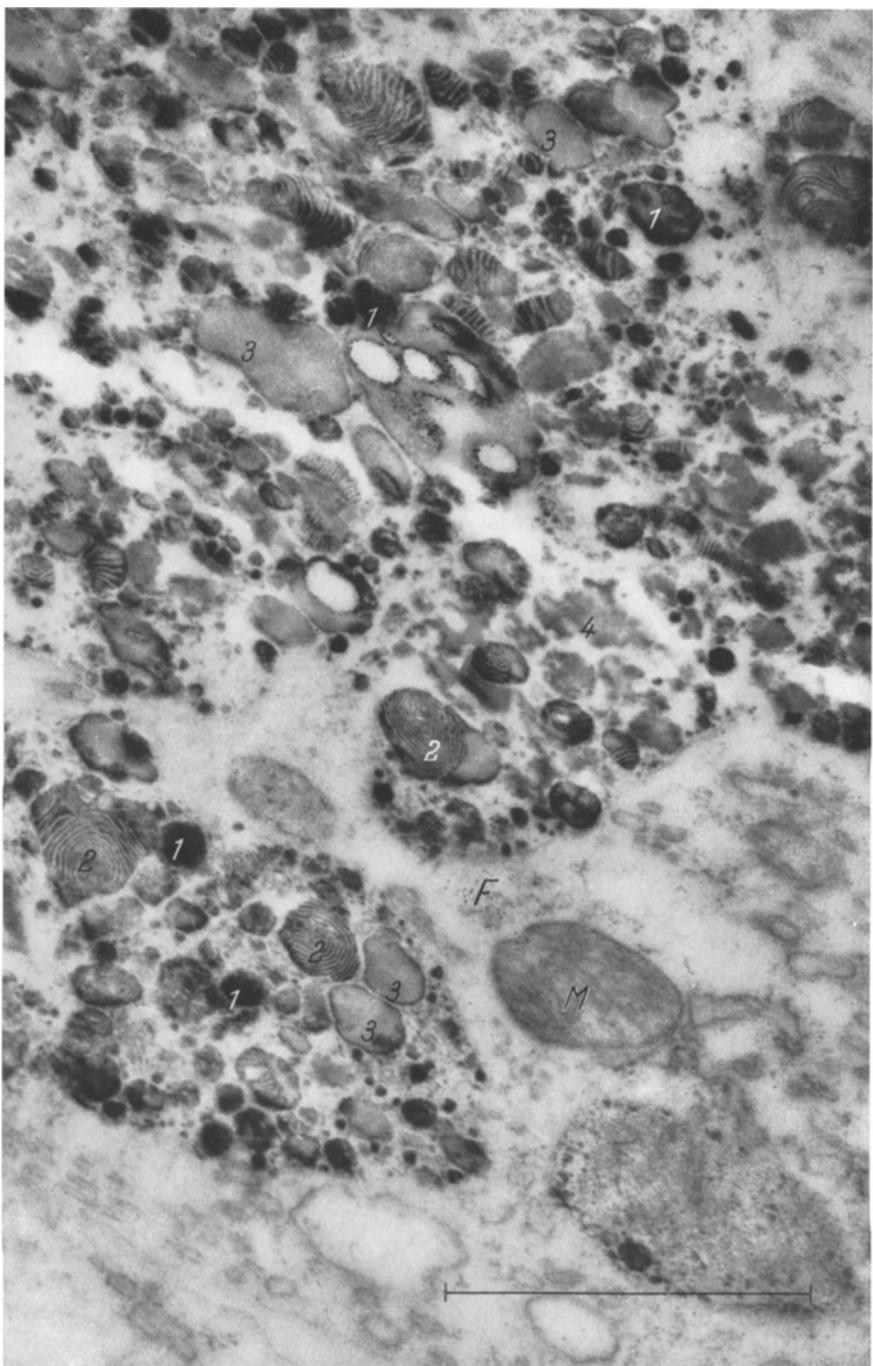


Abb. 6. Ausschnitt aus dem Cytoplasma eines Makrophagen. Das von zerfallenden Muskelzellen stammende Material wird von den phagocytierenden Zellen in Form großer Schollen gespeichert. Neben homogenen stark osmiophilen Elementen (1), wie man sie auch in früheren Stadien der Phagozytose sieht, finden sich in diesen Schollen Granula mit konzentrischer Streifung (2), die sich schließlich zu homogenen großen, schwächer kontrastierten Granula umwandeln (3), um sich schließlich aufzulösen (4). Zwischen diesen drei Formen findet man alle Übergänge. In der Nachbarschaft der großen Schollen erkennt man oft Ansammlungen von Ferritin (F). Mitochondrien (M). Vergr. 60000fach

zeigten in einem Drittel eine weitgehend homogene osmiophile Substanz, im mittleren Drittel die periodische Streifung und im letzten Drittel ein homogenes, wenig osmiophiles Material, welches den hellen Streifen der periodischen Anteile entsprach. Ein Teil dieser hellen Tropfen löste sich dann im Cytoplasma auf.

3. Bei der Untersuchung von *Kontrolltieren*, welche ein normales, Vitamin-E-haltiges Futter erhielten, ergaben sich folgende Bilder:

Neben den eingangs erwähnten Cytoplasmaorganellen fanden sich schon bei 130 Tage alten Tieren an den Kernpolen vereinzelte Propigmentzonen sowie kleine Granula, welche eine körnige Struktur mit eingelagerten osmophilien Partikeln besaßen und den im Anfangsstadium des Vitamin-E-Mangels beschriebenen Pigmentgranula entsprachen. Sie enthielten ebenfalls Ferritinpartikel und waren in der Regel nicht durch eine Membran abgegrenzt. Beziehungen zu präformierten Cytoplasmaorganellen bestanden nicht.

Im Laufe der Alterung vergrößerten sich diese Granula bei gleichzeitiger Vermehrung der Lipidpartikel, in denen oft eine Streifung sichtbar wurde. Zur weiteren Umwandlung der Pigmentgranula kam es aber auch bei den älteren Kontrolltieren (475 Tage) nicht.

Diskussion

1. Welchen Strukturwandel zeigt das Vitamin-E-Mangel-Pigment im Laufe einer Entwicklung? In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß sich das Vitamin-E-Mangel-Pigment im Laufe der Alterung vergrößert und eine Änderung seiner histochemischen Eigenschaften erfährt (GEDIGK und FISCHER 1959). Die vorliegenden elektronenmikroskopischen Bilder deckten nunmehr auch einen erheblichen Strukturwandel der Pigmentgranula auf, welcher synchron mit der chemischen Umwandlung abläuft: Zunächst entstehen im Hyaloplasma die lichtmikroskopisch noch nicht erfaßbaren Vorstadien des Pigmentes als unscharf begrenzte, leicht gekörnte Propigmentzonen, in welchen kleinere und größere, zunächst mehr feingranulierte, elektronenoptisch dichte, lipidhaltige Partikel abgelagert werden. Auch Ferritinmoleküle kommen hier in wechselnder Menge zur Darstellung.

Die Umwandlung der Propigmentzonen in reife Pigmentgranula erfolgt unter zunehmender Ablagerung feingranulärer Lipide, zwischen denen sich eine schwach osmiophile Zwischensubstanz bildet. An der Peripherie der Granula treten häufig auch größere, dichte und homogene Lipidablagerungen zutage. Außerdem entstehen im Laufe der weiteren Entwicklung fadenförmige, an Membranen erinnernde Strukturen, denen offenbar Polymerisationsprodukte der zunächst feingranulären Lipide zugrunde liegen. Gegen die Umgebung grenzen sich die Lipidablagerungen allmählich durch eine Membran ab, die zunächst unscharf konturiert ist. Auch in den älteren Granula ist diese Membran uneinheitlich ausgeprägt.

Später kommt es in den Pigmenten unter weiterer Verdichtung der Grundsubstanz zur Bildung größerer, teils körniger und teils fast homogener Schollen, welche bei den ältesten Versuchstieren auseinanderbrechen. Diese Granula stellen die letzten Entwicklungsstufen bzw. bereits Zerfallsprodukte des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes dar.

Gleichzeitig weisen die Muskelzellen erhebliche regressive Veränderungen auf, wie einen Kontrastverlust der Myofibrillen, eine Quellung der Mitochondrien

usw.. Bei älteren Versuchstieren gehen dann in zunehmendem Maße Muskelfasern zugrunde. Die dabei frei werdenden Pigmentgranula werden teilweise mit dem Säftestrom abtransportiert; größtenteils werden sie jedoch im Cytoplasma von Makrophagen gespeichert und verarbeitet, wie es schon LINDNER (1958) beobachtet hatte. Die Pigmentkörnchen erleiden dabei einen weiteren erheblichen Formenwandel, bei dem das Auftreten negativer Myelinfiguren besonders eindrucksvoll ist. Ob es sich bei diesen strukturellen Veränderungen nur um den Ausdruck des im Cytoplasma der Makrophagen ablaufenden Abbaues der Pigmente handelt, steht noch dahin. Es wäre denkbar, daß auch für diese Umbauvorgänge der Vitamin-E-Mangel-Zustand teilweise mit verantwortlich ist, von dem die Makrophagen genau so wie die Muskelzellen betroffen sind.

Überblickt man die submikroskopische formale Genese und Alterung des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes, so findet man — in Übereinstimmung mit dem Wandel der histochemischen Eigenschaften — sehr unterschiedliche Strukturen, denen man ohne Kenntnis des ganzen Entwicklungsablaufes nicht ohne weiteres ansehen könnte, daß es sich um verschiedene Altersstufen der gleichen Pigmentgranula handelt.

Bemerkenswert ist das Auftreten von Ferritinpartikeln in den Pigmentgranula, welche sowohl in den jungen Körnchen als auch in den mittleren Entwicklungsstufen manchmal recht dicht gelagert sind. In den alten Pigmentgranula treten sie mengenmäßig zurück oder fehlen ganz. Das Auftreten von Ferritin in den Pigmentzonen, das bereits LINDNER (1957) beschrieben hatte, scheint darauf hinzuweisen, daß in diesen Zellbezirken eine Eisenspeicherung oder vielleicht auch eine Störung des Eisenstoffwechsels besteht.

2. Zu welchem Zeitpunkt des Vitamin-E-Mangel-Zustandes treten die Pigmentgranula auf? Abgesehen von der formalen Genese geben die elektronenmikroskopischen Befunde auch über den Zeitpunkt der Pigmententstehung Auskunft. Betrachtete man die Zahl der Propigmentzonen einerseits und die Gesamtzahl der Pigmentgranula der Muskelzellen während des zeitlichen Ablaufes unserer Versuche andererseits, so fiel auf, daß in den ersten 130 Tagen relativ wenig Propigmentzonen auftraten, d. h. nur wenig Pigmente gebildet wurden. Es war darum verständlich, daß diese Anfangsstadien der Pigmente zunächst schwer zu finden waren. Offenbar war der Organismus in den ersten Monaten der Vitamin-E-armen Ernährung noch in der Lage, diesen Mangel auszugleichen; und zwar vielleicht durch eine noch aus der Zeit vor dem Versuchsbeginn vorhandenen Vitaminreserve. Diese erste Versuchsperiode kann also als „*Kompensationsphase*“ bezeichnet werden. Vom 130. bis etwa zum 250. Tag setzte dann eine außerordentlich starke Bildung von Propigmentzonen ein, die schnell zu fertigen Pigmentgranula ausreiften. Es kam also zu einem starken zahlenmäßigen Ansteigen der Pigmentgranula in den einzelnen Muskelzellen. Diese zweite Periode könnte man demnach als „*Phase der stärksten Pigmentbildung*“ bezeichnen, in welcher der Organismus nicht mehr in der Lage war, den alimentären Vitamin-E-Mangel zu kompensieren.

Nach dem 300. Tag standen regressive Veränderungen im Vordergrund, die zur Nekrobiose der Muskelzellen und zum Zerfall der Pigmentgranula führten. In diesem Versuchsstadium kamen nur noch wenige neue Pigmentgranula hinzu, so daß man in den elektronenmikroskopischen Bildern nur vereinzelt Propigment-

zonen antraf. Diese dritte Periode könnte also als „*Phase der Nekrobiose*“ charakterisiert werden.

Um die einzelnen Phasen der Pigmentbildung genau bestimmen zu können, ermittelten wir planimetrisch den Flächenanteil, den die Pigmentgranula auf elektronenoptischen Übersichtsaufnahmen am Gesamtschnitt, also an der Uterusmuskulatur, einnahmen. Wir werteten planimetrisch Übersichtsaufnahmen von Kontrollen, sowie von Tieren nach 104-, 207-, 303- und 475-tägigem Vitamin-E-Mangel aus. Durch möglichst kleine Vergrößerungen, welche die Auswertung großer Flächen erlaubten, gewannen wir einen repräsentativen Querschnitt des Pigmentanteiles. Obwohl der Schnittwinkel, unter dem die Fasern angeschnitten wurden, auf diese Berechnungen keinen wesentlichen Einfluß hat — da es sich ja nicht um absolute Werte, sondern um die Flächenrelation der Pigmentgranula zum gesamten Muskelgewebe handelt —, haben wir doch nur Präparationen mit gleichem Schnittwinkel (Längsschnitt) ausgewertet. Dabei läßt sich der Schnittwinkel leicht über eine tang.-Funktion an den beiden Halbmessern der spindeligen Zellkerne näherungsweise bestimmen (s. auch W. WESSEL 1960). Außerdem achteten wir darauf, daß nur Bilder mit derselben Vergrößerung ausplanimetriert wurden. Die Kurve in Abb. 7 gibt den Flächenanteil der Pigmentgranula an der Uterusmuskulatur während des Vitamin-E-Mangel-Zustandes in elektronenmikroskopischen Dünnschnitten wieder. Auf der Abszisse wurde die Zeit bzw. die Dauer des Vitamin-E-

Mangels, auf der Ordinate der Quotient $\frac{\text{Schnittfläche der Pigmentgranula}}{\text{Gesamtschnittfläche der Uterusmuskulatur}}$ in Prozent

aufgetragen. Da es sich bei den Pigmentgranula um relativ gleich gebaute, runde bis ovale, dreidimensionale Gebilde handelt und man den elektronenmikroskopischen Dünnschnitt als Quader mit differentiell kleiner Höhe auffassen kann, gibt die Kurve in Abb. 7 nicht nur den Flächen- sondern auch den Volumenanteile der Granula am Gesamtgewebe der Muskulatur wieder, der auf der Höhe des Vitamin-E-Mangels um den 300. Tag etwa 40% beträgt.

Als wesentliches Resultat dieser Messungen ist hervorzuheben, daß der Anstieg der Zahl der Pigmentgranula nicht linear erfolgt, sondern nach Art einer flachen, S-förmigen Kurve, wie man sie vergleichsweise bei den Titrationskurven in der Elektrochemie findet. Dabei entspricht der mittlere Teil (II) der Kurve einer Exponentialfunktion etwa nach Art der Wachstumsfunktion. Den gleichen Kurvenverlauf erhielten wir bei Anwendung neuer morphometrischer Methoden, wie sie von HENNIG und MEYER-ARENDE sowie WEIBEL angegeben wurden.

Das plötzliche Auftreten der Pigmente nach einer „kompensatorischen Phase“ im Vitamin-E-Mangel-Zustand entspricht im übrigen auch anderen biologischen Vorgängen, bei denen schädigende Einflüsse erst nach einer bestimmten Latenzzeit, d. h. nach dem Überschreiten eines Schwellwertes manifest werden (z. B. Auswirkungen des Sauerstoffmangels oder Giftwirkungen).

Der Abfall der Kurve etwa nach dem 350. Versuchstag dürfte auf dem beschriebenen zunehmenden Zerfall der Muskelfasern bei alten Versuchstieren beruhen, bei dem ein Teil der Pigmentkörnchen durch den Säftestrom abtransportiert wird (s. S. 371 u. 376).

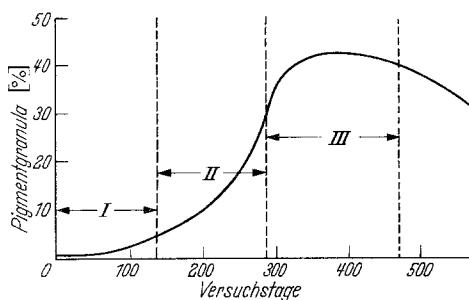


Abb. 7. Zunahme der Pigmentgranula während eines mehrmonatigen Vitamin-E-Mangels. Abszisse: Dauer des Vitamin-E-Mangel-Zustandes. Ordinate: Quotient aus Schnittfläche der Pigmentgranula und Gesamtschnittfläche der Uterusmuskulatur. I Kompensatorische Phase; II Pigmentbildungsphase; III Phase der Nekrobiose (Erklärung s. Text)

3. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Vitamin-E-Mangel-Pigment und den Lipofuscinen? Vergleicht man elektronenmikroskopisch das Vitamin-E-Mangel-Pigment mit den Lipofuscinen, so zeigt es sich, daß bei der Entstehung beider Pigmenttypen Lipide an stoffwechselaktiven Bezirken des Cytoplasmas abgelagert werden. *Das Grundprinzip der formalen Genese dieser Pigmente stimmt also — entsprechend den früheren histochemischen Befunden (GEDIGK und FISCHER 1959) — auch im submikroskopischen Bereich weitgehend überein.*

Dagegen haben die Lipide in den verschiedenen Pigmenten eine unterschiedliche Anordnung: Die Verteilung der Fettstoffe ist bereits bei den Lipofuscinen der verschiedenen Gewebe uneinheitlich und weist auch beim Vitamin-E-Mangel-Pigment ein eigenes Verteilungsmuster auf. So bilden die Lipide in den Lipofusingranula feinere Partikel und liegen meistens in dichterer Verteilung; des weiteren treten hier in Gegensatz zu dem Vitamin-E-Mangel-Pigment auch echte Myelinfiguren auf.

Innerhalb der Lipofuscinkörnchen der Herzmuskelfasern findet man zahlreiche, stark osmiophile Granula, die sich in Größe und Kontraststärke erheblich von einander unterscheiden sowie kleinere homogene, graue Bezirke. Dazwischen treten nicht selten elektronenoptisch leere Lücken auf (POCHE 1958, MALKOFF und STREHLER 1963).

In den Ganglienzellen (DUNCAN, NALL und MORALES 1960) sowie in der Bergmann-Glia des Kleinhirns erscheinen die Lipopigmentgranula wesentlich besser gegen die Umgebung abgegrenzt als das Vitamin-E-Mangel-Pigment und besitzen oft eine einfache Membran. Ferner ist die Grundsubstanz der Lipopigmente im Zentralnervensystem dichter; man findet hier auch häufig homogene, rundliche Bezirke mit etwas geringerem Kontrast. Es ist jedoch zu betonen, daß diese Pigmente selbst in ein und derselben Zellart eine verschiedene Feinstruktur zeigen, je nachdem, ob der Pigmentbildung „Alterungsvorgänge“ zugrunde liegen, oder ob die Zellen durch verschiedene Schädlichkeiten, wie z. B. einen Sauerstoffmangel, getroffen wurden (WESSEL und GEDIGK).

Ein scholliger Zerfall von Pigmentgranula, der bei einem langen Vitamin-E-Mangel-Zustand regelmäßig auftritt, ist beim Lipofuscin bisher noch nicht beobachtet worden.

Trotz der weitgehenden Übereinstimmung in der histochemischen Beschaffenheit sowie in der formalen Genese bestehen somit — genau wie bei den lichtmikroskopischen Befunden — auch Unterschiede in der Feinstruktur des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes und der Lipofuscine. *Das Vitamin-E-Mangel-Pigment ist also mit den Lipofuscinen nur eng verwandt und nicht mit ihnen identisch. Es stellt gewissermaßen eine Variante der in Parenchymzellen und Muskelfasern auftretenden Lipopigmente dar* (s. auch GEDIGK 1958, sowie GEDIGK und FISCHER 1959).

Besonders sei betont, daß die submikroskopische Struktur des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes in keinem Entwicklungsstadium Ähnlichkeiten mit Melanin-granula aufweist, welche meist durch stabähnliche, parallel verlaufende, stark osmiophile Untereinheiten gekennzeichnet sind (WELLINGS und SIEGEL 1963).

4. In welchen Cytoplasmabezirken entsteht das Vitamin-E-Mangel-Pigment? In früheren Untersuchungen wurde angenommen, daß sich Lipopigment-

granula, und zwar das Lipofuscin und das Vitamin-E-Mangel-Pigment, aus transformierten Mitochondrien entwickeln könnten (LINDNER 1957, DUNCAN u. Mitarb. 1960, ASHFORD und PORTER 1962 sowie GHOSH u. Mitarb. 1962). Auch POCHE hielt im Herzmuskel eine Entstehung des Lipofuscins aus Mitochondrien für möglich. Diese Annahme beruhte zunächst auf der weitgehenden Übereinstimmung der Größe von Mitochondrienanschnitten und voll entwickelten Pigmentgranula. Vor allem aber erinnerten die in den Pigmentgranula mitunter auftretenden unregelmäßigen Membranstrukturen an Cristae mitochondriales. Wie weiter oben dargelegt, handelt es sich bei diesen Membranen aber nicht um echte Cristae, sondern um kettenartig aneinander gereihte Molekülaggregate von starker Osmophilie. Eine Deutung der fadenförmigen Strukturen als Cristae mitochondriales würde auch deshalb auf Schwierigkeiten stoßen, weil sie sich erst in älteren Pigmentgranula bilden. Wenn nämlich tatsächlich Beziehungen zwischen Mitochondrien und Lipopigmenten vorlägen, so müßten am Beginn des Entwicklungsprozesses Mitochondrien vorhanden sein, welche dann allmählich durch die Lipoidablagerungen verändert würden. Wie die Untersuchung der ersten Entwicklungsstadien der Pigmente ergibt, ist das nicht der Fall. Daß sich aber in voll ausgebildeten Pigmenten, welche reichlich oxydierte und polymerisierte, schwer lösliche Lipide enthalten, noch Mitochondrienstrukturen oder womöglich echte Mitochondrien entwickeln können, ist von vornherein unwahrscheinlich. In Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen lehnten auch BJÖRKERUD und CUMMINS, sowie MALKOFF und STREHLER unlängst die Entstehung des Lipofuscins aus Mitochondrien ab. Nach diesen Autoren ist eine Assimilation anderer cytoplasmatischer Strukturen zu Pigmenten ebenfalls sehr unwahrscheinlich*.

Aus Golgi-Strukturen, Ergastoplasmabestandteilen oder Myofibrillen leitet sich das Vitamin-E-Mangel-Pigment ebenfalls nicht ab. Schließlich ist auch der Weg über eine primäre tröpfchenförmige Ablagerung von ungesättigten Neutralfetten, die sich z. B. in Makrophagen zum Ceroid umwandeln können (GEDIGK und FISCHER 1958), beim Vitamin-E-Mangel-Pigment nicht gegeben.

Die Befunde von NOVIKOFF u. Mitarb. (1961) machten enge Beziehungen oder sogar eine Identität zwischen dem Lipofuscin und Lysosomen wahrscheinlich. Dafür sprachen auch der Nachweis von hydrolytischen Enzymen, und zwar besonders von saurer Phosphatase, in isolierten Pigmenten (HEIDENREICH und SIEBERT 1955) und im Lipofuscin von Gewebsschnitten (GEDIGK und BONTKE 1956). Demgegenüber zeigen die Pigmentgranula aber nicht die scharfe Abgrenzung durch eine Membran, wie man sie bei Lysosomen findet. Auf Grund ihrer Untersuchungen am Lipofuscin des Herzmuskels kamen jetzt SIEBERT u. Mitarb. (1962) zu dem Schluß, daß die Annahme einer Umwandlung von Lysosomen in Lipofuscin nach dem chemischen Verhalten dieser Cytoplasmapartikel auf Schwierigkeiten stoßen würde. Auf Grund der vorliegenden Befunde können wir zu dieser Frage nicht Stellung nehmen, da die elektronenmikroskopische Abgrenzung und Darstellung der Lysosomen nicht ohne weiteres gelingt und noch

* Während der Drucklegung teilte uns Herr Doz. Dr. E. LINDNER mit, daß er auf Grund neuer Untersuchungen an seinem Material ebenfalls zu der Ansicht gelangt ist, daß sich das Vitamin-E-Mangel-Pigment nicht aus Mitochondrien entwickelt. (Persönliche Mitteilung.)

immer umstritten ist. Jedenfalls läßt sich eine Entstehung des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes im Bereich von Lysosomen an Hand unserer Bilder weder beweisen noch widerlegen.

Bei unseren Experimenten ließ sich zeigen, daß *am Anfang der Pigmentbildung kleinere, unscharf abgesetzte, durch eine etwas stärkere Osmophilie aus dem umgebenden Hyaloplasma hervorgehobene Propigmentzonen* auftreten. Sie haben ihren bevorzugten Sitz am Rand des Golgi-Apparates; und zwar vor allem dort, wo die perinukleäre Zone mit dem Golgi-Feld und ergastoplasmareichen Cytoplasmabezirken zusammentrifft. Dabei handelt es sich um ein besonders stoffwechselaktives Gebiet, das auch lichtmikroskopisch eine erhebliche Fermentaktivität besitzt (GEDIGK und FISCHER 1959). In diesen Propigmentzonen entstehen dann durch zunehmende Ablagerung von Lipiden allmählich die Pigmentgranula.

5. Untersuchungen an Kontrolltieren. Bei den Kontrolltieren mit Vitamin-E-haltigem Futter zeigte es sich, daß schon normalerweise in den glatten Muskelfasern des Uterus der Ratte kleine Pigmentkörnchen auftreten, welche die gleichen strukturellen Eigenschaften besaßen wie das Vitamin-E-Mangel-Pigment. Sie waren bei den gesunden Tieren jedoch kleiner und weniger zahlreich, so daß sie bei der lichtmikroskopischen Untersuchung im allgemeinen nicht entdeckt wurden. Die Entwicklung der Pigmentgranula schritt bei den Kontrolltieren nicht so weit fort wie bei den Tieren im Vitamin-E-Mangel-Zustand. So entsprachen die Pigmentgranula bei alten Kontrolltieren (475 Tage) etwa den Pigmentgranula, welche man bei den Vitamin-E-Mangel-Tieren nach 130 bis 200 Tagen antraf.

Das im Vitamin-E-Mangel-Zustand auftretende Pigment ist also kein grundsätzlich neues, nur durch die Stoffwechselstörung erzeugtes Strukturelement der glatten Muskelfasern. Beim Vitamin-E-Mangel erfolgte die an sich physiologische (altersabhängige ?) Ablagerung ungesättigter Lipide nur schneller und in einem erheblich größeren Umfang als bei normalen Tieren. Die Pigmentbildung wurde also nur beschleunigt und verstärkt.

Zusammenfassung

Das Vitamin-E-Mangel-Pigment entsteht in den glatten Muskelzellen des Myometriums in der Nähe der Golgi-Felder unter zunehmender Ablagerung von feinkörnigem und gröberem lipidhaltigem Material. Das Pigment besitzt keine konstante Zusammensetzung, sondern wird im Laufe der Alterung chemisch und morphologisch umgeformt. Eine Umwandlung von Cytoplasmaorganellen (wie Mitochondrien usw.) in Pigmentgranula erfolgt nicht.

Die Zahl der Pigmentgranula nimmt in den Muskelzellen mit fortdauerndem Vitamin-E-Mangel nicht linear zu (Abb. 7): Nach dem Beginn des Vitamin-E-Mangel-Zustandes ist zunächst die Pigmentbildung gering; dann setzt etwa 130 Tage nach Versuchsbeginn eine Phase stärkster Pigmentgenese ein; und nach etwa 300 Versuchstagen werden nur noch wenige neue Granula gebildet.

Die formale Genese des Vitamin-E-Mangel-Pigments stimmt grundsätzlich mit der der Lipofuscine überein. Die Verteilung der Lipide innerhalb der Granula ist jedoch bei den einzelnen Pigmenttypen verschieden.

In geringem Umfang treten Pigmentgranula auch in normalen Kontrolltieren auf. Beim Vitamin-E-Mangel erfolgt bloß die offenbar physiologische (altersabhängige ?) Ablagerung ungesättigter Lipide schneller und in erheblich größerem Umfang.

Bei alten Versuchstieren gehen die Muskelfasern häufig zugrunde, wobei die frei gewordenen Pigmentgranula zu Schollen auseinanderbrechen, die dann größtenteils von Makrophagen aufgenommen und weiter verarbeitet werden.

Electron-microscopic Study of the Vitamin-E-Deficiency Pigment in the Myometrium of the Rat

Summary

The vitamin-E-deficiency pigment develops in the smooth muscle cells of the myometrium near the Golgi field with increasing deposition of finely granular and coarser lipid-containing material. The pigment has no constant composition, but is changed chemically and morphologically with age. A transformation of the cytoplasmic organelles (e.g., mitochondria etc.) into pigment granules does not occur.

The number of the pigment granules does not increase directly with progressive vitamin-E-deficiency. After the onset of the vitamin-E-deficiency state the formation of pigment is slight. About 130 days after the onset of the experiment a phase of intense formation of pigment manifests itself. After 300 experimental days only a few new granules are formed.

The formal genesis of the vitamin-E-deficiency pigment is the same basically as that of the lipofuscin. The distribution of the lipid within the granules, however, is different for the individual types of pigment.

In normal control animals scanty amounts of pigment granules appear. With vitamin-E-deficiency, the apparent physiological (age dependent ?) deposition of unsaturated lipids merely occurs more quickly and to a considerably greater extent.

In old experimental animals the muscle fibers degenerate, whereby the released pigment granules break up into fragments which are then taken up in large part by macrophages and further consumed.

Literatur

- ASHFORD, T. P., and K. R. PORTER: Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell. Biol.* **12**, 198—202 (1962).
- BJÖRKERUD, S., and J. T. CUMMINS: Selected enzymic studies of lipofuscin granules isolated from bovine cardiac muscle. *Exp. Cell Res.* **32**, 510—520 (1963).
- BONDAREFF, W.: Genesis of intracellular pigment in the spinal ganglia of senile rats. An electron microscope study. *J. Geront.* **12**, 364—369 (1957).
- DUNCAN, D., D. NALL and R. MORALES: Observations on the fine structure of old age pigment. *J. Geront.* **15**, 366—372 (1960).
- ESSNER, E., and A. B. NOVIKOFF: Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 773—784 (1961).
- GATENBY, J. B.: The Golgi apparatus of the living sympathetic ganglion cell of the mouse, photographed by phase-contrast-microscopy. *J. roy. mier. Soc.* **73**, 61—68 (1953).
- , and T. A. A. MOUSSA: The Sympathetic ganglion cell with sudan black and the Zernike microscope. *J. roy. mier. Soc.* **70**, 342—364 (1950).

- GEDIGK, P.: Zur Kenntnis lipogener Pigmente. Verh. dtsch. Ges. Path. **42**, 430—434 (1958).
- , u. E. BONTKE: Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten. Z. Zellforsch. **44**, 495—518 (1956).
- , u. R. FISCHER: Über die Entstehung des Ceroidpigmentes bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose. Virchows Arch. path. Anat. **331**, 341—370 (1958).
- Über die Entstehung von Lipopigmenten in Muskelfasern. — Untersuchungen beim experimentellen Vitamin-E-Mangel der Ratte und an Organen des Menschen. Virchows Arch. path. Anat. **332**, 431—468 (1959).
- GOSH, A., H. A. BERN, I. GHOSH, and R. S. NISHIOKA: Nature of the inclusions in the lumbosacral neurons of birds. Anat. Rec. **143**, 195—217 (1962).
- HAMMERBECK, W.: Die Fuscinkörper (Abbaukörper) des menschlichen Herzmuskels. Zbl. allg. Path. path. Anat. **100**, 305—326 (1960).
- HEIDENREICH, O., u. G. SIEBERT: Untersuchungen an isoliertem, unverändertem Lipofuscin aus Herzmuskelatur. Virchows Arch. path. Anat. **327**, 112—126 (1955).
- HENNIG, A., and J. R. MEYER-ARENDE: Microscopic volume determination and probability. Lab. Invest. **12**, 460—464 (1963).
- HESS, A.: The fine structure of young and old spinal ganglia. Anat. Rec. **123**, 399—424 (1955).
- LINDNER, E.: Die submikroskopische Struktur der pigmenthaltigen glatten Muskelzellen im Uterus von Vitamin-E-Mangel-Ratten. Beitr. path. Anat. **117**, 1—16 (1957).
- Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. Z. Zellforsch. **45**, 702—746 (1957).
- Der elektronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe. Ergeb. allg. Path. path. Anat. **38**, 46—91 (1958).
- MALKOFF, D. B., and B. L. STREHLER: The ultrastructure of isolated and in situ human cardiac age pigment. J. Cell. Biol. **16**, 611—616 (1963).
- NOVIKOFF, A. B.: Lysosomes and related particles. In: The cell (BRACHET-MIRSKY, edit.), vol. II, p. 423—488. New York: Academic Press 1961.
- POCHE, R.: Submikroskopische Beiträge zur Pathologie der Herzmuskelzelle bei Phosphorvergiftung, Hypertrophie, Atrophie und Kaliummangel. Virchows Arch. path. Anat. **331**, 165—248 (1958).
- Über den Einfluß von Dinitrophenol und Thyroxin auf die Ultrastruktur des Herzmuskels bei der Ratte. Virchows Arch. path. Anat. **335**, 282—297 (1962).
- SIEBERT, G., P. B. DIEZEL, K. JAHN, E. KRUG, A. SCHMITT, E. GRÜNBERGER u. I. BOTTKE: Isolierung und Eigenschaften von Lipofuscin aus Herzgewebe des Menschen. Histochemistry **3**, 17—45 (1962).
- WEIBEL, E. R.: Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab. Invest. **12**, 131—155 (1963).
- WELLINGS, S. R., and V. V. SIEGEL: Electron microscopic studies on the subcellular origin and ultrastructure of melanin granules in mammalian melanomas. N. Y. Acad. Sci. **100**, 548—568 (1963).
- WESSEL, W.: Über die Form der Mitochondrien im elektronenmikroskopischen Bild. Z. Zellforsch. **52**, 712—714 (1960).
- , u. P. GEDIGK: Über die feinstrukturellen Unterschiede der Lipopigmente in verschiedenen Organen. (In Vorbereitung.)

Prof. Dr. P. GEDIGK, Pathologisches Institut,
Marburg a. d. Lahn, Robert Koch-Str. 5.

Doz. Dr. W. WESSEL, Pathologisches Institut,
Bonn-Venusberg