

Mikrospektrophotometrische Untersuchungen am Hämosiderin*

W. SANDRITTER**, B. THORELL***, W. SCHUBERT und G. SCHLÜTER

Pathologisches Institut der Justus Liebig-Universität Gießen

(Direktor: Prof. Dr. W. SANDRITTER)

und Pathologisches Institut des Karolinska Sjukhuset, Stockholm

(Direktor: Prof. Dr. B. THORELL)

Eingegangen am 15. Oktober 1965

Das Hämoglobin und seine näheren Abkömmlinge sind in ihren spektralen Eigenschaften gut bekannt. Dagegen gibt es über das Hämosiderin bzw. Siderin nur wenige Untersuchungen, die zu ganz verschiedenen Resultaten geführt haben (WELLS u. Mitarb., 1962; SCHREIBER u. Mitarb., 1960).

In der folgenden Untersuchung sollte geklärt werden, welche spektralen Eigenschaften das Hämosiderin verschiedenen Ursprungs, verschiedener Lokalisation und Alters hat. Es wurde versucht, die auftretenden Absorptionsgipfel im Vergleich zu denen bekannter Substanzen zu identifizieren.

Methodik

Die Spektren von *Eisenlösungen* wurden mit dem Spektralphotometer von Zeiss (PM Q II) bei einer Spaltbreite von 3 μ aufgenommen. Die Fälle 811/62, 308/62 und 985/61 sowie 840/62 entstammen dem Sektionsmaterial, der Fall 3854/62 dem Einsendungsgut des Institutes (Formalinfixation).

Tierversuche:

Injection von Fe(OH)₃: 10 Mäusen wurden 0,4 ml einer 0,8%igen Fe(OH)₃-Lösung (5%ige, saure Stammlösung von Merck, Nr. 3900) subcutan injiziert. Die Tiere wurden nach 6, 8, 16, 25 und 31 Tagen getötet, die Haut mit subcutanem Gewebe und Muskulatur excidiert und 3 Std in Carnoyscher Lösung fixiert. Die Paraffineinbettung erfolgte in üblicher Weise. Ein Teil des Materials wurde im Kryostaten unfixiert geschnitten.

Implantation von Blut: 10 Ratten wurden 0,5 ml geronnenes Rattenblut in eine Bindegewebetasche im Bereich der Nackenhaut implantiert. Das Gewebe wurde nach 6, 14, 21 und 31 Tagen excidiert, in Carnoyscher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Vereinzelt wurden Kryostatschnitte angefertigt.

Alle Präparate wurden auf Quarzobjektträger aufgezogen, entparaffiniert und in wasserfreies Glycerin eingedeckt.

Mikrospektrophotometrische Messungen: Die Messungen wurden zum Teil mit dem Gerät von THORELL und ÅKERMAN (1957), zum Teil mit dem UMSP von Zeiss vorgenommen. Beide Geräte sind mit der achromatischen Optik von Zeiss ausgerüstet.

Arbeitsbedingungen: Gerät von THORELL und ÅKERMAN: nA Kondensor 0,3—0,6; nA Objektiv 0,85—1,0; Größe des Meßpunktes 0,5—1,5 μ ; UMSP: nA Kondensor 0,3; nA Objektiv 0,85; Größe des Meßpunktes 0,5 μ . In beiden Geräten wurde die Absorption gegen die Wellenlänge automatisch registrierend gemessen. Insgesamt wurden 120 Spektren aufgenommen.

* Herrn Professor TIMM zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und

*** der „Therese och Johan Anderssons Minne“.

Ergebnisse

In der folgenden Darstellung werden repräsentative Absorptionskurven der jeweiligen Untersuchungsreihe mitgeteilt und die Abweichungen davon beschrieben.

1. Erythrocyten

Für die Analyse und Deutung der beim Hämosiderin auftretenden Absorptionspektren geht man am besten vom Spektrogramm von Erythrocyten aus. Abb. 1 zeigt die typische Absorptionskurve eines Erythrocyten in einer menschlichen Lunge bei chronischer Blutstauung (Formalinfixation). Die Maxima kommen hier eindeutig zum Vorschein: Der breite Gipfel bei $270\text{ m}\mu$ ist durch tyrosin- und tryptophanhaltige Eiweißkörper bedingt¹. Das schwache Maximum bei $337\text{ m}\mu$ ist der Anwesenheit von Eisen in Verbindung mit Häm und der steile Gipfel bei $417\text{ m}\mu$ der Soretbande des Hämoglobins zuzuordnen. In gleicher Weise gehören die kleineren Maxima bei 533 und $555\text{ m}\mu$ der Hämgruppe an. In anderen Fällen vom Sektionsmaterial konnten prinzipiell die gleichen Spektren nachgewiesen werden, die Gipfelbildungen waren manchmal nicht so deutlich ausgeprägt (postmortale Veränderungen mit Auftreten verschiedener Hämoglobinderivate?). Die Soretbande war in allen Fällen deutlich, der Gipfel um $550\text{ m}\mu$ zeigte sich allerdings häufig verwaschen, die schwache Absorption bei 330 — $340\text{ m}\mu$ fehlte öfters. Die Proteinabsorption bei 270 — $280\text{ m}\mu$ war immer vorhanden.

Diese Versuche zeigen, daß auch unter den komplexen Einflüssen, denen das Sektionsmaterial ausgesetzt ist (Autolyse usw.), die wesentlichsten spektralen Eigenschaften des Hämoglobins erhalten bleiben.

Für die Interpretation der in den nachfolgenden Spektren immer wieder auftauchenden Absorption bei 330 — $350\text{ m}\mu$ wurde

2. Eisen in Lösung und nach subcutaner Injektion

untersucht. Abb. 2 zeigt, daß die Spektren von sauren Eisenlösungen $[\text{Fe}(\text{OH})_3$ und $\text{Fe}(\text{Cl})_3$] ein deutliches Maximum bei 325 — $330\text{ m}\mu$ aufweisen. Das gleiche Maximum, jetzt allerdings in einem breiteren Bereich zwischen 320 — $360\text{ m}\mu$, stellt sich auch in den Sideringranula nach subcutaner Injektion von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ dar (Abb. 3).

Mikroskopisch sieht man 6 Tage nach der Injektion kleine Gruppen von Histiocyten im Fettgewebe, teilweise auch zwischen den Muskelfasern, die im Cytoplasma zahlreiche feine Hämosideringranula aufweisen (Berliner Blau-Reaktion positiv). Das Gewebe ist aber außer-

¹ Die Extinktionskurven sind logarithmisch aufgetragen, da hierbei die Absorptionsmaxima besser zum Vorschein kommen. In den Abb. 3—6 ist der Logarithmus der Extinktion angegeben. Die Kurven sind dadurch unabhängig von ihrer Höhe miteinander vergleichbar (sogenannte Farbgleichheitskurven).

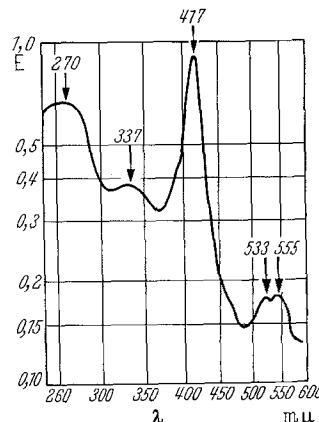


Abb. 1. Absorptionskurve eines Erythrocyten aus der Lunge (985/61, chronische Stauungslunge)

dem diffus von Eisen imprägniert. Bis zum 31. Tag nimmt die Zahl der Histiocytēn zu, sie lagern sich zu größeren Gruppen zusammen und die Granula werden grobschollig.

Abb. 3 zeigt eine Auswahl der Spektren im Vergleich zu einem Erythrocyten in einem dem Eisengranulom benachbarten Blutgefäß. Der Erythrocyt läßt zwei deutliche Gipfelbildungen bei 275 und 412 m μ (Soretbande) erkennen, sowie ein schwaches Maximum bei 350 m μ . Ganz ähnlich sind die Kurven (Nr. 2 und 3 in Abb. 3) von Sideringranula, die 6 Tage nach der Injektion der Eisenlösung auftreten. Prinzipiell besteht kein Unterschied zwischen carnoyfixiertem

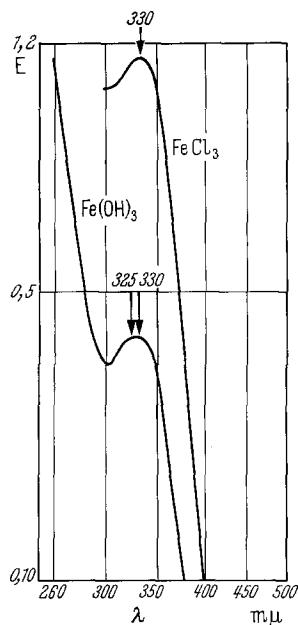


Abb. 2

Abb. 2. Spektrogramm einer 0,1%igen sauren wäbrigen $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -Lösung und einer 0,5%igen $\text{Fe}(\text{Cl})_3$ -Lösung (1 em Schichtdicke, Spektralphotometer)

Abb. 3. Absorptionspektren von einem Erythrocyten (1) und Siderin nach Injektion von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ subcutan (Maus). 2 Feinkörnige und 3 grobkörnige Sideringranula in Histiocytēn (6 Tage nach Injektion). 4 25 Tage und 5 31 Tage nach Injektion (Kryostatschnitte). Die Extinktionen bei 275—280 m μ betragen in 1 0,6; in 2 0,57; in 3 1,15; in 4 0,29 und in 5 1,45

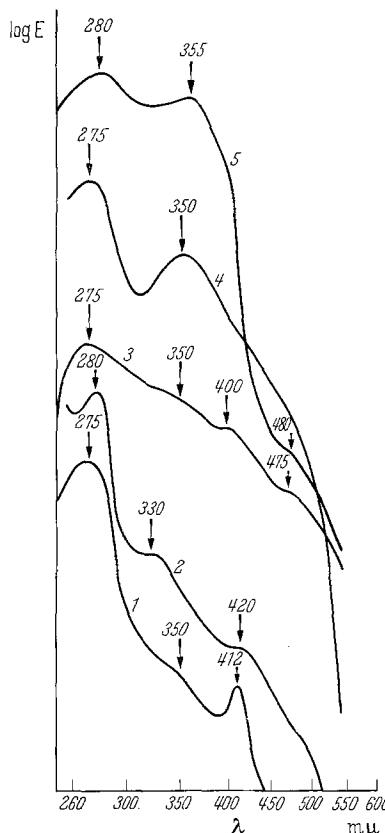


Abb. 3

Material und Kryostatschnitten. Die Soretbande war 6 Tage nach Injektion immer nachweisbar. Auffällig ist, daß die Granula eine organische Trägersubstanz aus tyrosin- und tryptophanhaltigen Eiweißkörpern mit einem Maximum bei 270 bis 280 m μ aufweisen und außerdem einen Gipfel um 400—420 m μ zeigen. Die Ausbuchung der Kurve um 330—350 m μ liegt in der gleichen Größenordnung wie in den Erythrocyten nachweisbar. Mit zunehmendem Alter und Größe der Granula verschwindet die Soretbande und es resultiert ein Spektrum, welches durch Gipfel bei 275 und 350—360 m μ gekennzeichnet ist (Kurve 4 und 5 in Abb. 3). An insgesamt 30 Kurven war das Maximum bei 270—280 m μ immer nachweisbar, ebenso die Absorption um 350 m μ (Schwankung 330—360 m μ). Bei Präparaten

über 25 Tage nach der Eiseninjektion war die Soretbande nicht mehr zu sehen. Fast alle Kurven lassen einen deutlichen Anstieg des Streulichtes mit zunehmend kürzerer Wellenlänge erkennen.

Aus diesen Untersuchungen läßt sich schließen, daß bei Injektionen von Eisenhydroxyd neben Eisen Hämoglobin mit in den Sideringranula vorhanden ist, welches mit zunehmender Dauer abgebaut wird, bzw. verschwindet. Auffällig ist die in manchen Präparaten (5 von 30 Kurven) auftretende schwache Absorption im Bereich von 475—480 m μ . Vielleicht kann man diese Absorption komplexen Eisenverbindungen zuordnen.

3. Hämosiderin nach Implantation von Blut

Nach 6 Tagen findet man im subcutanen Bindegewebe einen großen Komplex geronnenen Blutes, der vom Rande her vom Granulationsgewebe resorbiert wird. In den großen Histiocytien sieht man hier kleine Hämosideringranula. Nach 14 Tagen ist die Organisation schon weiter fortgeschritten und das Granulationsgewebe enthält reichlich Histiocytien mit Hämosiderin. 21 und 31 Tage später ist das Blut vollständig resorbiert und die hämosiderinhaltigen Histiocytien liegen dicht beieinander. Das Granulationsgewebe weist schon eine deutliche Faserbildung auf.

Die Spektren (Abb. 4) lassen wiederum die typischen Schwerpunkte um 280, 320—350 und um 400 m μ erkennen. Mit zunehmender Dauer der Implantation verschwindet die Soretbande und es bleiben nunmehr nur die ersten beiden Gipfel erhalten. Allerdings sind die Kurven auch am 31. Tage noch sehr breit angelegt (vgl. Nr. 3 in Abb. 4), so daß man hier noch eine Hämoglobinkomponente vermuten kann. Nur in 2 von 15 Kurven nach 31 Tagen war noch eine schwache Ausbuchtung der Kurve um 400 m μ vorhanden, die meisten fielen in diesem Bereich steil ab (Abb. 4, Kurve 4).

4. Hämosiderin des Menschen

Fünf verschiedene Fälle wurden untersucht.

1. Grobschollige Hämosideringranula in Siderophagen einer alten organisierten Thrombose der Arteria carotis interna nach Röntgenbestrahlung eines Tonsillencarcinoms (811/62).

2. Hämosiderin in Alveolarphagocyten bei chronischer Stauungslunge (Mitralstenose) (985/61).

3. Hämosiderin in der Milzpulpa bei einer hämolytischen Anämie (840/62).

4. Sternzellen- und Leberzellsiderose bei subchronischer Leberdystrophie (308/62).

5. Hämosiderin am Rande eines nicht ganz frischen Milzinfarktes (3854/62).

Bei den Absorptionsspektren (Abb. 5) können zwei Typen von Kurven unterschieden werden: 1. Spektren mit einer ausgeprägten Soretbande bei 415 m μ (Kurve 1 und 4) und 2. solche ohne oder mit nur ganz geringer Ausbuchtung in diesem Bereich (Kurve 2 und 3). Alle Spektren zeigen ein deutliches Maximum bei 275—280 m μ , die Absorption bei 350 m μ (Schwankung 340—360 m μ) ist

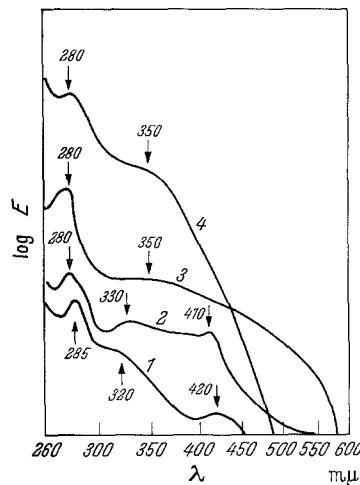


Abb. 4. Absorptionsspektren von experimentell erzeugtem Hämosiderin nach Implantation von Blut. 1 Feine Granula in Histiocytien am 6. Tag (E 280 m μ = 0,22). 2 Grobes Granulum in einem Histiocyt am 21. Tag (E 280 m μ = 0,66). 3 Grobscholliges Hämosiderin nach 31 Tagen (E 280 m μ = 0,55). 4 Grobscholliges Hämosiderin nach 31 Tagen (E 280 m μ = 0,5)

ebenfalls immer vorhanden, kommt aber, wie in Kurve 2, manchmal nur als breiter, flacher Buckel zum Vorschein. In Alveolarphagocyten findet sich auch hin und wieder ein schwacher Gipfel bei $536 \text{ m}\mu$. In manchen Fällen, z.B. in Kurve 3 mit sehr hoher Absorption bei $360 \text{ m}\mu$, ist auch um $470 \text{ m}\mu$ eine schwache Absorption vorhanden. Das Siderin des Menschen läßt also die gleichen spektralen

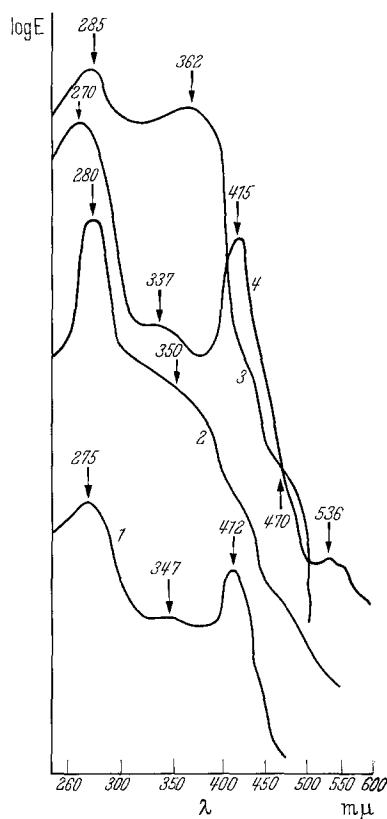


Abb. 5

Eigenschaften wie das experimentelle Siderin nach Eisen- oder Blutimplantation erkennen. Die Absorption der organischen Trägersubstanz ist immer vorhanden, die Eisenabsorption mehr oder weniger deutlich, die Soretbande kann in ihrer Intensität wechseln und die Absorption um $470 \text{ m}\mu$ ist nur vereinzelt zu sehen.

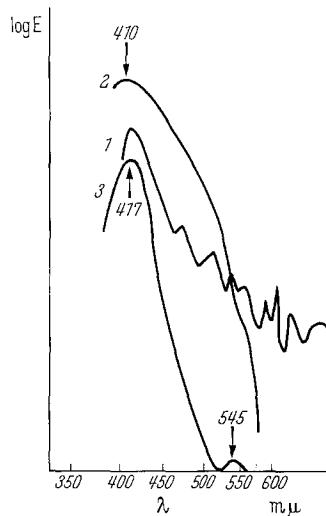


Abb. 6

Abb. 5. Absorptionsspektren von Siderin des Menschen. 1 Feinscholliges Hämosiderin in Histiocyten am Rande eines Milzinfarktes (3854/62) ($E 275 \text{ m}\mu = 0,5$). 2 Grobscholliges Hämosiderin einer organisierten Thrombose (811/62) ($E 280 \text{ m}\mu = 1,2$). 3 Siderin in Sternzellen der Leber (308/62) ($E 275 \text{ m}\mu = 1,45$). 4 Grobscholliges Hämosiderin in Alveolarphagocyten bei chronischer Stauungslunge (985/61) ($E 270 \text{ m}\mu = 1,1$)

Abb. 6. Absorptionsspektren vom Hämosiderin nach Präparaten von WELLS und WOLKEN (1962). 1 Die Kurve von WELLS und WOLKEN (\log , umgezeichnet). 2 und 3 Typische Kurven nach eigenen Messungen

Protoporphyrin, wie von WELLS und WOLKEN (1962) mitgeteilt, konnte aufgrund einer ausgedehnten Nachprüfung mit Messungen an 20 verschiedenen Stellen an den von den Autoren freundlicherweise überlassenen Präparaten in den Hämosideringranula nicht nachgewiesen werden (Abb. 6).

Diskussion

Nach den Untersuchungen von GEDIGK (1958, weitere Literatur dort) ist das Siderin an eine organische Trägersubstanz gebunden, die Kohlenhydrate, Proteine und Lipoide enthält. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß darüber hinaus in den meisten Fällen auch noch Häm enthalten ist und die Eisen-

komponente im ungefärbten Präparat aufgrund einer Absorption im Bereich von 330—350 m μ sicher zu identifizieren ist.

In früheren Untersuchungen zusammen mit GEDIGK (SCHREIBER u. Mitarb., 1960) konnten wir klären, daß das Hämosiderin keine Desoxyribonucleotide enthält, wie WÖHLER u. Mitarb. (1959) mitgeteilt hatten. Aus den vorliegenden Messungen geht ebenfalls einwandfrei hervor, daß im Bereich von 260 m μ (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) kein Absorptionsmaximum vorliegt, die Kurven dagegen hier konstant ein Minimum aufweisen. Die relativ hohe Lage des Minimums dürfte durch die Absorption der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan in diesem Bereich und Streulicht bedingt sein. Außerdem beginnt hier schon zum kürzeren UV hin steigend die Absorption der anderen Aminosäuren. Zudem soll nach KWART u. Mitarb. (1958) Eisen in Anwesenheit von Histidin eine Absorption bei 250 m μ aufweisen.

Ganz eindeutig zu identifizieren ist in allen Messungen die Absorption der tyrosin- und tryptophanhaltigen Eiweißkörper mit ihrem Maximum bei 270 bis 280 m μ . Es handelt sich hierbei um die organische Trägersubstanz (vgl. SCHREIBER u. Mitarb., 1960).

Die UV-Absorption des Eisens ist ein sehr komplexes Problem. In wässrigen oder leicht sauren Lösungen $[\text{Fe}(\text{Cl})_3$ oder $\text{Fe}(\text{OH})_3$] findet man immer ein Maximum bei 330 m μ (vgl. Kiss).

Die Lage dieses Absorptionsgipfels ist aber außerordentlich stark von verschiedenen Faktoren, wie der Art des Lösungsmittels, der Konzentration, der Art des Eisenkomplexes (Chelatbildung), dem pH usw. abhängig. Im Hämosiderin ist das Maximum häufig sehr breit und der Schwerpunkt der Absorption kann sich maximal von 320—360 m μ verschieben. Diese Verlagerung steht in keinem eindeutigen Zusammenhang zur Größe der Hämosideringranula oder dem Alter des Hämosiderins bzw. zu anderen morphologischen faßbaren Kriterien. Bei dieser Schwierigkeit des ganzen Problems können wir nicht entscheiden, welche Faktoren für die Maximumwanderung verantwortlich sind. Auch die Frage, in welcher Form (komplexgebunden ?) die Eisenmoleküle vorliegen, läßt sich kaum entscheiden. Inwieweit man aus der Höhe der Absorption Rückschlüsse auf den Eisengehalt ziehen kann, muß ebenfalls offen bleiben, zumal die Dicke der Schnitte nicht bekannt war und eine exakte Kurvenanalyse durch den in vielen Fällen sehr hohen Streulichtanteil sehr schwierig ist. Hinzu kommt, daß auch eine anormale Dispersion im Absorptionsmaximum nicht völlig auszuschließen ist.

Die Soretbande des Häms war fast in allen Sideringranula nachzuweisen, ohne daß wir aus der exakten Lage des Maximums in den fixierten Präparaten Rückschlüsse auf die Art des Häms ziehen wollen ($\text{HbO}_2 = 414 \text{ m}\mu$, $\text{HbCO} = 420 \text{ m}\mu$, $\text{MethHb} = 406 \text{ m}\mu$). Beim Hämosiderin, welches durch den Abbau von Hämoglobin (Blutimplantation und im menschlichen Organismus) entstanden ist, kann man sich die Anwesenheit der Pyrrolringe recht gut vorstellen. Mit zunehmendem Alter des Hämosiderins wird das Hämoglobin offenbar abgebaut, da wir nach 31 Tagen beim experimentellen Hämosiderin keine Absorption bei 410—420 m μ mehr nachweisen konnten. In Präparaten vom Menschen (Sektionsmaterial) ist es möglich, daß es zu einer sekundären Imbibition des Hämosiderins

mit Hämoglobin gekommen ist (postmortale Hämolyse, Hämoglobin in der Fixierungsflüssigkeit).

Zunächst überraschend war die Tatsache, daß auch bei subcutaner Injektion von Eisen die Sideringranula eine Soretbande aufwiesen. Wir müssen annehmen, daß es bei der Injektion zu geringen Blutungen gekommen ist und die Makrophagen nicht nur Eisen, sondern auch Hämoglobin mit aufgenommen haben. Eine sekundäre Imbibition mit Hämoglobin könnte ebenfalls eine Rolle spielen, obwohl in Kryostatschnitten gleiche Spektren nachzuweisen waren. Die vorliegenden Untersuchungen lassen demnach den Schluß zu, daß Hämosiderin mit zunehmendem Alter die Hämkomponente verliert und Eisen verschiedener Herkunft immer an Protein gebunden ist.

Zusammenfassung

In mikrospektrophotometrischen Untersuchungen wurden die physikalisch-optischen Eigenschaften des Hämosiderins bzw. Siderins untersucht. Ausgehend vom Absorptionsspektrum von Erythrocyten und Lösungen von Fe(OH)_3 konnten die auftretenden Absorptionsspektren im experimentell erzeugten Siderin (Injektion von Eisenlösung) und Hämosiderin (Blutimplantation) sowie menschlichem Siderin geklärt werden:

1. Die Absorption bei $280 \text{ m}\mu$ ist auf die proteinhaltige organische Träger-substanz mit tyrosin- und tryptophanhaltigen Eiweißkörpern zurückzuführen.
2. Die Eisenkomponente im Siderin bedingt eine Absorption bei 330 — $360 \text{ m}\mu$, wobei die Lage des Absorptionsmaximums von verschiedenen Faktoren abhängig ist.
3. Die Soretbande (um $410 \text{ m}\mu$) war nicht konstant nachweisbar. Mit zunehmendem Alter von experimentell erzeugtem Siderin und Hämosiderin verschwindet die Absorption bei $410 \text{ m}\mu$.
4. Menschliches Siderin weist gleiche Absorptionseigenschaften auf, wobei die Hämkomponente fehlen kann.

Microspectrophotometric Studies of Hemosiderin

Summary

The physical-optical properties of hemosiderin or siderin were investigated microspectrophotometrically. Based on the absorption spectrum of erythrocytes and of Fe(OH)_3 solutions, the absorption maxima occurring in experimentally induced siderin and hemosiderin (by injecting the iron solution and by implantation of blood) could be defined, as well as in human siderin:

1. The absorption at $280 \text{ m}\mu$ is due to the organic protein carrier-substance containing tyrosin and tryptophane.
2. The iron component in the siderin causes an absorption at 330 — $360 \text{ m}\mu$. The position of the maximum of the absorption depends on different factors.
3. The soret band (around $410 \text{ m}\mu$) could not be demonstrated constantly: with increasing age of the experimentally induced siderin and hemosiderin, the absorption disappears at $410 \text{ m}\mu$.
4. Human siderin shows the same properties of absorption, yet the component haem may be missing.

Literatur

- GEDIGK, P.: Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigments. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 1—45 (1958).
- KISS, A. V., J. ABRAHAM u. I. HEDEGÜS: Zur Lichtabsorption der Ferrikomplexe. *Z. anorg. u. allg. Chem.* **244**, 98—110 (1940).
- KWART, H., and V. E. SHASHOUA: The structure and constitution of a mucus. I. The Poly-electrolyte nature of mucus solutions derived from *busycon canalliculatum*. *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 2230—2236 (1958).
- SCHREIBER, M., W. SANDRITTER u. P. GEDIGK: Ultraviolettmikrospektrophotometrische Untersuchungen am Eisenpigment. *Virchows Arch. path. Anat.* **333**, 288—293 (1960).
- THORELL, B., and L. ÅKERMAN: Recording microspectroscopy for the study of intracellular reactions. *Exp. Cell Res., Suppl.* **4**, 83—85 (1957).
- WELLS, C. L., and J. J. WOLKEN: Microspectrophotometry of haemosiderin granules. *Nature (Lond.)* **193**, 977—978 (1962).
- WÖHLER, F., u. H. BIELIG: Über die Natur des Hämosiderins. In: W. KEIDERLING, Eisenstoffwechsel, S. 82—92. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Prof. Dr. W. SANDRITTER
Pathologisches Institut
63 Gießen, Klinikstraße 32g