

Elektronenmikroskopische Untersuchung des Homogentisinsäure-Melanins bei Ochronose

U. FUCHS

Pathologisches Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig (Direktor: Prof. Dr. G. HOLLE)

Ein eingegangen am 22. Januar 1968

Electron-microscopic Investigations of the Homogentisic acid-melanin in Ochronosis

Summary. The structure of the pigment in ochronosis is investigated in tissue and after isolation. The results are compared with other melanins.

Zusammenfassung. Die Struktur des im Gewebe abgelagerten und des isolierten Pigmentes bei Ochronose wird elektronenmikroskopisch untersucht. Die Befunde werden mit anderen Melaninen verglichen.

Die verschiedenen Melanine werden von SCHREIER (1955) nach jener chemischen Verbindung benannt, die der Oxydation und Polymerisation der Oxyphenyl- und Aminophenylkörper vorangeht. Während das vom 3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) abgeleitete Melanin häufig submikroskopisch analysiert wurde (Übersichten bei DROCHMANS, 1963, und bei RILEY und FORTNER, 1963), fehlen entsprechende Berichte für das in Aorta und Knorpel abgelagerte Homogentisinsäure-Melanin der Ochronose, das sich bereits histochemisch vom gewöhnlichen (Dopa-) Melanin unterscheidet (HUECK, 1921). Wir legen deshalb Befunde vor, die an zwei Ochronose-Kranken und an zwei Patienten ohne Tyrosin-Stoffwechselstörung erhoben wurden.

Material und Methode

1. Untersuchte Gewebe. a) Pigmentierte, pigmentarme und makroskopisch pigmentfreie Aorta eines 71jähr. Mannes (Sekt.-Nr. 2077/65) und einer 73jähr. Frau (Sekt.-Nr. 1136/67) mit einer Ochronose. In dem einen Fall wurde außerdem pigmentierter Tracheal- und Rippenknorpel sowie Nierengewebe untersucht; b) Herzmuskel und Aorta eines 16jährigen Patienten mit generalisierter Calcinose infolge renaler Osteodystrophie (Sekt.-Nr. 698/66); c) Aorta eines 64jährigen Mannes mit schwerer allgemeiner Arteriosklerose und einer Aortenwandruptur infolge Medionecrosis aortae (Sekt.-Nr. 1652/65); d) Pigmentepithel der Retina erwachsener Hunde. Die Pigmentgranula dienten dem Vergleich. Die Augen wurden früher hinsichtlich diabetischer Netzhautschäden untersucht.

2. Isolierung des Pigmentes. Aus Rippenknorpel der beiden Patienten mit Ochronose wurde das Pigment nach JANNEY (1918) isoliert¹ und vor und nach Alkohol- und Ätherextraktion (COOPER und MORAN, 1957) zur elektronenmikroskopischen Untersuchung präpariert. Die Löslichkeit des Pigmentes wurde in 5% KMnO₄, 5% KOH, 3 und 30% H₂O₂ (mit und ohne Zusatz von maximal 0,5% KOH, pH 8—11), Phosphorwolframsäure (0,5%ig und gesättigt in 70% Aceton) und in 20% Natriumkarbonat geprüft. Um festzustellen, ob sich mit dieser Präparationsmethode auch Pigmente bei nicht ochronotischen Patienten gewinnen lassen, wurde das gleiche Verfahren bei Rippenknorpel eines 76jährigen Mannes mit schwerer Arteriosklerose und Diabetes mellitus (Sekt.-Nr. 1948/67) und einer 46jährigen Frau mit einem malignen Meningiom (Sekt.-Nr. 1940/67) angewendet.

¹ Die Präparation hat die Chemie-Laborantin Fräulein INGEBOORG BRAUN durchgeführt.

3. Elektronenmikroskopische Präparation. Das nur in phosphatgepuffertem Glutaraldehyd, allein in OsO₄ oder nacheinander in beide Lösungen eingelegte Material wurde in Vestopal W oder Araldit eingebettet. Einige Gewebsstücke wurden während der Entwässerung mit 0,5% Uranylacetat und 0,5% Phosphorwolframsäure kontrastiert. Die mit dem Mikrotom nach v. ARDENNE-WESTMEYER angefertigten Dünnschnitte wurden vor und nach „Elektronenfärbung“ mit filtrierten (FUCHS, 1966) komplexen Bleihydroxyden nach MILLONIG im elektrostatischen 50 kV-Zeiss-Elektronenmikroskop D 2 untersucht. Ferner wurde eine Bleichung des Pigmentes mit 5% KOH, 5% KMnO₄ nach DROCHMANS (1960) und mit 3% H₂O₂ erprobt, dem 0,5% KOH zugefügt wurde. Anschließend wurden die Blenden in 1% Essigsäure gespült (STRAUSS, 1932).

Ergebnisse

Die reifen *Pigmentgranula* sind rund, oval oder langgestreckt und polymorph (Abb. 1, b1, b3). Ihre Größe liegt zwischen ~ 40 nm und $\sim 2,4 : \sim 1,0$ μm . Bereits nach Fixierung nur mit Glutaraldehyd sind sie sehr elektronendicht (Abb. 1, b2; zum Vergleich dazu das OsO₄-fixierte Granulum b1). In einigen Fällen treten nach Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure kleine Vacuolen im Inneren der Pigmentgranula auf (Abb. 2a). Gleichfalls selten sind dichte Granula, die Pigmentkörper teilweise aufbauen (Abb. 1, b4). Die Pigmentkörper liegen vorzugsweise extracellulär; selten werden sie auch in glatten Muskel- oder Knorpelzellen bzw. in Hauptstückepithelien der Niere gefunden. Ausnahmsweise werden sie im Zellkern angetroffen. Intracellulär liegen außerdem andere Körper, deren Zuordnung zu dem Ochronose-Pigment nicht gesichert ist (Abb. 1, b8, b9). Extracellulär finden sich weitere Strukturen, die mit Sicherheit (Abb. 1, b6) oder Wahrscheinlichkeit (Abb. 1, b5, b7) nicht aus Melanin bestehen.

In der Aorta der *Kontrollfälle* werden gleichartige elektronendichte Körper sehr selten extracellulär gefunden. Bei der generalisierten Calcinose liegen Kristallite (Abb. 1a) in Mitochondrien und im Grundplasma.

Das *isiolerte Pigment* zeigt vor Alkohol- und Ätherextraktion scharf oder unscharf begrenzte isolierte oder zu größeren Komplexen zusammengelagerte Granula (Abb. 1, c10) in wolkigen und granulären, mäßig dichten Bezirken. Daneben treten kristallartige Strukturen unterschiedlicher Dichte (Abb. 1, c11) und Membranen (Abb. 1, c12) auf. Nach Extraktion mit den Lipoidlösungsmitteln besteht der gesamte Schnitt fast ausschließlich aus ziemlich elektronendichtem Material, in dem Granula seltener abgegrenzt werden können. Pigmentkörnchen lösen sich innerhalb von 2 Std in H₂O₂ (30% oder 3%, pH 8–11 mit KOH-Zusatz) und in 5% KOH. In 5% KMnO₄, in Phosphorwolframsäure (0,5% und gesättigt) und in 30% H₂O₂ ist innerhalb von 45 Std keine Auflösung erzielt worden. Die zur elektronenmikroskopischen Präparation verwendeten Chemikalien lösen oder entfärben das Pigment nicht. Aus 40 g Rippennorpel wurden 970 mg Pigment gewonnen. Bei den Kontrollfällen hat sich lediglich bei der ersten Ausfällung mit Essigsäure ein Niederschlag gebildet. Nach erneutem Lösen des Rückstandes mit Natriumkarbonat und wiederholter Ausfällung mit Essigsäure wurden keine Niederschläge erhalten. Demnach ist es nicht gelungen, in den Kontrollfällen Pigmente zu isolieren.

Da elektronenoptisch *Vorstufen* (Melanosome zum Beispiel) der dichten Pigmentgranula nicht gefunden wurden, sind Dünnschnitte frei schwimmend oder nach

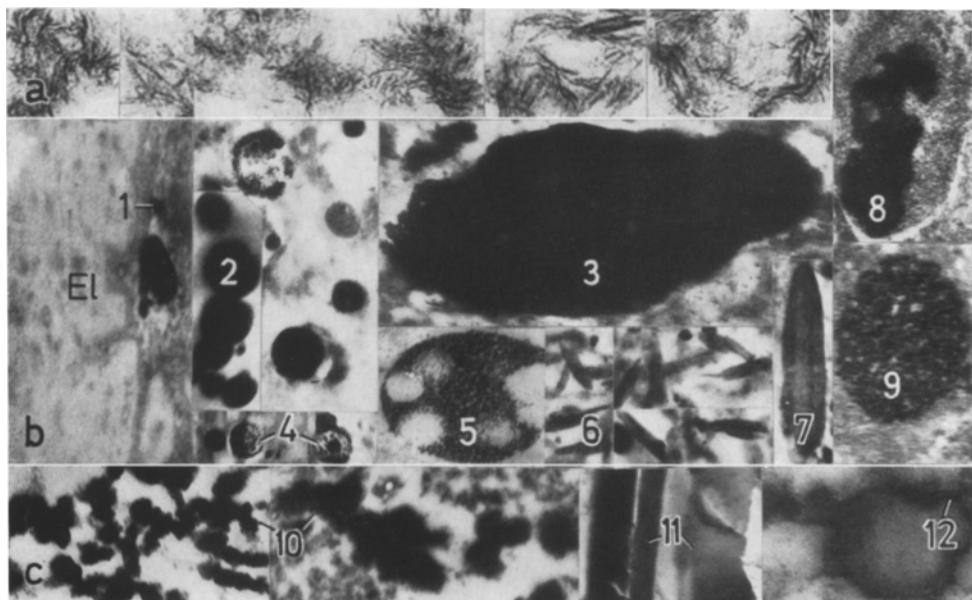


Abb. 1a—c. *Synopsis* einiger Strukturen bei generalisierter Calcinose (a) und Ochronose im Gewebe (b) und im isolierten Pigment vor Alkohol- und Ätherextraktion (c). Extracellulär liegen 1—7, intracellulär 8 und 9. El Elastische Faser. Herzmuskulatur (a), Aorta (1—3, 5, 7—9), Trachealknorpel (4, 6). Vergrößerung 24850mal (Ausnahmen: a 42600mal, b 628400mal, b 7 9230mal)

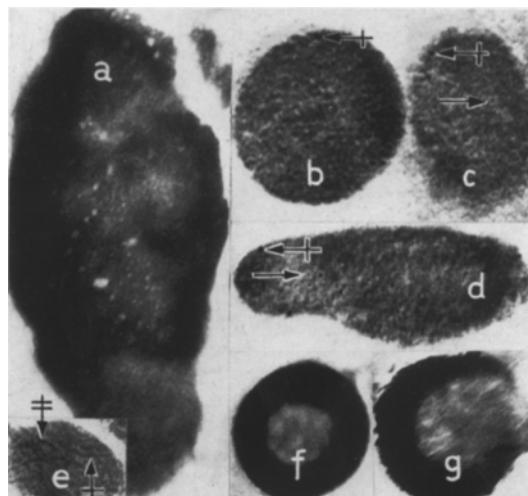


Abb. 2a—g. *Feinbau* der Pigmentgranula bei Ochronose. Optisch leere (a) oder mit zentralen Granula versehene Vacuolen (c, d, Pfeil). Dichte Granula an der Pigmentkörperbegrenzung (b, c, d, einfach gestrichelter Pfeil). Heller Hof (f, g). Fibrillen (e, doppelt gestrichelter Pfeil). Behandlung des Dünnschnittes 40 min nach DROCHMANS (1960) (e) bzw. 120 min nach STRAUSS (1932) (b—d, f, g). Kürzer belichtete Aufnahme des Körpers b3 der Abb. 1 (a). Vergrößerung 28400mal (a), 42600mal (b, c, e, f, g), 46900mal (d)

Aufziehen auf befilmte Blenden mit 5% KOH, mit der Lösung von DROCHMANS (1960) und von STRAUSS (1932) behandelt worden. Mehrere μ m dicke Schnitte des eingebetteten isolierten Pigmentes ließen auch nach tagelanger Einwirkung nur eine sehr geringe Aufhellung des dunkelbraunen Pigmentes erkennen. In Dünnschnitten finden sich viele unveränderte und einige ganz herausgelöste Pigmentkörper. Selten werden weitere Strukturen erkennbar: dichte Granula, die am Rand des Pigmentkörpers (Abb. 2b) oder inmitten kleiner Vacuolen (Abb. 2c, d) liegen; zentrale (Abb. 2f) oder exzentrische (Abb. 2g) optisch hellere Hofbildung; eine dunklere Randschale (Abb. 2a); und Fibrillen (Abb. 2e).

Diskussion

Eine sichere morphologische Abgrenzung des Ochronose-Pigmentes von allen anderen bekannten Melaninpigmenten ist nicht möglich, obwohl diese in Abhängigkeit von Standort und Species unterschiedlich beschaffen sind (MOYER, 1963; TOUSIMIS, 1963). Die Dopa-Melanine bestehen aus einem Gemisch verschiedener Oxydations- und Polymerisationsstufen des 5,6-Dioxyindols, deren chemische Struktur bisher nicht aufzuklären war (SCHAFF, 1957). Elektronenmikroskopisch ist nicht sicher zwischen Polymerisaten des Dopa- und des Homogentisinsäure-Stoffwechsels zu unterscheiden. Einige Besonderheiten des Homogentisinsäure-Melanins sollen im folgenden hervorgehoben werden. Im Gegensatz zu den Melaningranula der Haut wird bei der Ochronose eine schmale grobgranuläre oder breite feingranuläre osmiophile Hülle (DROCHMANS, 1963) zumeist vermisst. Ferner fehlen bei unseren ochronotischen Patienten stäbchenförmige (TOUSIMIS, 1963), helle zusammengesetzte (DROCHMANS, 1963) und gestreifte (RAPPAPORT, NAKAI und SWIFT, 1963) Pigmentkörper. Obwohl unter den von uns geprüften Bedingungen das sog. Homogentisinsäure-Melanin in Phosphorwolframsäure und Kaliumpermanganat *in vitro* unlöslich ist, ließen sich nach „Bleichung“ am Dünnschnitt weitere Strukturen darstellen. Nach Behandlung der Dünnschnitte mit einer dünnen Kalilauge-Lösung gelingt nämlich häufiger als nach Stückkontrastierung mit Phosphorwolframsäure die Darstellung granulärer und bläschenförmiger Strukturen (Abb. 2a—d), wie sie in dem Pigment der Iris auftreten (TOUSIMIS, 1963). Dabei sind die im ochronotischen Pigment beobachteten Granula (Abb. 1, b4) Befunden an Pigmentkörpern der Kanincheniris vergleichbar; diese sind anders als bei Mensch, Affe, Katze und Hund beschaffen (TOUSIMIS, 1963). Die zentrale Hofbildung (Abb. 2f) ist bereits in Melanophoren des Axolotl beobachtet worden (DROCHMANS, 1963). Nach Einwirkung von Kaliumpermanganat haben wir — allerdings sehr selten — Fibrillen in Pigmentkörpern gefunden (Abb. 2e). Das Melaninpigment lagert sich nämlich einem fibrillären Gerüst auf (DROCHMANS, 1963; SELJI, SHIMAO, BIRBECK, FITZPATRICK, 1963 u.a.). Auch chemisch ist Melanin ein Farblack, d.h. eine aus unlöslichem Farbstoff und unlöslichem Träger zusammengesetzte Verbindung (SCHAFF, 1957). Das Homogentisinsäure-Melanin liegt in Bestätigung früherer Angaben zumeist extra-, das Dopa-Melanin demgegenüber intracellulär. Obwohl anzunehmen ist, daß auch bei der Ochronose die Pigmentbildung intracellulär erfolgt, sind ohne chemische Bleichung Melanosomstrukturen nicht gefunden worden. Folglich wurden zur Zeit der Untersuchung keine neuen Pigmente gebildet. Erst nach jahrzehntelangem Bestehen der Stoffwechselstörung soll die Pigment-

bildung, deren genauere Kinetik unbekannt ist, auftreten (Lit. bei FRIEDERICH und NIKOLOWSKI, 1951).

Intracelluläre Strukturen, die unseren in Abb. 1 (b8, b9) dargestellten Befunden ähnlich sind, finden sich auch im fibrösen arteriosklerotischen Beet (MARSHALL, ADAMS, O'NEAL und DE BAKEY, 1966). Die Autoren erörtern, ob diese Gebilde aus Lipoiden oder Lipoidpigment bestehen. Extracelluläre elektronendichte Granula treten selten auch bei der von uns untersuchten Calcinose auf. Vergleichbare Befunde haben YU und BLUMENTHAL (1963) an der verkalkten Aorta des Menschen beschrieben. Allerdings lassen sich diese „osmiophilen Knötchen“ durch Entkalkung nicht entfernen. Sie fehlen auch bei der in-vitro-Verkalkung der Rattenaorta, bei der unseren Kristalliten entsprechende typische Hydroxyapatitablagerungen gefunden werden (MARTIN, SCHIFFMANN, BLADEN und NYLEN, 1963). Wir haben bei der Calcinose vorzugsweise am Rand einiger derartiger dichter Granula typische, aus Kalksalzen bestehende Kristallite beobachtet. Wir schließen daraus, daß bei dichter Lagerung das Apatit dem ochronotischen Pigment ähnlich sein kann. Zur sicheren Unterscheidung von Pigment und anderen ähnlichen Körpern kann also wegen der möglichen morphologischen Gleichartigkeit die chemische und physikalische Charakterisierung erforderlich sein. Infolgedessen ist an Hand bisheriger Mitteilungen noch nicht zu entscheiden, ob die Annahme zu Recht besteht, bei der Ochronose sei lediglich eine orthologisch geringe Pigmentbildung krankhaft gesteigert (HUECK, 1921).

Literatur

- COOPER, J. A., and T. J. MORAN: Studies on ochronosis. I. Report of case with death from ochronotic nephrosis. *Arch. Path.* **64**, 46—53 (1957).
- DROCHMANS, P.: Mise en évidence du glycogène dans la cellule hépatique par microscopie électronique. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 553—558 (1960).
- Melanin granules: their fine structure, formation, and degradation in normal and pathological tissues. In: *International review experimental pathology* (ed. by G. W. RICHTER and M. A. EPSTEIN) **2**, 357—422 (1963).
- FRIEDERICH, H., u. W. NIKOLOWSKI: Endogene Ochronose. *Arch. Derm. Syph. (Berl.)* **192**, 273—289 (1951).
- FUCHS, U.: Beitrag zur Kontrastierung elektronenmikroskopischer Schnittpräparate mit Bleiverbindungen im alkalischen Milieu. *Z. med. Labortechn.* **7**, 250—253 (1966).
- HUECK, W.: Die pathologische Pigmentierung. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, hrsg. v. L. KREHL und F. MARCHAND, Bd. III, Tl. 2. Leipzig: Hirzel 1921.
- JANNEY, N. W.: A study of ochronosis. *Amer. J. med. Sci.* **156**, 59—68 (1918).
- MARSHALL, J. R., J. G. ADAMS, R. M. O'NEAL, and M. E. DE BAKEY: The ultrastructure of uncomplicated human atheroma in surgically resected aortas. *J. Atheroscler. Res.* **6**, 120—131 (1966).
- MARTIN, G. R., E. SCHIFFMANN, H. A. BLADEN, and M. NYLEN: Chemical and morphological studies on the in-vitro calcification of aorta. *J. Cell Biol.* **16**, 243—252 (1963).
- MOYER, F. H.: Genetic effects on melanosome fine structure and ontogeny in normal and malignant cells. In: V. RILEY and F. G. FORTNER, p. 584—606.
- RAPPAPORT, H. T., T. NAKAI, and H. SWIFT: The fine structures of normal and neoplastic melanocytes in the Syrian hamster, with particular reference to carcinogen-induced melanotic tumors. *J. Cell Biol.* **16**, 171—186 (1963).
- RILEY, V., and J. G. FORTNER (ed.): *The pigment cell. Molecular, biological and clinical aspects*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **100**, 1—1123 (1963).
- SCHAAF, F.: Die Haut und ihre Ausscheidungen. In: *Physiologische Chemie*, hrsg. v. B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, Bd. 2, Tl. 2b. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

- SCHREIER, K.: Angeborene Störungen des Eiweißstoffwechsels. In: Handbuch der inneren Medizin, hrsg. v. G. v. BERGMANN, W. FREY und H. SCHWIEGK, Bd. 7, Tl. II. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- SHEIJI, M., K. SHIMAO, M. S. C. BIRBECK, and T. B. FITZPATRICK: Subcellular localization of melanin biosynthesis. In: V. RILEY und J. G. FORTNER, p. 497—533.
- STRAUSS, A.: Über die Bleichung des Melanins. Z. wiss. Mikr. **49**, 123—125 (1932).
- TOUSIMIS, A. J.: Pigment cells of the mammalian iris. In: V. RILEY and F. G. FORTNER, p. 447—465.
- YU, S. Y., and H. T. BLUMENTHAL: The calcification of elastic fiber. III. Various crystalline structures of apatite in human aortae. Lab. Invest. **12**, 1154—1162 (1962).

Doz. Dr. U. FUCHS
Pathologisches Institut der Karl-Marx-Universität
X 701 Leipzig, Liebigstr. 26