

Untersuchungen zur Polymerisation von Lipofuscin mittels J-Band-Effekt* **

Dieter Haag, Cyrus Tschahargane und Klaus Goerttler

Institut für Vergleichende und Experimentelle Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. Kl. Goerttler) am Pathologischen Institut der
Universität Heidelberg

Eingegangen am 3. Mai 1973

Studies on the Polymerization of Lipofuscin by the J-Band Effect

Summary. 1. Dibenzo-diethyl-methyl-thiacarbocyaninebromide stains lipofuscin according to the J-Band effect, thereby providing histochemical proof of the presence of a highly polymerized component.

2. It is also possible to stain lipofuscin in autolyzed tissue.

3. Lipofuscin and iron pigment can be demonstrated simultaneously by our method because of their different staining properties.

4. The fluorescing, J-Band negative pigment found in some brain regions allows the hypothesis that lipofuscin occurs there in low molecular weight form.

5. The pseudomelanin in Pseudomelanosis coli shows a strong cytoplasmic pigment reaction, apparently caused by a lipofuscin-like pigment whose fluorescence is suppressed by traces of heavy metals.

Zusammenfassung. 1. Mittels Dibenzo-diäthyl-methylthiacarbocyaninbromid gelingt eine Anfärbung des Lipofuscins nach dem J-Band-Effekt. Damit ist die Annahme einer hochpolymeren Komponente im Lipofuscin histochemisch erwiesen.

2. Eine Anfärbung des Lipofuscins ist auch in autolyisiertem Gewebe sicher möglich.

3. Lipofuscin und Eisenpigment lassen sich mit unserer Methode simultan färben und getrennt darstellen.

4. Fluoreszierende, indessen J-Band-negative Pigmente in einzelnen Gehirnabschnitten erlauben die Annahme, daß das Lipofuscin dort in niederpolymerer Form vorliegt.

5. Das Pseudomelanin bei Pseudomelanosis coli zeigt eine starke Pigmentreaktion im Cytoplasma. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Lipofuscin-ähnliches Pigment, dessen Fluoreszenz durch Schwermetallspuren unterdrückt wird.

Obgleich das Lipofuscin, seine Verteilung im Körper und seine histologische Darstellbarkeit in einigen Organen gut bekannt sind (Hamperl, 1934; Gedigk und Fischer, 1959), herrscht über die chemische Zusammensetzung dieses Pigments und über seinen Metabolismus noch weitgehend Unklarheit. Dies mag z.T. auf die Heterogenität des Lipofuscins selbst und auf Schwierigkeiten in der Reindarstellung dieser Substanz beruhen, z.T. ist auch ihre ungewöhnliche Resistenz gegenüber chemischen Aufschlußverfahren anzuführen. Aufgrund des Vorkommens in nicht-regenerierenden Geweben und einer melanin-ähnlichen Komponente werden Zusammenhänge mit dem Amin-Stoffwechsel vermutet. Die von Hamperl (1934) beschriebene charakteristische Eigenfluoreszenz des z.B. in den Herzmuskelfasern polkappenartig den Zellkernen angelagerten Lipofuscins erlaubt histologisch die Unterscheidung vom Melanin. Die gelbliche Eigenfarbe ist durch eine bei 450 m μ beginnende Endabsorption

* Auszugsweise vorgetragen auf der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in München vom 16.—17. 9. 1972.

** Mit freundlicher Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

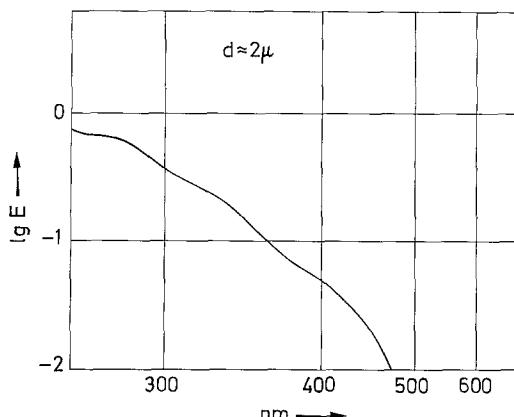


Abb. 1. Absorptionsspektrum des Lipofuscins in unfixiertem Gewebe. Der Endabsorption ist bei etwa 280 nm eine von der Proteinkomponente herrührende „Schulter“ überlagert

bedingt, die in Abb. 1 an unfixiertem Material gewonnen wurde. Ähnliche wie das hier aufgezeichnete Spektrum wurden auch in fixierten Geweben aufgenommen (Sandritter et al., 1972). Von verschiedenen Autoren (z.B. Gedigk und Fischer, 1959; Siebert et al., 1962; Hendley et al., 1963) wird das spektrale Verhalten des Lipofuscins auf eine große Anzahl konjugierter Doppelbindungen infolge Polymerisation ungesättigter Fettsäure zurückgeführt. Bislang konnte ein solcher Beweis im histologischen Schnitt noch nicht geführt werden.

Bestimmte, für die Farbphotographie entwickelte Cyanine zeigen bei der Bindung an makromolekulare Substanzen eine sichtbare Farbänderung, ähnlich der in der histologischen Technik bekannten Metachromasie, die bei den Cyaninen aber auf dem Auftreten *zusätzlicher* Absorptionsbanden im längerwelligen Teil des Absorptionsspektrums beruht. Dieser, von Jelley (1937) beschriebene und nach ihm benannte *J-Band-Effekt* resultiert aus Wechselwirkungen in Aggregationen der ebenen Farbstoffkationen, wenn diese planparallel zueinander liegen. Er tritt nach den Untersuchungen von Kay et al. (1964) vorwiegend bei Verbindungen mit hochpolymeren Nucleinsäuren, Proteinen und Polysacchariden auf. Vorkommen und Intensität von *J*-Banden lassen dabei Rückschlüsse auf den Polymerisationsgrad bzw. auf die Molekülgroße der anfärbbaren Substanzen in Zellkompartimenten zu.

Der auch in der Chromatographie verwandte Farbstoff Dibenzo-diäthylmethylthiacarbocyanimbromid hat die Eigenschaft, polymolekulare Substanzen nach der Größe der Molekulargewichte in gut unterscheidbaren Farbtönen wiederzugeben (Dahlberg et al., 1969). Wir haben den *J-Band-Effekt* dieser Substanz für die histologisch-histochemische Methodik nutzbar gemacht und anderenorts beschrieben (Haag et al., 1971). In der vorliegenden Studie soll über Befunde berichtet werden, die den *Teilaspekt der Polymerisation lipogener Pigmente* betreffen, soweit ein solcher mit Hilfe der spektralen Eigenschaften des *J-Band-Effektes* und mittels des von uns verwandten Carbocyaninbromides erfaßbar ist.

Material und Methodik

a) Eigenschaften des Dibenzo-diäthyl-methylthiacarbocyaninbromides

Das Absorptionsspektrum der von uns verwandten Substanz ist in Abb. 2 wiedergegeben, ihre Struktur wurde oben im Bild eingezeichnet. Die gestrichelte Kurve stellt das Spektrum der Reinsubstanz, die durchgezogene Kurve das Spektrum der in 50%igem wäßrigen Form-

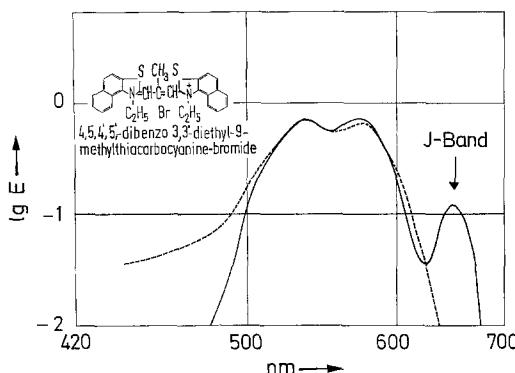


Abb. 2. Absorptionsspektrum von Dibenzo-diäthyl-methylthiacarbocyaninbromid (Strukturformel links oben). Konzentration der Farbstofflösung in reinem Formamid (----) 0.1%. $d = 12 \times 10^{-4}$ cm, in 50% wäßrigem Formamid (—) 0.005%, $d = 0.2$ cm. J-Bande der wäßrigen Lösung bei 650 nm

amid gelösten Substanz dar; die wäßrige Lösung besitzt bei $650 \text{ m}\mu$ als zusätzliches Maximum die J-Bande.

b) Untersuchte Gewebe

Dem täglichen Obduktionsgut des Pathologischen Institutes wurden Myokard, Leber, Hirngewebe und das Ganglion Gasseri betagter Individuen entnommen. Zusätzlich konnte Lebergewebe bei subakuter Dystrophie und Leber und Herzmuskel in einem Fall von Hämochromatose untersucht werden.

c) Fixierung und Färbung

Als Fixationsmittel sind Formalinlösung bzw. alle Aldehyd-Fixantien wenig geeignet, da alle Aldehyde die Tendenz zur Vernetzung polymerer Strukturen besitzen. Uns hat sich nach eingehender Prüfung die Fixierung in absolutem Alkohol bewährt. Dabei muß allerdings die bekannte Gewebsschrumpfung mit allen Folgen für die Anfertigung histologischer Präparate in Kauf genommen werden. Die Präparate werden als kleine Gewebsblöcke durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt ($70\% = 5$ Std; $96\% = 24$ Std; absolut. Alk. = 24 Std), danach über 24 Std in Methylbenzoat belassen und nach Überführung über Benzol und Benzol-Paraplast (30 min bzw. 2 Std) 5 Std in Paraplast eingebracht und danach in neuem Paraplast ausgegossen. Anfertigung von 6μ dicken Schnitten, Entparaffinierung und Einbringen in die absteigende Alkoholreihe in üblicher Weise.

Die Färbung mit dem kationischen Farbstoff 4,5,4',5'-dibenzo 3,3'-diäthyl-9-methylthiacarbocyaninbromid (Fa. Serva GmbH, Heidelberg) erfolgt in 0,005%iger Lösung in 50%igem wäßrigen Formamid. Diese Farblösung ist bei Aufbewahrung in der Dunkelheit einige Zeit gut haltbar. Für die Färbung zur Darstellung des Lipofuscins genügen 2 Std, zur intensiven Darstellung der Nucleohistone bzw. Proteine soll 24 Std gefärbt werden. Nach der Färbung werden die Schnitte 15 min in Fließwasser gewässert, in Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet. Zur Erzielung einer guten Entwässerung haben wir die Präparate 15 min in Vakuum ausgepumpt. Anschließend kurzes Eintauchen in Xylol und Eindeckung mittels Eukitt®. Zur Kontrolle dienten uns mit HE bzw. Hämalaun gefärbte Schnitte.

Ergebnisse

a) Lipofuscinpigment im Herzmuskel

Die Zellkerne der Herzmuskelfasern zeichnen sich durch violette und die Proteine durch hellrosa Farbtönung aus; die Lipofusingranula stellen sich dagegen

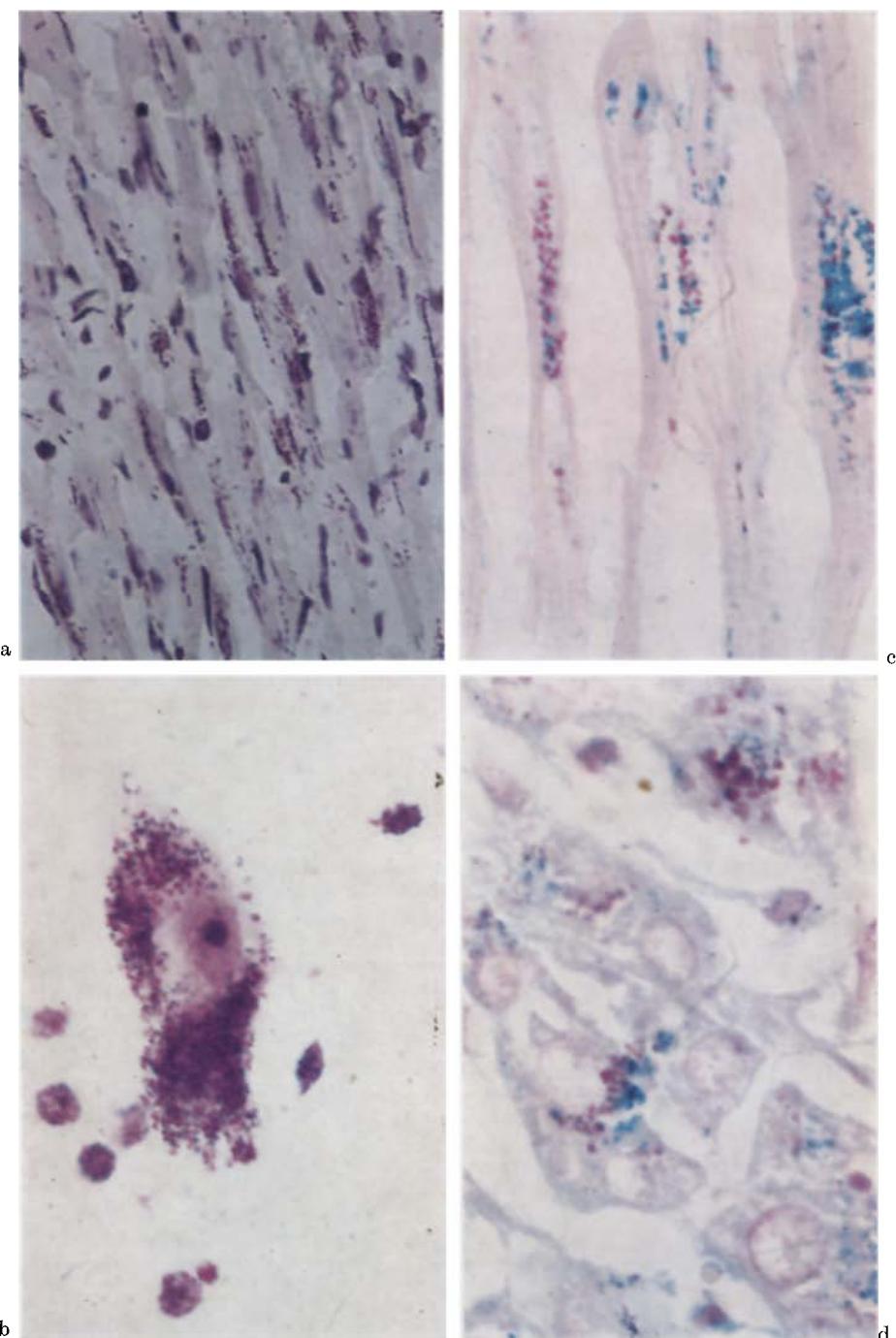


Abb. 3a—d

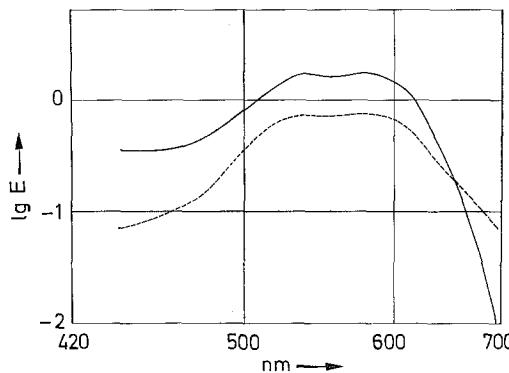


Abb. 4. Absorptionsspektren der in Abb. 3a angefärbten Zellkompartimente. Punktierte Linie = Spektrum der Zellkerne (Nucleoproteide); durchgezogene Linie = Spektrum des Lipofuscins. Die Überschneidung der Absorptionslinien bei ca. 670 nm bedingt die unterschiedlichen Farbtöne

als rubinrote bzw. ziegelrote Körnchen dar (Abb. 3a). Mittels registrierender Mikrospektralphotometrie konnten im gleichen Präparat die Absorptionsspektren verschiedener Zellbezirke aufgenommen werden. In Abb. 4 sind diese Spektren abgebildet. Die punktierte Linie repräsentiert das Spektrum von Zellkernen, die darüberliegende, durchgezogene, das Spektrum des Lipofuscins. Besonders stark macht sich der J-Band-Effekt bei den Nucleinsäuren des Zellkernes und des Cytoplasmas bemerkbar. Die Überschneidung zwischen 650 und 700 m μ verursacht die bläuliche Färbung der Nucleoproteide bzw. die violette Färbung der RNS, deren Molekulargewichte bekanntlich sehr groß sind. Entscheidend für unsere Fragestellung ist jedoch die Tatsache, daß auch das Lipofuscin bei Anfärbung mit dem Thiacyaninbromid den J-Band-Effekt zeigt. Damit ist erwiesen, daß das untersuchte Lipofuscin eine hochpolymere Komponente enthält; die Annahmen von Gedigk und Fischer (1959) sowie von Braak (1971) lassen sich mit unserer Färbung experimentell beweisen.

b) Lipofuscin in anderen Organen; Abgrenzung gegenüber Melanin, Gallepigment, Hämochromatin; Lipofuscin-Darstellung in autolyisiertem Gewebe

Nach Untersuchungen von Präparaten bei akuter Leberdystrophie färbt sich das Gallepigment mit Thiacyaninbromid überhaupt nicht an, während das Lipo-

Abb. 3a—d. a Herzmuskel nach Färbung mit Thiacyaninbromid. Durch unterschiedliche Stärke des J-Band-Effektes rubin- bis ziegelrote Anfärbung der Lipofuscingranula und blau-violette Anfärbung der Nucleoproteide in den Zellkernen. Vergrößerung 80 \times . b Ganglien-Zelle der Substantia nigra nach Thiacyanin-Reaktion. Rubinrote Anfärbung der Lipofuscingranula infolge J-Band-Effekt. In der Peripherie Zellkerne von Gliazellen. Vergrößerung 315 \times . c und d Lipofuscin und Eisenpigment in simultaner Darstellung bei einem Fall von Hämochromatose: Kombinierte Turnbullblau-Thiacyaninbromid-Färbung. Deutliche Unterscheidbarkeit der in den gleichen Bezirken abgelagerten Pigmente; Eisenpigment blau, Lipofuscin rubinrot. c Herzmuskel, d Leber. Vergrößerung 315 \times

fuscin auch in den dystrophischen Bezirken unverändert positiv bleibt. Hierin dokumentiert sich die bekannte Resistenz des Lipofuscins gegenüber chemischen Veränderungen.

Aufgrund dieser Beobachtungen haben wir *Autolysestudien* an Herzmuskelgewebe durchgeführt und konnten feststellen, daß sich die Lipofusingranula bei weitgehendem Verlust der Kernfärbbarkeit weiterhin deutlich anfärbten, d. h. praktisch unverändert nachweisen ließen.

Bei *Pseudomelanosis coli* wird in der Tunica propria ein Pigment mit nur schwacher bräunlicher Eigenfluoreszenz abgelagert. Im Gegensatz zum Melanin der Epidermis reagiert dieses Pseudomelanin stark J-Band-positiv. Wir nehmen an, daß es sich um ein *Lipofuscin-ähnliches Pigment* handelt, dessen Fluoreszenz durch Schwermetallspuren unterdrückt wird.

Im *Hirngewebe* wird das Lipofuscin bekanntermaßen in unterschiedlicher Menge abgelagert. Abb. 3b zeigt eine Lipofuscin-haltige Gehirnganglienzelle in der Substantia nigra. Auch hier ist eine stark positive Reaktion des Pigmentes im Cytoplasma erkennbar; die Polychromasie des J-Band-Effektes tritt hier besonders deutlich in Erscheinung. In anderen Gehirngeweben (z. B. Nucleus dentatus) fanden wir jedoch auch *fluoreszierendes Pigment mit negativer Reaktion*, vielfach in unmittelbarer Nachbarschaft von Zellen mit positivem Pigmentnachweis. Unsere Beobachtungen ergänzen die von Braak (1971) beschriebenen Unterschiede des *Neurolipofuscins*.

In einem Fall von *Hämochromatose* hatten wir Gelegenheit, die *gleichzeitige Präsenz von Eisenpigment und Lipofuscin* zu studieren. In Abb. 3c wurde Herzmuskelgewebe einer Eisenfärbung und nachfolgender Thiacyaninfärbung unterworfen. Hier wurde deutlich, daß beide Pigmente in den gleichen Cytoplasma-Bezirken abgelagert werden, daß aber nur das Lipofuscin J-Band-positiv reagiert. Ähnliche Verhältnisse fanden wir in der Leber des gleichen Falles (Abb. 3d). Wir sind damit in der Lage, eine Simultanfärbung verschiedener Pigmente vorzunehmen. Zusätzliche Studien über die Entstehung dieser Pigmente werden mittels Carbocyaninbromid-Färbung möglich.

Diskussion

Die von uns erhobenen Befunde erlauben nachfolgende Stellungnahmen: Die Tatsache, daß das Lipofuscin in der Mehrzahl der Beobachtungen mit dem Farbstoff Dibenzo-diäthyl-methylthiacarbocyaninbromid unter Ausbildung einer Absorptionserhöhung im langwelligen Teil des Spektrums reagiert, bestätigt histochemisch die Annahme einer hochpolymeren Komponente des Lipofuscins. Das Vorkommen autoxydierter und polymerisierter Substanzen war wegen der positiven Nachweisbarkeit von $-C=C-$ -Doppelbindungen bisher von Siebert *et al.* (1962), von Gedigk und Fischer (1959) und von Hendley *et al.* (1963) stets vermutet worden. Bisher konnte aber der Nachweis der Polymerisation mit den an isoliertem Lipofuscin durchgeföhrten Analysemethoden nicht erbracht werden, weil eben gerade die Unlöslichkeit ein Charakteristikum hochpolymerisierter autoxydierter organischer Substanzen ist.

Ausnahmen fanden wir bisher nur in einzelnen Gehirnbezirken, welche ein zwar *fluoreszierendes, aber J-Band-negatives Pigment* enthielten. Wir nehmen an,

daß in diesen Zellen das Lipofuscin in einer niederpolymeren Form vorliegt. Offenbar steht die Fluoreszenz mit der Polymerisation *nicht* in direktem Zusammenhang. Hierfür sprechen auch die jüngsten Befunde von Quadbeck und Weinhardt (1972), welche aus dem Herzmuskel-Lipofuscin eine fluoreszierende Komponente isolieren konnten, deren Molekulargewicht zwischen 148 und 150 liegt; es handelt sich hier mit Sicherheit um ein Monomer, Zusammenhänge mit dem Amin-Stoffwechsel lassen sich vermuten.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir die Aufklärung der biologischen Funktion des Lipofuscins nicht direkt fördern. Wir hoffen allerdings, daß die in dieser Studie skizzierten Methoden weitere Untersuchungen über die Entstehung und Veränderung des Lipofuscins stimulieren.

Literatur

- Braak, H.: Über das Neurolipofuscin in der unteren Olive und dem Nucleus dentatus cerebelli im Gehirn des Menschen. *Z. Zellforsch.* **121**, 573–592 (1971)
- Dahlberg, A. E., Dingman, C., Peacock, A. C.: Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agaroseacrylamide composite gels. *J. molec. Biol.* **41**, 139–147 (1969)
- Gedigk, P., Fischer, R.: Über die Entstehung von Lipopigmenten in Herzmuskelfasern. *Virchows Arch. path. Anat.* **322**, 431–468 (1959)
- Haag, D., Tschahargane, C., Goerttler, Kl.: Simultaneous differential staining of nucleic acids and proteins in histological tissues by means of J-band-effect. *Histochemistry* **26**, 190–193 (1971)
- Hamperl, H.: Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **292**, 1–51 (1934)
- Hendley, D. D., Mildvan, A. S., Reporter, M. C., Strehler, B. L.: The properties of isolated human cardiac age pigment. II. Chemical and enzymatic properties. *J. Geront.* **18**, 250–259 (1963)
- Jolley, E. E.: Molecular, nematic and crystal states of I:I-diethylcyanine-chloride. *Nature (Lond.)* **139**, 631–632 (1937)
- Kay, R. E., Walwick, E. R., Gifford, C. K.: Spectral changes in cationic dye due to interaction with macromolecules. *J. phys. chem.* **68**, 1896–1906 (1964)
- Quadbeck, G., Weinhardt, F.: Die Farbkomponente von Lipofuscin. *Acta geront.* **2**, 329–330 (1972)
- Sandritter, W., Bierfreund, B., Pannen, F., Adler, C. P.: Lipofuscin in cardiac hypertrophy. *Beitr. Path.* **147**, 280–292 (1972)
- Siebert, G., Diezel, P. B., Jahre, K., Krug, E., Schmitt, A., Grünberger, G., Bottke, I.: Isolierung und Eigenschaften von Lipofuscin aus Herzgewebe des Menschen. *Histochemistry* **3**, 17–45 (1962)

Dipl.-Phys. Dieter Haag
 Dr. med. Cyrus Tschahargane
 Prof. Dr. med. Klaus Goerttler
 Institut für Vergleichende und Experimentelle
 Pathologie der Universität
 D-6900 Heidelberg 1, Berliner Straße 5
 Bundesrepublik Deutschland