

ELEKTRONENOPTISCHE DARSTELLUNG EINER MAKROGLOBULIN-RETENTION IN PLASMAZELLEN DES MENSCHLICHEN KNOCHENMARKS

L. STOCKINGER. Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Wien, Austria

Nach heutiger Ansicht wird den Plasmazellen eine wesentliche Beteiligung an der Bildung der Globuline, im besonderen der immunologisch wichtigen Gamma Globuline zugeschrieben (Bessis, 1961 *b*; McMaster, 1961, und andere). Das elektronenmikroskopische Substrat dieser Funktion ist ein hochorganisiertes Ergastoplasma, das die Plasmazellen gleich anderen eiweissbildenden Zellen (Pankreas, Milchdrüse u.s.w.) besitzen; in den endoplasmatischen Zysternen können Sekretgranula nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden. In Plasmazellen kommen unter besonderen Umständen homogene bis kristalline Einlagerungen innerhalb der Zysternen des Ergastoplasmas zur Darstellung (Welsh, 1960; Wellensiek, 1957; Stoeckenius, 1957; Thiery, 1960), die z.T. mit den bekannten Russell'schen Körperchen identifiziert wurden.

Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Knochenmarks einiger Patienten mit Makroglobulinämie kam es nur in einem Fall zur Darstellung besonders auffälliger, granulalthaltiger Plasmazellen; dieser Befund stellt über seine pathophysiologische Bedeutung hinaus einen wichtigen Hinweis auf die normale Funktion der Plasmazellen dar und unterscheidet sich in einigen wesentlichen Details von den bisher bekannten elektronenmikroskopischen Befunden dieser Krankheit.

MATERIAL

Das Sternalpunktat eines klinisch diagnostizierten Falles von Makroglobulinämie nach Waldenström¹ (77 jährige Frau) wurde unmittelbar nach der Entnahme in eisgekühlter, gepufferter OsO₄-Lösung nach Palade fixiert und nach Entwässerung in

¹Das Material verdanke ich Herrn Doz. Dr. Schneiderbauer, Medizinische Abteilung des Krankenhauses der Stadt Wien Lainz. Die klinischen, sowie die Laboratoriumsbefunde wurden an anderem Ort ausführlich dargestellt (Schneiderbauer, Stockinger, Redtenbacher, und Narbeshuber, 1962).

Aceton und Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure in Epikote 812 (Shell) eingebettet. Die mit dem Ultramikrotom nach Sitte (Reichert) hergestellten Dünnschnitte mikroskopierten und photographierten wir mit dem Elmiskop I von Siemens. Einen Teil der Schnitte kontrastierten wir mit Blei bei hohem pH (Karnovsky, 1961). Alternierend zu den Dünnschnitten dienten dickere Schnitte zur lichtmikroskopischen Orientierung.

Bei der Makroglobulinämie handelt es sich um eine Dysproteinämie, bei der es neben anderen klinischen Symptomen zu charakteristischen Veränderungen des Knochenmarks (Vermehrung der lymphoid-plasmozytoiden Zellen) und zum Auftreten einer Makroglobulinfraction im Blutplasma kommt (Waldenström, 1944, 1958; Riva, 1958; Michon et Streiff, 1959 u.s.w.). Im beschriebenen Fall wurde eine Makroglobulinfraction mit 18 S (Svedberg Einheiten) nachgewiesen.

BEFUNDE

Lichtmikroskopisch finden sich im Knochenmark neben zellarmen Abschnitten Anhäufungen von rundkernigen, plasmareichen Zellen, die häufig auch eine feinere bis gröbere Granulierung erkennen lassen. Die Zahl der übrigen Blutelemente (Vorstufen von Granulozyten und Erythrozyten) ist sehr gering. Die Kerne der plasmareichen Zellen enthalten vielfach auffällige Einschlüsse; auch Kerne ohne Plasmasaum kommen nicht selten vor.

Die elektronenmikroskopische Darstellung der verschiedenen Zellen ist durch ihre Einlagerung in ein elektronendichtes Eiweissgerinnsel erschwert. In den zellreichen Abschnitten liegen vorwiegend Zellen mit reich ausgebildeten Lamellensystemen. Ihre exzentrisch liegenden Kerne sind rund bis oval, meist in der Einzahl und zeigen häufig randständige Verdichtungszone (Abb. 2). Einige Zellkerne enthalten Einschlüsse, die in ihrer Größe sehr stark schwanken und so extreme Ausdehnung

erreichen können, daß die Kernsubstanz daneben nur noch einen schmalen Randsaum bildet (Abb. 4 *a-d*); sie sind von einer distinkten Membran begrenzt und liegen häufig an einer Seite der Kernmembran innen an. In einigen Fällen liegt an dieser Stelle eine extranukleäre, membranbegrenzte Cyste mit gleichem Inhalt wie der intranukleäre Raum dem Zellkern dicht an (Abb. 4 *a, d*). Eine Verbindung zwischen beiden Räumen kommt nur selten zur Darstellung (Abb. 4 *d*). Der Inhalt dieser Einschlüsse ist sehr polymorph: von einem zarten Gerinnsel bis zu fein granulären elektronendichteren Massen finden sich Übergangsformen. In manche Einschlüsse sind mehrere kleine und vor allem auch einzelne bis 1 μ große, sehr elektronendichte Granula eingelagert (Abb. 4 *a, b*). Nur ganz selten liegen auch Doppelmembranen intranukleär. Multiple Einschlußbildungen kommen ebenfalls vor (Abb. 4 *c*). Dem Zellkern liegt eine dichte Plasmazone an, die von eng gelagerten, verschlungenen zarten Membranen begrenzt, regelmäßig auch kleine Bläschen in grösserer Zahl enthält (Abb. 1, 2). Diese Plasmazone ist mit dem para- oder juxtannukleären Feld

typischer Plasmazellen identisch und wird in Analogie zu den Strukturen anderer Zellen als Golgi Zone bezeichnet (Braunsteiner, Fellingner, and Pakesch, 1953; Stoeckenius, 1957; Wellensiek, 1957; Thiery, 1960; Bessis, 1961*a*, u.s.w.) Durch die wechselnde Schnittrichtung tritt sie nicht in allen Zellen in Erscheinung. Mitunter liegen auch in diesem Bereich größere und kleinere osmiophile Kugeln.

Der übrige Zelleib ist von einem System grösserer und kleinerer Zysternen durchzogen, das in manchen Zellen so stark ausgebildet ist, daß die begrenzenden Membranen dicht aneinander zu liegen kommen; oft schliessen sich diese Zysternen zu konzentrischen Systemen zusammen. An der Aussenfläche der Membranen sind besonders gut nach Kontrastierung mit Blei elektronendichte Ribonukleoprotein (RNP)-Granula in wechselnder Menge nachweisbar. In manchen Zellen liegen derartige Granula auch frei im Cytoplasma zwischen den Lamellen.

Zwischen den Zysternen kommen in der Innenzone des Cytoplasma im Golgi Feld und Zellkern zahlreiche, verschieden grosse, lamelläre Mito-

ABBILDUNG 1

Typische plasmozytoide Speicherzelle: Breite Randzone mit weiten Ergastoplasma-zysternen und reichlich granulärem Inhalt. Zentral paranukleäres Feld begrenzt von dicht gelagerten Golgi Lamellen. $\times 6,000$.

ABBILDUNG 2

Ausschnitt einer Speicherzelle mit exzentrisch liegendem Zellkern, Darüber charakteristische Golgi Region. Links oben Speicherzelle mit weiten Zysternen und sehr kleinen granulären Einlagerungen. $\times 12,000$.

ABBILDUNG 3

Speicherzelle in Auflösung. Die Ergastoplasmaräume sind aufgequollen, die Zellmembran z.T. schon aufgelöst. Zentral verdichtete Golgi Region, daneben dichte Mitochondrien. $\times 6,000$.

ABBILDUNG 4a-4d

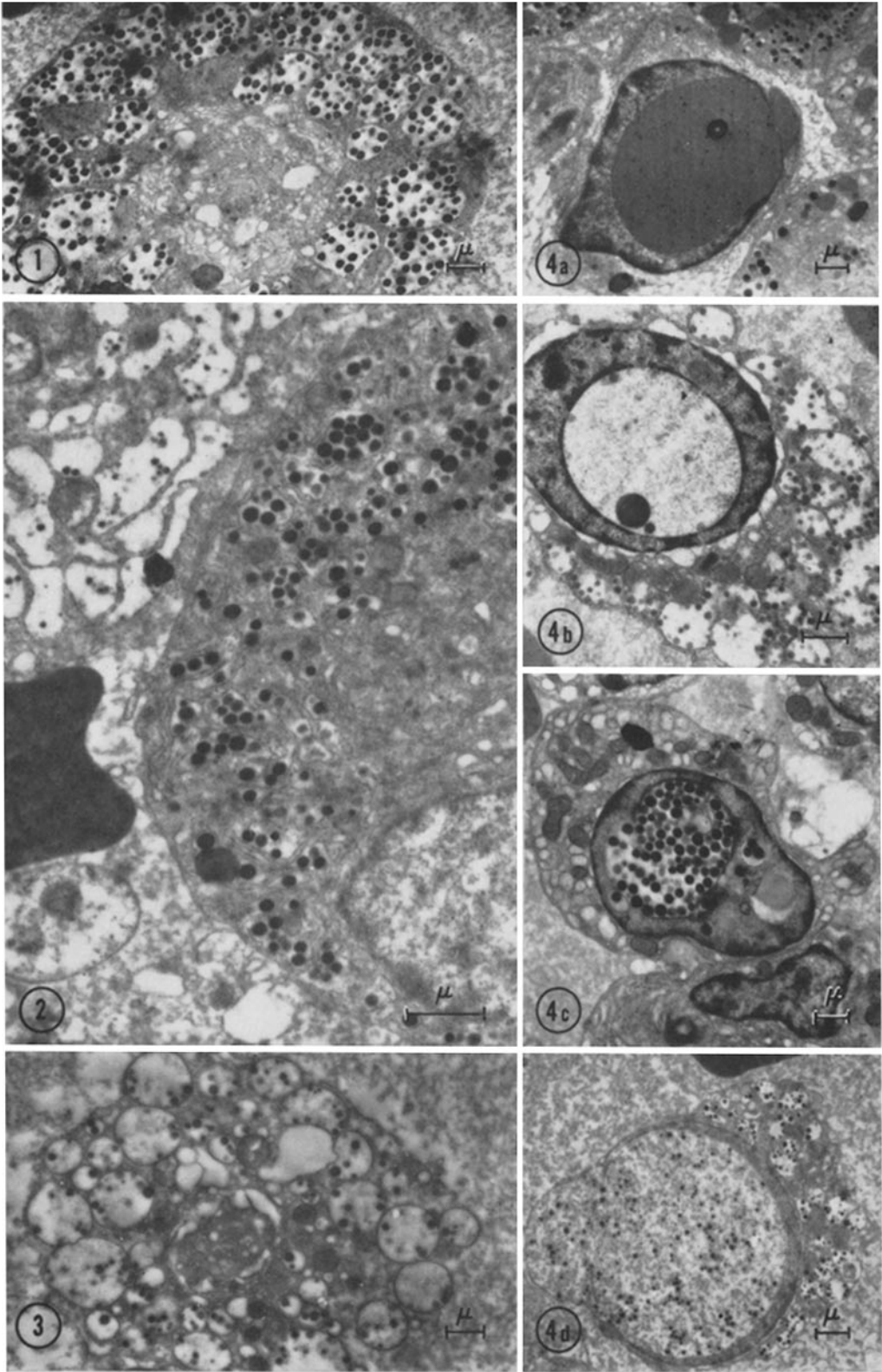
Verschiedene Formen von Kerneinschlüssen:

a, Sehr elektronendichte homogene Einlagerung mit paranukleärer Kappe; im Einschluß ein großes, dichtes Granulum und zahlreiche kleine Formen. $\times 5,000$.

b, Kerneinschluß aus zartem Gerinnsel mit Riesengranula. $\times 7,000$.

c, Mehrere Einschlüsse in einem Zellkern, z.T. mit elektronendichten Granula und verschlungenen Doppelmembranen, z.T. mit homogenem, zweiphasigen Inhalt. $\times 5,000$.

d, Die Kernsubstanz ist durch eine riesige Einschlußbildung bis auf einen schmalen Randsaum reduziert, im Einschluß liegt ein zartes Gerinnsel mit zahlreichen in ihrer Größe variierenden Granula. Am rechten Rand besteht eine offene Verbindung zu einer dem Kern kappenförmig aufsitzenden Blase mit gleichem Inhalt. $\times 5,000$.



chondrien vor. Die fast in allen mononukleären Zellen auffällig in Erscheinung tretenden, zahlreichen Zysternen erscheinen in manchen Fällen leer, enthalten mitunter zarte Gerinnsel, sehr häufig aber elektronendichte Granula wechselnder Grösse (20–350 $m\mu$) (Abb. 2). In manchen Zysternen finden sich bis zu 15 derartiger Granula angeschnitten. Besonders dicht liegen sie in der Aussenzone des Zytoplasma unmittelbar unter der Zelloberfläche. Kleinere Granula erscheinen homogen, grössere dagegen zeigen körnige Verdichtungen. Durch Bleikontrastierung wird ihre Dichte und Struktur nicht verändert.

Auffallend groß ist die Zahl der in Auflösung begriffenen Zellen (Abb. 3ö. Dabei quellen die Zysternen zuerst auf und dann trennen sie sich mit ihrem granulären Inhalt von der Zelloberfläche ab, während Zellkern, Golgi Feld und Mitochondrien zunächst noch vereint bleiben. Die hochgradige Vakuolisierung, die der Auflösung der Zellen vorausgeht, macht sie sicherlich auch gegen mechanische Insulte bei der Materialgewinnung wesentlich empfindlicher; dieser Umstand darf bei der Bewertung der Bilder dieses Auflösungs Vorganges nicht außer Acht gelassen werden. Eine sichere Unterscheidung zwischen spontaner und mechanisch verursachter Auflösung ist daher nicht immer möglich. Erst in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Auflösung und des Zellerfalls kommt es zu verstärkten Schädigungs- und Degenerationszeichen am Zellkern. In der Umgebung solcher Zellen finden sich weit ausgebreitet granulähaltige Vakuolen, deren Herkunft noch durch eine oberflächliche Anlagerung elektronendichterer RNP Granula erkennbar ist.

In der Umgebung zerfallender Zellen liegen auch in den Endothelzellen der Kapillarwand ähnliche Granula.

DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Bei dem dargestellten Fall handelt es sich um eine Form der bereits mehrfach beschriebenen Waldenström'schen Erkrankung mit exzessiver Vermehrung der für die Bildung der Globulinfraktion verantwortlichen Plasmazellen. Braunsteiner (1958) hat als erster auf die Ausbildung ergastoplasmatischer Strukturen in den früher den Lymphozyten zugerechneten Zellen hingewiesen. In der vorliegenden Arbeit werden in den weiten Zysternen des Ergastoplasmas der Plas-

mazellen elektronendichte Granula verschiedener Größe dargestellt, die als Aggregate der Makroglobuline gedeutet werden. Die Granula sind in manchen Zellen sehr klein und fein verteilt, in anderen zu grösseren Aggregaten vereinigt; ihre unterschiedliche Dichte lässt auf eine Entstehung durch Aggregation oder Agglutination kleinerer Einheiten schliessen. Kovacs und Daune (1961) isolierten aus einem Makroglobulinämieserum sphärisches Protein mit einem Durchmesser von ca. 200 A und einem Molekulargewicht von 750,000. Grössenordnungsmässig entspricht das den kleinsten in unserem Fall dargestellten Granula.

Bei Immunisierungs- und anderen Aktivierungsprozessen kommt es in den stimulierten Plasmazellen zunächst zur Vermehrung des endoplasmatischen Reticulums, sodann um den 10.–12. Tag zur Erweiterung der endoplasmatischen Zysternen und zur Anhäufung eines geflockten oder feingranulierten Materials in den so entstandenen Hohlräumen des Ergastoplasmas; schliesslich wird dieses Material kondensiert zu grossen Kugeln (Russell Körper); die Plasmazelle wird nun als Mott'sche Zelle bezeichnet (Bessis, 1961a; Stoeckenius, 1957; Thiery, 1960; Bernhard und Granboulan, 1960 u.a.). Bei der Waldenström'schen Erkrankung beschrieb Bessis (1961a) eine besondere Form einer Mott'schen Zelle mit riesigen Russell Körperchen, die Ergastoplasma und stark osmiophile Granula einschliessen. Unsere Beobachtungen unterscheiden sich von diesen Befunden in folgenden Details: (a) Die Größe der Granula erreicht in keinem Fall die der klassischen Russell Körperchen. (b) Die Einlagerungen in die endoplasmatischen Zysternen sind immer multiple, gleichartige Granula. Wahrscheinlich entspricht diese granuläre Einlagerung im Prinzip den Russell'schen Körperchen, die Bedingungen, unter denen diese spezielle Ausbildung erfolgte sind jedoch nicht näher analysierbar.

Granula ähnlicher Dichte finden sich auch in anderen Zellen, z.B. in den endoplasmatischen Zysternen exokriner Drüsenzellen des Pankreas (Palade, 1956), in glattwandigen Vakuolen der sezernierenden Milchdrüse als sogenannte Kasein-granula (Bargmann und Knoop, 1959; Wellings und Deome, 1961 u.a.). Unsere Befunde bekräftigen die mit anderen Methoden gewonnene Ansicht, daß auch in gesunden Plasmazellen die Bildung ähnlicher Eiweisskörper (Stoeckenius,

1957; Thiery, 1960; Wellensiek, 1957; Welsh, 1960; Vazquez, 1961 u.s.w.) erfolgt. Es scheint allerdings, daß im vorliegenden Fall die Abgabe der großen Eiweißkomplexe aus den Zellen nicht möglich war und nur durch Auflösung der Zellen die "Sekretion" ins Blut erfolgte. Damit steht auch der lichtmikroskopisch immer wieder festgestellte hochgradige Zerfall dieser Zellen innerhalb des Knochenmarks im Einklang. Thiery (1960) hat in mikrokinematographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen die spontane Lyse und auch die Abgabe cytoplasmatischer Anteile von Plasmazellen (Clasmatose) eindrucksvoll dargestellt, deren Phasen auch in unserem Material häufig sichtbar sind. Eine Ausschwemmung dieser spezifischen Zellen (im intakten Zustand) in das periphere Blut kommt dagegen normalerweise nicht vor (Waldenström, 1958). Der Zerfall und die Auflösung von Blutzellen scheint andererseits zu den normalen physiologischen Transport- und Regulationsmechanismen zu gehören (Pischinger, 1957).

Frühling und Mitarbeiter (1960) haben in letzter Zeit von einem Fall eindeutiger Makroglobulinämie lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Befunde des Knochenmarks und von Lymphknoten veröffentlicht. Dabei wurde histochemisch in den Plasmazellen eine Einlagerung PAS-positiven Materials nachgewiesen. Elektronenmikroskopisch brachten sie keine mit den hier beschriebenen elektronendichten granulären Einschlüssen vergleichbaren Befunde.

Wir haben bei zwei weiteren Patienten mit Makroglobulinämie bei gleicher Fixierung und technischer Behandlung der Knochenmarkspunktate ebenfalls keine derartigen granulären Einlagerungen gesehen, obwohl sonst gleichartige Zellen in wechselndem Ausmaß vorhanden waren.

Die in großer Zahl vorkommenden Kerneinschlüsse aller Größen können in den Fällen, in denen typische Plasmabestandteile eingestülpt sind, relativ leicht gedeutet werden; daneben existiert jedoch eine zweite Form, die durch die Einlagerung einer verschieden dichten, einheitlichen Grundsubstanz charakterisiert ist. Extranukleäre Blasen, die mit dem Zellkern in Verbindung stehen, zeigen gleichartigen Aufbau. Diese Einschlüsse dürften mit den von Dutscher und Fahey (1959) bei derselben Krankheit nachgewiesenen PAS-positiven intranukleären Massen

identisch sein. Zusätzlich finden sich in unserem Material verschieden große, elektronendichte, in die Kerneinschlüsse eingelagerte Granula, die gleiche Elektronendichte zeigen wie die intrazystemalen Formen. Über den Entstehungsmechanismus und die Bedeutung dieser Strukturen lassen sich keine Aussagen machen. Eine Anhäufung und Extrusion nukleären Materials, wie sie von Clark (1960) an exokrinen Pankreazellen der Ratte beschrieben wurde, muß in Betracht gezogen werden, doch ist zu bedenken, daß neben den Kerneinschlüssen häufig ein intakter Nukleolus zur Darstellung kommt, bzw. daß diese Einschlüsse gegen den übrigen Kernraum meist eine sehr scharfe Abgrenzung zeigen, an der die Kernsubstanz ähnlich wie an der Kernoberfläche verdichtet ist. Vielleicht können diese Befunde in Zusammenhang mit Beobachtungen anderer Autoren später geklärt werden.

Eingegangen am 3. März 1962.

LITERATURE

- BARGMANN, W., und KNOOP, A., Über die Morphologie der Milchsekretion. Licht- und elektronenmikroskopische Studien an der Milchdrüse der Ratte, *Z. Zellforsch.*, 1959, **49**, 344.
- BERNHARD, W., and GRANBOULAN, N., Ultrastructure of immunologically competent cells, in *Giba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity* (G. E. W. Wolstenholme and B. A. Maeve O'Connor, editors), London, J. & A. Churchill, 1960, 92.
- BESSIS, M. C., Ultrastructure of lymphoid and plasma cells in relation to globulin and antibody formation, *Lab. Inv.*, 1961a, **10**, 1040.
- BESSIS, M. C., The blood cells and their formation, in *The Cell*, (J. Brachet and A. E. Mirsky, editors), New York and London, Academic Press, Inc., 1961b, **5**, 136.
- BRAUNSTEINER, H., Quelques applications de la microscopie électronique en pratique de cytologie clinique, *Path. biol.*, 1958, **6**, 665.
- BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K., und PAKESCH, F., Demonstration of cytoplasmatic structure in plasma cells, *Blood*, 1953, **8**, 916.
- CLARK, W. H., Electron microscope studies of nuclear extrusions in pancreatic acinar cells of the rat, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1960, **7**, 345.
- DUTSCHER, T. F. and FAHEY, J. L., The histopathology of the macroglobulinemia of Waldenström, *J. Nat. Cancer Inst.*, 1959, **22**, 887.
- FRÜHLING, C., PORTE, A., und ROGER, S., La maladie

- de Waldenström. Etude d'un cas en microscopies optique et électronique, *Ann. anat. path.*, 1960, 5, 508.
- KARNOVSKY, M. S., Simple methods for staining with "lead" at high pH in electron microscope, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1961, 11, 729.
- KOVACS, A. M., und DAUNE, M., Masse et dimensions d'une molécule de macroglobuline, *Biochim. et Biophysica Acta*, 1961, 50, 249.
- MCMASTER, P. D., Antibody formation, in *The Cell*, (J. Brachet und A. E. Mirsky, editors), New York and London, Academic Press, Inc., 1961, 5, 323.
- MICHON, P., und STREIFF, F., Macroglobulinémie de Waldenström, Paris, Masson et Cie., 1959.
- PALADE, G. E., Intracisternal granules in the exocrine cells of the pancreas, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, 2, 417.
- PISCHINGER, A., Über das Schicksal der Leukozyten, *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 1957, 63, 169.
- RIVA, G., Makroglobulinämie Waldenström, Basel, Stuttgart, Benno Schwabe, 1958.
- SCHNEIDERAUER, A., STOCKINGER, L., REDTENBACHER, F., und NARBESHUBER, H., Über neue Befunde bei einem Fall von Makroglobulinämie Waldenström, *Wien. med. Woch.*, 1962, 112, 374.
- STOECKENIUS, W., Weitere Untersuchungen am lymphatischen Gewebe, *Verhandl. deutsch. Ges. path.*, 1957, 41st Meeting, 304.
- THIERY, J. P., Microcinematographic contributions to the study of plasma cells, in *Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity*, (G. E. W. Wolstenholme and B. A. Meave O'Connor, editors), London, J. & A. Churchill, 1960, 59.
- VASQUEZ, J. J., Antibody or gammaglobulin-forming cells as observed by the fluorescent antibody technic, *Lab. Inv.*, 1961, 10, 1110.
- WALDENSTRÖM, J., Incipient myelomatosis or essential hyperglobulinemia with fibrogenopenia, a new syndrome, *Acta Med. Scand.*, 1944, 117, 216.
- WALDENSTRÖM, J., Makroglobulinämie, *Triangel*, 1958, 3, 262.
- WELLENSIEK, H. J., Zur submikroskopischen Morphologie von Plasmazellen mit Russell'schen Körperchen und Eiweißkristallen, *Beitr. path. Anat. u. allg. Path.*, 1957, 118, 173.
- WELLINGS, S. R., und DEOME, K. B., Milk protein droplet formation in the Golgi apparatus of the C₃H/Crgl mouse mammary epithelial cells, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1961, 9, 479.
- WELSH, R. A., Electron microscopic localization of Russell bodies in the human plasma cell, *Blood*, 1960, 16, 1307.