

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Untersuchungen zur Charakterisierung der Granula in endometrialen Körnchenzellen

Von

GISELA HELLWEG

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. April 1956)

Im Stroma des menschlichen Endometriums finden sich auf der Höhe der Sekretionsphase neben den großen, hellen Stromazellen zahlreiche kleine Zellen, die, was Form und Verhalten anlangt, bisher in keinem anderen Gewebe gefunden werden konnten: die von HAMPERL 1954/55 beschriebenen endometrialen Körnchenzellen (s. a. HELLWEG 1954/55).

Die Kerne dieser Zellen sind sehr chromatinreich und teils rund, den Lymphocytenkernen ähnlich, teils nieren-, hufeisen-, keulen-, retorten- oder spiralförmig; einzelne weisen auch gestielt oder breitbasig aufsitzende Sprossen auf. Das Cytoplasma dieser Zellen enthält meist stark lichtbrechende, kreisrunde, morphologisch strukturlose Körnchen, deren Größe von der Grenze der Sichtbarkeit im Lichtmikroskop bis zu einem Durchmesser von 2—3 μ schwankt. Eine Zelle kann etwa 1—20 solcher Körnchen aufweisen, die unregelmäßig über das Cytoplasma verteilt sind oder in Kerndellen liegen. Die Körnchen verhalten sich acidophil und heben sich daher bei den üblichen Zellfärbungen nur sehr schlecht vom fast gleichfarbigen Cytoplasma ab. Kontrastreich darstellbar sind sie nur mit der Phloxin-Tartrazinfärbung nach LENDRUM (rot), der Fibrinmethode nach WEIGERT bzw. der Färbung nach GRAM (blau) und der Färbung nach DOMINICI (blaurot). Die Körnchenzellen hängen teils durch Ausläufer mit den übrigen Stromazellen zusammen, teils liegen sie frei in den Maschen des Zell- und Fasernetzes. Über die einzelnen Endometriumschichten sind sie unregelmäßig verteilt: am dichtesten liegen sie in der Compacta zwischen den großen, hellen Stromazellen. — Bei Betrachtung der einzelnen Cyclusphasen des Endometriums fällt auf, daß die Zahl der Körnchenzellen von der Proliferations- zur Sekretionsphase hin langsam zunimmt. Im Ruhestadium gelingt es kaum, eine Körnchenzelle zwischen den

noch spindeligen Stromazellen zu entdecken; auf der Höhe der Sekretionsphase dagegen sind sie annähernd ebenso zahlreich wie die Pseudodeciduazellen. In der Decidua der ersten Schwangerschaftsmonate kann ihre Zahl die der großen Deciduazellen sogar noch erheblich überschreiten. Bei der Menstruation gehen sie mit der sich abstoßenden Schleimhaut zugrunde. — Die Körnchenzellen entstehen offenbar durch direkte Umwandlung aus den Stromazellen. Die undifferenzierten Stromazellen des Endometriums scheinen sich somit im Laufe des Cyclus in zwei verschiedene Richtungen zu differenzieren: einerseits zu den großen decidualen Zellen, andererseits zu den Körnchenzellen. Mitosen der Körnchenzellen konnten wir nie beobachten. Eine Vermehrung durch Meroamitose wäre denkbar. — Von den gelegentlich an gleicher Stelle vorkommenden Leukocyten, Eosinophilen, Plasmazellen, Mastzellen und Lymphocyten sind die Körnchenzellen leicht abzugrenzen (s. u.).

Nach Beobachtung des morphologischen Verhaltens der Körnchenzellen erschien es uns vor allem interessant, etwas über das physikochemische Verhalten und die chemische Zusammensetzung der in ihnen enthaltenen Körnchen zu erfahren. Handelt es sich bei diesen Körnchen überhaupt um präformierte Zellbestandteile? Sind sie aus Substanzen des Kerns, des Cytoplasmas, oder vielleicht aus solchen des umgebenden Gewebes aufgebaut? Sind bestimmte Bestandteile etwa für die Körnchenzellen spezifisch? Oder liegen unspezifische Einschlüsse oder vielleicht sogar postmortale Ausfällungen des Cytoplasmas vor? Vielleicht wäre es durch Beantwortung aller dieser Fragen möglich, etwas über die vermutliche Funktion der Körnchenzellen aussagen zu können.

Material und Methodik

Wir verwendeten durch Abrasio bei noch nicht infiziertem Abort gewonnene Decidua aus den ersten Schwangerschaftsmonaten und fertigten von dem in Formalin fixierten Material Paraffinschnitte an. An diesen wurden zahlreiche unspezifische Färbungen und histochemische Reaktionen nach den bei ROMEIS bzw. PEARSE angegebenen Methoden versucht, sowie an Schnittserien außerdem Extraktionsversuche (s. Tabelle 1) und Fermentteste (s. Tabelle 2) unternommen. Zu den Fermenttesten verwandten wir:

1. Pepsin (Merck): 5 mg/cm³ 0,01 n HCl; 1, 4, 10 und 20 Std bei 37°.
2. Papain 1:350 (Merck): 1 g/100 cm³ isotonischer Phosphatpufferlösung (nach v. MURALT), eingestellt auf p_H: a) 5,4; b) 6,2; c) 7,2; d) 8,0; 1, 4, 10, 20 und 48 Std bei 20° und 37°.
3. Trypsin (Merck): 5 mg/cm³ 0,01 n HCl; 1, 4 und 10 Std bei 37°.
4. Pankreatin (Merck): 1 g/100 cm³ isotonischer Phosphatpufferlösung (nach v. MURALT), eingestellt auf p_H 7,4; 1, 4 und 10 Std bei 20° und 37°.
5. Hyaluronidase (Schering): 1 mg (= 24 Schering-Einheiten) auf 3 cm³ Aq. dest.; 24 Std bei 37°.

6. Pektinase (Bayer): 0,5 g/100 cm³ und 1,0 g/100 cm³ Aq. dest.; 1, 4, 10 und 20 Std bei 20°.

Die mit Extraktionsmitteln oder Fermenten vorbehandelten Schnittserien färbten wir anschließend, zusammen mit Kontrollschnitten, mit Phloxin-Tartrazin nach LENDRUM (s. u.) und mit WEIGERTS Fibrinmethode.

Weiterhin bestimmten wir den isoelektrischen Punkt (IEP) der Körnchen durch Methylenblaubindung bei abgestuftem p_H und zusätzlich den Umladebereich (ULB) fluoreszenzmikroskopisch mit dem Farbstoff Acridin-Orange nach STRUGGER und SCHÜMMELFEDER: wir färbten Schnittserien mit abgestuft gepufferten Acridin-Orangelösungen, wobei die Körnchenfärbung mit steigendem p_H-Wert allmählich von Grün in Orange übergang — der Farbumschlag ergab den Umladebereich.

Ergebnisse

Die schon früher durchgeprüften *unspezifischen Färbungen* seien hier noch einmal kurz zusammengefaßt:

Die Körnchenzellen färben sich nicht an bzw. heben sich nicht vom gleichfarbigen Cytoplasma ab mit: Hämatoxylin-Eosin, HEIDENHAIN'S Eisen-Hämatoxylin, Azur-Eosin, VAN GIESON'S Pikrinsäure-Fuchsin, MASSON'S Trichromfärbung, Phloxin-Hämatoxylin, Methylviolet, Alcianblau, MAY-GRÜNWALD-GIEMSA-Färbung, Silberimprägnationsmethoden nach BODIAN und MASSON; Oxydasereaktionen.

Sie lassen sich kontrastreich anfärben mit: LENDRUM'S Phloxin-Tartrazin, WEIGERTS Fibrinmethode, GRAM-Färbung, Färbung nach DOMINICI.

Die schon zum Teil früher durchgeführten und jetzt weiter ergänzten *histochemischen Untersuchungen* sind in folgender Übersicht zusammengestellt:

A. Fette und Lipide:

1. Neutralfette, Lipoproteide:

Sudan III: negativ
Sudanschwarz: negativ

2. Phosphatide:

Luxolblau¹: negativ

B. Kohlenhydrate:

PAS-Reaktion: mit und ohne Diastase negativ

Bauer-Feulgen-Reaktion: negativ

Best's Carmin: negativ

C. Proteide:

1. Saure Mucopolysaccharide:

PAS-Reaktion: negativ

Metachromasie (Methylviolet, Toluidinblau², FEYRTERS Thionin): negativ

Basophilie mit Methylenblau: negativ

Alcianblau: negativ

¹ 0,1% Luxol fast blue in 96% Alkohol, 6 Std bei 58°; 1% wäbriges Neutralrot 30 min; aufsteigende Alkoholreihe; Xylol; Balsam (s. PEARSE 1955).

² Nach Fixierung sowohl in Formalin als auch in Bleiacetat.

2. *Neutrale Mucopolysaccharide:*

PAS-Reaktion: negativ

3. *Nucleinsäuren:*a) *Desoxyribosenucleinsäuren:*

Feulgen-Reaktion: negativ

Basophilie mit Methylenblau: negativ

b) *Ribosenucleinsäuren:*

Methylgrün-Pyronin: negativ

D. *Proteine:*

Tetrazonium-Reaktion: positiv

Phloxin-Tartrazin: positiv

WEIGERTS Fibrinmethode: positiv

SH-Gruppen:

Aldehyd-Fuchsin (nach HALMI): negativ

Aus den bisher durchgeführten histochemischen Versuchen geht hervor, daß die Granula der Körnchenzellen aus Proteinen ohne charakteristische prosthetische Gruppen aufgebaut sind. Bei dem Mangel an geeigneten histochemischen Methoden zur eindeutigen Klärung der Zusammensetzung derartiger Eiweißstoffe haben wir zunächst physikalische und physikochemische Eigenschaften der Körnchensubstanz geprüft. So bestimmten wir den IEP und das Verhalten der Körnchen bei chemischer Hydrolyse und enzymatischer Eiweißaufspaltung.

Tabelle 1. *Chemische Löslichkeit der Körnchen*

Lösung	Körnchen nach					
	1 Std	2 Std	4 Std	8 Std	16 Std	24 Std
1 n/10 HCl	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
2 n/10 KOH	unverändert	unverändert	unverändert	bei Tartrazinfärbung: Verlust der Phloxinophilie; mit WEIGERTS Fibrin unverändert	wie nach 8 Std	wie nach 8 Std
3 Na_2CO_3	} Zeitpunkt der Gewebsauflösung					
a) 0,1 m bei 20°						
b) 0,5 m } bei 20° 1,0 m } konz. }						
c) 0,5 m } bei 37° 1,0 m } konz. }						
d) 0,5 m } bei 60° 1,0 m } konz. }						
	bis 21 Std: unverändert	bis 6 Std: unverändert	bis 80 min: unverändert	bis 1 min: unverändert		

Physikalische Eigenschaften

A. Bestimmung des isoelektrischen Punktes. 1. Durch Methylenblaubindung bei abgestuftem p_H (s. PEARSE): IEP bei p_H 4,09. 2. Fluoreszenzmikroskopisch mit Acridinorange: ULB bei p_H 3,5—4,6; IEP_M bei p_H 4,06.

B. Löslichkeit. Das Verhalten der Körnchen nach verschieden langer Einwirkung saurer und alkalischer Lösungen ist aus Tabelle 1 zu ersehen.

C. Enzymatische Hydrolyse. Die Einwirkung verschiedener Fermente auf Gewebe und Körnchen ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Bemerkenswert erschien uns im Laufe der enzymatischen Hydrolyse, daß die Körnchen, die sich bei nachfolgender Färbung mit Phloxin-Tartrazin weder in Farbe noch in Form änderten, mit zunehmender Abblässung des umliegenden Gewebes sich immer kontrastreicher vom blassen

Tabelle 2. *Enzymatische Hydrolyse der Körnchen*

Enzym	Körnchen nach				
	1 Std	4 Std	10 Std	20 Std	48 Std
1. Pepsin	unverändert	unverändert	unverändert	Gewebsauflösung	
2. Papain a) bei 20° b) bei 37°	unverändert unverändert	unverändert unverändert	unverändert unverändert	unverändert; unverändert; beginnende Gewebsauflösung	unverändert; unverändert; Gewebsauflösung
3. Trypsin	unverändert	unverändert	unverändert; Gewebsauflösung		
4. Pankreatin a) bei 20° b) bei 37°	unverändert unverändert	unverändert; beginnende Gewebsauflösung	unverändert Gewebsauflösung komplett; Körnchen isoliert erhalten		
5. Hyaluronidase	unverändert	unverändert	unverändert	24 Std: unverändert, beginnende Gewebsauflösung	
6. Pektinase	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	

Untergrund abhoben. Diese enzymatische Vorbehandlung erscheint zur Darstellung der Körnchenzellen mit der Tartrazinmethode sogar sehr ratsam, wenn man besonders klare Bilder erzielen will, z. B. zu Zwecken der Photographie (s. Abb. 1).

Die besten Ergebnisse in dieser Hinsicht erzielten wir bei folgender Dosierung der enzymatischen Hydrolyse, die wir daher hier als Ab-

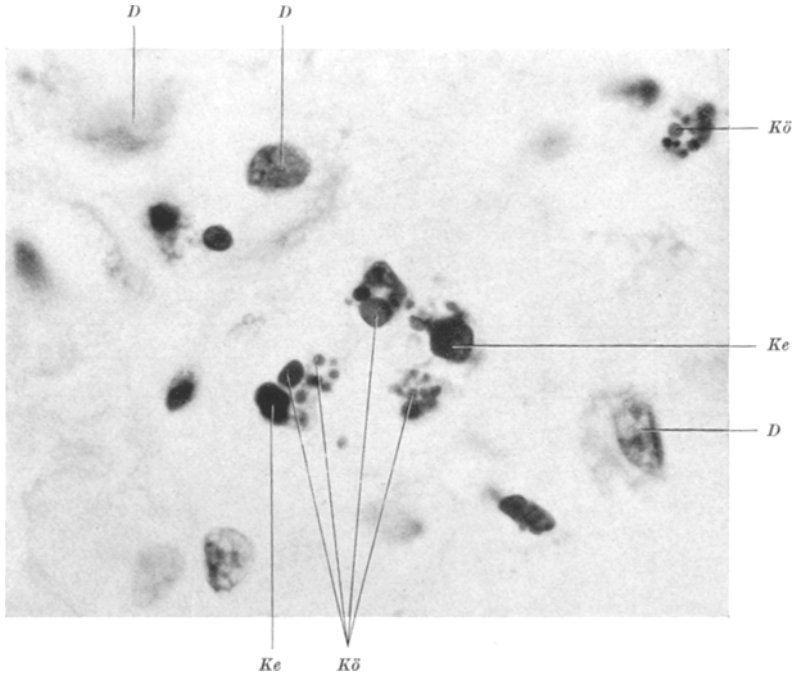


Abb. 1. Decidua. Phloxin-Tartrazin-Färbung nach 10stündiger Vorbehandlung mit Papain bei 20°. *D* Deciduazellen; *Ke* Kerne der Körnchenzellen; *Kö* Körnchen

wandlung der Tartrazinmethode zur Darstellung der endometrialen Körnchenzellen vorschlagen möchten:

1. Entparaffinierte Schnitte werden bei Zimmertemperatur 10 Std lang in folgende Lösung eingestellt: 1 g Papain 1:350 gelöst in 100,0 cm³ isotonischer Phosphatpufferlösung (nach v. MURALT), eingestellt auf pH 8,0.

2. Abspülen in Aq. dest.

3. Man schließt nun die Phloxin-Tartrazinfärbung nach LENDRUM an [s. HELLWEG, Arch. f. Gyn. 185, 150, (1954)].

Selbst nach weitgehender Zell- und Gewebsauflösung, wie sie z. B. nach 10stündiger Einwirkung von Pankreatin bei 37° erreicht war

(s. Tabelle 2), ließen sich die Körnchen isoliert, also außerhalb von Zellen, oft noch in Gruppen nachweisen (s. Abb. 2).

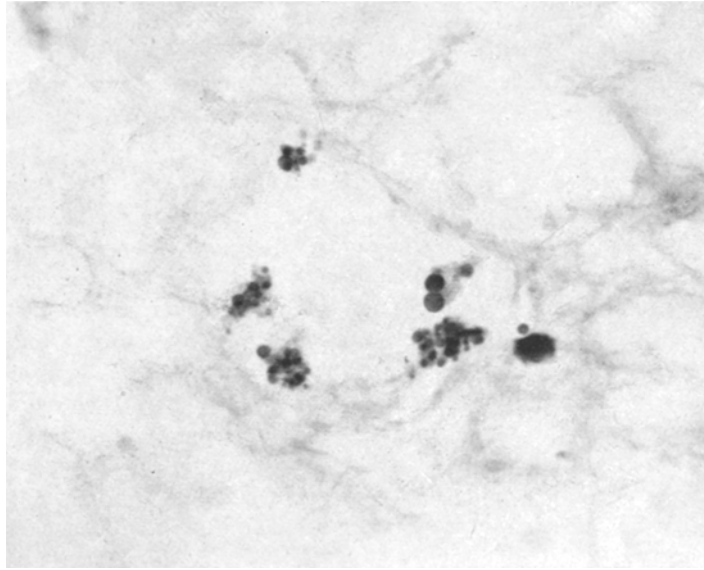


Abb. 2. Decidua (gleicher Fall wie Abb. 1). Phloxin-Tartrazin-Färbung nach 10stündiger Einwirkung von Pankreatin bei 37°: Zellen und Gewebe aufgelöst, Körnchen der Körnchenzellen isoliert erhalten

Besprechung

Die hier zusammengestellten Ergebnisse, zusammen mit den morphologischen Befunden, ermöglichen zunächst die Abgrenzung der Körnchenzellen von den im Endometrium vorkommenden ähnlichen Zellarten.

Von den *Neutrophilen* und *eosinophilen Leukocyten* lassen sich die Körnchenzellen einerseits morphologisch unterscheiden durch ihre eigentümlichen, bei Leukocyten nie beobachteten Kernformen, andererseits durch das Fehlen der Oxydasereaktion. Um *Plasmazellen* oder *RUSSELLsche Körperchen* kann es sich nicht handeln wiederum der bizarren Kernformen wegen, außerdem färben sich die Körnchenzellen weder mit Methylgrün-Pyronin noch mit Pikrinsäure (*VAN GIESON*). Die Abgrenzung von den *Mastzellen* gelingt einmal schon durch die meist viel kleinere Zahl der Körnchen in den Körnchenzellen, andererseits durch die fehlende Metachromasie, Basophilie sowie Färbbarkeit mit Aldehyd-Fuchsin. Etwas schwieriger erscheint zunächst die Unterscheidung der Körnchenzellen von den *Lymphocyten*, doch zeigt der Kern

der Körnchenzellen bei näherer Betrachtung eine mehr homogene Chromatinanordnung und erinnert in der Form nur gelegentlich an den Lymphocytenkern, auch sind die vorwiegend vorkommenden bizarren Formen der Körnchenzellkerne bei Lymphocyten nie beobachtet worden. Weiterhin lassen sich die Körnchen der Körnchenzellen nicht mit der MAY-GRÜNWALD-GIEMSA-Färbung darstellen, wodurch sie sich neben ihrer anderen Gestalt auch färbereich von den Azurgranula der Lymphocyten abtrennen lassen.

Es kann sich also bei den Körnchenzellen um keine der bekannten, im Endometrium gelegentlich vorkommenden Zellarten handeln. *Vielmehr muß eine besondere Zellart vorliegen, die durch das Auftreten von Proteinkörnchen im Cytoplasma charakterisiert wird.* Durch die histochemischen Untersuchungen können wir zunächst ausschließen, daß es sich bei diesen Körnchen um Bestandteile des Kerns handelt (negative Feulgen-Reaktion, fehlende Basophilie). Die Eiweißstoffe der Körnchen verhalten sich nach den Ergebnissen der Lösungsversuche und der histoenzymatischen Untersuchungen auch deutlich andersartig als das Cytoplasma der Zellen. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es sich um unverändertes, nur kondensiertes oder ausgefälltes Cytoplasmaweiß handelt. Es ist auch wenig wahrscheinlich, daß die Körnchen aus Cytoplasmaweiß und einer zweiten Substanz zusammengesetzt sind, denn es wäre dann der Anteil an Cytoplasmaweiß in den Fermenttesten herausgelöst worden. Es ergab sich aber trotz weitgehender Auflösung der Zellen hier eine vollkommene Erhaltung der Körnchenform und -färbbarkeit (s. Abb. 2). Die Körnchensubstanz unterscheidet sich also sehr erheblich vom Cytoplasma der Körnchenzellen. Da die Körnchen nach Behandlung mit Pektinase unverändert erhalten blieben, kann ihr GRAM-positives Verhalten auch nicht durch Pektine bedingt sein, wie sie z. B. in Bakterienhüllen enthalten sein können. Es handelt sich vielmehr um Eiweißgranula eigener Art, wie sie bisher in anderen granulierten Zellen des menschlichen Organismus, insbesondere den verschiedenen weißen Blutzellen und denjenigen Gewebszellen mit typischer cytoplasmatischer Granula (z. B. Mastzellen) nicht beobachtet wurden. Die bisherigen histochemischen und physikochemischen Untersuchungen haben also unsere früheren morphologischen Beobachtungen in dieser Hinsicht bestätigt. — Ob diese spezifische Eiweißsubstanz der Körnchen aktiv vom Cytoplasma synthetisiert oder von außen in die Zelle aufgenommen wird, läßt sich noch nicht sicher entscheiden. Eine weitere Klärung ihres Aufbaues ist noch am ehesten durch elektronenmikroskopische und weitere histochemische Untersuchungen sowie von einer Bausteinanalyse zu erwarten.

Die Erforschung dieser eigentümlichen neuen Zellart im Stroma des Endometriums ist also sicherlich noch nicht abgeschlossen. Trotzdem hat unseres Erachtens die oben gegebene Abgrenzung von ähnlichen Zellarten schon heute eine große praktische Bedeutung. Es unterliegt wohl kaum einem Zweifel, daß die endometrialen Körnchenzellen bisher je nach ihrer Kernform entweder für Leukocyten oder Lymphocyten angesehen wurden; ihr reichlicheres Auftreten mußte somit zwangsläufig zur Diagnose akute oder chronische Endometritis verleiten. Ist man einmal mit den hier geschilderten Besonderheiten dieser Zellen vertraut geworden, dann wird man diese Diagnose weitaus vorsichtiger stellen und sie auf diejenigen Fälle beschränken, bei denen man neutrophil leukocytaire Infiltrate um oder in Drüsen findet oder wo herdförmige Ansammlungen von Lymphocyten *und* Plasmazellen nachzuweisen sind, womöglich mit Zerstörung des Drüsenepithel (die Körnchenzellen können das Drüsenepithel zwar durchwandern, zerstören es aber nicht).

Zusammenfassung

Im Stroma des menschlichen Endometriums kommen vorwiegend während der Sekretionsphase neben den großen, pseudodecidualen Stromazellen sehr kennzeichnende kleine Zellen vor, die 1954 von HAMPERL als endometriale Körnchenzellen bezeichnet wurden. Physikochemisches Verhalten und chemische Zusammensetzung der in ihnen enthaltenen Körnchen wurden näher untersucht.

Fette, Lipotide, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren, saure und neutrale Mucopolysaccharide konnten als Bestandteile ausgeschlossen werden, dagegen gelang es, Proteine ohne charakteristische prosthetische Gruppen in ihnen nachzuweisen. Der isoelektrische Punkt der Körnchen liegt bei 4,09. Gegen chemische Hydrolyse und enzymatische Eiweißaufspaltung erwiesen sie sich als sehr viel stabiler und somit andersartig als das sie umgebende Gewebe sowie Kern und Cytoplasma der Körnchenzellen.

Die endometrialen Körnchenzellen stellen somit eine besondere Zellart dar, die durch das Auftreten von spezifischen Proteinkörnchen im Cytoplasma charakterisiert ist. Von den an gleicher Stelle gelegentlich vorkommenden neutrophilen und eosinophilen Leukocyten, Plasmazellen, Mastzellen und Lymphocyten lassen sie sich sowohl morphologisch als auch histo- und physikochemisch abtrennen, was unter anderem bei der Diagnose „Endometritis“ bedeutsam wird.

Zur besonders kontrastreichen Darstellung der Körnchenzellen mit der Phloxin-Tartrazinfärbung nach LENDRUM wird eine Abwandlung dieser Methode durch Vorbehandlung mit Papain angegeben.

Literatur

HALMI, N. S.: Stain Technol. **27**, 61 (1952). — HAMPERL, H.: Klin. Wschr. **1954**, 665. — J. of Path. **69**, 358 (1955). — HELLWEG, G.: Arch. Gynäk. **185**, 150 (1954). — Geburtsh. u. Frauenheilk. **15**, 521 (1955). — LENDRUM, A. C.: J. of Path. **59**, 399 (1947). — MURALT, A. v.: Praktische Physiologie. Berlin: Springer 1944. — PEARSE, E.: Stain Technol. **25**, 95 (1950). — Histochemistry. Boston: Little, Brown & Company 1953. — J. of Path. **70**, 554 (1955). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948. — SCHÜMMELFEDER, N.: Naturwiss. **35**, 346 (1948); **36**, 58 (1949). — Virchows Arch. **318**, 119 (1950). — Z. Zellforsch. **44**, 327, 488 (1956). — STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover: M. u. H. Schaper 1949.

Dr. GISELA HELLWEG, Pathologisches Institut der Universität Bonn
