

Aus dem Pathologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena
(Direktor: Prof. Dr. med. F. BOLCK)

Über die histochemischen Eigenschaften der Mucostoffe in Gallertcarcinomen des Magens

Von

D. STILLER und I. STILLER

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1963)

Die epithelialen Schleimstoffe im Bereiche des Verdauungskanalns lassen sich unter orthologischen Bedingungen auf Grund ihrer chemischen und ihrer histochemischen Eigenschaften in mehreren Gruppe einteilen, die bestimmten organischen Funktionseinheiten zugeordnet werden können. Histochemisch sind hier in erster Linie neutrale und saure Mucopolysaccharide zu unterscheiden, wobei letztere mittels verschiedener Methoden in sulfat- und carboxylgruppenhaltige Schleimstoffe zu differenzieren sind.

Obwohl die Schleimbildung in Carcinomen des Magens so stark ausgeprägt sein kann, daß große Teile der Geschwulst von gallertigen, bzw. gelatinösen Massen durchsetzt werden, liegen bisher genauere Kenntnisse über die histotopochemischen Eigenschaften dieser Mucostoffe nicht vor. Die Frage nach der Charakteristik der unter den Bedingungen des autonomen Wachstums gebildeten Mucine in Relation zum Ausgangsgewebe ist im Hinblick auf den stattgefundenen Formen- und Funktionswandel von besonderem Interesse.

LAURÉN erwähnt ein unterschiedliches Verhalten der dort gebildeten Mucostoffe bei Anwendung der Alcianblaufärbung. Im Rahmen einer Diskussion über die Frühdiagnose des Magencarcinoms wurde die Bildung alcianophiler Mucopolysaccharide in einem Teil der Magencarcinome erwähnt (SCHADE, FASSKE). Systematische histochemische Untersuchungen wurden bisher nicht durchgeführt.

Eigenes Untersuchungsgut und Aufarbeitung. Zur Untersuchung gelangten zehn sog. Gallertcarcinome des Magens. Das Material wurde größtenteils in neutralem Formalin (4%ig), in einigen Fällen außerdem in Carnoyscher Flüssigkeit oder in Formol-Alkohol nach SCHAEFFER fixiert. Aufarbeitung in üblicher Weise.

Mikroskopisch-anatomisch handelt es sich bei dem vorliegenden Material zum Teil um drüsig-wachsende, zylinderzellige Krebse mit erheblicher cystischer Erweiterung der Drüsen und abschnittsweiser Ausbildung gallertiger Strukturen (3 Fälle) oder mit teilweise in Strängen wachsenden unregelmäßigen Drüsen (1 Fall). Demgegenüber stehen die Carcinome, die überwiegend aus Siegelringzellen bestehen und teilweise eine disseminierte Ausbreitung erkennen lassen (2 Fälle) oder in alveolär verschleimten Nestern einzelne Zellen oder Zellgruppen aufweisen. Letztere bilden in den Randgebieten häufig solide Nester. Die Zellen zeigen hier unterschiedlich große Vacuolen (4 Fälle).

Histochemische Methodik. Zur Differenzierung der Schleimmassen wurden die verschiedenen im Text erwähnten histochemischen Reaktionen und Färbungen herangezogen.

Ergebnisse

PAS-Reaktion und HE-Färbung verhalten sich wie Positiv und Negativ zueinander. Die hochgradig cystisch-erweiterten Krebsdrüsen und die Schleimalveolen sind mit kräftig rot bis dunkelviolettfarbigem Material angefüllt, das

teils homogen, teils fädig dargestellt ist (Abb. 1, 2 und 3). In den Tumorzellen erkennt man sämtliche Übergangsstufen zwischen einer blaßroten bis zu einer dunkelvioletten Färbung. Die Polysaccharide treten als Granula, Tröpfchen oder Vacuolen hervor, wobei letztere am kräftigsten reagieren, während die Granula

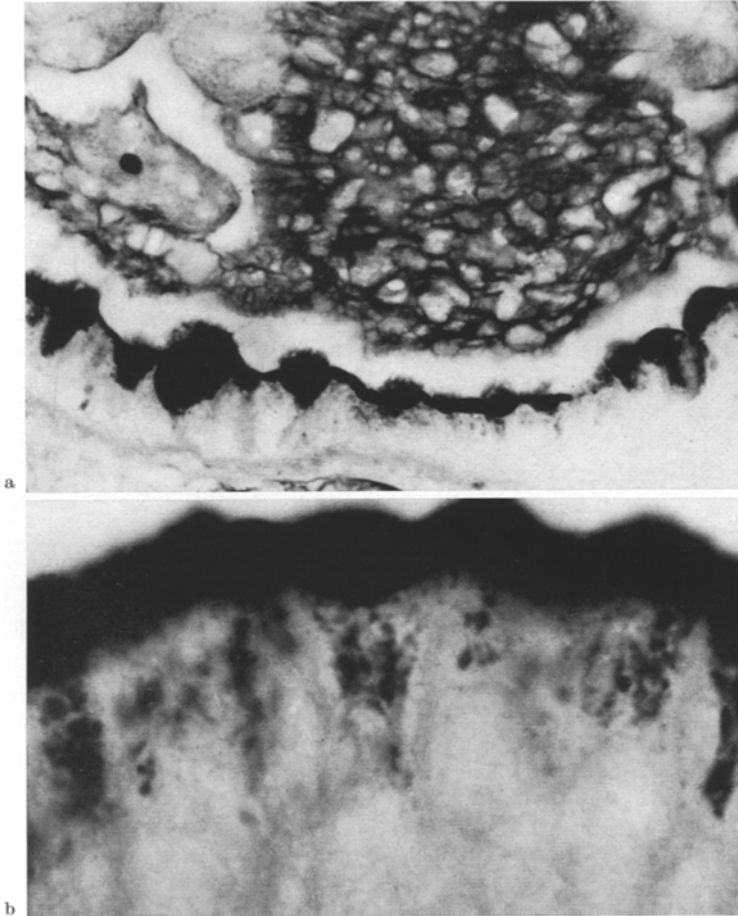


Abb. 1. a Teilweise drüsig wachsendes Gallertcarcinom. Kräftig PAS-positive extracelluläre Schleim-massen sowie polare Anordnung der Polysaccharide in den Krebszellen. Ausbildung becherzellähnlicher Strukturen. PAS-Reaktion nach Speicheleinwirkung. Vergr. etwa 400fach. b PAS-positives Material in Form von Granula und Tröpfchen oberhalb der Zellkerne; das Krebsdrüsenlumen beschließt ein kräftig gefärbter Saum. PAS-Reaktion nach Speicheleinwirkung. Vergr. etwa 1500fach

meist nur schwach gefärbt sind. Andere Zellen verfügen wiederum nur über eine diffuse, schwache bis mittelkräftige Rotfärbung und enthalten außerdem oft eine oder mehrere kräftig positive Vacuolen. In den drüsigen Anteilen erscheint das Material in einem Teil der Tumorzellen polar angeordnet, indem oberhalb des Zellkernes, in Richtung auf das Drüsenlumen, das positiv reagierende Material dargestellt wird. Andere Zellen offenbaren becherzellähnliche Strukturen mit großen kräftig positiven Vacuolen (Abb. 1). Die Mehrzahl der Zellen zeigt jedoch keine polare Anordnung der Substanzen, insbesondere im Bereiche der Epithel- und Adventivknospen. In den in Nestern wachsenden Krebsen findet man das

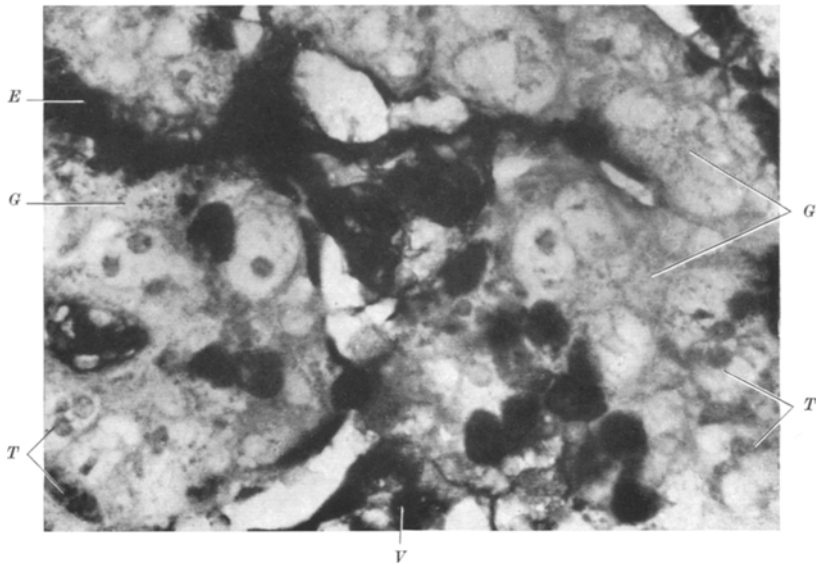


Abb. 2. Randabschnitt eines überwiegend in soliden Nestern wachsenden Gallertcarcinoms. Regellose Anordnung des PAS-positiven Materials in den Krebszellen als Granula (G), Tröpfchen (T) oder Vacuolen (V) sowie teilweise mittelkräftige diffuse Reaktion im Cytoplasma einzelner Zellen. E extracelluläre Schleimmassen, PAS-Reaktion nach Speicheleinwirkung, Vergr. etwa 400fach

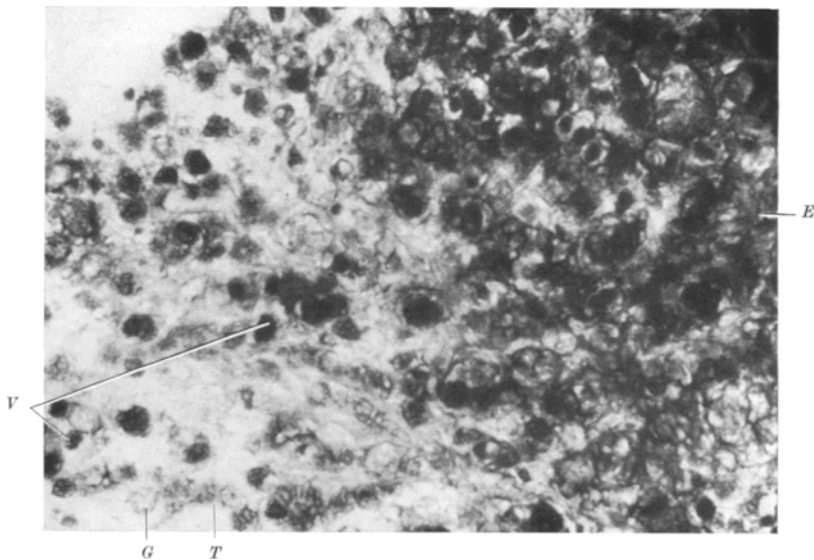


Abb. 3. Überwiegend diffus wachsendes Gallertcarcinom mit zahlreichen kräftig PAS-positiven Siegelringzellen (V) und Zellen mit schwach bis mittelkräftig gefärbten Granula (G) und Tröpfchen (T). In der rechten Bildhälfte zunehmende Verschleimung (E); PAS-Reaktion nach Speicheleinwirkung, Vergr. etwa 200fach

Material in ähnlicher Form, aber völlig regellos angeordnet (Abb. 2). Die Siegelringzellen führen überwiegend tief dunkelviolettfärbte Vacuolen und zeigen einen schmalen halbmondförmigen ungefärbten Cytoplasmasaum (Abb. 3). Zwischen PAS- und Speichel-PAS-Reaktion bestehen keine Unterschiede; lediglich in einem Fall kann man in den soliden Nestern zarte Glykogengranula feststellen.

Die zur Kontrolle der PAS-Reaktion ausgeführte reversible Acetylierungsreaktion nach McMANUS und CASON führt in der ersten Stufe in sämtlichen Schnitten zu einer vollständigen Blockierung der PAS-Reaktion, wogegen nach Entacetylierung wieder eine kräftige Rotfärbung eintritt. Die Darstellung der Schleimsubstanzen war nach letzterer Reaktionsstufe nicht so deutlich wie ursprünglich und außerdem war abschnittsweise eine Abschwächung der Färbung zu verzeichnen.

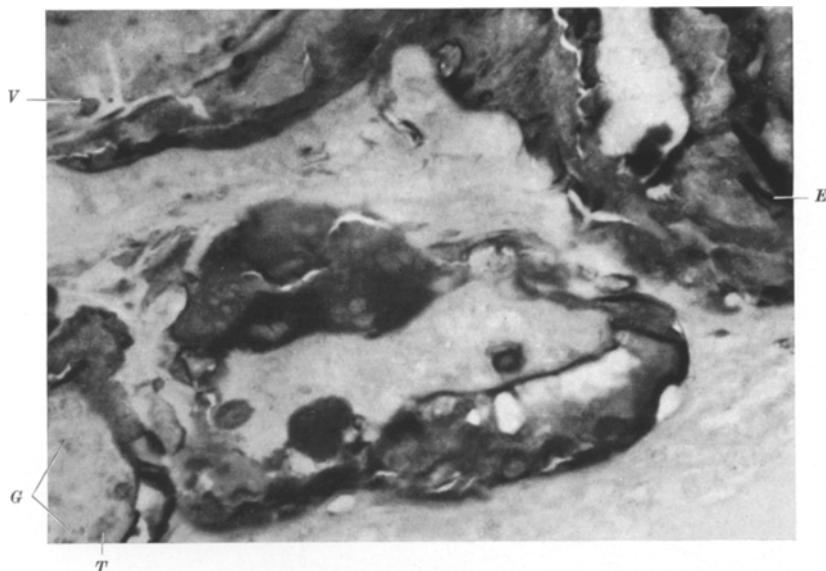


Abb. 4. Hale-Reaktion (Modifikation von G. MÜLLER), gleicher Tumor wie in Abb. 2. Die extracellulären Schleimmassen (E) reagieren sehr kräftig. In den Zellen erkennt man Granula (G), Tröpfchen (T) und Vacuolen (V). Vergr. etwa 200fach

Die *BTS-Reaktion* wurde in der Modifikation nach GRAUMANN durchgeführt, da diese am deutlichsten die Unterschiede zur PAS-Reaktion offenbart. Im Prinzip hat sich an der Verteilung der positiv-reagierenden Substanzen nichts geändert. Die Substanzen sind extracellulär kräftiger dargestellt, indem der weit-aus größere Teil eine dunkelviolette Färbung aufweist. Das gleiche trifft auch für die intracellulär liegenden Mucostoffe zu; insbesondere die größeren Vacuolen verfügen über sehr kräftig positive Substanzen. Die Speicheleinwirkung bringt keine Unterschiede zur PAS-Reaktion, so daß bis auf einen Fall in den Gallertcarcinomen kein Glykogen histotopochemisch nachweisbar war.

Die ursprünglich zum Glykogenachweis von BAUER eingeführte *Chromsäureoxydationstechnik* erzeugt in den Schleimalveolen eine mäßig- bis mittelkräftige Rotfärbung. In den Zellen reagieren in sehr geringem Maße Tröpfchen und Vacuolen in schwächerer Intensität. Glykogen kommt mit dieser Methode in den vorliegenden Carcinomen nicht zur Darstellung.

Die *kolloidale Eisenbindungsreaktion nach HALE* in der Modifikation von G. MÜLLER eignet sich sehr gut zur Darstellung saurer Gewebekomponenten. Mit dieser Modifikation findet man sowohl in den Tumorzellen als auch in den Schleimalveolen ein kräftig dunkelblau gefärbtes Material. In den alveolären Abschnitten liegen die Substanzen entweder diffus oder in fädiger Form vor.

In den Zellen erkennt man Granula, Tröpfchen und Vacuolen (Abb. 4). Es lassen sich Übergangsstufen zwischen blaßblau reagierenden Substanzen bis zu einer tief dunkelblauen Reaktion verfolgen. In den Zellen der drüsig wachsenden Anteile trifft man teilweise eine polare Anordnung der positiv reagierenden Substanzen an, indem auch hier oberhalb des Zellkernes schwach bis mittelkräftig gefärbte Granula zu sehen sind, die sich zu Tröpfchen und Vacuolen vergrößern. Dabei nimmt die Intensität der Reaktion erheblich zu. Andere Zellen führen

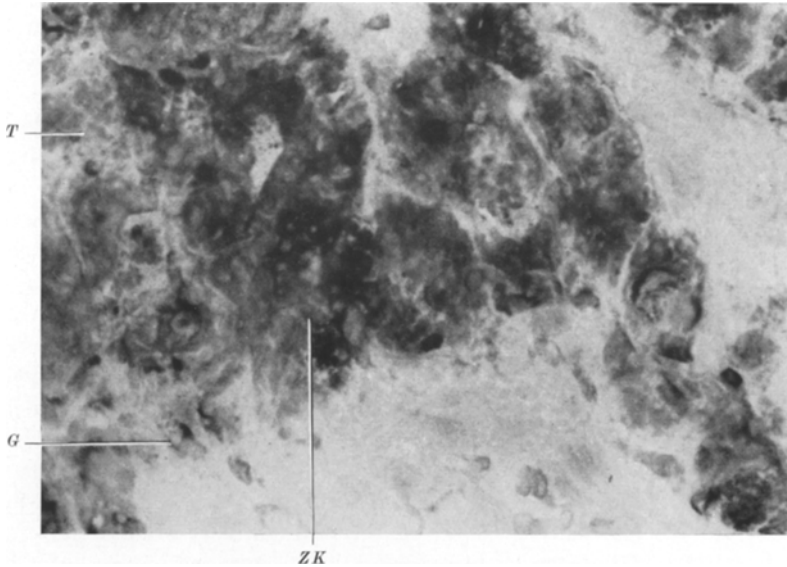


Abb. 5. Hale-Reaktion (Modifikation von G. MÜLLER); diffus wachsendes Gallertcarcinom. Die Krebszellen enthalten das positive Material in Form von Granula (G) und Tröpfchen (T). In den kräftig positiven extracellulären Schleimmassen findet man sehr kräftig reagierende Zellkomplexe (ZK). Fixation: Carnoy'sche Flüssigkeit, Vergr. etwa 200fach

nur dunkelblau gefärbte Vacuolen, die oberhalb der Zellkerne liegen. Außerdem findet man Zellen mit einer diffusen mittelkräftigen Blaufärbung oder regellos angeordneten Granula und Vacuolen.

Die Vacuolen der Siegelringzellen sind vorwiegend dunkelblau dargestellt. In den Randabschnitten erkennt man auch in diesen Fällen Zellen mit mittelkräftig blau gefärbten Granula, die sich teilweise gegen einen blaßblau getönten Untergrund abheben. Das Cytoplasma der Tumorzellen reagiert in der Regel blaß blaugrün. Die Zellkerne treten ebenfalls schwach gefärbt hervor.

Führt man entsprechend der Modifikation von GRAUMANN-CLAUSS eine Hydrolyse mit $n\text{-HCl}$ zur Extraktion der RNS durch und verwendet die etwas stärker angesäuerte Reagenslösung, so erzielt man eine distinkte Darstellung der positiv reagierenden Substanzen. Entsprechend der Hale-Reaktion trifft man in den Schleimalveolen und in den Tumorzellen auf kräftig blau gefärbte Substanzen. An der Reaktion der extracellulären Schleimstoffe ist keine Änderung eingetreten, während in den Carcinomzellen eine brillante, kontrastreiche Verteilung des Materials in Form von Granula, Tröpfchen und Vacuolen, die sich gegen das ungefärbte Cytoplasma deutlich abheben, angetroffen wird. Wendet man in einer weiteren Versuchsserie RNase zur Einengung der Hale-Reaktion an, so ändert

sich das Verhalten der extracellulär liegenden Substanzen nicht. Dagegen sind im Vergleich zur Graumann-Claus-Modifikation intracellulär Unterschiede zu verzeichnen. Obwohl die Reaktion im Cytoplasma der Carcinomzellen weitgehend eingeengt wird, ist die Darstellung der Substanzen nicht so distinkt. Man findet zwar das Material in gleicher Verteilung, jedoch sieht man in der Umgebung der Granula und Tröpfchen eine schwache diffuse oder feingranuläre Reaktion. Dadurch kommen fließende Übergänge zustande, so daß man oft die oben beschriebenen Granula und Tröpfchen in einem diffus blau gefärbten Zellabschnitt erkennt. Offenbar werden durch die Salzsäureeinwirkung neben RNS weniger polymerisierte Mucopolysaccharide hydrolysiert. Einen allmählichen Übergang zwischen neutralen und sauren Mucostoffen findet man auch mit der *kombinierten Hale-PAS-Reaktion*. Diese Kombination beider Reaktionen liefert zwar farbkraftige Schnitte, ist aber naturgemäß mit den gleichen Nachteilen der Hale-Methode behaftet. Man kann saure Gewebssorte und neutrale Mucopolysaccharide nebeneinander in einem Gewebsschnitt sichtbar machen. Übergangsstufen zwischen einer kräftigen Blaufärbung stark sauer reagierenden Strukturen und rotgefärbten neutralen Mucopolysacchariden sind in vielfältigen Nuancen zwischen blauviolett und rotviolett vorhanden. Entsprechend den Ergebnissen der PAS- und Hale-Reaktion findet sich eine überwiegend violette Reaktion. Die Tumorzellen enthalten häufig kräftig blau-violette Tröpfchen und Vacuolen und werden von einem rötlich-violetten Material umgeben. Die kleinen Granula sind nicht so kräftig und eher in rötlichen Farbtönen dargestellt. Die Zellen der Drüsencarcinome lassen, soweit eine polare Anordnung des Materials vorliegt, meist eine weitere Untergliederung erkennen, indem oberhalb der Zellkerne vorwiegend rotes, teilweise leicht violett getöntes Material in diffuser oder feingranulärer Form zu beobachten ist, das in Richtung auf das Drüsenlumen in eine blauviolette Färbung übergeht. Mitunter erkennt man hier in der Nähe der Zellkerne in dem rot bis rotviolett reagierenden Material teils granuläre, teils fädige, kräftig blau gefärbte Strukturen, die lagemäßig einem Golgi-Apparat entsprechen könnten. Daneben trifft man hier auch auf Zellen, die nur violette Vacuolen aufweisen. Unter den Siegelringzellen der disseminiert wachsenden Krebse findet man verschiedene Zellpopulationen. Die Mehrzahl der Vacuolen reagiert tief violett. Vorwiegend in den Randgebieten trifft man Zellen mit großen Vacuolen an, die diffus rot reagieren und blau bis violett dargestellte Granula enthalten, neben Zellen mit kräftig violetten Tröpfchen, die von rötlich violetten Substanzen umgeben sind. In anderen Zellen ist die Abgrenzung gegen das umgebende Cytoplasma weniger deutlich. Auf diese Weise kann man sämtliche Übergänge zwischen zarten Ablagerungen bis zur Ausbildung kräftig positiver Siegelringzellen verfolgen. Die Tumorzellkomplexe in den alveolären Schleimmassen selbst zeigen häufig auf einem violett gefärbten Untergrund tiefblau fädige Massen. Außerdem gibt es Zellen, die lediglich über schwach bis kräftig rot reagierende Mucopolysaccharide verfügen.

Mit der *Alcianblaufärbung nach Mowry* erreicht man ähnliche Ergebnisse, wenn auch in den Tumorzellen die Färbung mitunter schwächer ist. Die extracellulären Schleimmassen sind kräftig blau dargestellt, meist fädig-schlierig. In den Tumorzellen erscheint das Material sowohl in granulärer als auch in vacuolärer Form, wobei in letzteren Strukturen meist eine kräftige Färbung zu sehen ist.

Die Verteilung entspricht in den einzelnen Carcinomen den bereits besprochenen Mustern. Die Vacuolen der Siegelringzellen enthalten meist Granula, fädige Massen oder werden von kräftig blaugefärbten Mucopolysacchariden völlig angefüllt (Abb. 6). Im allgemeinen werden im Vergleich zur Hale-Reaktion trotz der dort vorgenommenen Einengungsreaktionen hier in den Zellen weniger Substanzen erfaßt.

Eine sehr gute Darstellung liefert die *kombinierte Anwendung von Alcianblaufärbung und PAS-Reaktion*. Die extracellulären Mucopolysaccharide sind sehr kräftig violett gefärbt; der weitaus größte Teil zeigt eine homogene Reaktion,

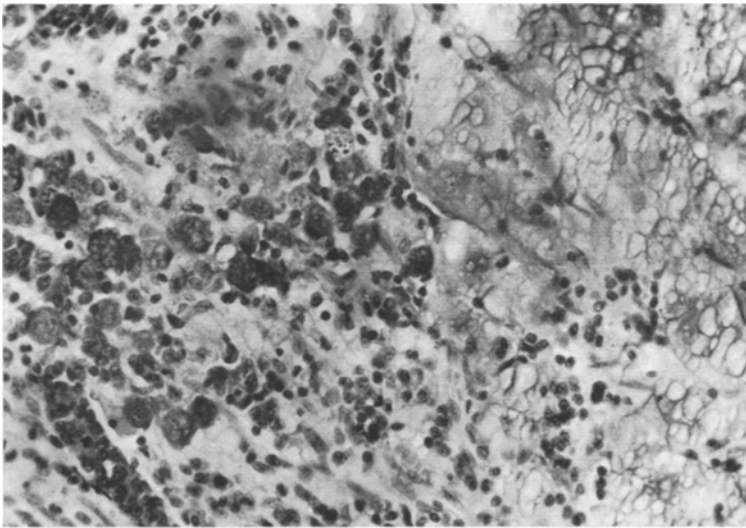


Abb. 6. Alcianblaufärbung; diffus wachsendes Gallertcarcinom mit kräftig gefärbten Siegelringzellen und mittelkräftig gefärbten, teilweise fädigen extracellulären Schleimmassen (rechte Bildhälfte). Fixierung: Formol-Alkohol. Kerne mit Kernechtrot gegengefärbt. Vergr. etwa 200fach

abschnittsweise kommen fädige blaue Massen hinzu. In einem Teil der Zellen finden sich vornehmlich in den größeren Tröpfchen und in den Vacuolen violette bis blau-violette Farbtöne, während gering rötlich-violett nuancierte Granula in anderen Zellen vorherrschen. Durch die Kombination kommen noch an Stellen, an denen mit der Alcianblaufärbung allein kein Erfolg erzielt werden konnte — offenbar weil die Reaktion infolge der geringen Mengen zu schwach ausfällt — Granula und Tröpfchen zur Darstellung, die sehr geringe Farbabstufungen von rot nach blau erkennen lassen. Darüber hinaus existieren Zellen mit nur PAS-positivem Material. Die Anordnung ist bei den Drüsencarcinomen wiederum teilweise polar. Nach dem Lumen hin verschiebt sich die Färbung zu violetten Tönen. In den anderen Carcinomen ist die Verteilung regellos. Die Siegelringzellen besitzen in der Mehrzahl violette Vacuolen. Hier sieht man auch in rot reagierenden Vacuolen alcianophile Granula und Tröpfchen. Einzelne Siegelringzellen verfügen nur über rot reagierende neutrale Mucopolysaccharide. Die *metachromatische Reaktion* mit einer 0,5%igen wäßrigen Toluidinblaulösung bedarf im Grunde genommen keiner weiteren Erörterungen, da sich die Ergebnisse in die bisherigen Befunde ohne Schwierigkeiten einordnen lassen. Sowohl die Mucine in den Carcinomzellen als auch in den gallertigen Strukturen zeigen eine

kräftige rote Metachromasie. Intracellulär kommen die kleineren Tröpfchen und Granula kaum zur Darstellung. Unterzieht man die Schnitte einer Behandlung mit *Aldehydfuchsin*, so treten herdförmig sowohl intra- als auch extracellulär Mucostoffe mittelkräftig bis kräftig gefärbt hervor, während abschnittsweise wiederum nur eine schwache Färbung oder ein negatives Verhalten zu verzeichnen ist (Abb. 7). Liegt in den Tumorzellen eine polare Anordnung der Substanzen vor, so erkennt man häufig nur einen schmalen, dem Drüsenlumen zugekehrten rotviolett gefärbten Saum. Andere Zellen verfügen über kräftig rotviolette Vacuolen. Die Siegelringzellen führen ebenfalls kräftig gefärbte Schleimstoffe. Besonders

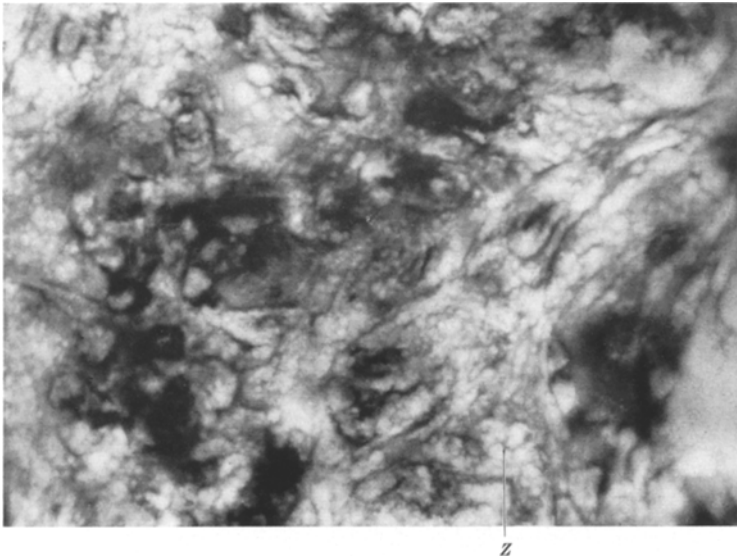


Abb. 7. Aldehydfuchsinfärbung (GOMORI) ohne Voroxydation; kräftig positive Schleimalveolen eines Gallertcarcinoms. Zellen ebenfalls kräftig angefärbt; Zellkerne ungefärbt (Z). Formalinfixierung. Vergr. etwa 400fach

stark gefärbt heben sich die Zellnester in den alveolären Schleimmassen ab. Im großen und ganzen sind die Vacuolen in den Tumorzellen gering kräftiger dargestellt als die extracellulären Schleimmassen. Kombiniert man Aldehydfuchsin- und Alcianblaufärbung, so erkennt man rotviolette Abschnitte und blauviolette Anteile. Letztere kommen offenbar durch die Überlagerung beider Färbungen zustande. Andere Teile, die sich bei der Aldehydfuchsinfärbung negativ verhalten haben, sind kräftig blau gefärbt. Die rot- und blauvioletten Anteile treten brillant hervor. In zahlreichen Tumorzellen findet man kräftig blau-violette Vacuolen. Daneben sieht man aber auch Tumorzellen mit nur alcianophilen Mucopolysacchariden. Insgesamt sind bei Kombination beider Färbungen größere Abschnitte der Carcinome gefärbt als bei Anwendung der Aldehydfuchsinfärbung allein. Vergleicht man diese Färbung mit dem Sulfonsäureverfahren nach GEYER, so ist festzustellen, daß sich die rotviolett dargestellten Anteile weitgehend mit den dort reagierenden Abschnitten überschneiden. Zuvor sind aber kurz die Ergebnisse der umgekehrten Färbungskombination (Alcianblau-Aldehydfuchsin) darzulegen. In dieser Doppelfärbung sind große Abschnitte kräftig blau gefärbt und die Aldehydfuchsinfärbung ist distinkt auf umschriebene Abschnitte be-

schränkt. Es handelt sich bei letzteren um die Anteile, die bei alleiniger Anwendung des Aldehydfuchsin kräftig rotviolett hervortreten. Eine Überlagerung, wie sie mit der vorhergehenden Kombination zu sehen war, ist nicht so ausgeprägt. An der Verteilung des Materials ist keine Änderung eingetreten.

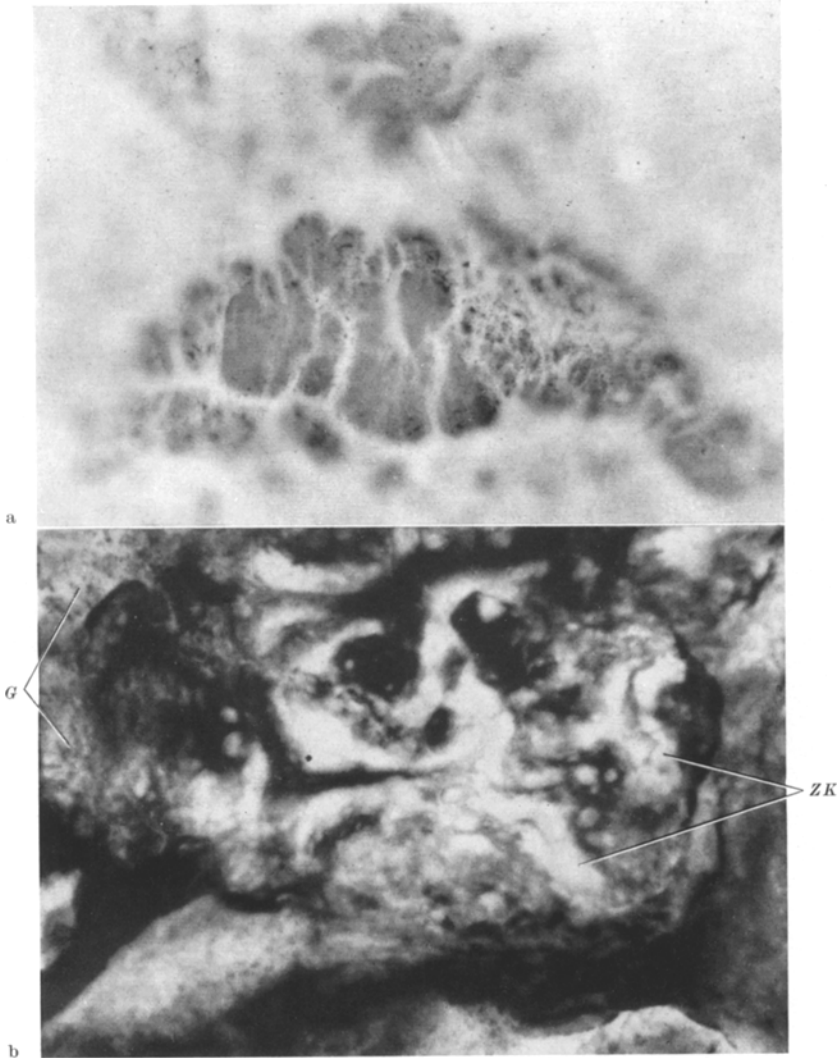


Abb. 8a u. b. Sulfonsäureverfahren nach GEYER. a Abschnittsweise mittelkräftige Reaktion der Schleimalveolen. In den Zellen kräftig reagierende Granula. Vergr. etwa 200fach. b Kräftig positiv reagierender Abschnitt eines Gallertcarcinoms. In den Zellen erkennt man Granula (G); einzelne Zellkomplexe (ZK) verhalten sich negativ. Fixierung: Carnoysche Flüssigkeit; Vergr. etwa 400fach

Das Sulfonsäureverfahren von GEYER, das auf der Bildung von Tetrazoniumsulfonaten aus einem tetrazotierten aromatischen Amin (Echtblausalz B) und deren Umwandlung in einen Azofarbstoff beruht, soll spezifisch für den Nachweis natürlich vorkommender oder durch Oxydation erzeugter Sulfonsäuren sein. Bis auf einen Fall zeigten die Carcinome eine positive Reaktion. Die extracellulären

Schleimmassen treten herdförmig teilweise kräftig gefärbt hervor (Abb. 8). Andere Abschnitte verfügen nur über eine angedeutete blaßviolette Tönung oder verhalten sich negativ. In den Zellen findet man blaß bis kräftig rotviolette Granula und Vacuolen. Die Verteilung entspricht dem bisher Gesagten, jedoch kommen insgesamt weit weniger Substanzen zur Darstellung als mit den bisher angewandten Methoden. Die prinzipielle Übereinstimmung mit der Aldehydfuchsfärbung wurde bereits erwähnt. Allerdings werden mit der Aldehydfuchsfärbung größere Anteile der Carcinome schwach gefärbt.

Zur Unterstützung der histochemischen Reaktionen wurde die *Basophilie* als relatives Maß des Säuregrades der Schleimsubstanzen herangezogen. Unter einem pH 4 werden neben Nucleinsäuren saure Mucopolysaccharide gefärbt. Eine Überlagerung beider Gewebskomponenten ließ sich in dem vorliegenden Material morphologisch leicht ausschließen. Bis zu einem pH 3,0 ließ sich eine deutliche Farbstoffbindung verfolgen, die topographisch auf die Abschnitte beschränkt war, die durch Aldehydfuchsfärbung und Sulfonsäureverfahren gekennzeichnet waren. Unter einem pH von 2,6 trat regelmäßig eine Auslöschung ein.

In dem vorliegenden Material waren nach *Methylierung* der Schnitte mit einem Methanol-Salzsäuregemisch (99:1, 1 Std bei 60° C) Hale-Reaktion, Alcianblau- und Aldehydfuchsfärbung sowie Sulfonsäureverfahren vollständig blockiert. Weiterhin ließ die PAS-Reaktion eine deutliche Abschwächung erkennen. Nach Entmethylierung (1% KOH in 80% igem Äthanol) war in sämtlichen Carcinomen das Geyersche Sulfonsäureverfahren negativ. Mit Aldehydfuchsin war lediglich in zwei Carcinomen eine äußerst schwache Färbung angedeutet, wogegen alcinophiles Material wieder in ausreichendem Maße nachweisbar war, wenn auch die Stärke der Färbung das ursprüngliche Ausmaß nicht wieder vollständig erreichte.

Besprechung der Ergebnisse

Aus den vorliegenden Befunden wird ersichtlich, daß in Gallertcarcinomen des Magens sowohl *neutrale* als auch *saure Schleime* gebildet werden, die neben *perjodsäure- und bleitetraacetatreaktiven Komponenten über Carboxyl- und Sulfatgruppen verfügen*.

Glykogen konnte lediglich in einem Gallertcarcinom nachgewiesen werden, wogegen in anderen histologischen Formen des Magencarcinoms unterschiedliche Mengen nachweisbar sind. Die Unterschiede der PAS- zur BTS-Reaktion sind vorerst nicht näher definierbar. Es konnte gezeigt werden, daß an verschiedenen Gewebssorten, die über saure Mucopolysaccharide verfügen, Komponenten vorhanden sind, die nicht oder nur schwach mit Perjodsäure, dagegen aber mit Bleitetraacetat kräftig reagieren, ohne daß zur Zeit zu entscheiden ist, ob dieser Reaktion sterische Faktoren (trans-Gruppen) oder die Spaltung von α -Hydroxycarboxylgruppen zugrunde liegen (STILLER). Vorerst kann nur der Unterschied zwischen beiden Reaktionen festgestellt werden, der sich in dem vorliegenden Material in einer kräftigeren Färbung der größeren Vacuolen und extracellulären Schleimmassen äußert. Bei Anwendung der Chromsäure als Oxydationsmittel werden offenbar die für Perjodsäure zugänglichen Gruppen ebenfalls oxydiert (LILLIE). Allerdings ist über den Ablauf dieser Reaktion nur sehr wenig bekannt. Sowohl Magencarcinome als auch das Oberflächenepithel der normalen Magen-

schleimhaut zeigen eine positive Bauer-Reaktion, die nicht auf Glykogen zurückzuführen ist.

Bedeutungsvoll im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sind die Einengungsreaktionen der Hale-Methode, da in Carcinomzellen RNS in erhöhtem Maße gefunden wird (CASPERSON). Sowohl die Graumann-Clauss-Modifikation als auch die Anwendung von RNase führen zu einem Verlust der diffusen Blaufärbung des Cytoplasma. Unterschiede treten in den Zellabschnitten zu Tage, in denen saure Mucopolysaccharide nachweisbar sind. Während mittels der Graumann-Clauss-Methode die Färbung distinkt auf umschriebene Zellabschnitte beschränkt ist, werden nach RNase-Extraktion in der Umgebung der kräftig positiven Granula und Vacuolen schwach bis mäßig positive Granula oder eine diffuse schwach positive Reaktion angetroffen. Sehr wahrscheinlich kommt es durch die Salzsäureeinwirkung zu einer geringgradigen, aber doch nachweisbaren Hydrolyse und Extraktion gewisser (weniger polymerisierter) Vorstufen der sauren Mucopolysaccharide, die an Epithelzellen unter orthologischen Bedingungen offenbar nicht ins Auge fällt. Vergleicht man beide Einengungsreaktionen der Hale-Methode mit der Alcianblaufärbung, so ist festzustellen, daß sich die extracellulären Schleimmassen sowie die größeren intracellulären Vacuolen kaum unterscheiden, wogegen kleinere Hale-positive Granula mit Alcianblau nicht zu erfassen sind. In der Kombination der PAS-Reaktion mit der Alcianblaufärbung sind diese Gewebssorte kräftig rot gefärbt, verfügen aber über eine leichte violette Nuancierung im Vergleich zur einfachen PAS-Reaktion, so daß man annehmen muß, daß die Alcianblaufärbung allein nicht für die Darstellung dieser Strukturen ausreicht. Man findet außer den färberisch unterschiedlich ausgeprägten gemeinsam vorkommenden PAS-positiven und alcianophilen Mucostoffen in sämtlichen Carcinomen noch Zellen, die lediglich über PAS-positives Material und damit über neutrale Mucopolysaccharide verfügen. Diese können in Form von Granula, Tröpfchen und Vacuolen vorliegen. Die entsprechende Kombination Hale-PAS-Reaktion, die naturgemäß die gleichen Mängel wie die Hale-Methode aufweist, zeigte ebenfalls Carcinomzellen mit kräftig rot gefärbten Polysacchariden.

Eine weitere Aufgliederung der carboxylgruppenhaltigen Komponenten konnte von uns leider nicht durchgeführt werden, da uns das Ferment Sialidase zur enzymatischen Extraktion von Sialinsäure nicht zur Verfügung stand.

Die Abgrenzung der Carboxylgruppen gegen sulfatierte Mucopolysaccharide konnte mittels der uns zur Verfügung stehenden histochemischen Methodik durchgeführt werden. Hier ist vor allen Dingen das 1962 von GEYER entwickelte Sulfonsäureverfahren zu nennen. Eine positive Reaktion erstreckt sich nur auf umgrenzte Geschwulstabschnitte. In diesen trifft man positiv reagierende Substanzen sowohl in den Tumorzellen in Form von Granula, Tröpfchen und Vacuolen als auch außerhalb der Zellen als homogene, teils fädige Massen an. In völliger Übereinstimmung mit den bisher mitgeteilten histochemischen Eigenschaften sulfatierter Schleime steht auch hier das negative Verhalten der Mucine bei Anwendung des Sulfonsäureverfahrens in Verbindung mit der Methylierungs- und Demethylierungsreaktion.

Aldehydfuchsin färbt auch sulfatierte Mucopolysaccharide und andere sulfatierte Substanzen (durch Oxydation erzeugte Schwefelsäuregruppen) sowie Aldehyde. Behandelt man Schnitte, die nicht voroxydiert wurden, mit Aldehyd-

fuchsin, so ist vorwiegend mit einer Färbung sulfatierter Mucopolysaccharide zu rechnen (HALMI und DAVIES). Allerdings wenden KONEČNÝ und PLICZKA ein, daß neben Sulfatgruppen auch Carboxylgruppen reagieren könnten. Jedoch bestehen zwischen Alcianblau- und Aldehydfuchsinfärbung so beträchtliche Unterschiede, daß diese von SPICER und MEYER zur Abgrenzung stark saurer sulfatierter Mucostoffe von carboxylgruppenhaltigen (oder schwach sauren sulfatierten) Schleimschubstanzen durch Kombination beider Färbungen ausgenutzt wurden. In dem vorliegenden Untersuchungsmaterial decken sich Sulfonsäureverfahren und Aldehydfuchsinfärbung weitgehend, wobei mit letzterer Methode die positiv reagierenden Anteile nicht so herdförmig begrenzt sind. Die übrigen Abschnitte der Gallertcarcinome weisen eine sehr schwache rotviolette Färbung auf. Mit der kombinierten Alcianblau-Aldehydfuchsinfärbung tritt der herdförmige Charakter deutlicher zu Tage. Wendet man die Kombination im umgekehrten Sinne an, so werden diese Abschnitte farblich noch klarer getrennt. Auch bei diesen Färbungen weist die Anwendung der Methylierungs-Entmethylierungstechnik auf die Anfärbung von sulfatgruppenreichen Schleimstoffen hin. Daß durch Alcianblau im geringen Maße histochemisch sulfierte Polysaccharide darstellbar werden, wird aus dem Verhalten zahlreicher polysaccharidhaltiger Gewebekomponenten nach Sulfierung ersichtlich (SPICER), ohne daß aber die Stärke der Färbung erreicht wird, wie sie an anderen Strukturen gefunden wird.

Die Ergebnisse der Toluidinblauetachromasie und der Basophiliebestimmung mittels gestuft gepufferter Methylenblaulösungen stellen eine weitere Sicherung der Ergebnisse dar.

Das Verteilungsmuster der sulfatierten Mucine variiert im Magen-Darm-Kanal. Im Magenschleim waren einige sulfatierte Mucopolysaccharide in geringer Menge nachzuweisen. Neben Heparin fanden sich zwei weitere Gruppen, die offenbar zu den Chondroitinsulfaten gehören (SMITH, GALLOP, HARRITH-SMITH und STANLEY, SMITH und GALLOP). Inwieweit sich die Existenz der Mucoitinschwefelsäure (Polysaccharidketten aus Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin; MEYER, SMYTH und PALMER, WOLFROM und RICE, WERNER) aufrecht erhalten läßt, bedarf weiterer Untersuchungen. SMITH u. Mitarb. isolierten jedoch nur Heparin und Chondroitinschwefelsäure und bezweifeln das Vorkommen einer Substanz im Sinne der Mucoitinschwefelsäure als selbständige chemische Verbindung.

Das Magencarcinom nimmt seinen Ausgang von den Zellen der Indifferenzzone (BÜCHNER; KRAUSPE und GUSEK). Setzt man diese Angaben mit den hier erzielten Ergebnissen in Beziehung, so zeigt sich, daß in einer Gruppe von Magencarcinomen Mucostoffe gebildet werden, die qualitativ ihre histochemische Entsprechung in den für die Regeneration der Magenschleimhaut wichtigen Zonen hat. Die in den Gallertcarcinomen nachweisbaren Schleimqualitäten sind demzufolge nicht Ausdruck des autonomen Wachstums, sondern es handelt sich nur um eine *quantitative Störung, der offenbar eine intracelluläre Fermententgleisung zugrunde liegt*. Biochemische Untersuchungen haben wiederholt gezeigt, daß sich Tumorzellen weder in ihrer stofflichen noch enzymatischen Ausstattung prinzipiell von ihrem Ausgangsgewebe unterscheiden (GREENSTEIN, BUTENANDT und DANNENBERG).

Zusammenfassung

In Gallertcarcinomen des Magens sind neutrale und stark saure Mucopolysaccharide nachweisbar. Diese findet man in den Tumorzellen in Form von Granula, Tröpfchen und Vacuolen sowie in den gelatinösen Schleimmassen. Mit der angewandten histochemischen Methodik konnte nachgewiesen werden, daß die sauren Mucopolysaccharide sowohl carboxylgruppenhaltige als auch sulfatierte Schleimstoffe umfassen. Die prinzipiellen histochemischen und biochemischen Korrelationen zwischen Carcinom und Indifferenzzone des Ausgangsgewebes werden erörtert.

Regarding the Histochemical Properties of Mucins of Mucinous Carcinomas of the Stomach

Summary

Neutral and acid mucopolysaccharides are demonstrable in mucinous carcinomas of the stomach, appearing in the tumor cells as granules, droplets or vacuoles, and in the luminal secretions. With the histochemical technics used it could be shown that the acid mucopolysaccharides include mucins with carboxyl groups as well as sulfated mucins. The principal histochemical and biochemical relationships between carcinomas and the mucous neck cells of the stomach are discussed.

Literatur

- BÜCHNER, F.: Die Histologie der peptischen Veränderungen und ihrer Beziehungen zum Magenkarzinom. Jena: Gustav Fischer 1927.
- Allgemeine Pathologie. Pathologie als Biologie und als Beitrag zur Lehre vom Menschen. Berlin u. München: Urban & Schwarzenberg 1962.
- CASPERSON, T.: Cell growth and cell function. New York: Norton 1950.
- FASSEKE, E.: Diskussionsbemerkung zu R. SCHADE. Verh. dtsh. Ges. Path. **45**, 190 (1961).
- GEYER, G.: Der Sulfonsäurenachweis. Eine neue Methode für den histochemischen Nachweis von Sulfonsäuren. Acta histochem. (Jena) **14**, 26 (1962).
- GOMORI, G.: The histochemistry of mucopolysaccharides. Brit. J. exp. Path. **35**, 177 (1955).
- GRAUMANN, W.: Die histochemische Reaktion der Knorpelgrundsubstanz mit Perjodsäure und Bleitetraacetat. Mikroskopie **8**, 218 (1953).
- , u. W. CLAUS: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. Acta histochem. (Jena) **6**, 1 (1958/59).
- GREENSTEIN, J. P.: Biochemistry of cancer. New York: Academic Press 1947.
- HALE, C. W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. Nature (Lond.) **157**, 802 (1946).
- HALMI, N. S., and J. DAVIES: Comparison of aldehyd fuchsin staining, metachromasia and periodic acid Schiff reactivity of various tissues. J. Histochem. Cytochem. **1**, 447 (1954).
- KONEČNÝ, M., u. Z. PLICZKA: Über die Möglichkeit der Anwendung des Aldehyd-Fuchsins (GOMORI) in der Histochemie. Acta histochem. (Jena) **5**, 247 (1957/58).
- KRAUSPE, C., u. W. GUSEK: Über Frühstadien des Magenkarzinoms. Verh. dtsh. Ges. Path. **45**, 183 (1961).
- LAURÉN, P.: The cell structure and secretion in intestinal cancer. With references to benign epithelial tumours of the bowel. Acta path. microbiol. scand., Suppl. **152**, 1 (1961).
- LILLIE, R. D.: Histochemical comparison of the Casella, Bauer and periodic acid oxidation-Schiff leucofuchsin technics. Stain Technol. **26**, 123 (1951).
- Histopathologic technic and practical histochemistry. New York-Toronto-London 1954.
- McMANUS, J. F. A., and J. E. CASON: Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. J. exp. Med. **91**, 651 (1956).
- MEYER, K., E. M. SMYTH, and J. N. PALMER: On glycoproteins. The polysaccharide from pig gastric mucosa. J. biol. Chem. **119**, 73 (1937).

- MOWRY, R. W.: Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 407 (1956).
- Revised method producing improved coloration of acidic polysaccharides with alcian blue 8 GX supplied currently. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 323 (1960).
- MÜLLER, G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach HALE (1946). *Acta histochem. (Jena)* **2**, 68 (1955/56).
- PEARSE, E. A. G.: *Histochemistry. Theoretical and applied.* 2nd edit. London 1960.
- SCHADE, R.: Cancerisierung und Frühkarzinom der Magenschleimhaut. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **45**, 179 (1961).
- SMITH, H., and R. C. GALLOP: The acid polysaccharides of hog gastric mucosa. *Biochem. J.* **53**, 666 (1953).
- R. F. GALLOP, P. W. HARRITH-SMITH, and J. L. STANLEY: The virulence-enhancing factor of mucins. 6. Identification of a heparin as the main component of the third factor involved in virulence enhancement. *Biochem. J.* **52**, 23 (1952).
- SPICER, S. S.: A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 18 (1960).
- Histochemical differentiation of sulfated rodent mucins. *Ann. Histochem.* **7**, 23 (1962).
- , and MEYER, D. B.: Histochemical differentiation of acid mucopolysaccharides by means of combined aldehyd fuchsin alcian blue staining. *Amer. J. clin. Path.* **33**, 453 (1960).
- STILLER, D.: Histotopochemische Untersuchung zum Wirkungsmechanismus der Bleitetraacetatoxydation. *Acta histochem. (Jena)* **19** (1964).
- WERNER, J.: Studies on glycoproteins from mucous epithelium and epithelialsecretions. *Acta Soc. Med. upsalien.* **58**, 1 (1953).
- WOLFROM, M. L., u. F. A. H. RICE: The uronic acid component of mucoitin sulfuric acid. *J. Amer. chem. Soc.* **69**, 1833 (1947).

Dr. DANKWART STILLER,
Pathologisches Institut der Friedrich-Schiller-Universität
Jena, Ziegelmühlenweg 1