

Aus dem Pathologischen Institut des Kantonsspitals Winterthur
(Leiter: Prof. CHR. HEDINGER)

Das Verhalten argentaffiner Zellen im Bereich stenosierender Dickdarmtumoren*

Von
TH. HARDMEIER und CHR. HEDINGER

Mit 2 Textabbildungen

(*Ein gegangen am 9. September 1964*)

Die physiologische Bedeutung der argentaffinen Zellen des menschlichen Verdauungstraktes ist unklar. Die Frage ihrer Abhängigkeit von verschiedenen Funktionszuständen des Darmes ist ebenfalls noch nicht eindeutig gelöst. In erster Linie werden auch beim Menschen Beziehungen zur Peristaltik vermutet [s. bei ERSPAMER (2), LEMBECK]. Gleichsam als Modell haben wir deshalb Resektionspräparate stenosierender Darmtumoren auf ihren Gehalt an argentaffinen Zellen vor und nach der Stenose untersucht. Da sich die für derartige quantitative Untersuchungen zur Anwendung kommenden Auszählmethoden zum Teil sehr stark unterscheiden, sollen sie mit ihren Vor- und Nachteilen auf Grund eigener Vergleichsuntersuchungen ebenfalls kurz besprochen werden.

Eigene Untersuchungen

Insgesamt wurden 27 Fälle mit Dickdarmtumoren untersucht und zwar 15 Fälle mit sicher stenosierenden Geschwüsten und 12 Fälle mit nur fraglich oder sicher nicht stenosierenden Tumoren, Fälle, die zur Kontrolle dienen. Die 27 Fälle lassen sich in folgende Gruppen aufteilen:

1. Die erste Gruppe umfaßt einerseits 3 Fälle (1a) sicher stenosierender, andererseits 4 Fälle (1b) ohne wesentliche Stenose einhergehender Coecumcarcinome. Als proximale Stücke wurden hier Schleimhautabschnitte aus dem terminalen Ileum, unmittelbar vor der Valvula Bauhini entnommen.
2. Die zweite Gruppe umfaßt 10 Fälle (2a) sicher stenosierender Coloncarcinome vom Colon ascendens bis zum Colon sigmoideum, weiter einen Fall eines nur fraglich stenosierenden Tumors (2b) und schließlich 4 Fälle (2c), bei denen der Tumorexstirpation verschiedenartige Entlastungseingriffe zur Behebung der Stenose vorausgegangen sind.
3. Die dritte Gruppe umfaßt zwei sicher stenosierende (3a) und drei fraglich oder nicht stenosierende (3b) Rectumcarcinome.

Eine Stenose wird bei entsprechenden klinischen und röntgenologischen Befunden und bei einer deutlichen Ausweitung des Darmumfangs oberhalb der Stenose angenommen. Die Messung der Darmumfänge erfolgte in jedem Falle auch am formalinfixierten Präparat. Bei Rectumcarcinomen darf die physiologische Ausweitung der Ampulle nicht mit einer stenosebedingten Dilatation verwechselt werden. Eine Stenose wurde vor allem auch dann vermutet, wenn eine deutliche Verdickung der Tunica muscularis proximal des Tumors nachgewiesen werden konnte.

Es handelt sich ausschließlich um frische Operationspräparate. Die untersuchten Schleimhautabschnitte wurden als Querstreifen der ganzen Wand in mindestens 2 cm Abstand vom Tumorrand entnommen. Eine gewisse Distanz vom Geschwulstrand muß eingehalten werden,

* Mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds.

da es nach unserer Erfahrung in unmittelbarer Tumornähe nicht selten zu starken Vermehrungen der argentaffinen Zellen besonders am Kryptengrund kommt. Wie am Beispiel einer 74jährigen Patientin (BW 1333/59) gezeigt werden kann, führen derartige Wucherungen bis zum Bilde des sog. Bourgeonnement oder der Endophytie (Abb. 1). Die Darmstücke wurden wenige Tage in 4%iger, gepufferten Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 10 μ dicken Schnitte wurden nach MASSON-HAMPERL versilbert und mit der Schmorlschen Methode und der Diazokupplungsreaktion gefärbt.

Für die Auszählung wurden die beiden am häufigsten verwendeten Methoden gebraucht, einerseits die Auszählung von 20 mm langen, entlang der Lamina muscularis mucosae aus-

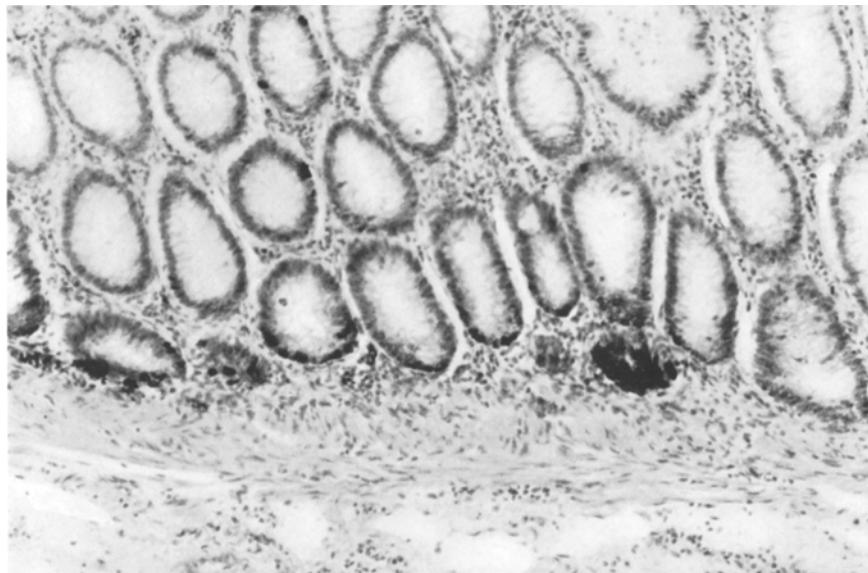


Abb. 1. (BW 1333/59: 74jährige Frau.) Vermehrung der argentaffinen Zellen bis zum eigentlichen Bourgeonnement (rechts) in der einem Carcinoma solidum simplex partim adenomatous des Colon sigmoideum unmittelbar benachbarten Dickdarmschleimhaut (Paraffin, Versilberung nach MASSON-HAMPERL, 150fach)

gemessenen und mit Tintenpunkten markierten Schleimhautabschnitten, andererseits die Auszählung von mindestens 30, im Sinne von ABRAMS u. Mitarb. „ideal“ längsgetroffener Krypten. Bei dieser Methode können nach Errechnung des durchschnittlichen Kryptenabstandes auch die absoluten Zahlen der argentaffinen Zellen für den ganzen Darmumfang ermittelt werden. In allen Fällen wurden beide Methoden angewandt. Pro Fall wurden proximal und distal der Stenose durchschnittlich je 4 Zählungen durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt.

Resultate

Die bei den insgesamt sieben verschiedenen Gruppen gefundenen Zahlen der argentaffinen Zellen vor und nach dem Tumor sind in Abb. 2 tabellarisch zusammengefaßt. Wesentliche Unterschiede der Werte proximal und distal der Stenose bestehen nicht. Die mit der doppelten Auszählung von 2 cm langen Schleimhautabschnitten bestimmten Zahlen weisen innerhalb der einzelnen Gruppen viel stärkere Schwankungen auf als die Werte, die durch Auszählung der „ideal“ längsgetroffenen Krypten ermittelt wurden. Die bei verschiedenen Färbungen für argentaffine Zellen gefundenen Werte verlaufen einander bei beiden Auszählmethoden parallel. Bei den nach BODIAN versilberten argyrophilen

Zellen ergeben sich fast durchwegs etwas höhere Werte als bei den nach MASSON-HAMPERL versilberten oder mit der Schmorlschen und der Diazokupplungsreaktion gefärbten argentaffinen Zellen.

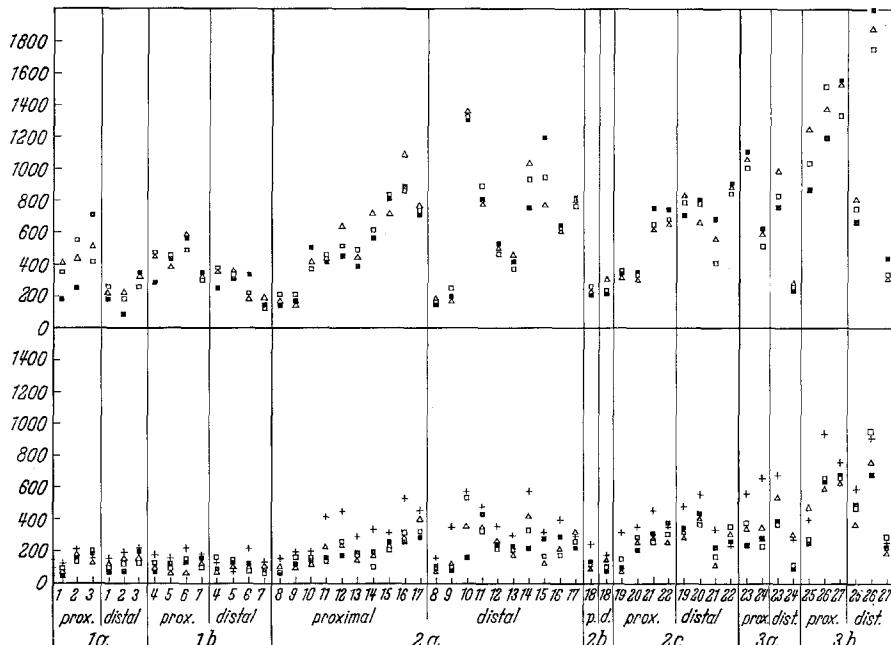


Abb. 2. Tabellarische Zusammenstellung der bei den insgesamt sieben verschiedenen Gruppen gefundenen Zahlen argentaffiner Zellen vor und hinter dem Dickdarmcarcinom. Innerhalb der einzelnen Gruppen sind zuerst alle Werte proximal und daneben diejenigen distal des Tumors dargestellt. *Obere Tabellenhälfte:* Die mit der doppelten Auszählung von 2 cm langen Schleimhautabschnitten bestimmten Zahlen. *Untere Tabellenhälfte:* Die durch doppelte Auszählung der „ideal“ längstgetroffenen Krypten ermittelten Werte pro 100 Krypten; ■ Versilberung nach MASSON-HAMPERL; □ Schmorlsche Reaktion; △ Diazokupplungsreaktion; + Versilberung nach BODIAN

Diskussion

Bei der kleinen Zahl von bisher 27 untersuchten Fällen, die wegen der unterschiedlichen Lokalisation der Geschwülste und des verschiedenen Ausmaßes der Stenose noch auf 7 Untergruppen aufgeteilt werden müssen, ist bei der Interpretation der Resultate eine gewisse Vorsicht am Platze. Immerhin lassen sich doch gewisse Schlüsse ziehen. *Wesentliche Unterschiede zwischen der Anzahl der argentaffinen Zellen in den oral und aboral der Stenose liegenden Abschnitten sind vor allem auch bei Berücksichtigung der Kryptenauszählung nicht nachweisbar.* Damit wird die Vermutung einer Vermehrung argentaffiner Zellen oberhalb der Stenose im Sinne einer Arbeitshypertrophie des argentaffinen Systems besonders beanspruchter Darmabschnitte widerlegt. Während sich die relativen Werte der argentaffinen Zellen aus Ileum und Coecum entsprechen, zeigen die im Dickdarm gefundenen Zellzahlen die typische caudale Zunahme der argentaffinen Zellen mit Maximum im Rectum.

Entsprechend früheren Untersuchungen [HELLWEG (1), EDER u. Mitarb., LILLIE u. Mitarb.] gehen die mit den als spezifisch angesehenen Färbemethoden, der Versilberungsmethode nach MASSON-HAMPERL, der Schmorlschen Färbung und der Diazokupplungsreaktion gefundenen Werte einander durchwegs parallel.

Die bei der Auszählung der längs getroffenen Krypten zusätzlich noch berücksichtigte Bodiansche Färbung [nach HELLWEG (2)] führt für die argyrophilen Zellen fast durchwegs, aber nicht immer zu höheren Werten als die Färbungen für die argentaffinen Zellen.

Was die *Auszählmethoden* betrifft, so ergibt, wie aus der Abb. 2 hervorgeht, die *Auszählung ausgemessener Schleimhautstücke* einer bestimmten Länge bei Anwendung an aufeinanderfolgenden Schnitten, die mit verschiedenen spezifischen Färbemethoden behandelt worden sind, vergleichbare Resultate. In diesem Sinne ist diese Methode z.B. von HELLWEG (1), LASKEY u. GRECO, LILLIE u. Mitarb. angewandt worden. Bei Messung entlang der Lamina muscularis mucosae wird eine Verfälschung des Resultates durch in unterschiedlichem Ausmaße vorhandene Schleimhautfalten vermieden. Dagegen ist diese Methode weniger gut geeignet für die vergleichende Untersuchung gleicher Darmabschnitte bei verschiedenen Individuen (vergleiche vor allem die Untersuchungen verschiedener Autoren nach Verabreichung von Reserpin) oder verschiedener Darmabschnitte beim gleichen Untersuchungsobjekt. Die Strukturunterschiede der verschiedenen Darmstücke fallen wesentlich ins Gewicht und ergeben die aus der Abb. 2 hervorgehenden auffallend hohen Schwankungen der Werte innerhalb der verschiedenen Gruppen. Neben dem Dehnungszustand der Darmwandung bei der Fixation spielt auch die Schnittrichtung am eingebetteten Material eine Rolle. In diesem Sinne wäre bei der Arbeit von COLE u. Mitarb. der Einwand anzubringen, daß allein schon durch die Dehnung der Darmwand bei Erhöhung des Druckes im Darmlumen die Anzahl der argentaffinen Zellen in einem bestimmten Schleimhautabschnitt gegenüber Vergleichstieren abnimmt, wobei die absolute Zahl der argentaffinen Zellen pro Krypten oder für den ganzen Darmumfang berechnet unverändert geblieben sein könnte. Der Einwand scheint in ähnlichem Sinne auch für die Untersuchungen von ZBINDEN u. PLETSCHER zu gelten. Es ist möglich, daß auch hier die Abnahme und Zunahme der Anzahl der argentaffinen Zellen zum Teil wenigstens nur relativ ist. Es handelt sich dabei um diejenigen Fälle, bei denen sekundär eine Verdickung oder Verdünnung der Magenschleimhaut nach fortgesetzter Reizung mit 48%igem Alkohol zustande gekommen ist. Die Methode wird also unter gewissen Bedingungen wohl relative, niemals aber vergleichbare absolute Werte liefern.

Die mit der *Auszählung einer bestimmten Anzahl* im Sinne von ABRAMS u. Mitarb. „ideal“ längsgetroffener Krypten erzielten Werte liegen bei den verschiedenen Gruppen innerhalb viel engerer Grenzen (vgl. Abb. 2). Unabhängig vom Zustand der Darmwand ergibt diese Methode sichere absolute Zahlen. Allerdings ist nun die Beurteilung, was als „ideal“ längsgetroffene Krypten zu gelten hat, vom subjektiven Urteil des Untersuchers abhängig, ein Nachteil, der durch eine gewisse Erfahrung kompensiert werden kann. Unter Verzicht auf die im Zottenepithel liegenden, zum Teil auch nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen degenerativ veränderten argentaffinen Zellen kann diese Methode auch im Dünndarm angewandt werden. Die Angabe des Resultates erfolgt im allgemeinen durch Umrechnen der Werte auf 100 Krypten. Mit dieser Methode hat HELLWEG (1) die mit dem Zeisschen Vergleichsmikroskop erhobenen Beziehungen zwischen argentaffinen und argyrophilen Zellen in aufeinanderfolgenden Schnitten des gleichen Gewebsstückes durch die Erzielung absoluter Zahlen

erhärtet. FRIEDMANN hat an Operationsmaterial aus dem menschlichen Darmtrakt die typische Verteilung der argentaffinen Zellen mit der caudalen Abnahme im Dünndarm und der aboralen Zunahme im Dickdarm nachgewiesen. WERMEL u. KACHAROVA haben damit die 1962 von RESNICK u. SEYMOUR erneut gezeigte Auslöschung der argentaffinen Zellen durch Spülung des Darmlumens mit verdünnter Salzsäure entdeckt. Unzweckmäßig scheint uns das von KAHLAU gewählte Vorgehen zu sein, der die argentaffinen Zellen beim Meerschweinchen wahllos in längs-, schräg- und quergetroffenen Krypten auszählte. Nimmt man nur die sauber längsgetroffenen Krypten, so scheint dieses Verfahren, das ja vom Bauelement der Darmschleimhaut ausgeht, am zuverlässigsten zu sein. Weniger geeignet ist diese Methode für die Auswertung der Magenschleimhaut sowie der Brunnerschen Drüsen. Von verschiedenen Autoren wird für derartige und ähnliche Untersuchungen die Auszählung einer bestimmten Anzahl von Objektivfeldern bevorzugt. In gleicher Weise wie PRELLWITZ kombinieren auch wir die Auszählung einer bestimmten Anzahl von Objektivfeldern an der Magenschleimhaut mit der Auszählung einer bestimmten Anzahl längsgetroffener Krypten am Darm.

Es sei hier noch auf einige spezielle Auszählmethoden hingewiesen, wie sie von einzelnen Autoren ausgearbeitet und angewandt worden sind. Die Ausmessung der Schleimhaut erfolgt nach SINGH entlang der Basalmembran der Zellen. Unter Berücksichtigung der Schnittdicke wird nach der Formel $D = N/LT$ die Dichte (D) der Zellen pro Quadratmillimeter errechnet. Dabei bedeutet N die Anzahl der im ausgemessenen Abschnitt L ausgezählten Zellen und T die Schnittdicke. SINGH bestätigt damit bei menschlichen Feten die von FRIEDMANN gefundene Verteilung der argentaffinen Zellen im Darm. Er weist sodann nach, daß die argentaffinen Zellen nach den argyrophilen auftreten, wie das von ERSPAMER (1) auf Grund von Beobachtungen bei Tieren schon lange angenommen wird. Dagegen scheint uns die mit dieser Methode erzielte Ablehnung der von HELLWEG (1) in einem kleinen Prozentsatz nachgewiesenen rein argentaffinen und nicht argyrophilen Zellen unbegründet zu sein. Wir schließen uns dabei dem Nachwort HAMPERLS an. PADYKULA u. Mitarb. haben die Mitosen in längsgetroffenen Krypten und Zotten der Dünndarmschleimhaut ausgezählt, das Resultat wird dabei nicht als Zahl der in Teilung begriffenen Zellen pro Krypten und Zotte angegeben. Es wird vielmehr der prozentuale Anteil von allen hier gefundenen Epithelzellen errechnet. Bei Patienten mit nichttropischer Sprue wird dabei eine starke Zunahme der Mitosen beobachtet. KNUDTSON u. Mitarb. berücksichtigen bei ähnlichen Untersuchungen noch die Zelldichte. Als ideale Methode für die Auszählung von Epithelzellen ist die von MOE ausgearbeitete Technik mit durchsichtig gemachten Schleimhautstücken zu erwähnen. Der Autor führte damit quantitative Studien über die Verteilung der Becherzellen durch, die am durchsichtig gemachten Gewebe mit einer Schleimfärbung dargestellt wurden. Im Gegensatz zu den Krypten ist dabei die Untersuchung an den Zotten einfacher. Für die quantitative Erfassung der argentaffinen Zellen ist diese Methode wegen der Kleinheit dieser Zellen und ihrer basalen Lage kaum geeignet. Außerdem treten bei der Anwendung der Silberfärbungen diffuse schwarze Niederschläge an der Geweboberfläche auf.

Besondere Beachtung haben wir schließlich noch der *Verteilung des Melanosepigmentes* oral und aboral der Stenose geschenkt. Nach verschiedenen Autoren soll ja die Stase des Dickdarminhaltes bei chronischer Obstipation neben dem Abusus gewisser Laxantien für das Auftreten des Pigmentes verantwortlich sein (PIRINGER-KUCHINKA, ECKER u. DICKSON). Mit Melanosepigment beladene Phagocyten konnten mit einer Ausnahme immer gefunden werden. Eine deutlich stärkere Pigmentierung der oralen Anteile ließ sich bei diesen 26 pigmentierten Fällen nur einmal finden, während bei den restlichen 25 Fällen die Pigmentierung oral und aboral mehr oder weniger gleich stark ausgeprägt war. Das vollständige

Fehlen einer Ablagerung von Melanosepigment wurde bei einem 52jährigen Mann mit einem Adenocarcinom des Coecums festgestellt. Eine vermehrte Pigmentierung oberhalb eines stark stenosierenden Adenocarcinomes der Flexura lienalis lag bei einer 56jährigen Patientin vor. Interessant ist dabei, daß bei dieser Frau 4 Wochen vor der Resektion des Tumors zur Entlastung eine Umgehungsanastomose durch Verbindung des Colon transversum mit dem Colon sigmoideum angelegt worden war.

Zusammenfassung

Die beiden für die Auszählung der argentaffinen Zellen im Verdauungstrakt am häufigsten verwendeten Auszählmethoden werden an einer Serie von 27 Fällen mit zum Teil stenosierenden Dickdarmtumoren miteinander verglichen und die dabei gefundenen Vor- und Nachteile gegeneinander abgewogen. Dabei ergibt die Auszählung einer bestimmten Anzahl längsgetroffener Krypten die zuverlässigeren Werte. Die andere Methode, die Auszählung der Zellen in ausgemessenen Schleimhautabschnitten einer bestimmten Länge eignet sich besonders für die vergleichende Untersuchung verschiedener Färbemethoden an aufeinanderfolgenden Schnitten.

Im Dickdarm nimmt die Zahl der argentaffinen Zellen gegen das Rectum zu, um hier die höchsten Werte zu erreichen. Proximal und distal der stenosierenden Dickdarmtumoren fallen an der Verteilung der argentaffinen Zellen und des Melanosepigmentes keine Unterschiede auf. Die mit den verschiedenen Färbemethoden erzielten Werte verlaufen einander parallel.

The behaviour of argentaffine cells in the neighbourhood of stenosizing tumors of the colon

Summary

The two most commonly applied methods for counting the argentaffine cells in the gastro-intestinal tract are compared in a series of 27 cases, including also stenosizing tumors of the colon, and the encountered advantages and disadvantages are also compared with each other. The counting of a certain number of longitudinally sectioned crypts yields the most reliable values. The other method, the counting of cells in measured areas of the mucous membrane of identical lengths, is especially useful for the comparative examination of various staining methods in consecutive sections.

In the large bowel the number of argentaffine cells increases towards the rectum, where the largest number is found. Regarding the distribution of the argentaffine cells and the melanosis pigmentation. No noticeable differences are found proximal and distal to the stenosizing colon tumors. The findings obtained by the various staining methods run parallel with one other.

Literatur

- ABRAMS, G. D., H. BAUER, and H. SPRINZ: Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab. Invest.* **12**, 355—364 (1963).
- COLE, J. W., J. SCHNEIDER, and A. MCKALEN: Effect of intraluminal pressure on entero-chromaffin cells in the rat duodenum. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **107**, 58—59 (1961).
- ECKER, J. A., and D. R. DICKSON: Melanosis proctocoli — the so called 'brown bowel', etiology and significance. *Amer. J. Gastroent.* **39**, 362—370 (1963).

- EDER, M., B. MARKUS u. K. LOEWER: Zur Funktion des enterochromaffinen Zellsystems des Darms im Experiment. *Beitr. path. Anat.* **121**, 50—63 (1959).
- ERSPAMER, V. (1): Il sistema enterocromaffine ed i suoi rapporti con il sistema insulare. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **109**, 586—608 (1939).
- (2) Recent research in the field of 5-hydroxytryptamine and related indolalkylamines. *Fortschr. Arzneimittel-Forsch.* **3**, 151—367 (1961).
- FRIEDMANN, I.: Ein Beitrag zur Kenntnis der basalgekörnten gelben Zellen des Darmtraktes beim Menschen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **36**, 99—136 (1934).
- HAMPERL, H.: Nachwort zu I. SINGH, On the alleged presence of non-argyrophile argentaffin cells in the human gastro-intestinal tract. *Z. Zellforsch.* **59**, 615—624 (1963).
- HELLWEG, G. (1): Über Vorkommen und gegenseitiges Verhalten der argentaffinen und argyrophilen Zellen im menschlichen Magendarmtrakt. *Z. Zellforsch.* **36**, 546—551 (1952).
- (2) Über die Silberimprägnation der Langerhansschen Inseln mit der Methode nach BODIAN. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 502—508 (1955).
- KAHLAU, G.: Versuche zur Beeinflussung der „gelben Zellen“ des Darms durch Hormone. *Z. ges. exp. Med.* **80**, 190—205 (1932).
- KNUDTSON, K. P., R. E. PRIEST, R. D. SLOOP, and J. E. JESSEPH: Effects of partial resection of mammalian small intestine. II. Cell renewal of intestinal epithelium in the rat, with special reference to the colon. *Lab. Invest.* **12**, 606—610 (1963).
- LASKEY, A., and J. GRECO: Argentaffin cells of the human appendix. *Arch. Path.* **46**, 83—84 (1948).
- LEMBECK, F.: Biochemie und Pharmakologie der Carcinoide. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **68**, 194—211 (1962).
- LILLIE, R. D., J. P. GRECO-HENSON, and J. C. CASON: Azo-coupling rate of enterochromaffin with various diazonium salts. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 11—21 (1961).
- MOE, H.: Mapping goblet cells in mucous membranes. *Stain Technol.* **27**, 141—146 (1952).
- PADYKULA, H. A., E. W. STRAUSS, A. J. LADMAN, and F. H. GARDNER: A morphologic and histochemical analysis of the human jejunal epithelium in nontropical sprue. *Gastroenterology* **40**, 735—765 (1961).
- PIRINGER-KUCHINKA, A.: Zur Kenntnis der Melanosis coli. *Virchows Arch. path. Anat.* **322**, 433—441 (1952).
- PRELLWITZ, W.: Der Einfluß des Reserpins und Tryptophans auf das enterochromaffine Gewebe beim Meerschweinchen. *Z. ges. exp. Med.* **131**, 301—311 (1959).
- RESNICK, R. H., and J. G. SEYMOUR: Chemical and histologic demonstration of hydrochloric acid-induced release of serotonin from intestinal mucosa. *Gastroenterology* **42**, 48—55 (1962).
- SINGH, I.: The prenatal development of enterochromaffin cells in the human gastro-intestinal tract. *J. Anat. (Lond.)* **97**, 377—387 (1963).
- WERMEL, E. M., and E. A. KACHAROVA: The role of the basal granular cells of the mucosa of the small intestine in the production of secretin. *Anat. Rec.* **101**, 595—604 (1948).
- ZBINDEL, G., u. A. PLETSCHER: Experimentelle Untersuchungen über 5-Hydroxytryptamin-gehalt und enterochromaffine Zellen bei chronischer Reizung des Magen-Darm-Traktes durch Äthylalkohol. *Schweiz. Z. Path.* **21**, 1137—1144 (1958).

Prof. Dr. CHR. HEDINGER
Pathologisches Institut, Kantonsspital
8401 Winterthur (Schweiz)