

Die Wirkung von Folsäureantagonisten (Methotrexat) auf die Regeneration der Darmschleimhaut*

M. EDER, H. ROSTOCK** und G. VOGEL**

Pathologisches Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER)

Eingegangen am 28. Januar 1966

Die Dynamik der physiologischen Epithelregeneration der Darmschleimhaut, deren Epithel zu den sog. Wechselgeweben gehört, ist seit langem bekannt und vielfach untersucht (LEBLOND u. Mitarb., 1956; OEHLERT u. BÜCHNER, 1961 u. v. a.). Die Aufrechterhaltung der für die einzelnen Darmabschnitte charakteristischen Struktur ist abhängig von dem Gleichgewicht der in den Keimzellen stattfindenden Zellneubildung und dem Verlust der zur Oberfläche bzw. zu den Zottenspitzen gewanderten und dort abgestoßenen postmitotischen, differenzierten Zellen. Störungen in der Neubildung mit Unterbrechung des Zellersatzes müssen somit in einer direkten Abhängigkeit von der Intensität und der Zeitdauer des die Zellneubildung treffenden Reizes stehen und im Hinblick auf die in den einzelnen Darmabschnitten unterschiedliche Zellneubildungsrate und Lebensdauer der differenzierten Zellen unterschiedlich zur Geltung kommen.

Die Wirkung von Antimetaboliten der Folsäure (Aminopterin, Methotrexat) ist nicht nur wegen der klinischen Anwendung derartiger Substanzen von besonderem Interesse, sondern auch wegen ihrer Parallelen zu anderen Folsäuremangelzuständen. Das Hauptaugenmerk der zahlreichen Untersuchungen über die Wirkung von Aminopterin bzw. Methotrexat richtete sich dabei auf die Frühveränderungen an der Dünndarmschleimhaut [zusammenfassende Literatur bei JACOBSON (1954), GELFANT (1963), MILLINGTON (1965)], wobei trotz zahlreicher in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen an verschiedenen Untersuchungsobjekten der Zeitpunkt des Eingriffs in den Generationscyclus von Zellen (Blockade der Metaphase, Wirkung während der Telophase, Wirkung während der Interphase) unterschiedlich beurteilt wurde (Übersicht s. GELFANT, 1963).

Da folsäureantagonistische Substanzen einerseits innerhalb weniger Stunden einen zellteilungshemmenden Effekt entfalten, andererseits eine einmalige Dosis nur einen kurzfristigen Effekt entwickelt, klinisch jedoch verschieden hohe Dosen kurz- oder langfristig zur Anwendung kommen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen auf die physiologische Regeneration der Darmschleimhaut in verschiedenen Abschnitten sowohl im Stoßversuch als auch im Langzeitversuch näher zu analysieren. Um einen Einblick in die geänderte Dynamik der Regeneration zu erhalten, wurde deshalb zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen nach einstündiger Zufuhr von H^3 -Thymidin durch Autoradiographie bestimmt, die Populationsgröße der

* Herrn Professor Dr. W. BÜNGELER zum 65. Geburtstag.

** Inaug.-Diss. München. Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Regenerationszone durch quantitative Auszählung erfaßt, die Zottenhöhen bzw. die Zahl der differenzierten Zellen gemessen und bestimmt und zugleich Änderungen in der Auswanderungsrate durch verschieden lange vorherige Thymidin-Zufuhr geprüft.

Untersuchungsgut und Methodik

Mit insgesamt 58 weiblichen Mäusen (Inzuchtstamm NMRI; Altrominfutter und Wasser ad libitum) wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt.

A. Langzeitversuch

28 Tiere erhielten täglich durch Magensonde 0,5 ml Methotrexat (12 µg/100 g Körpergewicht). Tötung nach 4, 8, 14 und 21 Tagen, 11 Uhr vormittags. Die eine Hälfte der Tiere erhielt 1 Std, die andere Hälfte 48 Std, bei einem 14 Tage-Wert 24 Std vor der Tötung 0,3 µC H³-Thymidin (1900 mC/mM) i. p.

B. Stoßversuch

30 Tiere erhielten einmal 400 µg/100 g Körpergewicht Methotrexat i. m., Tötung nach 4, 8, 16, 24, 48, 72 und 144 Std. 20 Tiere erhielten 1 Std vor der Tötung, 2 Tiere, die nach 24stündiger Versuchszeit getötet wurden, 23 Std vor dem Tod und die nach 48, 72 und 144 Std getöteten Tiere 24 Std vor dem Tod jeweils 0,3 µC H³-Thymidin i. p.

Von allen Tieren wurde entnommen: Duodenum 1 cm nach dem Pylorus, Jejunum 18 cm proximal der Bauhinschen Klappe, Ileum 1 cm proximal der Bauhinschen Klappe, Colon ascendens 1 cm im aufsteigenden Schenkel, Colon descendens 1 cm nach der Flexur.

Fixierung je eines Stückes in Neutralformol 1:4; normale Paraffin-Einbettung. Fixierung je eines Stückes in eiskaltem Glutaraldehyd zur Darstellung der alkalischen Phosphatase im Bürstensaum nach einer früher angegebenen Methode (EDER). Neben normalen Färbungen wurden von allen Stücken Autoradiographien angefertigt (flüssige Emulsion Ilford K2 und G5 — Entwicklungszeit 14 und 21, bzw. 5 und 7 Tage; Strippingfilm Kodak AR 10 — Entwicklungszeit 21 Tage).

Die Auszählungen erfolgten:

Am *Dünndarm* an quergetroffenen Krypten mit Bestimmung des Verhältnisses markierter zu unmarkierten Zellen, sowie an längsgetroffenen Krypten mit Auszählung der Gesamtpopulation der Regenerationszone bis zum Zottenhals sowie der absoluten Zahl der markierten Zellen.

Am *Dickdarm* an quergetroffenen Krypten im Bereich der Regenerationszone, Auszählung wie am Dünndarm, an längsgetroffenen Krypten Auszählung der Gesamtpopulation einschließlich der zugehörigen Oberflächenzellen und Bestimmung des Verhältnisses der darin enthaltenen markierten Zellen.

Pro Versuchszeitpunkt wurden mindestens 30 quergetroffene, sowie 10 bis 20 längsgetroffene Krypten ausgewertet. Die Höhenmessungen wurden mit einem Okularmikrometer durchgeführt, am Dünndarm die Zottenhöhe der jeweils 10 längsten Zotten, vom Zottenhals bis zur Zottenspitze, an 4 Serienschnitten gemessen, am Dickdarm von der Basis bis zur Schleimhautoberfläche. Die Wanderungsraten wurden ebenfalls mit dem Okularmikrometer gemessen und sowohl als Absolutwerte als auch als Relativwerte zur jeweiligen Zottenhöhe ausgewertet.

Befunde

A. Langzeitversuch

Dünndarm. Die Bestimmung des Markierungsindex, d. h. der Zahl der in DNS-Synthese befindlichen Zellen im Verhältnis zu der in der Regenerationszone, d. h. im Kryptengrund vorhandenen Gesamtzellzahl, erfolgte in der üblichen Weise, wobei jedoch die Zellen quer und längs getroffener Krypten getrennt bestimmt wurden. Da bei dieser Methode die Prozentzahl markierter Zellen im Bereich der Regenerationszone bei beiden Bestimmungsarten nur unwesentlich

voneinander abwich, wurden die Mittelwerte errechnet. Das Ergebnis ist in der Tabelle zusammengefaßt. Hierbei zeigt sich, daß der Prozentsatz markierter Zellen bei verschieden langer Dauermedikation von Methotrexat in niedriger Dosierung keine Änderung aufweist. Dieser Befund steht in einem auffallenden Gegensatz zu der Tatsache, daß die vom Zottenhals bis zur Zottenspitze gemessenen Zottenhöhen in Abhängigkeit von der Dauer der Medikation eine deutliche Verkürzung der Zotten aufweist, die besonders deutlich am Jejunum zum Ausdruck kommt, aber auch an den anderen Darmabschnitten, Duodenum und Ileum, nachweisbar ist (Abb. 1). Die zugleich bestimmte Wanderungsrate nach

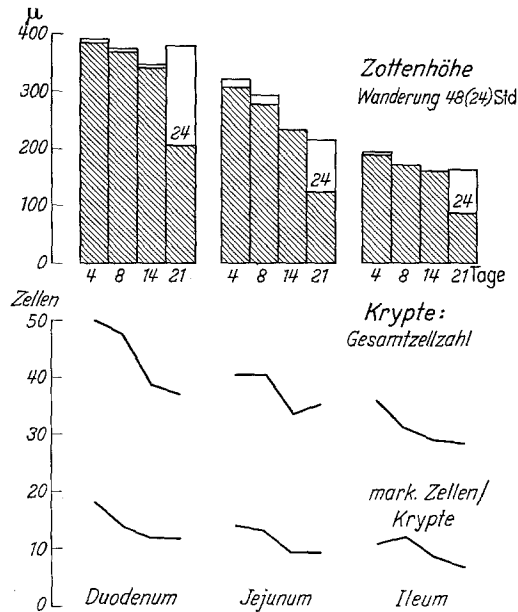


Abb. 1. Dünndarm: Wirkung von Methotrexat (12 µg/100 g täglich) auf die Zottenhöhe, Wanderungshöhe markierter Zellen nach H^3 -Thymidin (48 bzw. 24 Std) sowie die Gesamtzahl und die Zahl markierter Zellen (1h H^3 -Thymidin) pro Krypte

48 Std vorhergehender Thymidinmarkierung (zugleich eine Kontrolluntersuchung mit Bestimmung der Wanderungsrate nach 24 Std nach 14tägiger Methotrexat-Dauerdosierung) zeigen, abgesehen von der Tatsache, daß die Zotten kürzer geworden sind und somit eine kürzere Strecke zu durchwandern ist, keine Abweichung von der Norm.

Tabelle. Markierungsindex in Prozent nach H^3 -Thymidin (1 Std). Mittelwert der Auszählung an quer- und längsgetroffenen Krypten

	4 Tage	8 Tage	14 Tage	21 Tage
Duodenum	36	29	33	35
Jejunum	34	31	33	33
Ileum	34	36	34	30

Die Gesamtzellzahl der in der Krypte, d.h. in der Regenerationszone, vorhandenen Zellen nimmt dagegen signifikant ab, besonders ausgeprägt im Duodenum (von einer mittleren Zellzahl von 50 auf rund 36 Zellen). Auch die absolute

Zahl der im Kryptenlängsschnitt vorhandenen markierten Zellen nach einstündiger Thymidinzufuhr zeigt eine Verringerung mit zunehmender Dauer der Methotrexatzufuhr. Hieraus geht hervor, daß die Gesamtpopulation der Regenerationszone abgenommen hat, zugleich auch die Zahl der in DNS-Synthese befindlichen Zellen geringer geworden ist, so daß die übliche Bestimmungsmethode des Markierungsindex (s. Tabelle) keine Veränderungen des Prozentsatzes ergibt.

Dickdarm. Veränderungen in der Regeneration der Dickdarmschleimhaut wurden grundsätzlich, wie in der Methodik angeführt, am Colon ascendens und am Colon descendens getrennt bestimmt. Die Gesamthöhe sowie die Höhe der Regenerationszone nimmt im Colon ascendens zwar deutlich, jedoch nicht signifikant ab; am Colon descendens sind keine eindeutigen Unterschiede gegenüber der Norm feststellbar.

Da im Dickdarm im Unterschied zum Dünndarm keine exakte topographische Abgrenzung der Regenerationszone von der Zone der nicht mehr teilungsfähigen Zellen möglich ist, wurden am Dickdarm zwei getrennte Bestimmungsmethoden des Markierungsindex verwandt. Einmal wurde hier an quergetroffenen Krypten im Bereich der Regenerationszone das Verhältnis markierter Zellen zur Gesamtzellzahl dieser Kryptenquerschnitte bestimmt, andererseits an Längsschnitten durch Krypten die Zahl markierter Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl der Epithelien einer Krypte einschließlich der zugehörigen Oberflächenzellen ausgezählt.

So wurden hierbei zwei verschiedene Bezugsgrößen der nicht markierten Zellen verwandt, nämlich einmal nur Zellen, die in der Regenerationszone vorliegen und einmal die Gesamtpopulation der Epithelien der Dickdarmschleimhaut. Hieraus ergeben sich die in Abb. 2 dargestellten unterschiedlichen Prozentsätze. Das Ergebnis zeigt, daß die hier bis zu einer Dauermedikation von 14 Tagen ermittelten Werte eine signifikante Abnahme der Anzahl DNS-synthetisierender Zellen zwischen 4- und 8tägiger Dauermedikation aufweist, wobei nach 14tägiger Dauermedikation, insbesondere unter Bezug auf die Gesamtpopulation, bei den Längsschnittauszählungen ein Anstieg im Markierungsindex deutlich wird. Gerade die Längsschnittauszählungen zeigen aber, daß grundsätzlich im Colon descendens eine geringere Anzahl DNS-synthetisierender Zellen unter Bezugnahme auf die Gesamtpopulation vorliegt, wobei die von der Methotrexatwirkung abhängige Veränderung im Colon ascendens und descendens gleichsinnig verläuft. Eine Ermittlung des Markierungsindex ausschließlich an den Querschnitten aus der Regenerationszone läßt diesen Unterschied nicht deutlich werden. Zur Sicherung dieser Befunde wurden auch Auszählungen der Gesamtpopulation sowie der Zahl der markierten Zellen in absoluten Zahlen an Längsschnitten durchgeführt.

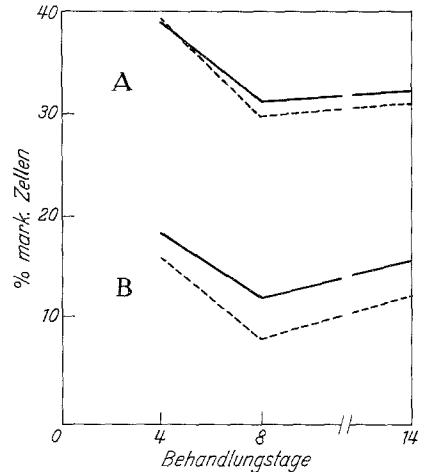


Abb. 2. Dickdarm: wie Abb. 1; Veränderung des Markierungsindex (1h H³-Thymidin), A Prozent markierter Zellen bezogen auf die Zellen der Regenerationszone (gezählt an Querschnitten), B Prozent markierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation der Schleimhaut. — Colon ascendens, - - - - Colon descendens

Letztere zeigen für das Colon ascendens (Colon descendens jeweils in Klammern) 4 Tage nach Methotrexat 19 (17), 8 Tage nach Methotrexat 15 (9), 14 Tage nach Methotrexat 11 (12) markierte Zellen im Mittel pro Krypte.

B. Stoßversuch (nach einmaliger hoher Methotrexatgabe)

Dünndarm (s. Abb. 3). Die Zottenhöhen aller drei Darmabschnitte zeigen in Abhängigkeit von einer einmaligen hochdosierten Methotrexatgabe eine zunehmende Verkürzung, die am Duodenum am ausgeprägtesten ist und dort ihren Höhepunkt 72 Std nach Methotrexatzufuhr erreicht. 144 Std nach Methotrexatgabe hat die Zottenhöhe wieder zugenommen. Im Jejunum und Ileum ist die stärkste Zottenverkürzung nach 48 Std erreicht, 72 und 144 Std nach Methotrexatgabe nehmen die Zotten wieder an Größe zu.

Die sowohl an quer- als auch an längsgeschnittenen Krypten ermittelten Markierungsindices zeigen einen identischen Kurvenverlauf, wobei die Messungen am Längsschnitt jeweils einen niedrigeren Kurvenverlauf ergeben, der durch die Auszählung der Gesamtzellzahl bis zum Zottenhals hin bestimmt ist. 4 Std nach Methotrexatgabe ist der Prozentsatz markierter Zellen gegenüber Normwerten gleichalter Versuchstiere mit 36% für das Duodenum, 38% für das Jejunum und 38% für das Ileum nur gering erniedrigt. Zum gleichen Zeitpunkt sind entsprechend den Angaben von MILLINGTON u.a. (1962a) im Kryptenbereich bereits zahlreiche geschädigte Zellen, z.T. auch bereits im Lumen, nachweisbar (Abb. 4). Alle drei Darmabschnitte zeigen, daß 8 Std nach Methotrexatzufuhr ein erster Gipfel im Prozentsatz markierter Zellen nachweisbar ist, der jedoch regelmäßig von einem steilen Abfall zu den Untersuchungszeitpunkten 16 und 24 Std gefolgt wird. Dieser starken Abnahme im Prozentsatz markierter Zellen folgt bei 48 Std eine zweite starke Zunahme, die im Jejunum und Ileum die erste Gipfelbildung bei 8 Std überschreitet und nahe an den 50%-Wert heranreicht. 72 und 144 Std nach Methotrexatzufuhr findet sich dann eine deutliche Abnahme etwa bis zur Höhe des Normwertes. Die von den gleichen Krypten (s. Abb. 3) ermittelten Gesamtzellzahlen im Kryptenlängsschnitt sowie die absolute Zahl der in diesen Krypten vorhandenen markierten Zellen zeigt, daß bereits 4 Std nach Methotrexatgabe die Gesamtzellzahl gering erniedrigt ist, eine eindeutige Erniedrigung aber nach 8 Std feststellbar ist, während die absolute Zahl der in Kryptenlängsschnitten nachweisbaren markierten Zellen zu diesem Zeitpunkt eine kleine Gipfelbildung zeigt. Das Produkt aus der Abnahme der Gesamtzellzahl und der Zunahme der markierten Zellen ergibt den steilen Gipfel des Markierungsindex zum Zeitpunkt 8 Std. Während im Duodenum nach 16 Std die Gesamtzellzahl weiter abgenommen hat, findet sich im Jejunum und Ileum eine geringe Zunahme der Gesamtzellzahl bis zum 24 Std-Wert. In dieser Zahl sind alle in der Epithelreihe vorhandenen Zellen, geschädigte und ungeschädigte, enthalten. Alle drei Darmabschnitte zeigen aber gleichmäßig, daß 48 Std nach Methotrexat die gesamte Zellzahl erneut abnimmt. Erst zu diesem Zeitpunkt zeigt die Zahl der absolut im Kryptenlängsschnitt nachweisbaren markierten Zellen eine Zunahme, die im Duodenum und Ileum bis zum 72 Std-Wert noch weiter ansteigt, um dann leicht abzufallen. Eine sichere Zunahme der Gesamtzellzahl im Kryptenlängsschnitt mit deutlicher Gipfelbildung ist 72 Std nach Methotrexatzufuhr nachweisbar.

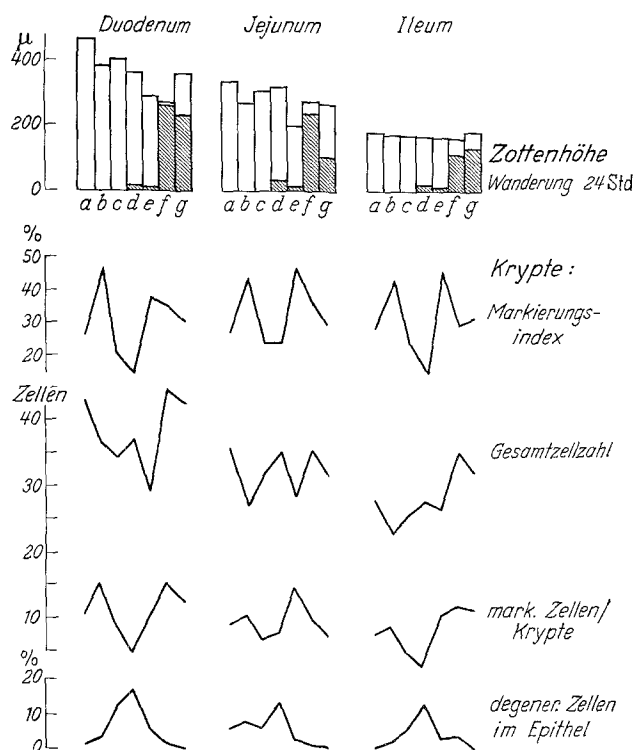


Abb. 3. Dünndarm: Schleimhautveränderungen nach einmaliger Gabe von Methotrexat (400 μ g/100 g) nach: a 4, b 8, c 16, d 24, e 48, f 72 und g 144 Std

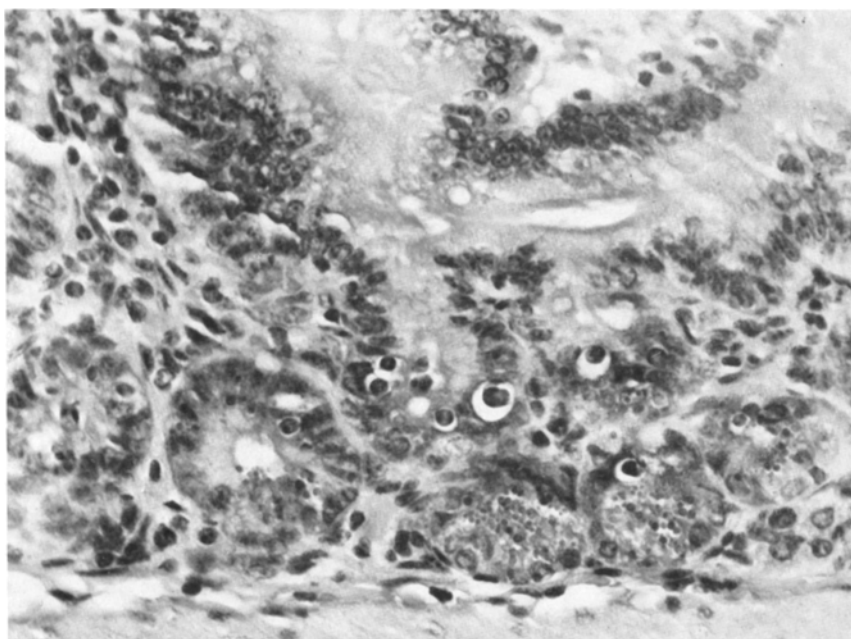


Abb. 4. Stoßversuch, Jejunum. 4 Std nach Methotrexatzufuhr sind im Kryptenbereich zahlreiche geschädigte Zellen nachweisbar. H.-E., Vergr. ca. 1200 \times

Geschädigte Zellen, die in das Kryptenlumen austreten, sind bereits nach 4 Std nachweisbar. Zur Interpretation der Befunde wurden von den geschädigten Zellen jene, die eindeutig verklumpte Kerne nach Art von Pyknosen (s. Abb. 4) zeigten und in der Epithelreihe waren (und somit in der Gesamtzellzahl mitgezählt wurden), in ihrer Häufigkeit analysiert (s. Abb. 3). Derartige, in der Epithelreihe nachweisbare geschädigte Zellen nehmen bei der verwendeten Methotrexat-

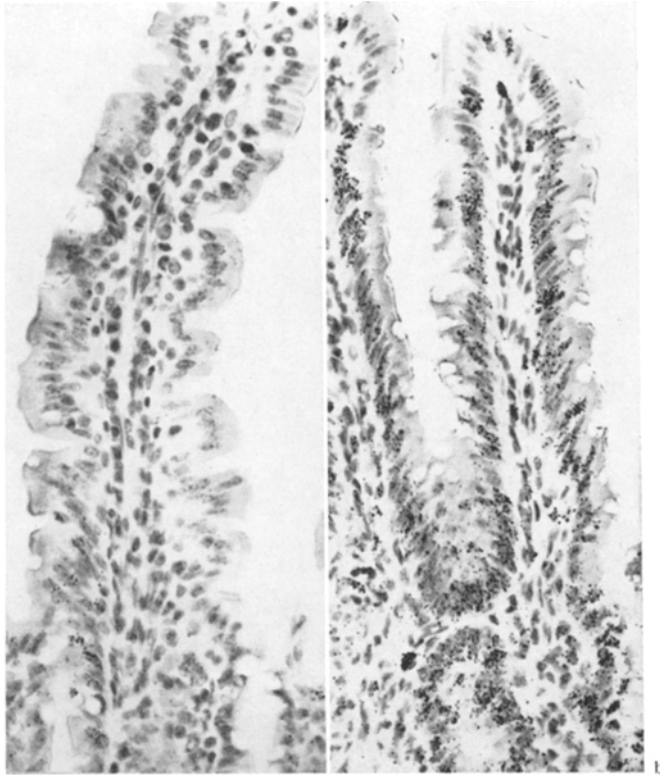


Abb. 5a u. b. Stoßversuch, Jejunum, 24 Std nach H^3 -Thymidin. a 24 Std nach Methotrexatzufuhr finden sich an der Zottenbasis nur wenige markierte Tochterzellen, eine stärkere Auswanderung fehlt. b 72 Std nach Methotrexatzufuhr sind bei vergleichbarer (24stündiger) Wanderungszeit die Zotten über die Norm hinaus bis fast zur Spitze mit markierten Tochterzellen besetzt. K2-Emulsion, Hämalaun, Vergr. ca. 350×

dosis bis 24 Std nach einmaliger Gabe zu, um dann kontinuierlich weniger zu werden. Die Anzahl dieser Zellen ist in Prozent der im Kriptenepithel nachweisbaren Zellen aufgezeichnet.

Parallel hierzu wurden die Wanderungsraten markierter Zellen 23 Std nach Methotrexatzufuhr und die 24stündige Wanderungsrate 48, 72 und 144 Std nach Methotrexatzufuhr bestimmt. Es zeigt sich, daß gegenüber einer Norm-Kontrollgruppe, in der im Duodenum 43, im Jejunum 44 und im Ileum 48% des Zottenepithels mit markierten Zellen besetzt sind, nach 24 und 48 Std keine oder nur eine ganz geringe Wanderung in das Zottenepithel stattgefunden hat (Abb. 5). 72 Std nach Methotrexat ist sowohl eine absolute als auch vor allem eine gegenüber den nunmehr stark verkürzten Zotten relative, weit überschießende Wanderung nachweisbar (Abb. 5), die am Duodenum und am Ileum auch noch nach

144 Std feststellbar ist, am Duodenum jedoch dann bereits wieder niedriger liegt.

Dickdarm. Unterschiede in der Schleimhautstärke sind am Dickdarm lediglich am Colon ascendens zwischen dem Wert 4 Std nach Methotrexatzufuhr und den übrigen Untersuchungszeitpunkten feststellbar. Da am Dickdarm die Regenerationszone nicht wie am Dünndarm topographisch von der Zottenzone getrennt ist, ist die Abb. 6 nicht direkt mit Abb. 3 (Dünndarm) zu vergleichen, weil in der Darstellung der Dickdarmbefunde als Basis der Kryptengrund gewählt wurde.

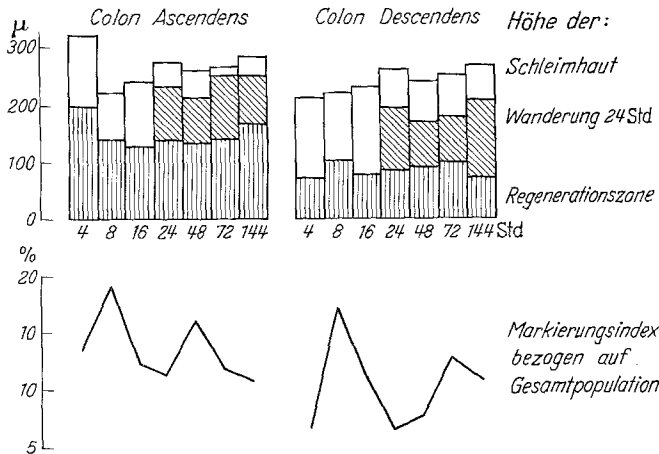


Abb. 6. Dickdarm: Schleimhautveränderungen nach einmaliger Gabe von Methotrexat (400 µg/100 g)

Nur im Colon ascendens zeigt sich parallel mit der Änderung der Gesamthöhe eine Abnahme in der Breite der Regenerationszone, ebenfalls zwischen 4- und 8 Std-Wert nach Methotrexatzufuhr.

Die Veränderung des Markierungsindex wurde ebenso wie im Langzeitversuch an Querschnitten durch Krypten aus der Regenerationszone unter Bezug auf die hierin enthaltene Gesamtpopulation, sowie an Längsschnitten durch Krypten unter Bezug auf die Gesamtpopulation bestimmt. Der Kurvenverlauf beider mit verschiedenen Bezugswerten gewählten Indices ist fast vollkommen identisch. Die an Querschnitten ermittelten Werte liegen in der Größenordnung fast vollkommen bei den Prozentwerten, wie sie für die Dünndarmabschnitte dargestellt wurden. In Abb. 6 sind deshalb wegen des identischen Kurvenverlaufs lediglich die auf die Gesamtpopulation bezogenen Markierungsindices dargestellt. Es zeigt sich, daß die Markierungsindices am Colon ascendens im Kurvenverlauf vollkommen dem an den verschiedenen Dünndarmabschnitten entsprechen. Eine eindeutige Abweichung findet sich für das Colon descendens lediglich in der Tatsache, daß hier die zweite Gipfelbildung, d.h. Zunahme des Prozentsatzes markierter Zellen, nicht nach 48 Std, sondern nach 72 Std nachweisbar ist.

Während somit die durch die einmalige Methotrexatgabe bewirkten, zeitabhängig verlaufenden Änderungen im Prozentgehalt DNS-synthetisierender Zellen (abgesehen von der erwähnten Abweichung) dem des Dünndarms entsprechen, zeigt sich, daß die 24stündige Wanderungszeit markierter Zellen in den oberen Schleimhautbereich, in dem keine Regenerationszellen mehr vorliegen, keine so

extremen Unterschiede aufweist, wie am Dünndarm. Zwar ist im Colon ascendens 24 und 48 Std nach Methotrexat die Wanderungsstrecke geringgradig verkürzt und 72 und 144 Std nach Methotrexat vergrößert, am Colon descendens dagegen ist eine derartige Änderung entsprechend der Verschiebung im Bereich des Markierungsindex mit einer etwas verstärkten Wanderung nur zum Zeitpunkt 144 Std nach Methotrexatgabe nachweisbar. Der entscheidende Unterschied gegenüber den Befunden am Dünndarm ist, daß hier Änderungen in der Wanderungsrate zwar nachweisbar sind, jedoch nur sehr undeutlich zum Ausdruck kommen.

Besprechung

Bei der Beurteilung von Änderungen im Regenerationscyclus der Darmschleimhaut kommt den Unterschieden im Regenerationsvorgang in den einzelnen Darmabschnitten eine besondere Bedeutung zu. Bereits die verschiedenen Dünndarmabschnitte zeigen bei im Prinzip gleichem Regenerationsmodus nach Art eines Wechselgewebes wesentliche Unterschiede. Diese finden ihren Ausdruck im unterschiedlichen Verhältnis des differenzierten Epithels zur Populationsgröße der Regenerationszone. In engem Zusammenhang hiermit stehen Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit beim Ersatz des differenzierten Epithels, auf die bereits OEHLERT u. BÜCHNER (1961) hingewiesen haben. In einem noch deutlicheren Gegensatz hierzu steht der Regenerationsmodus der Dickdarmschleimhaut, bei der die Regenerationszone nicht wie am Dünndarm topographisch abgegrenzt ist, sondern das untere Kryptendrittel einnimmt. Wie die Befunde zeigen, ist hierbei die Regenerationszone sowohl in ihrer Breite als auch in der Zahl der in DNS-Synthese befindlichen Zellen größer als im Colon descendens (vgl. Abb. 7). Zahlreiche Literaturangaben über den Regenerationsvorgang und seine Änderung an der Dickdarmschleimhaut werden hierdurch problematisch, weil zumeist keine exakten Angaben über den untersuchten Abschnitt des Dickdarms vorliegen. Daß der Ersatz differenzierter Zellen im Dickdarm langsamer vonstatten geht, als im Dünndarm, ist bereits von OEHLERT u. BÜCHNER (1961) betont worden. Der Vergleich mit den in den Befunden nicht näher angeführten Untersuchungen an Normaltieren läßt darauf schließen, daß hierbei wahrscheinlich Colon descendens untersucht wurde, denn auch der Zellersatz (die Wanderungsrate) verläuft im Colon descendens langsamer als im Colon ascendens des hier verwandten Versuchstieres, der Maus.

Zur Analyse von Veränderungen der Regeneration der Dickdarmschleimhaut können deshalb nicht die gleichen Methoden verwandt werden, wie sie am Dünndarm zur Anwendung kommen. Auch die Beurteilung bietet hierbei besondere Probleme, z. B. bei der Erfassung der Wanderungsgeschwindigkeit, da am Kryptengrund vom Dickdarm lokalisierte Zellteilungen Tochterzellen abgeben, die ein Drittel der gesamten Dickdarmschleimhaut durchwandern müssen, ehe sie die Regenerationszone verlassen. Erst die Berücksichtigung dieser, durch den anatomischen Bau bedingten und im Regenerationsmodus vorhandenen Unterschiede der verschiedenen Dünndarmabschnitte erklärt die unterschiedlichen Auswirkungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkung der fol-säureantagonistisch wirksamen Substanz (Methotrexat).

Der Langzeitversuch bei niedriger Dosierung, die etwa mit der therapeutischen Dosis beim Menschen vergleichbar ist, führt innerhalb der Versuchszeit

von 14 Tagen bis 3 Wochen zu einer langsam fortschreitenden Zottenverkürzung, die vor allem im Duodenum zum Ausdruck kommt. Diese ist bedingt durch eine Verringerung der Regenerationspopulation, während der Markierungsindex und die Wanderungsrate der allerdings verkürzten Zotten unverändert sind. Es muß somit ein schleichender Verlust von teilungsfähigen Zellen im

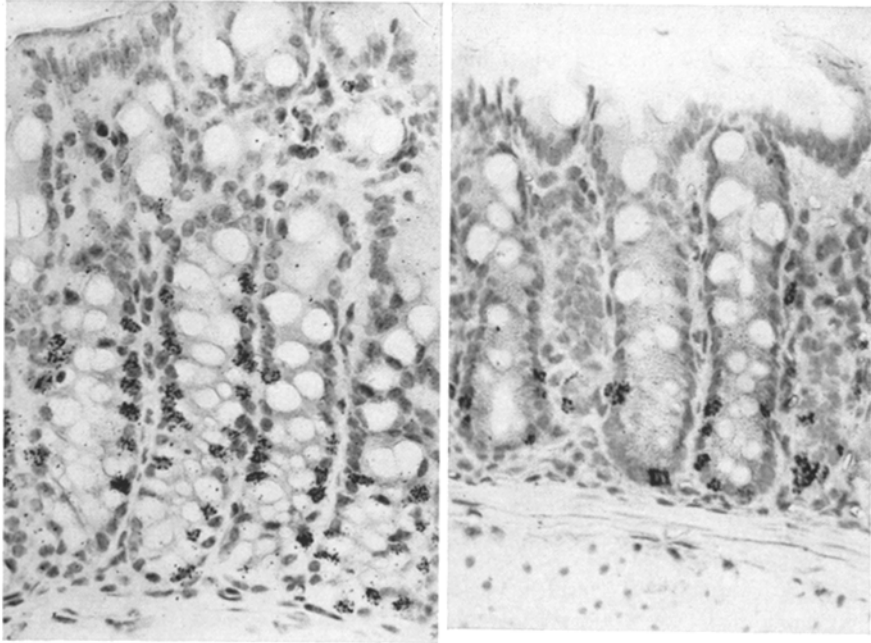


Abb. 7a u. b. a Colon ascendens, b Colon descendens. Vergleich der unterschiedlichen Schleimhautdicke sowie der unterschiedlichen Höhe und Markierungsintensität der Regenerationszone. K2-Emulsion, Hämalaun, Vergr. ca. 350 ×

Kryptengrund eingetreten sein. Die mit der zahlenmäßigen Verringerung der regenerationsfähigen Zellen einhergehende Abnahme der Zahl der in DNS-Synthese befindlichen Zellen ist auch in den Dickdarmabschnitten nachweisbar. Ob auf die Dauer bei noch längeren Behandlungszeiträumen parallel mit der klinischen Erfahrung einer Anpassung auch die Veränderungen der Darm-schleimhautregeneration aufgehoben werden, bleibt dahingestellt.

MILLINGTON (1965), GELFANT (1963) u.a. haben gezeigt, daß bei hoher Dosierung von folsäureantagonistischen Substanzen innerhalb von wenigen Stunden der Generationscyclus teilungsfähiger Zellen unterbrochen wird. Hiermit steht in Übereinstimmung, daß im Stoßversuch nach einmaliger hoher Dosierung bereits nach 4 Std zahlreiche pyknotische Zellkerne, bei denen es sich vermutlich um arretierte Mitosen handelt, nachweisbar sind. Der 8 Std nach einmaliger Dosierung auftretende Gipfel im Markierungsindex ist z.T. auf einen Verlust von Zellen im Kryptengrund zurückzuführen, die im Kryptenlumen nachweisbar sind, z.T. aber auf eine absolute Zunahme der Zahl der in DNS-Synthese befindlichen und nach H^3 -Thymidin-Zufuhr markierten Zellen. Theoretisch könnte dies durch eine methotrexatbedingte Verlängerung der DNS-Synthese-Phase zustande kommen. Da aber am Colon descendens gleichzeitig eine Verbreiterung

der Zone regenerationsfähiger Zellen nachweisbar ist, erscheint die Deutung wahrscheinlicher, daß als Ausdruck einer Kompensation des Zellverlustes bzw. der Unterbrechung einer umschriebenen Phase des Generationencyclus die restlichen regenerationsfähigen Zellen vorzeitig in DNS-Synthese eintreten, was nur durch Verkürzung der G_1 -Phase möglich ist. Nur ein Teil der geschädigten Zellen wird in das Lumen ausgestoßen und geht bereits im Kryptengrund verloren. Ein relativ großer Prozentsatz bleibt in der Epithelreihe liegen. Die Zahl dieser geschädigten Zellen nimmt bis 24 Std nach einmaliger Methotrexatzufuhr zu. Durch diesen Stau geschädigter Zellen kommt eine kleine Gipfelbildung bei der Auszählung der Gesamtzellzahl 24 Std nach Methotrexatzufuhr am Dünndarm zustande. Die Zahl regenerationsfähiger Zellen nimmt bis 24 Std ab, was eindeutig in der Verringerung DNS-synthetisierender Zellen bis zu diesem Zeitpunkt zum Ausdruck kommt. Der gestörten Regeneration entspricht eine weitgehende Unterbrechung der Auswanderung differenzierter Zellen, die auch nach 48 Std noch nachweisbar ist. Als Folge dieses mangelnden Zellnachschiebs findet insbesondere am Duodenum eine fortschreitende Zottenverkürzung statt; die parallele Untersuchung durch histochemischen Nachweis der Bürstensaumenzyme zeigt keine Veränderung der nicht mehr zeitgerecht ersetzten differenzierten Zellen, wie überhaupt die von MILLINGTON u. Mitarb., (1962a) beschriebenen Veränderungen am Zottenepithel in den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet wurden.

48 Std nach Methotrexatzufuhr setzt mit Abklingen der Wirkung eine intensive DNS-Synthese der noch verbliebenen regenerationsfähigen Zellen ein, die auch noch nach 72 Std nachweisbar ist. Selbst unter Berücksichtigung der Möglichkeit, daß bei Berechnung des Markierungsindex ein Prozentsatz geschädigter Zellen zu den nicht markierten Zellen gerechnet wurde, liegt der Markierungsindex etwa um 50%. In dieser Größenordnung entspricht er in Vergleichsuntersuchungen dem jugendlicher, wachsender Tiere, er scheint dem Höchstwert bei äußerster Regeneration in der Regenerationszone des Dünndarms zu entsprechen. Als Folge dieser vermehrten DNS-Synthese mit nachfolgender Mitose nimmt die Gesamtzahl der im Kryptengrund vorhandenen Zellen mit entsprechender zeitlicher Verzögerung zu. Erst zu diesem Zeitpunkt (72 und 144 Std nach Methotrexatgabe) findet ein Ersatz des differenzierten Epithels durch Auswandern der Zellen statt, deren Wanderungsgeschwindigkeit nun sowohl relativ (bezogen auf die verkürzten Zotten) als auch absolut weit über der Norm liegt, so daß bereits nach 24 Std am Duodenum und Jejunum das Zottenepithel bis fast zur Spitze durch ausgewanderte markierte Zellen besetzt ist. Als Folge dieser gesteigerten Auswanderung nimmt die Zottenhöhe am Duodenum, an dem die Größenschwankungen am deutlichsten zum Ausdruck kommen, wieder zu. 144 Std nach Methotrexatzufuhr zeigen alle Werte (Wanderungsrate, Markierungsindex sowie Gesamtzellzahl und absolute Zahl markierter Zellen im Kryptengrund) eine Einpendelung auf den Normwert. Auffällig ist die weitgehende Identität der Meßdaten im Bereich der Regenerationszone mit ihren von der Methotrexatgabe abhängigen Veränderungen an den drei Dünndarmabschnitten. Die davon abhängigen Veränderungen an den Zotten sind um so stärker ausgeprägt, je höher die Zotten sind, d.h. im Duodenum am stärksten.

Noch eindeutiger werden die Unterschiede bei der Untersuchung der Dickdarmabschnitte Colon ascendens und Colon descendens. Während das Colon ascendens eine qualitativ völlig gleichartige und quantitativ ähnliche, von der Methotrexatgabe abhängige Veränderung an den regenerationsfähigen Zellen zeigt, findet sich am Colon descendens eine in Bezug auf die wieder einsetzende DNS-Synthese zeitliche Verzögerung. Wahrscheinlich hängt dies damit zusammen, daß generell am Colon descendens der Regenerationsvorgang, wie oben dargestellt, gegenüber den anderen Darmabschnitten langsamer verläuft. Am eindrucksvollsten ist aber die Feststellung, daß trotz der Ähnlichkeiten der Störungen im Bereich der Regenerationszone die Unterschiede in der Auswanderungsrate zwar am Colon ascendens noch deutlich, jedoch keinesfalls in der Intensität mit denen der Dünndarmabschnitte vergleichbar sind. Die durch eine einmalige Methotrexatgabe ausgelöste Störung im Generationscyclus ist offensichtlich im Hinblick auf die langsamer ablaufende Regeneration der Dickdarmschleimhaut zu kurzfristig, als daß diese in entsprechendem Maße mitbeteiligt würde. Damit steht dieser Befund in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von MEIER-RUGE u. GRAUWILER, (1963) sowie eigenen früheren Untersuchungen (EDER u. LÖHRS, 1965), in denen bei Verwendung einer hemmenden Substanz dosis- und zeitabhängig unterschiedliche Lokalisationen an den verschiedenen Darmabschnitten gefunden wurden. Die unterschiedliche physiologische Regeneration der verschiedenen Dün- und Dickdarmabschnitte ist mitentscheidend für die Auswirkungen von Störungen der Regeneration, wobei limitierend die Intensität und die Zeitdauer der Regenerationsstörung wirken.

Zusammenfassung

In vergleichenden Untersuchungen wird die Wirkung der folsäureantagonistisch wirksamen Substanz Methotrexat auf die Regeneration der Schleimhaut von Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon ascendens und Colon descendens von Mäusen geprüft.

Im *Langzeitversuch* findet sich eine bis zu 3 Wochen fortschreitende langsame Zottenatrophie, vor allem am Duodenum, die auf einen Zellverlust in der Population der Regenerationszone zurückzuführen ist.

Bei einmaliger hochdosierter Zufuhr von Methotrexat (*Stoßversuch*) wird die Regenerationszone geschädigt, wobei anfangs der Verlust regenerationsfähiger Zellen mit einer gesteigerten DNS-Synthese der Restpopulation beantwortet wird; über eine gesteigerte Zellneubildung ist nach 4 Tagen die Regenerationszone wieder weitgehend hergestellt. Während der Blockade der Regenerationszone ist die Auswanderung differenzierter Zellen auf die Zotten unterbrochen bzw. verzögert; nach Wiederherstellung findet sich ein beschleunigter Zellersatz. Entsprechend dem langsameren physiologischen Zellersatz am Colon ascendens und Colon descendens ist hier eine Methotrexatwirkung in Form einer vorübergehenden Blockade nur in abgeschwächter Form feststellbar.

The Action of Folic Acid Antagonists (Methotrexate) on the Regeneration of the Intestinal Mucosa

Summary

Comparative studies were made of the action of Methotrexate, the folic acid antagonist, on the regeneration of the mucosa of the duodenum, jejunum, ileum,

ascending and descending colon of the mouse. In chronic experiments an atrophy of villi slowly developed up to three weeks, especially in the duodenum. The atrophy was related to a loss of some of the cells of the regeneration zone. On administering a single large dose of Methotrexate (push-experiment) the regeneration zone was damaged. Consequently, at the onset the loss of the cells capable of regenerating provoked an increased DNA synthesis of the remaining cells. After four days the regenerative zone was nearly restored by an increased renewal of cells. During the block of the regeneration zone, the migration of differentiated cells to the villi was interrupted or delayed. After restoration there was an accelerated renewal of cells. In the ascending and descending colon, where the physiological renewal of cells is slower than in other parts of the intestine, the effect of Methotrexate became apparent in a diminished form as a temporary block.

Literatur

- EDER, M.: Zur Darstellung von Wachstum und Differenzierung durch gleichzeitige Autoradiographie mit H^3 -Thymin und histochemische Enzymreaktionen. *Naturwissenschaften* **51**, 339 (1964).
- , u. U. LÖHR: Experimentelle Regenerationsstörungen der Darmschleimhaut. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **210**, 202 (1965).
- GELFANT, S.: Inhibition of cell division: A critical and experimental analysis. *Int. Rev. Cytol.* **14** (1963).
- JACOBSON, W.: The mode of action of folic acid antagonists on cells. *J. Physiol. (Lond.)* **123**, 603 (1954).
- LEBLOND, C. P., B. MESSIER, and B. KOPRIVA: Thymidine³ as a tool for the investigation of the renewal of cell populations. *Lab. Invest.* **8**, 296 (1956).
- , and C. E. STEVENS: The constant renewal of the intestinal epithelium in albino rats. *Anat. Rec.* **100**, 357 (1948).
- MEIER-RUGE, W., u. J. GRAUWILER: Der Einfluß des Äthylhydrazids der Podophyllinsäure (SP-I) auf Gewebe des Hundes mit konstanter Erneuerungsrate. *Med. exp. (Basel)* **9**, 127 (1963).
- MILLINGTON, P. F.: Studies of the effects of aminopterin on the crypts of Lieberkühn in rats. *Z. Zellforsch.* **65**, 607 (1965).
- , J. B. FINEAN, O. C. FORBES, and A. C. FRAYER: Studies of the effects of aminopterin on the small intestine of rats. 1. The morphological changes following a single dose of aminopterin. *Exp. Cell Res.* **28**, 162 (1962a).
- OEHLERT, W., u. TH. BÜCHNER: Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel und in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes der weißen Maus. *Beitr. path. Anat.* **125**, 347 (1961).

Prof. Dr. M. EDER
Patholog. Institut der Universität
8 München 15, Thalkirchner Straße 36