

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER UTERUSLIPOIDE BEI WEISSEN MÄUSEN, MIT BESONDERER RÜCKSICHT AUF DEM SEXUALZYKLUS

Die Untersuchungen im Institut für Allgemeine Zoologie sind zum Teil auf die Klärung der Korrelation zwischen den endokrinen Drüsen und den Geschlechtsorganen gerichtet. Die Verbindung der Innersekretorischen Drüsen und der Sexualorgane ist aber nur dann mit der entsprechenden Ausführlichkeit zu klären, wenn uns die in den Sexualorganen ablaufenden morphologischen, physiologischen und biochemischen Vorgänge genau bekannt sind. In der vorliegenden Arbeit möchte ich über einen Teil meiner am Uterus der weissen Maus angestellten Untersuchungen berichten.

Mit den Gebärmutterlipoiden der weissen Maus haben sich bis zum Gegenwart mehrere Autoren beschäftigt: BOURY [2], LAMS [6], MIGLIAVACCA [7], MOULONGUET [8], REESE [9], SEPELLI [11]. Diese Untersuchungen sind jedoch teils älteren Ursprungs, teils mangelhaft und zur genauen Differenzierung der einzelnen Lipoidarten ungeeignet. Andererseits erschien uns auch wegen der, von der Funktion abhängigen hochgradigen Veränderlichkeit der Uteruslipoiden angebracht, die Frage einer eingehenden Analyse zu unterziehen.

Untersuchungsmaterial und Methodik

Ich führte die Untersuchungen an 100 geschlechtreifen und 15 infantilen weiblichen weissen Mäusen aus. Die Tiere wurden in verschiedenen Phasen des Sexualzyklus nach Entnahme eines Vaginalausstrichs mit Dekapitation getötet. Aus den zwei Uterushörnern habe ich kleine Stückchen herausgeschnitten und diese dann den einzelnen Proben entsprechend behandelt. Zur Untersuchung des Gesamtlipoids wurde das Material mit 4% neutralen Formalin fixiert, das 1% Kobaltnitrat und 1% Kalziumchlorid enthielt, um die Emulgierung der Phospholipoiden zu verhindern. Das Material wurde 24 Stunden bei 37° C fixiert, da — nach den Untersuchungen von HOERR [5] — das Cholesterin bei niedrigerer Temperatur leicht auskrystallisiert und dann mit den zur Sudangruppe gehörigen Farbstoffen nicht mehr gefärbt werden kann. Von dem auf diese Weise fixierten Material habe ich mittels des Gefriermikrotoms Schnitte von 8 μ hergestellt, danach diese mit 70%iger alkoholische Lösung von Sudanrot 7 B (I. G. Farbenindustrie) und Sudanschwarz B während einer 1/2 Stunde gefärbt. Bei einigen mit Sudanrot 7 B gefärbten Schnitten

führte ich die Kernfärbung mit dem WEIGERTSchen Eisenhämatoxylin aus. Zum Nachweis des Gesamtlipoids eignet sich besser das Sudanschwarz B, da nach den Untersuchungen von HARRISON und CAIN [4] ferner SCHWEIZER und LONG [12] mit dieser Färbung auch die feinsten Lipoidtropfen nachweisbar sind, was mit anderen Lipoidfarbstoffen kaum oder überhaupt nicht gelingt.

Zum Nachweis des Cholesterins und der Cholesterinester verwandte ich die LIEBERMANN—BURCHARDT-Probe, beziehungsweise die Digitoninreaktion nach WINDAUS.

Zum Nachweis der neutralen Lipoiden bediente ich mich — in Ermangelung einer besseren Methode-, der von CAIN (1947) empfohlenen Form der Nilblausulfat-Färbung von SCHMITH. Die Originalmethode hielt man nämlich bis zur allerletzten Zeit nicht für brauchbar, doch scheint sie auf Grund der neueren Untersuchungen von CAIN mit gewissen Modifikationen zur Differenzierung der neutralen Lipoiden und anderer Lipoidarten brauchbar zu sein.

Zur Feststellung der Lokalisation der Phosphatide verwandte ich am nicht fixierten Material die Plasmal-Reaktion (nach CAIN) ferner die Paraffinmethode vom MC-MANUS mit zweitägiger Chrombehandlung. Nach den Literaturangaben [3] kommen nämlich neben den mittels der Plasmalreaktion nachweisbaren Azetalphosphatiden stets auch andere Phosphatide vor, andererseits bleibt nach zweitägiger Kaliumbichromat-Behandlung ein erheblicher Teil der Phosphatide auch bei Paraffineinbettung im Schnitt [10].

Die Lipoidnatur des intrauterinen Sekretes wurde durch die Paraffinmethode von MC-MANUS mit zwei und achttägiger Chrombehandlung entschieden. Nach achttägiger Chrombehandlung bleiben auch die neutralen Lipoiden im Schnitt, falls nach der Paraffineinbettung, als Lösungsmittel des Paraffins lediglich Azeton verwendet wird.

Die Lipoproteidnatur des vom Uterus entnommenen Sekrets wurde durch das Verfahren von ACKERMANN entschieden.

Untersuchungsergebnisse

Im Uterus von infantilen, anderthalb bis eine Woche alten Mäusen treten im basalen und apikalen Teil der das Uteruslumen auskleidenden Epithelzellen ferner im basalen Teil der Stromadrüsen lipoidhaltige Vakuolen in Erscheinung. In den mit der Cainschen Methode bei 60° C behandelten Schnitten wird der Inhalt der Vakuolen mit Nilblausulfat rosa gefärbt, was für ihren Neutrallipoid-Charakter zeugt. Diese Beobachtung wird auch dadurch gestützt, dass die lipoidhaltigen Vakuolen von dem Schnitt mit kaltem Azeton auch bei zweitägiger Kalium bichromat-Behandlung leicht auszulösen sind. Die das Uteruslumen auskleidende Epithelschicht, ferner das Drüsenepithel gaben eine intensive Plasmalreaktion, welche das Vorhandensein von Phosphatiden an den erwähnten zwei Stellen zeigt. Andere Lipoidarten sind im Uterus der infantilen Maus nicht nachzuweisen. Nach achttägiger Kaliumbichromatbehandlung bei Anwendung von paraffinierten Schnitten enthält das Lumen der Gebärmutter und der Drüsen keinen lipoidpositiven Stoff. Demnach ist im Uterus der infantilen Maus eine Sekretion von lipoidhaltigen Substanzen nicht zu beobachten.

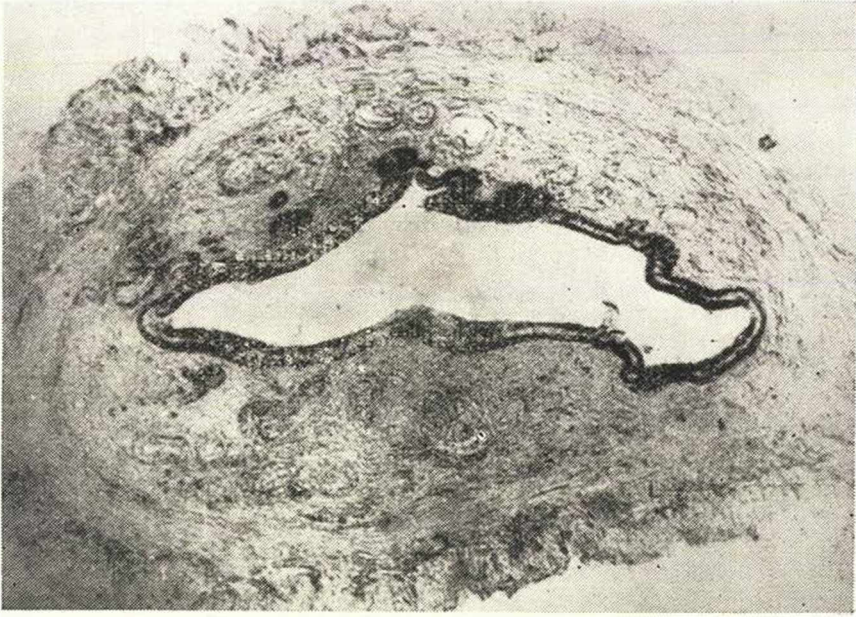


Abb. 1. Querschnitt der Uterus. Metoestrus. Mit Sudanrot 7 B. gefärbt.
48× Vergrößerung



Abb. 2. Teil des Uterusquerschnittes. Anfang des Dioestrus mit Sudanrot 7 B. gefärbt.
48× Vergrößerung

Nach dem Eintritt der Geschlechtsreife erfährt das bisherige statische Bild des Uterus eine Änderung. Während des Sexualzyklus besteht in Metoestrus noch ein dem Dioestrus ähnlicher Zustand, indem im basalen und apikalen Teil der das Uteruslumen auskleidenden Epithelien neutrale Lipide nachweisbar sind (Abb. 1.), dagegen sind im basalen Teil der Drüsenepithelzellen nur spärliche, winzige neutrales Lipoid enthaltende Vakuolen zu beobachten.

Am Anfang des Dioestrus finden sich bereits auch im basalen Teil der Uterusdrüsenzellen mehr Lipoidtröpfchen, und es treten sogar in dem Myometrium anliegenden Teil des Endometriums lipoidhaltige Bindegewebszellen in Erscheinung (Abb. 2.).

In der Mitte des Dioestrus gestaltet sich das Uterusbild interessant, indem die Lipoidtropfen im apikalen Teil der das Lumen auskleidenden Epithelien verschwinden, dagegen der Lipoidgehalt des Stromas und der Muskelschicht zunimmt (Abb. 3.).

Den maximalen Lipoidgehalt erreicht der Uterus im Prooestrus. Im Stroma wird viel, in der inneren, zirkulären Muskelschicht weniger, in der äusseren longitudinal verlaufenden Muskelschicht verhältnismässig wenig Lipoid gespeichert (Abb. 4). In dem die zwei Muskelschichten von einander trennenden bindegewebigen Septum finden sich zahlreiche lipoidhaltige Zellen, dagegen verschwinden die neutralen Lipoidtropfen völlig aus den das Uteruslumen auskleidenden Epithelzellen, sowie auch aus den Drüsenzellen.

Am Anfang des Oestrus erscheinen in den das Lumen auskleidenden Epithelzellen und in den Drüsenepithelien wieder die neutralen Lipoidtropfen (Abb. 5). Gleichzeitig verschwinden die lipoidhaltigen Zellen nach und nach in der Muskelschicht (Abb. 6.). Später nimmt der Lipoidgehalt des Uterus immer mehr ab, so dass der am Ende des Oestrus sehr lipoidarm wird (Abb. 7.).

In den Epithelzellen beginnt die Lipidspeicherung am Anfang des Metoestrus sofort. Ich fand nämlich in mehreren Fällen solche Tiere, die sich im Übergangszustand vom Oestrus in den Metoestrus befanden, wo der Querschnitt des Uterus die Eigenschaften beider Phasen aufwies. Das für den Oestrus bezeichnende gefaltete Epithel des Uterus enthielt kein Lipoid, während ein kleiner Teil des das Uteruslumen auskleidenden Epithels, das für den Metoestrus bezeichnend ungefaltet war, in seinem basalen und apikalen Abschnitt bereits Lipide gespeichert hat.

Auf Grund der zyklischen Änderungen der Uteruslipide ist der augenblickliche Zustand des Zyklus mit ziemlicher Genauigkeit zu fixieren. Die Änderungen der Uteruslipide stehen nämlich in engem Zusammenhang mit der Erscheinung anderer Komponenten: wie der alkalischen Phosphatase, Peroxydase, Oxydase, Dehydrogenase usw.

Die das Uteruslumen auskleidende Epithelschicht und das Drüsenepithel geben eine intensive Plasmalreaktion (Abb. 8.). Die Plasmalreaktion wird am Ende des Oestrus schwächer, als in den anderen Phasen. Unmittelbar am Anfang des Metoestrus geben die Drüsenepithelzellen nur eine schwache Reaktion (Abb. 9.). Bei zweitägiger Kaliumbichromat-Behandlung sind die im Paraffinschnitt mit Sudanschwarz B. gefärbten Strukturen identisch mit den Plasmalpositiven Strukturen. Im Drüsenlumen ist eine Plasmalpositive Sekretproduktion zu beobachten. Dieses Sekret lässt sich auch mit Sudanschwarz B im Paraffinschnitt gut färben (Abb. 10), demnach sezerniert der Uterus auch phosphatidhaltige Lipide. Am Ende des Oestrus und am

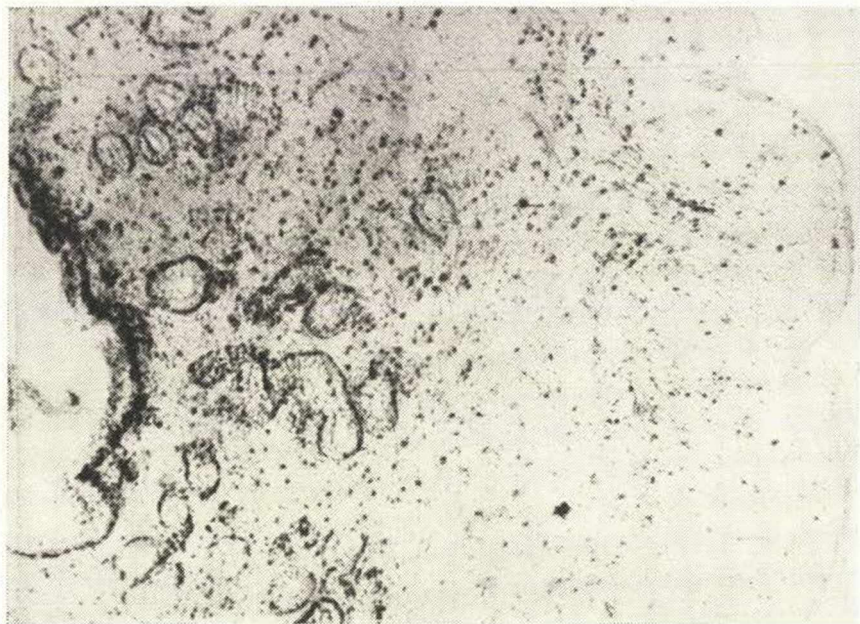


Abb. 3. Teil des Uterusquerschnittes. Mitte des Dioestrus mit Sudanrot 7 B. gefärbt.
48 × Vergrößerung



Abb. 4. Teil des Uterusquerschnittes. Prooestrus. Mit Sudanrot 7 B. gefärbt.
48 × Vergrößerung



Abb. 5. Die das Uteruslumen auskleidende Epithelschicht Anfang des Oestrus.
Mit Sudanschwarz B. gefärbt. 1700 \times Vergrößerung

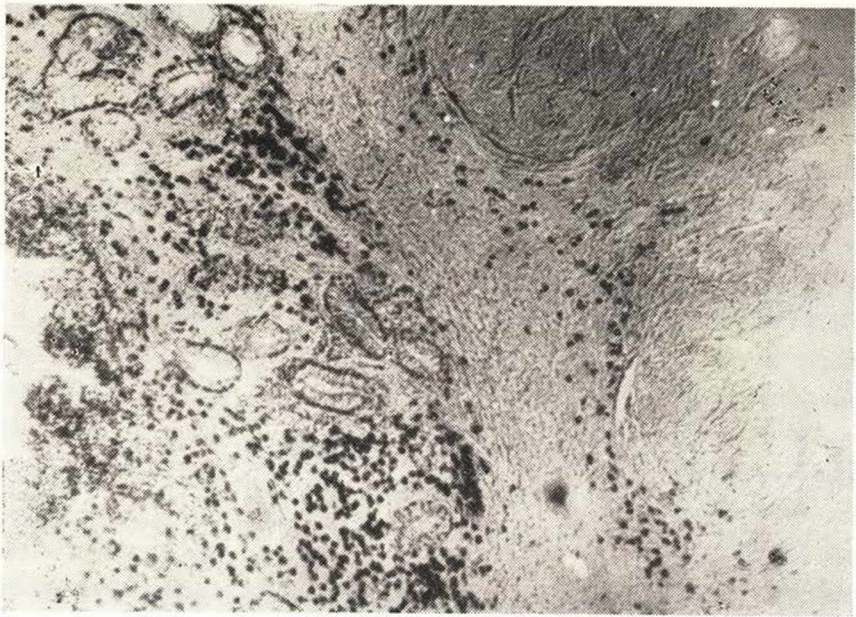


Abb. 6. Teil des Uterusquerschnittes. Oestrus. Mit Sudanrot 7 B. gefärbt.
48 \times Vergrößerung



Abb. 7. Teil des Uterusquerschnittes. Ende der Oestrus. Mit Sudanrot 7 B. gefärbt.
48 × Vergrößerung



Abb. 8. Teil des Uterusquerschnittes Dioestrus. Plasmalreaktion.
48 × Vergrößerung

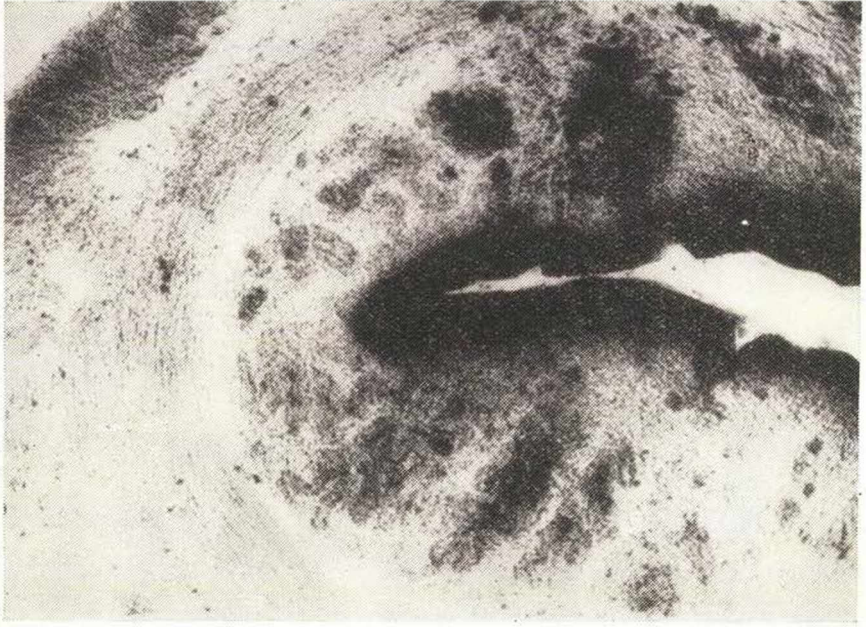


Abb. 9. Teil des Uterusquerschnittes. Anfang des Metoestrus Plasmal-reaktion.
48 × Vergrößerung

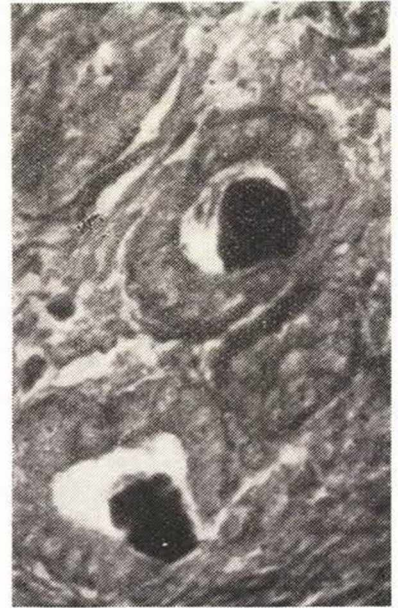
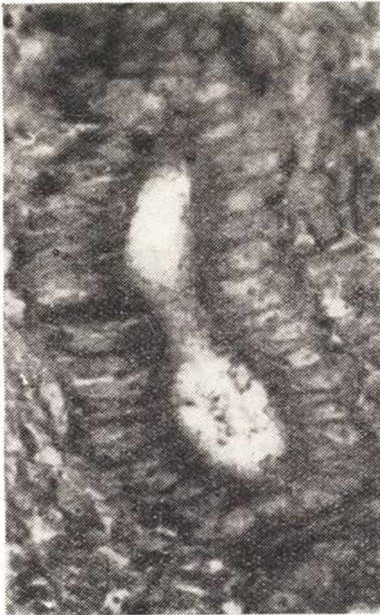


Abb. 10. Endometrium des Uterus. Anfang des Dioestrus nach zweitägigen Kaliumbichromatbehandlung. Paraffineinbettung. Mit Sudanschwarz B. gefärbt. 500 × Vergrößerung — Abb. 11. Endometrium des Uterus. Anfang des Oestrus nach zweitägigen Kaliumbichromat-behandlung Paraffineinbettung. Mit Sudanschwarz B. gefärbt. 300 × Vergrößerung

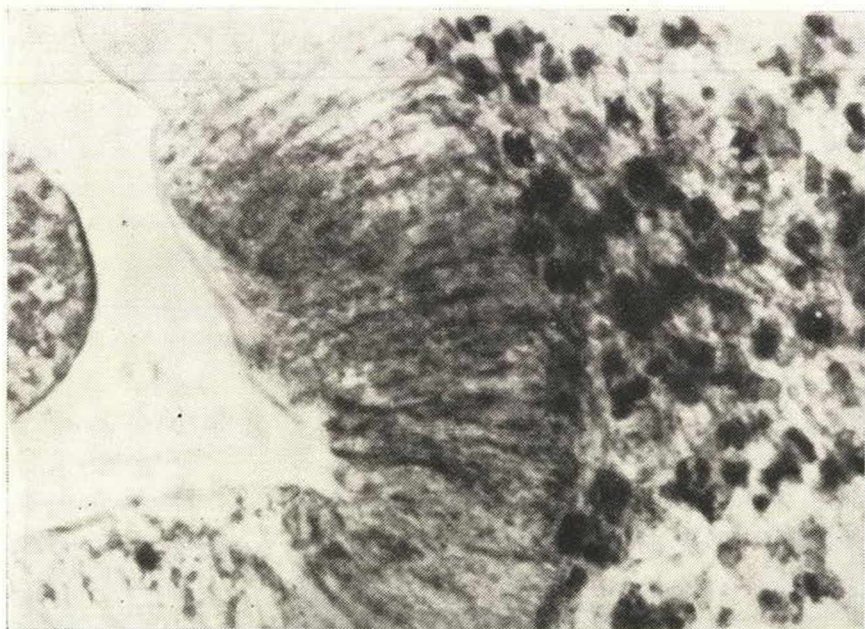


Abb. 12. Endometrium des Uterus. Prooestrus G.-Nadi-Oxydasereaktion. (Gräff)
720 \times Vergrößerung

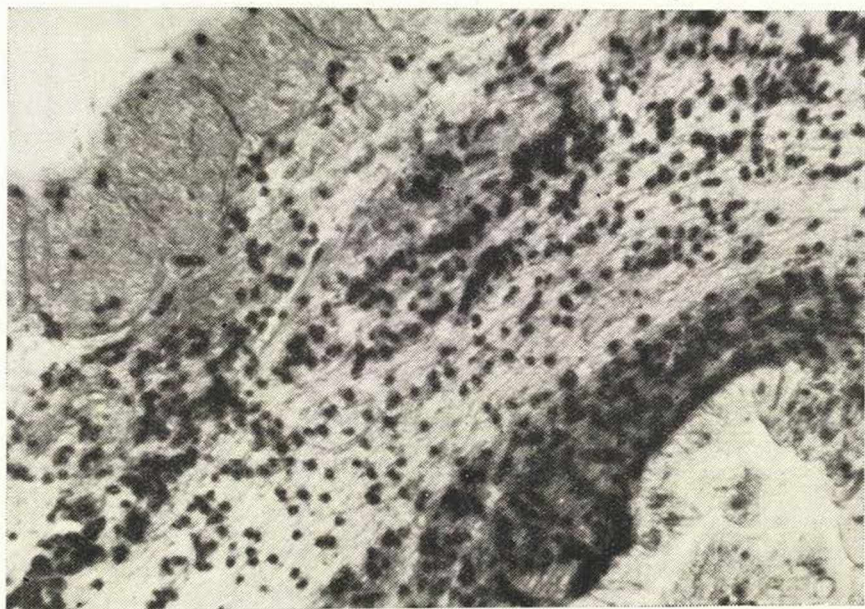


Abb. 13. Teil des Uterusquerschnittes. G.-Nadi-Oxydasereaktion (Gräff)
48 \times Vergrößerung

Anfang des Metroestrus ist im Lumen des Uterus und der Drüsen beinahe kein Sekret enthalten. Vom Anfang des Dioestrus an steigt jedoch die lipoidpositive Sekretion und erreicht ihr Maximum am Anfang des Oestrus (Abb. 11). Die Sekretion ist durchaus keine ausschliessliche Eigenschaft des Oestrus, Sekretionserscheinungen sind nämlich im ganzen Verlauf zu beobachten, ein Unterschied besteht lediglich im Ausmass der Sekretion.

Bei einer achttägigen Kaliumbichromat-Behandlung, wo auch die neutralen Lipide schon im Schnitt bleiben, ändert sich die Färbintensität des in den Drüsenlumina befindlichen Sekrets nicht, dagegen färbt sich das Sekret im Uterinallumen wesentlich besser mit Sudanschwarz B, als bei

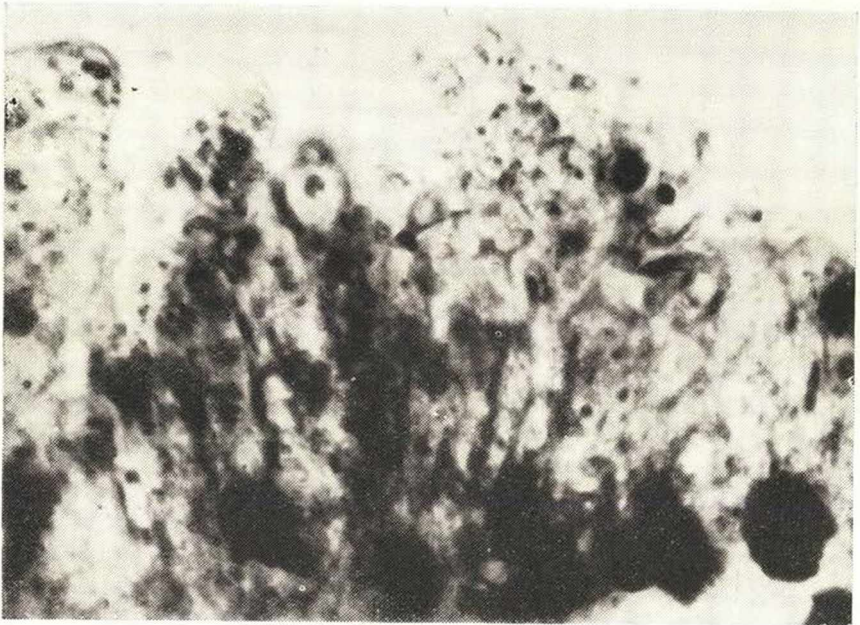


Abb. 14. Die das Uteruslumen auskleidende Epithelschicht Oestrus. G.-Nadi-Oxydase-reaktion (Gräff) 720 \times Vergrößerung

zweitägiger Kaliumbichromat-Behandlung. Folglich erzeugen die Drüsen lediglich phosphatidhaltige Stoffe, das Epithel des Uteruslumens erzeugt aber ausser den Phosphatiden auch neutrale Lipide. Dieser Umstand ist auch verständlich, da im Verlaufe der Zyklus die neutrale Lipoidtropfen in den das Lumen auskleidenden Epithelien zweimal verschwinden und zwar am Ende des Dioestrus und des Oestrus. Das vom Uterus im Oestrus entnommene Sekret färbt sich nach der Methode von ACKERMANN nach Essigsäure Behandlung besser mit Sudanschwarz B; ein Teil der im Uteruslumen befindlichen Lipide ist also lipoproteidartig. Im Lumen der Drüsen und des Uterus sind ausser dem Gesagten auch andere, nicht lipoidartige Verbindungen enthalten.

Cholesterin und Cholesterinester gelang mit in keiner Phase des Sexualzyklus nachzuweisen.

Ein besonderes Problem bedeuten die im Uterusstroma, ferner in der inneren Schicht des Myometriums zyklisch erscheinenden lipidhaltigen Zellen, die mit gewissen Lipoidfarbstoffen (Sudanschwarz B, Sudanrot 7 B) nachweisbar sind. Im allgemeinen werden sie für Mastzellen gehalten. Nach MOULONGUET sind sie aber keine Mastzellen, da sie sich mit Methylenblau nicht färben, ferner lassen sich die lipidpositiven Körnchen der Zellen mit Eisenhämatoxylin gut färben, mit Eosin aber nicht.

Die Körnchen werden von MOULONGUET für lipidhaltiges Pigment gehalten. Nach LAMS lassen sich wiederum diese Granula nach entsprechenden Fixierung auch mit Eosin färben. Er hält diese Zellen für ursprünglich eosinophile Granulozyten, die sich aus den Blutgefäßen in die Gewebe des Uterus tretend umwandeln, in dem die Segmentierung ihrer Kerne aufhört. Letzten Endes zerfallen diese Zellen. SEPELLI konnte diese lipidhaltigen Zellen im Uterus von Kaninchen, Meerschweinchen, Stachelschweinen, Fledermäusen und auch von Menschen nachweisen, ihre Rolle vermochte aber weder er, noch MIGLIAVACCA festzustellen.

Jedenfalls geben die lipidhaltigen Granula dieser Zellen eine den eosinophilen Zellen ähnliche Oxydase- und Peroxydase-Reaktion (Abb. 12, 13.). Bis zum Anfang des Oestrus nimmt die Zellmenge allmählig zu, dann wird ihre Zahl gegen das Ende des Oestrus stufenweise vermindert, weil sie degenerieren und zerfallen. Vom Anfang des Oestrus d. h. vom Zerfall der Zellen an erscheinen in den das Uteruslumen auskleidenden Epithelzellen oxydase-positive Lipidtropfen (Abb. 14.), welche dann in das Lumen des Uterus gelangen.

Beim Zerfall dieser Zellen dürfte wenigstens ein Teil der Granula als ein Komponent der Sekretion in das Uteruslumen gelangen. Die Verbindung der beim Zerfall der Zellen freigewordenen oxydasepositiven Körnchen mit der Sekretion des Uterus bedarf natürlich noch weiterer Beweise.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Uterus der infantilen Maus werden vom anderthalb bis zweiwöchigen Alter des Tieres angefangen von den das Lumen auskleidenden Epithelzellen und den Stroma-drüsen neutrale Lipide und Phosphatide gespeichert.

2. Der Uterus der infantilen Maus secerniert keine lipidhaltige Substanz.

3. Nach der Geschlechtsreife verschwinden nach und nach während des Dioestrus die neutralen Lipidtropfen der das Uteruslumen auskleidenden Epithelschicht und der Drüsen, im Prooestrus fehlen sie gänzlich, erscheinen aber wieder am Anfang des Oestrus um am Ende des Oestrus von neuem zu verschwinden. Das Verschwinden der Lipide steht mit der Sekretion in Verbindung.

4. In den gleichen Stellen werden auch Phosphatide gespeichert, diese zeigen aber nicht die Veränderungen der Sexualcyklus.

5. Im Uterus der infantilen und geschlechtsreifen Maus sind Cholesterin und Cholesterinester mittels histochemischen Methoden nicht nachzuweisen.

6. Die Zahl der im Stroma und in der Muskelschicht am Anfang des Dioestrus erscheinenden lipidhaltigen Zellen nimmt bis zum Ende des Prooestrus stufenweise zu, um nach dem Einsetzen der gesteigerten Sekretion bald zu zerfallen, so daß der Uterus am Ende des Oestrus Lipide kaum mehr enthält.

7. Die oxydasepositiven Granula der lipidhaltigen Bindegewebszellen gelangen im Oestrus vermutlich als Sekretkomponenten in das Lumen des Uterus.

8. Die Uterusdrüsen sezernieren Phosphatide, die das Lumen bedeckende Epithelschicht ausser den Phosphatiden auch neutrale Lipide. Über dies enthält das vom Uterus entnommene Sekret auch Lipoproteide und nicht lipidartige Verbindungen.

9. Zwischen der geweblichen Lokalisation der Uteruslipide und dem funktionellen Zustand der Uterus besteht ein enger Zusammenhang.

РЕЗЮМЕ

Результаты исследований обобщаем в следующем:

1. В эпителии матки и железах стромы инфантильных мышей, начиная с полтора-двух недельного возраста, накапливаются нейтральные липоиды и фосфатиды.
2. Липоидная секреция в инфантильных мышцах не обнаруживается.
3. После полового созревания, во время стадии покоя между двумя половыми циклами, постепенно исчезают, в предтечку полностью отсутствуют, а в начале течки снова появляются нейтральные липоидные капли в железах и слизистой оболочке, выстилающей просвет. В конце течки нейтральные липоиды снова исчезают, что — вероятно — находится в связи с секрецией.
4. Встречающиеся вместе с нейтральными липоидами фосфатиды не обнаруживают изменений, связанных с половым циклом.
5. Ни в матке инфантильных, ни в матке половозрелых мышей не удалось гистохимическими методами обнаружить холестерина или холестеринэфира.
6. Количество липоидсодержащих клеток, появляющихся в строме и в мышечном слое в начале стадии покоя между двумя половыми циклами, увеличивается до конца предтечки, а с наступлением секреции эти клетки распадаются.
7. Оксидаз-положительные гранулы липоидсодержащих клеток соединительной ткани в процессе течки вероятно являются компонентами секреции.
8. Железы матки выделяют фосфатиды, а слизистая оболочка, выстилающая просвет, выделяет фосфатиды и нейтральные липоиды. В выделениях к последним присоединяются линопротеиды и нелипоидоподобные элементы.
9. Установлена зависимость между тканевой локализацией имеющихся в матке липоидов и функциональным состоянием матки.

SCHRIFTTUM

1. ACKERMANN, G. A.: A modification of the Sudan Black B technique for the possible Cytochemical demonstration of masked Lipids. *Science*, 115, 629—631 (1952).
2. BOURY, R.: Un test nouveau des modifications spontanées et provoquées de l'oestrus chez la souris. (*C. R. Soc. Biol. Paris*, 1929, p. 102, 592—593.)
3. FLASCHENTRÄGER, B.: *Physiologische chemie I*. Berlin, 1951, pp. 1600.
4. HARRISON, R. G. and A. J. CAIN: Variations in the distributions of lipids in the adrenal cortex of the albino rat. (*J. of Anat.* 81. 1947, p. 286—299.)
5. HOERR, NORMAND LOUIS: Histological studies on lipids. I. Osmium acid as a microchemical reagent with special reference to lipids. (*Anat. Rec.*, 66, 1936, p. 149. 171.)
6. LAMS, H.: Infiltration de globules blancs éosinophiles dans l'uterus, l'oviducte et l'ovaire de la Rate. (*C. R. Soc. Biol. Paris*, 92. 1925, p. 1338—1340.)
7. MIGLIAVACCA, ANGELO: Sur les cellules interstitielles a lipochrome de l'uterus. (*C. R. Ac. Sci. Paris*, 191. 1930, p. 442—451.)
8. MOULONGUET, P.: Sur la présence dans l'uterus de la femelle du rat, de cellules granuleuses „eosinophiles”. (*C. R. Soc. Biol. Paris*, 91. 1924, p. 1385—1386.)
9. REESE, I. D.: Cyclic variation in certain osmophile granules in the rat uterus. (*Anat. Rec.* 48. 1931, p. 55—62.)
10. ROULET, F.: *Methoden der Pathologischen Histologie*. 199. (1948.)
11. SEPPILLI, ALESSANDRO: Cellule a contenuto lipoide di connettivo uterino. (*Arch. Ital. Anat. Embr.* 24. 1927, p. 352—405.)
12. SCHWEOZER, MALVINA, and M. E. LONG: Partial maintenance of the adrenal cortex by anterior pituitary grafts in fed and starved Guinea pigs. (*Endocrinology*, 46. 1950, p. 191—206.)