

3. Als chemischen Reiz dürfte das qualitativ wie quantitativ veränderte Sekret der Basedowschilddrüse, vielleicht auch die Jodmedikation, wirken. An anderen Kropfbildungen und bei Geschwülsten des Organs ist ein mechanischer Reiz vorauszusetzen, bei chronischer Thyreoiditis ein entzündlicher.

4. Ich konnte die Herdbildungen in 75% aller Basedowschilddrüsen, aber nur in 15% anderer Strumen antreffen.

5. Auch in unvergrößerten, makroskopisch normal erscheinenden Schilddrüsen finden sich öfter solche Herde. Sie kommen ganz wesentlich häufiger beim weiblichen Geschlecht vor, sind äußerst selten vor der Pubertät anzutreffen und werden mit zunehmendem Alter häufiger. Bevorzugt sind anämische Personen und ganz besonders häufig fette Individuen. Eine genügende Erklärung für diese Tatsache ist nicht zu geben.

V.

Beobachtungen an Gewebskulturen in Vitro.

(Aus dem Departement of Pathology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York.)

Von

Robert A. Lambert, M. D. und Frederick M. Hanes, M. D.

(Hierzu 16 Textfiguren.)

I.

In den letzten beiden Jahren haben wir von Zeit zu Zeit von den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen an in vitro gezüchteten Geweben berichtet. Anfangs waren unsere Resultate notwendigerweise unvollständig, denn die Methode war neu und Erfahrung fehlte. Aber dank der Zunahme unserer eigenen Vertrautheit mit der Methode und gefördert durch die Resultate anderer sind manche der die von uns verfolgten Probleme betreffenden Einzelheiten klar geworden. Wir möchten daher in dieser Arbeit einen vollständigeren Bericht, als es bisher möglich war, über unsere Ergebnisse erstatten und zugleich auf die zahlreichen Unzulänglichkeiten hinweisen, die weiterer Untersuchung bedürfen.

Historisches.

Die Methode, Gewebe in vitro zu züchten, verdanken wir Prof. R. G. Harrison von der Yale-Universität, der 1907 die erfolgreiche Züchtung der Gewebe des Froschembryos in Froschlymphe berichtete. Die Lymphe wurde aus den dorsalen Lymphsäckchen ausgewachsener Frösche gewonnen, kleine Stücke des Embryo wurden in hängenden Tropfen des Mediums suspendiert, das sofort danach gerann. Prof. Harrison untersuchte besonders das Herauswachsen von Nervenfasern aus Nervenzellen.

Burrows modifizierte, als er in Prof. Harrisons Laboratorium arbeitete, 1910 die Methode durch Ersetzung der Lymphe durch Blutplasma als Kulturmedium. Diese wichtige Änderung erweiterte sehr das Anwendungsgebiet der Methode, indem sie die Züchtung *in vitro* der Gewebe praktisch fast aller Warmblüter möglich machte. Bei seinen Untersuchungen gebrauchte Burrows Hühnerplasma als Kulturmedium für die Gewebe des Hühnerembryos. In der Folge wandten Carrel und Burrows die Technik von Harrison und Burrows beim Wachsenlassen von Geweben verschiedener Säugetiere an, wobei sie in jedem Falle homologes Plasma als Kulturmedium benutzten. Nach den Veröffentlichungen von Carrel und Burrows wurde die Arbeit der Gewebszüchtung von einer Anzahl Forscher (Lambert und Hanes, Lewis und Lewis, Loeb und Fleischer, Whipple und McWhorter, Oppel, Hodara, Braus, Ingebrigtsen, Ruth) aufgenommen, die die erfolgreiche Anwendung der Methode bei verschiedenen Fragen berichten, nebst Vorschlägen betreffs Verbesserung der Technik. Der Raum gestattet keinen kritischen Rückblick auf die Arbeit dieser Autoren, wenn auch auf einige der Arbeiten im Laufe dieses Berichts über unsere eigene Tätigkeit verwiesen werden soll. Am Schlusse dieser Arbeit ist ein völliges Literaturverzeichnis der Arbeiten über Gewebskultur hinzugefügt, auf die der interessierte Leser verwiesen sei.

Die Methode der Gewebszüchtung *in vitro* hat das Stadium der zögernden Aufnahme überwunden. An anderer Stelle haben wir das gewichtige Beweisstück besprochen, das, wie wir denken, in überzeugender Weise zeigt, daß die bei *in vitro* wachsenden Geweben auftretenden Erscheinungen völlig den im Organismus selbst beobachteten und entsprechenden vergleichbar sind. Sorgfältiges kritisches Studium der Methode hat uns von ihrer großen Nützlichkeit und Verlässlichkeit überzeugt, und diese Ansicht wird von allen jenen geteilt, die die Methode ernsthaft angewandt haben. Unsere eigene Arbeit hat eine ziemlich große Reihe von Problemen eröffnet, aber diese Probleme sind durch eine biologische Einheit zusammengefaßt, die ihre zusammenhängende Darlegung in einer einzelnen Arbeit erlaubt. Nach einer kurzen Besprechung der Technik werden wir zunächst die morphologischen Eigenschaften der im homologen Plasma wachsenden Gewebe betrachten, zusammen mit gewissen physikalischen Faktoren, welche verschiedentlich das Wachsen von Geweben *in vitro* beeinflussen. Das Gewebswachstum im heterologen Plasma wird als Nächstes behandelt werden, und schließlich werden die Resultate dargestellt werden, die an Geweben erhalten wurden, die in biologisch modifiziertem Plasma (Zytotoxine, Immunitätskörper) wuchsen.

II.

Die Technik.

Die Bereitung von Gewebeskulturen ist, nachdem das Blutplasma oder die Lymphe gewonnen ist, wunderbar einfach. Bei gewissen Tierarten indessen hat

sich einige Schwierigkeit ergeben, Plasma von dem zentrifugierten Blute zu gewinnen, bevor Gerinnung eingetreten ist. Diese Schwierigkeit wird zunächst dadurch überwunden, daß man sorgfältig eine Beschmutzung des Blutes mit Gewebssäften vermeidet und zweitens, indem man Blut und abgeegossenes Plasma auf niedriger Temperatur hält. Um Blut frei von Gewebssäften zu halten, kann man eine geölte oder paraffinierte Kanüle verwenden (Burrows, Carrel und Burrows). Dies Verfahren ist jedoch bei sehr kleinen Tieren wie Mäusen, Ratten und jungen Meerschweinchen wegen der Kleinheit ihrer Gefäße nicht praktisch. Wir ersannen deshalb eine Methode, die der Notwendigkeit, eine Kanüle zu benutzen, vorbeugt. Die Technik ist folgende:

Die Carotis wird freigelegt und längs ihrer ganzen Halsstrecke von ihrer Scheide getrennt; zwei kleine, feinzackige Klemmen werden, die eine am distalen Ende des Abschnittes, die andere proximal angebracht. Die Gefäßwand wird zwischen den Klemmen mit sehr feingeriefter Zange gehalten, so daß das Lumen nicht verschlossen ist. Das Gefäß wird dann nahe dem distalen Ende durchgeschnitten, das abgeschnittene Ende wird durch die Zange vom umgebenen Gewebe emporgehoben, die proximale Klammer wird gelöst und das Blut kann in paraffinierte Glasröhren spritzen, die in Eis innerhalb weiter Zentrifugenbecher liegen. Das Plasma und die korpuskulären Elemente werden durch Zentrifugierung unter hoher Geschwindigkeit in wenigen Minuten gesondert.

Bei Anwendung dieser Technik haben wir von einer 20 g-Maus Plasma gewonnen, das zur Herstellung von 10 bis 20 hängenden Tropfenkulturen genügt. Wenn das Plasma auf niedriger Temperatur gehalten wird, kann es in flüssigem Zustande für eine Stunde bis zu Tagen oder Monaten konserviert werden, was von der Tierart abhängt, von der es stammt. Menschliches, Kaninchen- und Taubenplasma z. B. können scheinbar beinahe unbegrenzt lange flüssig erhalten werden, während Rattenplasma trotz aller Vorsichtsmaßregeln binnen einer oder zwei Stunden gerinnt. Menschliches Blut wird am bequemsten mittels einer Nadel, die vorher in destilliertem Wasser gekocht wurde, aus einer oberflächlichen Arm- oder Vorderarmvene gewonnen. Bei Ziegen wird dasselbe Verfahren eingeschlagen, indem man entweder die Jugularis oder die oberflächlichen, das Bein oberhalb des Knies kreuzenden, vorspringenden Venen benutzt.

Bei kleinen Tieren einschließlich der Hühnerembryonen kann man anstatt der Methode des direkten Ausflusses aus dem Gefäß, wie sie oben beschrieben wurde, seine Zuflucht zur Blutentnahme aus dem Herzen nehmen. Zu diesem Zwecke wird eine Nadel von ziemlich großem Kaliber gebraucht, die in destilliertem Wasser sterilisiert wurde, wie beim Blutentlassen aus Oberflächenvenen. Bei Ratten und Mäusen bedeutet dies Verfahren gewöhnlich die Opferung des Tieres, ein ernster Nachteil in manchen Fällen, wie z. B. bei Immunitätsuntersuchungen, wo es wünschenswert sein kann, verschiedene Male Blut vom selben Tiere zu gewinnen.

Nachdem man sich das Plasma verschafft hat, werden kleine Tropfen davon auf sterile Deckgläschen gebracht und fein zerteilte Gewebsstücke (0,5 bis 1,0 mm im Durchmesser) dazugesetzt. Die Deckgläschen werden über in ganzer Breite hohlgeschliffene Objektträger umgestürzt und mit Vaseline verschlossen. Die

Objektträger werden dann in einen Brutschrank von 37° C gestellt. Ein gewärmter Mikroskopschrank wird für folgende Untersuchungen bereit gehalten. Es ist nicht notwendig, das Gewebe während der Zerteilung warm zu halten. Das Zerzupfen kann man in einem Gefäß mit Ringerscher Lösung vornehmen, um ein Austrocknen zu verhüten.

III.

Morphologische Charakteristika in vitro wachsender Zellen.

Der morphologische Charakter, den ein in vitro wachsendes Gewebe annimmt, entspricht ziemlich genau den von dem Gewebe im Körper selbst gezeigten Wachstumstyp. Gewebe des Bindegewebstyps wachsen in einer von Epithelgeweben sehr verschiedenen Weise. Wir wiesen zuerst auf den schlagenden Gegensatz im Charakter des Gewebswachstums in vitro zwischen epithelialen Tumoren und Bindegewebstumoren von Ratten und Mäusen hin und gaben der Meinung Ausdruck, daß diese beiden Typen verallgemeinert den Wachstumscharakter in vitro der entsprechenden normalen Gewebe darstellt. Unsere weitere Erfahrung mit dem Wachstum gewisser Organe (Milz, Knochenmark, Eierstock, Blutgefäße) von Ratten, Mäusen und Meerschweinchen, und verschiedenen Geweben des Hühnerembryos (Haut, Darm, Herz, Leber und Milz) bestätigen in weitgehender Weise diese Ansicht.

Bindegewebs- und epithelialer Wachstumstyp.

Das Wachsen in vitro von Bindegewebs- und epithelialen Tumoren von Ratten und Mäusen liefert ausgezeichnete Beispiele des Wachstums in vitro von epithelialen und Bindegeweben überhaupt und kann als Typus beschrieben werden. Wird eine Kultur von Ratten- oder Mäusesarkom frisch bereitet unter dem Mikroskop untersucht, sieht man die Ränder des eingepflanzten Gewebes scharf begrenzt; das Gewebe ist gleichmäßig dicht und undurchsichtig. 6 bis 12 Stunden später sind die Ränder des Gewebes dick besetzt mit vorspringenden Zellen (Textfig. 1) und man kann sehen, wie viele isolierte Zellen mit sehr unregelmäßigen Konturen in das umgebende Plasma hinübergegangen sind. Das Gewebe selbst macht den Eindruck, weniger kompakt und durchsichtiger zu sein als bisher. Die Zellenzahl im Plasma wächst jetzt von Stunde zu Stunde, und zugleich wird die ursprüngliche Gewebsmasse immer lockerer in ihrem Zusammenhange und ihre Ränder gehen unmerklich in radiäre Stränge von Zellen über, die in das umgebende Plasma vordringen.

Die so in das Plasma vordringenden Zellen tun es durch amöboide Bewegungen. Prüft man mit stärkeren Vergrößerungen die im Plasma liegenden Zellen, so sieht man, daß sie zahlreiche und unregelmäßige Pseudopodien besitzen. Jedes Pseudopodium endet in verschiedene fadenförmige Fortsätze, die von Zeit zu Zeit aus-

geworfen und zurückgezogen werden. Dann und wann verbreitert sich einer dieser feinen Fortsätze und wird rund wie die Zytoplasmastreifen in ihm. Mittels dieses Mechanismus wandern die Zellen weiter und weiter in das Plasma hinein und manche dringen ganz bis zum Ende des Plasmaklumpchens vor.

In einem der Mäusesarkompräparate konnte man mittels genauer Messungen

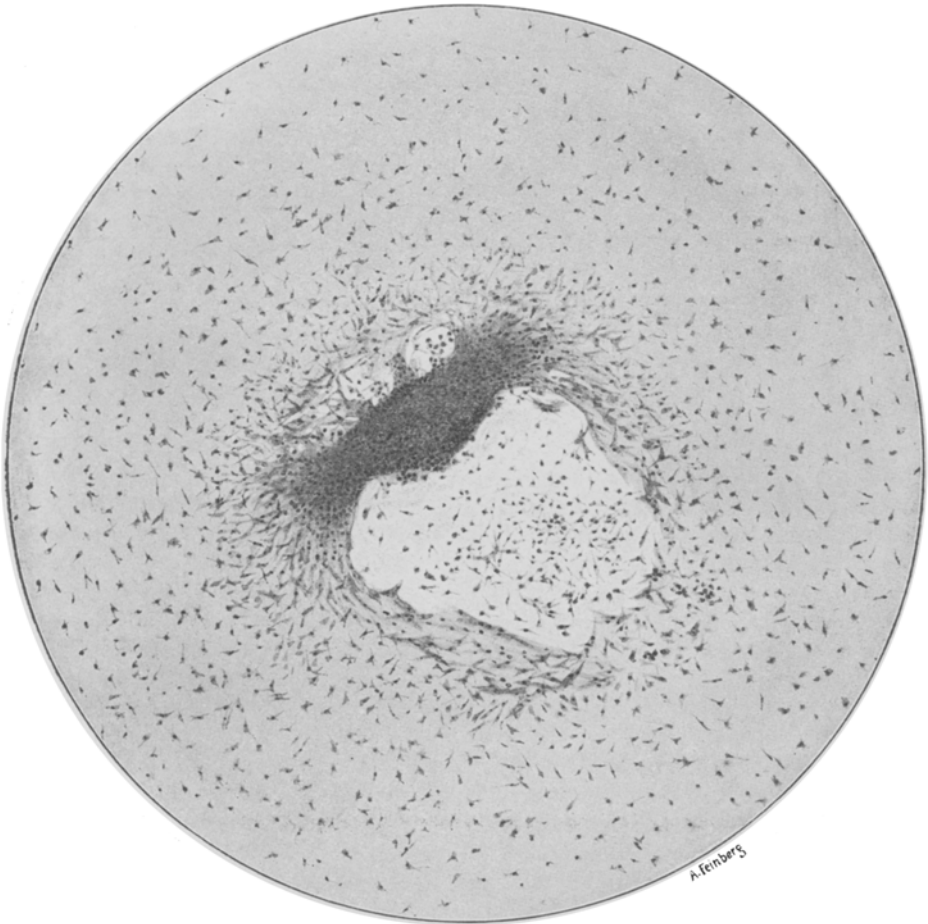


Fig. 1. Rattensarkom nach dreitägiger Züchtung in Rattenplasma, zeigt das charakteristische Wandern der Zellen durch das Plasma. Auf einer Seite des ursprünglichen Gewebstückes sieht man einen Spaltraum, in dem Fibrin fehlt. Die in diesem Bezirk sichtbaren Zellen sind dem Deckgläschen adhärent, über das sie sich schnell fortbewegen.

feststellen, daß einige der Zellen in 48 Stunden über eine Strecke von 6 mm in das Plasma hinauswanderten.

Das Wachsen von Epithelgeweben *in vitro* unterscheidet sich in hohem Grade von den Typen, die wir als charakteristisch für Bindegewebe beschrieben haben. Das Wachstum von Mäusekrebs *in vitro* dient sehr schön als Wachstumstyp von Epithelgeweben überhaupt. Nach 24 stündigem Wachstum bietet eine Krebs-

kultur den folgenden Anblick: Das ursprüngliche Stück eingebetteten Gewebes ist dünner und durchscheinender geworden infolge Ausbreitung der Zellen nach allen Seiten. Diese Zellen indessen wandern nicht einzeln in das Plasma hinein, wie es die Zellen des Bindegewebstypus tun, sondern bewegen sich nach außen in

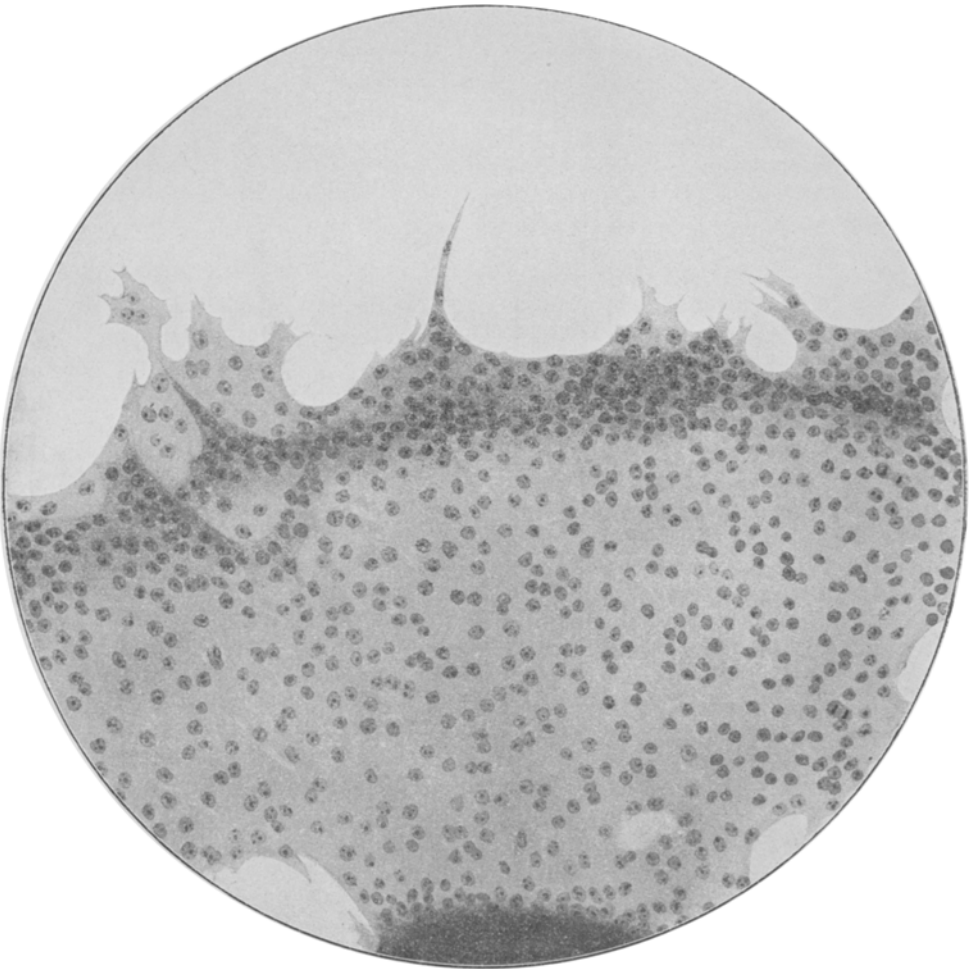


Fig. 2. In vitro 4 Tage lang gezüchteter Mäusekrebs.

Man sieht einen schmalen Rand des ursprünglichen Gewebstückes mit dem charakteristischen schichtenartigen Wachstum von Zellen, die nach außen von ihm vordringen. Die Schicht zeigt einen unregelmäßigen Rand, in welchem die Zellen aufgehäuft sind. Die Randzellen zeigen zahlreiche Pseudopodien, durchdringen das Plasma in verschiedenen Höhen. Zwei Mitosen sind sichtbar.

einer zusammenhängenden Schicht, die nur eine Zelle dick ist. Der vordringende Rand des gewachsenen Gewebes setzt sich aus einer sehr zarten Schicht von Cytoplasma zusammen, das amöboide Formveränderungen nebst zahlreichen Pseudopodien zeigt (Textfig. 2). Die Grenzen der die Schicht wachsenden Epithels

bildenden Zellen können nicht deutlich unterschieden werden; auch besteht eine Anhäufung von Zellen gerade hinter den vordringenden hyalinen Rand von Zytoplasma. Dann und wann werden Massen von Epithelzellen von den breiteren Schichten detachiert und fahren fort, gruppenweise in das Plasma hineinzuwachsen (Textfig. 3). Sie wachsen indessen selten als einzeln detachierte Zellen, und das unterscheidet sie scharf von Bindegewebszellen. Das *in vitro* Wachstum von Epithel und Bindegewebe stimmt mit bemerkenswerter Genauigkeit mit den Wachstumstypen überein, die im Organismus für diese Gewebe charakteristisch sind.

Wir haben an anderer Stelle (11 c) nachdrücklich die große Bedeutung betont, die der Fähigkeit der Tumorzellen, durch amöboide Bewegung zu wandern, zu-

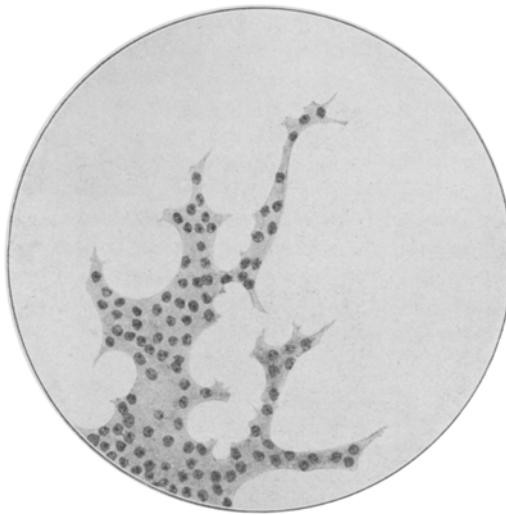


Fig. 3. Ein kleiner Abschnitt des wachsenden Randes einer Mäusekrebskultur. Sie zeigt Invasion des Plasmaklümpchens durch kompakte Gruppen von Zellen. Das alveoläre infiltrative Wachstum von Krebs im Körper wird nachgeahmt.

kommt, und haben darauf hingewiesen, daß das invasive Wachstum und die metastatische Aussaat maligner Tumoren im Körper allein durch die unabhängige Ortsbewegung von Tumorzellen erreicht werden kann.

Organe von reinem Bindegewebstypus wie die Milz, das Knochenmark und die Blutgefäße zeigen niemals den scheibenartigen epithelialen Wachstumstyp; die Zellen bleiben getrennt oder in losen Strängen (Textfig. 4). Kulturen von Haut und Darm zeigen ganz konstant den epithelialen Wachstumstyp, breite Zellschichten, die sich nach allen Richtungen vom eingepflanzten Gewebe aus verbreiten (Textfig. 5 und 6). Kulturen von Leber und Herz zeigen nur den Bindegewebstyp des Wachstums. Im allgemeinen sei bemerkt, daß Bindegewebe reichlicher wächst als Epithel, und daß die Parenchymzellen spezialisierter Organe wie Pankreas, Leber oder Niere in der Regel nur leichte Andeutungen von Wachstum zeigen.

Die Erscheinung amöboider Wanderung ist eine solch überraschende Eigen-

schaft des Gewebswachstums in vitro, daß wir zuerst im Zweifel waren, ob die Zellen im Plasma wirklich in höherem Grade an Zahl zunehmen durch karyokinetische Zellteilung, oder ob sie nur aus dem eingebetteten Gewebe ausgewandert seien. Es ist wahr, daß fixierte und gefärbte Präparate eine größere oder kleinere Zahl in Mitose begriffener Zellen zeigten, aber diese waren nicht immer reichlich;

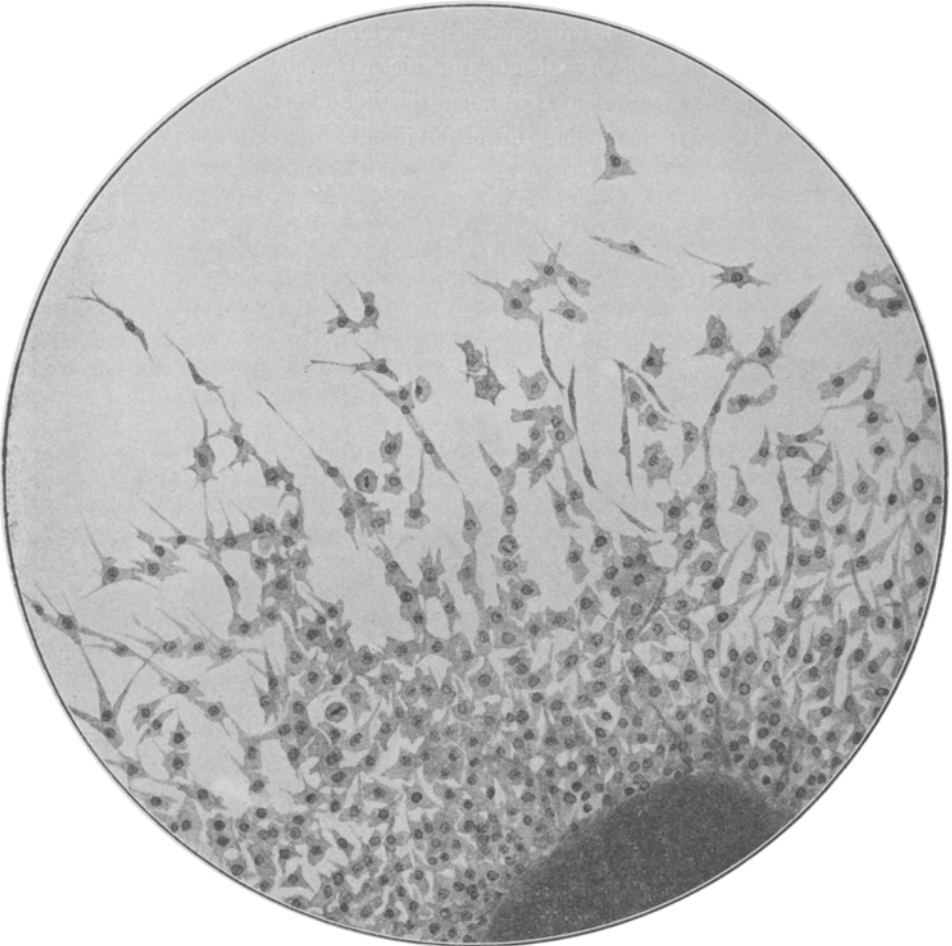


Fig. 4. Bindegewebswachstum von Rattenblutgefäßgewebe am 15. Tage des Wachstums in vitro (zweite Übertragung). Der Wachstumstyp erinnert sehr an den von Sarkom. Man kann drei Mitosen erkennen.

in der Folge indessen lernten wir in lebenden wachsenden Kulturen Zellen zu identifizieren, die in mitotischer Teilung begriffen waren, und die Zahl dieser in einem einzigen Präparat ist oft überraschend groß (Textfig. 7).

Zellteilung. Der ganze Prozeß karyokinetischer Zellteilung ist leicht zu verfolgen, wenn die Präparate mit dem Mikroskop in einer warmen Kammer untersucht werden. Die Zelle, die eine Teilung durchmachen soll, zieht gewöhnlich

ihre Pseudopodien zurück und wird kugelig, die Kernsubstanz ist von dem Zellsplasma durch ihre etwas größere Brechkraft unterscheidbar und die einander folgenden Veränderungen in ihrer Anordnung sind mit dem Fortschreiten der Karyokinese ohne Schwierigkeit zu beobachten.

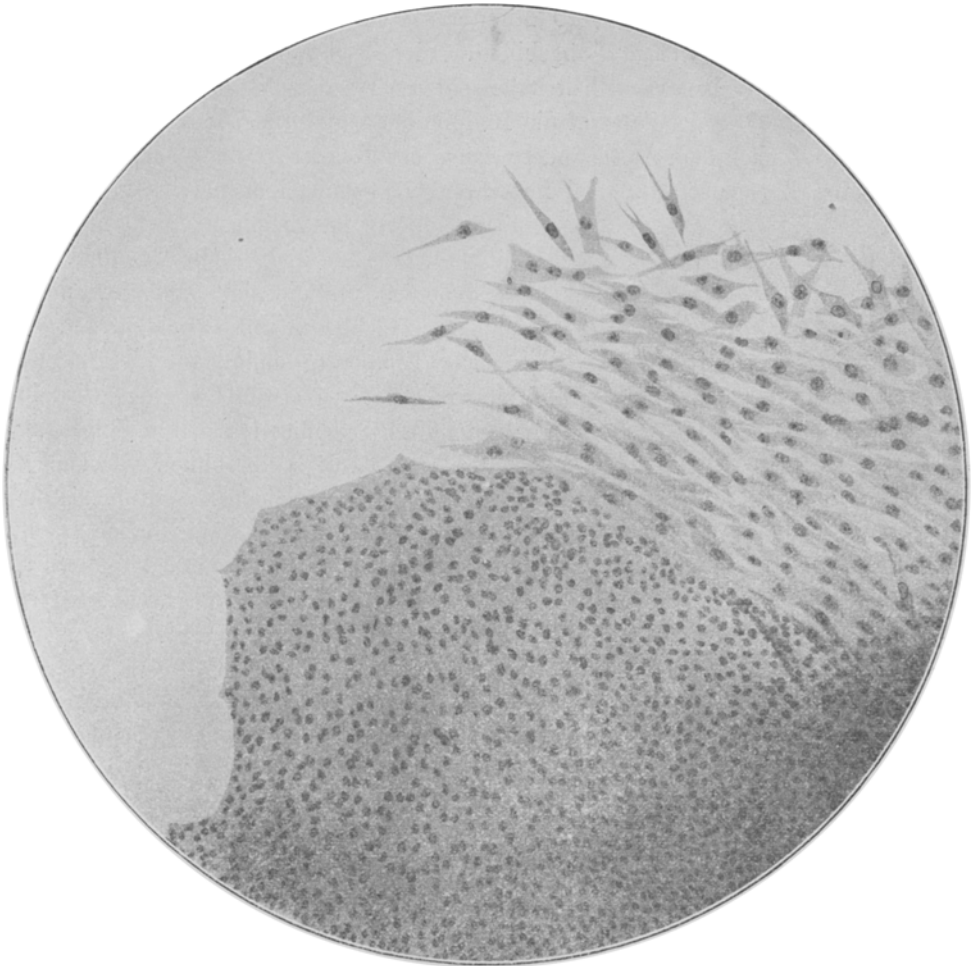


Fig. 5. Viertägige Kultur von Hühnerembryonendarm in Taubenplasma, der Epithel- und Bindegewebswachstum zeigt. Die kompakte Schicht von epithelialen Zellen ist nicht unähnlich der in Kulturen von Krebs beobachteten (Fig. 2).

Eine Zelle, die sehr lange protoplasmatische Ausläufer besitzt, zieht diese nicht immer während der Teilung zurück. Der Zellkörper indessen nähert sich beinahe immer einer ovalen Form; die Ausläufer, bedeutend zurückgezogen, strahlen von der Zelle aus. Nach der Teilung fließt dann das Zytoplasma in die Ausläufer zurück und bringt sie auf ihre ursprüngliche Größe. Die Schnelligkeit der Zell-

teilung ist merklich durch die Temperatur beeinflußt, unter welcher das Präparat gehalten wird, ebenso bestehen Schwankungen in der für die Teilung beanspruchten Zeit bei den Zellen verschiedener Art. Die Bindegewebszellen der Katze teilen sich in 15 bis 30 Minuten bei 37° C, während die Bindegewebszellen der Ratte 25 bis 45 Minuten erfordern, in der Regel, um den Prozeß bei dieser Temperatur auszuführen. Zeichnungen in 10 Minutenintervallen von einer sich teilenden Rattenzelle sind in Textfig. 8 abgebildet. Vier Zeichnungen in 5 Minutenintervallen (Textfig. 9) zeigen Einzelheiten der späteren Teilungsphasen. Es sei bemerkt, daß der größere Teil der Zeit auf die Bildung der äquatorialen Scheibe verwandt wird, und daß nach dem Auseinanderweichen der Tochterchromosomenmassen die Teilung des Zytoplasmas schnell fortschreitet. Unmittelbar nach der Teilung,

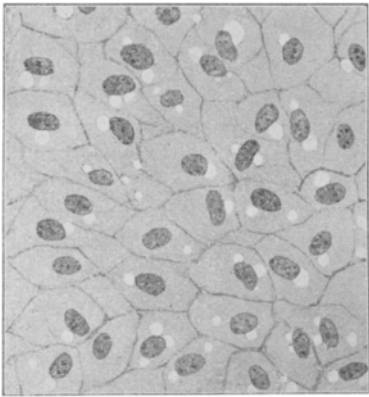


Fig. 6. Eine stark vergrößerte Partie des epithelialen Auswachsens in Fig. 5. Die Zellränder sind sehr deutlich. Man bemerkt große Fettkugeln in den Zellen.

mitunter bevor das Zellplasma sich völlig geteilt hat, werfen die beiden Tochterzellen Pseudopodien aus und sind bald nicht mehr von ihren Nachbarn unterscheidbar.

Der Temperatureinfluß auf die Art der Teilung, der oben erwähnt wurde, wird in einem andern Teile dieser Arbeit ausführlicher erörtert werden. Es gibt ohne Zweifel noch andere Faktoren als die Temperatur, die die Teilungsart beeinflussen. Wir haben beobachtet, daß in ungesunden und kümmerlich wachsenden Kulturen der Prozeß verzögert ist. Auch haben wir bemerkt, daß ungewöhnlich große Zellen eine längere Zeit zur Teilung beanspruchen, als es kleinere Zellen desselben Typs tun. Wir sahen indessen, daß die von den Zellen einer gesunden

aktiv wachsenden Kultur für ihre Teilung beanspruchte Zeit überraschend konstant innerhalb gewisser Grenzen ist. Wir haben z. B. im Laufe zweier Stunden Beobachtungen über 12 sich teilende Zellen in zwei Katzenblutgefäßkulturen eingetragen, die unter 37° gehalten wurden. Die zwischen dem Auseinanderweichen der Tochterchromosomenmassen und der völligen Teilung des Zytoplasma vergehende Zeit — ein leicht im Prozeß festzustellender Punkt — betrug im Mittel $5\frac{1}{3}$ Minuten. Die längsten und kürzesten Perioden waren $4\frac{1}{2}$ bzw. $6\frac{1}{2}$ Minuten.

In einem einzigen Präparat haben wir 100 Zellen gezählt, die eine gleichzeitige Teilung durchmachten. Da eine Mitose in der Regel in 15 bis 30 Minuten vollendet ist, so ist leicht einzusehen, daß eine starke Zunahme in der Zellzahl in solchen Kulturen stattfinden muß.

Die Zellteilung, wie wir sie in Gewebeskulturen beobachtet haben, ist deutlich mitotisch. Wir haben zahlreiche Präparate nach ihrer Beobachtung im frischen

Zustande gefärbt, um unsere Auslegung der verschiedenen Phasen der Karyokinese, wie sie in lebenden Zellen beobachtet wurde, zu stützen. Sorgfältige Durchsichtung sowohl frischer wie gefärbter Präparate hat keinen endgültigen Beweis dafür erbracht, daß die Zellen sich durch Amitose teilen, obschon wir in multinukleären Zellen gewisser Typen Figuren gefunden haben, von denen wir überzeugt

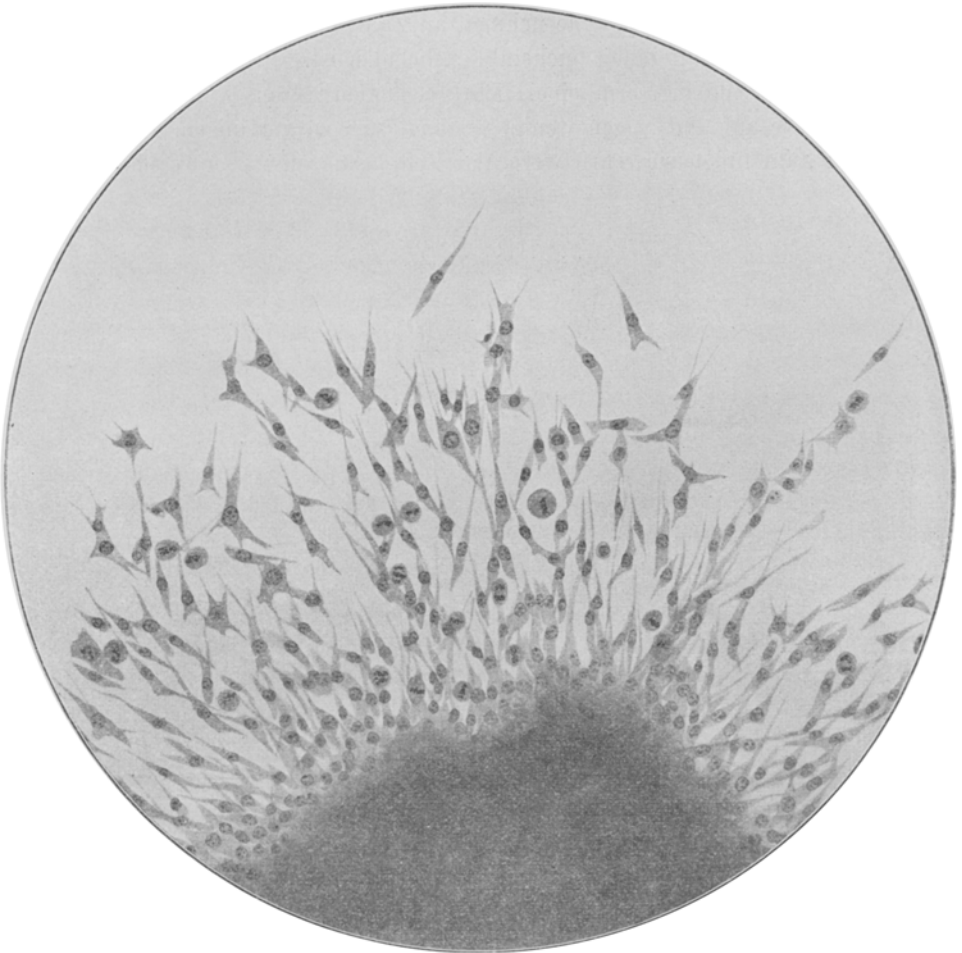


Fig. 7. Rattensarkomkultur in Taubenplasma nach 2 Tagen. Der charakteristische strahlenförmige Wachstumstyp ist gut dargestellt. 18 Mitosen sind sichtbar.

sind, daß sie als eine Kernsprossung anzeigend aufzufassen sind (Textfig. 14). Zellen dieses Typs wurden am häufigsten in Tumorkulturen gesehen.

Die folgende Beobachtung zeigt, daß die zweikernigen Zellen, die öfters in Kulturen von Geschwulst sowie von normalem Gewebe vorkommen, durch mitotische Teilung, ohne Teilung des Zellplasma, zustande kommen können. Es handelt sich nämlich um eine Zelle, welche in der Wärmekammer beobachtet, eine typische Karyokinese durchmachte. Doch folgte darauf keine Teilung des Zellplasma. Eine halbe Stunde später zeigte sich wiederum Pseudopodien-

bildung. Jetzt wurde das Präparat fixiert und gefärbt, wobei man wahrnehmen konnte, daß die Zelle zwei Kerne besaß.

Fettanhäufungen. Eine sehr überraschende Eigenschaft in vitro wachsender Zellen ist die rasche Anhäufung von Fettkörnchen im Zellplasma. Zahlreiche lichtbrechende Tröpfchen erscheinen im Zellplasma von Zellen, die aktive amöboide Bewegungen zeigen. Diese Tröpfchen färben sich glänzend mit Sudan III und sind isotrop. Sie nehmen an Zahl mit dem Alter der Zellen zu, bis das Zytoplasma mit ihnen buchstäblich beladen ist. Sie treten zuerst in der Peripherie der Zelle in Form eines lichtbrechenden Saums von Tröpfchen der gleichen Größe auf und zeigen wenig Neigung, sich zu vereinigen. Mit der Zunahme an Zahl füllen sie schrittweise das Zellplasma aus, aber es bleibt immer

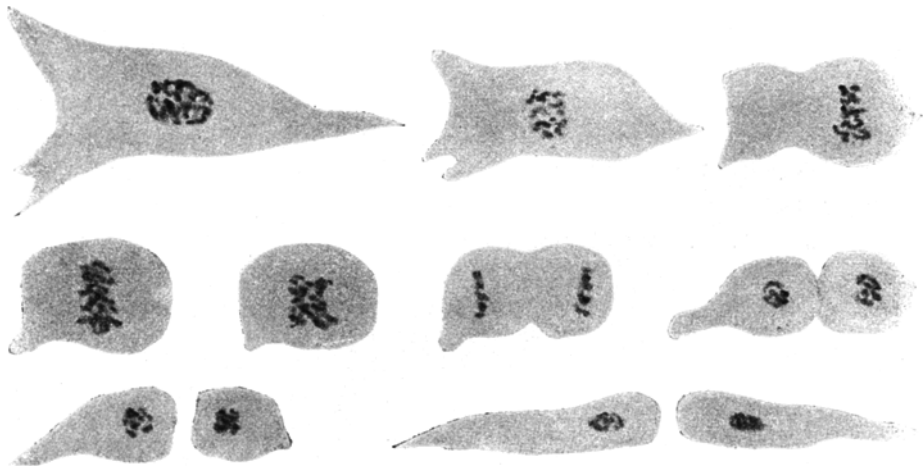


Fig. 8. 9 Beobachtungen in 10 Minuten-Intervallen eines Rattenbindegewebes während des Teilungsprozesses (warme Kammer, 34°C). Eine Zelle von 78 Tage alter Kultur; alle Phasen sind sichtbar. Man beachte die Zurückziehung von Pseudopodien mit kompakter Form, die während früherer Phasen angenommen wurde.

eine Zone um den Kern herum frei. Werden passende Präparate von wachsenden Zellen fixiert und nach Altmanns Methode zur Darstellung von Zellgranula gefärbt, so sieht man, wie das den Kern umgebende Zytoplasma, das bis dahin keine Fettröpfchen enthielt, mit Zellgranula erfüllt ist, und diese Körnchen zeigen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit in ihrer Anordnung mit den peripherischen Fettröpfchen (Textfig. 10). Man kann sich nicht dem Eindruck entziehen, daß die Zellgranula die Vorläufer der Fettröpfchen sind, und daß sie direkt mit der Assimilation des Fettes zu tun haben. Der Begriff dieser „granulären Fettsynthese“ wurde zuerst von Altmann und seinen Schülern aufgestellt und hat eine Stütze durch die Arbeit von J. Arnold und vielen andern erhalten. Goldmann⁶⁾ hat kürzlich den Beweis erbracht, was die allgemeine Vorstellung von einer Verwandtschaft zwischen Protoplasmakörnchen und dem Prozeß der Fettanhäufung in Zellen unterstützt. Er beobachtete, daß in vital gefärbten Zellen

von tuberkulösen und andern entzündlichen Reaktionen in demselben Grade Zellgranula verschwinden, wie Fettgranula angehäuft werden. Der Wechsel scheint ein gradueller Ersatz zu sein. Goldmann war nicht geneigt, seine Befunde als Beweis für eine „granuläre Fettsynthese“ zu erklären, aber seine Beschreibungen stimmen so gut mit den unseren überein, daß wir denken, seine Arbeit bringt eine weitere Stütze für Altmanns Hypothese.

Wir sind nicht imstande, mit Sicherheit zu bekräftigen, daß die Zellgranula in Fettröpfchen umgewandelt werden, denn wir haben gefunden, daß es unmöglich ist, den Prozeß durch die Zwischenstadien hindurch zu verfolgen. Diese Schwierigkeit hat die Bemühungen anderer beeinträchtigt, in ihren Versuchen eine Beziehung zwischen den Zellgranula und der Assimilation von Nährmaterial durch die Zelle zu beweisen. Wir sind indessen der Meinung, daß dieses Problem am leichtesten durch die Methode der Gewebszüchtung in Angriff genommen werden

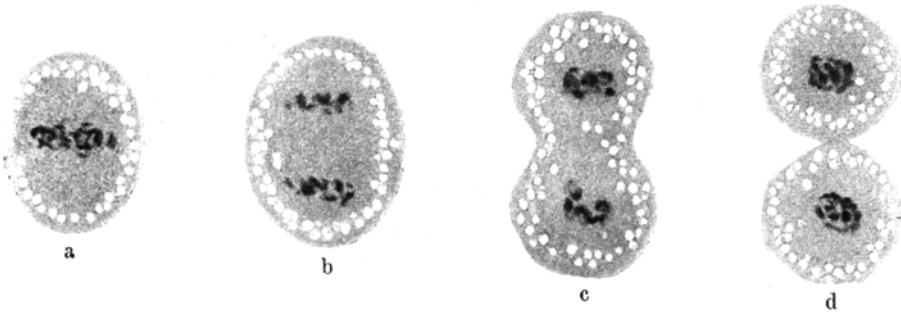


Fig. 9. 4 Beobachtungen in Pausen von 5 Minuten einer sich teilenden Rattenbindegewebszelle, die Einzelheiten späterer Teilungsstadien zeigen. Man beachte die Anwesenheit zahlreicher kleiner Fettkügelchen.

kann, und haben die Empfindung, daß diesem Teile des Gegenstandes, weitere Forschung gewidmet werden sollte.

Die Anhäufung von Fettröpfchen in wachsenden Zellen ist von einigen Beobachtern als eine fettige Degeneration des Zellplasma ausgelegt worden. Wir können im Augenblick diese Granula als Beweis von Zelldegenerationen nicht betrachten; sie sind vielleicht, wie wir glauben, der stärkste Beweis für eine aktiv aufbauende Funktion seitens der Zelle. Sie werden aller Wahrscheinlichkeit nach von der Zelle aus den Bestandteilen des im Plasma vorhandenen Fettes synthetisiert. Zahlreiche Fettgranula enthaltende Zellen zeigen aktive amöboide Bewegungen und unterziehen sich einer karyokinetischen Teilung (Textfig. 9). Das sind Zeichen von Lebenskraft, die nicht mit der Ansicht in Einklang gebracht werden können, daß das Fett das Resultat fettiger Degeneration des Zellplasma sei. Die Anhäufung von Fett in in vitro wachsenden Zellen zeigt eine Schwächung abbauender Tätigkeit durch leichtverständliche Einflüsse an und bedeutet hier wie in den Körperzellen eine Infiltration und nicht eine Degeneration.

Infolge zufälliger Unregelmäßigkeiten in der Dicke der verschiedenen Portionen

der als Kulturmedien verwandten Plasmotropfen passiert es zuweilen, daß Zellen von einem Teile des eingepflanzten Gewebes in eine sehr dünne Lage von Plasma einwandern, während jene von einem andern Teil eine relativ dicke Portion des Plasma durchdringen. Unter solchen Umständen enthalten die von einer nur dünnen Schicht von Plasma umgebenen Zellen beträchtlich weniger Fett, als es die in einem Überfluß von Plasma liegenden Zellen tun.



Fig. 10. 2 Mäusesarkomzellen mit Protoplasmagranula und Fett. Die Protoplasmagranula sind zentral gelagert und schwach mit Fuchsin gefärbt. Die Fettkörnchen sind durch Osmiumsäure gefärbt. Man beachte die gleiche Größe beider Arten von Körnchen.

Neben Fettkörnchen findet man gelegentlich im Zytoplasma runde Körperchen von wechselnder Größe, welche Vakuolen sehr ähnlich sind. Sie unterscheiden sich leicht von den Fettkörnchen dadurch, daß sie weniger lichtbrechend sind, auch haben sie einen mehr rötlichen Ton, während die Fettkörperchen mehr gelblich erscheinen. Verdünnt man das Plasma mit destilliertem Wasser, so zeigen die Zellen nach zwei oder drei Tagen viele solche vakuolenartige Gebilde, deren Größe

von dem Grade der Verdünnung direkt abhängig ist. Dieses Experiment beweist, daß die Vakuolenbildung als eine Art hydropische Infiltration zu deuten ist.

Phagozytose. Nicht nur Leukozyten, sondern auch Bindegewebszellen und Tumorzellen (Sarkom und Karzinom) zeigen deutliche phagozytäre Tätigkeit *in vitro*. Sie nehmen leicht Karminpartikelchen (Textfig. 11) oder Eisenrost, die in das Plasma gebracht sind, auf. Die von den Zellen aufgenommenen Karminpartikelchen unterliegen häufig der Auflösung und färben die Zellgranula. Die so erhaltenen ausgezeichneten Bilder entsprechen der Granulafärbung nach Alt-

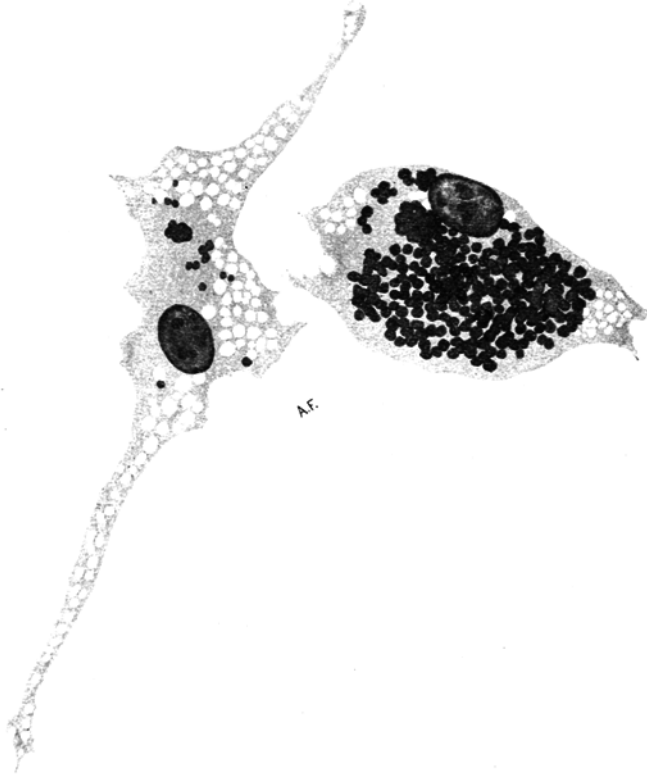


Fig. 11. Zwei Mäusesarkomzellen aus einer 4 Tagekultur; zeigen Phagozytose von Karmin-körnchen. Fettkügelchen erscheinen als helle kleine Lücken.

manns Methode, die schon beschrieben wurde. Tote Zellen sieht man nicht selten von großen uninukleären Riesenzellen verschlungen. Zwei solcher Zellen in Textfig. 12 wurden in einem 8 Tagepräparat von Rattensarkom in Meerschweinchenplasma gesehen. 10 andere phagozytäre Zellen waren in demselben Präparat vorhanden. Die großen uninukleären „Deckgläschen“-riesenzellen, die in Kulturen von Milz und Knochenmark gesehen wurden, sind ebenfalls aktiv phagozytär. Eine einzelne Riesenzelle dieses Typs kann 4 oder 5 uninukleäre Zellen enthalten, die in Auflösung begriffen sind.

Subkulturen. Stückchen in Plasma eingebetteten Gewebes besitzen nicht genügende Mittel, ihren Nahrungsvorrat zu erneuern oder den Wirkungen angehäufter Produkte des Zellstoffwechsels sich zu entziehen. Ein Leben unter solchen Bedingungen ist nur für eine relativ kurze Zeit möglich; 5 bis 10 Tage stellen in der Regel die Grenze aktiven Wachstums dar. In dieser Zeit werden die Zellen im Plasma mit Fettröpfchen angefüllt und liegen gewöhnlich nach 8 bis 10 Tagen Bebrütung schlafend mit wenig Lebenszeichen da. Wenn jetzt das Gewebe in einer solchen Kultur vom Plasma losgezupft und in einen Tropfen frischen Mediums gebracht wird, beginnt das Wachstum von neuem und dauert eine Woche oder 10 Tage länger. Dies Verfahren kann unbegrenzt oft wiederholt werden. Wir haben Kulturen von der Rattenkarotis, die $3\frac{1}{2}$ Monate *in vitro* gewachsen sind

und jetzt noch aktiv wachsen. Textfig. 8 ist die Abbildung einer Reihe von Beobachtungen über eine Zelle im Verlaufe der Teilung, nachdem sie 78 Tage außerhalb des Körpers gewesen war.

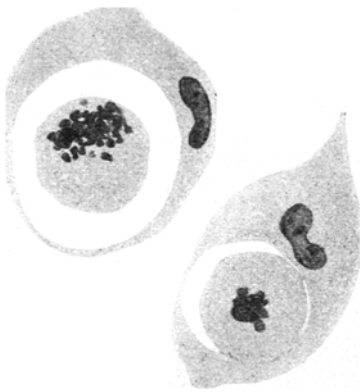


Fig. 12. Zwei Zellen von einer 9 Tagekultur von Rattensarkom in Meer-schweinchenplasma zeigen Phagozytose toter Zellen.

Viele der vom alten in das neue Plasma überführten Zellen sind ganz mit Fett erfüllt. Wir haben solche Zellen nach ihrer Überführung sorgfältig beobachtet und haben bemerkt, daß während der ersten wenigen Tage nach dem Transport der Fettgehalt der Zellen deutlich vermindert ist. Augenscheinlich hat der erneuerte Nahrungsvorrat in irgendeiner Weise den Zellstoffwechsel verbessert, aber es ist schwer zu sagen, ob das ein Resultat des aufgefüllten Vorrats an Sauerstoff ist

oder der Befreiung der Zelle von den Einflüssen toxischer Substanzen, die aus dem Zellstoffwechsel hervorgehen.

IV.

Physikalische Einflüsse auf das Wachstum von Geweben in Kulturmedien.

Mechanische Faktoren. Verschiedene mechanische Faktoren beeinflussen das Wachstum von Geweben *in vitro*. Daß eine mechanische Unterstützung für das Auswachsen von Geweben notwendig ist, ist von Harrison^(8c) bewiesen worden. Das Maschenwerk von Fibrin im Tropfen geronnenen Plasmas dient diesem Zwecke, und benutzt man Serum allein als Kulturmedium, muß das Fibrin durch irgendein passendes Mittel ersetzt werden wie Spinnwebgewebe (Harrison) oder Fäden verschiedener Art (Carrel und Burrows). Das Deckgläschen selbst kann als mechanische Stütze für die wachsenden Zellen dienen, die sich seiner Oberfläche anheften und stark abgeflacht werden.

Nach den Untersuchungen von Lewis und Lewis ist es möglich, eine Züchtung des Hühnerembryogewebes in Agar statt in geronnenem Plasma durchzuführen. Wir fanden allerdings, daß die Zellen in den Agarnährboden nur wenig eindringen, sondern nur unter dem Deckgläschen wanderten. Darum bietet Agar einen Vorteil gegenüber den flüssigen Nährböden weil das Gewebe gegen das Deckglas festgehalten ist. Die Beobachtung Harrisons, daß das Zellenwachstum nur stattfindet, wenn das Gewebstückchen eine solide Fläche berührt, können wir bestätigen. In dem hängenden Tropfen haften die wachsenden Zellen fest an dem Deckglas.

Eine häufige und gut umgrenzte Variation des normalen Wachstumstyps mechanischen Ursprungs verdient eine Beschreibung. Wir haben das die Ringform des Wachsens genannt. Bei dieser Art breiten sich die wachsenden Zellen nicht in das Plasma gleichförmig nach allen Richtungen von der zentralen Gewebsmasse aus, sondern das Plasma zieht sich von dem Gewebe in einer eiförmigen oder kreisförmigen Figur zurück und läßt das Gewebstück an einem Ende des Umfanges liegen wie die Fassung in einem Siegelring. In diesen offenen Ring hinein, der nur Serum enthält, wandern die Zellen in einer einzigen Lage, eng adhärent dem Deckgläschen, hinein. Solche Präparate eignen sich ausgezeichnet für die Untersuchung der feineren Zellstrukturen mittels spezifischer Methoden.

Schwund des Fibrinnetzwerkes als Resultat einer digestiven Tätigkeit tritt auf, wenn man gewisse Plasmaarten benutzt. Dieses Phänomen kann man regelmäßig beobachten, wenn man Ratten- und Mäusegewebe im menschlichen Plasma züchtet. Das in solchen Präparaten stattfindende Wachstum verläuft längs des Deckgläschens, der einzigen den Zellen verbliebenen Stütze.

Das von den Zellen gezeigte Bestreben, sich längs den Linien geringsten Widerstandes zu bewegen, wird in vielen Kulturpräparaten gut illustriert, wenn man Zellen beobachten kann, die in zwei bestimmten Ebenen auswandern, von denen die eine der Unterfläche des Deckgläschens entspricht, die andere der Unterfläche des geronnenen Plasmaklumpchens. Daneben kann man eine dritte Reihe von Zellen zwischen den beiden ersten liegen sehen, nämlich im Gerinnsel selbst (Textfigur 13). Die sich über glatte Oberflächen fortbewegenden Zellen der beiden ersten Gruppen werden deutlich abgeflacht und bilden trotz des nämlichen Ursprungs einen überraschenden Gegensatz zu den dichteren, aber sehr unregelmäßig gestalteten Zellen, die durch das Plasma hindurchwachsen.

Zugabe von Fremdkörpern zu Kulturen: Riesenzellenbildung. Wir haben gelegentlich in Kulturen Zellen beobachtet, die Teilchen von Schmutz, Paraffin oder Baumwollfasern einschlossen, die zufällig bei der Anfertigung der Kultur hineingebracht worden waren. Wir waren ferner imstande, willkürlich typische Fremdkörperriesenzellen in vitro hervorzurufen durch Hineinbringen von Lycopodiumsporen in Kulturen von Hühnerembryonenmilz. Diese Sporen liefern ausgezeichnete Objekte für diesen Zweck vermöge ihrer passenden Größe und auch deshalb, weil ihre charakteristische Gestalt und Lichtbrechung ihre leichte Erkennbarkeit im Plasma gestatten, auch wenn sie von dichten Zellmassen umgeben sind.

Wir waren imstande, auf diesem Wege den Mechanismus der Riesenzellbildung zu beobachten. Aktiv wandernde Zellen häufen sich um die Sporen herum an und werden im Laufe von 2 bis 4 Tagen zur Bildung eines breiten multinukleären Gewebes verschmolzen. Eine oder mehrere Zellen können so umschlossen werden. Solche Riesenzellenmassen werden oft abgeflacht und zeigen Pseudopodien.

Die an der Bildung von diesen Fremdkörperriesenzellen teilnehmenden Wanderzellen schließen sowohl Endothelzellen als große Milzpulpazellen ein. Daß Bindegewebszellen nicht an ihren Formationen teilnehmen, konnten wir durch ergänzende

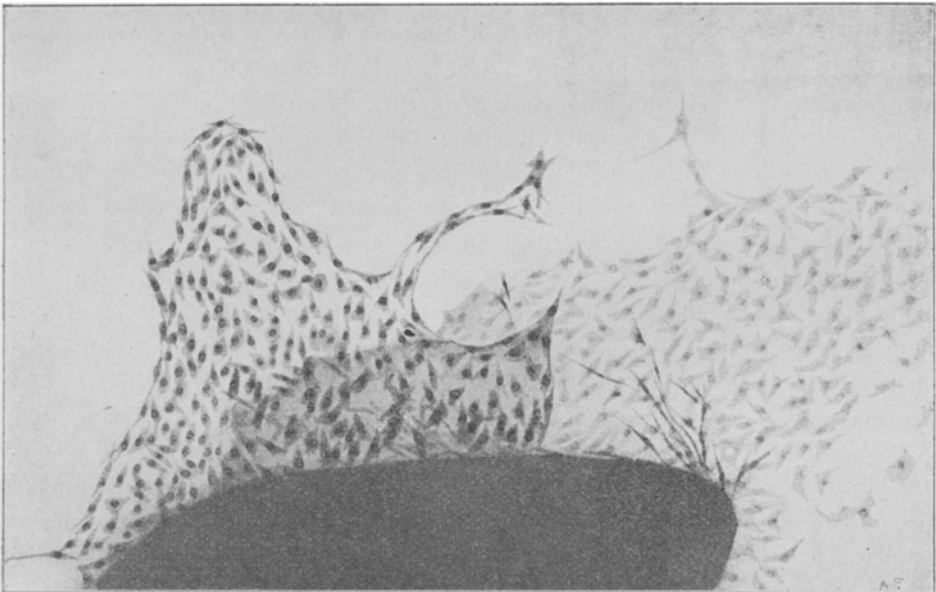


Fig. 13. Kultur von Rattenblutgefäß, die Auswanderung von Zellen in drei Ebenen zeigt: die proximale Gruppe breitet sich auf der Unterfläche des Deckgläschens aus. Die mittlere Gruppe irregulärer Spindelzellen durchdringt das Plasmaklumpchen, und die distale (unterste Gruppe) liegt auf der Unterfläche des Gerinnsels. Die über glatte Oberflächen wandernden Zellen (erste und letzte Gruppe) sind stärker abgeflacht als jene, die durch das Fibrinmaschenwerk dringen.

Versuche beweisen, bei denen Sporen in Kulturen gebracht wurden, die nur Bindegewebe enthielten. Es gibt noch eine andere Gruppe von großen, flachen, multinukleären Zellen, die, wie wir glauben, auch als Fremdkörperriesenzellen angesehen werden müssen. Sie entwickeln sich mit großer Konstanz in Kulturen von Milz und Knochenmark. Es sind große Zellen, die von 100 μ bis 1 mm Durchmesser schwanken und 5 bis 200 Kerne enthalten. Man findet sie ohne Abweichung auf dem Deckgläschen gebildet, wo sie sich in einer dünnen Schicht auf seiner Oberfläche ausbreiten. Das häutige Zytoplasma solcher Zellen ist in Pseudopodien verlängert; sie verändern dauernd durch amöboide Bewegungen ihre Gestalt. Manchmal kann man viele Kerne sehen und dann werden wiederum als Folge eines Zurückziehens der Pseudopodien und der Annahme einer kompakteren Form

überhaupt keine Kerne sichtbar. Diese Riesenzellen zeigen sowohl Phagozytose anderer Zellen als auch von Fremdkörpern; auch enthält ihr Zytoplasma stets große Fettropfen (Textfig. 16). Wir haben niemals eine karyokinetische Teilung in diesen Riesenzellen beobachtet, wenn man auch selten, wie es von kleineren Riesenzellen im ersten Teil dieser Arbeit berichtet wurde, Bilder sieht, die an Kernsprossung denken lassen.

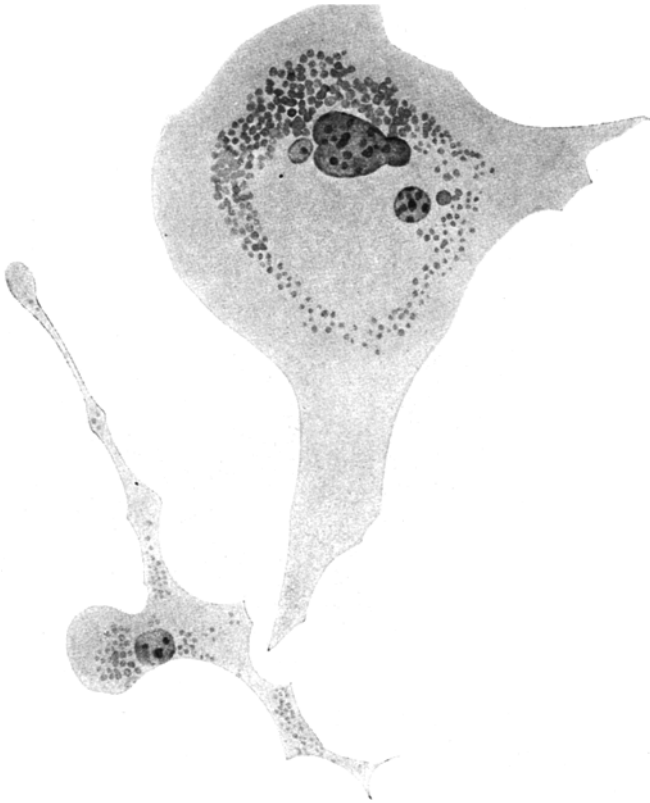


Fig. 14. Mäusesarkomzellen in menschlichem Plasma: 6 Tagepräparat, das eine multinukleäre Riesenzelle zeigt, mit Kernen ungleicher Größe, augenscheinlich durch Sprossung gebildet. Eine uninukleäre Zelle ist zum Vergleich dargestellt. Zahlreiche kleine Fettkörnchen, die mit Sudan III gefärbt sind, sind in beiden Zellen zu sehen.

Wir sind geneigt, diese multinukleären Gebilde als Fremdkörperriesenzellen zu erklären, wobei das Deckgläschen selbst als Fremdkörper wirkt, der als ihr Bildungsreiz dient.

Temperatur. Stückchen des Herzmuskels von bis zu 11 Tagen alten Hühnerembryonen zeigen rhythmische Kontraktionen, wenn man sie in Plasma aufbewahrt, und in ähnlicher Weise Darmstücke von noch älteren Embryonen peristaltische Bewegungen. Diese Erscheinungen bieten den sichtbaren Beweis von Lebenskraft, der ein sehr brauchbares Kriterium für die Wirkungen verschiede-

ner äußerer Einflüsse wie Hitze und Kälte auf das Leben von Kulturen dieser Organe ist. Unter Benutzung dieser Organe haben wir zunächst die Wirkungen verschiedener Temperaturen auf das Gewebswachstum *in vitro* erforscht und zweitens die Widerstandskraft von Gewebe gegen Hitze und Kälte untersucht, indem wir die Methode der Gewebszüchtung zur Bestimmung des Grades der überstandenen Schädigung verwandten.

Bei Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Temperaturen auf das Wachstum von Geweben (Hühnerembryonenherz und -darm) haben wir gefunden, daß die unteren und oberen Grenzen des aktiven Bindegewebswachstums annähernd 26 und 44° C. sind. Peristaltik und Herzschlag werden noch innerhalb dieser Grenzen beobachtet, aber regelmäßiger bei Temperaturen unter 38° bemerkt.

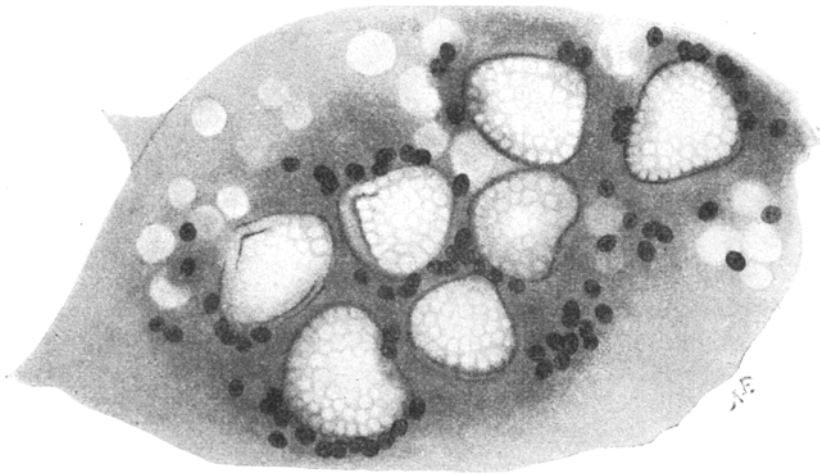


Fig. 15. Große, dicke Riesenzellen, die sich um 7 Lycopodiumsporen gebildet haben. Die runden Lücken repräsentieren Fett und Vakuolen.

Als allgemeine Regel kann man den Satz aufstellen, daß das Wachstum langsamer, aber die Tätigkeitsperiode länger ist bei den niederen Temperaturen (25 bis 32°) als bei den höheren Temperaturen (38 bis 44°). Das größte Wachstum findet zwischen 36 und 39° statt.

Vergleichende Beobachtungen über die Zellteilungsart bei 28 und bei 38° zeigten, daß die zur Teilung erforderliche Zeit ungefähr zweimal so lang bei der niederen Temperatur ist. Ähnliche Untersuchungen an Ratten- und Katzenbindegewebszellen zeigten noch deutlicheren Unterschied, z. B. erforderten in einer Kultur von Katzenbindegewebe, die bei 38° untersucht wurde, die Zellen 15 bis 25 Minuten zur Teilung (alle Phasen), während bei 28° 1 bis 2 Stunden beansprucht wurden.

Bei Untersuchung der Widerstandskraft von Geweben gegen Hitze und Kälte haben wir die Zellen diesen Einflüssen unterworfen, während das Gewebe im ge-

wöhnlichen hängenden Tropfenpräparat suspendiert war. Diese Technik hat zwei Vorteile: erstens erhält man ein völlig isotonisches Medium und zweitens kann das Gewebe leicht gehandhabt werden, bei wenig Gelegenheit zu mechanischer Beschädigung. Das feste Anhaften des Gerinnsels erlaubt auch freie Bewegung der Objektträger, sei es im Heißluftbad oder in Eis-Salzmischung.

Widerstandsfähigkeit von Zellen gegen Hitze. Während die obere Wachstumsgrenze für Hühnchengewebe 43 bis 44° ist, hat ein Aus-

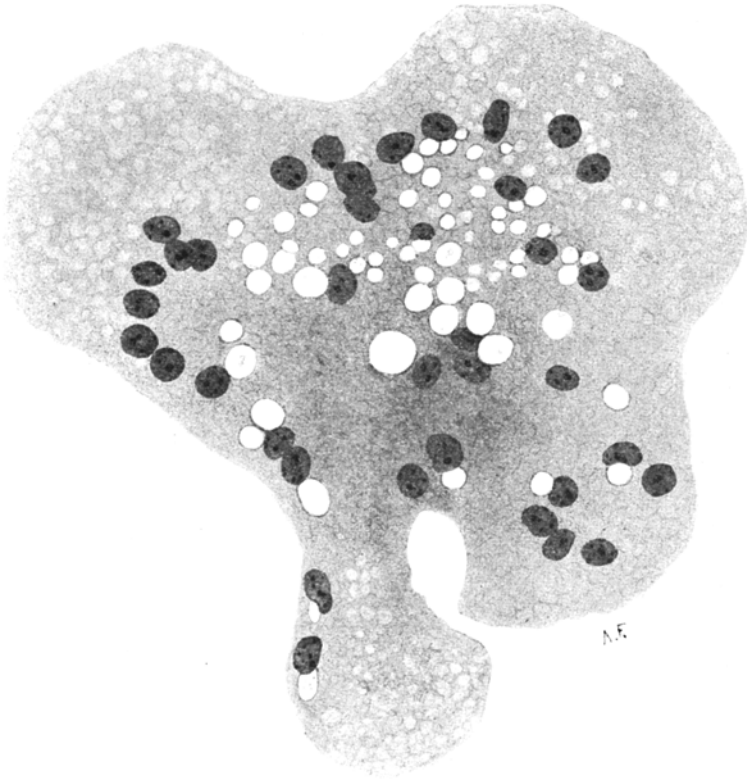


Fig. 16. Eine große Deckgläschenriesenzelle von einem Hühnerembryonenpräparat. Milz in Taubenplasma. Man beachte große Fettugeln im Zentrum und den feinen spitzengewebeartigen Charakter des dünnen Pseudopodienrandes. Eine uninukleäre Wanderzelle ist zum Vergleich dargestellt.

setzen gegen Temperaturen von 45 bis 47° (Heißluft) für 45 Minuten keine ernste Schädigung zur Folge, wie durch die nachfolgende Tätigkeit bewiesen wird, wenn es bei 37° in den Brutschrank gestellt wird. Wenige Zellen indessen überleben eine Temperatur von 48 bis 50°. Höhere Temperaturen sind gleichmäßig schädlich. Von Interesse ist die Bemerkung, daß für Mäuse- und Rattengewebe der Wärmepunkt 3 bis 4° niedriger als für Hühnchengewebe liegt, ein Unterschied, der ziemlich genau mit dem Unterschied in der normalen Körpertemperatur der beiden Tierarten übereinstimmt.

Eine Versuchsreihe wurde angestellt, um die Resistenz gegen Hitze von Ratten- und Mäusesarkomzellen bzw. aktiv wachsenden Bindegewebszellen zu bestimmen. Kurz gesagt, zeigten die normalen Zellen einen etwas höheren Widerstand gegen Hitze als die Geschwulstzellen. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da es wohl bekannt ist, daß Sarkomzellen eine viel höhere Resistenz gegen Kälte wie auch gegen die Einwirkung verschiedener chemischer Agentien bieten, als normale Zellen.

Widerstandskraft von Geweben gegen Kälte. Hühnchengewebe, das für 1 bis 4 Tage in den Eisschrank bei -4° gebracht ist, eine Temperatur, die über dem Gefrierpunkt des Gewebes liegt, wächst aktiv bei nachfolgender Bebrütung. Herzschlag und Peristaltik werden häufig beobachtet. 10 Tage oder länger im Eisschrank gehaltene Gewebe zeigen keine Lebenskraft mehr.

Bei Untersuchungen der Wirkungen des Gefrierens durch extrem niedrige Temperaturen haben wir gefunden, daß diese Gewebe kurzes Gefrieren überleben, aber durch ausgedehntes Gefrieren getötet werden, ebenso wenn sie sehr niedrigen Temperaturen, selbst für eine relativ kurze Zeit, unterworfen werden. Die Ergebnisse einer großen Zahl von Versuchen zeigen, kurz gesagt, daß die Wirkung niedriger Temperaturen verbunden mit Gefrieren der Expositionsdauer und der Temperaturtiefe proportional ist. Die folgende Tabelle zeigt klar die Ergebnisse unserer Versuche:

Gewebe:	CO ₂ (Temp.?) — 20° C. (Eis-Salz) — 10° C. (Eis-Salz)	überlebt:	getötet:
		$\frac{1}{2}$ Minute 5—10 Minuten bis 2 Stunden	2 Minuten. 30 Minuten. 6—12 Stunden.
Hühnchenembryonenherz			

Ein Überleben wurde von Bindegewebswachstum in nachfolgend bebrüteten Kulturen angezeigt. Daß oft auch ein Überleben von Muskelzellen statthatte, zeigte sich durch Peristaltik und rhythmische Kontraktionen in vielen Gewebestücken.

Weniger überzeugende Untersuchungen wurden an normalen und Tumorgeweben von Ratten und Mäusen ausgeführt. Die große Widerstandskraft von Tumorzellen, die sich bei den Transplantationsversuchen früherer Autoren zeigten, konnten wir bestätigen. Die genauen vergleichenden Studien werden in einer späteren Arbeit erscheinen.

Die Wirkung von Kälte auf karyokinetische Teilung ist sehr deutlich. Wenn Zellen im Verlaufe der Teilung für einige Stunden in den Eisschrank gebracht werden, bleibt der Prozeß stehen, so lange die Zellen unter dieser niedrigen Temperatur gehalten werden, aber er schreitet fort in der gewöhnlichen richtigen Weise, wenn das Präparat in den Brutschrank zurückgebracht wird.

V.

Kultivierung von Geweben in artfremdem Plasma.

Wir fanden sehr bald bei unseren Untersuchungen über das Wachstum von Ratten- und Mäusetumoren in vitro, daß Maus- und Rattenplasma als Kultur-

medien ausgetauscht werden können, daß aber das Wachstum stets kräftiger war, wenn man homologes Plasma benutzte. Das brachte uns darauf, das Wachstum gewisser Gewebe in verschiedenem heterologen Plasma zu untersuchen. Drei Gewebe — Rattensarkom, Mäusekrebs und Rattenmilz — wurden in unserer ersten Versuchsreihe verwandt und im Plasma des Meerschweinchens, Kaninchens, Hundes, der Taube, Ziege und im menschlichen Plasma gezüchtet. Kontrollkulturen in homologem Plasma wurden stets angelegt.

Meerschweinchenplasma. Für die verwandten Gewebe als Kulturmedium, nur etwas weniger passend als Rattenplasma, fanden wir Meerschweinchenplasma; der Unterschied besteht hauptsächlich in der Ausdehnung und Schnelligkeit der Zellauswanderung. Zeichen aktiven Wachstums sind gewöhnlich nach dem 7. Tage nicht mehr vorhanden, wenn sie auch gelegentlich 12 oder 15 Tage andauern. Verimpfungen der Tumorkultur auf Tiere fallen positiv aus. Verschiedene Kulturen von Rattengewebe im Meerschweinchenplasma wurden jeden 7. Tag in neue Tropfen des Plasmas gebracht; ihr Wachstum war gesund und kräftig noch nach vier solchen Transporten, d. h. nach einem Monat Aufenthalt in artfremdem Medium. Diese Präparate waren nicht von denen ähnlichen Alters in homologem (Ratten-)Plasma unterscheidbar.

Diese Beobachtung ist von großer Tragweite für die Frage, die sich oft bei experimentellen Tumoruntersuchungen erhoben hat, in Verbindung mit gewissen Theorien über Tumor- und Gewebstransplantation, nämlich die Spezifität der Nahrung innerhalb der Tierart. Nach **Ribberts** Ansicht, deren Grundprinzip es ist, daß Zellen nicht imstande sind, irgendeinen organischen Nahrungsstoff von einem fremden Wirt zu assimilieren, würden wir gezwungen sein, zu glauben, daß diese aktiv wachsenden Zellen einen Monat oder länger auf einem Nährboden von Salz und Wasser leben bleiben können, oder wir müßten mit **Ehrlich** annehmen, daß eine genügende Menge von einem X-Stoff (eine hypothetische spezifische, nur in homologen Seren vorhandene Nährsubstanz) zur Unterhaltung des Lebens während dieser Zeit zurückgehalten wurde. Ein richtiger Schluß, scheint uns, ist der, daß die Rattenzellen fähig sind, alle nötige Nahrung aus dem Meerschweinchen Serum aufzunehmen, und daß ein Mißlingen von Rattensarkomimpfungen, um bei Meerschweinchen Tumoren zu produzieren, auf andere Faktoren als auf den Nahrungsersatz zurückzuführen ist.

Kaninchenplasma. Das Wachstum sowohl von Mäuse- als auch Rattentumoren ist viel weniger umfangreich im Kaninchen- als im Meerschweinchenplasma; auch ist die Verflüssigung des Fibrins oft ganz deutlich. Rattensarkom wächst sehr langsam, aber kann im Wachsen 10 oder 12 Tage fortdauern. Überführung in Rattenplasma hat erneute Tätigkeit im Gefolge. Verimpfungen auf Tiere nach viertägigem Wachstum im Rattenplasma fallen positiv aus.

Hundeplasma. Präparate von Rattensarkom in Hundeplasma wachsen einen oder zwei Tage und zeigen dabei ein feines diffuses radiäres Herauswachsen von hellen Zellen, die nach dieser Zeit rasch zerfallen. Übertragung von Stücken

Rattensarkom in Rattenplasma nach 2, 4 und 6 Tagen in Hundeplasma zeigten, daß die Zellen nicht länger als 2 Tage im Hundeplasma überleben und bilden so einen strengen Gegensatz zum Verhalten von Rattensarkom in Meerschweinchenplasma.

Ziegenplasma. Überhaupt kein Wachstum tritt auf, wenn Ratten- oder Mäusegewebe in Ziegenplasma gezüchtet werden und das eingepflanzte Gewebe zerfällt rasch. Übertragung in homologes Plasma am 1., 2., 3. und 4. Tage zeigen, daß 24 bis 36 Stunden die Grenze der Lebensfähigkeit der Gewebe im Ziegenplasma bilden. Das führt zum Gedanken, daß Ziegenplasma bestimmte für Rattenzellen toxische Substanzen enthält; die eingepflanzten Zellen wachsen nicht nur nicht, sondern das Leben selbst hört in kurzer Zeit auf. Carrel und Ingebritsen haben in Fortsetzung unserer Beobachtungen gezeigt, daß Ziegenserum nach Erhitzung ein viel günstigeres Medium für Meerschweinchenleukozyten wird, was die Anwesenheit thermolabiler zytotoxischer Substanzen normaliter im Ziegenplasma anzeigt.

Taubenplasma. Rattensarkom wächst in Taubenplasma 3 bis 5 Tage sehr schön. Normales Rattenbindegewebe wächst länger (8 bis 12 Tage). Teilungsfiguren sind zahlreich. Versuche, diese Gewebe kontinuierlich in Taubenplasma durch Erneuerung des Mediums zu züchten, wie es mit Meerschweinchenplasma möglich ist, sind ohne Erfolg geblieben. Durch Zickzackübertragungen (Taubenplasma-Rattenplasma-Taubenplasma usw.) indessen kann aktives Wachstum beinahe unbegrenzt erhalten werden. Rattengewebe wachsen gut in Mischungen von Tauben- und Rattenplasma. Diese Befunde zeigen, daß Taubenplasma keine für Rattenzellen zytotoxischen Substanzen enthält. Unsere Ergebnisse könnten nach Ehrlich's Hypothese erklärt werden; d. h., daß Rattenzellen im Taubenplasma nicht einen Nährstoff finden, der für ihr kontinuierliches Wachstum und ihre Vermehrung nötig ist.

Menschliches Plasma. Die überraschendste und konstanteste, bei Benutzung von menschlichem Plasma gefundene Erscheinung ist die fortschreitende Verflüssigung des Fibrins, die nach 6 oder 7 Tagen tatsächlich vollendet ist. Trotz dieses Verlustes von Fachwerk findet eine aktive Wanderung von Zellen längs des Deckgläschens statt; wird Rattenmilz im menschlichen Plasma gezüchtet, werden Riesenzellen von bemerkenswerter Größe auf dem Deckgläschen gebildet.

Hühnchengewebe wachsen am besten in Hühnchen- oder Taubenplasma; das Wachstum ist in Ratten-, Kaninchen- und Menschenplasma schwach. Die Gewebe der Katze wachsen in Ratten-, Kaninchen- und Taubenplasma, und Rattengewebe wachsen in Katzen- und Taubenplasma; aber in jedem Falle ist das Wachstum weniger kräftig als in homologem Plasma.

Neben den Unterschieden in Dauer und Ausdehnung des Wachstums in artfremdem Plasma bestehen große Unterschiede im Charakter des Auswachsens in gewissen artfremden Medien. Diese Erscheinung wird am besten durch das Auswachsen von Rattensarkom in Meerschweinchen- und Taubenplasma illustriert.

In dem einen sieht man bemerkenswert moosartige Zellen, im andern außerordentlich große helle, geschwollen aussehende Zellen; noch andere Beispiele könnten angeführt werden. Diese Veränderungen der Morphologie in verschiedenen Medien müssen, wie wir denken, zum größten Teil auf physikalische Einflüsse auf das Wesen des geronnenen Plasma zurückgeführt werden, wie z. B. die Dichtigkeit des Fibrinnetzwerkes. Im Taubenplasma zeigen die Zellen wenig Neigung, den Klumpen zu durchdringen. Sie wandern längs des Deckgläschens oder über die Unterfläche des Koagulums aus. Wie wir in einer Erörterung der mechanischen Faktoren betonten, eignen sich Zellen, die sich über glatte Oberflächen fortbewegen, dazu, sich abzuflachen, während bei der Durchwanderung eines Fibrinnetzwerkes eine kompaktere und unregelmäßigere Form angenommen wird (Textfig. 13).

Bei einem Rückblick auf die oben erwähnten Versuche sieht man, daß allein im Ziegenplasma das Wachstum von Mäuse- und Rattengewebe ausbleibt. Das ist, aller Wahrscheinlichkeit nach, auf die Anwesenheit von für Ratten- und Mäusezellen giftigen Substanzen im Ziegenserum zurückzuführen. Wir sahen, daß Plasma von jenen Tierarten, die den Ratten am engsten verwandt sind, d. h. von Mäusen und Meerschweinchen, die besten heterologen Medien für die Züchtung von Rattengeweben liefert. Diese Verwandtschaft indessen erstreckt sich nicht über die übrigen benutzten Tierarten. Das Wachstum von Rattensarkom ist z. B. kräftiger und von längerer Dauer im Taubenplasma als im Hundeplasma. Und wiederum ist menschliches Plasma entschieden günstiger als Kulturmedium für Rattengewebe, als es Ziegenplasma ist.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, daß der in dieser Arbeit zutagegeforderte, für Forscher auf dem Gebiete des experimentellen Krebses interessanteste Punkt der ist, daß normale Zellen gegen eine veränderte Umgebung eine ebenso große Widerstandskraft besitzen und ebenso fähig sind, fremdes Nährmaterial zu assimilieren, wie die Zellen der virulentesten transplantablen Krebse.

VI.

Immunitätsstudien.

Zytotoxine. Ausreichende Methoden für den Nachweis in vitro von zytotoxischen oder zytolytischen Substanzen, abgesehen von Hämolysinen, sind nicht ausgearbeitet worden. Es ist deshalb nicht überraschend, daß auch die Frage betreffs der Möglichkeit, in artfremden Spezies spezifische Immunkörper für die Zellen verschiedener Organe hervorzurufen, noch von vielen als ungelöst angesehen wird. Die Methode, Gewebe in vitro zu züchten, scheint uns besonders geeignet für Untersuchungen dieser Art, da die direkte Einwirkung des modifizierten Serums auf ausgewählte wachsende Gewebe leicht unter dem Mikroskop beobachtet werden kann.

In unserer ersten Versuchsreihe wurden Ratten gegen Mäusesarkom durch subkutane Injektion eines „Breies“ von diesem Gewebe immunisiert. Plasma von so immunisierten Ratten wurde dann für verschiedene Serien von Mäuse-

sarkomkulturen verwandt. In allen Präparaten verlief das Wachstum des Mäusesarkoms sehr langsam und bestand in Auswanderung weniger Zellen nach einem Zwischenraum von 2 oder 3 Tagen. Im Vergleich mit Kontrollpräparaten war das Wachstum unbedeutend. Dieses Ergebnis stimmt mit gut bekannten Tatsachen überein, die das Schicksal von Mäusesarkomzellen betreffen, die auf normale Ratten und solche Ratten verimpft wurden, die vorher mit Mäusegewebe behandelt waren. Es zeigte sich, daß in normalen Ratten die Mäusezellen sich 8 bis 10 Tage länger vermehren und kleine Tumoren bilden, während, wie Russell gezeigt hat, in immunisierten Ratten die artfremden Zellen einen frühen Tod erleiden. Seine Befunde weisen, wie auch unsere es tun, auf die Existenz toxischer Substanzen im Serum immunisierter Tiere hin. Der Wert unserer Beobachtung liegt in der Tatsache, daß die angewandte Methode ein Studium der Wirkung des Serums allein erlaubt; der Einfluß lokaler Gewebsreaktionen ist beseitigt.

Rattensarkomkulturen in normalem Meerschweinchenplasma geben gleichmäßig gutes Wachstum, was schon früher in dieser Arbeit beschrieben ist. Wir haben Meerschweinchen mit Sarkombrei, Leber und defibriniertem Blut immunisiert und dann Plasma von diesen Tieren als Kulturmedium für Rattensarkom verwandt. Es trat überhaupt kein Wachstum der Sarkomkulturen auf, wenn die Meerschweinchen mit Sarkombrei immunisiert waren, und ein schwaches Weiterwachsen von Zellen war das einzige Zeichen des Überlebens, wenn wir defibriertes Rattenblut für die Immunisierung verwandten.

Es kann demnach aus diesen beiden Versuchsreihen geschlossen werden, daß das Plasma eines Tieres, das Injektionen eines fremden Gewebes bekommen hat, als Kulturmedium für dieses Gewebe ungeeignet ist. Die Tatsache, daß nicht nur eine Behinderung des Wachstums, sondern auch oft eine rasche Auflösung der Zellen in diesen Kulturpräparaten auftritt, läßt wenig Zweifel, daß die Wirkung durch Antikörper zytotoxischer Natur hervorgerufen wird. Die Frage nach der Spezifität dieser Antikörper, soweit es sich um Organe der Tumorzellen handelt, ist nicht endgültig durch unsere Versuche gelöst. Die Möglichkeit indessen, diesen Punkt durch ähnliche Untersuchungsmethoden aufzuklären, liegt auf der Hand.

Krebsimmunität. Die Methode, Gewebe außerhalb des Körpers zu züchten, ist wunderbar für das Studium von Krebsimmunität geeignet, da sie die Kontrolle gewisser Faktoren erlaubt, die beim Gelingen oder Mißlingen transplantierter Zellen beteiligt sind — Vaskularisation, Stromabildung, zelluläre Reaktionen, Phagozytose usw. Dieser großen Menge modifizierender Einflüsse bei der Gewebstransplantation muß ohne Zweifel das Fehlen von Übereinstimmung in den Ergebnissen zugeschrieben werden, die von einigen sorgfältigen Untersuchern (Ehrlich, Russell, da Fano, Goldmann, Gyzzar) erhalten wurden, die diese Frage zu lösen versuchten und das Schicksal von verimpften Mäusekrebsen untersuchten. Auf ihre verschiedenen Auslegungen soll hier nicht näher eingegangen werden. Eine kurze Darlegung indessen von Russells Beobachtungen wird dazu dienen, zu zeigen, wie die Methode der Gewebeskultur dabei

hilfreich sein kann, einiges Licht auf dieses schwierige Problem zu werfen. Er fand, daß die spezifische Stromareaktion auf überimpftem Krebs bei empfänglichen Mäusen, bei immunen Mäusen nicht auftritt. Er bemerkte ferner, daß die Krebszellen eine Zeitlang in diesen refraktären Tieren langsam proliferierten und erst nach 8 bis 10 Tagen unterlagen. Das temporäre Überleben und die Vermehrung der Zellen, vermutet er, beweist die Abwesenheit einer Serumimmunität; ihren schließlichen Tod führt er auf den Mißerfolg des Wirtes, ein Stroma herzustellen, zurück. In geronnenem Blutplasma außerhalb des Körpers wachsende Tumorzellen finden in Fibrin ein stützendes Fachwerk analog dem Stroma eines Tumors, so daß der Einfluß des Serums allein verantwortlich gemacht werden muß, wenn Krebszellen, die sehr leicht in normalem Plasma wachsen, zu wachsen unfähig sind oder in ihrem Wachstum im Plasma immuner Tiere modifiziert werden. Ein virulentes Rattensarkom aus Ehrlich's Laboratorium wurde für Kulturzwecke bei unserer Untersuchung dieser Frage verwandt. Plasma wurde von 6 Typen immuner Tiere gewonnen: 1. refraktäre Tiere von einem Stamm weißer Ratten, bei denen Verimpfungen von Sarkom 80 bis 90 % positive Erfolge gaben; 2. refraktäre Tiere von unbekannter Rattenvarietät, bei denen der Prozentsatz von positiven Erfolgen nur 20 bis 30 betrug (Rassenimmunität); 3. immune alte Tiere, deren Immunität wahrscheinlich auf ihr Alter zurückführbar war; 4. Tiere, bei denen sowohl Sarkom- als Karzinomverimpfungen negativ gewesen waren (Panimmunität); 5. Tiere, deren Tumoren (Sarkom) der Rückbildung und Absorption unterlagen; 6. künstlich immunisierte Ratten von einer Tierreihe, die 2 ccm Rattenblut bekommen und folgenden Sarkomverimpfungen widerstanden hatten (der Prozentsatz resistenter Ratten der Serie betrug 40). Im ganzen wurden 18 immune Ratten verwandt und von jeder genügend Plasma für 15 bis 20 Kulturpräparate gewonnen.

Wir fanden, daß Sarkom leicht in Plasma von jedem verwandten Tiere wächst; auch differierte der Charakter des Wachstums nicht wesentlich von dem in Kontrollpräparaten beobachteten, bei denen Plasma von normalen und tumorbehafteten Tieren benutzt war.

Um die Lebensfähigkeit des sarkomatösen, im Plasma verschiedener Typen immuner Tiere gezüchteten Gewebes zu prüfen, wurden empfängliche Ratten mit Gewebe geimpft, das 3 Tage bei 37° gewachsen war. Der Prozentsatz positiver Ausfälle war ebenso hoch nach solchen Verimpfungen wie bei der Reihe Kontrolltiere, die mit Stücken Sarkom geimpft waren, die eine ähnliche Zeit lang im Plasma von normalen empfänglichen Ratten gewachsen waren. Die Art des Wachstums war ebenso gleichmäßig wie schnell und wies darauf hin, daß die Zellen in keiner Weise als Resultat der Einwirkung von Immunserum bei einer Brutschranktemperatur während dreier Tage verändert waren. Hinsichtlich der im letzten Kapitel erwähnten Untersuchungen über die Wirkung von Zytotoxinen in Gewebeskulturen fühlen wir uns überzeugt, daß die eben beschriebenen Versuche den schlüssigen Beweis dafür liefern, daß Immunität gegen verpflanzbaren Krebs

nicht auf die Anwesenheit von Antikörpern zytotoxischer oder zytolytischer Natur in den Körpersäften immuner Tiere zurückzuführen ist.

L i t e r a t u r.

1. Braus, H., Münch. med. Wschr. 1911, Bd. 58, S. 2237, 2471. — 2. Burrows, M. T., Journ. Amer. Med. Assn. 1910, vol. VI, p. 2057; Journ. Exper. Zool. 1911, vol. X, p. 63; Anat. Record 1912, vol. I, p. 141. — 3. Carrel, Alexis, Berl. klin. Wschr. 1911, Bd. 48, S. 1364; Journ. Exper. Med. 1912, vol. XV, p. 393, 516. — 4. Carrel, A., and Burrows, M. T., Journ. Exper. Med. 1911, vol. XIII, p. 387, 416, 562, 571; Journ. Exper. Med. vol. XIV, p. 244. — 5. Carrel and Ingebrigtsen, Journ. Exper. Med. 1912, vol. XV, p. 287. — 6. Goldmann, Beitr. z. klin. Chir. Bd. 98, S. 1. — 7. Hadda, S., Berl. klin. Wschr. 1912, Bd. 49, S. 11. — 8. Harrison, R. G., Proc. Soc. Exper. Biol. 1906/07, vol. IV, p. 140; Journ. Exper. Zool. 1910, vol. IX, p. 787; Science 1911, vol. XXXIV, p. 257; Anat. Record 1912, vol. VI, p. 181. — 9. Ingebrigtsen, Journ. Exper. Med. 1912, vol. XV, p. 397. — 10. Lambert, R. A., Anat. Record 1912, vol. VI, p. 91; Journ. Exper. Med. 1912, vol. XV, p. 510. — 11. Lambert, R. A., and Hanes, F. M., Journ. Exper. Med. 1911, vol. XIII, p. 495, 505; Journ. Exper. Med. 1911, vol. XIV, p. 129, 453; Virch. Arch. 1912, Juli-Heft. — 12. Lewis, W. H. and Lewis, M. R., Anat. Record vol. V, p. 277; Anat. Record vol. VI, p. 7, 195, 207. — 13. Loeb, Leo, Biochem. Zeit. 1911, Bd. 36, S. 98; Anat. Record 1912, vol. VI, p. 109. — 14. Loeb, Leo, and Fleischer, M. S., Proc. Soc. Exper. Biol. 1911, vol. VIII, p. 133. — 15. McWhorter, J. E., and Whipple, A. O., Anat. Record 1912, vol. VI, p. 121. — 16. Oppel, Albert, Arch. f. Entwicklungsmech. 1912, Bd. 34, S. 132. — 17. Ruth, E. S., Journ. Exper. Med. 1911, vol. XIII, p. 422. — 18. Weil, G. C., Journ. Med. Research. 1912, vol. XXVI, p. 159.

VI.

Beitrag zur Forschung über Endotheliome der Lymphwege.

(R. R. Istituti Clinici di Perfezionamento in Mailand.)

(Klinik für Gewerbekrankheiten.)

Von

Dr. Carlo Vallardi.

(Hierzu Taf. I und 2 Textfiguren.)

Zahlreiche Beiträge haben in diesen letzten Jahren das Kapitel der endothelialen Geschwülste bereichert und die ziemlich unklare Pathologie der Geschwülste weiter geklärt; außerdem wurden dadurch die histogenetischen Anhaltspunkte noch mehr erweitert, indem sie den Nachweis lieferten, daß ganze Organe und anatomische Bestandteile (Lymphdrüsen, Lymphgefäße, Endothelien) eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Neubildungen spielen.

Es dürfte uns zu weit führen, hier die so sehr bestrittene Frage der Morphologie der von den Lymphwegen ausgehenden Geschwülste näher zu besprechen, nur möchte ich hier daran erinnern, daß neuere histopathologische Untersuchungen die Möglichkeit der Entwicklung der epithelialen Geschwülste aus den Lymphdrüsen und Lymphgefäßen ausschließen wollen und, sich auf die betreffenden Beschreibungen stützend, sogar dem Zweifel Raum geben, daß es sich in den bisher bekannten Fällen nicht um eine solche Geschwulstart handelte. Unter den primären