

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Zürich.)

## Welcher Art sind die Rundzellen, die bei den Gewebskulturen auftreten?

Von

Professor Dr. Otto Busse †.

(Nachgelassene Arbeit.)

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Mai 1922.)

Die Frage nach der Herkunft der bei der Entzündung auftretenden kleinen Rundzellen ist trotz der durch die Jahrzehnte darauf verwandten Arbeit noch immer nicht zu einem klaren Abschluß gekommen. Nur das eine darf man wohl als sichergestellt annehmen, daß die im Jahre 1890 von der *Cohnheimschen* Schule, fast von der Gesamtheit der Pathologen und mikroskopisch arbeitenden Mediziner vertretene *Ansicht heute aufgegeben ist, daß nämlich alle Rundzellen aus dem Blute ausgewanderte weiße Blutkörperchen seien.*

In meiner Arbeit über „Auftreten und Bedeutung der Rundzellen in den Gewebskulturen“, *Virchows Arch.* 229, 1 habe ich gezeigt, was mir auf dem Pathologentag in München im Jahre 1914 auf das heftigste bestritten wurde, daß nämlich in den Gewebskulturen Rundzellen in großer Zahl und aus verschiedenen Gründen auftreten, und zwar unter Bedingungen, bei denen eine Auswanderung aus Blutgefäßen schlechthin absolut ausgeschlossen ist. Es freut mich, daß *Lubarsch* das Auftreten von Lymphocyten bei den Gewebskulturen vorbehaltlos bestätigt. Das Hervorgerufen von echten Leukocyten oder wenigstens „Zellen von gleichem morphologischen Verhalten“ ist dagegen nach *Lubarschs* Arbeit auch heute noch durchaus nicht „bewiesen“. Mit dem Beweisen von biologischen und morphologischen Vorgängen ist es eine schwierige Sache. Zwingende Beweise, wie etwa in der Mathematik für den pythagoreischen Lehrsatz, gibt es in der Biologie leider nur ganz wenige. Das lehrt der Wechsel der Anschauungen, die auch anscheinend absolut feststehende Tatsachen im Wandel der Zeiten erfahren haben und noch dauernd erfahren. Daß *Lubarsch* und andere Pathologen die Herkunft der echten Leukocyten aus dem Gewebe noch nicht für bewiesen halten, ist lediglich eine Negation, aber keine Widerlegung, sie besagt also rein gar nichts in dem Sinne, daß die von uns vertretene Ansicht etwa unrichtig wäre. Je länger ich mich mit den Gewebskulturen beschäftige, desto mehr

häufen sich die Beobachtungen dafür, daß die bei den Kulturen auftretenden Rundzellen unter geeigneten und glücklichen Versuchsbedingungen *alle* diejenigen Eigenschaften zeigen, die die Entzündungszellen auszeichnen.

In meiner früheren Arbeit habe ich gezeigt, daß die Form und Art der Zellen ganz wesentlich durch chemische Verhältnisse des Nährmediums bedingt wird. Ich habe unzählige Male beobachtet, daß in gut wachsenden Kulturen von Spindel- und Sternzellen massenhaft Rundzellen erzielt werden können, wenn eine Infektion der Kultur mit Bakterien erfolgt, oder der Kultur etwa das Plasma eines Tieres zugesetzt wird, dem vorher Terpentinwasser oder Bakteriengifte eingeimpft worden sind. Dagegen, daß diese Rundzellen immer nur Lymphocyten gewesen seien und nicht teilweise auch „ein gleiches morphologisches Verhalten“ gezeigt haben, wie die Leukocyten, sprechen meine früheren Auseinandersetzungen und die dazu gegebenen Abbildungen, und ich muß meine frühere Behauptung trotz *Lubarsch* aufrecht erhalten. Die Form und die Art der Zellen hängt lediglich von der chemischen Zusammensetzung des Nährmediums ab, wie dies auch *Rhoda Erdmann* festgestellt hat.

Im folgenden möchte ich neue Beobachtungen dafür beibringen, daß in den Kulturen sich gleiche oder ähnliche Vorgänge wie bei der Entzündung abspielen.

Es ist bekannt, daß bei ungestörtem Wachstum aus den Rändern der explantierten Gewebsstücke Spindel- und Sternzellen hervorwachsen; werden die Explantate aber durch Bakterien verunreinigt, so locken diese geradezu die Rundzellen aus dem Gewebsstück heraus. Dies trat in eklatanter Weise bei einer Kulturserie im März 1921 ein. Von einem jungen Kaninchen wurden vier kleine Stückchen Aorta und vier kleine Stückchen Mitrals ausgesät. Bei sechs von diesen acht Kulturen lief das Wachstum in gewohnter Weise derart ab, daß nach 48 Stunden die ersten auswachsenden Spindelzellen am Rande der Gewebsstückchen sichtbar waren und in den nächsten 14 Tagen weiter wuchsen. Bei zwei von den acht Kulturen war schon nach 24 Stunden der eine Rand mit einem Saum von leuchtenden kleinen runden Zellen besetzt. Der Grund für das abweichende Verhalten beruhte darauf, daß an den fraglichen Rändern kleine Kokkenwucherungen entstanden waren. Unter der Wirkung dieser unerwünschten und zufälligen Verunreinigungen hatten sich also innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Aussaat der Gewebsstücke in diesen Rundzellen gebildet, die dann ihren Weg zu den Kokkenkolonien genommen hatten und aus dem Gewebe in das Plasma ausgewandert waren.

Bei beiden Kulturen nahm die Zahl der Rundzellen innerhalb der nächsten 24 Stunden noch bedeutend zu. Da aber bei einigen derselben

schon Degenerationserscheinungen in Gestalt von beginnender Verfettung zu bemerken waren, und sich das Plasma verflüssigte, so wurden die Kulturen nicht weiter fortgezüchtet. Die Rundzellen entsprachen in ihrem Aussehen mehr den Lymphocyten als Leukocyten.

In ganz ähnlicher Weise konnten wir am 3. Januar 1922 den Kollegen *Askanazy* und *v. Meyenburg* zeigen, daß in einem Präparat einer 4 Tage alten Kulturserie auf der einen Seite des Gewebsstückes schöne anastomosierende Zellen dem Gewebe aufsaßen, während auf der anderen Seite lediglich glänzende Rundzellen zu sehen waren. Hier fanden sich Bakterien, die auch schon eine Verflüssigung des Nährplasmas einleiteten.

Alle diese Präparate zeigen mit absoluter Sicherheit, daß das Erscheinen von Rundzellen in der Kultur genau wie im lebenden Körper durch Bakterien veranlaßt wird. Der letzte Versuch läßt auch schon eine räumliche Beziehung zwischen den Rundzellen und den Bakterien erkennen, indem nämlich jene nur auf derjenigen Seite der Kultur erscheinen, an der sich die Bakterien befinden. Dies und auch das Ausstreten der Rundzellen nur auf der einen Seite der zuerst erwähnten Kulturen deutet auf chemotaktische Vorgänge hin.

Noch deutlicher tritt die Chemotaxis und die auf ein bestimmtes Ziel gerichtete Wanderung der Zellen hervor, wenn die verunreinigenden Kokken nicht direkt am Gewebsrande selbst liegen, sondern wenn sich eine Kokkenkolonie in einiger Entfernung vom Gewebsrande entwickelt. In solchen Fällen sieht man dann, wie die aus dem zugekehrten Gewebsrande frei werdenden Zellen der Kokkenkolonie geradezu entgegenstreben. Aus einer ganzen Reihe von einschlägigen Beobachtungen möchte ich zunächst nur zwei hier anführen, die besonders typisch waren. Ich zitiere aus meinen Versuchsprotokollen:

Am 27. VI. 1917 werden 5 Kulturen von der *Valvula tricuspid.* eines jungen Kaninchens in dem Plasma des Tieres ausgelegt und mit Nr. 486—490 bezeichnet. Von diesen enthält die Kultur 486 nach 24 Stunden, ferner vom Gewebsstück eine runde, scharf umschriebene Kokkenkolonie. Diese Kolonie ist von einer ganzen Anzahl von Rundzellen umgeben, während das Plasma auf den übrigen Seiten des Gewebsstückes vollkommen frei von solchen Zellen ist. Es werden eine Zeichnung und 2 Photogramme von dem Explantat gemacht und dann das ganze in Carnoy fixiert.

Die anderen Kulturen wachsen in gewöhnlicher Weise. Am 3. VII. wird mit Plasma 1 Teil Aqua dest. 2 Teile nachgefüttert, indem die Gewebsstückchen vorsichtig aus der Plasmakultur herausgenommen und auf neue Deckgläschchen mit Nr. 88a—90a verbracht werden. Die verbleibenden Zellrestkulturen wachsen wunderbar. Das weitere Schicksal der Kulturen ist für unsere Zwecke belanglos.

In vorstehend verzeichneter Beobachtung sind die Rundzellen schon im Verlauf von 24 Stunden ausgeschwärmt. Wenn ein derartiges Erscheinen der Rundzellen immer nur innerhalb der ersten 24 oder 48 Stunden zu beobachten wäre, so könnte man den Einwand *Aschoffs*, daß die Zellen nicht neugebildet, sondern schon vorher als Wanderzellen in der Herzklappe vorhanden gewesen wären, allenfalls für möglich halten.

Daß aber die Rundzellen wirklich neu gebildet werden und aus neugewachsenen Zellen entstehen, beweisen sowohl die *Gravitzschen* Untersuchungen der histologischen Abbauvorgänge im Gewebsstück als auch das oft zu beobachtende Auftreten der Zellen in späteren Stadien der Kultur. Zum Belege führe ich eine Beobachtung an, die ich zusammen mit meinem Assistenten *Vetter* im letzten Frühjahr machen und einer ganzen Anzahl meiner Zürcher Fakultätskollegen demonstrieren konnte.

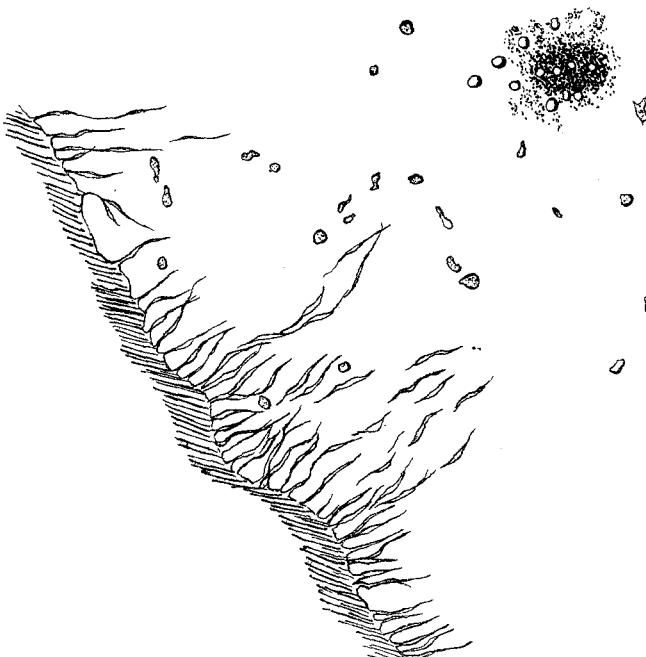


Abb. 1. Zeichnung nach der lebenden Kultur. Rechts Bakterienkolonie mit zuwandernden Rundzellen. Links Gewebsstückchen. An letztem haben die ausgewachsenen Zellen noch schöne Spindelformen, je näher man der Kolonie kommt, um so mehr nehmen sie den Charakter von Rundzellen an.

In den von *Vetter* geführten Versuchsprotokollen heißt es:

CV 31 angelegt am 21. IV. 1921: Herzklappe von jungem Kaninchen. Nährboden: Autoplasma und Ringerlösung 1 : 3.

22. IV.: nihil.

23. IV.: An einer Ecke des Gewebsstückchens wachsen vom Rande desselben zarte helle Protoplasmaspieße aus. Sie sind am Ende fein verzweigt.

24. IV.: Auch an anderen Stellen des Stückchens sind nunmehr Protoplasmafäden in reichlicher Menge ausgewachsen, sie sind anßerordentlich reichlich verästelt, so daß ein Bild entsteht, das an das Filzwerk von den feinen Haarwurzeln (bei Pflanzen) erinnert. Es sind aber nunmehr nicht nur Fäden, sondern deutliche, stark geästelte Sternzellen, die mit ihren Ausläufern anastomosieren. Das Protoplasma ist schon hell und deshalb nur bei starker Abblendung mit enger Blende gegen das umgebende Plasma abzugrenzen. In den Maschen der Stern- und Spindel-

zellen liegen an einer Stelle 3—4 kleine runde Zellen, die sich durch ihren Glanz scharf von den anderen Elementen abheben. Die Rundzellen sind fein granuliert. Kerne sind nicht wahrzunehmen.

25. IV.: In einiger Entfernung vom Gewebsstück hat sich eine Kokkenkolonie entwickelt. In derselben und an ihrem Rande liegen mehrere rundliche, ziemlich stark granulierte Zellen. Interessant ist der Abschnitt zwischen der Bakterienkolonie und dem Gewebsstück. Aus dem der Kolonie zugekehrten Rande sind Stern- und Spindelzellen in üppiger Weise ausgewachsen. Sie haben blasses Protoplasma, sind scharf gezeichnet und anastomosieren untereinander. Weiter gegen die Bakterienkolonie zu folgt nun eine schmale Zone, in der lauter Spindelzellen liegen, aber alle einzeln; man hat den Eindruck, daß sie sich von dem Zellnetz,



Abb. 2.

das mit dem Gewebsstück verbunden ist, losgemacht haben, das Protoplasma scheint nicht mehr ganz so hell wie bei den anastomosierenden Zellen. Es folgt jetzt, immer gegen die Kokkenkolonie hin, eine Zone, in der verschieden geformte Zellen zerstreut liegen. Man sieht hier meist geschwänzte oder kaulquappenähnliche Formen mit abgerundeten Rändern und feinkörnigem Protoplasma. Der dickere abgerundete Pol ist dem Bakterienhaufen zugekehrt. Neben und in demselben liegen dann hauptsächlich runde Elemente von etwas wechselnder Größe. Ver einzelte Rundzellen findet man auch in dem Zellnetz und den zerstreut liegenden Spindelzellen.

Ich habe die sehr ausführlichen Aufzeichnungen von *Vetter* fast unverkürzt wiedergegeben, um den Eindruck des Unmittelbaren zu erhalten, wie er aus den Aufzeichnungen eines Experimentators hervorgeht, der erst im Beginn der Züchtungsversuche steht und das für ihn Neue eben noch genauer und umständlicher beschreibt als derjenige, der schon seit Jahren diese reizvollen Bilder verfolgt.

Aus der Beschreibung des auch von mir in allen Stadien genau beobachteten Versuches geht hervor, daß sich in einer anfänglich ungestört auswachsenden Herzklappenkultur, wie ich noch vervollständigend hinzufügen möchte, auf allen Seiten und besonders schön, auch in zwei ansitzenden Sehnenfäden viele Spindel- und Sternzellen bildeten und auf allen Seiten zu dem charakteristischen Geflechtwerk von Zellen verfilzten. Auf einer Seite dieser Kultur wurden am 4. Tage zum ersten Male einige Rundzellen bemerkt. Der Grund für ihre Erscheinen wurde erst am nächsten Tage klar in Gestalt einer Kokkenkolonie, die sich entfernt von der Zellkultur im Plasma entwickelte und die Kultur nun — offenbar durch ihre Umsatzstoffe — in doppelter Weise beeinflußte. Einmal löste sich der Teil der Zellkultur, der den Kokken benachbart und zugekehrt war, auf, die Zellverbindungen schmolzen, oder die Zellen zogen ihre Fortsätze allmählich ein, so daß erst feine, wie ausgeschwärmt Spindelzellen entstanden, die allmählich bei weiterem Einziehen der Ausläufer keulenförmig oder rhomboid und schließlich kugelig wurden. Zum zweiten wirken die Kokken chemotaktisch, indem die sich aus dem Verbande lösenden Zellen gegen die Kolonie zu vorstreben und sich um bzw. in dem Kokkenhaufen ansammeln.

Ich möchte in diesem Vorgang ein Analogon zur eitrigen Schmelzung des Gewebes sehen. Hier in der Gewebskultur ist aber die Möglichkeit vollkommen ausgeschlossen, daß die bei der Entzündung auftauchenden kleinen Rundzellen etwa aus dem Blute ausgewanderte Leukocyten seien. Die Entzündung ist eben die Reaktion der lebenden Gewebe auf Entzündungsreize und nicht die Durchdringung des Gewebes mit fremden, aus dem Blute stammenden Zellen, wobei sich das Gewebe selbst passiv, wie ein Stückchen Schwamm oder Holundermark, verhalten würde.

Die Fähigkeit, massenhaft Rundzellen zu produzieren, ist den künstlich fortgezüchteten Gewebskulturen auch dann noch eigen, wenn von dem ursprünglich explantierten Gewebe nichts mehr vorhanden ist. Ich habe auch hierauf schon in meiner oben erwähnten Arbeit hingewiesen und dort auch des genaueren Versuche von *Peyton Rous* und *F. S. Jones* zitiert, die gut wachsende Zellkolonien von anastomosierenden Spindel- und Sternzellen durch Zusatz von Trypsin auflösten und dann Rundzellen der verschiedensten Größe erhielten, die in ihrer überwiegenden Zahl den Lymphocyten glichen und bei Aussaat in Plasma wieder zu sich verflechtenden Spindel- und Sternzellen auswuchsen. Bei erneutem Zusatz von Trypsin zerfielen dann die Geflechte wieder in Rundzellen, die dann gewaschen, zentrifugiert und aufs neue ausgesät wurden und in gutem Nährmedium zu hochentwickelten Zellen auswuchsen. Dieses Wechselverfahren konnte beliebig lange und oft wiederholt werden.

Zum Belege der Tatsache, daß die Fähigkeit, Rundzellen zu bilden, auch den ohne Gewebsstücke weiter wachsenden Zellen erhalten bleibt,

sei es mir gestattet, noch einen Versuch hier anzuführen. Er entstammt einer Reihe von Versuchen, bei denen wir Vitalfärbungen der Kulturen durch Zusatz von Neutralrot zum Nährboden erzielten. Dieser Farbstoff läßt in der lebenden Zelle die Kerne frei und färbt bestimmte Granula der Zellkörper, so daß diese letzteren also von verschiedenen großen rot gefärbten Körnchen durchsetzt sind.

C. V. 133, angelegt am 25. VI. 1921: Aorta von einem jungen Kaninchen. Nach 5 Tagen üblichen Wachsens mit der für die Vitalfärbung charakteristischen Tingierung und mehrmaligem Auswaschen des Stückchens und frischer Aussaat desselben wird schließlich am 14. VII. eine gut wachsende Kultur gewonnen. Es hatte sich um das Stück ein Geflecht anastomosierender Spindel- und Sternzellen gebildet. Aus dieser Kultur wird das Gewebsstückchen herausgenommen, *die übrigbleibenden Zellen werden für sich allein weitergezüchtet als C. V. 133 Z.*

Bis zum 20. VII. haben sich die Zellen enorm vermehrt und sind zu einem dichten, weit ausgebreiteten Netz von Stern- und Spindelzellen gewuchert.

21. VII.: Man sieht jetzt *vereinzelt* in den Maschen der Spindel- und Sternzellen zum Teil auch diesen dicht anliegenden *Rundzellen*, während am Tage vorher nur Stern- und Spindelzellen vorhanden waren.

21. VII.: Abends Nachfütterung.

24. VII.: *In den Maschen* des weiter üppig gewachsenen Netzes *liegen viele runde Zellen*. Einmal große, kugelige, mit Neutralrot gefärbte, dann gleichgroße, nicht gefärbte Rundzellen, die gekörnt sind. An anderen Stellen liegen viel kleinere, scharf konturierte Zellen, die mit feinen, aber nicht rot gefärbten Körnchen durchsetzt sind. Endlich finden sich viele kleine und kleinste leuchtende Elemente, die fast homogen sind und manchmal wie Trabanten um größere granulierte Zellen gelagert sind.

Das Bemerkenswerte an diesem Versuche ist, daß in einer Kultur von Zellen, die von einem vor 23 bzw. 26 Tagen ausgepflanzten Aorta-stückchen abstammen, und die seit 7 bzw. 10 Tagen für sich allein, nach Entfernung des Gewebsstückchens aus der Kultur, weitergezüchtet worden sind, Rundzellen erscheinen. Diese Zellen werden zum ersten Male am 23. Tage nach Beginn der Aussaat und am 7. Tage nach Entfernung des Stückchens aus der Kultur beobachtet. Sie verschwinden nach Zusatz von frischem Nährmaterial vorübergehend, treten aber dann nach 3 Tagen in stark vermehrter Zahl wieder auf. Hierdurch wird der letzte Einwand widerlegt, dahingehend, daß die in der Kultur sichtbar werdenden Rundzellen nichts weiter seien als etwa zufälligerweise im Gewebe gerade anwesende Wanderzellen. In dem zuletzt mitgeteilten Versuche sind die runden Zellen als Abkömmlinge der seit 7 oder 10 Tagen ohne jedes Gewebsstück für sich allein weiter gezüchteten und üppig wachsenden Zellen zu betrachten. Sie sind nicht aus dem Blute ausgewandert, sondern in diesem Falle von den Gewebszellen gebildet worden.

Seit Jahren beschäftigt mich nun, wie oben angedeutet, die Frage, ob diese runden Zellen, die sich ganz wie die Entzündungszellen verhalten, auch wirklich die Eigenschaften der sog. Leukocyten besitzen. Ich habe

in meiner früheren Arbeit des längeren ausgeführt und photographisch auch mit Abbildungen belegt, daß diese Zellen U- und S-förmige oder gelappte Kerne besitzen und verschiedenartige Granulierungen aufweisen.

Auch neuerdings konnten wir wieder in der Kultur einer Kaninchenherzklappe prachtvolle Rundzellen züchten, wie wir sie in einer Abbildung wiedergeben. Man sieht Rundzellen, die sich in ihren Kernformen in nichts unterscheiden von den myelogenen Leukocyten. Als weiteren Beweis für ihre Identität mit diesen Formen finden wir in der Giemsafärbung neutrophile Granulationen. Es liegen also Zellen vor, die ganz

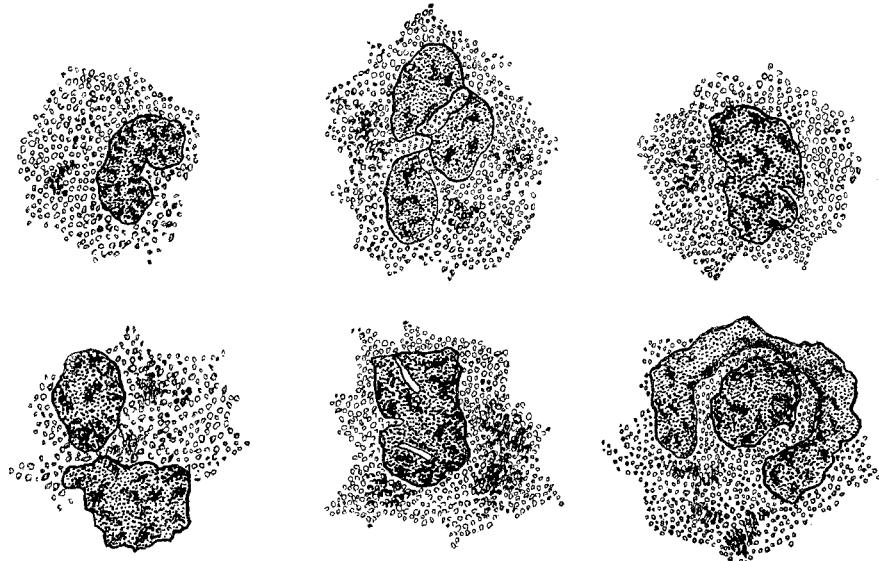


Abb. 3. Einige Zellen nach der fixierten, mit Giemsa gefärbten Kultur gezeichnet. Dabei sieht man sehr schön die leukocytären Formen mit den gelappten Kernen und der Granulierung.

den neutrophilen Leukocyten entsprechen und auch von hämatologischer Seite als solche anerkannt wurden.

Trotzdem findet Lubarsch, daß das Auftreten von wirklichen echten Leukocyten nur behauptet, nicht aber bewiesen worden sei. Eines muß ich allerdings zugeben: Die Oxydasereaktion fiel bisher auch bei den polynukleären Zellen negativ aus. Ich glaube das abweichende Verhalten leicht mit dem Umstande erklären zu können, daß den Zellen, die in einem winzigen Tröpfchen verdünnten Blutplasmas wachsen, doch eben vieles fehlt, was in dem komplizierten menschlichen oder tierischen Organismus zum Ablauf der sehr verschiedenartigen Lebensvorgänge vorhanden ist. Hierin gehört in erster Linie das Fehlen der Zirkulation, welche den Geweben andauernd Sauerstoff und Nährmaterial zuträgt und sie von Stoffwechselumsatzprodukten befreit. Diese Stoff-

wechselumsatzprodukte werden zweifellos, zumal wenn es sich um Bakteriengifte und ähnliches handelt, in den dafür bestimmten Organen chemische Korrelationen auslösen und so neue chemische Stoffe hervorrufen, die dann wieder den entzündeten Geweben zugute kommen. Es fehlen in den Kulturen die verschiedenen Fermente, und da ist es wohl nur natürlich, daß sich allerlei Abweichungen in dem feinen Chemismus der Zellen zu erkennen geben. Aus diesem Gedankengange heraus habe ich zum Teil die Tiere vor der Blutentnahme mit Bakterienextrakten, mit abgetöteten Streptokokkenkulturen, mit Terpentinwasser oder anderen Stoffen vorbehandelt, in der Hoffnung, daß dann in dem Plasma solcher Tiere Stoffe vorhanden sein könnten, die das Bild der wachsenden Kulturen nach der Seite der Entzündung hin verschieben würden. Zum Teil ist dies ja auch gelungen, indem bei solchen Kulturen viel mehr Rundzellen als unter gewöhnlichen Umständen auftreten. Aber es zeigt sich, daß gar zu oft nach solchen Vorbehandlungen das Blut nicht mehr bakterienfrei ist, und ich habe mir eine große Anzahl gut wachsender aseptischer Kulturen durch Verwendung von Blut solcher Tiere zerstört, auch wenn die Injektionen unter peinlichster Beachtung aseptischer Regeln ausgeführt worden waren. Trotz immer erneuter Modifikationen gelang es nicht, die Oxydasereaktion in den künstlich gezüchteten Rundzellen hervorzurufen. Leider wissen wir über die Entstehung des die Leukocyten auszeichnenden Fermentes sehr wenig. Wir kennen weder den Ort wo, noch die Bedingungen, unter denen es gebildet wird. Wahrscheinlich spielt doch die Versorgung der Gewebe, Zellen und Flüssigkeiten mit Sauerstoff eine große Rolle bei der Oxydasebildung, und deshalb können wir auf die Bildung dieses Fermentes kaum rechnen, solange wir die Kulturen nicht ausgiebig mit Sauerstoff versorgen können. Es ist ja durchaus unerwiesen, daß die Leukocyten das Ferment selbst bilden, es ist sehr wohl denkbar, daß nur diese Zellen das irgendwo (oder überall?) im Körper gebildete Ferment aufnehmen oder abwandeln, so daß sich die in der Zelle befindlichen Granulationen damit verbinden.

Wenn dies letztere wirklich der Fall ist, dann müßten leukocytäre Zellen auch in den Gewebskulturen das Ferment an sich reißen, sofern dasselbe oder vielleicht ein naher Verwandter davon, in dem sie umgebenden Nährmedium enthalten ist.

Es ist nun *Wilstätter* in München vor einigen Jahren gelungen, aus Pflanzen eine Peroxydase herzustellen. Auf meine Bitte hat mir Herr Geh. Rat *Wilstätter* gütigst eine kleine Quantität des von ihm rein hergestellten Stoffes zu meinen Versuchen überlassen, wofür ich ihm auch an dieser Stelle danken möchte. Mit einer 1: 10 000 verdünnten Aufschwemmung dieses Stoffes haben wir eine Anzahl geeigneter Kulturen unter verschiedenen Bedingungen behandelt. Ich möchte davon nur 2 Versuche hier mitteilen.

C. V. 241: Herzklappe eines nicht ausgewachsenen Kaninchens (8 Wochen alt), ausgelegt am 30. XI. 1921 in Plasma 1 : *Fleischscher Lösung*<sup>1)</sup> 4 und Neutralrotlösung 1 : 10 000.

2. XII.: Übliche Rotfärbung des Stückes, in den Gewebszellen rote Granulationen intensiv gefärbt. Am Gewebsrande intensiv rot gekörnte Rundzellen, gegen die Stern- und Spindelzellen abstechend.

3. XII.: Stück mit der Pinzette aus der Kultur entfernt, die Zellen als C. V. 241 Z. weitergezüchtet. Das Stück in Tyrode abgespült und in Mischung von Plasma und Tyrode 1 : 4 mit Neutralrot 1 : 10 000 schwach rot gefärbt explantiert.

7. XII.: Zahlreiche Stern- und Spindelzellen und stark rot gefärbte Rundzellen verschiedener Größe. Diese Zellen werden nach Herausheben des Gewebsstückchens allein weitergezüchtet als C. V. 241 Z. 1 durch Zusatz von Plasma-Tyrode 1 : 4 (auf 10 ccm Tyrodelösung wurde ein kleinstes Körnchen Peroxydase hinzugesetzt).

10. XII.: Die vorher rot gefärbten Zellen sind entfärbt, aber sehr stark vermehrt. Neben Stern- und Spindelzellen sieht man Rundzellen und größere granulierte (ungefärbte) amöbenartige Zellen. An einer Stelle scheint sich das Netz anastomosierender Zellen in Rundzellen aufzulösen.

Es werden im Abstand von einer Stunde zweimal je zwei Platinösen der Peroxydase der Kultur zugesetzt und dann nach vier weiteren Stunden die Kultur in Formalin fixiert.

*Nach 24 stündiger Fixation Behandlung nach Schulze mit 1 proz. Naphthollösung und 1 proz. Dimethylparaphenyldiamin.*

Ergebnis: *Die kleineren wie die größeren Rundzellen (Körnchenzellen ähnelnd) färben sich himmelblau bis tiefblau. Die Granula sind in einigen Zellen sehr schön zu erkennen. Die anastomosierenden Zellen sind ungefärbt; dort, wo das Zellnetz in Auflösung begriffen, zeigen auch einige der Zellen mit den halbeingezogenen Fortsätzen eine leichte feinste blaue Granulierung. Im Präparat finden sich zwei Bakterienkolonien.*

C. V. 246: Kaninchen-Aortenklappen, ausgesät am 29. XI. 1921.

Am 3. XII. wird das Gewebsstückchen herausgenommen, und die üppig wachsenden Stern- und Spindelzellen werden als C. V. 246 Z. weitergezüchtet.

Am 7. XII. geringe Wucherung von Spindelzellen und wenige Rundzellen. Nachfütterung mit Plasma und Tyrode 1 : 4.

9. XII.: Die Stern- und Spindelzellen haben sich sehr stark vermehrt und wachsen namentlich in den zentralen Teil, in dem früher das Gewebsstückchen lag. In dem Netzwerk einige Rundzellen.

Am 10. XII. neben den weiter vermehrten, scharf konturierten anastomosierenden Zellen auch viele Rundzellen, die in dem Netzwerk liegen, aber auch Bezirke einnehmen, wo gestern noch Spindel- und Sternzellen lagen. Hier sieht man auch Übergänge von diesen zu Rundzellen. Die Rundzellen zum Teil fein granuliert und mit Pseudopodien versehen und hellglänzend. Am Rand des Nährmediums eine Bakterienkolonie.

Um 10 Uhr vormittags werden 4 Platinösen der Peroxydaseaufschwemmung zugesetzt.

Um 3 Uhr nachmittags 1 Tropfen Naphthol 1 : 10 000 und nach 15 Minuten 1 Tropfen Dimethylparaphenyldiamin 1 : 1000.

<sup>1)</sup> Eine vom Herrn Dr. *Fleisch*, Assistenten am Physiol. Institut Zürich hergestellte Modifikation der Tyrodelösung.

Die Reaktion wird von *Vetter* unter dem Mikroskop beobachtet.

Die Zellen buchten sich aus unter Bildung von Vakuolen. Nach einigen Minuten nehmen die Rundzellen tiefblaue Färbung an, später färben sich auch die anderen Zellen schwach bläulich, aber immer sind die Rundzellen sofort durch ihre weit intensivere, tiefblaue Färbung herauszukennen.

Aus dieser in alle Einzelheiten genau eingehenden Schilderung meiner Kulturen geht hervor, daß das gesteckte Ziel erreicht ist. Der Ring ist geschlossen. Der Einwand, es könne sich um Wanderzellen handeln, die im Klappengewebe vor Beginn der Versuche enthalten wären, ist widerlegt. Es ist damit auch endgültig bewiesen, daß die bei der Entzündung auftretenden Zellen oder wenigstens ein erheblicher Teil derselben vom Gewebe selbst geliefert werden und nicht aus dem Blute ausgewanderte Leukocyten sein müssen. Damit würde aufs neue die *Growitzsche* Lehre unumstößlich bestätigt, für die *Growitz* und auch ich seit Jahrzehnten manche Tatsachen und wertvolle Beobachtungen anführen konnten.

Aus dem fibroelastischen Gewebe selbst sind Zellen ins Plasma ausgewandert, von denen *ein Teil alle Eigenschaften der Lymphocyten hat, ein anderer gelapptkernig ist, neutrophile Körnelung und Oxydasesreaktion und somit alle diejenigen Merkmale besitzt, welche für die myelogenen echten Leukocyten und Eiterkörperchen charakteristisch sind.*

*Naegeli* selbst hat diese Rundzellen als den myelogenen Leukocyten völlig gleichartig anerkannt. Mit diesem Ergebnisse muß die Lehre vom dualistischen Ursprunge der Leukocyten und Lymphocyten aufgegeben werden, da sie mit den hier aufgeführten Tatsachen unvereinbar ist.

Meine durch Jahrzehnte größtenteils gemeinsam mit *Growitz* fortgesetzten Untersuchungen über die allmähliche Zellentwicklung bei Heilung und Entzündung haben in uns die Überzeugung vom histioiden Ursprung der kleinzelligen Infiltration immer wieder gefestigt, ohne daß es gelingen wollte, den uns von allen Seiten entgegengesetzten Widerstand zu brechen und das Dogma von der Allmacht der Leukocyten zu stürzen. Die Beobachter ließen sich immer wieder durch die vollkommene Übereinstimmung der Eiterzellen mit den Leukocyten des Blutes bestimmen, eine Einwanderung der letzteren ins Gewebe anzunehmen. Dieses Vorurteil beseitigt und den Weg für eine objektive Erforschung der Entzündungsvorgänge frei gemacht zu haben, halte ich für das wertvollste Ergebnis meiner heute mitgeteilten Kulturversuche.

#### Bemerkungen zu vorstehender Arbeit.

Von

O. Lubarsch.

Die vorstehende nachgelassene Arbeit des leider so plötzlich verstorbenen verehrten Kollegen *Busse* habe ich gerne zum Abdruck ge-

bracht, weil sie, noch in seiner letzten Lebenszeit entstanden, den Schlußstein zu dem von *Grawitz* und ihm mit so großer Ausdauer errichteten Gebäudes bilden sollte. Ich kann aber doch einige der Ausführungen nicht ganz ohne Widerspruch lassen und vor allem seinen Schlußsätzen nicht zustimmen. Zunächst hat *Busse* nicht ganz wortgetreu meine Ansichten wiedergegeben, wenn er schreibt, ich habe „das Auftreten von Lymphocyten in Gewebskulturen rückhaltslos bestätigt“. Ich habe mich vorsichtiger ausgedrückt. Ich spreche nur von Zellen vom „Typus der Lymphocyten“ (Virch. Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. 235, 200) und „lymphocytenartigen Rundzellen“ (ebenda S. 201). Das ist immerhin ein Unterschied. Daß lymphocytenartige Zellen als Abkömmlinge seßhafter Gewebszellen bei der Entzündung auftreten, das habe ich nicht nur etwa erst jetzt zugestanden, sondern seit mehr denn 25 Jahren gelehrt, und das haben *Marchand*, *Orth* u. a. ebenfalls anerkannt, und *Busse* setzt die Dinge in ein unrichtiges Licht, wenn er schreibt, daß ihm und *Grawitz* in dieser Hinsicht allseitiger Widerstand entgegengesetzt worden sei und man an dem „Dogma von der Allmacht der Leukocyten“ festgehalten habe. Dieses Dogma wurde schon etwa 1890, allerdings auch unter *Grawitz*’s Beteiligung, gebrochen. Der allseitige Widerstand galt nur der Schlummerzellenlehre in ihrer alten und neuen Fassung und diese Lehre scheint mir auch durch die Gewebskulturversuche nicht begründet. Die Erfahrungen an Gewebskulturen haben nur in erfreulicher Weise und in sehr einwandsfreier Weise bestätigt, daß die bei Entzündungen auftretenden Rundzellen — unter denen sich auch leukocytenähnliche befinden — zu einem großen Teil histiogener Herkunft sind. Daß deswegen aber diese Rundzellen den Lymphocyten des Blutes und der lymphatischen Teile völlig gleichgestellt werden dürfen, ist damit ebensowenig bewiesen wie durch die Versuche am Lebenden. Vielmehr zeigen die von *Busse* selbst angeführten Versuche von *Peyton Rous* und *Jones*, daß es sich lediglich um Form- und keine Wesensveränderungen, nicht um eine *Metaplasie* handelt. Und das war lange vor den Gewebszüchtungen bekannt, daß sowohl absterbende, wie wachsende Zellen die Neigung haben sich abzurunden, man denke nur z. B. wie verschiedener Herkunft die einander so ähnlich sehenden Fettkörnchenzellen sein können. Doch das mag nebensächlich sein. Der Hauptpunkt bleibt nach wie vor, ob in den Gewebskulturen ursprünglich leukocytenfreier und blutgefäßloser Teile echte Leukocyten auftreten können, d. h. also Zellen, die nicht nur eine mehr oder weniger große Formähnlichkeit mit diesen weißen Blutzellen haben, sondern die ihnen auch in ihrem spezifischen Bau entsprechen. Auch hier kann für jeden, der Versuche mit ausgepflanzten Herzklappen gemacht hat, kein Zweifel sein, daß große *Formähnlichkeiten* bestehen und namentlich Rundzellen mit

eingekerbten oder lappigen Kernen vorkommen. Auch das ist eigentlich schon längst nicht mehr umstritten — hat doch *Marchand* deswegen die Bezeichnung „leukocytoide“ Zellen eingeführt. Nun glaubte *Busse* aber in seiner nachgelassenen Arbeit den endgültigen Beweis für die völlige Übereinstimmung der in Gewebskulturen auftretenden Rundzellen mit Blutleukocyten geführt zu haben und zieht daraus auch für die Hämatologie sehr weitgehende Schlüsse. Ich würde seinen Schlüssen nicht einmal dann ganz beipflichten können, wenn ich seine Beobachtungen für völlig eindeutig hielte. Zunächst gibt *Busse* zu, daß er für gewöhnlich in den für Leukocyten gehaltenen Zellen die Oxydasereaktion nicht erhalten habe, was er durch verschiedene Umstände zu erklären sucht. Dann hat er aber eine Reaktion erhalten, die er für positive Oxydasereaktion ansieht, nachdem er Peroxydase den Kulturen zugesetzt hatte. Es ist mir nach der Beschreibung und eigenen Erfahrungen aber durchaus zweifelhaft, ob es sich um eine echte Oxydasereaktion gehandelt hat. Zunächst ist bemerkenswert, daß auch andere Zellen als die Rundzellen eine, wenn auch schwache Naphtholblauauffärbung gaben und daß der Farbenton zum Teil als „himmelblau“ geschildert wird. Auch in den in meinem Institut angestellten Versuchen von *Mitsuda* haben wir nicht selten eine große Menge von meist rundlichen Zellen in den gezüchteten Herzklappen gesehen, die eine ausgesprochene blaue Körnelung bei Anstellung der *Schultzeschen* Oxydasereaktion zeigten, bei Vergleich mit Sudan- und Scharlachgefärbbten Präparaten sich aber stets als fetttröpfchenhaltige Zellen erwiesen und bei der *Loeleschen* Reaktion nicht gefärbt wurden; auch unterschied sich die positive Reaktion noch dadurch von der echten Naphtholblauoxydasereaktion, daß sie sich wochenlang in unseren Präparaten hielt. — Das alles hat *Busse* offenbar nicht geprüft, und deswegen muß man zum mindesten mit der Möglichkeit rechnen, daß die von *Busse* für oxydasehaltige Leukocyten gehaltenen Zellen fetthaltige waren. Wie es mit der neutrophilen Körnelung steht, deren Nachweis natürlich sehr bedeutungsvoll wäre, entzieht sich zunächst meinem Urteil. Nur geht aus den Parallelversuchen *Mitsudas* folgendes hervor: Die Befunde in unter gleichen Bedingungen einerseits lebenden Kaninchen eingepflanzten und andererseits in Kaninchenplasma gezüchteten Herzklappen ergaben so gut wie völlige Übereinstimmung hinsichtlich des Auftretens zerfallender Zellen, gewuchter Gewebszellen, lymphocyten- und leukocytenähnlicher Rundzellen; der Unterschied bestand in der Hauptsache darin, daß *in den implantierten Teilen reichlich pseudoeosinophile Leukocyten vorhanden waren, während sie in den Gewebskulturen vollständig fehlten*. — Das scheint mir eine auch durch die neuen Angaben *Busses* nicht zu erschütternde Tatsache. — Immerhin wird *Mitsuda* die Versuche *Busses* nachprüfen, und wir werden uns freuen, wenn wir durch eine Bestätigung seiner letzten Arbeit zu einer Ehrung seines Andenkens beitragen könnten.