

(Aus dem Institut für Histologie und Embryologie an der Medizinischen Militär-Akademie zu St. Petersburg. [Direktor: Prof. Dr. A. Maximow, z. Zt. University of Chicago, U. S. A.].)

Über *in vitro* Kulturen von Geweben der Säugetiere mit besonderer Berücksichtigung des Epithels.

I. Kulturen der Submaxillaris.

Von

Dr. Nikolaus G. Chlopin.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Januar 1923.)

I. Einleitung, Material, Technik.

In der bis jetzt veröffentlichten Literatur über die Gewebekulturen *in vitro* findet man sehr verschiedenartige Interpretationen der dabei beobachteten Tatsachen. Von manchen Autoren ist unter anderem selbst die Möglichkeit eines richtigen Wachstums *in vitro* bestritten und die Explantate sind nur als überlebend betrachtet worden [Jolly⁶), Dilger⁵), Pfeiffer und Prausnitz⁹) u. a.]. Jetzt aber, wo es Carrel gelungen ist, das Bindegewebe eines Hühnerembryos 10 Jahre lang *in vitro* zu züchten, kann man die potentielle Unsterblichkeit wenigstens für das Bindegewebe als bewiesen betrachten. Die an den Explantaten hervortretenden Erscheinungen sind zum großen Teil wirkliche progressive Entwicklung, echtes Wachstum, nicht nur Überlebungserscheinungen.

Was nun die feinere Histologie der Gewebekulturen und die Wechselbeziehung der verschiedenen Gewebe zueinander *in vitro* anbetrifft, so sind die Angaben darüber sehr strittig. Das beruht darauf, daß nur sehr wenige Autoren eine passende histologische Technik angewandt haben. Durch die Arbeiten von Maximow^{7, 8)} haben wir jetzt einen tieferen Einblick in die Morphologie und Histogenese der zelligen Elemente in Kulturen des Bindegewebes und der Lymphknoten gewonnen.

Die Verwandlungen des Epithels *in vitro* und besonders seine Beziehungen zum Bindegewebe in den Gewebekulturen sind viel weniger bekannt. Champy^{1, 2, 3)} hat bekanntlich die Behauptung aufgestellt, daß das Epithel verschiedenen Ursprungs *in vitro* seine charakteristischen Merkmale einbüßt, einer regressiven Differenzierung anheimfällt und schließlich zusammen mit dem Bindegewebe ein ganz indifferentes

Gewebe von embryonalem Charakter liefert. Mir ist es gelungen, zu beweisen⁴⁾, daß eine solche Behauptung, wenigstens für die Gewebe älterer Embryonen, nicht zutrifft. Man kann stets das Epithel vom Bindegewebe in vitro unterscheiden; das erste bewahrt seine Kontinuität, im zweiten kann man sogar deutliche progressive Differenzierung nachweisen.

Es wäre somit von Interesse, das Verhalten der Epithelien verschiedener Art in vitro zu erforschen, die in ihnen enthaltenen prospektiven Potenzen und ihre Veränderungen unter verschiedenen Umständen aufzuklären und endlich ihre Beziehungen zum Bindegewebe näher zu bestimmen.

Da außerdem, wie ich bereits gezeigt habe⁴⁾, auch die Entwicklung des explantierten Fragmentes als Ganzes besonderes Interesse beansprucht, weil man dabei Vorgängen begegnet, die als regulatorisch gedeutet werden müssen, so werde ich in der vorliegenden Arbeit auch diese Seite des Problems besonders berücksichtigen.

Da die experimentelle Arbeit bei uns jetzt mit ganz außerordentlichen materiellen Schwierigkeiten verbunden ist und es z. B. fast unmöglich ist, die nötigen Tiere, Gerätschaften und Reagentien anzuschaffen, ist das Material, das mir zur Verfügung steht, nicht sehr groß; da dieselben Umstände aber auch die Fortsetzung meiner Untersuchungen in Frage stellen, finde ich es zweckmäßig, die von mir bereits gewonnenen Resultate in einzelnen Mitteilungen erscheinen zu lassen.

Die vorliegende Arbeit enthält die Beschreibung der mit Submaxilläriskulturen gewonnenen Resultate. In kurzer Zeit werde ich dann weiter über Kulturen der Harnblasenschleimhaut berichten, wo es mir unter anderem gelungen ist, reine Epithelkulturen zu gewinnen, und über Kulturen des embryonalen Augenbechers.

Was die Technik der Versuche anbetrifft, so habe ich sie in meiner früheren Arbeit⁴⁾ beschrieben; ebendaselbst findet sich auch ein ausführliches Literaturverzeichnis.

Als Untersuchungsmaterial dienten mir kleine Stückchen der Glandula submaxillaris eines 2 Tage alten Kaninchens, die in homogenem Blutplasma mit Zusatz von Knochenmarkextrakt im hängenden Tropfen, wie üblich, kultiviert wurden. Die Untersuchungsdauer betrug im ganzen 8 Tage mit einer Transplantation, die am 5. Tage vorgenommen war. Die Kulturen wurden sowohl lebend im Nuttalschen Brutschrank beobachtet als auch nach zweckmäßiger Fixierung auf Schnittserien untersucht.

Als Fixierungsflüssigkeit benützte ich auch diesmal ausschließlich Zenker-Formol. Die in Zelloidin eingebetteten Kulturen wurden in lückenlose, 8 μ dicke Schnittserien zerlegt und mit Eosin-Azur gefärbt (EAz). Die Färbung wurde von mir etwas modifiziert, indem ich nach-

träglich die Schnitte noch mit alkolischem Eosin nachfärbte; diese geringe Modifikation lässt die Unterschiede in der Basophilie des Protoplasmas besonders deutlich hervortreten.

Einige Stückchen desselben Organs, das zur Verfertigung der Kulturen diente, wurden als Kontrollpräparate auf dieselbe Weise bearbeitet und untersucht.

II. Beschreibung der Kontrollpräparate.

In den Kontrollpräparaten sieht man dicht gedrängte, mit gleichartigen, dunkelgefärbten Epithelzellen erfüllte sekretorische Endabschnitte und dünne Bindegewebszüge und Blutcapillaren dazwischen. Dickere Bindegewebsstreifen grenzen die einzelnen Drüsenläppchen voneinander ab. Im interlobulären Bindegewebe sieht man größere Blutgefäße, Ausführungsgänge und kleine sympathische Ganglien. Die Endabschnitte der Drüse färben sich tiefblau mit einem Stich ins Violette, die intra- und die interlobulären Ausführungsgänge nehmen dagegen einen hellen himmelblauen Ton an. Die das Lumen der Endabschnitte begrenzenden Zellen haben eine kegelförmige Gestalt; ihr zentralwärts gerichteter Abschnitt ist mit Sekretkörnchen dicht erfüllt, die zum größten Teil aufgelöst sind und als feine Vakuolen erscheinen, wodurch dieser Abschnitt des Zellprotoplasmas eine wabige Struktur erhält. Die nach außen gerichtete Basis der Zellen enthält besonders intensiv gefärbtes, stark basophiles Protoplasma und einen dunklen Zellkern, entbehrt aber vollständig der Sekretgranula. Das Epithel der Ausführungsgänge ist zunächst in den Schaltstücken kubisch und wird dann allmählich zylindrisch; eine sehr bedeutende Höhe erreicht es aber nur in den interlobulären Ausführungsgängen größeren Kalibers. Keine Korbzellen lassen sich unterscheiden. In den Ausführungsgängen ist der Kern arm an Chromatin und hat eine sphärische oder ovale Gestalt. Im Epithel der Ausführungsgänge findet man hie und da Mitosen. Außer dieser bereits fertig ausgebildeten und funktionierenden Drüsenabschnitte findet man an der Peripherie des Organs, von reichlichem Bindegewebe umgeben, auch noch offenbar in Entstehung begriffene oder vielleicht abortive Läppchen, deren Endabschnitte noch keine Spur von sekretorischen Vorgängen zeigen und ohne scharfe Grenze in das indifferente Epithel der Ausführungsgänge übergehen. Ihre Zellen besitzen rundliche helle Kerne und einen sehr dunklen basophilen Protoplasmasaum. Durch bedeutende Basophilie zeichnet sich hier auch das Protoplasma der interlobulären Ausführungsgänge aus.

Das lockere interstitielle Bindegewebe besteht aus gewöhnlichen Fibroblasten, nur selten trifft man in ihm sehr spärliche lymphoide Wanderzellen. Im dünnen spaltförmigen Lumen einiger Ausführungsgänge sieht man schmutzig blaugrau gefärbtes Sekret.

III. Topographie der Kulturen.

Die soeben kurz skizzierte typische Struktur der Drüse erfährt im Explantate verschiedenartige Veränderungen, die teils regressiven, teils aber progressiven Charakter besitzen.

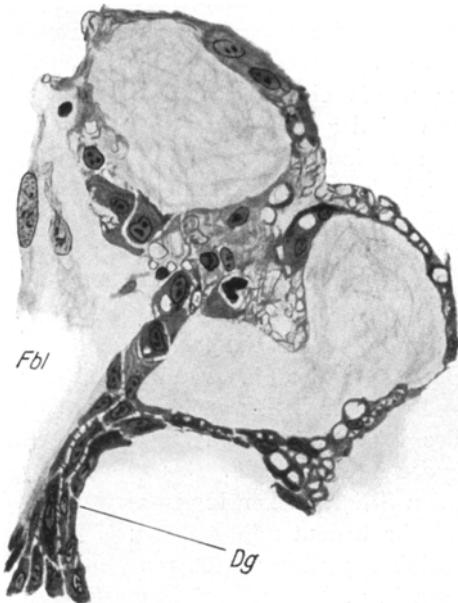
Während der ersten Tage nach der Explantation sind die Veränderungen in den Kulturen noch ziemlich schwach. Man konstatiert nur das gewöhnliche grasförmige extensive Wachstum des Bindegewebes, während die Aktivität des Epithels noch sehr unbedeutend ist. Es treten

vielmehr zunächst regressive Veränderungen in den Vordergrund. Der zentrale Teil des Explantates fällt, wie es immer der Fall ist, der Degeneration anheim; dabei ist die degenerierende Zone in der Nähe der Deckglasoberfläche, wo die Existenzbedingungen am ungünstigsten ausfallen, am größten. Am empfindlichsten sind augenscheinlich die sekretorischen Alveolen. Die Ausführungsgänge und das interstitielle Bindegewebe sind widerstandsfähiger und bleiben längere Zeit am Leben, so daß man mitunter sogar in den fast völlig degenerierten Abschnitten noch lebendige Ausführungsgänge unterscheiden kann. Sie heben sich als blaue kernhaltige Epithelschläuche deutlich vom diffus rosa gefärbten aus nekrotischen Alveolen bestehenden Hintergrund ab.

Abb. 1. Kultur von 4 Tagen. Zwei teilweise verschmolzene, mit Detritus gefüllte, sackförmig aufgeblähte Drüsenalveolen. Ihr Epithelüberzug ist stark vakuolisiert. Im angeschnittenen Drüsengang (*Dg*) deutliche Interzellularbrücken. *Fbl* = Fibroblasten.

Leitz hom. Imm. 1/12a, Oc. 2.

Die Sekretion scheint in vitro noch eine Zeitlang fortzudauern — am 3. und 4. Tage trifft man zuweilen zwischen stark veränderten Alveolen, besonders an der Peripherie des Explantates, solche, die noch granulaführende Drüsenzellen enthalten. Dafür spricht auch die durch das stauende Sekret hervorgerufene progressive Erweiterung der Lumina der Ausführungsgänge. Zum 6. Tage verschwindet aber jede Spur der Sekretion — keine granulaführende Zellen können mehr im Epithel gefunden werden. Dafür aber treten im Drüsenepithel nach der Transplantation in frisches Nährsubstrat zahlreiche Mitosen auf, und die früher unbedeutenden Veränderungen werden viel intensiver.



Die Involution der Alveolen geht sehr gesetzmäßig vor sich und schreitet von ihrem Zentrum zur Peripherie. Die früher mit Sekretgranulis gefüllten inneren Abschnitte der Drüsenzellen degenerieren und zerfallen, so daß schließlich nur deren basale, kernhaltige, rein protoplasmatische Teile am Leben bleiben. Das Volumen der Alveolen nimmt dabei stark zu, sie blähen sich cystenähnlich auf und erscheinen als mit Detritus gefüllte Säcke, deren Wand aus meist stark abgeflachten Zellen besteht [Abb. 5*). Dabei können die ebenfalls stark erweiterten Lumina der an die Alveolen grenzenden Abschnitte der Ausführungsgänge, zusammen mit den Alveolen, lange, weite Schläuche bilden,

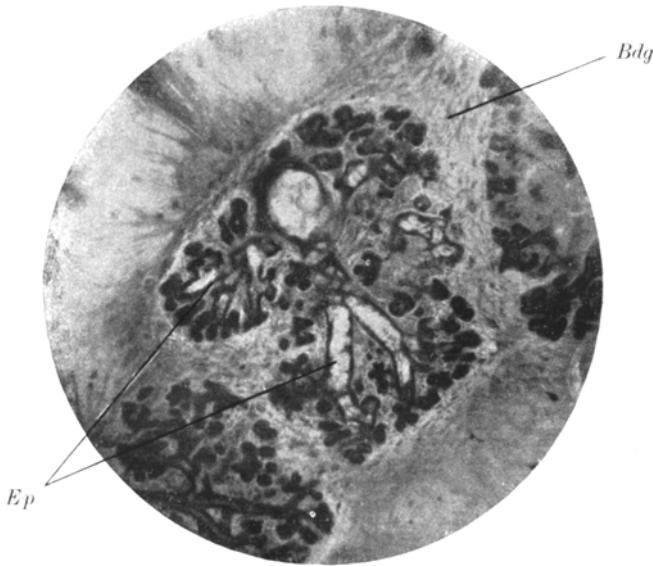


Abb. 2. Kultur von 8 Tagen. Regenerierte Drüsenstruktur. Junge Alveolenknospen von Bindegewebe umgeben. Die Lumina der Ausführungsgänge sind erweitert und besitzen nischenähnliche Aussackungen. *Ep* = Epithel; *Bdg* = Bindegewebe.

welche mit Detritus erfüllt sind, und deren Wände durch schwache Einschnürungen voneinander getrennte Nischen besitzen.

Nach Auffrischung des Nährbodens gewinnen die progressiven Veränderungen Oberhand. Die Mitosen werden zahlreicher. Der Detritus wird von den am Leben gebliebenen Zellen allmählich resorbiert. Die Schläuche nehmen eine mehr regelmäßige röhrenförmige Gestalt

*) Die Mikrophotogramme 1—3 wurden mit Zeiß Objektiv A und komb. Okular 8, Abb. 4 mit Zeiß' Objektiv C und projekt. Okular 2 aufgenommen, bei Tubuslänge von 160 mm und Projektionsweite von 160 mm. *Ugloff* spreche ich für seine Hilfe bei deren Anfertigung meinen besten Dank aus. Die Abb. 5 bis 11 wurden mit Hilfe des *Abbeschen* Zeichenapparates auf Objekttischhöhe entworfen bei Tubuslänge von 170 mm.

an und geben dann, zusammen mit den am Leben gebliebenen Ausführungsgängen größeren Kalibers, einem neuen frisch sprossenden Drüsenbaum Ursprung. Am 8. Tage nach der Explantation sieht man schon zahlreiche mit knospenähnlichen neuen Alveolen besetzte Verzweigungen der regenerierten Drüsenabschnitte, die von ebenfalls wucherndem interstitiellen Bindegewebe umgeben sind (Abb. 1, 2). Die Grenze zwischen Epithel und Bindegewebe ist überall scharf. Das weitere Schicksal dieser Kulturen war ich leider nicht imstande zu beobachten.

Die beschriebenen bedeutenden Regenerationserscheinungen organoiden Charakters treten aber nur dort hervor, wo das Epithel bei der

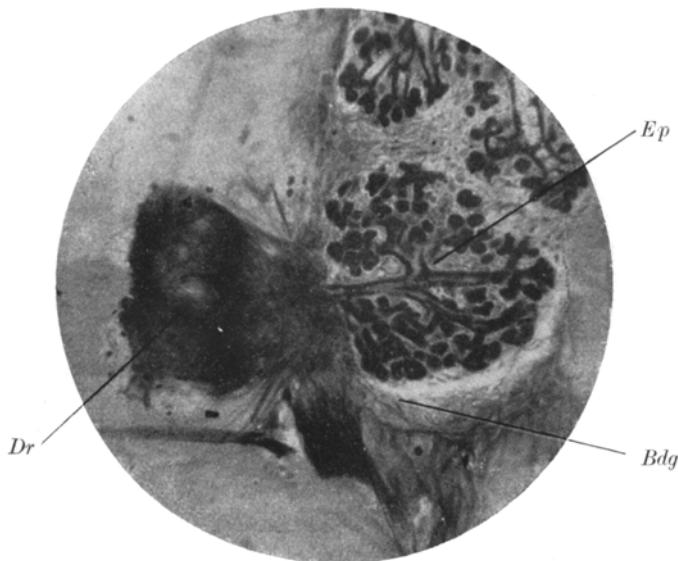


Abb. 3. Dieselbe Kultur; rechts = deutliche Drüsenstruktur = *Dr*; links = eine tangential angeschnittene Epithelschicht = *Ep*; *Bdg* = Bindegewebe.

Anfertigung der Explantate nicht verletzt wurde. An den Stellen, wo die Ausführungsgänge oder die Drüsenalveolen angeschnitten wurden, verlaufen die Vorgänge ganz anders, und die Entwicklung nimmt einen durchaus atypischen Charakter an.

Schon am dritten Tage nach der Explantation oder auch etwas früher setzt sich das Epithel der angeschnittenen Drüsenschläuche in Bewegung und bildet kontinuierliche Schichten, die sich entweder auf die Oberfläche des explantierten Stückchens selbst umkrepeln oder in das anliegende Fibrinnetz einwachsen oder sich auf der Oberfläche des Deckgläschen ausbreiten. Sie erinnern durchaus an die von *Uhlenhuth*^{10, 11)} beschriebenen Befunde. Dabei sind Mitosen zunächst nur ausnahmsweise zu finden, erst nach der Transplantation werden sie zahlreicher. An der

Bildung einer kontinuierlichen Schicht nehmen dabei oft mehrere angeschnittene Drüsenschläuche teil. Obgleich hierbei die Struktur solcher Schichten kompakt bleibt, können sich doch einzelne Epithelzellen von ihnen isolieren und ganz frei ins Fibrin einwachsen; ein Vorgang, den ich früher⁴⁾ nicht beobachtet hatte. Neben solchen Auswüchsen epithelialen Ursprungs findet man auch immer ganz unregelmäßig vordringende lockere Züge von Bindegewebe und einzelne Fibroblasten. Diese beiderlei Auswüchse verschiedenen Ursprungs lassen sich stets deutlich von einander unterscheiden.

Alle diese Vorgänge verlaufen zunächst sehr träge, nach der Transplantation aber werden sie sehr intensiv. Am 6.—8. Tage nehmen die

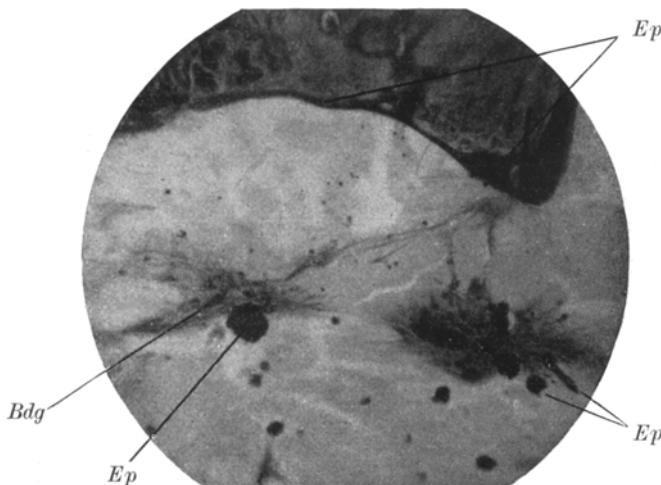


Abb. 4. Kultur von 6 Tagen. Oben ein Teil der mit Epithel (Ep) überdeckten Oberfläche des Explantats. Unten frei im Fibrin wachsendes Bindegewebe = Bdg, mit isolierten epithelialen Inseln (Ep) von verschiedenen Dimensionen.

Epithelschichten an Größe kolossal zu, dabei lassen sich an ihnen verschiedene Typen unterscheiden.

Die aus den angeschnittenen interlobulären Ausführungsgängen größeren Kalibers entstandenen Epithelschichten besitzen gewöhnlich eine unbedeutende Dicke, erreichen aber eine ganz beträchtliche Flächenausbreitung. Solche Schichten können einen großen Teil der Oberfläche des Explantates bedecken; dabei verflüssigt sich das ihnen anliegende Fibrinnetz (Abb. 3). Auch hier sehen wir also dieselbe Tendenz des Epithels ausgesprochen, auf welche ich schon anderswo die Aufmerksamkeit gerichtet habe, die Tendenz, das Explantat von außen zu begrenzen, es zu einem abgesonderten Teilorganismus zu machen. In anderen Fällen wachsen solche Schichten, gewöhnlich von Bindegewebe umgeben, in Form von breiten Lamellen ins Fibrin hinein oder an der

Oberfläche des Glases. Es können sich dann von ihnen einzelne Zellen lostrennen (Abb. 2 links).

Ein anderes Aussehen haben die sich auf Kosten der verletzten feineren Verzweigungen des Drüsenbaums bildenden Auswüchse. Diese letzteren haben die Gestalt von kompakten, aus Epithelzellen bestehenden Höckern, die von der Oberfläche des Explantates nach außen hervorragen. Man kann stets ihren Zusammenhang mit mehreren Drüsenschläuchen nachweisen. Das ihnen anliegende Fibrin wird gewöhnlich auch verflüssigt (Abb. 3).

Außer diesen eben beschriebenen Gebilden, die ihren Zusammenhang mit den Epithelien des explantierten Drüsenstückchens bewahren, beobachtet man in der am 6. Tage schon bedeutenden Zone des ins

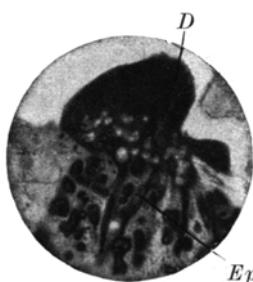


Abb. 5. Kultur von 6 Tagen. Ein Epithelhöcker (*Ep*), der vom Rande des Explantats aus hervorragt; sein Zusammenhang mit den Drüsenzügen (*D*) ist sichtbar.

fibrin unregelmäßig eingewachsenen Bindegewebes freiliegende zerstreute epitheliale Elemente. Die Zellen des Bindegewebes bilden hier meistens mit ihren langen, spitzen, oft anastomosierenden Ausläufern ein lockeres Netz. Die epithelialen Elemente liegen in den Maschen des Netzes entweder ganz isoliert, oder sie vereinigen sich zu Gruppen von 2, 3 und mehr Zellen, oder endlich sie bilden hier größere kompakte Massen. Diese im Bindegewebe zerstreuten epithelialen Komplexe haben ein verschiedenes Aussehen. Meistenteils stellen sie aus konzentrisch angeordneten Zellen bestehende Perlen vor, die vollständig abgerundet sind und vom umgebenden

Gewebe ganz isoliert erscheinen (Abb. 3 unten und Abb. 6, 11). Es ist dabei möglich, alle Stadien des Zusammentretens einzelner Epithelzellen bis zur Bildung der Perlen zu verfolgen. In diesen vom Explantat ganz abgesonderten Elementen trifft man sehr zahlreiche normale Mitosen. Näheres über ihre Formveränderungen und ihre Morphologie werde ich im nächsten Abschnitte berichten. Hier möchte ich es nur ausdrücklich betonen, daß alle diese isolierten epithelialen Gebilde, ja sogar die einzelnen Epithelzellen, ihre deutliche Abgrenzung vom Bindegewebe bewahren.

Was nun das Wachstum des Bindegewebes anbetrifft, so hat es keine Besonderheiten und stellt das öfter beschriebene gras- oder spießförmige anarchische Wachstum einzelner oder zu lockeren Zügen verbundener Zellen vor, die vom Explantate aus in das Fibrinnetz eindringen. Wenn die Bindegewebssüge am Rande eines verflüssigten Bezirken des Fibrins vordringen, so bilden sie kompaktere, aus stark abgeflachten Zellen bestehende Schichten. Letztere habe ich auch schon anderorts ausführlich beschrieben⁴⁾. Soviel über die allgemeine Topographie der Submaxillarkulturen.

IV. Die Verwandlungsprozesse der einzelnen Gewebe.

A. Das Epithel.

Wenn wir uns jetzt zum Studium der feineren Strukturveränderungen der epithelialen Elemente *in vitro* wenden, so fällt vor allem die außergewöhnliche Plastizität ihrer äußeren Form in die Augen, die mit dem funktionellen Zustande der Zelle, ihrer Lage und ihrer Beziehung zu anderen Zellen im engsten Zusammenhange steht.

Die tinktoriellen Unterschiede zwischen dem Protoplasma der Zellen der Ausführungsgänge und demjenigen der Zellen der Alveolen verschwinden im Explantat. Das erste beginnt bald nach der Explantation sich fast ebenso intensiv blau zu färben wie das zweite. Es ist Anhäufung von „Granoplasma“, die auf einen erhöhten Metabolismus hinweist. Die spezifischen sekretorischen Vorgänge in den Drüsenzellen hören andererseits allmählich auf, wobei der mit Sekretgranuliererfüllte Teil des Zellprotoplasmas meistenteils zugrunde geht. Die dabei an den Alveolen beobachteten Umwandlungen wurden schon oben beschrieben. Es können übrigens die Sekretgranula verschwinden, auch ohne daß der betreffende Teil des Protoplasmas der Nekrose anheimfällt. In diesem Falle werden sie wahrscheinlich von der Zelle selbst wieder resorbiert, vielleicht auch ausgestoßen.

Alle diese erwähnten epithelialen Elemente, zusammen mit den jungen, beim neugeborenen Tier noch nicht sezernierenden Alveolen, stellen im Explantat lebenskräftige, verjüngte Zellelemente vor, die nun zur weiteren progressiven Evolution bereit sind. Diese Zellen

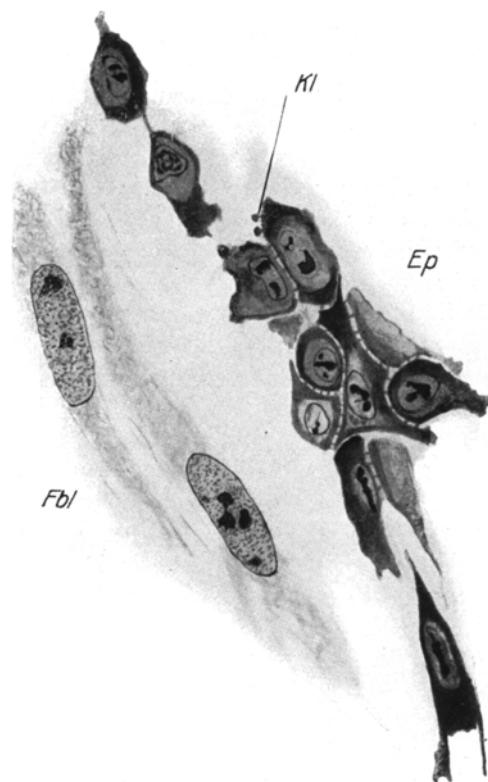


Abb. 6. Kultur von 6 Tagen. Eine isolierte Epithelinsel (Ep) im Fibrinnetz, von der sich einzelne Zellen lostrennen. Intercellularbrücken treten deutlich hervor. Kl = Klascose; Fbl = Fibroblasten. Leitz hom. Imm. 1/12a, Oc. 4.

besitzen sämtlich verhältnismäßig voluminöse runde oder ovale Kerne, mit ziemlich wenig Chromatin und einem oder zwei großen Nucleolen von unregelmäßiger Form. Ihr Protoplasma bildet einen recht schmalen Saum um den Kern herum und unterscheidet sich stets durch seine sehr starke Basophilie. Diese epithelialen Elemente stellen nun den Mutterboden vor, von welchem, nach der Auffrischung des Nährbodens, am 6. und 8. Tag die Bildung der neuen Alveolenknospen ausgeht.

Die Entstehung der neuen Alveolen ist aber nur zum Teil als das Resultat einer echten Zellwucherung zu betrachten. Die verhältnismäßig unbedeutende Zahl der vorhandenen Mitosen ist allein nicht imstande, die Neubildung der ziemlich zahlreichen knospenähnlichen Vorsprünge zu erklären. Eine genaue Untersuchung zeigt uns, daß die Struktur der Wände der Drüsenschläuche, aus welchen die neuen Alveolenknospen hervorgehen, von Grund aus umgebaut wird. Die Zellen, aus welchen diese Drüsenschläuche bestehen, verändern ihre Form, dehnen sich der Längsachse des Drüsenschlauches parallel aus und können dabei manchmal eine lange, spindelige Gestalt annehmen. Es findet also innerhalb eines solchen Drüsenschlauches, mittels der bekannten aktiven Epithelbewegung, eine Neuverteilung und Neuordnung des Zellenmaterials statt. Trotz dieser Epithelbewegung bleibt aber hier die ursprüngliche Gestalt des Drüsenbaums immer erhalten. Das Fortsprossen des Drüsenbaums erscheint stets gegen die Peripherie des Explantates gerichtet, und die Epithelzellen bewegen sich also ihrer Nahrungsquelle und dem Strome des frischen Sauerstoffs entgegen. Es müssen jedenfalls auch hier unter anderem chemotaktische Reize im Spiel sein.

Was die Struktur dieser neuen Drüsenanlagen anbetrifft, so bestehen sie meistens aus unregelmäßig polyedrischen Zellen, die entweder ganz dicht aneinander gedrückt sind, oder es bleiben zwischen ihnen schmale spaltförmige Zwischenräume übrig, in welchen dann deutliche intercelluläre Brücken hervortreten.

Alle diese bis jetzt geschilderten Vorgänge spielen sich im Epithel ab, das allseitig vom Bindegewebe umgeben ist und durch die Präparation nicht direkt verletzt worden war. Was nun diejenigen Drüsenschläuche anbetrifft, die bei der Anfertigung der Kultur angeschnitten waren und auf die Oberfläche des Explantates zu liegen kamen, so kann man an ihrem Epithel, welches die oben beschriebenen wachsenden Epithelschichten bildet, folgende Besonderheiten beobachten.

Etwa am 3. Tage nach der Explantation sieht man, daß die Zellen der angeschnittenen Drüsenschläuche sich abflachen, spindelförmig werden und sich in Gestalt einer zusammenhängenden Schicht vorwärtschieben. Die Zellgestalt in den Schichten ist verschieden vieleckig, spindelförmig usw. Wenn sich einzelne Zellen isolieren, so haben sie zunächst eine spindelförmige Gestalt; dennoch unterscheiden sie sich

aber auch in solchen Fällen sehr deutlich von den Fibroblasten des umgebenden wachsenden Bindegewebes durch ihre sehr scharfen Zellkonturen, durch ihre regelmäßige, kurzspindlige Gestalt und durch die starke Basophilie ihres Protoplasmas. In allen Epithelzellen treten bald kleine Vakuolen auf, die dem Zellprotoplasma am 4. Tage des Lebens *in vitro* eine schaumige Struktur verleihen (Abb. 5). Nach der Transplantation, zugleich mit der Erhöhung der Aktivität des Epithels, verschwinden diese Vakuolen wieder gänzlich; das Zellprotoplasma wird vollständig homogen, behält aber seine starke Basophilie. Nach der Transplantation werden die früher nur spärlichen Mitosen in den Epithelschichten zahlreich, viel zahlreicher als in den vorher beschriebenen unverletzten Drüsenausschnitten. In einigen Epithelschichten lagern sich die Zellen stellenweise konzentrisch und bilden Perlen, die in die Masse des Epithels eingebettet erscheinen. Die sich in diesen Stadien loslösenden Epithelzellen sind entweder spindel- oder kugelförmig. Meistenteils sind die Konturen der Epithelschichten oder Höcker ganz oben, nur in wenigen Stellen beobachtet man spitze Vorsprünge.

In einem Falle, wo eine sehr große umgeklempte Epithelschicht einen bedeutenden Teil der Oberfläche des Explantates bedeckte, konnte man an Querschnitten ihre Struktur feststellen. Sie glich einem mehrschichtigen, aus 3, 4 oder mehr Zelllagen bestehenden flachen Deckepithel. Die Zellen der basalen, dem Bindegewebe anliegenden Schicht hatten eine niedrige zylindrische oder kubische Gestalt, die Zellen der Zwischenschichten waren mehr oder weniger abgeflacht, die äußerste Lage bestand aus dünnen lamellenähnlichen Zellen, die im Querschnitt die Gestalt von feinen protoplasmatischen Fäden hatten und der Lage der Kerne entsprechend leicht angeschwollen waren.

Die Abgrenzung aller dieser Epithelschichten vom anliegenden Bindegewebe erscheint auf senkrecht zur Oberfläche des betreffenden Stückchens geführten Schnitten ganz scharf; wo die Epithelschicht aber vom Schnitt schief oder tangential getroffen erscheint, vermißt man selbstverständlich jede deutliche Grenze infolge des Übereinanderlagerns von Epithel und Bindegewebe. Nirgends nehmen die Epithelschichten einen syncytialen Charakter an.

Wenden wir uns jetzt zu den ganz isolierten, im Bindegewebe frei-liegenden Elementen epithelialen Ursprungs. Ihrer Form nach sind sie ganz außerordentlich vielgestaltig. Ganz ebenso, wie die frei wachsenden Fibroblasten, erscheinen auch sie hypertrophisch im Vergleich zu den Elementen, welche sich am Aufbau der organoiden Drüsenaalveolen und der Epithelschichten beteiligen. Immer aber zeichnen sie sich durch die außerordentliche Basophilie des Zellprotoplasmas, durch den chromatinarmen Kern und durch die großen, oft eine sehr komplizierte Form besitzenden Kernkörperchen aus. Ihre Gestalt wird am besten durch die

beigefügten Zeichnungen (Abb. 6—11) illustriert; sie zeigt alle Übergänge von der kugeligen zur spindeligen Form, wobei sogar verzweigte spitze Ausläufer auftreten können, und in manchen Fällen sogar zur amöboiden. An der Oberfläche des Zelleibes bemerkt man fast immer in größerer oder geringerer Anzahl kleine Vorsprünge des Protoplasmas, welche sich in Gestalt kleiner Tröpfchen ablösen können — ein Vorgang, der an die sog. Klasmatose erinnert. In diesen isolierten Elementen sind Mitosen sehr häufig.

Die von solchen Epithelementen gebildeten Komplexe zeigen, dem Polymorphismus ihrer Bausteine entsprechend, auch eine sehr verschiedene Gestalt und Struktur (Abb. 6 und 11). An der Bildung dieser Komplexe kann sich eine verschiedene Anzahl von Zellen beteiligen; manchmal nur 2 oder 3, häufig aber auch sehr viele. Die Verbindung der Zellen miteinander

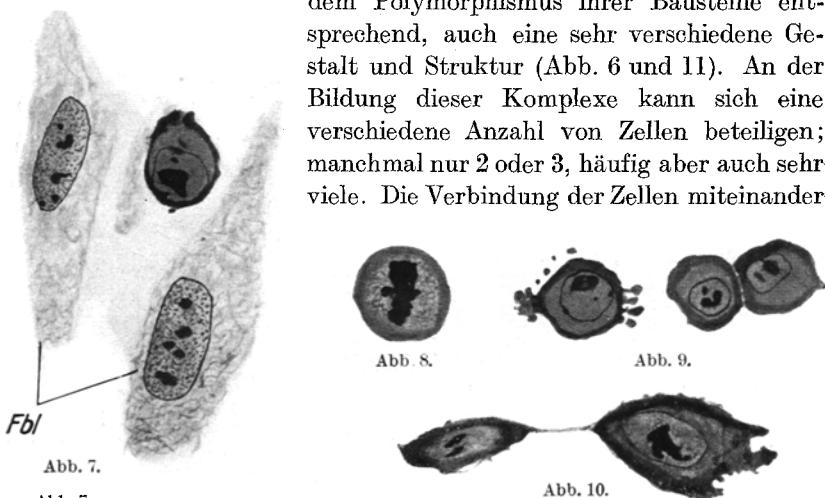


Abb. 7—10. Kultur von 6 Tagen. Einzelne isolierte Epithelzellen verschiedener Form. Abb. 8 = Mitose einer freien Epithelzelle. Abb. 9, links = Klasmatose, rechts = zwei freie Epithelzellen mit Intercellularbrücken. Abb. 10. Zwei mittelst eines Protoplasmafadens verbundene Epithelzellen. *Fbl* = Fibroblasten. Leitz hom. Imm. 1/12a, Oc. 4.

ist meistenteils eine fürs Epithel sehr charakteristische: zwischen den einander anliegenden Zellflächen ist ein schmaler spaltförmiger Zwischenraum zu sehen, in welchem die Intercellularbrücken zum Vorschein kommen. Größere Zellkomplexe haben oft eine ganz runde Gestalt und eine perlenartige Struktur mit konzentrisch angeordneten Elementen. In anderen Fällen verbinden sich die Zellen nach Art der Fibroblasten durch ihre spitzen Ausläufer lose miteinander. Oft sieht man beide Arten der Verbindung in ein und demselben Zellkomplex nebeneinander (Abb. 6). Die perlenartig angeordneten Zellkomplexe können sich von der übrigen Schicht ganz isolieren und frei in das umgebende wuchernde Bindegewebe zu liegen kommen.

Diese beiden miteinander vermischten Zellarten zweier ganz verschiedener Stämme, die einen entodermalen, die anderen mesenchymatösen Ursprungs, bleiben trotz ihres engsten räumlichen Ineinander-

greifens völlig scharf geschieden. Die übrigen nur selten vorkommenden Zellen zweifelhafter Natur dürfen wohl eher als Konvergenzerscheinungen, nicht als Übergangsformen gedeutet werden.

Es kann nun die Frage gestellt werden: In welchen Beziehungen stehen diese verschiedenenartigen epithelialen Gebilde zueinander und zu den ganz isolierten epithelialen Elementen? Haben wir es hier mit einer fortschreitenden Dissoziation größerer Zellkomplexe zu tun oder, umgekehrt, mit ihrer Neubildung aus einzelnen Zellen? Diese Frage läßt sich am toten, fixierten Material mit voller Sicherheit nicht lösen. Wahrscheinlich gehen diese beiden Vorgänge gleichzeitig und parallel vor sich. Es wäre von bedeutendem Interesse, diese Tatsachen noch weiter zu studieren.

B. Das Bindegewebe.

Was die sich im Bindegewebe abspielenden Veränderungen anbetrifft, so werde ich sie hier nur kurz streifen, da sie keine bemerkenswerten Besonderheiten bieten. Das in Kontroll-

präparaten völlig gleichartige lockere Bindegewebe gibt *in vitro* den bekannten hypertrophischen spindel- und sternförmigen wuchernden Fibroblasten und großen amöboiden, mit einem schaumigen Protoplasma versehenen Polyblasten oder Makrophagen Ursprung. Letztere sind besonders dort zu treffen, wo sich nekrotische Zellmassen befinden, an welchen sie ihre phagocytäre Tätigkeit entwickeln können. Übrigens trifft man sie auch frei im Fibrin. Fremdkörper rufen stets die Ansammlung sehr zahlreicher Polyblasten hervor. Näheres über das Bindegewebe kann man in der Arbeit von *Maximow*⁸⁾ finden.

IV. Zusammenfassung und Schluß.

Aus den beschriebenen Tatsachen erhellt, daß das untersuchte Drüsenepithel der Submaxillaris vom neugeborenen Tier *in vitro* eine

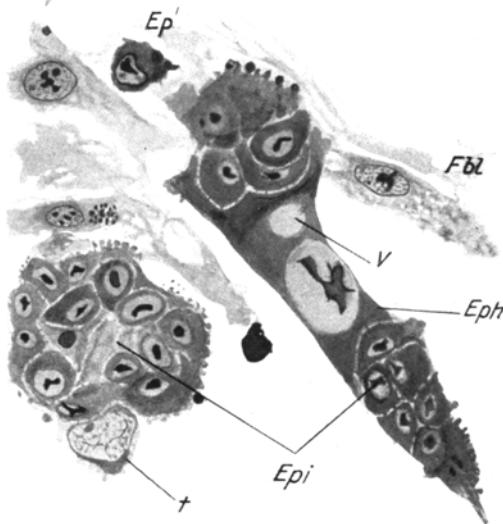


Abb. 11. Kultur von 6 Tagen. Der mit \times bezeichnete Teil der Abb. 3. Zwei freie Epithelinseln (*Epi*) verschiedener Form; *Ep'* = isolierte Epithelzelle; *Eph* = außerordentlich hypertrophische Epithelzelle mit einem großen Kernkörperchen; *V* = Vakuole; *Fbl* = Fibroblasten; $+$ = degenerierende Epithelzelle. Klammatose und Intercellularbrücken deutlich sichtbar. Leitz hom. Imm. 1/12a, Oc. 2.

bedeutende Lebensfähigkeit und bedeutendes Vermehrungsvermögen besitzt. Bevor es aber diese Eigenschaften mit Deutlichkeit hervortreten läßt, muß es eine Art Verjüngung eingehen. In dieser Beziehung stimmen meine Resultate mit denjenigen von *Champy*³⁾ überein. Das von mir untersuchte Epithel unterscheidet sich also von embryonalen Epithelien früherer embryonaler Entwicklungsstadien, die sich nicht zu anaplasieren brauchen und sofort nach der Explantation ihre Wucherung und Differenzierung fortsetzen. Beim neugeborenen Tier muß der in den Geweben an vielen Stellen schon eingetretene stabile Gleichgewichts zustand durch neue formative Reize gestört werden. Ist dieses vollbracht, so werden die schlummernden Entwicklungspotenzen wieder wach und offenbaren sich in den mannigfältigen progressiven Verwandlungsprozessen, die sich im Explantate abspielen. Ich kann es mir an dieser Stelle nicht versagen, auf den Zusammenhang dieser Tatsachen mit dem Problem der Geschwulstbildung hinzuweisen. Es zeigt sich, daß das Drüsenepithele auch als Deckepithel fungieren kann, daß die Zellform äußerst plastisch ist und je nach den Existenzbedingungen und dem funktionellen Zustand der Zelle sich zu verändern vermag. Je nach der Art des formativen Reizes treten entweder die für das betreffende Organ typischen Entwicklungspotenzen zum Vorschein, wie z. B. die erwähnten Versuche zur Wiederherstellung, zur Regeneration der Drüsenstruktur, oder es erwachen die atypischen (sekundären, wie *H. Driesch* sie nennt) prospektiven Potenzen.

Das Epithel bewahrt im allgemeinen die für dasselbe charakteristischen Eigenschaften, vor allem die Kontinuität, und funktioniert als ein Ganzes. Dennoch können sich auch von ihm mitunter einzelne Zellen oder Zellkomplexe lostrennen. Aber auch diese epithelialen Elemente bleiben, sozusagen, ihres Ursprungs stets eingedenk und zeigen, trotz ihres Polymorphismus, wenigstens in dem von mir untersuchten Zeitraum, keine Tendenz, zusammen mit den Bindegewebszellen in einem gemeinsamen indifferenten Gewebe aufzugehen.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. *A. Maximow*, meinen ergebensten Dank auszusprechen für die mir bei meinen Arbeiten zuteil gewordene Unterstützung.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Champy, Ch.*, La dédifférentiation des tissus cultivés en dehors de l'organisme. Bibliogr. anat. **23**. 1913. — ²⁾ *Champy, Ch.*, Quelques résultats de la méthode des cultures des tissus. III. Le rein. Arch. de zool. exp. et gén. **54**. 1914. — ³⁾ *Champy, Ch.*, Notes de biologie cytologique. Quelques résultats de la méthode de culture de tissus. V. La glande thyroïde. Arch. de zool. exp. et gén. 1915. — ⁴⁾ *Chlopin, N.*, Über in vitro-Kulturen der embryonalen Gewebe der Säugetiere.

Arch. f. mikr. Anat. **96**. 1922. — ⁵⁾ *Dilger, A.*, Über Gewebskulturen in vitro unter besonderer Berücksichtigung der Gewebe erwachsener Tiere. Zeitschr. f. Chirurg. **120**. 1913. — ⁶⁾ *Jolly*, Sur la survie des cellules en dehors de l'organisme. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **69**. 1910. — ⁷⁾ *Maximow, A.*, The cultivation of connective tissue of adult mammals in vitro. Arch. russes d'anat., d'hist. et d'embr. **1**. 1916. — ⁸⁾ *Maximow, A.*, Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. VII. Über in vitro-Kulturen von lymphoidem Gewebe des erwachsenen Säugetierorganismus. Arch. f. mikr. Anat. **96**. 1922. — ⁹⁾ *Pfeiffer, Prausnitz u. a.*, Diskussion zu *Hadda*, Berl. klin. Wochenschr., Nr. 5. 1912. — ¹⁰⁾ *Uhlenhuth, E.*, Cultivation of the skin epithelium of the adult frog, *Rana pipiens*. Journ. of exper. med. **20**. 1914. — ¹¹⁾ *Uhlenhuth, E.*, The form of the epithelial cells in cultures etc. Journ. of exper. med. **22**. 1915.
