

(Aus dem Institut für Histologie und Embryologie an der Medizinischen Militärakademie zu St. Petersburg.)

Über In-vitro-Kulturen von Geweben der Säugetiere mit besonderer Berücksichtigung des Epithels.

II. Kulturen der Harnblasenschleimhaut.

Von

Dr. med. et phil. Nikolaus G. Chlopin.

Mit 30 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. April 1924.)

I. Einleitung, Material, Technik.

Die vielumstrittene Frage über die Lebens- und Wachstumsfähigkeit in vitro der beiden weniger spezialisierten Gewebsarten, des Bindegewebes und des Epithels, ist jetzt durch eine ganze Reihe von Untersuchungen in positivem Sinne gelöst worden. Alle gegen diese Tatsache gemachten Einwände dürften zur Zeit nur ein historisches Interesse haben. Es ist sogar möglich, wie es von *Lewis* und seiner Schule gezeigt wurde¹⁵⁾, verschiedenartige Explantate auf künstlichen Nährboden lebend zu erhalten. Mir ist es unter anderem gelungen, Bindegewebsarten und Epithelien der Amphibien auf heterogenem Blutplasma dauernd (1 oder 2 Monate lang) zu kultivieren⁸⁾.

Was aber die morphologische Deutung der in den Gewebskulturen beobachteten Vorgänge anbetrifft, so herrscht in dieser Beziehung noch eine sehr große Verschiedenheit der Meinungen. Nach den ersten Arbeiten von *Harrison* und *Carrel* war man geneigt zu denken, daß die explantierten Organstückchen in vitro als solche weiter existierten und wuchsen. So beschrieb man die Neubildung von typischen Harnkanälchen und deren Auswachsen als solcher in das umgebende Fibringerinnsel in den Nierenkulturen usw. Es schien, mit anderen Worten, daß man in vitro typische Organstrukturen fortzüchten könnte. *Champy*²⁻⁵⁾ war der erste, welcher sich daran machte, die Gewebskulturen mit Hilfe histologischer und cytologischer Methoden eingehend zu untersuchen. Er hat, wie bekannt, seine Befunde in dem Sinne gedeutet, daß alle Prozesse in den Gewebskulturen auf eine weitgehende Entdifferenzierung hinauslaufen, wobei das Epithel alle seine Kennzeichen einbüßt und mit dem Bindegewebe zusammen in einer gleichartigen

indifferenten lockeren Zellmasse aufgeht. Solch ein allgemeines Gesetz der Gewebsveränderung in vitro scheint schon a priori deswegen recht unwahrscheinlich zu sein, weil man dabei eine bereits eingetretene ungleiche Verteilung der Entwicklungspotenzen zu leugnen und den Zellbestand der beiden Gewebe als äquipotent aufzufassen hätte, was, wenigstens für hochentwickelte Tierformen, kaum wahrscheinlich sein dürfte. In meiner Arbeit über Kulturen der embryonalen Gewebe⁶⁾ habe ich schon auf einige Verwandlungen der embryonalen Epithelien und auf den deutlich ausgesprochenen Antagonismus zwischen Epithel und Bindegewebe hingewiesen. Dabei wurde die große Variabilität im Schicksal der einzelnen Kulturen betont und von einer frühzeitigen Aufstellung von allgemeinen Regeln für das Verhalten der Explantate gewarnt. Die neuerdings von *Fischer*¹³⁾ gewonnenen reinen Epithelkulturen und die von ihm und *Ebeling*¹²⁾ beschriebenen Versuche der Vereinigung und Weiterzüchtung von Mischkulturen aus Epithel und Bindegewebe, welche von zwei verschiedenen reinen Zellstämmen, „strains of cells“ stammen, stehen auch in einem schroffen Widerspruch zu den Abgaben von *Champy* und stimmen andererseits mit den meinigen überein. In meiner letzten Arbeit über die Kulturen der Submaxillaris⁷⁾, welche speziell dem Verhalten eines entodermalen Drüsenepithels in vitro gewidmet war, konnte ich die große Abhängigkeit der Zellform und der gegenseitigen Beziehungen der Epithelzellen von ihrer Lage und den äußeren Bedingungen feststellen. Ich habe gezeigt, daß in vitro nicht nur zusammenhängende Epithelschichten, sondern auch isolierte Epithelzellen vom Bindegewebe morphologisch unterschieden werden können.

Die vorliegende, mit der vorhergehenden fast gleichzeitig begonnene Arbeit ist einem weiteren histologischen Studium der Epithelverwandlungen in vitro gewidmet, wobei hier als Objekt, im Gegensatz zur Submaxillaris, ein Deckepithel gewählt wurde, das Übergangsepithel der Harnblasenschleimhaut. Dieses Objekt ist bis jetzt in vitro kaum untersucht worden — mir ist jedenfalls nur eine Arbeit von *Auroroff* und *Timofejewsky* bekannt¹⁾, welche in Kulturen der Harnblase junger Hunde Bildung von dickeren oder dünneren Epithelmembranen beschreiben. Eingehendere histologische Angaben fehlen vollständig. Das genannte Objekt ist aber deswegen empfehlenswert, weil die normale Struktur des Übergangsepithels eine große Abhängigkeit von seiner Funktion zeigt und erst in der letzteren Zeit aufgeklärt zu sein scheint [*Danini*¹⁰⁾], und weil es in diesem Falle sehr leicht ist, entweder ganz reine Epithelkulturen oder Mischkulturen von Epithel und Bindegewebe mit entschiedenem Überwiegen des Epithels zu bekommen.

Das Material, welches dieser Arbeit zugrunde liegt, umfaßt 4 Versuchsreihen. Als Versuchstier dienten mir Kaninchen verschiedenen

Alters — in den ersten 2 Versuchsreihen neugeborene (ca. 2—3 Tage alte), in den übrigen junge, ungefähr 6 Wochen alte Tiere.

Nach der sterilen Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Harnblase weit aufgeschnitten, wobei der Urin herausfloß, und die mit feinen Falten bedeckte Schleimhaut ausgestülpt. Mit einer feinen krummen Schere wurden alsdann kleine oberflächliche Schleimhautfetzen tangentiell herausgeschnitten und in warme Ringerische Lösung übertragen. Bei nicht zu kleinen Tieren ist es dabei möglich, ganz reine Epithelstückchen zu erhalten oder wenigstens solche mit sehr spärlichem Bindegewebe. Die Stückchen wurden alsdann in 3 Versuchsreihen in auto- oder homogenem Blutplasma mit Zusatz von Knochenmarkextrakt in hängendem Tropfen, wie üblich, kultiviert. In einer Versuchsserie diente als Kulturmedium autogenes Serum mit Zusatz von Knochenmarkextrakt. Nach je 4 oder 5 Tagen wurden Transplantationen vorgenommen. Die Untersuchungsdauer betrug 10—13 Tage. Die Kulturen wurden sowohl lebend beobachtet, als auch an zweckmäßig fixierten und entweder in toto gefärbten oder nach Celloidineinbettung in Schnittserien zerlegten Präparaten. Die Totalpräparate wurden in der Carnoy'schen Mischung (C) fixiert mit nachfolgender Färbung mit Delafield'schem Hämatoxylin (H). Die für Schnittserien bestimmten Kulturen wurden fast ausschließlich in Zenker-Formol (ZF) fixiert und die Schnittserien mit Eosin-Azur II (EAz) oder Eisenhämatoxylin (Eh) nach *Heidenhain* gefärbt. Um das *Golgische* Binnennetz zu impregnieren, wurde die Flüssigkeit von *Champy* (Ch) mit nachfolgender Osmierung nach *Kolacev* (Os) angewandt. Diese Methode ist ausführlich bei *Nassonow*¹³⁾ beschrieben. Zugleich wurden selbstverständlich Kontrollpräparate der ursprünglichen Schleimhaut angefertigt und untersucht.

II. Beschreibung der Vergleichspräparate (Abb. 1).¹⁾

An ZF-EAz-Präparaten der Harnblasenschleimhaut neugeborener Kanimchen zeigt die Schleimhaut zahlreiche mit Epithel überzogene Falten.

Das Epithel besteht aus wenigen, gewöhnlich 3—4 Zellagen und ist durch keine ausgesprochene *Membrana propria* vom Bindegewebe abgegrenzt. Man kann im Epithel 3 Zellarten unterscheiden, welche allerdings miteinander durch zahlreiche Übergangsformen verbunden sind. Direkt auf dem Bindegewebe ruht eine Lage von Zellen verschiedener Gestalt, mit verhältnismäßig hellen, grobkonturierten Kernen und spärlichem, stark basophilem, homogenem Protoplasma. Ihre Kerne, welche meistens oval, mitunter auch etwas eingekerbt sind, sind arm an Basichromatin, und besitzen ein sehr lockeres Chromatingerüst mit einigen größeren Chromatinschollen und einem oder zwei Nucleolen. Die Form dieser Zellen vom ersten Typus wechselt von einer polygonalen zu einer langgezogenen spindeligen oder birnförmigen. Letztere Zellen stellen schon alle Übergänge zu Zellen vom zweiten Typus vor, die mit dem Bindegewebe nur durch einen fußförmig ausgezogenen, zwischen den Zellen der basalen Schicht hindurchtretenden protoplasmatischen Fortsatz verbunden sind. Der größte Teil ihres Zellkörpers befindet sich oberhalb der ersten Zellage. In den Zellen der basalen Lage werden Mitosen angetroffen, welche in den übrigen Zellagen fehlen; deswegen kann diese Zellage auch als *germinative* bezeichnet werden (G, x, Abb. 1).

Die weiter folgenden Zellen vom zweiten Typus sind in einer oder zwei Lagen angeordnet. Im Vergleich mit den Zellen der ersten Lage sind sie viel umfangreicher, schwach oder kaum basophil und daher viel heller gefärbt. Ihre Kerne erscheinen gleichsam angeschwollen, sind 2—3 mal größer als die Kerne der basophilen Zellen und haben meistens eine recht unregelmäßige gefaltete Membran. Sie haben ebenfalls ein schwachgefärbtes Kerngerüst und 3 oder 4 Nucleolen. Im Protoplasma

läßt sich eine größere oder geringere Vakuolisierung beobachten, welche dicht am Kern beginnt und in besonders ausgesprochenen Fällen einen bedeutenden Teil des Zellkörpers einnehmen kann, wodurch ihm eine wabige Struktur verliehen wird. Was die Form dieser Zellen anbetrifft, so erscheinen sie an Schnittpräparaten gewöhnlich polygonal. In recht seltenen Fällen kann man auch an ihnen einen langen, bis zum Bindegewebe reichenden protoplasmatischen Stiel beobachten.

Schließlich sind die oberflächlichen Deckzellen zu erwähnen, welche in ihrer Größe stark variieren und sich schwach färben; ihr Kern ist meistens kleiner und von kugeligem Gestalt. Wie bekannt, können sich die Kerne in diesen Zellen durch Amitose teilen, wodurch zwei- oder mehrkernige Zellen entstehen. Die kugeligen Kerne der Deckzellen besitzen gewöhnlich 1 oder 2 deutlich ausgesprochene echte Nucleolen. Die Gestalt dieser Zellen wechselt von einer abgeflachten bis zur kubischen, mit kissenartig vorgewölbter freier Oberfläche (D, Abb. 1). Bei älteren Tieren sind die Beziehungen dieselben, nur sind bei ihnen mehrkernige Deckzellen in größerer Anzahl zu beobachten und die Epithelschicht kann noch etwas dicker erscheinen.

Was nun die Verbindung der Epithelzellen miteinander anbetrifft, so können keine deutlichen intercellulären Brücken konstatiert werden. *Dani-ni*¹⁰⁾, welcher neuerdings die Epithelien der harnabführenden Gänge sehr eingehend untersucht hat, verneint die Anwesenheit der Intercellularbrücken und behauptet, daß alle Zellen des Übergangsepithels, die großen Deckzellen älterer Tiere ausgenommen, mit dem Bindegewebe in Verbindung stehen, weswegen diese Epithelart als mehrreihig und einschichtig resp. zweischichtig aufgefaßt werden muß. Der dem Bindegewebe aufsitzende Teil der Epithelzellen ist gewöhnlich feingezackt, was wahrscheinlich ihre festere Verbindung bedingt. Wie gesagt, ist keine Membrana propria wahrnehmbar.

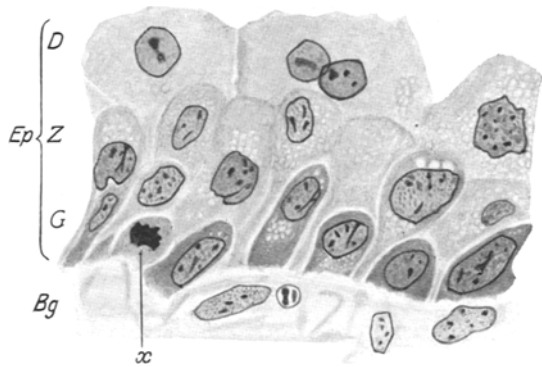


Abb. 1. Kontrollpräparat. Das Harnblasenepithel eines neugeborenen Kaninchens. Ep = Epithel, in welchem 3 Zelltypen zu unterscheiden sind; G = germinative (oder basale) Zellreihe; Z = Zellen der mittleren Lage und D = Deckzellen; x = Mitose in einer germinativen Zelle; Bg = Bindegewebe. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt EAZ. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a. Ok. 4.

III. Topographie der Kulturen.

Die kleinen ausgeschnittenen Stückchen der Harnblasenschleimhaut rollen sich stets mit der freien Epithelfläche nach außen zusammen, so daß die Wundfläche sich stark zusammenzieht und oft durch das sich aktiv bewegende Epithel völlig verdeckt wird. Zunächst werde ich diejenigen Explantate erwähnen, welche im Plasma kultiviert wurden.

Sehr bald tritt eine stark ausgesprochene Verflüssigung des umgebenden Fibrins ein, wobei das Explantat entweder in der entstandenen Höhle frei schwebt

oder am Fibrin der Höhlenwand kleben bleibt. Solche abgerundete, mit Epithel überdeckte Stückchen haben das Aussehen eines kleinen Teilorganismus, wie ich sie schon früher in verschiedenen anderen Fällen beschrieben habe⁶⁾. Ihr Epithelüberzug wird oft fast allseitig sehr dick, viel dicker als auf den Kontrollpräparaten, und enthält oft bis zu 10 übereinander gelegene Kernreihen.

Auf Abb. 2 ist solch ein abgerundetes Explantat im Querschnitt dargestellt. Man sieht einen dicken, mit unregelmäßigen Höckern versehenen Epithelüberzug (links). Im Innern befindet sich eine zum Teil degenerierte Bindegewebsmasse. In der Epithelschicht können mit Flüssigkeit gefüllte Hohlräume entstehen. Eine solche intraepitheliale Cyste sieht man auf der Abbildung oben (*H*). Von diesem

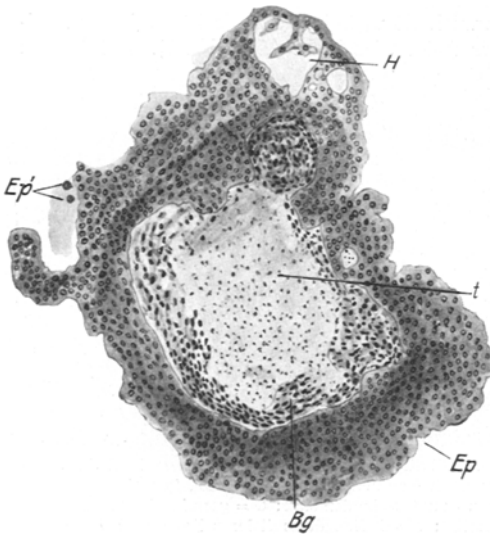


Abb. 2. Querschnitt durch eine abgerundete und epithelierte, 4 Tage alte Kultur der Harnblasenschleimhaut von einem neugeborenen Kaninchen. Dicke Epithelschicht (*Ep*) an der Oberfläche, darunter Bindegewebe (*Bg*), welches im Zentrum nekrotisch ist (*t*); *H* = intraepitheliale Hohlräume; *Ep'* = sich abrundende Epithelzellen. Rings um das Explantat eine breite Verflüssigungszone. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt EAz. Obj. Leitz 8. Ok. 4.

typischen Falle weichen reine Epithelexplantate dadurch ab, daß sie im Innern, unter dem Epithelüberzug, keinen Bindegewebskern enthalten, sondern nur eine eiweißhaltige Flüssigkeit, eventuell auch spärliche Detritusmassen. Solche Kulturen haben das Aussehen von hohlen Epithelbechern und sind einer Gastrula ähnlich. Die Wundstelle bleibt hier gewöhnlich nicht epithelisiert, offenbar, weil das für die aktive Epithelbewegung nötige feste Substrat fehlt. Die Dicke der Epithelschicht ist bei solchen Explantaten nicht so groß, wie es oben beschrieben wurde, sondern erscheint von etwa 2—4 Zellreihen gebildet. Die Größe der Höhle kann in weiten Grenzen variieren, je nach den Dimensionen des abgetrennten Epithelstückchens; in einigen Fällen ist sie sehr unbedeutend, so daß man eher von einer unregelmäßig gekrümmten Epithelinsel reden könnte. In der die Höhle ausfüllenden Flüssigkeit wird durch Fixierung ein

körniger Niederschlag hervorgerufen, was auf die Ausflockung gelöster Eiweißkörper zurückzuführen ist.

Was nun die eventuelle Epithelisierung der Schnittfläche anbetrifft, so erfolgt sie, wie gewöhnlich, durch aktive Bewegung sich abflachender Epithelzellen. Ist der direkte Weg durch eine Detritusmasse oder ein Fibringerinnsel versperrt, so umwachsen die vorgleitenden Epithelschichten das Hindernis, wodurch ein dünnwandiges, sackartiges Anhängsel am Explantat entsteht. Auf Abb. 12 und 13 ist die Stelle, wo die aktive Epithelbewegung begonnen hat, und ein kleiner Bezirk der entstandenen Sackwand im Querschnitt abgebildet. Eine ausführliche Beschreibung der Struktur solcher Epithelschichten findet man im nächsten Abschnitt.

Wir sehen also, daß in den Explantaten vom oben erwähnten Typus das Epithel kein ausgebreitetes Wachstum zeigt, seine Ganzheit bewahrt

und in diesem Zustande während der ganzen Untersuchungsdauer verbleiben kann; dabei können in ihm verschiedene, weiter unten besprochene Verwandelungsprozesse konstatiert werden. An solchen abgerundeten, frei umherschwimmenden Stückchen läßt sich aber noch ein anderer Vorgang beobachten, der mehr oder weniger ausgesprochen erscheint — die Abrundung und Isolierung einzelner Epithelzellen, welche sich in Form kleiner Kügelchen von der Oberfläche der Epithelschicht los trennen und in der umgebenden Flüssigkeit zu schweben kommen. In den meisten Kulturen findet man diesen Vorgang nur schwach ausgesprochen; in selteneren Fällen ist die Anzahl der abgerundeten Zellen größer. Nur in einem Falle konnte ich einen fast vollständigen Zerfall der ganzen Epithelschicht in einzelne abgerundete Zellen feststellen. Da eine stark ausgesprochene Abrundung von Zellen gewöhnlich in älteren, mehrere Tage nicht transplantierten Kulturen eintritt und mit manchen degenerativen, im nächsten Abschnitt besprochenen Veränderungen der Zellen parallel verläuft, so könnte man diesen Vorgang auf gewisse schädliche Einflüsse seitens des umgebenden Mediums zurückführen. Ich will aber schon hier hervorheben, daß nicht alle losgetrennten Zellen der Nekrobiose verfallen, sondern nur solche, welche in der Flüssigkeit schwebend bleiben. Diese sind allerdings nach kürzerer oder längerer Frist dem Tode geweiht. Ganz anders ist aber das Schicksal solcher Zellen, welche sich auf der Deckglasoberfläche oder auf dem umgebenden nicht verflüssigten Fibrin niederlassen und dort haften bleiben. Solche Zellen schmiegen sich dem festen Substrat an und wachsen in letzteres hinein, falls es Fibrin ist.

Somit erhält man schließlich in vitro sowohl aus zusammenhängenden Epithelschichten bestehende Explantate, rein oder mit Bindegewebe, als auch einzelne freigewordene, der Deckglasoberfläche angeschmiegte oder ins Fibrin eingewachsene Epithelzellen.

In seltenen Fällen aber fallen die Verhältnisse in vitro ganz anders aus: noch bevor das Fibrin verflüssigt wird, beginnt ein energisches Wachstum des Epithels, welches sowohl in dünnen Membranen an der Deckglasoberfläche, als auch in kompakten Epithelhaufen und in isolierten Zellen in das Fibrin einwuchert. Allerdings bleiben auch in diesen Fällen größere Epithelschichten da, welche sich abrunden und das Fibrin nachträglich verflüssigen.

Ein Teil einer solchen 7 Tage alten reinen Epithelkultur ist auf Abb. 3 dargestellt, wo man zahlreiche kompakte Epithelinseln neben vielen isolierten oder nur lose zusammenhängenden Zellen verschiedener Form sieht. Aus den Epithelhaufen wachsen Zellstränge und einzelne Zellen hervor; dadurch erhält das Explantat ein Aussehen, welches den Bindegewebskulturen sehr ähnlich ist. Die einzelnen Epithelkomplexe können durch Züge von Zellen miteinander verbunden

sein. In der Umgebung der einen Zellhaufen kann eine Verflüssigung des Fibrins eintreten, während an anderen dies vollständig fehlen kann. Im ersteren Falle bleibt selbstverständlich ein weiteres Herauswachsen von Zellen aus. Wenn man solche Kulturen beobachtet, ist es gewiß sehr verlockend, diese Erscheinung als Anaplasie des Epithels mit Verwandlung in Bindegewebe zu erklären. Aber diese Annahme wäre viel zu voreilig. Bei einer eingehenden histologischen

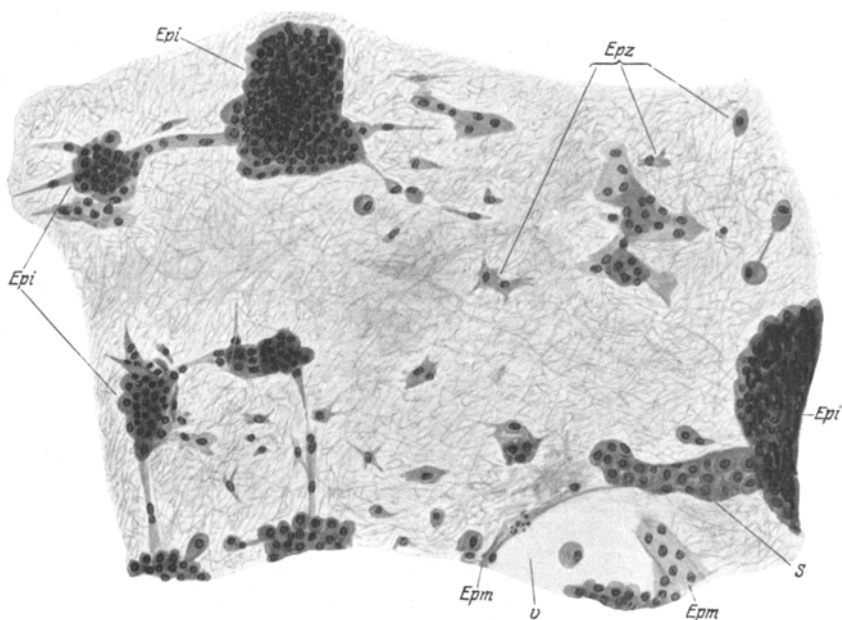


Abb. 3. Eine reine 7 Tage alte Harnblasenepithelkultur von einem ca. 1½ Monate alten Kaninchen. Im Fibrin unregelmäßig wuchernde kompakte Epithelinsel (*Epi*) und isolierte Epithelzellen (*Epz*) von verschiedener Gestalt. Rechts ein Teil eines größeren Epithelkomplexes (*Epi'*) mit einem herauswachsenden Epithelstrang (*S*); *v* = verflüssigter Fibrinbezirk mit kleinen Abschnitten von Epithelmembranen (*Epm*). Totalpräparat. Fixiert Carnoy, gefärbt H. Obj. Leitz 8, Ok. 12.

Analyse offenbaren sich viele Details, welche zu einer anderen Erklärung führen.

Was nun die im Serum kultivierten Stückchen anbetrifft, so weisen sie kein ausgebreitetes Wachstum auf und runden sich ab. Dabei treten in ihnen bald degenerative Erscheinungen auf, welche viel stärker ausgesprochen sind und sich viel schneller entwickeln, als in den Plasma-Explantaten.

Nach diesen Besprechungen der allgemeinen topographischen Beziehungen in den Explantaten können wir uns jetzt zu einer eingehenden Analyse der histologischen Verwandlungsprozesse wenden.

IV. Die Verwandlungsprozesse der einzelnen Gewebe.

A. Epithel.

Wenden wir uns zuerst dem Deckepithel der abgerundeten Explantate zu, welches kein extensives Wachstum zeigt und in welchem die typischen Charakterzüge des Epithels am deutlichsten erhalten bleiben. Die Struktur der Epithelschicht erfährt verschiedene Umwandlungen, wodurch ihr ursprünglicher Charakter stark verändert wird. Dabei erstrecken sich diese Veränderungen gewöhnlich nicht auf die ganze Epithelschicht, sondern treten nur in einzelnen Bezirken auf; dadurch erhält ein und dasselbe Explantat in seinen verschiedenen Teilen ein verschiedenes Aussehen.

Sehr oft erfährt die Epithelschicht schon während der ersten Tage nach der Explantation eine sehr bedeutende Verdickung bis auf 10 oder noch mehr Kernreihen. Dabei beruht diese Verdickung zunächst meistens nicht auf einer Zunahme der Anzahl der übereinander gelagerten Zellschichten, sondern darauf, daß die Zellen sich senkrecht zur Oberfläche des Epithels stark ausziehen, wodurch nur die Anzahl der Kernreihen und die Dicke der ganzen Schicht bedeutend zunehmen. Auf Abb. 4 ist solch eine verdickte Epithelschicht abgebildet. Es ist deutlich zu sehen, wie kolossal die Zellen in die Länge gezogen und wie dünn ihre Fortsätze sind. Nur der kernhaltige Teil der Zellen bleibt verdickt. Somit erhalten die einzelnen Zellkörper eine spindel- oder keulenartige Gestalt, je nachdem sie sich in der Mitte oder näher zur Peripherie befinden. Die dünnen Zellfortsätze laufen durch mehrere Zellreihen hindurch. Stellenweise kann man einen Zellenfortsatz bis zur bindegewebigen Unterlage verfolgen (*F*). Man erhält den Eindruck, als ob die Zellen stark zusammengedrängt wären und auf ihrer Unterlage viel zu wenig Platz hätten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß alle Zellen ohne Ausnahme, wenigstens mittels ihrer fadenförmigen Fortsätze, mit der Unterlage verbunden bleiben. Wenn wir diese Verhältnisse mit den Befunden von *Danini*¹⁰⁾ am normalen Übergangsepithel vergleichen, erhält die Annahme von der Mehrreihigkeit, aber Ein- oder höchstens Zweischichtigkeit des Übergangsepithels eine weitere Stütze.

Was nun die Unterschiede in der Morphologie der einzelnen Zellreihen anbetrifft, so werden sie in einigen Kulturen, welche im Zentrum Bindegewebe enthalten, recht hartnäckig bewahrt: die basalen Zellreihen werden durch die größere Basophilie des Protoplasmas und verhältnismäßig helle Kerne, wie in den Kontrollpräparaten, gekennzeichnet, die äußeren Zellreihen sind, im Gegenteil, heller gefärbt und zeichnen sich durch einen bedeutenden Polymorphismus der Kerne aus. Letztere sind oft gefaltet und wechseln stark in bezug auf ihre Größe. Auf der Oberfläche können die zwei- oder mehrkernigen Deckzellen erhalten

bleiben; in anderen Fällen können sie auch desquamiert sein. Zweikernigkeit kann auch in den mittleren Zellreihen beobachtet werden.

Auf der schon erwähnten Abb. 4 sieht man, daß zwischen den Epithelreihen deutliche Spalträume bestehen, in welchen zum großen Teil keine deutlichen Zellbrücken beobachtet werden können, stellenweise sieht man solche aber doch. Das Fehlen von Zellbrücken in den Explantaten ist aber eher eine Ausnahme; in den meisten weiter unten beschriebenen Fällen treten sie sehr deutlich hervor.

Die Abgrenzung des Epithels gegen das Bindegewebe bewahrt entweder ihren normalen Charakter, oder sie wird, besonders dort, wo das

unterliegende Bindegewebe degeneriert (*D*), durch eine sehr deutliche gerade Linie vorgestellt. Oft entsteht, augenscheinlich infolge des Zusammenschrumpfens des zu Detritus zerfallenen Bindegewebes, ein deutlicher Spalt zwischen letzterem und dem Epithel (Abb. 4).

Trotzdem hat das Epithel die Neigung, die oben erwähnten 3 Zellagen in vitro zu verlieren; dies kann auf zwei Wegen zustande kommen. Entweder beginnt das Epithel, nach der Desquamation der äußersten Zellagen, sich stärker zu färben, wobei das Zellprotoplasma meistens homogen

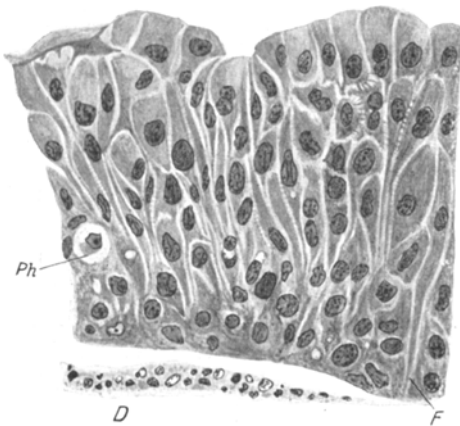


Abb. 4. Neugeborenes Kaninchen. Kultur von 3 Tagen. Verdicktes Harnblasenepithel mit langgezogenen Zellen. Freie Epithelfläche oben; unten zusammengeschrumpfter Detritus (*D*); *Ph* = phagocytierte Einschlüsse, von einer Vakuole umgeben; stellenweise Interzellularbrücken sichtbar; *F* = ein bis zur Unterlage reichender Fortsatz einer langausgezogenen Epithelzelle; in einigen Zellen Vakuolen. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt EAz. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ -a. Ok. 2.

erscheint, so daß die farbreichen Verschiedenheiten der einzelnen Zellagen verschwinden; oder — in den des Bindegewebes entbehrenden und aus einer gekrümmten Epithelschicht bestehenden Explantaten — läuft der Prozeß auf eine Umbildung der inneren Zellagen hinaus, welche dabei das Aussehen der äußeren bekommen können, sogar bis auf das Entstehen von zwei- oder mehrkernigen Zellen. Dabei verschwindet die polare Differenzierung der Epithelschicht; die letztere wird ganz gleichartig und ihre Zellen können sich sowohl nach außen, als auch nach innen abrunden und isolieren. Diese Tatsache läßt sich dadurch erklären, daß auf die Epithelschicht beiderseits gleiche äußere Faktoren einwirken.

In anderen Fällen lassen sich weitergehende Veränderungen im Epithel nachweisen. In den basalen Lagen der verdickten Epithelschicht

können die Zellgrenzen sowohl an ZF-EAz-, als auch an ZF-Eh-Präparaten undeutlich werden oder sogar völlig verschwinden, wodurch man den Eindruck eines Syncytiums erhält. Solch eine Verwandlung verbreitet sich aber niemals auf die peripheren Teile der Epithelschicht, wo die einzelnen Zellterritorien voneinander immer deutlich abgegrenzt bleiben. Auf Abb. 5 sieht man links einen syncytiumähnlichen Bezirk, welcher einem querdurchschnittenen basalen Teil der Epithelschicht gehört. Da die abgebildete Schicht gekrümmt ist, sind die rechts gezeichneten Zellen der mittleren und äußeren Lage mehr tangential getroffen. Hier treten mit Eh gefärbte Schlußleisten sehr deutlich hervor, wodurch die einzelnen Zellkonturen eine besondere Schärfe erhalten. Stellenweise sieht man noch ein anderes Strukturdetail (z. B. rechts oben Abb. 5): die Zellkörper erscheinen etwas geschrumpft und auseinandergewichen, wodurch eine feine zickzackförmige Spalte entsteht, welche beiderseits durch schwarz imprägnierte, ebenfalls gezackte Zellränder umsäumt ist. Im Spaltraum können keine Interellularbrücken gefunden werden.

Im Protoplasma der Epithelzellen beobachtet man fast immer ein Auftreten von kleinen Vakuolen, welche dicht am Kern entstehen, später aber ihre Lage ändern können. Dort, wo die Vakuolen im Syncytium nebeneinander liegen, erhält man den Eindruck, als ob im Protoplasma dadurch neue Zellterritorien geschaffen werden — die Vakuolen erscheinen als kleine intercelluläre Spalten; das zwischen ihnen gelegene Protoplasma als intercelluläre Brücken. Auf diese Weise könnte man das Auftreten von Zellbrücken in vitro erklären, welche im normalen Übergangsepithel nicht vorhanden sind. Selbstverständlich will ich dabei auch andere Entstehungsmöglichkeiten von Zellbrücken nicht leugnen. Dieselbe Annahme kann auch andere, weiter unten beschriebene Strukturen in den Epithelschichten erklären.

Was nun die Zellverbindung durch intercelluläre Brücken anbetrifft, so kann sie in den meisten anderen Fällen konstatiert werden und ist sowohl an EAz-, als auch an Eh-Präparaten wahrzunehmen. Die Interellularbrücken können auf den Abb. 4 und 5 gesehen werden.

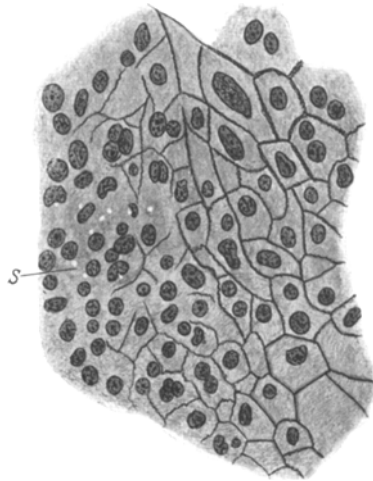


Abb. 5. Neugeborenes Kaninchen. Kultur von 4 Tagen. Schnitt durch das Deckepithel des Explantats; links (S) syncytiumähnliche Struktur mit einzelnen Vakuolen: freie Oberfläche oben rechts; Schlußleisten oder schwarzgefärbte gezackte Zellränder. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt Eh. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a. Ok. 2.

Gewöhnlich sind sie fast in der ganzen Dicke der Epithelschicht zu sehen und nur an der freien Oberfläche befinden sich stets die Schlußleisten, welche sowohl auf tangentiellen Schnitten in Netzform, als auch auf Querschnitten als schwarze Punkte (Abb. 13) durch Eh sehr deutlich dargestellt werden.

Was nun die gegenseitigen Beziehungen der durch Interellularbrücken verbundenen Zellen betrifft, so weichen sie von den normalen oft sehr stark ab und deuten auf einen tiefgehenden Umbau und Neuordnung der Zellen hin.



Abb. 6. Neugeborenes Kaninchen. Kultur von 3 Tagen. Teil des Deckepithels mit intercellulären Brücken; einige Zellen sind von den Fortsätzen der Nachbarzellen allseitig umgeben. Schnittpreparat. Fixiert ZF, gefärbt EAz. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a. Ok. 4.

Die ursprüngliche mehrreihige Struktur des Übergangsepithels wird zu einer mehrschichtigen. Die dabei entstehenden Bilder sind in Abb. 6 dargestellt. Man sieht hier einen Teil einer kleinen Ausstülpung der Epithelschicht mit sehr deutlichen Interellularbrücken. Einzelne Zellen sind stellenweise durch sich verzweigende und anastomosierende protoplasmatische Stränge anderer Zellgruppen allseitig umgeben, so daß man den Eindruck bekommt, daß die einen Zellen von anderen eingeschlossen werden. Dabei scheinen die protoplasmatischen Fortsätze der umschließenden Zellen, wenigstens zum Teil, einen syncytialen Charakter anzunehmen. Die umschlos-

senen abgerundeten Zellen sind mit der sie umgebenden protoplasmatischen Wand allseitig durch Interellularbrücken verbunden.

Wie könnte man sich nun die Entstehung solcher Strukturen erklären? Wenn man das oben über die Entstehung von intraepithelialen syncytienähnlichen Bezirken Gesagte ins Auge faßt, so könnte man vermuten, daß die soeben erwähnten von anderen Zellen umschlossenen Elemente sekundär durch Vakuolenbildung im Syncytium entstanden wären. Durch gegenseitige Verschiebungen einzelner Zellen gegeneinander wäre der Befund viel schwieriger zu erklären. Die angeführten Tatsachen zeigen uns zweifellos, daß innerhalb einer kontinuierlichen Epithelschicht, welche aus dicht zusammengedrängten Zellen besteht, tiefgreifende Umwandlungsprozesse ausgelöst werden, welche die ursprüngliche Struktur von Grund aus umbauen.

Weitere strukturelle Veränderungen, zu denen ich nun übergehe,

beruhen auf dem Auftreten von intercellulären Hohlräumen, welche eine bedeutende Auflockerung der früher kompakten Epithelschicht verursachen können. Sie können auf zweierlei Art entstehen. Erstens kommen sie dadurch zustande, daß einige mitten im Epithel gelegene Zellen der Nekrobiose anheimfallen. Sie lösen ihre Verbindung mit den umgebenden Zellen auf, im Kern läßt sich Karyolyse oder Pyknose beobachten; schließlich zerfällt die ganze Zelle zu einem Häufchen körnigen Detritus. In anderen Fällen ist die Bildung von intercellulären Hohlräumen durch eine fortschreitende Speicherung von Flüssigkeit in den

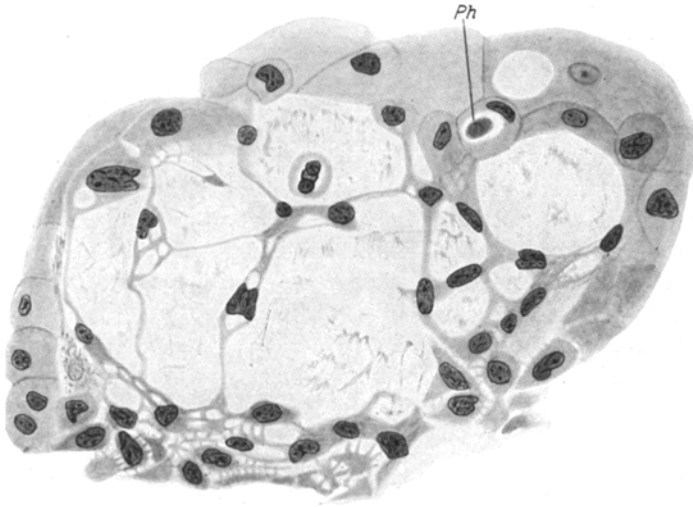


Abb. 7. Neugeborenes Kaninchen. Kultur von 4 Tagen. Deckepithel des Explantats. Links und oben freie Epithelfläche; unten deutliche intercelluläre Brücken. Größere und kleinere intercelluläre Hohlräume. In der oberen Höhle eine abgerundete isolierte Epithelzelle; Ph = phagocytierte Einschlöß. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt EAz. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a. Ok. 2.

intercellulären Spalten verursacht. Die Zellen werden durch die Flüssigkeit auseinandergedrängt und die Intercellularbrücken stark ausgedehnt, wodurch die Zellen Sternform erhalten.

Auf Abb. 7 sind solche intraepitheliale Höhlen abgebildet. Unten sieht man miteinander durch protoplasmatische Brücken verbundene Zellen. Einige intercelluläre Spalträume sind etwas erweitert. Im Zentrum sieht man eine große mit Flüssigkeit gefüllte Höhle, die von einem lockeren Reticulum aus nur teilweise vom Schnitt getroffenen Zellen durchzogen ist. Ihrer Gestalt nach sind diese Elemente, obgleich sie dem Epithel gehören, Bindegewebszellen äußerst ähnlich. In der Höhle befindet sich eine offenbar degenerierende abgerundete Epithelzelle mit fragmentiertem Kern. Rechts sieht man ähnliche kleinere Höhlen.

Die Entstehung von intraepithelialen Höhlen in vitro ist wahrscheinlich in verschiedensten Epithelarten möglich: ich habe ihr Vorkommen sowohl in embryonalen Epithelien, als auch in den Submaxillarkulturen neugeborener Tiere gesehen^{6, 7}).

Weitere Veränderungen der Epithelstruktur finden an den Stellen der aktiven Epithelbewegung statt, wo die Zellen sich stark abflachen und in einer oder zwei dünnen Zellschichten irgendein festes Substrat (Detritus, Bindegewebe oder Fibringerinnsel) umwachsen. Im Übergangsepithel beteiligen sich die Zellen der tieferen Lagen an der Epithelisierung. Die Zellen sind miteinander durch Intercellularbrücken verbunden. Die Abb. 12 und 13 erläutern diese Beziehungen.

Wenden wir uns nun einigen innerhalb der einzelnen Zellen vorkommenden Veränderungen zu. Ich habe oben das Auftreten von kleinen Vakuolen schon erwähnt. Die Vakuolen treten in verschiedenen Zellschichten auf und verändern sich nach zwei Hauptrichtungen. Was den feinwabigen Bau des Protoplasmas anbetrifft, welcher in den Kontrollpräparaten für die mittleren Zellagen so charakteristisch ist, so verschwindet er bald nach der Explantation. Daher erscheint das Protoplasma der meisten Zellen in vitro zunächst homogen; die unten beschriebenen Vakuolen entstehen in vitro.

An nach *Kolačev* osmierten Präparaten kann man konstatieren, daß die Vakuolen innerhalb des *Golgischen* Netzes auftreten und das letztere stark auseinanderziehen (Abb. 15). In den einen Fällen nimmt die Größe der einzelnen Vakuolen nicht besonders zu. Zunächst sieht man neben dem Kern einzelne Vakuolen (Abb. 4); dann nimmt ihre Anzahl bedeutend zu, so daß der Zellkörper von kleineren oder größeren Vakuolen vollständig durchsetzt erscheint (Abb. 16). Gewöhnlich läßt sich diese Erscheinung an Zellen beobachten, welche sich von der Epithelschicht lostrennen und abrunden. Was ihr weiteres Los anbetrifft, so wird davon etwas weiter unten berichtet werden. In anderen Fällen nimmt die Größe der einzelnen Vakuolen sehr stark zu; sie fließen zusammen und nehmen den ganzen zentralen Teil der Zelle ein (Abb. 8). Dabei wird der Kern gegen die Peripherie abgedrängt und abgeplattet, das Protoplasma aber auf einen dünnen peripherischen Saum reduziert. Solche bläschenförmige Zellen gleichen auf Schnitten vollständig ringförmigen Fettzellen, mit dem Unterschiede, daß hier in den Zellen sich keine Spur von Fett nachweisen läßt und die Vakuolen eine wässerige Flüssigkeit enthalten. Diese Umwandlung kann sowohl in einzelnen Zellen eintreten, als auch große Bezirke der Epithelschicht betreffen; sie ist wahrscheinlich als ein degenerativer Vorgang aufzufassen und ist besonders in alternden, mehrere Tage nicht transplantierten Kulturen anzutreffen. Eine besonders starke, rasch vor sich gehende Vakuolisierung wird in den im Serum kultivierten Kulturen beobachtet — sie beginnt dort schon während des ersten Tages nach der

Explantation. In 3 Tage alten Kulturen ist dieser Vorgang sehr stark ausgesprochen (Abb. 8) und dehnt sich fast auf die ganze Epithelschicht aus, welche dadurch das Aussehen von Fettgewebe erhält. Nur in der basalen Zellage bleiben die Vakuolen dauernd klein, weswegen die entsprechenden Zellen feinwabig erscheinen.

Mit dieser „vakuoligen Verwandlung“ darf ein anderer Vorgang nicht verwechselt werden: nämlich das Auftreten von Nahrungsvakuolen um allerlei Einschlüsse. Es lassen sich tatsächlich fast in allen Kulturen solche Zellen beobachten, in welchen neben dem Kern größere oder kleinere, von einem hellen Saum umgebene Klumpen gelegen sind (Abb. 4, 7, 10, *Ph*). In anderen Fällen sind es keine Klumpen, sondern

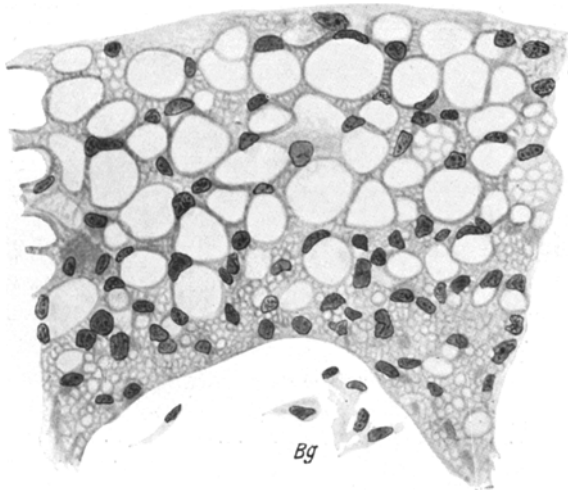


Abb. 8. Junges Kaninchen. Kultur von 4 Tagen im Serum. Deckepithel des Explantats. Intracelluläre Vakuolen, welche den mittleren und äußeren Zellagen das Aussehen von Fettgewebe verleihen; *Bg* = Bindegewebe. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt E.A. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{11}$ a, Ok. 2.

noch kaum veränderte Zellen mit Kern und Protoplasma (Abb. 9). Es können alle Übergänge zwischen ersteren und letzteren gefunden werden. Da solche Zellen mit Einschlüssen ein durchaus normales Aussehen bewahren, wobei eventuell nur der Kern durch die Vakuole mechanisch deformiert wird (Abb. 9), kann man nicht umhin, solche Bilder als Phagocytose seitens der Epithelzellen aufzufassen. Wie diese letztere zustande kommt, ist schwer zu sagen, da die betreffenden Epithelzellen den typischen Verband mit den umgebenden epithelialen Elementen bewahren und keine Veränderungen der Form zeigen, welche an aktive Phagocytose denken lassen könnten. Dennoch kann wenigstens eine mögliche Herkunft der phagocytierten Einschlüsse festgestellt werden — in vielen Fällen handelt es sich um eine Einwanderung von Lymphocyten aus dem unter-

liegenden Bindegewebe ins Epithel. Man sieht dann in den basalen Zelllagen typische amöboide Lymphocyten, welche zum Teil zwischen den Epithelzellen gegen die Peripherie vordringen, zum Teil ins Zellinnere gelangen, wo sie sich bald abrunden und von einer Vakuole umgeben werden (Abb. 9). Als dann treten in ihnen degenerative Erscheinungen auf: im Protoplasma entstehen feine Vakuolen, der Kern schrumpft zusammen und schließlich verwandeln sie sich in ein Klümpchen mit kaum wahrnehmbaren Kernresten, welches in der Größe immer weiter abnimmt. Da dabei in der einschließenden Zelle, wie schon erwähnt, keine degenerativen Erscheinungen auftreten, ist die ganze Erscheinung wohl als ein Phagocytosevorgang seitens der epithelialen Zelle aufzufassen, und nicht umgekehrt, als eine Vernichtung der Epithelzelle durch einen eingewanderten Phagocyten. Andererseits ist es möglich, daß unter

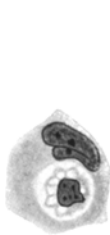


Abb. 9. Neugeborenes Kaninchen. Kultur von 3 Tagen. Eine Zelle aus dem Deckepithel mit einer anderen Zelle in einer Nahrungsvakuole. Schnittpreparat. Fixiert ZF, gefärbt Eh. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a, Ok. 4.



Abb. 10. Dieselbe Kultur. Eine keulenförmige Zelle aus dem Deckepithel mit Zellrest in Nahrungsvakuole. Dasselbe Schnittpreparat und Vergrößerung wie Abb. 6.



Abb. 11. Junges Kaninchen. Kultur von 7 Tagen. Eine ins Fibrin ausgewanderte Epithelzelle. Vakuolen sind rings um den Zellkern und die Sphäre angeordnet. „Intracelluläre Brücken.“ Totalpräparat. Fixiert C, gefärbt H. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a, Ok. 4.

Umständen auch degenerierende Epithelzellen von ihren Nachbarn verschlungen werden. Der Mechanismus dieser Art von Phagocytose bleibt allerdings unklar. Was aber die Tatsache selbst anbetrifft, so sind die in den Präparaten beobachteten Bilder sehr eindeutig und beweisend.

Was nun die weiteren cytologischen Einzelheiten des Zellprotoplasmas anbetrifft, so will ich nur den durch die Osmiummethode dargestellten Golgischen Apparat kurz erwähnen. Sogar in fast 2 Wochen alten Kulturen behalten die Epithelzellen ein wohlentwickeltes Golgisches Netz, welches neben dem Kern liegt (Abb. 14). Es weist keine nennenswerten Abweichungen vom normalen Zustand, wie er z. B. von *Deineka*¹¹⁾ im Übergangsepithel beschrieben wurde, auf. In den oberflächlichen Zellen befindet sich das Netz oft unterhalb des Kerns. Der räumliche Zusammenhang zwischen den in den Zellen auftretenden Vakuolen und dem Golgischen Apparat (Abb. 15) wurde schon oben erwähnt. Wenn man die in der neueren Zeit vorgeschlagene Auffassung [*Nasso-*

now¹⁴)] des Golgischen Netzes, als eines intracellulären Sekretionsorgans ins Auge faßt, könnte man auch von einer Beteiligung desselben an der Bildung der Vakuolen reden. Dann wäre die *in vitro* beobachtete „vakuolige Metarmorphose“ für eine abnorme sekretionsähnliche Tätigkeit des Golgi-Netzes zu erklären.



Abb. 12.

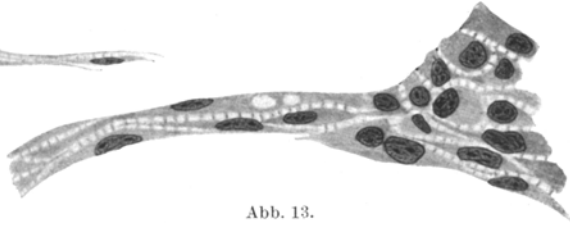


Abb. 13.

Abb. 12 und 13. Neugeborenes Kaninchen. Kultur von 3 Tagen. Aktive Epithelbewegung. Freie Epithelfläche oben. Deutliche intercelluläre Brücken und stellenweise Schlußleisten im Querschnitt. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt Eh. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{13}$ a, Ok. 2.

Von anderen Zelleinschlüssen könnte man noch erwähnen, daß Fett sogar in älteren Kulturen nur in sehr seltenen Fällen und in geringen Mengen gefunden werden kann (Abb. 14 oben).

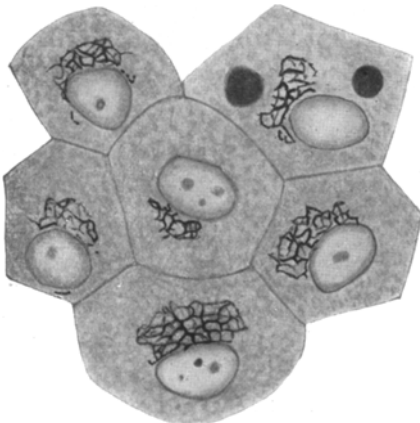


Abb. 14.

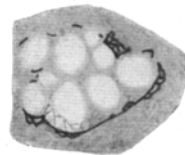


Abb. 15.

Abb. 14 und 15. Junges Kaninchen. Kultur von 13 Tagen. Golgische Netze in den Zellen des Deckepithels; in Abb. 14 nicht vakuolisierte Zellen; in Abb. 15 Auftreten von Vakuolen innerhalb des Golgischen Netzes; der Kern ist von dem Schnitt nicht getroffen. Schnittpräparat. Fixiert Ch, imprägniert Os. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{13}$ a, Ok. 4.

Es ist bemerkenswert, daß Mitosen im Übergangsepithel *in vitro* sehr selten sind — in den dicken, das Explantat umkleidenden Epithelschichten konnte ich keine einzige karyokinetische Figur finden. Einzelne Mitosen sah man nur in der Nähe der Schnittfläche, wo die Epithelzellen nicht so dicht nebeneinander liegen und an den Stellen der aktiven Epithelbewegung. Ihre Gesamtzahl in allen von mir untersuchten

Kulturen betrug aber nicht mehr als 10. Bilder der amitotischen Durchschnürung der Kerne sind hingegen viel häufiger (Abb. 26—29). In dieser Hinsicht weicht das Übergangsepithel von allen anderen von mir untersuchten Epithelarten stark ab.

Wenden wir uns nun zum aktiv wachsenden Epithel und zu den einzelnen, isolierten Epithelzellen.

Die eine Art der Entstehung isolierter Epithelzellen ist die folgende. Es wurde bereits erwähnt, daß sich einzelne Epithelzellen von den epithelisierten, in der Flüssigkeit schwimmenden Explantaten isolieren und abrunden können. Oft kann man an der Peripherie der Explantate kissenartig nach außen vorragende Epithelzellen bemerken (Abb. 16). Es können entweder die zweikernigen Deckzellen, oder auch, nach

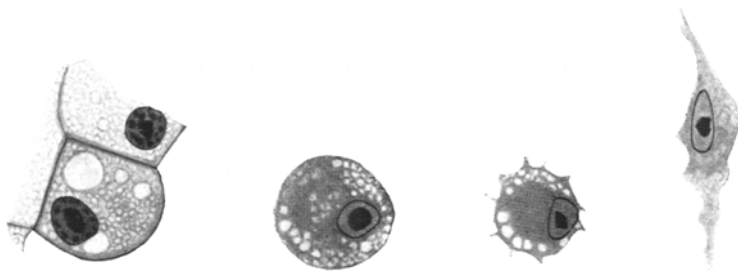


Abb. 16.

Abb. 17.

Abb. 18.

Abb. 19.

Abb. 16—19. Junges Kaninchen. Kultur von 13 Tagen. Abb. 16 kissenartig vorgewölbte Epithelzelle, welche sich vom Deckepithel ablöst; Abb. 17 kugelrunde, freischwimmende Epithelzelle; Abb. 18 ähnliche Zelle, welche sich auf dem unverflüssigten Fibrin niedergelassen hat, mit kurzen stachelförmigen Fortsätzen; Abb. 19 weiteres Stadium der Formveränderung: die auf dem Fibrin ruhende Epithelzelle nimmt Spindelgestalt an. Man beachte das Vorrücken der Vakuolen gegen die Peripherie und ihr allmähliches Verschwinden. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt EAz.

Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a, Ok. 4.

deren Desquamation, einkernige darunterliegende Zellen sein. Das Protoplasma solcher Zellen erscheint gewöhnlich von kleineren oder größeren Vakuolen durchsetzt. Der Kern färbt sich mit EAz oder H dunkel, so daß seine Struktur schwer zu bestimmen ist. Man kann jedenfalls auf dem dunklen Hintergrund einige noch dunklere große Chromatinschollen bemerken. Solche Zellen wölben sich immer mehr hervor, bis sie völlig frei und kugelig geworden sind und frei in der Flüssigkeit schweben. Die ganze chromatische Substanz des Kernes (EAz-Präparate) zieht sich dabei zu einem sehr großen kompakten Nucleolus zusammen, welcher mitten im Kern gelegen ist. Der übrige Teil des Kernes bleibt hell gefärbt, heller als das basophile Protoplasma. Die recht dicke Kernmembran ist scharf umrissen (Abb. 17 und 25). Die früher im ganzen Zellkörper zerstreuten Vakuolen sammeln sich an der Peripherie des Protoplasmas an und nehmen an Zahl zu; neben dem Kern kommt ein homogener Hof zum Vorschein, welcher der Lage nach einer Sphäre entspricht.

Bleiben die in der Flüssigkeit schwebenden Zellen längere Zeit in diesem Zustande, so treten in ihnen nekrobiotische Erscheinungen auf — Karyorrhesis und Zerfall zu Detritus. Ganz anders steht es mit den Zellen, welche sich auf der Deckglasoberfläche oder auf dem nicht verflüssigten Fibrin niederlassen und haftenbleiben. Sofort äußert sich ihr Stereotropismus — die Zellen schmiegen sich dem festen Substrat an, dehnen sich in die Länge und nehmen Spindelform an (Abb. 18, 19). Wenn sie in größerer Anzahl nebeneinander liegen, können sie größere oder kleinere dünne Membranen bilden und scheinen dabei lebensfähig zu sein; es können in ihnen auch Mitosen beobachtet werden. Die allmähliche Veränderung der Zellform ist besonders deutlich in den Zellen, die der Fibrinwand der verflüssigten Höhle anliegen: auf der Oberfläche der früheren kugelrunden Zellen treten zunächst kleine spitze Ausläufer auf (Abb. 18), die Vakuolen nehmen an Zahl ab und bilden einen schmalen Saum unter der Zellperipherie, wo sie schließlich gänzlich verschwinden. Vielleicht werden sie einfach nach außen entleert. Dann streckt sich die Zelle in die Länge und nimmt eine unregelmäßige Spindelform an (Abb. 19). Nun können solche Zellen unter verschiedenen Formveränderungen ins Fibrin weiter einwuchern. In solchen isolierten Zellen kann man auch amitotische Kernteilung beobachten. Verschiedene Stadien der Amitose in abgerundeten Zellen sind auf Abb. 25—29 wiedergegeben. Der Kern dehnt sich aus, erhält Hantelform und zerfällt schließlich in zwei Teile.

Unter den freien ins Fibrin eindringenden Zellen trifft man allerlei Formen, welche zwischen der amöboiden, spindligen und verzweigten schwanken. Die amöboiden Zellen (Abb. 20) besitzen an ZF-EAz-Präparaten ein dunkles, stark basophiles, homogenes Protoplasma mit einem helleren, runden oder ovalen, sphärenartigen Hof in der Mitte, neben dem Kern. Der Kern liegt gewöhnlich exzentrisch, ist unregelmäßig oval, heller gefärbt als das Protoplasma und enthält 2 oder mehr dunkle Kernkörperchen von verschiedener Form. Was die spindelförmigen oder verzweigten Zellen anbetrifft, so ist ihre Gestalt sehr polymorph (Abb. 21, 22). Auch hier ist das stark basophile Protoplasma homogen oder undeutlich wabig und manchmal mit einer helleren Sphäre versehen. Der Kern ist oval, hell homogen oder schwach gefleckt, oft mit einem Stich ins Rosa (nach EAz) und enthält 1—2 große oder mehrere kleine Kernkörperchen. Die Form der Verzweigungen wechselt ganz außerordentlich; mitunter wird sie höchst verwickelt.

Wie aus dieser Beschreibung erhellt, sind die verzweigten isolierten Epithelzellen ihrer Form nach den Fibroblasten äußerst ähnlich, unterscheiden sich von ihnen aber in den meisten Fällen durch die erwähnten Kern- und Protoplasmaeigenschaften. Jedenfalls sind auch solche Zellen anzutreffen, die noch stärker zum Fibroblastentypus neigen und

von echten Fibroblasten kaum mehr zu unterscheiden sind. Über Amitose in den isolierten Epithelzellen wurde schon gesprochen (Abb. 23, 24).

Das Aussehen der isolierten Epithelzellen nach Eh ist ganz verschieden: Eh färbt in den Kernen das, was EAz kaum angreift. Die Kerne der kugelligen oder amöboiden Zellen werden durch H stärker und diffus gefärbt, mit undeutlich hervortretenden Nucleolen, viel dunkler, als das schwach tingierte Protoplasma (Abb. 25). In den verästelten Zellen, deren Kerne größer und heller erscheinen, ist die Kern- und Protoplasmastruktur mit derjenigen echter Fibroblasten absolut identisch — dasselbe staubförmige Chromatin und 3—4 eckige Nucleolen

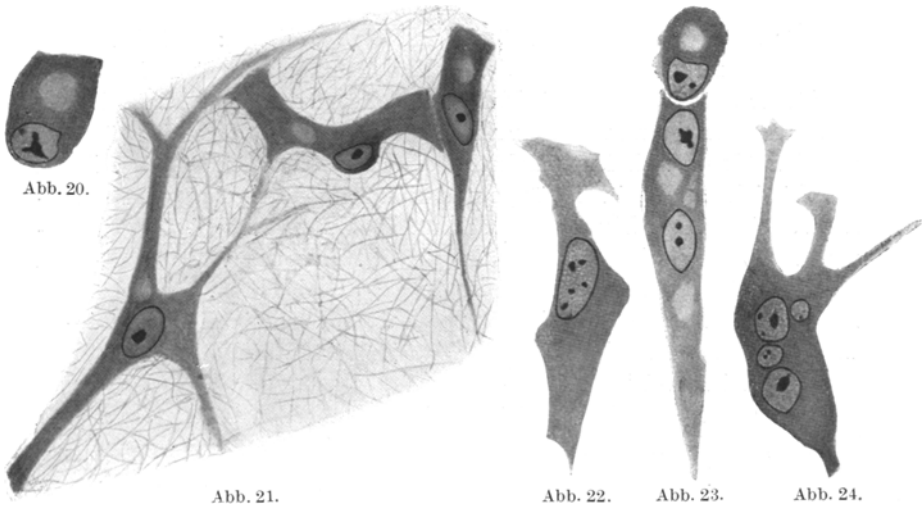


Abb. 20—24. Junges Kaninchen. Kultur von 13 Tagen. Ins Fibrin eingewucherte Epithelzellen verschiedener Gestalt, ein- oder mehrkernig; in Abb. 20, 21 und 23 neben dem Kerne eine helle Sphäre. Schnittpräparat. Fixiert ZF, gefärbt EAz. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ a, Ok. 4 (Abb. 20, 22—24), Ok. 3 (Abb. 21).

in den Kernen, und blasses wabiges Protoplasma (Abb. 30). Wenn man also nur Eh-Präparate vor sich hätte, könnte man eine vollkommene morphologische Übereinstimmung der isolierten Epithelzellen und der Fibroblasten annehmen.

Obgleich die beschriebenen isolierten Epithelzellen die Eigenschaft, das Fibrin zu verflüssigen, verloren haben, scheint dieser Verlust nicht unwiderruflich zu sein: es ist oft möglich, weit im Fibrinnetz einzelne wiederum abgerundete Zellen zu finden, welche von einem kleinen Hof verflüssigten Fibrins umgeben sind.

Eine andere Art der Entstehung isolierter Epithelzellen beruht nicht auf ihrer Abrundung mit nachträglichem Einwachsen, sondern auf einem direkten Wachstum von Epithelschichten und einzelnen Zellen vom Explantat heraus; dieses Wachstum erfolgt entweder

ins Fibrin hinein oder auf der Deckglasoberfläche (Abb. 2). Warum in diesen seltenen Fällen die Abrundung des Explantates und die Verflüssigung des Fibrins entweder überhaupt nicht erfolgen oder verzögert sind, ist schwer zu entscheiden. Jedenfalls erhalten wir, als Folge dieses Wachstums, welches in ein Auseinanderkriechen der epithelialen Elemente ausläuft, zahlreiche unregelmäßige, teils im Fibrin, teils an der Deckglasoberfläche zerstreute, kompakte, epitheliale Inseln, Membranen und einzelne Zellen verschiedener Form. Die Membranen bestehen

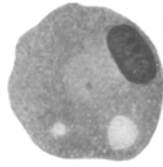


Abb. 25.

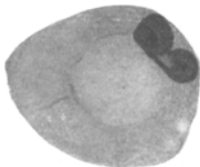


Abb. 26.

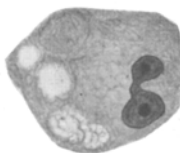


Abb. 27.

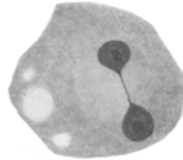


Abb. 28.

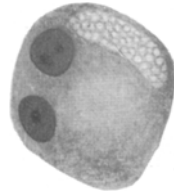


Abb. 29.

Abb. 25–29. Dieselbe Kultur. Verschiedene Stadien der Amitose in isolierten abgerundeten Epithelzellen. Totalpräparat. Fixiert ZF, gefärbt H. Obj. Leitz 8, Ok. 4.

gewöhnlich aus dicht einander anliegenden stark abgeflachten Zellen. Die Epithelinseln bestehen aus einem kompakten Haufen Epithelzellen und bedingen in einigen Fällen eine Verflüssigung des Fibrins; dann bleiben sie ohne weitere Veränderungen. Manchmal aber bleibt die Ver-

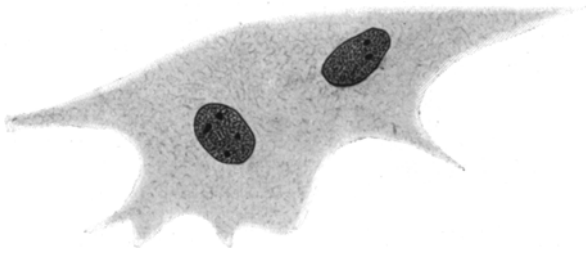


Abb. 30. Junges Kaninchen. Kultur von 7 Tagen. Isolierte Epithelzelle, welche bei dieser Färbung von einem Fibroblast nicht zu unterscheiden ist. Totalpräparat. Fixiert C, gefärbt H. Obj. hom. Imm. Leitz $\frac{1}{12}$ 8, Ok. 4.

flüssigung an der einen Seite der Insel oder auch überall aus. Außerdem läßt sich aber auch ein Herauswachsen einzelner Epithelzellen nachweisen; sie dringen in Form amöboider, abgerundeter oder mit zugespitzten Ausläufern versehener Elemente ins Fibrin ein. Einzelne Epithelinseln können durch längere Zellstränge miteinander verbunden bleiben. Alle diese Beziehungen kann man auf Abb. 2 sehen. Was die feinere Beschaffenheit dieser Zellen und ihre Formveränderungen anbetrifft, so gilt für sie alles oben Gesagte. Daher willich mich hier nicht wiederholen und nur noch eine Beobachtung hervorheben. Auf Totalpräpa-

raten ist es oft möglich, in den mit Vakuolen versehenen Zellen eine sehr regelmäßige Verteilung der Vakuolen längs der Peripherie des Zelleibes festzustellen; die Vakuolen bilden einen Saum um den Kern und den zentralen Teil der Zelle herum (Abb. 11). Es scheint, als wäre hier der kernhaltige zentrale Teil der Zelle mit der Peripherie durch dünne, zwischen Vakuolen verlaufende, „intracelluläre“ protoplasmatische Brücken verbunden.

B. Bindegewebe.

In den epithelreichen Kulturen spielt das Bindegewebe eine rein passive Rolle, wird vom Epithel umschlossen und hat keine Möglichkeit, hervorzuwachsen. In ihm treten schon sehr bald degenerative Erscheinungen auf, die eine vollständige Umwandlung des Bindegewebes zu Detritus herbeiführen. Im Gegensatz zu den Epithelzellen treten im Bindegewebe große Mengen Fett auf. An Ch-Os-Präparaten ist es möglich, in den Fibroblasten einen typischen Golgi-Apparat zu demonstrieren; er ist hier vom Golgi-Apparat der Epithelzellen sehr verschieden und wird von einem kleinen, aus wenigen dicken Balken bestehenden Klümpchen vorgestellt.

Die abgestorbenen Zellen werden oft durch überlebende Makrophagen phagocytiert. Die Lymphocyten können, wie oben erwähnt, ins Epithel einwandern.

In einigen des Epithels entbehrenden Kulturen des bindegewebigen Teils der Harnblasenschleimhaut habe ich das gewöhnliche „grasartige“ Wachstum des Bindegewebes ohne Fibrinauflösung feststellen können.

V. Zusammenfassung und Schluß.

Die beobachteten Tatsachen lassen sich auf folgende Weise zusammenfassen:

1. Das Epithel der Harnblase von neugeborenen und jungen Tieren ist, sowohl in den rein epithelialen, als auch in den mit Bindegewebe vermischten Kulturen wachstums- und lebensfähig.
2. Es können 2 Typen von Entwicklung der Explantate beobachtet werden: a) Abrundung und Epithelisierung der Stückchen mit starker Fibrinverflüssigung, aber ohne Bildung von Epithelmembranen; b) aktives Wachstum des Epithels an der Deckglasoberfläche oder auf dem Fibrin in Form von Membranen, kompakten Massen oder einzelnen Zellen. Letzterer Typus kommt viel seltener vor.
3. Die Struktur und die Dicke der das Explantat überdeckenden Epithelschichten kann sehr stark variieren.
4. In den basalen Epithelschichten können die Zellgrenzen stellenweise verschwinden, wodurch syncytiumähnliche Strukturen zustande kommen.

5. Meistenteils sind deutliche intercelluläre Brücken vorhanden.
6. An der Peripherie der Epithelschichten sind Schlußleisten vorhanden.
7. Durch Entwicklung intercellulärer Hohlräume kann die Epithelschicht stellenweise stark aufgelockert werden.
8. Infolge des Auftretens von großen intracellulären Vakuolen kann das Epithel das Aussehen von Fettgewebe mit ringförmigen Zellen bekommen.
9. Durch die Osmierungsmethode kann in den Epithelzellen ein Golgi-Netz von typischem Aussehen demonstriert werden. Die Vakuolen treten in den Zellen innerhalb des Golgi-Netzes auf, wodurch letzteres stark auseinandergedehnt wird.
10. In einigen Epithelzellen in den Epithelschichten können Nahrungsvakuolen mit phagocytierten Zellen und Zellresten gefunden werden.
11. Von zusammenhängenden Epithelschichten können sich einzelne Zellen isolieren, abrunden und in der umgebenden Flüssigkeit schweben; hier verfallen sie entweder der Degeneration, oder sie lassen sich auf einem festen Substrat nieder und wuchern fort.
12. Die freien im Fibrin oder an der Deckglasoberfläche wachsenden Epithelzellen konvergieren entweder zum amöboiden oder zum spindligen und verzweigten Typus. Die Zellen vom letzteren Typus sind ihrer äußeren Form nach den wuchernden Fibroblasten oft sehr ähnlich, unterscheiden sich aber von ihnen durch die Beschaffenheit des Kerns und des Protoplasmas und durch die Fähigkeit, auf amitotischem Wege mehrkernig zu werden. In seltenen Fällen kann die Fibroblastenähnlichkeit vollkommen werden.

Es liegt nahe, zu denken, daß man in den Zellen und Geweben der Metazoen zweierlei Differenzierungsarten unterscheiden kann: einerseits eine sozusagen konstitutionelle Differenzierung, welche bei der Ontogenese in der Verteilung der prospektiven Potenzen besteht und einen fixen Zellbestand vorstellt, andererseits eine rein funktionelle Differenzierung, welche labil ist, und nur unter ganz bestimmten äußeren Bedingungen zustande kommen und bewahrt werden kann, wie z. B. die Sekretion der Drüsenzellen, eine bestimmte Bauart der Epithelschichten u. dgl. Die durch eine funktionelle Differenzierung hervorgerufenen Strukturen können unter Einwirkung veränderter Daseinsbedingungen verschwinden. Was aber ihre konstitutionelle Basis, den Bestand an bestimmten prospektiven Potenzen betrifft, so wird sie auch bei experimentellen Bedingungen hartnäckig bewahrt, jedenfalls kann ihr nichts Neues hinzugefügt werden.

Aus allen beobachteten Tatsachen erhellt, daß die Entwicklung der Epithelzellen *in vitro* großen Schwankungen unterworfen ist, welche mit den Existenzbedingungen im engsten Zusammenhang stehen. Die für

das Epithel so charakteristische, hartnäckig bewahrte kompakte Anordnung der Zellen wird in vitro durch seine andere Eigenschaft unterstützt — die Fähigkeit, den Nährboden zu verflüssigen. Die Verflüssigung des Nährbodens beraubt das explantierte Gewebstückchen des für das Wachstum notwendigen Substrats.

Die normale Struktur des Übergangsepithels hat wahrscheinlich eine funktionelle Bedeutung, welche mit der starken Contractilität der Harnblase in Zusammenhang steht. Nach der Isolierung aus dem Organismus fallen selbstverständlich alle funktionellen Reize fort und die durch Funktion bedingte Differenzierung kann sich weiterhin je nach den Potenzen der entsprechenden Zellen und den neuen Existenzbedingungen verändern. Es kommen sowohl die für das entsprechende Gewebe als solches charakteristischen, als auch die für alle nicht hoch spezialisierten Zellen des Organismus gemeinsamen Eigenschaften zum Vorschein.

Die abgerundeten epithelisierten Explantate stellen ein weiteres Beispiel eines in vitro lebensfähigen „Teilorganismus“ vor.

Die in der deckenden Epithelschicht solcher Explantate beschriebenen Umbauprozesse, welche die ursprüngliche Struktur von Grund aus ändern, zeigen, wie labil die verschiedenen Bauarten des Epithels sind.

Dabei werden aber die „epithelialen“ Merkmale doch hartnäckig bewahrt und sogar noch schärfer ausgeprägt: es treten meistens die für das Epithel so charakteristischen intercellulären Brücken auf, deren Anwesenheit im normalen Übergangsepithel gelegnet wird [*Danini*¹⁰⁾], stellenweise können Schlußleisten konstatiert werden u. dgl.

Was die isolierten Epithelzellen anbetrifft, so geht bei ihnen gerade die typische Epitheleigenschaft, die Cytharme, verloren. Ganz ebenso wie alle sonstigen nicht hoch spezialisierten Zellen, nehmen sie im flüssigen Medium Kugelgestalt an. Dieselben isolierten Zellen nehmen aber auf einem festen Substrat entweder eine polygonale, spindlige und verzweigte, oder eine abgerundete und amöboide Form an. Nur diese zwei Gestaltstypen und deren Übergangsformen sind überhaupt, wie es scheint, möglich, ja sogar denkbar. Unter den Bindegewebszellen sind die Fibroblasten Vertreter des ersten, die verschiedenen Wanderzellen des zweiten Formtypus. In zusammenhängenden Epithelschichten wird die Form einzelner Zellen durch ihre feste Verbindung miteinander bestimmt. Sobald sich die Zellen aber voneinander trennen, kommt die allgemeine Formregel zum Vorschein und die Zellen nehmen eine der obenerwähnten Gestalten an. Die Form der isolierten Epithelzellen ist somit als eine durch gleiche Existenzbedingungen verursachte Konvergenzerscheinung aufzufassen. In meiner vorigen Arbeit⁷⁾ habe ich ähnliche Formveränderungen für die Epithelzellen der Submaxillaris beschrieben. Da es sich nun herausstellt, daß ganz verschiedene Epithelarten durchaus

ähnliche Veränderungen durchmachen können, ist es natürlich, anzunehmen, daß wir es hier mit einer für alle möglichen Epithelarten gültigen Erscheinung zu tun haben. Die verschiedenen Epithelarten sind demnach im Organismus wahrscheinlich nur funktionell differenziert, potenziell stehen sie aber einander viel näher, als man es von vornherein glauben möchte.

Wenn man andererseits die Verwandlungen der Epithelien *in vitro* mit denselben des Bindegewebes vergleicht, sieht man, daß, obgleich diese beiden Gewebsarten in vielen Hinsichten in schroffem Gegensatz zueinander stehen, ihre Elemente dennoch bei ähnlichen äußeren Bedingungen in derselben Richtung konvergieren können.

Ganz ebenso wie das für das Bindegewebe so charakteristische „grasartige“ Wachstum lockerer Zellstränge und isolierter Zellen bei Anwesenheit von verflüssigten Hohlräumen im Fibrin zu einem Wachstum in Form von zusammenhängenden Schichten wird [*Clarke*⁹⁾, *Chlopin*⁶⁾], kann auch das Epithel beiderlei Wachstumsformen zeigen: das „typisch epitheliale“ Wachstum von Zellen, die miteinander in fester Verbindung bleiben — dies ist der bei weitem häufigste Fall —, oder ein gewöhnlich viel schwächer ausgesprochenes und von mir nur an Epithelien erwachsener Tiere festgestelltes Wachstum in Form von isolierten, spindeligem oder verzweigten Zellen.

Wenn man es mit einem schichtenähnlichen Wachstum von Bindegewebe zu tun hat, ist man nicht geneigt, von einer Differenzierung oder Entdifferenzierung des Bindegewebes in der Richtung zum Epithel zu sprechen. Mit ebensowenig Recht kann man also auch von einer Entdifferenzierung des Epithels zu einer Art von Bindegewebe sprechen. Es ist vielmehr ein im Organismus nur unter außergewöhnlichen Bedingungen eintretender funktioneller Zustand. Im Organismus der höheren Vertebraten gibt es bekanntlich zwei Organe, wo sich das Epithel stark auflockern kann — die Thymus und das Stratum intermedium der Zahnanlage. Hier nehmen die im Verlauf der normalen Entwicklung zuerst ganz typischen Epithelzellen mit der Zeit eine verzweigte Sternform an, welche sehr an Bindegewebszellen erinnert.

Gegen eine Gleichstellung der wuchernden isolierten Epithelzellen mit ähnlichen Zellen bindegewebiger Herkunft sprechen auch direkte Tatsachen: bei Anwendung geeigneter Methoden können die verzweigten Epithelzellen von den ihrer Form nach höchst ähnlichen Fibroblasten durch bestimmte, oben erwähnte färberische Kennzeichen meistens ganz leicht unterschieden werden. Daß in einigen recht seltenen Fällen das tinktorielle Kriterium versagt, dürfte wohl kaum im Sinne von echten „Übergangsformen“ gedeutet werden. Ein weiterer Unterschied ist die Fähigkeit der isolierten Zellen des Übergangsepithels, durch Amitose zwei- und mehrkernig zu werden. Isolierte, im Fibrin zerstreute Zellen

können sich unter entsprechender Formveränderung augenscheinlich wiederum zu größeren oder kleineren Inseln verbinden. Manchmal kann eine Verflüssigung des Fibrins um einzelne Epithelzellen herum eintreten. Histologisch vollkommen ähnliche Zellen brauchen aber ihrem Wesen nach nicht identisch zu sein, oder, wenn wir die oben erwähnte Terminologie gebrauchen, können Zellen mit ganz verschiedener konstitutioneller Differenzierung unter Umständen eine konvergente funktionelle Differenzierung erleiden.

Wenn man also die Gesamtheit der Veränderungen des Epithels in vitro ins Auge faßt und mit den Veränderungen des Bindegewebes vergleicht, so erscheinen ihre Entwicklungswege zwar in ihrem Ganzen verschieden, in den Einzelheiten aber können die Elemente dieser beiden Gewebe sozusagen füreinander funktionell eintreten und bei gleichen funktionellen Zuständen eine ausgesprochene Konvergenz der Form und des Wachstumstypus zeigen.

Die verschiedenen Faktoren, welche die Entwicklungsrichtung der Explantate beeinflussen können, habe ich in einer anderen Arbeit⁶⁾ bereits formuliert. Sowohl die dort beschriebenen Tatsachen, als auch die am Epithel erwachsener Tiere gewonnenen Befunde machen es wahrscheinlich, daß, je nachdem, welche Faktoren in vitro die Oberhand gewinnen, das Gewebe entweder ein organotypisches oder ein zelliges Wachstum zeigen kann. Im ersten Falle können regulatorische Vorgänge und weitere Entwicklung resp. Regeneration beobachtet werden [*Rienhoff*¹⁵⁾, *Chlopin*⁶⁾], im zweiten atypisches Wachstum von Membranen, Zellinseln oder isolierten Zellen, welche ihre funktionelle Differenzierung eingebüßt haben. Die von den Geweben während der Ontogenese erhaltene konstitutionelle Ausgestaltung kann hingegen dabei weder um- noch dedifferenziert werden und äußert sich stets in den in vitro zutage tretenden Verwandlungen und Umgestaltungen.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer und ehemaligen Chef, Herrn Prof. Dr. A. Maximow, für das stete wohlwollende Interesse, welches er meinen Arbeiten entgegenbrachte, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

St. Petersburg, November 1923.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Aurorow und Timofejewsky*, Versuche über Kultivierung von Geweben außerhalb des Organismus. Tomsk. 1914. (Russisch.) Dasselbe in *Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol.* **216**. 1914. — ²⁾ *Champy, Ch.*, La dédifférentiation des tissus cultivés en dehors de l'organisme. *Bibliogr. Anat.* **23**. 1913. — ³⁾ *Champy, Ch.*, Quelques résultats de la méthode des cultures des tissus. III. Le rein. *Arch. de zool. exp. et gén.* **54**. 1914. — ⁴⁾ *Champy, Ch.*, Quelques résultats etc. IV. La glande thyroïde. *Arch. de zool. exp. et gén.* 1915. — ⁵⁾ *Champy, Ch.*, Perte de la sécrétion spécifique des cellules cultivées in vitro. *Cpt. rend. des séances de la soc. de*

biol. 1920. — ⁶) *Chlopin, N.*, Über In-vitro Kulturen der embryonalen Gewebe der Säugetiere. Arch. f. mikroskop. Anat. **96**. 1922. — ⁷) *Chlopin, N.*, Über In-vitro Kulturen von Geweben der Säugetiere mit besonderer Berücksichtigung des Epithels. I. Kulturen der Submaxillaris. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **243**. 1923. — ⁸) *Chlopin, N.*, Investigations on the in vitro cultures of tissues of the axolotl. Proc. of the I. Russ. Congress of Anat., Zool. and Histol. 1923. — ⁹) *Clarke, W. C.*, Experimental mesothelium. The Anat. Rec., **5**. 1916. — ¹⁰) *Danini, E. S.*, Zur Frage über die Struktur des Übergangsepithels. Berichte des biol. wiss. Inst. zu Perm **1**. 1922. (Russisch.) — ¹¹) *Deineka, D.*, Der Netzapparat von Golgi in einigen Epithel- und Bindegewebszellen usw. Anat. Anz. **41**. 1912. — ¹²) *Ebeling, Alb.*, and *A. Fischer*, Mixed cultures of pure strains of fibroblasts and epithelial cells. Journ. exp. med. **36**. 1922. — ¹³) *Fischer, A.*, A three months old strain of epithelium. Journ. exp. med. **35**. 1922. — ¹⁴) *Nassonow, D.*, Das Golgische Binnennetz und seine Beziehungen zur Sekretion. Untersuchungen über einige Amphibiendrüsen. Arch. f. mikroskop. Anat. **97**. 1923. — ¹⁵) *Rienhoff, W.*, Development and growth of the metanephros or permanent kidney of chick embryos. Bull. of Johns Hopkins hosp. **33**. 1922.
