

{Aus der Parasitolog. u. Vergl.-patholog. Abt. d. Patholog. Institut d. Universität  
[Dir.: Geh. Rat *Lubarsch*] und der Universitäts-Frauenklinik der Charité  
[Dir.: Geh. Rat *Franz*.]}

## Die Kultur menschlichen Ovarial- und Amniongewebes.

Von

Priv.-Doz. Dr. **E. K. Wolff** und Priv.-Doz. Dr. **B. Zondek**.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. August 1924.)

Wenn bisher die explantative Technik in verhältnismäßig geringem Umfang menschliche Gewebe verwendet hat, so hat dies weniger in einer gewissen Schwierigkeit der Materialbeschaffung als vielmehr darin seinen Grund, daß das menschliche Plasma wenig geeignet ist, als Grundlage des Nährmediums zu dienen. So waren die Versuche von *Carrel* und *Burrows* (1911), menschliche Tumoren in Menschenplasma zu züchten, daran gescheitert, daß das Flüssigwerden des Plasmas die längere Züchtung unmöglich machte, und dasselbe Schicksal wiederfuhr — allerdings erst bei späteren Passagen — den Bindegewebskulturen, die *Loose* und *Ebeling* (Journ. of exp. Med. 1914) vom Bindegewebe eines gestorbenen Foetus angelegt hatten. Glücklicher war dann *Lambert* (Journ. exp. Med. XXIV) sowie *Lewis*, der am explantierten menschlichen Lymphknoten (in Menschenplasma) seine Untersuchungen über die Riesenzellbildung und den genetischen Zusammenhang der verschiedenen Zellarten des lymphatischen Gewebes anstellen konnte (Journ. of exp. Med. 1921).

Die Unterschiedlichkeit im Verhalten von Epithelien und von Bindegewebszellen gegenüber dem Plasmamedium ist bekannt. Die Neigung der Epithelien, den Nährboden zu verflüssigen ist eine gefürchtete Verwicklung der Gewebezüchtung, da dieser Vorgang, falls er im ganzen Umkreis das überpflanzte Stück betrifft, stets ein Absterben desselben zur Folge hat. Bei Bindegewebskulturen zahlreicher Tiere im gleichartigen Plasma begegnet man diesen Schwierigkeiten im allgemeinen nicht — hingegen gerade bei der Züchtung menschlichen Bindegewebes in menschlichem Plasma. Da es sich hierbei um die Verdauung des Fibringerüstes handelt, eines ausschließlich mechanisch wirksamen Bestandteiles des Kulturmediums, so liegt der Ersatz durch einen geeigneteren Stoff für den besonderen Fall der Züchtung menschlicher Gewebe auf der Hand. Man braucht nicht einmal zu den methodisch

nicht ganz einfachen und mit vielen Nachteilen behafteten Gerüsten in Form von feinmaschiger Gaze, von Faden-Netzwerken, Watte u. dgl., die alle mit Erfolg angewandt worden sind, zu greifen, sondern kann sich viel einfacher des Gerinnungssystems artfremden Blutes bedienen. Die Versuche der Züchtung in artfremdem Plasma, wie sie systematisch von *Lambert* und *Hanes* am Rattensarkom, Mäusesarkom und der Rattenmilz mit Meerschweinchen-, Kaninchen-, Hunde-, Ziegen-, Tauben- und Menschenplasma angestellt worden sind und die zu dem Ergebnis geführt hatten, daß das arteigene Plasma besser als das artfremde ist, haben wohl nur für den Fall Geltung, daß das beim Gerinnen aus dem Plasma austretende Serum den wichtigsten Nährbodenbestandteil darstellt — aber nicht, wenn man gewissermaßen das artfremde Plasma nur zur Gewinnung des Gerüstes benutzt und geeignetes Nährmaterial hinzufügt. Dann genügt eigentlich, daß die eine Vorbedingung erfüllt ist, daß das verwandte Plasma und natürlich auch das nach Gerinnung gebildete Serum keine giftigen Wirkungen auf das ausgepflanzte Gewebe ausübt. Das Arbeiten mit reinen Fibrinogenlösungen, das in Amerika gelegentlich geübt wird, aber aus verschiedenen Gründen nicht sehr angenehm ist, löste diese ganze Frage ideal. Wir brauchten hierauf nicht zurückzugreifen, denn die Verwendung von Kaninchenplasma erwies sich für unsere Zwecke völlig ausreichend. Die Mischung artfremden Plasmas mit arteigenem Serum empfiehlt sich überhaupt unter verschiedensten Umständen. Die Schwierigkeit, größere Mengen z. B. von Meerschweinchenplasma zu gewinnen, das so außerordentlich schnell gerinnt, hatte *Kuczynski* veranlaßt, bei der Auspflanzung von Milzen fleckfieberinfizierter Meerschweinchen sich der Mischung Meerschweinchen- und Kaninchenplasma zu bedienen (*Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol.* 242). Für die Züchtung menschlicher Gewebe hatte schon früher *Lambert* die Mischung von Hühnerplasma mit menschlichem Serum empfohlen (*Journ. of exp. Med.* 1924).

Die Wahl der Zusätze zum Nährmittel, sowohl der Verdünnungsflüssigkeit wie der sog. wachstumsfördernden Substanzen weicht ebenfalls nicht von bekannten Methoden ab. Wenn wir das arteigene Serum zur Grundlage des Nährbodens wählten und wir damit einem allgemein üblichen Brauche folgten, so liegt das in der Einfachheit der Gewinnung dieses Stoffes begründet. Wir wissen zwar durch die Untersuchungen von *Carrel* und seinen Mitarbeitern, daß zur Gewebeskultur die Anwesenheit von Serum nicht erforderlich ist, daß künstliche Gemische wie *Locke-Lewissche Tyrode-Lösung* unter Zusatz geringer Mengen von Embryonal-extrakt den Geweben Wachstumsmöglichkeit bieten, ohne daß Serum zugesetzt zu werden braucht, falls es sich aber um die Beobachtung der ersten Kultur und nicht um Züchtung in Passagen zu züchtender Gewebe, vor allem auch Epithelien handelt und man nicht verglei-

chende Studien über die Nährbodenanforderungen anstellt, empfiehlt sich schon wegen der Einfachheit ohne Zweifel die Verwendung des „kompletten“ Serums. Die Verdünnung des Plasma-Serumgemisches wurde teils mit Tyrode-, teils mit Ringerlösung vorgenommen, derart, daß von jedem dieser drei Bestandteile die gleiche Menge genommen wurde. Falls wir außerdem noch Zusätze, Embryonal- oder andere Extrakte verwandten, wurden im allgemeinen alle 4 Bestandteile zu gleichen Mengen gemischt; unter diesen Umständen hat dann das geronnene Medium eine für das Wachstum sehr günstige Festigkeit. Bei der verhältnismäßig starken Verdünnung des Plasmas tritt die Erstarrung erst ziemlich spät ein, doch macht sich dieser Umstand bei Verwendung geeigneter Züchtungskammern nicht störend bemerkbar, während Deckglaskulturen mit einem so dünnflüssigen und spät gerinnenden Nährmedium wohl nur mit Schwierigkeit angelegt werden können. Wir verwendeten stets die von *Kuczynski* angegebenen Modelle in möglichst kleiner Ausführung. Die Züchtung in Kulturgefäßen und damit die Abkehr von der Deckglaskultur hat sich ja in den letzten Jahren in der ganzen Welt vollzogen. Amerikanische und französische Autoren arbeiten schon lange mit Kulturschälchen und seit einiger Zeit ist auch von *Carrel* ein besonderes Modell für diese Zwecke angegeben, das nicht nur die Verwendung größerer Mengen von Nährmaterial, sondern auch eine Erneuerung desselben ohne Herausreißen des Stückchens und daher eine viel länger fortzusetzende Beobachtung gestattet. Die mikroskopische Beobachtung des wachsenden Gewebes läßt sich in unseren Plasmakammern fast ebenso gut durchführen wie bei der Deckglaskultur, zumal, wenn man so durchsichtige Medien verwendet, wie die oben angegebene Mischung. Die Mischung Plasma-Serum-Ringer (evtl. Extrakt) 1 : 1 : 1 (: 1) ist außerordentlich klar. Wir wählten diese Zusammensetzung auch dann, wenn wir beispielsweise Kaninchengewebe in arteigenen Nährmedien auspflanzten, weil sie viel klarer ist als etwa die einfache Verdünnung des Plasmas allein mit Ringerscher Lösung. Diese Mischungen sind nicht nur trübe, sondern auch sehr fest, wenn man nicht unverhältnismäßig viel Ringersche Lösung bzw. Extrakt zusetzt; die Mischung Kaninchenplasma-Kaninchenserum-Ringer-(Extrakt) ist demgegenüber erheblich günstiger.

Die Bedeutung des Zusatzes von Embryonalextrakt zum Nährboden soll hier nicht eingehend erörtert werden<sup>1)</sup>. Die Frage ist auch von größerer Wichtigkeit für die dauernde Fortführung von Kulturpassagen, seitdem *Carrel* gezeigt hat, daß hierfür der Zusatz der jetzt von ihm *Trephone* genannten Wuchsstoffe erforderlich ist. Wir wissen heute, daß diese „Wuchsstoffe“, die nach der neuesten Auffassung von *Carrel* viel mehr unentbehrliche Nährstoffe selbst und nicht nur wachstum-

<sup>1)</sup> Siehe Referat in Jahreskurse für ärztl. Fortbildung 1925, Januarheft.

anregende Stoffe sind, in dieser Vollständigkeit nur in Embryonal- und Leukocyten-Extrakten, hingegen nicht in den Extrakten der Organe erwachsener Individuen anzutreffen sind. Es ist zu erwarten, daß die Zeit nicht mehr fern ist, daß man diese geheimnisvollen Stoffe ganz des sie umgebenden Mystizismus entkleidet und dafür bestimmte Vorstellungen erhält. Die Versuche von *Kuczynski*, die Wachstumsbedingungen in der Gewebeskultur entweder durch direkte Zusätze von wirksamen verdauenden Fermenten oder durch eine Präparation des Nährbodens, die eine Anreicherung von katalytisch wirkenden Fermenten bezweckt (die für bakteriologische Zwecke viel verwandte Methode der Nährbodenbereitung nach *Levinthal*), weisen neue aussichtsreiche Wege (Verhandl. Deutsch. Pathol. Gesellsch. 1923). Für die Originalkultur und auch die erste Passage kann man ohnedies auf jeglichen Extraktzusatz verzichten. Extrakt aus menschlichem embryonalen Gewebe ist ja auch schwer zu beschaffen und stand uns selbst nur in geringer Menge zur Verfügung. Falls wir späterhin Extrakt benötigten, stellten wir ihn aus den Lebern möglichst junger Foeten mit und ohne Autolyse im Brutschrank her. Wir haben der ganzen Extraktfrage im Rahmen der vorliegenden Untersuchung verhältnismäßig wenig Beachtung geschenkt, da rein technisch vorwiegend das Verhalten des ausgepflanzten Organstückes in der ersten, zum Teil recht lange ausgedehnten Kultur unsere Aufmerksamkeit in Anspruch nahm und erst in zweiter Linie die Frage der Kulturpassage. Wir haben auch — um dies vorwegzunehmen — die Passagen längstens über zwei Monate fortgeführt; ein unglücklicher Zufall — Versagen der Regulierung des Brutschrankes — veranlaßte das vorzeitige Unterbrechung dieser Versuche. Die Frage der dauernden Erhaltung der gezüchteten Gewebe in der Kultur, die von jedem angestrebt wird, der auf diesem Gebiete arbeitet und die erst unlängst am Hühnersarkom in neuartiger Weise von *Fischer* (Klin. Wochenschr. 40, 1924) ausgeführt worden ist, wird durch unsere Versuche nicht berührt.

Die so lange vorzugsweise geübte Züchtung embryonaler Gewebe hat neben dem Vorteil der leichteren Züchtbarkeit entschieden den Nachteil gegenüber der Kultur erwachsenen Gewebes, daß die Beurteilung der Ergebnisse durch entwicklungsgeschichtliche Fragen verwickelt wird. Wenn man mesenchymales Gewebe von ganz jungen embryonalen Herzen auspflanzt, ist man nicht in der Lage, zu sagen, ob man es mit Gewebsbestandteilen zu tun hat, die sich bei normaler Weiterentwicklung zu Muskelzellen weiter entwickelt oder Bindegewebsfunktionen übernommen hätten. Diese Unsicherheit der Beurteilung noch nicht ausgebildeter Gewebe erschwert naturgemäß auch die Beurteilung des Zuchterfolges. Die immer so betonte hervorragende Wachstumskraft embryonalen Gewebes allein berechtigt nicht zu einer derartigen Bevorzugung

desselben, zumal sie ja auch noch nach der Geburt in recht erheblichem Umfange vorhanden ist. Im allgemeinen untersuchen wir doch gar nicht in der Gewebeskultur das normale, den wachsenden Organismus kennzeichnende Wachstum, das mit der Reife zum Abschluß kommt, sondern vielmehr das Regenerations- bzw. Wundheilungsvermögen, das während des ganzen Lebens in wechselndem Ausmaß erhalten bleibt. Wir pflanzen ja nicht unverletzte Embryonen aus und lassen sie wachsen, sondern wir setzen eine Lücke, eine Wunde und untersuchen die reaktive Zellwucherung, die wir durch Auswahl der Versuchsbedingungen in bestimmte Bahnen zu lenken versuchen. Daß wir nicht einmal die Bedingungen der natürlichen Wundheilung in unseren Kulturen erreichen, bedarf keiner Betonung: es tritt Zellwanderung und Zellvermehrung ein, ohne eine endgültige gewebliche Organisation. Weil eine das Regenerationsbestreben abschließende Form nicht erreicht wird, bleibt das Regenerationsbestreben dauernd erhalten und äußert sich unter den Bedingungen der Passage, die zum Nährmaterialersatz notwendig ist, unbegrenzt. *Carrel* und *Ebeling* züchten einen Stamm embryonalen Bindegewebes seit nunmehr 13 Jahren in Passagen und er zeigt noch die unverminderte Wachstumsstärke. *Fischer* (l. c.) berichtet über 84 Passagen des Hühnersarkomstammes, der unverändert seine Eigenschaften — auch was Pangenität anlangt — bewahrt hat. Wenn Epithelien bis jetzt noch nicht unbegrenzt lange gezüchtet werden konnten, so liegt das wohl nur an unseren Nährbodenverhältnissen und die Lösung dieser Frage wird gefunden werden<sup>1)</sup>. Wichtiger scheint uns die Aussicht gerade mit Hilfe der Plasmakultur die Frage der Regenerationsfähigkeit verschiedener Gewebe unter Berücksichtigung des Alters einerseits und des Individuums andererseits zu erforschen; dafür ist aber Voraussetzung, daß die Versuche vereinfacht werden und bestimmtere Ergebnisse liefern als heute noch der Fall ist. Es wird wohl jedem nur zu oft begegnen, daß gleichartig behandelte Versuchsserien in der einzelnen Gewebeskultur recht verschiedene Ergebnisse aufweisen, allerdings im allgemeinen weniger, was den Beginn des Wachstums anbelangt, der meist ziemlich gleichmäßig erfolgt, als was den Eintritt oder Nichteintritt des Wachstums an sich betrifft. Diese Unsicherheit der Ergebnisse erschwert auch die Beurteilung jeglicher Maßnahme; die auf das Wachstum von Einfluß sein soll, so ungemein!

<sup>1)</sup> *Ebeling* berichtet unlängst bereits über 211 Passagen von Irisepithelien, die sich über einen Zeitraum von 18 Monaten erstrecken. Es wurde hierbei die neue Methode von *Carrel* verwandt, bei der in kleinen Zuchtgefäßen das ausgepflanzte Stück nicht mit dem gerinnenden Plasma überschichtet, sondern ganz oberflächlich in die eben gerinnende Plasmamasse eingebettet und dann mit Embryonal-extrakt bedeckt wird. Das Gewebe wächst dann auf der Oberfläche des Plasma-mediums; der ernährende Extrakt kann beliebig oft erneuert werden. (*Ebeling*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 90, Nr. 8. 1924.)

Zahlreiche Versuche mit Bindegewebs- und Epithelkulturen erwachsener Individuen haben gezeigt, daß die Züchtung dieser Gewebe auch in längeren Passagen durchaus möglich ist, wenn auch vielleicht die ersten Wachstumserscheinungen etwas später einsetzen als bei Verwendung embryonaler Gewebe. Hier kommen wir mit der Erklärung schon in Bedrängnis, wenn wir uns auf den Boden der *Carrel'schen* Trephonenlehre stellen, denn die embryonalen Wachs- bzw. Nährstoffe, die seiner Ansicht nach das explantierte Stück anfänglich in genügender Menge in sich trägt und die erst bei späteren Passagen durch Zuführung von außen ersetzt werden müssen, können wir doch bei Auspflanzung reifer Gewebe nicht erwarten. Und doch läßt sich hier auch bei Geweben alter Individuen ohne jeden Zusatz oft genug gutes Wachstum erzielen. Bei der Wundheilung und ebenso bei dem Vorgang des Wachstums im ausgepflanzten Gewebe ist die Störung im Gleichgewichtszustand innerhalb des Zellverbandes durch Setzung der Lücke der die Ausgleichsrichtungen erweckende Einfluß, und hier wie dort ist auch das Erhaltenbleiben des restlichen Zellverbandes die Voraussetzung für den geordneten Ablauf der Wiederherstellung im weitesten Sinne. Die Untersuchungen von *Fischer* (*Journ. exp. Med.* 38) haben erst unlängst zu dem Ergebnis geführt, daß der Versuch, einzelne, freigemachte Zellen der Gewebeskultur zur Vermehrung zu bringen, erfolglos blieb: ein Zellverband, sei es der des ausgepflanzten oder eines in der Kultur gewachsenen Stückes mußte gewahrt bleiben, wenn eine weitere Vermehrung erfolgen sollte. Es ist unmöglich, in diesem Zusammenhang die Problematik der Wachstumsbedingungen, Wachstumsreize, Wundhormone usw. aufzurollen; hier berühren sich Grundfragen der Biologie, hier grenzt das Tumorproblem an theoretische Erörterungen, die über das Thema hinausgreifen (*Burrows* u. a.).

Unser Explantationsmaterial wurde, soweit es nicht von verstorbenen Neugeborenen stammte, operativ gewonnen. Die Eierstöcke wurden gleich nach Herausnahme in ein keimfreies Schälchen gelegt und im Eisschrank, bzw. Eiskasten aufbewahrt. Die Anlegung der Kultur erfolgte am gleichen oder am folgenden Tage, außer in den Fällen, in denen die später kurz zu erwähnenden Versuche über die Dauer der Konservierbarkeit angestellt wurden. Schwierigkeiten hinsichtlich der Sterilität des operativ gewonnenen Materials sind wir so gut wie nie begegnet. Falls es sich nicht um bereits infizierte Organe handelte, erwies sich in fast 100 Prozent das Material als brauchbar, d. h. völlig bakterienfrei. Ein Foetus im 4. Monat wurde durch Exstirpation des schwangeren Uterus ohne weiteres steril gewonnen. Seine Organe dienten zur Herstellung des menschlichen Embryonalextraktes.

Unsere ersten Versuche galten der Feststellung, inwieweit sich auch der *Eierstock* älterer Individuen zur Zucht im Plasmamedium eignete

und welche Zellen unter diesen Umständen zur Vermehrung zu bringen wären. Es zeigte sich bald, daß das Alter der betreffenden Personen kein Hindernis für die Zucht abgab, denn einer unserer ersten Fälle, der ein Ovarium einer 45jährigen Frau betraf, zeigte üppig sprossendes Wachstum. Die Abb. 1 gibt den Eindruck wieder, den die wachsende Kultur nach 8tägiger Bebrütung im Brutschrank bei 37° darbot; man sieht von allen Seiten die charakteristischen weitverzweigten Sprossen aus dem eingepflanzten, von innen nach außen zunehmender Nekrose

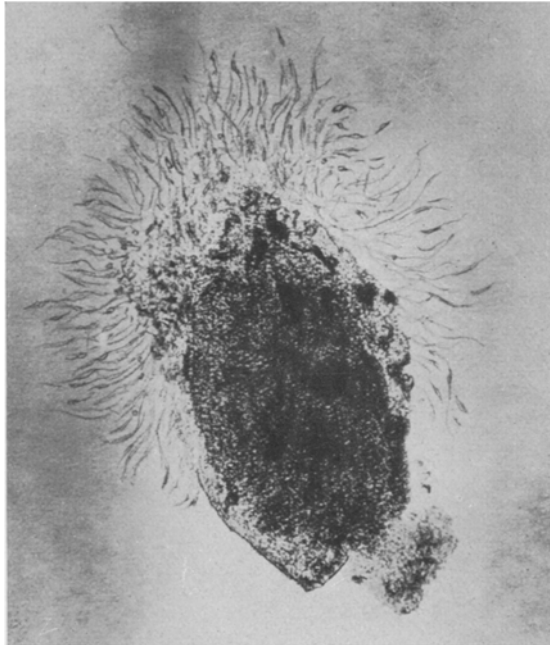


Abb. 1. Wachstumsvorgänge am ausgepflanzten Ovarium einer 45 jährigen Frau nach 8tägigem Brutschrankaufenthalt. In den oberen Abschnitten vorwiegend Fibroblastensprossung, rechts unten flächenhaftes (epitheliales) Wachstum. Zeichnung der lebenden Kultur bei schwacher Vergrößerung.

verfallenden Stück herauswachsen und die einfache Betrachtung ergibt auch ohne die Besichtigung des gefärbten mikroskopischen Präparates, daß es sich überwiegend um Bindegewebszellwucherung, um sich vermehrende und unter Vermehrung weit ins Medium vordringende Fibroblasten handelt. Dieser Typ des Wachstums ist ja von allen Bindegewebsbestandteile enthaltenden Explantaten hinreichend bekannt und so charakteristisch, daß sich jede weitere Beschreibung erübrigt. Rechts unten im Bilde sieht man im Gegensatz dazu flächenhaftes Wachstum, wahrscheinlich epithelialer Zellen. Die Abb. 2 zeigt

einen besonders günstigen Schnitt vom Pol einer wachsenden Kultur, der das gleichmäßige Vordringen der Sprossen nach allen Seiten tief ins Medium hinein erkennen läßt. Mitosen sind, wie bekannt, äußerst selten zu finden; der Vorgang der Kernteilung läuft bei diesen Zellen so schnell ab, daß der Querschnitt des Wachstumablaufes, wie man ihn beim Fixieren der Kultur zu sehen bekommt, nur ganz gelegentlich eine Teilungsfigur aufweist. Dennoch kann nicht bezweifelt werden, daß es sich hier um echtes Wachstum handelt und nicht etwa um einen Vorgang der Auswanderung, wie man ihn bei Organstückchen, die reichlich Blut- und Wanderzellen enthalten, zu Beginn des Aufenthalts

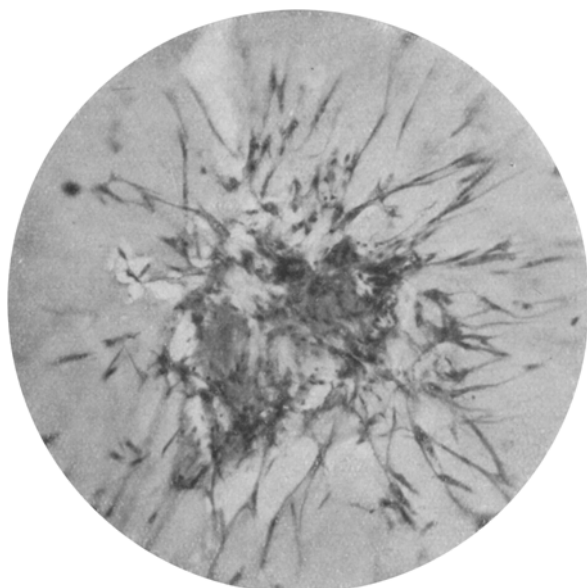


Abb. 2. Mikroskopisches Präparat einer 6 Tage lang bebrüteten Kultur von Ovarialgewebe. Ausschließlich wachsende Bindegewebszellen.

im Plasmamedium beobachtet. Die praktisch ad infinitum mögliche Fortführung der Bindegewebskulturen durch sog. Passagen, stellt ja die Frage echten Wachstums endgültig sicher. Wir selbst haben auch von derartigen Kulturen mit bestem Erfolge eine Reihe von Subkulturen bis zu 2 Monaten fortgesetzt.

Unser Bestreben ging natürlich dahin, außer dem unspezifischen, uncharakteristischen Bindegewebe auch die „spezifischen“ Zellen des Eierstocks zum Wachsen in der Kultur zu bringen. Seitdem man sich überhaupt mit der Züchtung epithelialer Elemente befaßt, steht man in jedem Einzelfall vor der Schwierigkeit, aus den Organstücken, die doch stets gemischt bindegewebig-epitheliale Anteile enthalten, den

einen und zwar den langsam wachsenden in „Reinkultur“ zu züchten. Im allgemeinen nimmt der schneller wachsende bindegewebige Anteil den epithelialen Gebilden die Möglichkeit der Vermehrung; nur wenn das Bindegewebswachstum gehemmt bleibt, kann auch aus gemischtgeweblich zusammengesetzten Organen das Epithel für sich allein sich vermehren und dann bei Passagekulturen sogar in Reinkultur weitergeführt werden. Könnte man bei der Anlegung von Kulturen von einzelnen Zellen ausgehen, so wäre dies Problem vielleicht etwas einfacher zu lösen, indem man durch weitgehende mechanische Zertrümmerung des Organstückes und Lösung des Zellverbandes auch einzelne Epithelien, z. B. Leberzellen gewinnen könnte. Nun ist aber, wie oben erwähnt, fest-

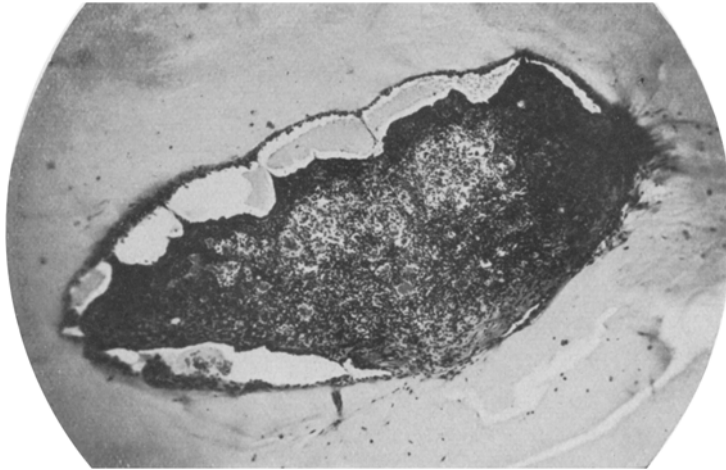


Abb. 3. Wachsendes Oberflächenepithel des Ovars einer Frühgeburt im 8. Monat. Die äußere Zelllage und die Verbindungsbrücken sind neugewachsene Zellen. 9 tägiger Brutschrankaufenthalt.

gestellt, daß eine einzelne Zelle in künstlicher Kultur nicht vermehrungsfähig bleibt, daß dazu ein wenn auch noch so kleiner Zellverband erforderlich ist. Falls nun nicht rein epitheliale Zellverbände zur Verfügung stehen, wie bei der viel geübten Kultur von Epithelien der äußeren Haut oder der Irisepithelien (*Fischer, Ebeling*), muß man erstreben, günstige räumliche Bedingungen zwischen den Bestandteilen des ausgepflanzten Stückes und dem Nährmedium zu erreichen, da wir bis heute Nährbodenzusätze, die das Wachstum einzelner Zellarten begünstigen und anderer hemmen, nicht kennen<sup>1)</sup>. In einer Reihe von Versuchen mißlang es denn auch gänzlich, außer dem Bindegewebe andere Bestandteile des Eierstocks zum Wachstum zu bewegen, bis die Auspflanzung des Eierstocks einer Frühgeburt zu dem gewünschten Er-

<sup>1)</sup> Erfolgreiche Versuche sind unlängst von *Krontowski* mitgeteilt. *Klin. Wochenschr.* 1924.

folge führte (Abb. 3 u. 4). Wie sich später im Schnitt herausstellte, war das ausgepflanzte Stück zum größten Teil mit dem Oberflächenepithel in unmittelbare Berührung mit dem umgebenden Medium geraten, während nur an kleineren Stellen des Umfanges Stromaanteile das Plasmamedium berührten. Die Folge dieser Lagerung war nun die, daß die Epithelien, wie sie das stets zu tun pflegen, das anstoßende Medium zu verdauen begannen, aber nicht so vollständig, daß etwa — wie so oft — eine völlige Herauslösung der Stücke erfolgt wäre. An einigen Stellen blieb die Berührungsfläche erhalten und an diesen Plasma-spangen entlang zog sich nun das wuchernde *Oberflächenepithel* (das sog.

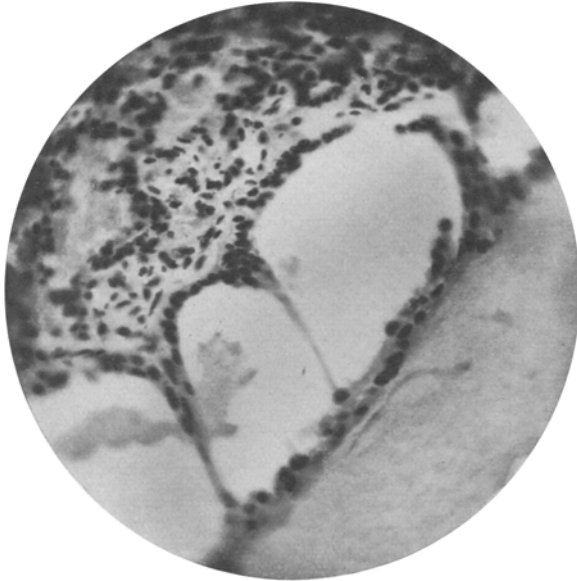


Abb. 4. Ausschnitt aus Abb. 3 bei stärkerer Vergrößerung.

Keimepithel) an dem Rand der selbstgeschaffenen Höhlung entlang, diese dadurch mit einer epithelialen Auskleidung versehend. Man sieht in dem Präparat an verschiedenen Stellen die etwas breiteren Pfeiler epithelialer Gebilde, die, von der ausgepflanzten Schicht ausgehend, sich dann in die die Höhlung auskleidende neugewachsene Schicht fortsetzen. Die besondere Anordnung der Kultur hat hier einmal durch die Schaffung von Wundflächen den Wucherungsreiz geschaffen, dann aber durch die Herstellung des Verdauungshofes der Neigung der Epithelien zur Auskleidung von Hohlräumen die Wege gewiesen. Es ist dies der eine Typ epithelialen Wachstums in der Kultur, der nur zumeist wegen zu erheblicher und allseitiger Verflüssigung des Mediums sich nicht ausbilden kann. Er unterscheidet sich ganz wesentlich vom Wachstums-

typus der Fibroblasten, die ohne Verflüssigung des Mediums tief in dasselbe hineindringen und nach allen Seiten ihre Ausläufer und Verzweigungen aussenden. Das eine Ende der Kultur zeigt deutlich das gegensätzliche Verhalten. Zur Zeit der Fixierung scheint der Prozeß epithelialen Wachstums eben durch die Auskleidung der Höhlung zu einem gewissen Anschluß gekommen zu sein. Bei genauester Durchmusterung fanden sich nur in zwei Präparaten der Serie einige Mitosen. Dasselbe Bild bot übrigens ein zweites Stück der gleichen Reihe. Die Zellen sind im allgemeinen etwas flacher als die entsprechenden Zellen der Oberfläche des Stückes selbst, die Kerne sind zum Teil etwas langgestreckt, ohne aber den Charakter des Bindegewebszellkernes anzunehmen. Von einer Entdifferenzierung kann hier jedenfalls keine Rede sein, denn in ihrer „Differenzierung“ unterscheiden sich die neugewachsenen Zellen nicht grundsätzlich von den Mutterzellen.

Ob die besonderen topographischen Verhältnisse im geschilderten Versuch allein maßgebend waren oder ob es an der Jugend des fraglichen Stückes lag, daß dies Ergebnis hier erzielt wurde, hingegen bei allen übrigen Auspflanzungen nicht, muß offengelassen werden. Gewiß wird beim Neugeborenen die Wachstumsneigung aller Zellen eine größere sein als beim älteren Kinde oder Erwachsenen, aber die besonderen Funktionen, die in der frühen Embryonalzeit dem Keimepithel möglicherweise zukommen, eben die Funktion als Keimepithel und nicht nur als Oberflächenepithel, besteht doch bei der Geburt ebenso wenig wie bei späteren Lebensaltern. Das Oberflächenepithel des Neugeborenen ist ja im eigentlichen Sinne des Wortes kein Keimepithel mehr, da es an der Bildung der Follikel keinen Anteil nimmt; wir können also auch aus dem Gelingen der Plasmakultur keinen Schluß hinsichtlich einer besonderen funktionellen Beziehung ziehen.

Als Gegenstück soll hier die den anderen Typus des epithelialen Wachstums verkörpernde Kultur vom *Amnionepithel* geschildert werden. Über die Kultur von Amnionepithel des Huhns hat unlängst *Lewis* (*Anat. record.* 26) berichtet. Die Kultur menschlichen Amnionepithels ist u. E. neu. Als Ausgangsmaterial diente die Nabelschnur des durch Uterusexstirpation gewonnenen Foetus im 4. Monat. Die Abbildung 5 zeigt ganz deutlich, daß das Nabelschnurgewebe selbst keine Neigung zum Wachstum zeigt, hingegen die ein- bis zweischichtige Epithelbekleidung in ganz enorme Wucherung geraten ist. Bei schwächeren Vergrößerungen kann man in einem Gesichtsfeld bis 5 Mitosen erkennen; die starke Vergrößerung, Abb. 6, zeigt zwei besonders schön ausgebildete Kernteilungsfiguren. Man sieht, wie sich im engsten epithelialen Verband die protoplasmareichen eng aneinandergedrängten Zellen in das Plasmamedium vorschieben. Das flächenhafte Wachstum tritt ganz besonders deutlich zutage, wenn man damit das sprossende der Abb. 1 vergleicht. Die einzelnen am weitesten vorgeschobenen Zellen zeigen, wie man dies stets beobachtet, Neigung zur Abrundung; die meisten anderen sind eckig und typisch im epithelialen Verbande. Auch hier findet sich wohl gelegentlich eine Abflachung und Streckung der Zellen eine Ver-

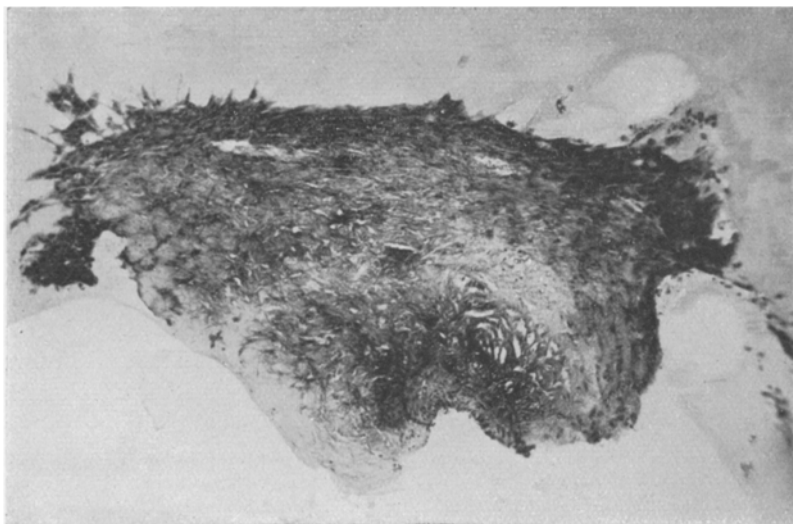


Abb. 5. Wachsendes Amnionepithel von der Nabelschnur eines menschlichen Foetus im 4. Monat. Man sieht die mehrfache Zellage und die ins Medium teilweise flächenhaft vordringenden Zellmassen. 7. Tag der Auspflanzung.

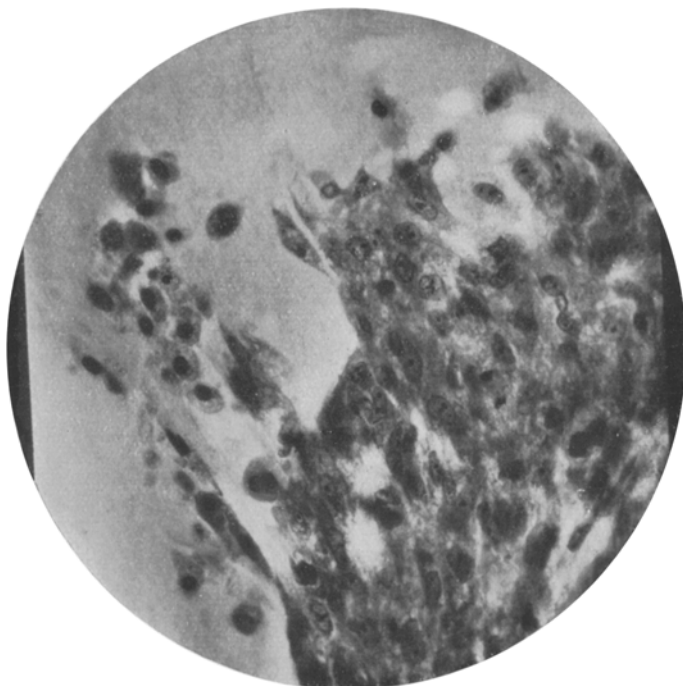


Abb. 6. Ausschnitt aus Abb. 5 bei stärkerer Vergrößerung. Im Gesichtsfeld mehrere Mitosen.

änderung der ursprünglichen Form — aber nicht das, was man als Entdifferenzierung bezeichnet, wie sie *Champy* bei fast allen seinen Kulturen epithelialer Gewebe (Niere, Leber usw.) beobachtet haben will. Gegen die Tatsache der Entdifferenzierung in der Kultur sprechen heute schon eine große Menge von Beobachtungen lange Zeit unverändert fortgezüchteter rein epithelialer Kulturen (*Ebeling* l. c.), Erfahrungen mit Reimplantationen usw.

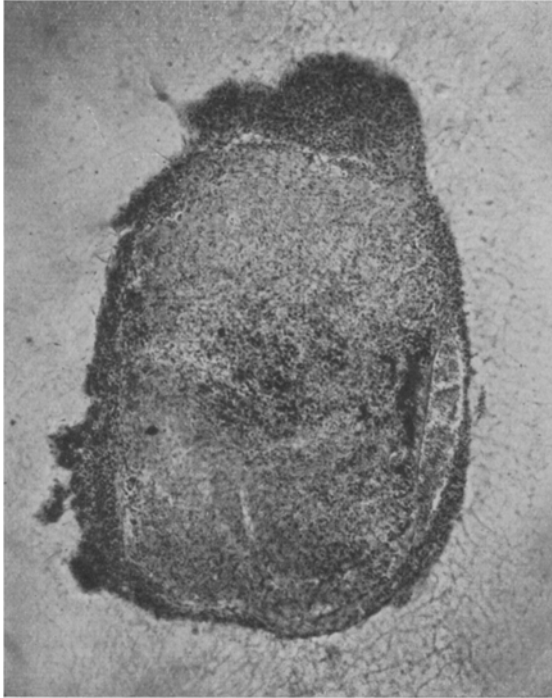


Abb. 7. Flächenhaft wachsende Granulosazellen (?) des Ovariums einer 35jährigen Frau. 10. Tag der Auspflanzung.

In Parenthese sei bemerkt, daß wir von demselben Foet Bindegewebe der Herzklappen in lange fortgesetzten Passagen züchten konnten, daß uns aber sowohl die Kultur der Placenta wie der Decidua mißlang. Wir möchten aber davon absehen, aus diesen Mißerfolgen Schlüsse auf allgemeine biologischen Eigenschaften dieser Gewebe zu ziehen. Vielleicht führt hier schon eine geringe Änderung der Versuchsanordnung zum Ziel.

Am meisten fesselte uns natürlich wegen der zahllosen mit diesen Fragen verknüpften Probleme der Anatomie und Physiologie der Ovarien die Möglichkeit, auch anderes Epithel, als das Oberflächenepithel zu züchten. Wir möchten hier mit aller Zurückhaltung einen Fall beschreiben, den man als einen gelungenen derartigen Versuch bezeichnen könnte (Abb. 7—9). Der Eierstock entstammt einer 35jährigen Frau. Die makro-

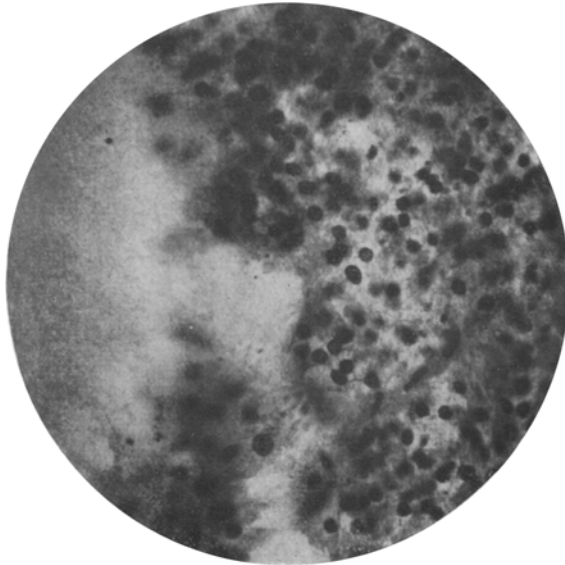


Abb. 8. Ausschnitt aus Abb. 7 bei stärkerer Vergrößerung.

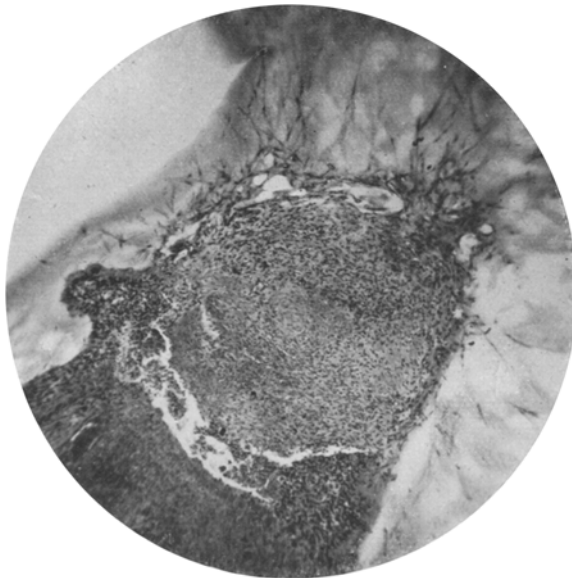


Abb. 9. Mikroskopisches Präparat aus einem anderen Stück des gleichen Ovariums wie Abb. 7 und 8. In den oberen Abschnitten Bindegewebswachstum, an der linken Seite flächenhaftes Wachstum in Form einer Nase von den gleichen Zellen wie in Abb. 7 und 8 dargestellt. Höchstwahrscheinlich Granulosaepithel. 9 tägiger Brutschrankaufenthalt.

skopische Betrachtung der wachsenden Kultur ließ in der gesamten Peripherie ein flächenhaftes Wachstum erkennen, das sich deutlich sowohl von der als Auswanderung bezeichneten Erscheinung wie ohne weiteres von der der Fibroblastensprossung unterschied; letztere macht sich nur an einigen Stellen bemerkbar. Das Präparat zeigt nun am Rande einen ganzen Saum von Zellen in wechselnder Breite, größtenteils geradlinig begrenzt, nur an einzelnen Stellen mit Ausläufern in die Umgebung versehen. Außerdem sieht man — aber in viel geringerem Grade — wiederum Wachstum von typischen Fibroblasten in schmalen Sprossen, zum Teil durch diesen Zellsaum hindurchwachsend. Die Zellen des Saumes zeichnen sich durch eine große Gleichmäßigkeit des runden, gut färbbaren deutlich strukturierten Kernes aus. Die Zellgrenzen sind nirgends genau zu verfolgen, vielmehr erhält man den Eindruck eines syncytialen Verbandes. Nach dem Aussehen des Kernes ähneln die Zellen am meisten den *Granulosazellen*, ohne daß man aber auf Grund der vorliegenden Präparate imstande wäre, sie einwandfrei zu identifizieren. Die Art der vorgenommenen Fixierung und Einbettung gestattet leider nicht einmal den Entscheid, ob es sich um lipoidhaltige Zellen handelt, etwa Abkömmlinge eingepflanzter Luteinzellen. Dies ist aber aus den verschiedensten Gründen wenig wahrscheinlich; auch finden sich in den Präparaten keine Lücken im Protoplasma, die auf größere extrahierte Lipoidmengen schließen lassen könnten. Die Untersuchungen über das Verhalten fettführender Zellen in der Plasmakultur stoßen ja überhaupt auf recht erhebliche technische Schwierigkeiten. Wir hoffen aber auch zu dieser Frage auf Grund einiger noch nicht abgeschlossener Versuche einiges beitragen zu können. Bei der Bedeutung des Lipidstoffwechsels für den Eierstock und in Anbetracht der vielen morphologischen und physiologischen Probleme, die sich gerade an die lipoidführenden Zellen knüpfen, reizt diese Frage ganz besonders zum Studium mit der Methodik der Explantation. Vorläufig möchten wir uns darauf beschränken, im geschilderten sowie im gleich zu schildernden Falle ein ausgedehntes flächenhaftes Wachstum epithelialer Anteile des eingepflanzten Ovariums anzunehmen, ohne heute auf weitere Einzelheiten eingehen zu können. Auch in diesem Fall (Abb. 8) zeigt die Abbildung deutlich zwei unterschiedliche Wachstumsformen des Explantates: einmal zahlreiche weit in das Medium vordringende Sprossen (Fibroblasten) und dann an einzelnen Stellen flächenhaftes Wachstum, besonders ausgeprägter an einer wie eine Nase herausragende Zellmasse.

Aus praktischen Erwägungen heraus wurde von uns untersucht, wie lange sich die *Wachstumsfähigkeit* des aus dem Körper entfernten Eierstocks *erhalten* ließe. Über die Einzelheiten dieser Untersuchungen, die besondere Art der Konservierung ist an anderer Stelle (Zentralbl. f. Gynäkologie) berichtet worden. Der Nachweis wurde auf 2 Wegen geführt, einmal durch die Anlegung einer Gewebeskultur in der angegebenen Methodik nach verschieden lange ausgedehnter

Aufbewahrung in einer von uns angegebenen Eiskiste und Beobachtung des Wachstums und dann durch Einpflanzung verschieden lange konservierter Kaninchenovarien auf neue Kaninchen. Die Konservierungsversuche können auf zahlreiche Vorgänge zurückblicken, beginnend von den grundlegenden Versuchen *Ehrlichs* über die Konservierung von Tumormaterial in der Kälte, die Versuche von *Lubarsch* und *Prochownik*, ferner die Versuche von *Hertwig* und *Poll*, die ebenfalls die Möglichkeit der Reimplantation prüften und bis zu 19 Tagen Konservierung erhalten fanden usw. Zur Beantwortung der praktischen Frage der Überpflanzbarkeit menschlicher Ovarien ist zweifellos diese Versuchsanordnung der Reimplantation die der Wahl und der andere Weg, die Prüfung der Erhaltung der Wachstumsfähigkeit hat nur bedingten Wert. Schalten wir hier doch alle die Gegenwirkungen aus, denen das in das lebende Tier eingepflanzte Gewebestück vom Wirt aus ausgesetzt ist — aber auch jede fördernde Wirkung, die ein ungestörter Kreislauf im Gegensatz zum erstarrten Plasmamedium zu bieten vermag. An anderen Organen ist von *Chuma* unter *Lubarschs* Leitung die Frage geprüft worden, ob sich Unterschiede zwischen der Überpflanzbarkeit und Auspendanzbarkeit konservierten Materials nachweisen lassen; im allgemeinen ließen sich die Organe etwas später noch reimplantieren als in der Gewebekultur zum Wachstum bringen. Die Konservierungsdauer ist in ausgedehnten Versuchen von *Nasu* an Speicheldrüsenepithelien bei 14tägiger Aufbewahrung bei 2–4° Kälte ihre Wachstumsfähigkeit in der Kultur nicht eingebüßt hatten. Unsere Erfahrungen mit Ovarialgewebe decken sich im allgemeinen mit diesen Erfahrungen; nach 14tägiger Aufbewahrung im Eiskasten (bei –12°) ließ sich wenigstens das Bindegewebe mühelos züchten. Epithelwachstum wurde nicht mehr erzielt, doch kann das nicht wundernehmen, denn die mitgeteilten Ergebnisse der Züchtung epithelialer Bestandteile der Eierstöcke sind bei zahlreichen Versuchen ganz selten erzielt worden, während Auspendanzungsversuche nach längerer Konservierung nicht sehr zahlreich vorgenommen wurden.

Zum Schluß erübrigt sich der Hinweis, daß das Mitgeteilte nur ein Anfang sein kann. Die weiteren Aufgaben, vor allem die der Reinzüchtung der einzelnen Gewebestandteile der Eierstöcke und das Erhalten in länger forgeführten Passagen, steht noch aus, ebenso das Angehen der zahlreichen physiologischen Fragen, von denen das Lipoidproblem oben schon angedeutet worden ist. Wenn wir uns trotz der Unabgeschlossenheit der Ergebnisse entschlossen haben, den von uns geführten Nachweis der Züchtbarkeit der genannten Gewebe zu veröffentlichen, so geschah dies vor allem deswegen, weil unsere weitere Zusammenarbeit aus äußeren Gründen eine längere Unterbrechung erleiden muß.

---