

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin. Vergleichend Pathologische Abteilung und Edwin Goldmann-Stiftung.)

Untersuchungen über Ernährung und Wachstum der Zellen erwachsener Säugetiere in Plasma unter Verwendung wohlcharakterisierter Zusätze an Stelle von Gewebsauszügen.

(Nebst einem Anhang über den Nachweis der Immunkörperbildung seitens sprossender retikulärer Zellen in der Gewebskultur.)

Von

Max H. Kuczynski, E. Tenenbaum und A. Werthemann.

Mit 20 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. August 1925.)

Die große Entwicklung, die die Gewebezüchtung in den letzten 2 Jahrzehnten genommen hat, läßt jedenfalls mit Klarheit erkennen, daß in geeigneter Weise aus dem Körperverbande gelöste Gewebsteile in eine geeignete Umgebung gebracht, imstande erscheinen, an einzelnen oder allen Bestandteilen Erscheinungen der Bewegung, der Ernährung und der Teilung ablaufen zu lassen. Eine sehr ausführliche zusammenfassende Studie über die Ergebnisse dieses Gebietes hat *Albert Fischer* kürzlich erscheinen lassen. Ebenso haben *O. Lubarsch* und *E. Wolff* vor einigen Monaten den gegenwärtigen Stand dieses Gebietes, im besonderen in seiner Bedeutung für die Pathologie, gewürdigt. Wir möchten daher hier besonders in Hinsicht auf das Schrifttum auf diese beiden Arbeiten verweisen.

Im April 1923 hatte einer von uns über experimentelle Untersuchungen über die funktionellen Beziehungen der Zellen im entzündlichen Gebiet berichtet. Dort wurde der Erscheinung nachgegangen, daß bei der Auspflanzung der Milz erwachsener Tiere eine anfänglichen Leukocytenauswanderung eine Auswanderung und Vermehrung von Histiocyten und Fibroblasten folgt.

„Dieses sekundäre Wachstum findet bei der normalen Anordnung in ‚erwachsenen‘ Systemen, also erst nach etwa 72 Stunden, zuweilen erst später statt. Ohne vorangegangene leukocytäre Auswanderung wird ein beträchtliches sprossendes Wachstum der zweiten Art, soweit meine Erfahrung reicht, stets vermißt. Mikroskopiert man das Stadium primärer Leukocytenauswanderung sorgsam lebend und fixiert, so überzeugt man sich leicht, daß um die einzelnen Leukocyten herum das Fibrin gelöst wird, ohne daß jedoch dieser Vorgang den störenden Umfang an-

nimmt, wie man ihn bei der Auspflanzung vieler epithelialer Organe, besonders vom Menschen her kennt. Die Kerne der Leukocyten werden eigenartig sproßartig gegliedert. Das Granuloplasma beschränkt sich auf den zentralen Teil innerhalb der Kernbuchtungen. Das periphere Protoplasma wird in blasigen Buckeln vorgetrieben. Nach 2 mal 24 Stunden bereits gehen eine große Zahl dieser Zellen zugrunde. Dieser Zusammenhang scheint mir grundlegendes Interesse zu bieten.“

Wir möchten auf diese Beobachtung hinweisen, weil sie den gleichen Gegenstand betrifft, der der Carrelschen Lehre von den leukocytären Trepochen zugrunde liegt (*Carrel 1924*). Es ist aus zahlreichen Arbeiten bekannt, daß auf die Dauer wachstumserhaltend nur gewisse Zusätze zu dem mehr indifferenten Plasma wirken, nämlich Embryonalextrakte und solche aus Knochenmark. *Kuczynski* brachte dies mit der vorher beschriebenen Erscheinung in einen gewissen Zusammenhang und bildete sich die Vorstellung, daß jene Auszüge dadurch wirksam würden, daß sie Fermente und abbaufähige Substrate vereint enthielten. Aus der vergleichenden Analyse der Vorgänge im Gewebsverbande des Körpers und in der Gewebskultur ergab sich die Aufgabe zu prüfen, inwieweit etwa aus der unzweifelhaften leukocytären Einwirkung auf das Wachstum mannigfacher Zellen gefolgert werden dürfe, daß peptische Abbaustufen des Eiweißes in geeigneter, sehr hoher Verdünnung überhaupt als wesentliche oder sogar alleinige Träger der Wirksamkeit der Auszüge angesprochen werden dürfen.

Zur besseren Verständigung sind einige Bemerkungen begrifflicher Natur vorteilhaft. Massenvermehrung durch Aufnahme von Wasser ist ebensowenig echtes Wachstum, wie etwa die Verschiebung von Zellen derart, daß sie von vielen Orten weggezogen werden und sich an einzelnen Punkten versammeln, die zuvor zellfrei waren. Vielmehr charakterisiert sich für uns in einfacher Form Wachstum als echte Vermehrung der geweblichen Masse unter Anwendung der typischen geweblichen Vorgänge, die zur Vermehrung ihrer Masse führen und mit ihr regelmäßig verbunden sind: In erster Linie also fortgesetzte mitotische Zellteilungen. Wie *Th. H. Morgan* in seiner älteren ausgezeichneten experimentellen Zoologie bereits ausgeführt hat, hängt das Wachstum in einem gewissen Umfange von der Nahrungsmenge ab. Ohne jegliche Ernährung wird jedenfalls das Wachstum schnell zu einem Stillstand gelangen. Andererseits wissen wir — und die Kenntnisse hiervon sind in den beiden letzten Jahrzehnten noch erheblich gewachsen, daß eine Reihe von Stoffen oder Wirkungen in größten Verdünnungen oft genug die Ausnutzbarkeit und den Wertgrad gegebener Ernährung wesentlich beeinflussen. Sicherlich aber stellt uns auch in dem Fragengebiet der Gewebskultur die Ernährung der Zellen eine Aufgabe von ganz zentraler Bedeutung, deren genaue Beantwortung von Fall zu Fall überhaupt erst gestattet, andere für Leben und Wachstum notwendige Faktoren gesondert herauszuheben und zu erkennen.

Wir möchten daher in diesem Zusammenhang darauf verzichten, auf die mannigfaltigen Versuche mit embryonalen und Gewebs- bzw. Leukocytenauszügen, auf die Thermolabilität der wirksamen Faktoren, die Abschwächung durch Filterung und ähnliches einzugehen. Ebenso-wenig wollen wir hier auf die Unterscheidung von Trephonen, ernährenden Stoffen und Hormazonen, wachstumsanregenden Stoffen, wie sie von *Carrel* getroffen worden ist, eingehen (vgl. hierzu *Lubarsch* und

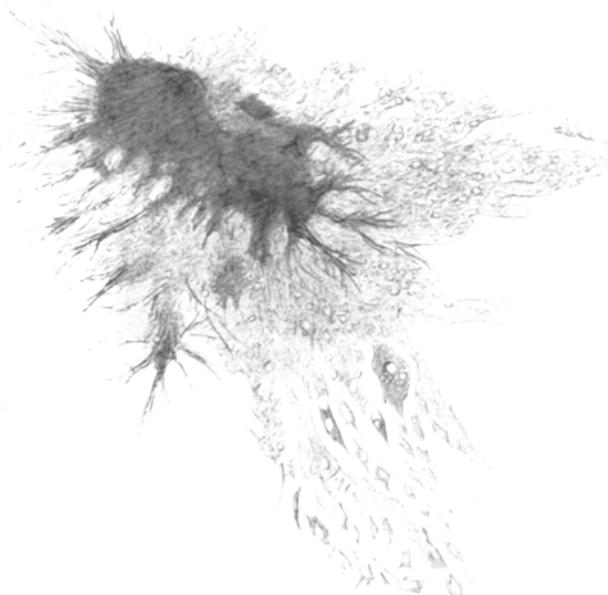


Abb. 1. Milzkultur 8186. 8 Tage bebrütet in P.G.N.*-Plasma. Starkes Wachstum reiserförmig verästelter Fibroblasten und teils hautartig zusammengeschlossenes, teils in lockeren Verbänden erfolgtes Wachstum histiocytärer Zellen, unter denen einzelne durch ihre starke Größe sowie auch durch feine Vakuolisierung auffallen. Zeiss-Binokular a 1 mit Okular 3 Lebendbeobachtung. $\frac{1}{4}$. Alle Bilder entstammen Präparaten, die den in Paraffin eingebetteten und reihenweise in etwa $5\text{ }\mu$ dicken Schnitten aufgeschnittenen Blöcken entstammen. Die Fixierung erfolgte stets in Heidenhains *Susa*-Gemisch, die Färbung außer bei den Bildern mit der neuen Giemsaschen Lösung. Die Hervorhebung der erstrebten Gegensätze geschah mit Hilfe des Mikrofiltersatzes der Augsburger Lifa-Werke. Optische Bank und Vertikalkamera: Zeiss.

Wolf). Es ist außerordentlich schwer, auf Grund des vorliegenden Materials eine klare begriffliche Trennung in der angedeuteten Richtung vorzunehmen. Durch Jahre hindurch fortgesetzte analytische Untersuchungen unter mannigfach veränderten Bedingungen des pathologischen Lebens haben uns stets wieder vor Konstellationen geführt, deren wesentlich gesicherter Bestandteil funktionelle Beziehungen zwischen geänderter Ernährung und Formbildung, insbesondere morphologischen Wiederherstellungen darstellt. Insbesondere sind im Rahmen der ungestörten

*) P.G.N. = Pepton-Glykogen-Normosal.

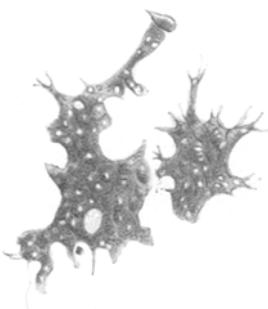
organismischen Einheit die Beziehungen der Säftekonzentration und der örtlichen Gefäßinnervation von maßgeblichem Einfluß für den Gleichgewichtszustand der Gewebe. Die verschiedenen pathologischen Erfahrungen zeigen uns mit aller Klarheit, daß plötzlich einsetzende Wachstumsvorgänge, soweit wir bis heute sehen — wenn wir die ganz ungeklärte Frage des Wesens der Geschwülste ausschließen — mit plötzlichen Änderungen der Zusammensetzung der Säfte und bzw. oder mit vasomotorischen Änderungen einhergehen. Während im Gegensatz zu gewissen Vorstellungen *Rickers* das zeitliche Verhältnis vasomotorischer Reaktionen und chemischer Verschiebungen unseres Ermessens nicht in allen Fällen derart ist, daß die nervöse Gefäßreaktion vorangeht, vielmehr auch der umgekehrte Vorgang oft genug verwirklicht

ist, ist es doch sicher, daß die formativen Vorgänge erst eine Folge dieser so entstandenen Gleichgewichtsstörung sind. Das Beispiel der sog. akuten Halbmondbildung bei der glomerulären Reaktion („Glomerulo-Nephritis“) ist gerade für den Pathologen sehr eindrucks-voll (Kuczynski). Verlegt eine Schlinge des geblähten glomerulären Knäuels den Harnpol der Glomeruluskapsel, so kann die aus dem Glomerulus austretende Flüssigkeit nicht in das Gangsystem abfließen. Dann und nur dann kommt es unter ganz schnell einsetzenden zahlreichen Kernteilungen an den Deckzellen der Kapsel zu akuten Halbmondbildungen. In Übereinstimmung mit anderen Erfahrungen zeigt dies, daß bestimmte Änderungen des Chemismus der Zelle als „Teilungsreiz“ wirken. An dem herangezogenen Beispiele läßt sich des weiteren in Fortführung

Abb. 2. Milzkultur 8184. 8 Tage bebrütet in P.G.N.-Plasma. Bei der Anlage der Kultur wurden an verschiedenen Stellen vereinzelte Zellen, sei es des Serosaüberzuges oder histiocytären Charakters am Glase abgestreift. Sie sind zu kleinen Zellrasen fast epithelartigen Gefüges ausgewachsen. Optik wie gewöhnlich. Lebendbeobachtung. $\frac{1}{4}$.

der bereits 1923 mitgeteilten Beobachtungen der Nachweis führen, daß es wiederum gestaute Stoffe des Eiweißabbaues sind, die hier teilungs-reizend wirken.

Dabei ist es sehr bemerkenswert, daß in allen solchen Fällen eine Änderung der Ernährung der Zelle, wie sie sich aufs Deutlichste in ihrer Struktur zu erkennen gibt, der Teilungsleistung vorangeht. Diese Verbindung von Ernährung und Wachstum entspricht nicht allein wohl erwogenen Vorstellungen der älteren Biologen, sondern hier finden sich zahlreiche Erfahrungen auf dem Gebiete des pathologischen Lebens zwanglos ein. Sollten sich die Gurwitschschen Vorstellungen von der Existenz mitogener Strahlen wirklich bewähren, so könnte ihr uns noch sehr zweifelhaftes Vorhandensein sich lediglich den eben kurz um-



rissenen Zusammenhängen einordnen. Zu erklären bliebe ja vor allem noch ein plötzliches Einsetzen von Zellteilungen in einem ruhenden Gewebe nach Art des Geschilderten unter der Einwirkung chemischer Änderungen der inneren Umwelt. Bei derartigen Vorgängen innerhalb des Gewebes wurde daher für die Änderung im Verhalten der Zellen der kurze Begriff der Aktivierung eingeführt.

„Aktivierung bedeutet die starke Anfachung aller Zelleistungen über das Maß des minimalen Ruhestoffwechsels unter gleichzeitig damit auftretenden charakteristischen gestaltlichen Veränderungen: Turgorzunahme, wachsende Basophilie des Zelleibes, oft verbunden mit feinen Körnelungen des stark geschwollenen Plasmas, Wasseraufnahme seitens des Kernes, der dadurch in seiner Struktur ‚gelockert‘ wird, Speicherleistungen von gegen das normale Maß gesteigertem Umfange, schließlich mitotische Teilungen. Möglichenfalls lösen sich gleichzeitig die Zellen aus ihrem Verbande, um je nach den besonderen Verhältnissen ihres Milieus in gerichtete Bewegungen einzutreten oder als abgerundete Zellen an Ort und Stelle liegen zu bleiben.“ (Kuczynski.)

Wenn wir damit Ernährung und Wachstum in einen ziemlich engen Zusammenhang bringen, so ist damit keineswegs gesagt, daß es nicht Stoffe und Wirkungen gäbe, welche die Stärke dieser Vorgänge wesentlich zu steigern imstande sind.

Das Gewebe in der Kultur ist aus dem Zusammenhang des Organismus herausgerissen. Einen Kreislauf gibt es nicht. Änderungen des chemischen Gleichgewichtes sind insofern immer vorhanden, als die Gewebe durch Adsorption Stoffe zu speichern vermögen, welche nach der Verpflanzung des Gewebes in das Plasma notwendig einem Ausgleich zustreben. Für den Pathologen bilden die Vorgänge der Aufsaugung des Amyloids ein recht gutes Beispiel dieser sonst kaum sicht-

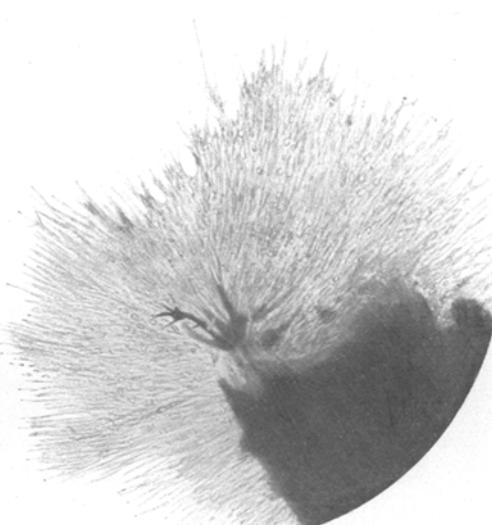


Abb. 3. Milzkultur 8184. 9 Tage bebrütet in P.G.N.-Plasma. Gewebsstück mit charakteristischem histiocytärem Wachstum nicht besonders üppigen Charakters. Sprossende Fibroblasten spärlich. Lebendbeobachtung mit der gewöhnlichen Optik. $\frac{2}{3}$.

baren und auch mikrochemisch schwer faßbaren Vorgänge. Die pathologische Physiologie der Nephritiden zeigt in bekannter Weise, wie sehr der Körper darauf eingestellt ist, die umlaufenden Säfte auf Kosten der Gewebe möglichst auf dem Zustande physiologischer Gleichgültigkeit zu erhalten. Im Gewebe selbst aber wird durch Adsorption an den Faserapparat, durch gleichzeitige Bindung von Wassern und Salzen, durch Quellungsvorgänge und durch Zelltätigkeit wiederum bewirkt, daß das Gewebe selbst wenigstens im Rahmen des Möglichen in einem für sein Leben erforderlichen Zustand physiologischer Gleichgültigkeit gehalten wird.

Manche Überlegungen in explantativen Arbeiten wirken diesem feinen Zusammenspiel der Kräfte im Organismus gegenüber etwas roh und physiologisch unbekümmert, zumal wenn wir noch an die hier kaum in Rechnung gestellte Vasmotorik denken, deren Spiel, Änderung und Beeinflussung aus den Arbeiten besonders zahlreicher Kliniker und Physiologen neben den bekannten Arbeiten *Rickers* hervorgeht (*Ebbecke, Krogh, Jadassohn, v. Török u. a.*).

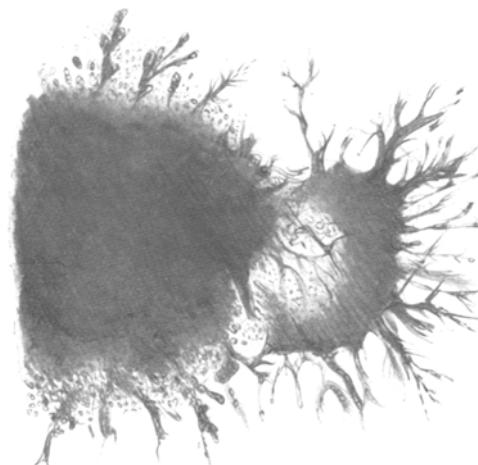


Abb. 4. Milzkultur 8194. 9 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Starke, vorwiegend fibroblastische Wucherung mit charakteristischen, beweglichen, baumartig verästelten Ausläufern. Lebendbeobachtung mit gewöhnlicher Optik. $\frac{1}{10}$.

des intermediären Umsatzes im Blute kreisen. Der Organismus entzieht auf verschiedene Weisen dem Kreislaufe wirksame Stoffe, um sie in den Ablagerungsstätten der Gewebe in nicht hinreichend bekannter Form sich zu weiterer Verfügung zu halten. Wenn wir also die physiologisch aktivierende Bedeutung irgendwelcher Stoffe zu prüfen beabsichtigen, so ist es jedenfalls unerlässlich, im Rahmen derjenigen Verhältnisse zu bleiben, die noch physiologisch sind. Wir dürfen keineswegs vergessen, daß dem ausgepflanzten Gewebsstück durch den mangelnden Umlauf und die mangelnden Ganzheitsbeziehungen (organismischen Korrelationen) die Möglichkeiten sehr weitgehend genommen sind, ähnlich wie der lebende Organismus es vermag, giftige Häufungen von Stoffen auf die verschiedenen Weisen schnell aufzuheben. Wenn wir im besonderen an die Verdauung des Eiweißes denken, so kann es uns

Wir wissen, in welch geringen Häufungen physiologisch wirksame Stoffe

keineswegs wundern, daß *Burrows* und *Neymann* mit 2—5 proz. Peptonslösungen gar keinen Erfolg hatten, und daß Aminosäuren eine starke Giftigkeit erwiesen. Diese Versuche mußten daran scheitern, daß die Forscher unter nicht genügender Beachtung der Eigentümlichkeiten aus gepflanzter Gewebsstücke unregulierbar unphysiologische Verhältnisse schufen.

Die von uns geübte Technik des gewebskulturellen Verfahrens ist eine denkbar einfache und in ihren Grundzügen bereits in Arbeiten des Instituts (*Kuczynski*, *Mitsuda* u. a.) kurz beschrieben. Der wesentliche

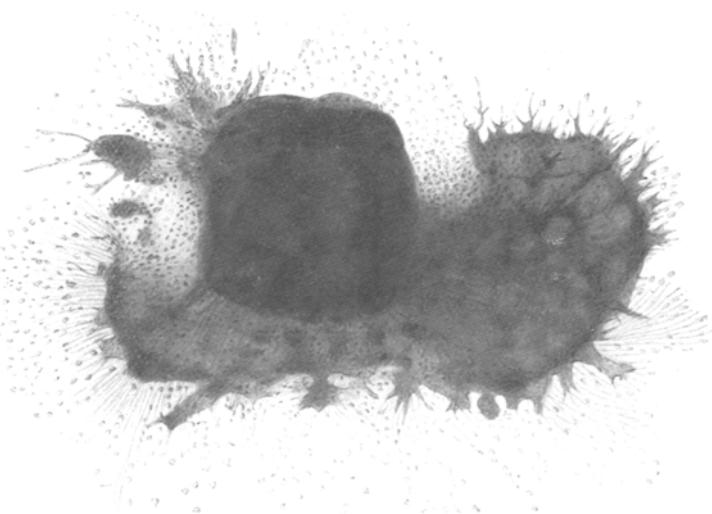


Abb. 5. Milzkultur 8186. 11 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Stärkste gewebsartige Wucherung fibroblastischer Zellverbände mit zahlreichen amoiboidbeweglichen Ausläufern in das Plasma, das ein dünneres Feld eingelagerten Rundzellen erkennen läßt. $\frac{2}{3}$.

Zug des verwendeten Kulturgefäßes, der Plasmakammer, besteht in ihrem verhältnismäßig großen Rauminhalt, der es gestattet, kleinste Gewebsstückchen in Plasmamengen von 1—3 ccm Masse zu betten, je nach der Schichtdicke, die man im besonderen Falle bevorzugt. Ebenso gestattet uns der einfache Bau dieser Schalen nach Belieben Überschichtungen vorzunehmen. Die günstigen Mengenverhältnisse gestatten es uns, Gewebe bis zu 4 Wochen ohne irgendeinen Wechsel oder eine Änderung am System vorzunehmen, zu bebrüten. Die Möglichkeit reihenweiser Weiterführung unterscheidet sich auch bei dieser Anordnung nicht von der bei andersartiger Technik. Leider war es uns bisher aus Gründen der Verbilligung nicht möglich, die Grundscheiben unserer Kammern so weitgehend zu glätten oder von vornherein aus

Spiegelglas zu wählen, daß die Anwendung stärkster Systeme auch auf die lebende Kultur möglich wäre. Diese Beobachtungen wurden daher meist mit dem binokularen Operationsmikroskop von Zeiß oder mit mittleren Mikroskopobjektiven vorgenommen. Die so erzielten Ergebnisse wurden in den meisten Fällen durch eine histologische Aufarbeitung der fraglichen Kulturen ergänzt. Hierbei wurden die mit dem umgrenzenden Plasma und dem Wachstum herausgeschnittenen Gewebs-

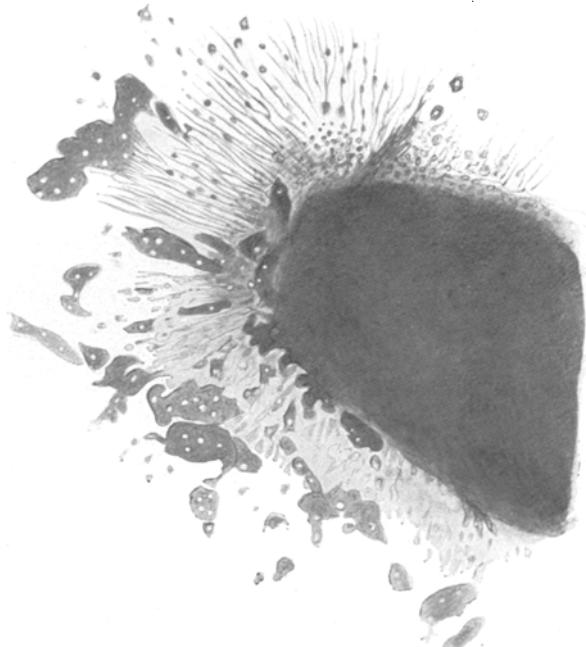


Abb. 6. Leberkultur 8244, 18 Tage in P.G.N.-Plasma mit Trz.-Zusatz bebrütet. (2,8 einer mit 0,25% Trz. versehenen P.G.N.-Lösung und 7,2 Blut.) Spärliches Wachstum langgestreckter Zellen nach Art fibroblastischer Zellen, sowie Entwicklung von Gruppen sehr großer zu flächenhaften Verbänden zusammenretender Zellen mit trübem Plasma und verhältnismäßig kleinen, klaren hellen Kernen. Diese Zellen erweisen sich auch im abgetöteten und gefärbten Zustande als histiozytäre-monocytaire Elemente, deren Abgrenzung gegen Gefäßwandzellen uns nicht mit Sicherheit möglich ist. Gewöhnliche Optik. Lebendbeobachtung. 1/1.

stücke meist in Paraffin eingebettet und in lückenlose Serien zerlegt, die weiterhin nach *Giemsa* gefärbt wurden. Natürlich traten daneben auch andere technische Aufarbeitungen.

Zu der Anlage der Kulturen und ihrer Fortführung dienten feine Instrumente, wie sie auch der Augenarzt vielfach verwendet. Sie werden in regelmäßigen Abständen ebenso wie vor der ersten Benutzung frisch geschliffen und gut vernickelt, so daß sie möglichst scharf sind. Wir haben stets den Eindruck gewonnen, daß jede Form der Quetschung für das gesamte zu erzielende Wachstum äußerst nachteilig ist. Die

Instrumente werden jeweils etwa 1 Stunde vor der Inanspruchnahme in ausreichend tief mit 90 proz. Alkohol gefüllte Gefäße gestellt, so daß man sie ohne Gefährdung ergreifen kann und sie durch flüchtige Be- rührung mit einer Flamme von ihrem Alkohol zu befreien vermag. Nach Eintauchen in ein steriles physiologisches Salzgemisch sind sie sodann in voller Schärfe und steril gebrauchsfertig.

Als physiologisches Salzgemisch verwenden wir bereits seit Jahren Normosal, da sich uns dies *Straubsche Präparat* entsprechend den Erfahrungen der Pharmakologen als bei weitem allen anderen Zubereitungen überlegen erwiesen hat. Für alle anderen Einzelheiten des technischen Vorgehens sei auf die zuvor erwähnten Arbeiten aus unserem Institut verwiesen.

Die hier wiedergegebenen Versuche beziehen sich fast ausnahmslos auf die Organe halb erwachsener Meerschweinchen von 250—300 g Gewicht, während meist etwas ältere Meerschweinchen von 300 bis 400 g zur Gewinnung des Plasmas dienten. In sehr vielen Fällen konnten wir die Organe fleckfieberkranker Tiere verwenden, die durch die Fortführung unserer Fleckfieberstudien dauernd zur Verfügung standen. Wesentliche Unterschiede gegenüber dem Verhalten der Organe gesunder Tiere konnten im Hinblick auf die darzustellenden Ergebnisse nicht festgestellt werden. Ohne die Heranziehung des Fleckfiebermaterials wäre es uns aber nicht möglich gewesen, die hier dargestellten Untersuchungen in mehreren Hunderten von parallelen Reihen durchzuführen, um uns von den bekannten Zufälligkeiten freizuhalten, die jedem biologischen Verfahren anhaften.

Es besteht im Augenblick im allgemeinen die Neigung, die Ergebnisse der Kulturverfahren an den sog. ewigen Kulturen amerikanischer Forscher zu messen. Dies ist zweifellos insofern berechtigt, als jedes Gewebe möglichenfalls über einen derartigen Gehalt an Vitaminen und ähnlichen in geringen Mengen wirksamen Stoffen verfügt, daß er in Verbindung mit sonst ausreichenden Lebensbedingungen eine längere Zeit Leben und Wachstum gestattet, das eigentlich durch die von uns geschaffenen Bedingungen nicht in vollem und ausreichendem Maße gewährleistet wäre.

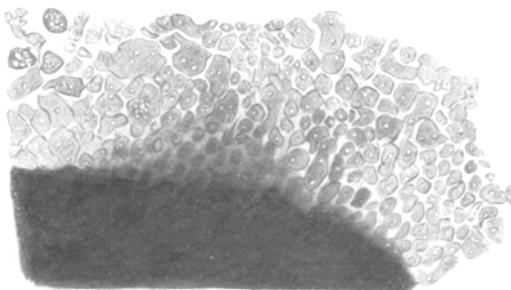


Abb. 7. Leberkultur 8828. 18 Tage in P.G.N.- mit einem Zusatz von 1 Tropfen Ei-Ringer-Aufschwemmung aa, auf etwa 2 ccm des Plasmagemisches bebrütet. Langsames Auftreten eines immer größer und dichter werdenden flächenförmigen Mantels, riesenhafter monocytierer Zellen, langsamer Beweglichkeit bei Fehlen anderer Wachstumserscheinungen. Am 19. Tage trübten sich einige dieser Zellen und zeigten gröbere Blasen. Am 20. Tage starb diese Kultur ab. ^{2/3}.

Man darf sich aber nicht von einem begreiflichen Stolz auf die Ruhmesleistungen eines neuen Forschungsgebietes dazu verleiten lassen, dogmatische Forderungen aufzustellen, die gerade systematischer Vertiefung der Aufgaben und ihrer Bewältigung im Wege stehen. Sicherlich lassen sich grundsätzliche Beobachtungen über Lebenderhaltung und Wachstum zunächst auch ohne die Kette zahlloser Tochterkulturen anstellen. Dies gilt im besonderen Umfange, wenn man nach unserer Weise so vorgeht, daß man die Wirkung verschiedener Nährgemische mit der einfach verdünnter Plasmen oder mit der in ihrer Wirksamkeit

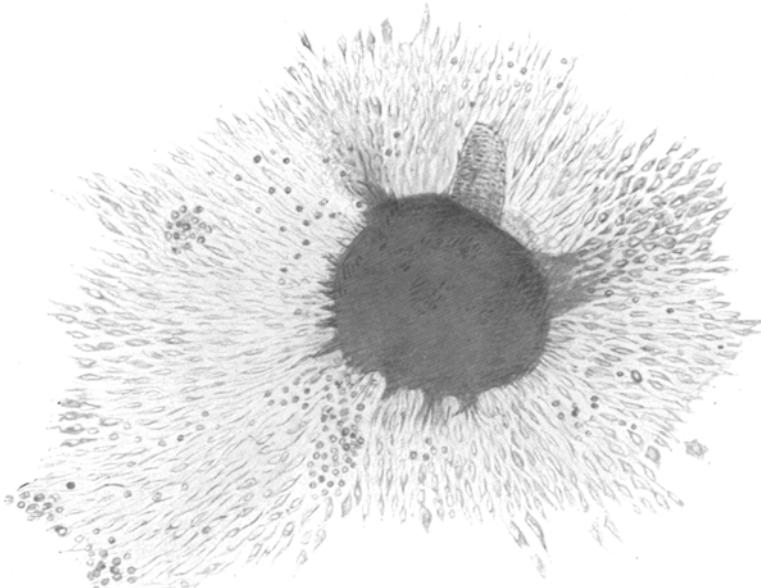


Abb. 8. Leberkultur 8223. 10 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Vom 4. Tage an einsetzende lebhafte Vermehrung monocyttärer Zellen, die in locker geschlossener Zone weithin das Gewebe umgeben. Einige Epithelzapfen beginnen vom 7. Tage etwa ab aus der Oberfläche auszusprossen. Lebendbeobachtung mit gewöhnlicher Optik. $\frac{1}{4}$.

allgemein anerkannter Auszüge vergleicht. Immerhin haben wir der berechtigten Forderung fortgesetzt beobachteten Wachstums auch bereits im Rahmen der hier mitgeteilten Versuche wenigstens soweit Rechnung getragen, daß wir Gewebskulturen bis zur dritten Passage und über 60 Tage in ihren Lebensäußerungen verfolgt haben. Jedoch sollen die hier mitgeteilten Beobachtungen im wesentlichen als Grundlage zu einem weiteren systematischen Ausbau nach dieser und anderen Richtungen hin dienen.

Am Anfang unserer Beobachtungsreihe standen vergleichende Untersuchungen über zusatzlose Kulturen von Milz und Leber des halb er-

wachsenen Meerschweinchens im Plasma erwachsener Meerschweinchen, verglichen mit den gleichen Kulturen unter Zusatz von Embryonal-, Leukocyten- und Knochenmarksextrakten. Diese Versuche haben naturgemäß nichts Neues zutage gefördert. Sie dienen lediglich als Grundlage für die Beurteilung der weiteren Anordnungen mit chemisch wohlcharakterisierten Zusätzen. Dabei mögen wir von der Tatsache ausgehen, daß die Milz ohne Zusätze von Extrakten in der von uns früher beschriebenen Weise nach anfänglicher Leukocytenauswanderung in das

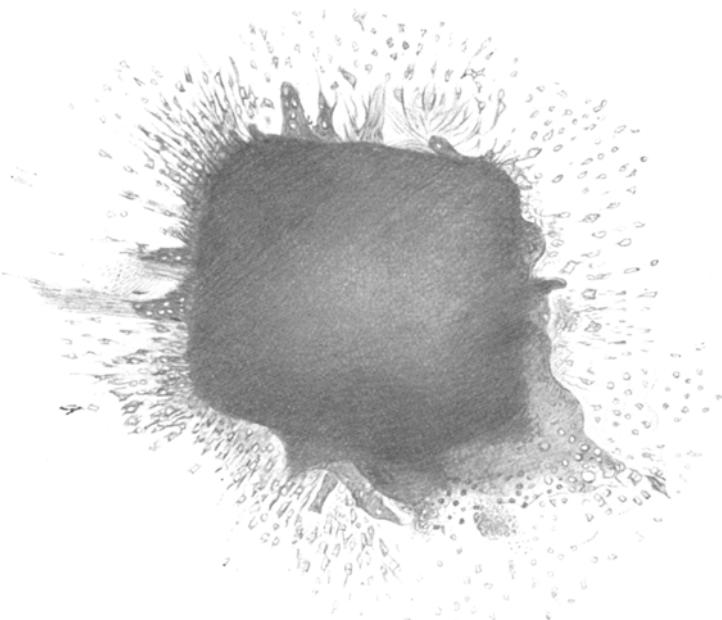


Abb. 9. Leberkultur 8256. 7 Tage in P.G.N.-Zucker-Plasmagemisch mit Insulin bebrütet. Neben einer noch mäßigen Wucherung histiocytärer Zellen erkennt man einen epithelialen neuen Randsaum an dem ausgespflanzten Gewebe, von dem aus sich auch einzelne zapfen- oder flächenförmige Fortsätze epithelialen Charakters in die Nachbarschaft vorschieben. Lebendbeobachtung mit gewöhnlicher Optik. $1/1$.

Plasma ein später einsetzendes verhältnismäßig spärliches Aussprossen bindegewebiger Elemente erkennen läßt, unter denen Fibroblasten bekannter Art überwiegen, während abgerundete mononucleäre Zellen des histiocytären Types zwar reichlich vorhanden sind, aber nirgends in großartig gefügten Schichten und in geschlossenem, schnellem Vordringen auftreten. Gefäßsprossen sind selten. Besonders die fibroblastischen Zellen fallen durch die Zartheit ihres Leibes und ihrer Ausläufer auf. Die Leber zeigt demgegenüber ein viel ungünstigeres Verhalten. Wiederum ohne Anwendung von Auszügen läßt sie meist nur

ein sehr spärliches Aussprossen kümmerlicher fibroblastischer oder endothelartiger Zellen erkennen, was meist räumlich wie zeitlich sehr beschränkt ist und wohl sicher z. T. damit im Zusammenhang steht, daß die Leber nicht über die Hilfstruppen der Leukocyten verfügt. Aus diesem Grunde wohl sieht man hier auch kaum Mitosen, während solche besonders an den Fibroblasten der Milzkulturen wenigstens in den ersten drei Tagen ihres Aussprossens nicht selten sind, ohne allerdings hohe Grade von Häufigkeit zu erlangen.

In zusätzlichen Leberkulturen stirbt im allgemeinen das Epithel schnell ab und zeigt nur als verschwindende Ausnahme ganz kümmerliches Wachstum vom Gangsystem ausgehend.

Diese jedem Untersucher geläufigen Verhältnisse bilden die Bezugsbasis unseres weiteren Vorgehens.

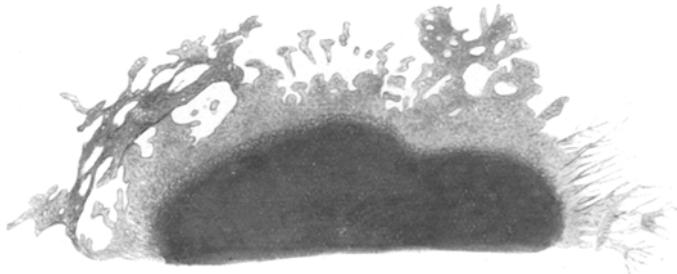


Abb. 10. Leberkultur 8332. 20 Tage in P.G.N.-Zucker-Insulinplasma gezüchtet. Charakteristisches aber nicht besonders reichliches Wachstum von Leberbalken, die sich flächenförmig in gitterartigen Bildungen ausbreiten und zum Teil kugelschalenartig Bezirke umwachsen, in denen das Plasma gelöst ist. Daneben ist das fibroblastische Wachstum unbedeutend und auf einzelne Stellen beschränkt. Lebendbeobachtung bei gewöhnlicher Optik. Man vergleiche das Photogramm des Schnittpräparats. 2/3. (Abb. 13 u. 14.)

Solange man überhaupt mit Plasma als Grundlage des Systems arbeitet, muß man sich darüber klar sein, daß man niemals reine Wirkungen bestimmter, etwa der zugesetzten Stoffe, zu Gesicht bekommt. Insbesondere ist stets mit dem Vorhandensein einer gewissen Menge von Blutzucker zu rechnen, wie es auch nicht gelingt, im Plasma vorhandene Fettstoffe im weitesten Sinne durch irgendwelche Eingriffe in zuverlässiger Weise zu entfernen. Wir haben daher bisher unsere Zusätze stets auf der Grundlage eines annähernd gleichmäßigen Plasmas entworfen und demgemäß versucht, im Salz- und Zuckergehalt nichts zu verändern. Das variierte Element unserer Zusätze ist „Pepton“. Da wir wissen, daß die tierische Zelle auf die äußere Zufuhr von Aminosäuren und ihren Verkettungen angewiesen ist, erscheint es klar, daß jegliches künstliche Ernährungsgemisch über einen gewissen Gehalt an Eiweißbruchstücken verfügen muß, um seinen Aufgaben zu genügen. Die dafür wesentlichen Gesichtspunkte, insbesondere auch der Voll-

ständigkeit an aromatischen Aminosäuren, bestimmten uns zur Wahl eines Pepsin-Fibrin-Peptons nach dem Typus des Peptons „Witte“, wie es nach den Vorschriften der 5. Ausgabe des Deutschen Apotheker-

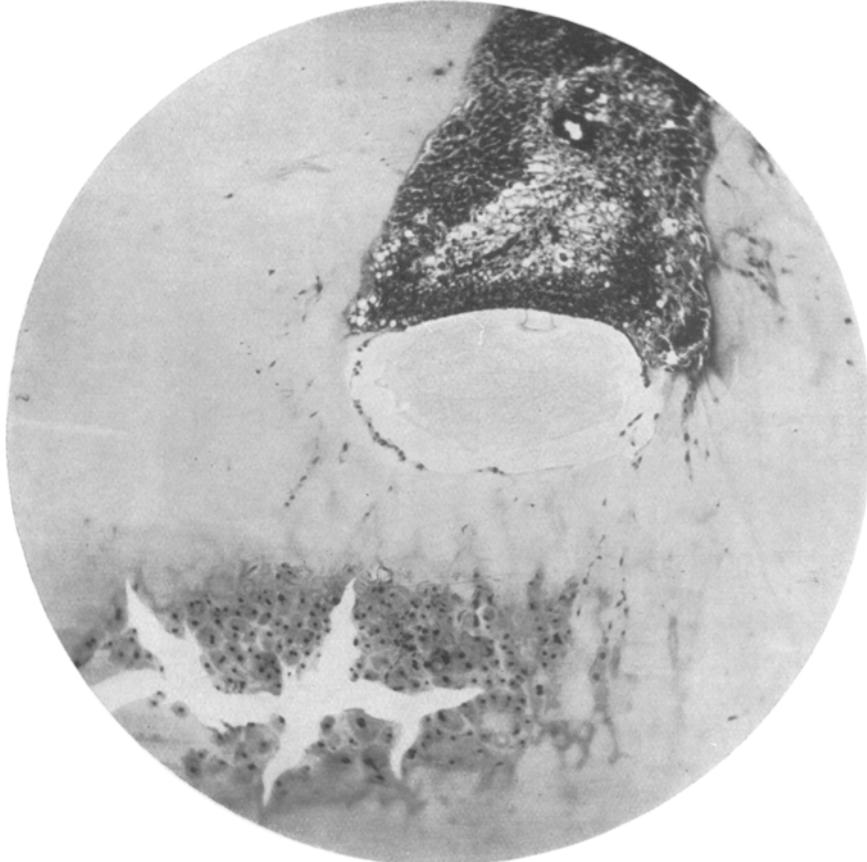


Abb. 11. „156.“ Leberkultur 8261. 14 Tage bebrütet in P.G.N.-Plasma, unter Verwendung von „Bakterienpepton“ als Pepton. Bakterienpepton ist ein verhältnismäßig tief abgebautes Caseinpepton, ehemals von *Kuczynski* und *Ferner* dargestellt und von *E. Merck* vertrieben. — Die Kultur zeigt sehr starkes Wachstum mononukleärer Zellen, die hier weit vom ausgepflanzten Stück entfernt in einem Flachschnitt getroffen sind. Ihr Wachstum erfolgt flächenförmig, aber es ist natürlich nicht möglich es meist wenigstens zugleich mit dem Gewebe im Schnitt zu erfassen, zumal es die natürlichen Oberflächen bevorzugt. Daneben findet sich etwas sprossendes Bindegewebe und ein mit Zellen ausgekleideter Verflüssigungsraum, an dem — innerhalb des Gewebes ein kräftiges Lager junger Leberzellen entwickelt ist. Sonst fanden sich auch einige Epithelzapfen, die im Schnitte nicht getroffen sind. Reichert Hartapochromat 16 mm-Komp.-Okul. 4, Lifa-Filter 373, Osram-punktlampe, 3 Sek. Expos. Kondensor-Brille 3.

buches vielfach fabrikmäßig hergestellt wird. Zudem darf daran erinnert werden, daß dies Präparat Vitamin B in ziemlich reichlichen Mengen enthält. Hinsichtlich der Konzentration galten die oben ausgeführten Gesichtspunkte. Nach mannigfachem Vergleichen ergab sich

uns eine Lösung von 1% solchen Peptons in destilliertem Wasser als geeignete Grundlage unserer Versuche. Dies Zusatzpräparat wird in folgender Weise hergestellt: Man löst 0,1 g Pepton und 0,25 g Glykogen in 100 ccm aqua dest. Diese Lösung wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine knappe Stunde im Dampftopf sterilisiert. Dabei ist wahr-

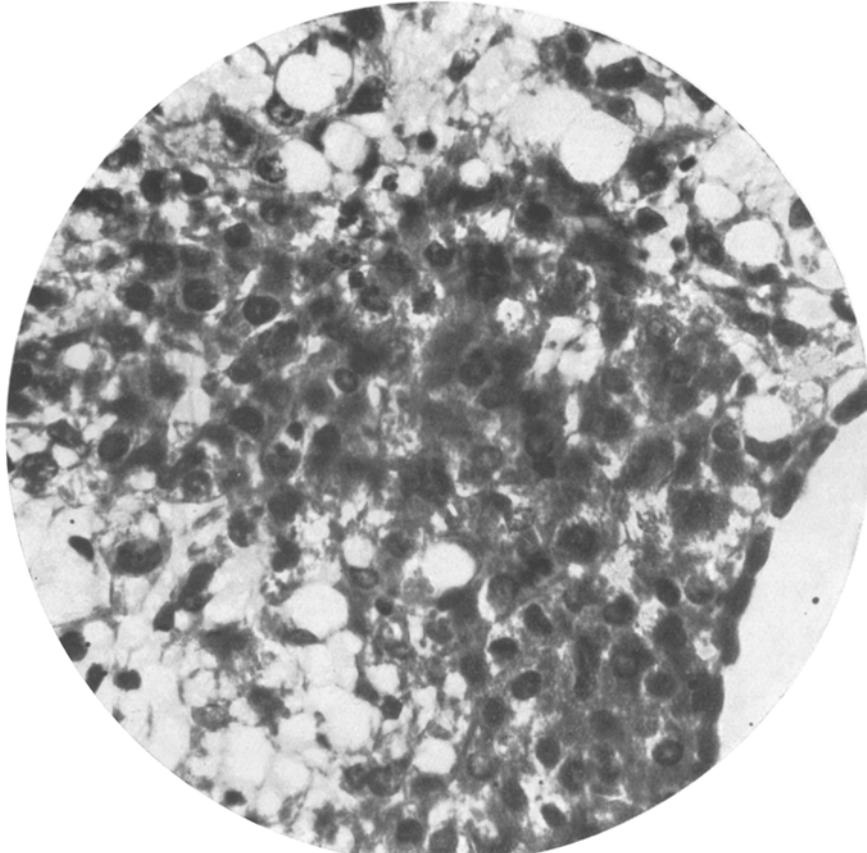


Abb. 12. Dasselbe wie Abb. 11. Das im Stücke neu gewachsene Lebergewebe mit Mitosen. Man erkennt die epithelartige Auskleidung des verflüssigten Plasmaraumes. Optik die gleiche, nur 4 mm-Komp.-Okul. 8, 5 Sek. Expos. (Kondensor-Aperture 1,0).

scheinlich mit einer geringgradigen Zersetzung des Glykogens zu rechnen. Jedenfalls bleibt die Lösung opaleszierend trüb, und es zeigt sich in bekannter Weise ein kleiner Niederschlag vom Pepton her, den wir ruhig absetzen lassen. Dem Kolben wird nun bei Handwärme die nötige Menge Normosal zugesetzt. Nach gutem Umschwenken wird steril auf einzelne Röhrchen verteilt, die noch bei $70^{\circ} 1/2$ Stunde des weiteren gehalten werden, um möglicherfalls hineingelangte Luftkeime mit Sicher-

heit auszuschalten. In einer Reihe von Versuchen wandten wir auch ein Caseinpepton tryptischen bzw. gemischten Abbaues an, das früher von uns hergestellte „Bakterienpepton“ *Merck*.

Bei der Gewinnung des Blutes, die wir durch Anstechen des Herzens vollziehen, saugen wir 7 ccm Blut mittels einer weithalsigen Rekordspritze in 3 ccm eisgekühlte Verdünnungsflüssigkeit. Wir verpflanzen somit die Gewebe und Zellen in eine Umgebung, die bestenfalls $1/3\text{ \%}$ Pepton über dem mit mikrochemischen Methoden nicht feststellbaren Gehalt des nativen Plasmas führt. Man wird im übrigen bei der Nutzung eines neuen Peptons durch Vorversuche stets das bestmögliche Mengenverhältnis festzustellen suchen. Der Glykogengehalt kann namentlich nach unten sehr viel leichter verändert werden, jedoch sollen darüber spätere Mitteilungen ausführlicheres Material bringen.

Jede nähere Betrachtung der Ergebnisse von Gewebskulturen zeigt mit voller Deutlichkeit, daß es nur in äußerst beschränktem Umfange Lebenderhaltung ohne Bewegungs- und Wachstumserscheinungen gibt. Bei der erstmaligen Auspflanzung von Gewebsstücken kann man zwar durchaus nicht von den Erscheinungen an der Gewebeplasmagrenze auf die Vorgänge im Gewebe rückschließen. Soweit aber unsere Erfahrung reicht, deutet mangelhafte Auswanderung und Sprossung an der Oberfläche meist auch nach einer bestimmten Dauer der Bebrütung, die etwa 3—6 Tage betragen mag, auch auf Absterbeerscheinungen innerhalb des Gewebes hin.

Die in der Regel nicht sehr erfreulichen Zuchterfolge an den Organen halb oder ganz erwachsener Tiere hängen nach zahlreichen Beobachtungen, die wir machen konnten, zu einem beträchtlichen Teil damit zusammen, daß bereits das ursprünglich vom Untersucher hergestellte Gewebe-Plasmasystem für die Kultur des Gewebes ungünstige Voraussetzungen bietet. Ein sehr wesentlicher Fehler liegt selbst dann, wenn das Gewebsstück richtig und quetschungsfrei entnommen ist, in der meist viel zu großen Masse des zu kultivierenden Stücks. Immer wieder überzeugt man sich, daß die Bedingungen jeglichen Wachstums mit der Kleinheit des ausgepflanzten Stücks bis zu einer gewissen Grenze wachsen. Gerade an solch günstigen Stücken aber gewinnt man den Eindruck, daß es einen eigentlichen Stillstand formbildender Vorgänge bei der Lebenderhaltung ausgepflanzter Gewebe eine vorwiegend auf Ernährung und Stoffumsatz beschränkte Vitalität in der Regel nicht gibt. Entweder die Ernährungsbedingungen sind unzureichend, dann stirbt das Gewebe sehr schnell ab; oder sie reichen aus, dann führen sie zu einer in Zellbau und in Zellteilung zum Ausdruck gelangenden Mehrleistung seitens der überlebenden Zelle, die durch den Wegfall der inneren Hemmungen und Ausgleiche ausgeprägter Form des fertigen Organismus in chemisch verständlicher Weise angefacht

wird und, bei Säugetieren wenigstens, zu meist ungeordneten, formbildenden Vorgängen Veranlassung geben. So werden wir mit den älteren Forschern, wie z. B. *Karl Ernst v. Baer*, ganz nachdrücklich auf die Einheit von Ernährung, Wachstum und Erzeugung geführt. Es verdient in diesem Zusammenhange erwähnt zu werden, daß die Re-

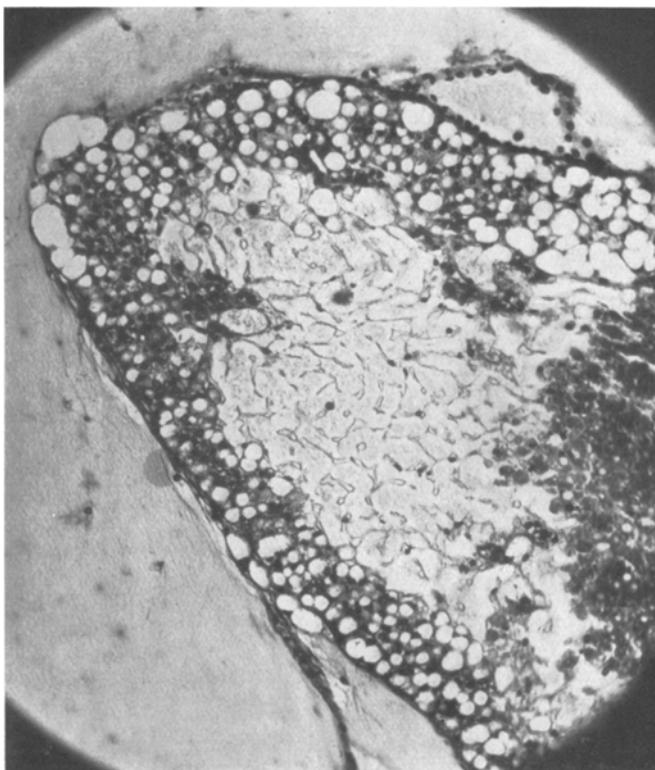


Abb. 13. „174.“ Leberkultur 8332. 20 Tage bebrütet in Traubenzucker-P.G.N.-Plasma mit Insulin. Üppiges epitheliales Wachstum, zum Teil in eigentümlicher kugelflächenartiger Ausbreitung, verbunden mit Plasmaverflüssigung. — Zentral abgestorbenes Gewebe, in seiner Umgebung ein Lösungsbezirk, in dem nur die Struktur des capillären Netzes eben erhalten erscheint, während die Leberzellen völlig autolytisch gelöst erscheinen. Darin einige lebende Gefäßwandzellen. Randwärts junges Lebergewebe ohne Capillaren mit kugligen Hohlräumen, die nur zu einem Teile Fettropfen entsprechen. 16 mm Hartapochromat Reichert Komp.-Okul. 12. Brille 3. Lifa-Filter 211, 2 Sek. Exposition.

generationsblasteme der Milz, wie sie nach Röntgenatriopie leicht beobachtet werden können, mit Zellen einsetzen, die in jeder Hinsicht sowohl des Protoplasmas wie des Kernbaues als im höchsten Maße resorptiv tätige Zellen angesprochen werden müssen (Kuczynski und Schwarz, Krankheitsforschung 1925). Die eigentlichen „Matrikulargewebe“ zeigen zugleich eine sehr starke Aufsaugung, die sich mit ver-

mehrtem Säfteumlauf, gesteigerter Atmung, dann aber auch mit recht merklichen strukturellen Änderungen verbindet. Ernährung und Bildung sind nicht zu trennen, wenn auch die Möglichkeiten einer zu Bildungsvorgängen *ausreichenden* Ernährung in der Regel organismisch — eben durch die „Ganzheit“ und ihre regulativen Einwirkungen — eng

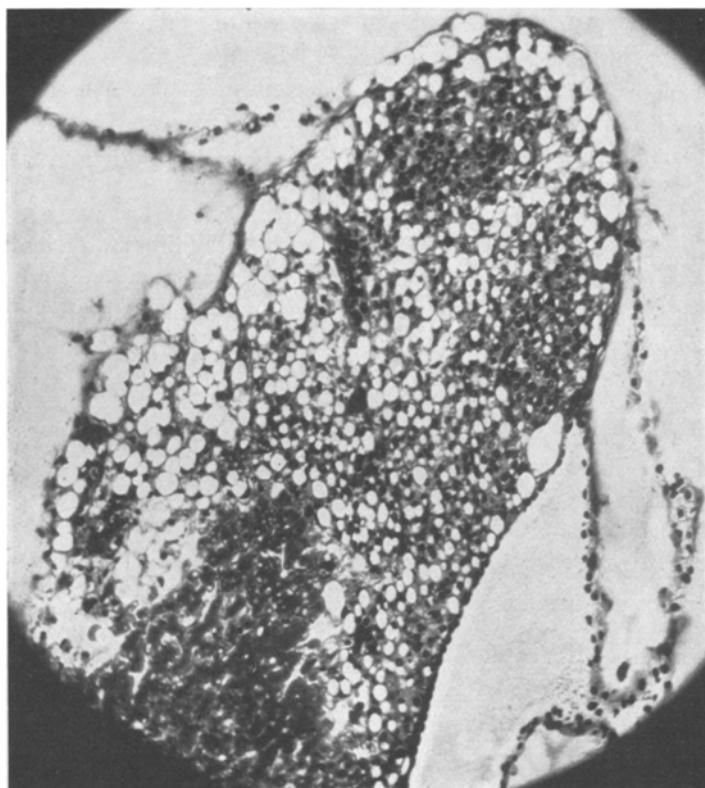


Abb. 14. Dasselbe. Einige Schritte weiter. Man erkennt die größere Ausdehnung des zelligen epithelialen Regenerates. Randwärts erkennt man die Umgrenzung der Hohlräume im Querschnitte. Optik wie bei Abb. 3.

beschränkt sind, jedenfalls, wenn wir den erwachsenen Körper betrachten.

Verglichen mit der Wirkung von Embryonal- und Leukocyten-extrakten ist das Wachstum von Peptonkulturen des Milzgewebes ein außerordentlich gutes. Nach anfänglicher Leukocytenauswanderung setzt sehr schnell eine starke Gewebsbildung um das ausgepflanzte Stück ein, die ungefähr vom 4. Tage an deutlich wird, ohne Umbettungen im Durchschnitt etwa bis zum 12. Tage einen schnellen und dauernden

Anstieg aufweist, um sodann vom 12. bis zum 20. Tage langsamere Fortschritte zu machen. Jedoch hört auch dann das Wachstum nicht notwendig auf, da wir noch nach 26 bzw. 33 Tagen verschiedentlich bei der histologischen Aufarbeitung normale Mitosen gefunden haben. Jenseits des 22. bis 25. Tages jedoch sind die Kulturen, namentlich, wenn sie üppig gewachsen sind, dem Absterben ausgesetzt, so daß man gut tut, sich hiernach in der Entscheidung über Weiterführung oder histologische Verarbeitung zu richten.

Da unsere Untersuchungen ja vorwiegend methodischen Charakters sind, können wir uns in der Beschreibung des Wachstums selbst sehr kurz fassen. Im allgemeinen haben wir unsere Milzauspflanzungen derart vorgenommen, daß das Plasma die Stücke 2—4 mm überschichtete. Ein nicht zu großer Abstand gegen die Grenzschicht Plasma-Luft ist im allgemeinen vorteilhaft. Dabei kommt es zu immer dichter sich zusammenfügenden Mänteln fibroblastischer Zellen bzw. Zellstränge, die schon in der ersten Kultur die Masse des ursprünglichen Gewebes um ein Mehrfaches übertreffen können. Die sehr naturgetreuen Abbildungen des Malers *Landsberg* geben dies vorzüglich wieder. Dann sieht man etwa in der Mitte das ausgepflanzte Gewebsstück und darum konzentrisch oder exzentrisch wachsend das sehr dichte neue Gewebe aussprossender Fibroblasten. Dies ist so dicht gefügt, daß man von den einzelnen, sich innig durchflechtenden Zellzügen in der Regel nichts erkennt, sondern bei schwacher Vergrößerung den Eindruck eines einheitlichen Gewebes empfängt. Nur an der äußeren Oberfläche heben sich zahlreiche, ziemlich dichte Zapfen heraus, deren meist aus 2 bis 3 Zellen bestehende stark verzweigte Endigungen durch eine langsame, aber bei länger dauernder Beobachtung sehr deutliche Amöboidie ausgezeichnet sind.

Neben diesem fibroblastischen Wachstum ergibt sich ein besonders ausgiebiges und in leichtester Weise in Reihen fortführbares Wachstum monohistiocytärer Zellen. Sie bevorzugen im allgemeinen die obere bzw. untere Grenzfläche des Plasmas, ohne sich jedoch auf diese zu beschränken. *Kuczynski* hatte bereits 1923 auf die Beziehungen von Histiocyten zu peptonartigen Abbaustufen hingewiesen:

„Besonders bei örtlichen Überschüttungen mit Peptonen kommt es nämlich zu direkten geweblichen Anbildungen von Histiocyten im Muskelinterstitium, ohne daß man berechtigt wäre, von einem Granulationsgewebe zu sprechen, da tatsächlich eine entsprechende Beteiligung des Gefäßsystems an Ort und Stelle fehlt. Diese Zellen phagocytieren nur spärlich. Dagegen sind sie durchweg ziemlich grob vakuolisiert. Eine Fetteinlagerung läßt sich nicht nachweisen. Das Zellbild entspricht durchaus einem Speicherprozeß. Solche Zellen wandern auf entsprechende Reize auch aus den regionären Lymphknoten, wo sie im

Ruhezustande dieser Gebilde in den Randsinus besonders zu Hauf liegen, anscheinend zuweilen Zellnetze bildend.“

Diese monocytiären Zellen vermehren sich also in Peptonkulturen und ihren Überpflanzungen so außerordentlich, daß kaum daran gezwifelt werden kann, daß sie in besonders leichter Weise peptonartige Stoffe aufzunehmen und zu verwerten imstande sind. Der starke Auf-

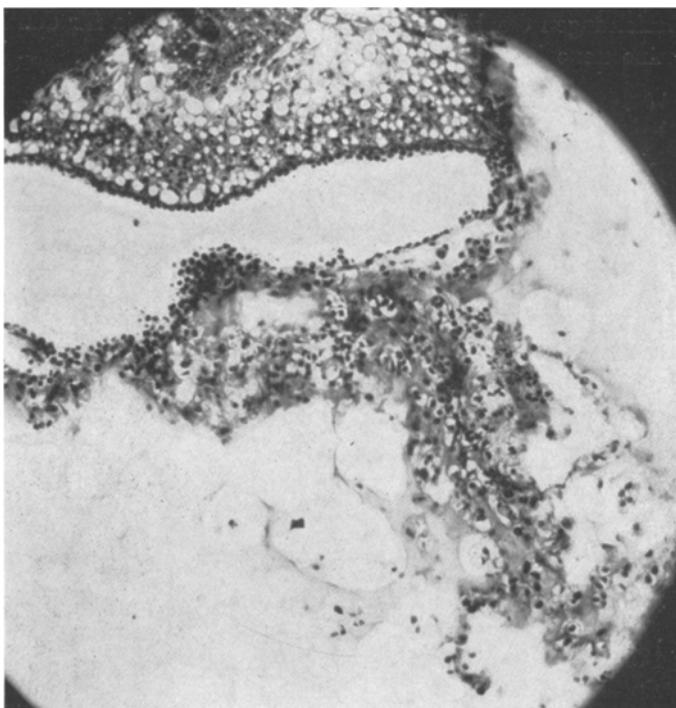


Abb. 15. „189.“ Leberkultur 8332. 22 Tage in Traubenzucker-P.G.N.-Plasma bebrütet. Sehr ausgesprochenes flächenförmiges monocytiäres Wachstum. Daneben dichtes Wachstum von Leberzellen, zum Teile in Form von Kugelschalen mit vielfach gitterförmig zusammenlaufenden Epithelsträßen. Dazwischen zuweilen deutliche Strahlen von Fibroblasten. Man erkennt den Rand des ausgepflanzten Gewebes mit wiedergewachsenem Epithel und daran den gleichfalls epithelumkleideten Lösungsraum, von dessen Begrenzung sich nach unten im Bilde ein kräftiges Wachstum von Leberzellen zeigt. Um die einzelnen Zellen, die zu kleinen Balken zusammengefügt erscheinen sieht man deutlich kleine Höfe, wo das Plasma gelöst ist. Optik 16 mm-Hartapochromat Reichert Komp.-Okul. 6. Brille 3. Lifa-Filter 211. $1\frac{1}{2}$ Sek. Expos.

saugungsvorgang drückt sich auch in der vielfach riesenzellartigen Größe und zuweilen Mehrkernigkeit, sowie auch in der überhaupt sehr verschiedenen Größe dieser in lockeren Verbande oder epithelartigen Gefügen wachsenden Zellen aus. Dabei merkt man gar nicht selten, daß bei der Beimpfung des Plasmas mit Gewebsmaterial allenthalben, wo man zufällig das Gewebe am Glas abgestreift hat, ersichtlich aus ein-

zellen Zellen oder kleinsten Zellverbänden Mittelpunkte eines starken Wachstums monocyttärer Zellen entstehen. Es ist zuweilen durchaus schwierig, solche Zellen von Epithelien zu unterscheiden. Sie speichern auch je nach Angebot Fette und Lipoide. Wir wissen, daß solche in geringer Menge stets im Plasma vorhanden sind. Der Nachweis gelingt sehr eindrucksvoll, wenn man der Plasmakultur einen Tropfen in Ringer oder Normosal zu gleichen Teilen aufgeschwemmten Eigelbs zusetzt. Diese Beziehungen der histiocytären Zellen bedeuten ja für den Pathologen keine neue Erkenntnis.

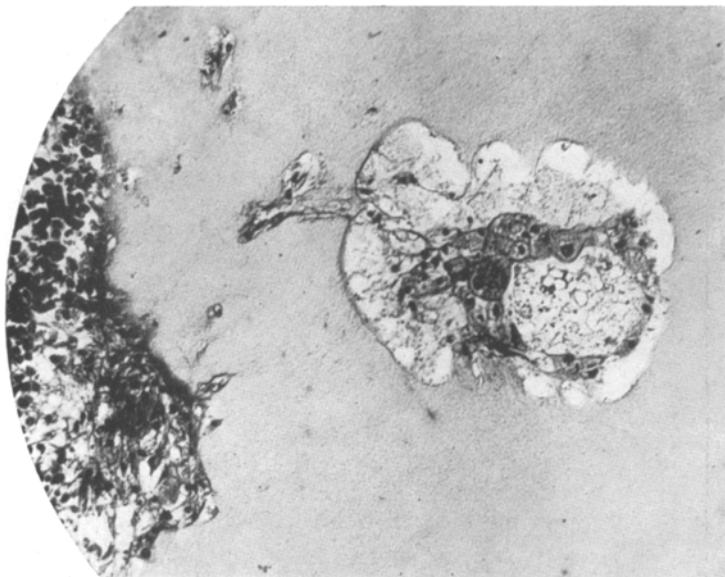


Abb. 16. „176.“ Leberkultur 8300. 28 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Zahlreiche Epithelbalken und Strahlen von Fibroblasten. Man erkennt den Querschnitt eines Epithelbalkens mit der kennzeichnenden Lösung des Plasmas. Zellen zu einem Ring von ungleicher Dicke zusammengeschlossen.
Optik: 16 mm-Hartapochromat Reichert. Komp.-Okul. 8. Lifa-Filter 373. 4 Sek. Expos.

Nur kurz hinweisen möchten wir auf die verhältnismäßig lange Lebenderhaltung der Lymphzellen. Sie unterliegen sicherlich in unseren Kulturen keiner Entfaltung, und die Bedingungen ausreichenden Daseins für sie sind noch nicht erfüllt. Wenn wir aber von den ausgezeichneten, aber physiologisch leider undurchsichtigen Versuchsergebnissen *Maximoffs* absehen, so ist es sicherlich anderen Erfahrungen gegenüber auffällig genug, daß wir noch nach 32-tägiger Bebrütung häufig Lymphstränge mitten im ausgepflanzten Gewebe antreffen, die in ihrer Kernfärbung noch so merkwürdig erhalten sind, daß man jedenfalls bei aller Vorsicht auf eine verhältnismäßig lange Lebensdauer dieser Zellen unter

den von uns gesetzten Bedingungen rechnen kann. *Kuczynski* hat bereits früher auf die physiologisch-pathologischen Beziehungen dieser Zellen hingewiesen, Erfahrungen, die neuerdings von *Kuczynski* und *Schwarz* wesentlich vertieft und erweitert werden konnten. Für die Lymphocyten können wir ja ebenso wenig wie für die Leukocyten heute bereits ihre normale Lebensdauer angeben. Abgesehen von einer möglichst langen Lebenderhaltung ergeben sich für die Pathologen zwei mit Hilfe der Gewebskultur lösbarer Aufgaben, einmal die Erzeugung eines lymphoblastischen Zellgewebes, wie uns dies im lebenden Organismus sicher und übersichtlich gelingt (*Kuczynski, Kuczynski* und *Schwarz*), zweitens die Umwandlung von Lymphzellen in Plasmazellen als vorwärts gerichteten formalen Ausdruck bestimmter funktioneller Beanspruchung.

Ein wesentlicher Punkt bedarf besonderen Hinweises. Sowohl an Histiocyten, als auch besonders an fibroblastischen Zellen fällt an unseren gegenüber den Vergleichskulturen die bereits in lebendem Zustand sehr kräftige Entwicklung der einzelnen Zellen auf. Dadurch kommt es bei den Fibroblasten häufig zu ganz knorrigem und wuchtigen Wachstumsbildern, denen saftige, sehr plasmareiche und verhältnismäßig sehr große Zellen entsprechen. Bei Giemsafärbung zeigt das Protoplasma neben Vakuolisierungen eine ausgesprochene Basophilie, wie sie besonders meristematischen Zellen zukommt.

Wir sehen hierin einen Hinweis darauf, daß unsere Peptonzusätze zum mindesten für die histiocytären und fibroblastischen Bestandteile des Binde- und Stützgewebes erwachsener Organismen als ausreichende und sogar vorzügliche Grundlage kulturellen Gedeihens betrachtet werden dürfen. Damit dürften sie aber sich gleichzeitig als Grundlage für weitere physiologisch begründete Versuche zur Züchtung bestimmter Zellen und Gewebe mit besonderen Ansprüchen eignen. Es ist vorauszusetzen, daß die Lebensbedingungen der sog. Parenchyme zu denen des Zwischengewebes nicht in einem gegensätzlichen Verhältnis stehen, wenn es auch sicher ist, daß die Organzellen ihrer besonderen funktionellen Berufung gemäß besondere Ansprüche stellen. Die Gegenwart geringer Häufungen von Eiweißabbaustoffen kann auch in der Kultur mindestens nicht als schädlich betrachtet werden, da wir wissen, daß beispielsweise abiurete Stoffe in beträchtlicher Menge sogar im normalen Zentralnervensystem durch Auszug nachgewiesen werden können. An dieser Stelle mag auch daran erinnert werden, daß *Freund* und *Kaminer* in ihren bemerkenswerten Untersuchungen Beziehungen der bindegewebig abgeleiteten Sarkomzelle zu Pepton als Nährstoff nachgewiesen haben, während die Carcinomzelle eine größere Verwandtschaft zu Kohlenhydraten aufwies, wie dies ja auch den neueren Untersuchungen von *Warburg* entspricht. (1925, Bioch. Grundlagen der Disposition für Carcinom.)

Die Gewebskultur kann aber für den wissenschaftlichen Pathologen dann ein sehr wertvolles Hilfsmittel zum Verständnis normaler und krankhafter Beziehungen werden, wenn er aus seinen anders gewonnenen Erfahrungen für bestimmte Zellen und Gewebe funktionelle und korrelative Beziehungen aufstellt und nun die Methode der Auspflanzung dazu benutzt, den Wert dieser Theorien zu prüfen und wirklich einfache

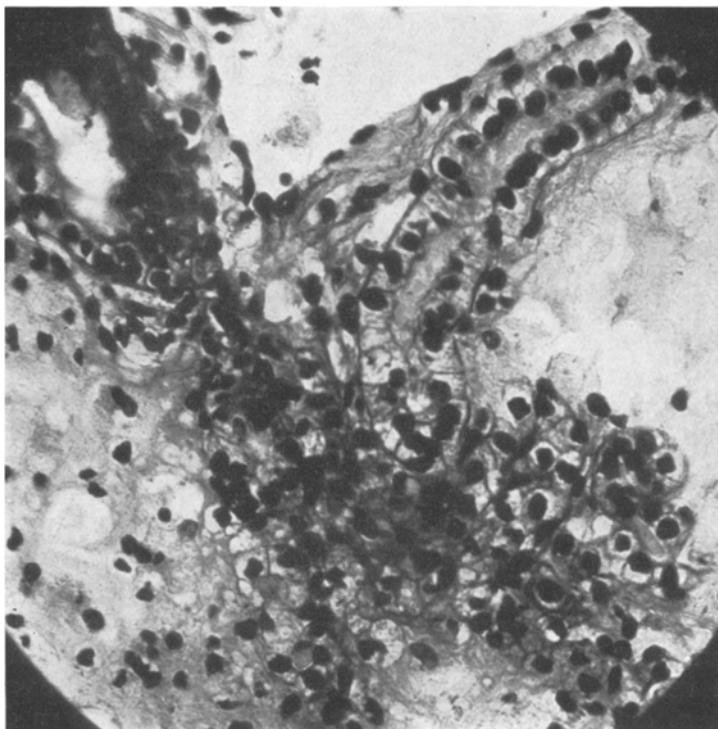


Abb. 17. „177.“ Leberkultur 8318. 23 Tage in Traubenzucker-P.G.N.-Plasma mit Insulin bebrütet. Gewebe macht den Eindruck, als wäre es fast aufgelöst in üppiges zelliges Wachstum, flächenförmig vordringende monocytär-histiocytäre Zellen und lange breit aufsitzende Leberzellbalken. Die Mikroskopie eines der Stücke zeigt mitten im abgestorbenen alten Lebergewebe eine zellige Regeneration von Gallengängen aus, wie sie im Bilde dargestellt ist. Man sieht viele Mitosen am Gang und in seiner Umgebung. Optik. Hartapochromat 4 mm Reichert. Komp.-Okul. 6. Kondensor num. Ap. 1,0. Lifa-Filter 373. 8 Sek. Expos.

Zusammenhänge aufzustellen. Dazu ist es allerdings durchaus erforderlich, von den verwickelten üblichen Systemen der Zucht zu einfachen und in ihrem Aufbau bekannten überzugehen.

Wir haben zunächst wiederum die Leber in den Kreis unserer Untersuchungen gezogen. Sie stellt sicherlich einen besonders schwierigen Gegenstand für Auspflanzungsversuche dar. Zunächst ergab sich wiederum, daß monocytäre Zellen, sei es des Peritonealüberzuges, sei es der

Auskleidung der Capillarwände entstammend, in üppiges und leicht fortführbares Wachstum gerieten. Hier ergeben sich keine anderen Beobachtungen als an Milzkulturen. Das sprossende Wachstum ist nach Auftreten und Art sehr wechselnd und hängt höchstwahrscheinlich mit Besonderheiten des ausgepflanzten Gewebsstückes zusammen.

In Hinsicht auf die Bedeutung, die der Leber seit den grundlegenden Versuchen von *Claude Bernard* im Zuckerstoffwechsel zugeschrieben werden muß, haben wir in einer größeren Reihe von Versuchen unsern Standardzusatz durch Zufügung von 0,25% Traubenzucker kohlehydratreicher gestaltet. Das Ergebnis war, verglichen mit den Standardkulturen, in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle in allen Richtungen ein schlechteres, wenn wir auch öfter feststellen konnten, daß noch unter diesen Umständen z. T. sogar ungewöhnlich große histiocytäre Zellen wuchern konnten. Vor allem aber vermißten wir in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle bei einfach erhöhtem Angebot an Zucker ein epitheliales Wachstum, sei es nun in der Form sprossender Ausführgänge oder aber echter Neubildung von Leberzellen. Demgegenüber läßt sich ein solches in gut angelegten Pepton-Glykogen-Normosal-Kulturen vielfach in sehr deutlicher Weise erkennen.

Wir haben aber aus sehr zahlreichen Versuchen der letzten Monate den Eindruck erhalten, daß eine wesentliche Steigerung gerade der epithelialen Wachstumsbedingungen der Leber unserer fast erwachsenen Tiere durch Zucker bei Gegenwart von Insulin zu erreichen ist. Trotzdem wir diesen Befunden mit größter Skepsis gegenübertraten, hat doch der immer wieder durchgeführte Vergleich des Standard mit der Insulin-Kultur besonders auch unter Berücksichtigung des histologischen Bildes so oft zugunsten der Insulinkulturen gesprochen, daß wir bei aller Vorsicht und Zurückhaltung den Befund als Anregung zur weiteren Arbeit nicht unterdrücken möchten. *Jedenfalls aber können wir mit voller Bestimmtheit aussagen, daß der nachteilige Einfluß erhöhter Zuckerhäufung im Nährgemisch durch Insulinzusatz völlig aufgehoben und in der Regel in einen deutlich fördernden umgewandelt wird.*

Wir arbeiten mit unserm Standardgemisch unter Zusatz von 0,25% Traubenzucker. Das von uns angewendete Insulin „Teichgräber“ enthält in 5 ccm 100 neue amerikanische Einheiten. Hiervon wurde 1 ccm mit Ringer auf 100 ccm verdünnt. Etwa 0,3 ccm dieses Insulins wurde zusammen mit 2,7 der mit erhöhtem Zuckergehalt versehenen Standardlösung zum Verdünnen von 7 ccm Blut verwendet. Selten schwankten die betr. Zahlen zwischen dem Angegebenen bzw. 2,5, 0,5 und 7 ccm. Vergleichende Prüfungen ergaben, daß der bakterienfeindliche Zusatz von 0,3% Trikresol der ursprünglichen Insulinlösung durch die Verdünnung wirkungslos gemacht wird. Schon bei der lebenden Betrachtung setzt das epitheliales Wachstum vielfach bereits zwischen dem

5. und 7. Tage sehr deutlich ein. Teils sind es dünne Stränge, teils dickere Zapfen oder aber in besonders bezeichnender Form flächenhaft sich ausdehnende Epithellager. Wie wir dies in viel großartigerer Weise bei der Auspflanzung menschlicher Lebern zu sehen gewohnt sind, so kommt es auch in der unmittelbaren Umgebung der ausgepflanzten Meerschweinchenleber nicht selten zu einer umschriebenen Lösung des Plasmafibrins. Diese Hohlräume werden nun bezeichnenderweise von schmälerem oder breiterem, vielfach gitterartig zusammenfließendem Epithelbalken spangenartig umkleidet.

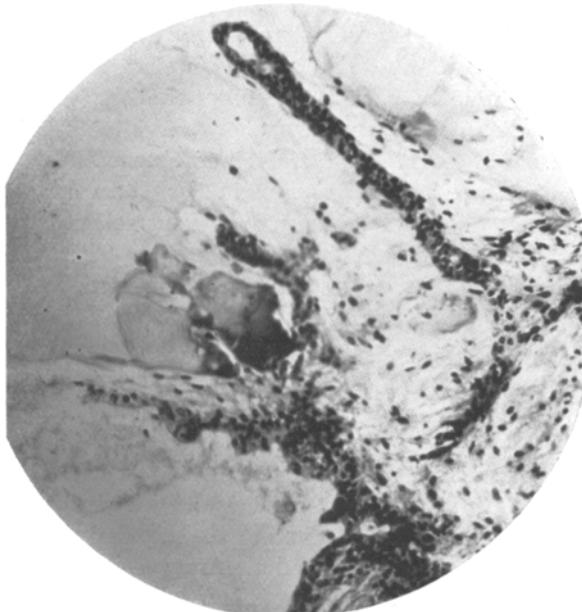


Abb. 18. „127.“ Leberkultur 8292. 6 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Üppigstes flächenhaftes Wachstum monocytiär-fibroblastischer Zellen. Daneben aussprossende Gallengänge, sowie epitheliale Zapfen, wie im Bilde ersichtlich ist. Eine Trennung des Wachstums der einzelnen Elemente hat nicht stattgefunden. Optik wie bei Abb. 11.

Dieses Wachstum ist deutlich von demjenigen unterschieden, das in Gestalt von sprossenden Gallengängen beobachtet wird. Von besonderem Interesse ist das histologische Verhalten der ausgepflanzten Leberstücke. Da sie auch in unseren Zubereitungen meistens viel zu groß gewählt waren, ergab sich auch hier die gewohnte Nekrose des allergrößten Teils der eigentlichen Leberzellen. In verhältnismäßig kurzer Zeit jedoch beginnt von der Oberfläche her eine Regeneration von Leberzellen, welche sich zunehmend nach innen in die Zerfallsmassen hinein unter lebhaften Mitosen ausdehnen, während sie gleichzeitig nach außen hin die im lebenden Zustand leicht erkennbaren Zell-

bänder entsenden. Auch im Anschluß an größere Gefäße im ausgepflanzten Gewebe, die anscheinend ihrer näheren Umgebung bevorzugte Lebensbedingungen gewähren, kann es zu ähnlichen epithelialen Bildungen kommen, die vielfach durchaus embryonalen Bildern gleichen.

Man sieht in unseren Kulturen vielfach, daß sowohl die jungen, lebhaft wachsenden Leberzellen, wie auch die histiocytären Zellen lebhaft Fett und zwar nach Ausweis der färberischen Analyse reines *Neutralfett* speichern. Teilweise bilden sich so richtig *blasige Fettzellen*.

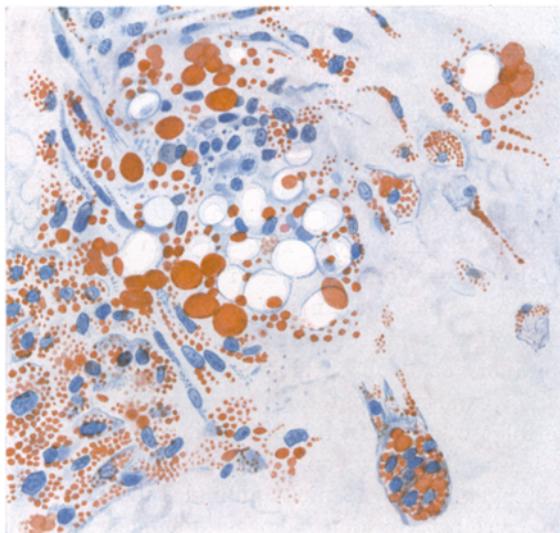


Abb. 19. „211.“ Leberkultur 8357. 20 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Formolfixierung. Gelatineeinbettung. Rand der äußeren Wachstumszone. Fettbeladene Zellen: Nach unten zu ein geschlossen vordringender kleiner Epithelzapfen, rechts ein halb quergeschnittener, etwas lockerer, sehr viel weiter gewuchter Zapfen. Daneben histiocytäre und andere retikuläre Zellen mit teilweise Fettspeicherung. Sudan. (Nilblau und Nilblauanbase liefern ein entsprechendes, rein röthliches bzw. rotes Bild.) Optik: Hartapochromat 4 mm. Komp.-Okul. 8 Reichert, gemalt von M. Landsberg; $\frac{2}{3}$ verkleinert.

Die weitere Verfolgung des eingeschlagenen Weges wird es vielleicht gestatten, aus Angebot von Nährstoffen und histologischem Ergebnis Einblicke genauerer Art in den Zellstoffwechsel zu erhalten.

Wir hatten bisher keinen vollständigen Ersatz des abgestorbenen Lebergewebes durch neugewachsene Epithelien beobachtet, immerhin sehr beträchtliche Ausdehnung der Regenerate. Ähnliche Vorgänge sind natürlich in Milzkulturen nicht zu sehen. Dagegen kommt es auch hier zuweilen zu erheblichen zelligen Aufsaugungen des Restes, der Leiche, des eingepflanzten Stückes, das zentrifugales Wachstum ent sandt hat. Während bekanntermaßen zu Beginn der Auspflanzung histiocytäre Zellen alle möglichen Blutzellen unter gleichzeitiger starker

Eisenspeicherung aufnehmen, greifen sie nun nach mehrwöchiger Auspflanzung zuweilen derart in den Gewebsumsatz ein, daß sie die letzten Trümmer beseitigen. Dabei gestalten sie sich in bemerkenswerter Weise zu vielkernigen Riesenzellen um, die noch dadurch besonders auffallen, daß die Nucleolen ihrer Kerne nach Art der berühmten *Leydenschen* Vogelaugen umgewandelt werden. Die tieferen Ursachen dieser Erscheinung sind uns unbekannt. Jedenfalls zeigten gelegentliche Beobachtungen solcher Zellen im lebenden bewegten Zustand, daß sie durchaus als lebenskräftig zu bezeichnen sind.

Da die feineren histologischen Verhältnisse nicht eigentlich Gegenstand dieser Untersuchungen sind, sondern nur dazu dienen sollen, die Lebensvorgänge unter den von uns gewählten und geschaffenen Bedingungen zu erläutern, können wir auch hinsichtlich dieser riesenhaften Makrophagen uns darauf beschränken, auf die letzte Arbeit von *Lewis* (Americ. journ. of pathol. Volume I, 1, 1925) hinzuweisen. Die dargestellten Zelleistungen, wie die in ihrem Gefolge auftretende Bildung von „Riesenzellen“ kennt ja der Pathologe im geweblichen Verbande außerordentlich genau. Von Interesse in unserem Zusammenhang bleibt der Umstand, daß solche Vorgänge sich wie in dem dargestellten Falle noch nach 28tägiger Bebrütung in der Kultur abspielen.

Man kann aber aus Beobachtungen wie den mitgeteilten nicht etwa folgern, daß die vorwärts gerichteten Vorgänge auf Kosten der rückwärtsgerichteten erfolgt wären. Dann müßten sie auch ohne alle Zusätze bei der einfachen Auspflanzung von Geweben in reines Plasma zur Beobachtung gelangen. Dies ist nicht einmal andeutungsweise der Fall. Wenn wir daher selbst von den mehrfach gelungenen Weiterführungen unserer Kulturen absehen, so glauben wir, daß die mitgeteilten, sehr breit angelegten Versuche, die wir bereits mehr als 2 Jahre verfolgen, besonders für den Pathologen eine geeignete Grundlage weiterer Untersuchungen abgeben können.

Albert Fischer hat in seinem neuen großen Werk auch die Studien über Immunität und verwandte Erscheinungen zusammenfassend besprochen, soweit sie mit Hilfe von Gewebskulturen unternommen worden sind. Das Ergebnis ist ein außerordentlich geringes und namentlich hinsichtlich der Frage nach dem Entstehungsort der immunisatorischen Leistungen innerhalb des Körpers noch ganz unbefriedigend. Mit Recht lehnt *Fischer* die öfter in diesem Zusammenhang genannte Untersuchung von *H. Reiter* ab, da sie nichts mit dem zu tun hat, was wir heute Gewebskulturen nennen. So bleiben besonders hinsichtlich der hämolytischen und agglutinatorischen Leistungen des Organismus die Beziehungen bestimmter Gewebe oder Zellen zu den im Blut und Serum nachweisbaren Immunitätserscheinungen zunächst vom Standpunkte der explantativen Forschung offen. Angesichts der stets größer werden-

den Zahl von Forschern, die in Fortführung von Vorstellungen, die bereits *Metschnikoff* ausführlich entwickelt hat, in Gefäßwandzellen bzw. dem retikulo-endothelialen System die Ursprungsstätte der genannten Kräfte sehen, lag es für uns nahe genug, einige entsprechende Versuche an Gewebskulturen anzustellen. Gerade das in Milzkulturen

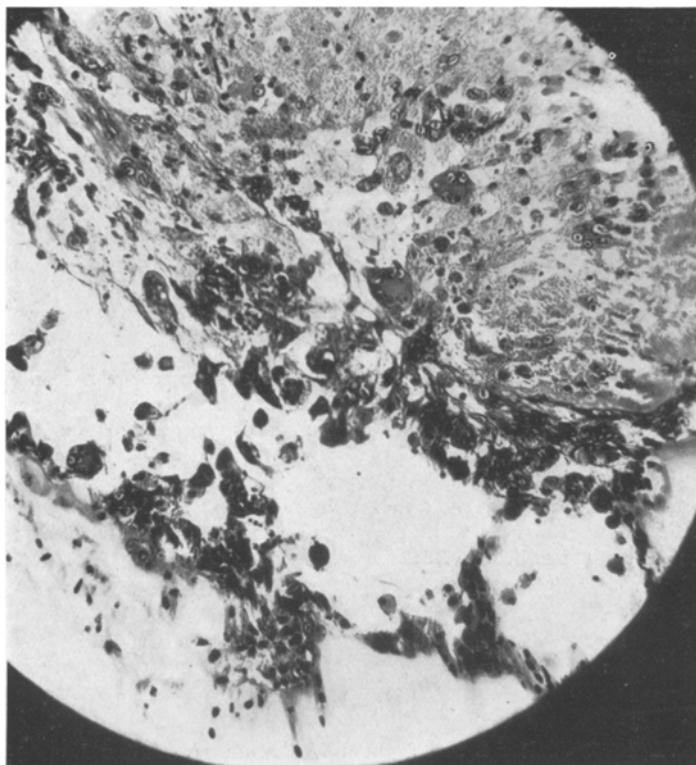


Abb. 20. „104.“ Milzkultur 6783. 22 Tage in P.G.N.-Plasma bebrütet. Gewaltiges strahliges Wachstum in dichtesten Zonen, sowie riesenhafte, leicht gekörnte und deutlich vielkernige Zellen in flächenförmiger Ausdehnung, besonders in der Nähe des ursprünglich ausgepflanzten Gewebes. Man erkennt im Bilde der Beobachtung im lebenden Zustande entsprechend in der Nähe des Geweberestes sowie auch besonders in ihm die riesenhaften Aufsaugungszellen mit ihren randwärts gestellten Kernen. Diese gleichen mit ihren großen zentralen, sehr blaß gefärbten Kernkörperchen ganz den v. Leydenschen Vogelauge. Optik: 16 mm Hartapochromat Reichert. Komp.-Okul. 8. Brillenkondensor 3. Lifa-Filter 211. 2 Sek. Expos.

ausgesprochen gute Wachstum histiocytär-fibroblastischer Zellen konnte die Hoffnung begründen, in solchen Kulturen bei ihrer langen Lebensdauer die Entstehung der genannten Immunitätsleistungen zu beobachten. Wir verwandten einsteils Hammelblutkörperchen, andererseits bei 60° abgetötete Typhusbakterien, die wir entweder den Kaninchen, deren Milz wir züchteten, in so großen Mengen i. v. einverleibten,

daß wir sicher sein konnten, das Antigen im kleinsten Stückchen Milzgewebe zu finden, oder wir setzten es dem P.-G.-N.-Plasma in der fertigen Kultur unter inniger Vermischung zu. Im ersten Falle hyperämisierten wir die Bauchorgane vor der Einspritzung durch Wärmeeinwirkung.

Die mitgeteilten Ergebnisse sind im allgemeinen völlig negativ. Es ist uns nicht mit Sicherheit gelungen, die Entstehung von Agglutininen oder Hämolysinen in der Kultur zu beobachten. Dieses Ergebnis kann nicht in dem Sinne verwertet werden, daß die gezüchteten Zellen nicht imstande wären, kreisendem Blute die entsprechenden Wirkungen zu übermitteln. Das Fehlen eines Blut- und Säfteumlaufs, vielleicht auch im Überschuß vorhandenes Antigen können positiven Ergebnissen entgegenwirken. Jedenfalls zeigen diese Versuche, die besonders von Dr. Werthemann durchgeführt worden sind, daß es nicht in so einfacher Weise gelingt, gerade die leichte Züchtbarkeit der Elemente des sog. retikulo-endothelialen Systems zu einer näheren Begründung derjenigen Theorie heranzuziehen, die in diese Zellen den Ursprung der Antikörper verlegen möchte.

29. V. 1925. *Kaninchen Nr. 1* wird mit 4,5 ccm gewaschenen Hammelblutkörperchen Verdünnung 1 : 20 i. v. gespritzt. Erwärmung des Bauches während 15 Minuten vor der Einspritzung. 20 Min. nach der Einspritzung Herausnahme der Milz und Anlegen der Kulturen in P.G.N.-Plasma. *Positiv* + bedeutet Hämolyse (Lösung), *Negativ* — bedeutet *keine Hämolyse* (Hemmung). Das auf Hämolysine geprüfte Kaninchenserum verhält sich völlig negativ. 1 : 20 —.

11. VI. 1925. *Kultur 1.* 4 Stücke (gutes Wachstum) werden zentrifugiert und mit dem ausgepreßten Serum Hämolyseversuch gemacht:

	2 Std.		Kontrollen:
1 : 10	±		Kompl. —
1 : 20	±		NaCl —
1 : 40	—		
1 : 80	—		
1 : 160	—		

13. VI. 1925. *Kultur 2 und 3* gutes Wachstum wie Kultur 1.

K. 2	2 Std.	24 Std.	K. 3	2. Std.	24. Std.
1 : 10	±	±	1 : 10	—	—
1 : 20	±	±	1 : 20	—	—
1 : 40	—	—	1 : 40	—	—
1 : 80	—	—	1 : 80	—	—
1 : 160	—	—	1 : 160	—	—

Kontrollen: Kompl — NaCl —

16. VI. 1925. *Kultur 4.* Gutes Wachstum, behandelt wie Kultur 1.

	2 Std.	24 Std.	Kontrollen:
1 : 10	±	±	Kompl. —
1 : 20	+	+	NaCl —
1 : 40	—	—	
1 : 80	—	—	
1 : 160	—	—	

Amboceptor siehe Wassermann vom 16. VI. 1925.

19. VI. 1925. Kultur 5 und 6. Gutes Wachstum, behandelt wie Kultur 1.

K. 5	2 Std.		24 Std.		Kontrollen:		2 Std.		24 Std.		
					K. 6						
1 : 10	±	±			1 : 10	±	±				
1 : 20	±	±			1 : 20	—	—				
1 : 40	—	—			1 : 40	—	—				
1 : 80	—	—			1 : 80	—	—				
	Kompl.		—			—		—		—	
	NaCl		—			—		—		—	

Amboceptor siehe Wassermann vom 19. VI. 1925.

Ergebnis: Vollständige Hämolyse zeigt sich in keinem einzigen Versuch. Die mit ± bezeichneten Ergebnisse lassen nicht auf Anwesenheit von Hämolsinen in den Kulturen schließen.

4. VI. 1925. Kaninchen Nr. 2 wird mit 10 ccm gewaschenen Hammelblutkörperchen (1 : 20) gespritzt. 15 Min. nach Einspritzung Herausnahme der Milz und Anlegen der Kulturen in P.G.N.-Plasma. Das verwendete Kaninchenserum zeigt keine Hämolsine gegen Hammelblutkörperchen.

	20 Min.	1 Std.
1 : 20	—	—
1 : 40	—	—
1 : 80	—	—

23. VI. 1925. Nur 2 Kulturen zeigen Wachstum und werden für den Hämolyseversuch verwandt.

K. 1	20 Min.	2 Std.	Kontrollen:
1 : 10	—	±	Kompl. —
1 : 20	—	±	NaCl —
1 : 40	—	—	
1 : 80	—	—	
1 : 160	—	—	

Amboceptor siehe Wassermann vom 23. VI. 1925.

K. 2	20 Min.	2 Std.
1 : 10	—	±
1 : 20	—	±
1 : 40	—	±
1 : 80	—	—

Ergebnis: Nach 2 Stunden zeigt sich in Kultur 2 bis zu einer Verdünnung von 1 : 40 eine leichte Aufhellung der Röhrchen, nirgends aber vollständige Lösung. Im abzentrifugierten Serum der Kulturen sind keine sicheren Hämolsine.

8. VI. 1925. Kaninchen Nr. 3 wird mit 9 ccm ungewaschenen Hammelblutkörperchen ins Herz gespritzt. 15 Min. nach Einspritzung Herausnahme der Milz. Kulturen in P.G.N.-Plasma. Das Kaninchenserum enthält keine Hämolsine gegen Hammelblutkörperchen.

	20 Min.	1 Std.	Kontrollen:
1 : 10	—	—	Kompl. —
1 : 20	—	—	NaCl —
1 : 40	—	—	
1 : 80	—	—	

30. VI. 1925. Kultur 1 und 2 deutliches nicht sehr üppiges Wachstum. Zum Hämolyseversuch bearbeitet wie Kultur 1 vom 11. VI. 1925.

K. 1	2 Std.	24 Std.	K. 2	2 Std.	24 Std.
1 : 10	—	—	1 : 10	—	—
1 : 20	—	—	1 : 20	—	—
1 : 40	—	—	1 : 40	—	—
1 : 80	—	—	1 : 80	—	—
1 : 160	—	—	1 : 160	—	—
Kompl. —					
NaCl —					

Amboceptor siehe Wassermann vom 30. VI. 1925.

Ergebnis: Im abzentrifugierten Serum der beiden Kulturen findet sich keine Spur von Hämolsinen.

23. VI. 1925. Kaninchen Nr. 4 Blutentnahme zum Anlegen von Kulturen. Dem Plasma von 6 Kammern wird 1 Tropfen einer ungewaschenen Hammelblutkörperchenaufschwemmung ca. 1 : 20 zugesetzt. Weitere 6 Kammern erhalten einen Tropfen einer Typhusvaccine (Ty-Stamm Agglutination 1 : 1600 + Milzkulturen von Kaninchen Nr. 4. Das Kaninchenserum enthält weder Agglutinine noch Hämolsine.

Agglutination			2 Std.	24 Std.	NaCl	—
1 : 20	—	—				
1 : 40	—	—				
usw.						
1 : 1280	—	—				
Hämolyse:			20 Min.	2 Std.	Kompl.	—
1 : 10	±	±				
1 : 20	±	±				
1 : 40	—	—				
1 : 80	—	—				
1 : 160	—	—				

3. VII. 1925. Hämolyseversuche mit den Kulturen 1—3 (Hammelblutzusatz).

K. 1: Üppiges Wachstum, beginnende Eintrocknung.

K. 2: Üppiges Wachstum von 4 Stücken.

K. 3: Üppiges Wachstum von 4 Stücken.

K. 1	K. 2	K. 3	20 Min.			2 Std.			24 Std.		
			K. 1	K. 2	K. 3	K. 1	K. 2	K. 3	K. 1	K. 2	K. 3
1 : 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Kompl. Kontr. —

NaCl Kontr. —

Amboceptor 1 : 800 WaR vom 3. VII. 1925.

4. VII. 1925. Agglutinationsversuche mit den Kulturen 1—3 (Vaccinezusatz).

K. 1: Sehr üppiges Wachstum, eigentümliche Hofbildung.

K. 2: Leicht eingetrocknet, sehr üppiges Wachstum.

K. 3: Nur ein Stück zeigt sehr gutes Wachstum.

	2 Std.			24 Std.			NaCl K. —
	K. 1	K. 2	K. 3	K. 1	K. 2	K. 3	
1 : 20	—	—	—	—	—	—	—
1 : 40	—	—	—	—	—	—	Ty-Stamm Kontr.
1 : 80	—	—	—	—	—	—	1 : 20 + + +
1 : 160	—	—	—	—	—	—	—
1 : 320	—	—	—	—	—	—	—

6. VII. 1925. Agglutinationsversuch mit Kulturen 4—6 (Vaccinezusatz).

K. 4: 2 Stücke üppig gewachsen.

K. 5: 3 Stücke gutes strahliges Wachstum.

K. 6: 5 Stücke von dichten Höfen umgeben, zum Teil Verflüssigung.

	2 Std.			24 Std.			NaCl K. —
	K. 4	K. 5	K. 6	K. 4	K. 5	K. 6	
1 : 20	—	—	—	—	—	—	—
1 : 40	—	—	—	—	—	—	Ty-Stamm Kontr.
1 : 80	—	—	—	—	—	—	1 : 20 + + +
1 : 160	—	—	—	—	—	—	—
1 : 320	—	—	—	—	—	—	—

7. VII. 1925. Hämolyseversuch mit Kulturen 4—6 (Hammelblutzusatz).

K. 4: Sehr üppiges Wachstum von 4 Stücken.

K. 5: Sehr üppiges Wachstum von 5 Stücken.

K. 6: Sehr üppiges Wachstum von 5 Stücken.

	20 Min.			1 Std.			24 Std.		
	K. 4	K. 5	K. 6	K. 4	K. 5	K. 6	K. 4	K. 5	K. 6
1 : 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 20	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 40	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 80	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 160	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 320	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Kompl. K. —

NaCl K. —

Amboceptor siehe Wa.R vom 7. VII. 1 : 1600.

Ergebnis: Weder Zusatz von Hammelblut ruft Bildung von Hämolsinen, noch Vaccinezusatz Bildung von Agglutininen hervor. Bei beiden Zusätzen ist aber sehr üppiges Wachstum fast aller eingepflanzten Stücke festzustellen.

2. VII. 1925. Kaninchen Nr. 5. Blutentnahme zum Anlegen von Plasmakulturen. Ein Teil der Kammer bekommmt einen Tropfen Hammelblutkörperchen (ungewaschen ca. 1 : 10 und 1 : 5), ein anderer Ty.-Vaccinezusatz (gutagglutinabler Ty.-Stamm). Die Auspflanzung der Milz erfolgt in P.G.N.-Plasma. Das Serum des Kaninchens Nr. 5 enthält Spuren von Hämolsinen, keine Agglutinine.

Agglutination:

	2 Std.		24 Std.		NaCl —
	1 : 20	—	—	—	
1 : 40	—	—	—	—	—
usw.					
1 : 640	—	—	—	—	—

Hämolyse:

	20 Min.	2 Std.	24 Std.
	1 : 10	+	+
1 : 20	—	±	+
1 : 40	—	—	±

	20 Min.	2 Std.	24 Std.	
1 : 80	—	—	±	
1 : 160	—	—	±	
		Kompl. K.	—	
		NaCl K.	—	

Amboceptor vom 3. VII. 1925. 1 : 800.

11. VII. 1925. Agglutinationsversuch mit Kulturen 1 und 2 (Vaccinezusatz).

K. 1: 4 Stücke sehr gutes Wachstum.

K. 2: 3 Stücke sehr gutes Wachstum (daneben Verunreinigung?)

	2 Std.		24 Std.		
	K. 1	K. 2	K. 1	K. 2	
1 : 20	—	—	—	—	NaCl K. —
1 : 40	—	—	—	—	
1 : 80	—	—	—	—	
1 : 160	—	—	—	—	
1 : 320	—	—	—	—	

14. VII. 1925. Hämolyseversuch von K. 1 bis K. 3 (Hammelblutzusatz).

K. 1: (Hammelblut 1 : 5) 4 Stücke gutes strahlenförmiges Wachstum.

K. 2: Wachstum üppig, beginnende Vertrocknung.

K. 3: Geringes Wachstum (verunreinigt).

	20 Min.			2 Std.			
	K. 1	K. 2	K. 3	K. 1	K. 2	K. 3	
1 : 10	—	—	—	±	±	±	Kompl. —
1 : 20	—	—	—	±	±	±	NaCl —
1 : 40	—	—	—	±	±	±	

Amboceptor vom 14. VII. 1925. 1 : 800.

Fixiert wurden:

K. 3: Vaccinezusatz am 11. VII. 1925
 K. 4: Vaccinezusatz am 24. VII. 1925
 K. 4: Hammelblutzusatz am 18. VII. 1925 } überall ausgezeichnetes
 Wachstum

Literaturverzeichnis.

Fischer, Albert, Tissue Culture Copenhagen 1925 (sehr vollständige Nachweise). — *Lubarsch-Wolff*, Jahreskurse f. ärztl. Fortbildung. München 1925, Heft 1. — *Erdmann, Rh.*, Praktikum der Gewebepflege usw. Berlin 1922. — *Kuczynski*, Dtsch. pathol. Ges. 1923. — *Aschoff, L.*, Das Reticulo-endotheliale System in Ergebni. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 26. 1924.