

(Aus dem Pathologisch-anatomischen Laboratorium des Staatsinstituts für medizinische Wissenschaften in Leningrad. — Vorstand: Prof. Th. Süssow.)

Einige histologische Beobachtungen am isolierten Kaninchenohre.

Von

Assist. B. Malyschew.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. September 1925.)

Vorliegende Arbeit verdankt ihr Entstehen einer Beobachtung von Süssow, die er bei der Durchsicht von Präparaten eines nach Krawkow isolierten Kaninchenohres in den Versuchen von Kanewskaja gemacht hatte.

Eine eingehende Untersuchung dieser Präparate gestattete anzunehmen, daß eine bakterielle Emulsion, die in die Gewebe oder durch die Gefäße des isolierten Ohres eingebracht wird, eine Herdreaktion hervorruft, in Form einer Anhäufung von sich mobilisierenden lokalen Zellen.

Diese Beobachtung bedurfte selbstverständlich weiterer Untersuchungen.

Wir wissen ja zudem noch recht wenig, inwiefern die Zellen eines isolierten Ohres ihre biologischen Eigenschaften behalten, d. h. inwieweit ein isoliertes Organ seine Lebensfähigkeit behält.

Noch weniger wissen wir über den Charakter der histologischen Veränderungen, die bei verschiedenen pharmakologischen Einwirkungen oder bei irgendwelchen anderen Arten von Einwirkung im isolierten Ohr entstehen.

Nun aber gewinnt die Prüfung am isolierten Ohr eine immer größere Anwendung in der Klinik und im Laboratorium und bedarf einer Beobachtung auch vom histologischen Standpunkte aus.

Aus diesen Gründen wollten wir in der vorliegenden Arbeit die Prüfung folgender Fragen vornehmen: erstens, ob tatsächlich reaktive Veränderungen in den Geweben in Form von herdförmigen Ansammlungen der Zellen existieren; zweitens, ob die Zellen des isolierten Ohres ihre Fähigkeit zur Phagocytose den eingeführten Bakterien gegenüber bewahren; drittens, ob die Zellen (Histiocyten) ihre Fähigkeit bewahren,

Teilchen vitalfarbender und anderer Substanzen, z. B. Eisen, im Protoplasma in Form von Granulis abzulagern; endlich, ob auch Mitosen existieren, d. h. ob die Funktion der Zellvermehrung noch besteht.

Entsprechende Literaturangaben sind recht spärlich.

In der Arbeit von *Kanewskaja* findet man Hinweise, daß die in das Gewebe des isolierten Ohres eingebrachten Bakterien zum Teil im Zellenprotoplasma eingeschlossen gefunden werden.

Ssyojew benutzte die Methode der Vitalfärbung, um zu klären, ob die Zellen der isolierten Organe der Kalt- und Warmblüter sich im normalen oder pathologischen Zustande befinden. Bei der Untersuchung von isolierten Kaninchenohren, wobei Trypanblau 1 : 1000, 1 : 1500 und 1 : 2000 während 5 $\frac{1}{2}$, 6 und 12 Stunden durch die Gefäße geleitet wurde, konnten nur in einem von 4 Fällen (6 Stunden-Versuch) einige Histiocyten gefunden werden, deren Protoplasma hellblaue Körner der Farbe enthielt.

Weitere Angaben über histologische Veränderungen im isolierten Ohr sind, soweit mir bekannt, in der Literatur nicht vorhanden.

Unsere Untersuchungen umfassen im ganzen 14 isolierte Kaninchenohren.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

Das Ohr, unmittelbar nachdem es isoliert war, kam in den Apparat zur Beobachtung der isolierten Organe.

Durch die Gefäße wurde auf 37° erwärmte Ringer-Lockesche Flüssigkeit so lange geleitet, bis die Zahl der ausfließenden Tropfen eine konstante blieb.

In 4 Fällen wurden 2 Stunden nach der Isolierung unmittelbar in das Gewebe mittels einer Spritze 0,2 ccm bakterieller Emulsion [1 Platinöse der Kultur verdünnt in 10 ccm R.-L.¹⁾] eingebracht (wir benutzten eine Kultur von *Staphylococcus aureus*, die aus einer Leiche 1—2 Tage vorher gezüchtet war).

Während der ganzen Versuchsdauer blieb die R.-L. auf 37° erwärmt.

Diese Versuche dauerten 5, 6, 8 und 9 Stunden.

In einem Falle wurde die bakterielle Emulsion mit der R.-L. zusammen durch die Ohrgefäße geleitet (Versuchsdauer 10 Stunden).

Als Kontrolle benutzten wir das zweite Ohr desselben Kaninchens.

In 3 Versuchen brachten wir dasselbe in den Apparat auf dieselbe Zeitspanne wie das Ohr, an dem der Versuch ausgeführt wurde. Eine Kontrolle wurde noch derart ausgeführt, daß in das Gewebe eines frisch isolierten Ohres, welches mit R.-L. nicht durchgespült war, die Staphylokokkenemulsion eingespritzt und daraufhin das Ohr in den Thermostaten bei 37° in einem Glase mit R.-L. auf 6 Stunden gestellt wurde.

Eine Kontrolle endlich bestand darin, daß das Ohr, in welches keine Bakterien eingespritzt wurden, einfach bei Zimmertemperatur während der ganzen Versuchsdauer bewahrt wurde.

Während des Versuches wurde das Ohr wie üblich durch Stecknadeln an einer Korkplatte fixiert, und dieselben blieben den ganzen Versuch hindurch in dem Gewebe stecken.

Vor und nach dem Versuche wurden die Ohren gewogen, um auf diese Weise Aufschluß über den Grad des Ödems zu erlangen.

Nach dem Versuche entfernten wir die Haare durch Rasieren und schnitten aus verschiedenen Stellen des Ohres 10 Stückchen aus, darunter auch die Stelle, wo vor-

1) R.-L. = Ringer-Lockesche Flüssigkeit.

her die Stecknadel gesteckt hatte. Die Stückchen wurden in Zencker-Formol fixiert und in Celloidin eingebettet. Weiterhin wurden die Stückchen zumeist von der Fläche aus geschnitten und Serien über ein Schnitt gemacht. Gefärbt wurde mit Azur II-Eosin, Hämatoxylin-Eosin; außerdem wurden Reaktionen auf Eisen angewandt nach *Perls* und in einigen Fällen mit Ammoniumsulfat.

Ich will hier nicht auf die Beurteilung der biologischen Reaktion eingehen, die in den Gefäßen des Ohres auftritt, wenn in dieselben oder direkt ins Gewebe Bakterien eingeführt werden; auch lasse ich vorerst beiseite die Frage über den Ursprung des Ödems im isolierten Ohr, da diese Fragen nicht zu meinen unmittelbaren Aufgaben gehören. Ich will deshalb zur Schilderung der histologischen Veränderungen, die im isolierten Ohr beobachtet worden sind, übergehen.

Wie in den Fällen, wo Bakterien eingeführt worden waren, so auch in den Kontrollfällen, ist das Gewebe des Ohres etwas ödematös.

Der Grad des Ödems ist in den verschiedenen Versuchen nicht gleich. In manchen Fällen findet man eine ausgesprochene Anschwellung der kollagenen Fasern; in anderen Fällen dagegen lassen sich Anzeichen eines Ödems mikroskopisch kaum feststellen. Die Kernstruktur bleibt meistenteils bewahrt; Karyorrhexis und Pyknoseerscheinungen konnten nur in seltenen Fällen gefunden werden.

Bloß in 2 Fällen, wo Bakterien in das Gewebe eingespritzt wurden, traten bedeutende Veränderungen in der Kernstruktur der Zellen (Karyorrhexis, Pyknose) auf. In manchen Zellen konnte eine Vakuolisierung des Protoplasmas beobachtet werden.

Das Endothel der Gefäßwände bleibt meistenteils bewahrt. Stellenweise stößt man auf eine Schwellung der endothelialen Zellen, mitunter sogar auf ihr völliges Ablösen vom Zellverband, so daß sie frei im Gefäßlumen zu liegen kommen. Teilweise ähneln diese geschwollenen und losgelösten Zellen, ihren morphologischen Eigenschaften nach, den Fibroblasten. Deutlicher ausgeprägt ist eine Abstoßung der Endothelien in dem Versuche, wo die Bakterien durch die Gefäße geleitet wurden. Größere Ansammlungen von losgelösten endothelialen Zellen, die die Gefäßlichtung verschließen, werden überhaupt selten gefunden.

Im Gefäßlumen stößt man auf verschiedene Erythrocyten und polymorphe Leukocyten.

Im Gewebe findet man hin und wieder pseudoeosinophile Leukozyten (rsp. neutrophile Leukocyten des Menschen).

An Stellen, wo Bakterienemulsion eingespritzt wurde, sieht man im Gewebe große Mengen von Bakterien. An diesen Stellen färben sich die Zellen schlechter, Histiocyten phagocytieren die Bakterien nicht, somit scheint die Funktion dieser Zellen gestört zu sein.

In anderen Teilen des Ohres, die weiter von der Einspritzungsstelle der Bakterien gelegen sind, wo weniger Bakterien vorhanden sind, konnte eine Bakterienphagocytose seitens der Histiocyten festgestellt werden,

und zwar in 4 aus den 5 in dieser Richtung vorgenommenen Versuchen.

Dabei wurden die phagocytierten Bakterien öfter in den Histiocyten getroffen (Abb. 1), welche neben den Capillaren liegen (Adventitielle Zellen *Marchands*). Manche Histiocyten enthalten auch andere Einschlüsse, die sich mit Azur färbten — wahrscheinlich handelte es sich um kleinste Agarteilchen, die mit der bakteriellen Emulsion eingeführt worden waren.

In dem Versuche, wo die Bakterienemulsion durch die Gefäße geleitet wurde, ließ sich ihre Phagocytose durch die Pseudoeosinophilen innerhalb des Gefäßlumens feststellen. In diesem Falle füllten die Bak-

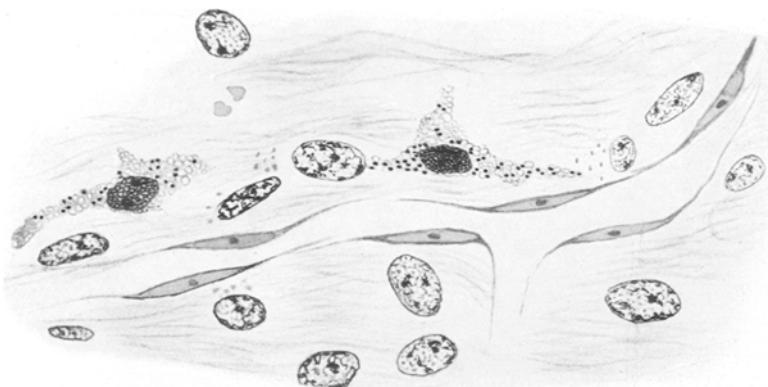


Abb. 1. Staphylokokkenphagocytose seitens der Histiocyten des isolierten Kaninchenohres. Vers. 5. Dauer 8 Stunden. Leitzimmers. Nr. 12. Ok. 8.

terien auch die kleinsten Capillaren aus, drangen aber ins Gewebe des Ohres fast gar nicht ein. In jenen Fällen, wo ein solches Vordringen festzustellen war, konnte auch eine Phagocytose durch die Histiocyten gefunden werden.

Im Protoplasma der Endothelzellen konnten Bakterien nicht gefunden werden.

Die Frage bezüglich der reaktiven Anhäufung von Zellen unter dem Einfluß der ins isolierte Ohr eingeführten Bakterien kann an unserem Material nicht endgültig gelöst werden.

Man sieht tatsächlich herdförmige Anhäufungen von Histiocyten und lymphoiden Zellen, mitunter mit Phagocytoseerscheinungen; öfter findet diese Erscheinung neben den Blutgefäßen statt. Manchmal sind diese Anhäufungen recht ausgesprochen, jedoch aber konnte bisher kein beständiger und scharfer Unterschied im Vergleich zu den Kontrollpräparaten festgestellt werden.

In keinem einzigen Falle haben wir Mitosenbilder gefunden.

Außer Phagocytose gelang es noch eine sehr bemerkenswerte Erscheinung festzustellen, die für die Erhaltung der biologischen Eigenchaften seitens der Zellen des isolierten Kaninchenohres spricht.

Es handelt sich nämlich um Ablagerung von Eisen in den Zellen und Geweben, die in der Nähe der Einstichstelle der Stecknadel gelegen waren.

Diese Stellen wurden in 12 Kaninchenohren genau untersucht: In 7 Fällen, wo die R.-L. durch die Gefäße geleitet worden war; in 1 Falle, wo das Ohr vorher nicht durchgespült wurde und welches bei Zimmertemperatur bewahrt wurde; in diesen Fällen betrug die Dauer des Versuches 5—10 Stunden.

Außer diesen Versuchen wurden, um die Frage, inwiefern die Eisenablagerung in den Ohrgeweben einen biologischen Prozeß darstellt, zu erklären, zum Vergleiche noch 2 Kontrollversuche ausgeführt: 1. Zwei Ohren wurden 6 Stunden vor der Isolierung mit einer Stecknadel durchgestochen und unverzüglich nach der Isolierung zur Untersuchung genommen; 2. in 2 Versuchen waren die isolierten Ohren, ohne vorher durchspült zu werden, von einer Stecknadel durchgestochen und, nachdem Bakterien ins Gewebe eingespritzt wurden, bei 37° für 24 Stunden in den Thermostaten gestellt, wo sich eine Fäulnis entwickelte.

In jenen 7 Fällen, wo durch die Gefäße die R.-L. geleitet wurde, waren die Erscheinungen folgendermaßen: an der Einstichstelle ist eine Öffnung vorhanden, von einem breiten Ringe kollagener Bindegewebefasern umgeben.

Zwischen diesem Gewebe liegen länglich gezogene Zellen, offenbar teils Histiocytten, teils Fibroblasten.

In ihrem Protoplasma kann man keine Körner bemerken, die die Eisenreaktion nach *Perls* geben.

Die Kerne dieser Zellen ergeben hin und wieder bei der Eisenreaktion auch diffuse bläulich-grüne Durchfärbung.

An der Peripherie des Ringes aus zusammengedrückten kollagenen Fasern findet man Histiocytten, deren morphologische Eigenschaften gut ausgesprochen sind. Die Kerne dieser Zellen ergeben bei der Eisenreaktion keine diffuse Durchfärbung.

Ihr Protoplasma dagegen enthält das Eisen in großen Mengen in Form von Körnern verschiedener Größe.

In einem Falle fand die Ablagerung von Eisen im Protoplasma zugleich mit einer Phagocytose von Bakterien statt.

Eisenablagerungen wurden nicht nur in den Bindegewebezellen gefunden, sondern das Eisen wurde in Form von Granulas auch im Protoplasma der Deckepithelzellen und im Epithel der Haarwurzeln nachgewiesen.

Nahe der Stelle, wo die Stecknadel gesteckt hatte, ergeben bei der Reaktion aufs Eisen die Kerne und das Protoplasma der Zellen eine diffuse Durchfärbung. In weiter gelegenen Teilen findet man deutliche epitheliale Zellen, in deren Protoplasma nebst gelblichem, eisenfreiem

Pigment, auch bläulich-grüne Eisenkörner sichtbar sind. (Abb. 2.) Hautpigment sowie das in Chromatophoren eingeschlossene Pigment gaben kein einziges Mal die Eisenreaktion.

Das Eisen lagert sich ebenfalls in Form von Granula im Protoplasma der Bindegewebezellen ab, die um die Haarwurzeln herum gelegen sind; und auch das Knorpelgewebe ergibt bei der Eisenreaktion eine diffuse Durchfärbung.

In 2 Fällen, wo die Stecknadel in unmittelbarer Nähe der Wand einer ziemlich großen Arterie gesteckt hatte, fanden wir diffuse und teils körnige Eisenablagerungen zwischen den Muskelfasern der Gefäßwand und in denselben.

Das Bild der Eisenablagerung, welches man in den unisolierten

Ohren bekommt, wenn man dieselben vorher mit einer Stecknadel durchgestochen hat, ist fast dasselbe wie das eben beschriebene. Nur sind in der Umgebung Erscheinungen einer Hyperämie und geringe Anhäufungen von Pseudoeosinophilen zu finden.

In den 2 Fällen, wo die Ohren 24 Stunden lang im Thermostaten geblieben sind und in Fäulnis über-

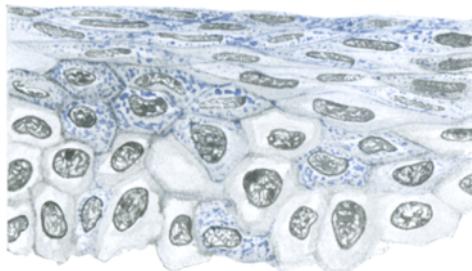
Abb. 2. Eisenablagerung im Protoplasma der Deckepithelzellen des isolierten Kaninchenohres in Form von Granulas. Berlinerblaureaktion. Vers. 3. Dauer 5 Stunden. Leitz-immers. Nr. 12. Ok. 8.

gegangen waren, ergab die Eisenreaktion eine ausgedehnte diffuse Durchfärbung der Zellen und der Gewebe. Eisenablagerung im Protoplasma wie der Bindegewebezellen, so auch der Epithelzellen, wurde nicht gefunden.

Die diffuse Eisendurchtränkung spricht zweifelsohne für einen pathologischen Zustand der Gewebe. Dagegen aber fanden wir in unseren Hauptversuchen, von denen früher die Rede war, wo das Leben der Gewebe mittels Durchleitung der R.-L. unterhalten wurde, das Eisen im Protoplasma der Zellen in Form von Granulas.

Dieser Umstand kann, wie mir scheint, dadurch erklärt werden, daß die biologische Fähigkeit der Zellen, das Eisen wie die Farbe aus ihrer kolloidalen Lösung zu absorbieren, erhalten ist.

In dieser Weise bestätigen unsere Versuche, daß eine Phagocytose seitens der Gewebehistiozyten und Pseudoeosinophilen im isolierten Ohr stattfindet; zugleich ergeben sie auch, daß das Eisen sich im Zellenprotoplasma entsprechend dem Typus einer kolloidalen chemischen Reaktion ablagert.



Diese Umstände gestatten anzunehmen, daß die Zellen des isolierten Kaninchenohres ihre biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften länger bewahren als es früher angenommen wurde.

Diese Annahme soll durch weitere Versuche, die in unserem Laboratorium nach der Methode der Vitalfärbung vorgenommen werden, geprüft und bestätigt werden.

Unsere Versuche können als ein weiterer Beweis gelten, daß *Krawkow* recht hatte, als er äußerte, daß die Zellen und die Gewebe der isolierten Organe ihre biologischen Funktionen in hohem Grade bewahren.

Literaturverzeichnis.

- 1) *Ssyssojew, Th.*, Versuch einer Anwendung der Vitalfärbungsmethode an isolierten Organen. *Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol.* **250**, H. 1/2, S. 163.
— 2) *Kanewskaja, E. I.*, Über entzündliche Reaktion isolierter Organe. *Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.* **41**, H. 1/3, S. 380.