

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Greifswald.  
Direktor: Prof. Dr. Leupold.)

## Über Bedingungen des Wachstums auf Grund von Untersuchungen an Gewebekulturen<sup>1</sup>.

Von

Dr. H. Guillery,  
Privatdozent.

Mit 24 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Juni 1928.)

Für die Kenntnis krankhafter Wachstumsarten als dynamisches Geschehen bestehen insofern Schwierigkeiten, als wir vergebens nach den Bedingungen der Wachstumsauslösung und des Wachstumsstillstandes fragen. Entsprechend unserem sonst gültigen Wissen von Krankheitsvorgängen dürfen wir auch hier vermuten, daß kein grundsätzlicher Unterschied zwischen dem gesuchten Krankheitsverlauf und ihm vergleichbaren normalen Wachstumseignissen bestehen wird, daß wir aus der Kenntnis vergleichbarer normaler Vorgänge auch beim Wachstum auf dessen krankhafte Arten schließen können. Aussichtsreich ist die Untersuchung normaler Geschehnisse hier aber auch deshalb ganz besonders, weil die bedeutendste Art normalen Wachstums, das embryonale, durch das Zurücktreten aller übrigen Leistungen des Körpers während dieser Zeit hinter diese eine ausgezeichnet ist. Bei der embryonalen Entwicklung wird also die Wachstumsleistung in ganz besonders reiner und unverwickelter Form zu finden sein.

Als grundlegenden Vorgang bei der embryonalen Entwicklung stehen wir uns vor, daß bei der Vereinigung der Geschlechtszellen Kräfte freiwerden und auf vorhandene oder zugeführte Stoffe derartig einwirken, daß diese Stoffe für den Bestand der lebendigen Substanz geeignet und in sie eingebaut werden. Im Verlauf dieser Vorgänge scheinen unter anderem Hemmungen zu entstehen, die einzelne der wirksamen Kräfte oder Aufbaustoffe unbrauchbar machen. Vielleicht werden auch geradezu irgendwelche notwendigen Bedingungen verbraucht. Wir kommen nicht weiter als bis zu Vermutungen darüber, ob die Ausbildung

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde ausgeführt mit großzügiger Unterstützung der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Universität Greifswald.

von Hemmungen oder der Verbrauch notwendiger Bedingungen die größere Rolle spielt. Jedenfalls entsteht ein Stadium der Unzulänglichkeit von Wachstumsbedingungen, das der abgeschlossenen Entwicklung und dem Wachstumsstillstand entspricht. Aus der Gleichgewichtslage hinaus, als welche dieser Zustand bezeichnet werden kann, und in neue Kräfteinwirkungen hinein führen fast ganz unbekannte Einflüsse bei jener übergroßen Zahl von Wachstumsvorgängen, die unabhängig von den ursprünglichen embryologischen, beispielsweise bei Entzündungen und bei Gewächsbildungen stattfinden. Bekanntlich wird auch hierbei in einem Teil der Fälle das Gleichgewicht wiederhergestellt. Ebendiese Frage der Wiederherstellung des Gleichgewichtes, der Ausbildung von Hemmungswirkungen ist von allen die offenbar wichtigste. An dieser Stelle ist unsere Vorstellung vom Wesen des Gewächses mehr als sonst unzulänglich.

Unter den Möglichkeiten, an diese Fragen heranzutreten, ist in angedeuteter Weise die Untersuchung des embryologischen Wachstums eine besonders aussichtsreiche. Unterstützend kommt hinzu, daß wir im Besitze einer Arbeitsweise sind, die das Wachstum auch experimentell in etwa aus der Summe der übrigen Vorgänge herauszulösen gestattet, die ferner die Untersuchung des lebendigen Geschehens außerhalb des Organismus ermöglicht. Diese Arbeitsweise ist die künstliche Gewebezüchtung, die auch ihrer bisherigen Ergebnisse wegen geeignet erscheint, für diese Fragen immer wieder herangezogen zu werden. Die enge Vermischung von Wachstumsvorgängen und andersartigen bei den sonst möglichen Arbeitsweisen und die beträchtlichen daraus entstehenden Schwierigkeiten machen die Gewebezüchtung nicht zuletzt zur Methode der Wahl.

Die vorhandenen ausführlichen Berichte<sup>1</sup> über die Ergebnisse der Gewebezüchtung entwerten einen neuen derartigen Bericht im voraus und gestatten die ausschließliche Besprechung einzelner Sonderfragen.

Als Untersuchungen der Energetik des Wachstumsorganges sind an erster Stelle Arbeiten von *Carrel, Ebeling* und *Drew* zu nennen, jene Untersuchungen der Extrakt- und Serumwirkungen, deren Ergebnisse im Laufe der Jahre so völlig umgewertet wurden. Ältere Arbeiten schienen zu beweisen, daß im Embryonalextrakt wachstumsfördernde Stoffe enthalten sind, die ausschließlich die Bedeutung des Extraktes für das Wachstum ausmachen.

Im Serum wurden Stoffe vermutet, die ausschließlich Nährmaterial bedeuten. Diese Lehre entstand vor allem aus der Beobachtung, daß im Serum (Plasma) allein die Kultur verhältnismäßig bald abstirbt, während durch Zugabe von Embryonalextrakt die Kultur geeigneter Gewebe unsterblich zu werden scheint. In den neueren Veröffentlichungen der genannten Forscher werden diese Einflüsse, die von Serum und

<sup>1</sup> *Oppel, Erdmann, Lubarsch-Wolff* u. a.

Extrakt ausgehen, geradezu vertauscht. Diese Wandlung begann mit der Entdeckung von wachstumshemmenden und -fördernden Stoffen im Serum, die in geeigneter Anordnung des Versuches entfernt und durch die Wachstumsänderungen bestimmt werden können. Untersuchungen über Organextrakte, die in ihren Wirkungen mit dem Embryonalextrakt verglichen werden könnten, lehrten zwar nicht einen einzigen Extrakt kennen, der dem Embryonalextrakt völlig gleichwertig ist, aber es fanden sich doch einzelne Organe, deren Extrakte in der Wirkung dem embryonalen nahekamen. Neben Milz und Knochenmark ergaben vor allem Leukocyten solche Extrakte. Als es dann gelang, Fibroblastenkulturen auf Nährböden zu übertragen, auf denen vorher Leukocyten gelebt hatten, zeigten sich Verbesserungen des Wachstums der Fibroblasten, vergleichbar den mit Embryonalextrakt erzielten. Aus diesen nur in den wesentlichen Zügen wiedergegebenen Arbeiten entstand die Lehre von den im Embryonalextrakt enthaltenen Trehonen und den Hormonen des Serums. Das heißt, es wurde so dem Extrakt die Bedeutung des Nährstoffes, dem Serum die Rolle des fermentativ oder sonstwie fördernden Bestandteiles zugewiesen. Am Beispiel der Leukozytenwirkung bildete sich die Vorstellung, daß die zum Wachstum notwendigen Stoffe durch lebendige Zellen (Leukocyten und embryonale Zellen) vorbereitet sein müssen, ehe sie von der wachsenden Zelle verwendet werden können.

Wie schon angedeutet, ist zu erwarten, daß bei der Untersuchung des lebendigen und wachsenden Gewebes nicht der eine oder andere Faktor gefunden wird, der eine ausschließliche oder auch nur überwiegende Bedeutung hat. Vielmehr ist zu erwarten, daß ein Bedingungskomplex vorliegt von größter und verwickelter Vielheit. Und es entspricht nicht nur der Vorstellung, sondern erhellt aus vielfacher Erfahrung, daß geringfügige Änderungen offenbar untergeordneter Faktoren nennenswerten Einfluß auf das Wachstum nehmen können. Daraus folgt die Schwierigkeit, den einzelnen Faktor zu werten und nach solchen erfolgreich zu fahnden, die übergeordnete Bedeutung haben. Es ist wohl erlaubt, zur teilweisen Beseitigung solcher Schwierigkeiten alle solche Faktoren von der Untersuchung auszuschließen, deren Beständigkeit bekannt ist. Oder anders gesagt, alle diese nicht als Unbekannte, sondern als Konstante in die Rechnung einzusetzen. Was übrigbleibt, ist weiter eine unbekannt große Zahl von Umständen, teils vielleicht solchen, deren Beständigkeit uns nicht bekannt ist, teils sicherlich anderen, die als unbeständig die gesuchten darstellen, die im Sinne von *Roux* realisierende sind. Mehr als diese Orientierung scheint im voraus von hier aus nicht gewonnen werden zu können.

Weitere Aufschlüsse entstehen aus den methodischen Möglichkeiten. Das zu verwendende Untersuchungsverfahren: die meßbare Wachstums-

leistung als Indicator für die wirkenden Faktoren oder umgekehrt die gleichbleibenden äußereren Bedingungen als Indicator für verschiedene Wachstumsleistungen verschieden wachsender Gewebe, hat zur Voraussetzung, daß die Fehlerquellen genügend klein und die erhaltenen Ausschläge genügend groß sind, um verwendet werden zu können. Da eine feststehende und allgemein gültige Untersuchungsweise nicht denkbar ist, so wird die Auswahl unter diesen und die Bestimmung der geeigneten das erste Erfordernis sein. Da aus der Untersuchung der Embryonal-extrakt- und Serumwirkungen zunächst die gesuchten Aufschlüsse zu erwarten sind, so wird die Prüfung der dazu angegebenen Verfahren ebenfalls oben an stehen. Aus den vorliegenden Mitteilungen über diese Verfahren läßt sich entnehmen, daß sie mutmaßlich Änderungen erfahren müssen, um genügend genaue Ergebnisse zu gewährleisten. Die eigenartige Tatsache, daß die Embryonalextrakte als solche wirksam sind, gleich von welchem Tiere sie stammen und bei dem Gewebe welchen Tieres sie angewendet werden, bedarf der näheren Prüfung ebensosehr wie die nur ungefähre Angabe, daß Unterschiede in der Wirksamkeit durch das Alter des verwendeten Embryo bedingt werden. Bedenken entstehen auch dadurch, daß bei der Art der Herstellung des Embryonalextraktes das gesamte Serum des verwendeten Embryos im Extrakt enthalten sein muß. Also wird eine gegenüberstellende Untersuchung von Extrakt und Serumwirkungen gar nicht durchführbar sein. Größere Schwierigkeiten bereitet der Vorstellung auch die scheinbar unvermeidliche Verwendung von Plasma. Denn mit dessen vielleicht notwendiger Gerüstsubstanz, das heißt zusammen mit dem Fibrin, werden vermutlich unbestimmt große Mengen von Serum, also spezifisch wirksamen Stoffen, verwendet. Deren Ausschaltung erscheint vorerst unmöglich. Bedenken entstehen ferner gegen Vergrößerungen der Kultur im Verlauf von Stunden oder Tagen als Ausdruck des Wachstums. Denn wenn schon sichergestellt ist, daß die Kultur wachsen kann, so ist doch gleichzeitig eine Flächenzunahme durch Änderung der Zellverteilung denkbar und in vielen Fällen als Einwand gegen echtes Wachstum erwiesen worden. Das zwischen Überlebungserscheinungen und echtem Wachstum gefundene Unterscheidungsmittel des nur wochenlangen Überlebens im Gegensatz zu monatelangem Wachstum kommt ja dabei als methodisch ungeeignet nicht in Frage. Es ist nicht durchführbar, dem angestellten Versuch monatelanges weiteres Züchten folgen zu lassen, um hinterher sagen zu können, daß es sich damals wirklich um einen Wachstumsversuch handelte. Auch geht es nicht an, nach monatelangem Züchten die Kultur zum Versuch zu verwenden, weil sich dabei ebensowenig beweisen läßt, daß unter den Versuchsbedingungen immer noch Wachstum stattfindet und es sich jetzt nicht nur um Überleben handelt. Weiter

ist anzunehmen, daß jedes Explantat, gleich ob es unmittelbar dem Organismus oder einer beliebig alten Kultur entstammt, so oft es überhaupt wachsendes Gewebe ist, eine gewisse Menge von Wachstumsmöglichkeiten in den Versuch mitbringt. So würde also nicht zu entscheiden sein, ob unter dem Einfluß des Versuches oder aus eigenen Beständen das Wachstum erfolgte, sondern nur Verbesserungen oder Verschlechterungen der Wachstumskraft wären eindeutig abzulesen. So erweist sich das mögliche Verfahren als behaftet mit Eigentümlichkeiten, die zum mindesten vorerst Bedenken entstehen lassen und Prüfungen der Methode zur Voraussetzung machen. Gesetzt, daß die bestehenden Bedenken sich dabei beseitigen lassen, müßte am Explantat, das lebendig im Sinne von wachstumsfähig sich in einer Ruhelage befindet, in der es nicht wächst, die Auslösung des Wachstums versucht werden durch Zugabe wachstumsbedingender Stoffe. Aus der Überlegung wäre unter solchen Stoffen der Embryonalextrakt allerdings der letzte, falls es sich dabei um einen Extrakt organisierter Bestandteile des Embryos handelt. Man wird sich zunächst nicht vorstellen, daß aus dem Zerfall organisierter Teile (das heißt aus deren Extrakt) die Aufbaustoffe für andere Teile entstehen. Auch würde man damit die Aufgabe ja nur verschieben und nicht lösen; denn selbst wenn aus dem Zerfall oder Extrakt des einen Teiles der andere gebildet wird, so muß doch irgendwann einmal eine unmittelbar aus Dotterbestandteilen aufbauende Kraft vorhanden gewesen sein. Diese Kraft ist die gesuchte.

Aus ihren erwähnten Arbeiten entnehmen *Carrel* und *Ebeling*, daß es sich beim Embryonalextrakt nicht um extrahierte organisierte Stoffe handelt, sondern um Aufbaumaterial, das von außen dem Embryo zugeführt und durch Einwirkung seiner lebenden Zellen umgewandelt, in geeignete Form gebracht wurde. Daraus ergäben sich mehrere neue Möglichkeiten für die weitere Untersuchung. Allem Anschein nach kommt das Vermögen, vorhandene und angebotene Stoffe in geeignete Aufbaustoffe zu verwandeln, keinesfalls allen embryonalen Zellen zu. Denn beim eierlegenden Tier stellen Eiweiß- und Dotterbestandteile, beim lebendgebärenden mütterliche Blutbestandteile fraglos Vorstufen der Aufbaustoffe dar, und wenn das übrige, die Umwandlung dieser Vorstufen, Sache der Embryonalzelle schlechthin wäre, so müßten die Explantate der einen Art von Embryonen auf Nährböden aus unverbrauchten Eibestandteilen, die anderen auf solchen aus Blutbestandteilen wachsen, ohne auf Embryonalextrakt angewiesen zu sein. Die dem widersprechenden Tatsachen lehren, daß nicht jede embryonale Zelle die gedachten Fähigkeiten besitzen kann. Wenn aber trotzdem die Überlegungen der genannten Forscher richtig begründet sind, dann gibt es immerhin Arten von Embryonalzellen, die solche Fähigkeiten

besitzen und darin vermutlich die Leukocyten noch übertreffen. Diese Zellen bestimmter Art könnten gleichmäßig verteilt und Bestandteil aller embryonalen Gewebe sein, oder sie sind an Stellen im Embryo angehäuft, von wo aus sie das gesamte angebotene Material bearbeiten und danach weitergeben können. Der Versuch müßte lehren, welche von diesen Möglichkeiten verwirklicht ist, und der Einwand, daß im erstgenannten Falle der gleichmäßigen Verteilung jedes beliebige, zur Kultur verwendete Teil des Embryo auf Grund des Besitzes solcher Zellen ohne Extraktzugabe wachsen müßte, ist nicht stichhaltig. Es ist nämlich nicht gesagt, daß diese besondere Zellart im Explantat erhalten bleiben muß und also ihre Wirkung entfalten kann, wie ja auch sonst bei der Züchtung die eine Zellart die andere verdrängt. Wo andererseits, wenn es sich um Leistungen von Zellen handeln sollte, die nicht gleichmäßig verteilt sind, diese Zellen zu suchen wären und welches Organ sie besäße, läßt sich nicht erschließen, denn die vorzustellende Zugänglichkeit für die zu bearbeitenden Stoffe und ebenso die Möglichkeit der Weiterleitung und Verteilung, würde durch den Dotter- und Körperkreislauf an fast allen Orten gewährleistet sein. Der Ort dieser Leistung würde im übrigen nur so lange Beachtung verdienen, als daraus Schlüsse auf die Art der Leistung erhofft werden.

Demnach ist im Versuch zu ermitteln, ob das Wirksame des Embryonalextraktes solche Stoffe sind, die im lebenden Embryo zu den nicht-organisierten, etwa im Blute kreisenden gehören, oder ob es sich um Zellbestandteile handelt, die im Tode und im Extraktionsverfahren freigemacht wurden.

Das Ergebnis solcher Untersuchungen erschließt weitere Arbeitsmöglichkeiten. So etwa ist zu erwägen, ob die chemische Beschaffenheit der zum Aufbau geeigneten Stoffe, verglichen mit der chemischen Beschaffenheit der übrigen, normalerweise vorhandenen Körperflüssigkeiten, über die Bedingungen des Aufbaues und Wachstums neue Aufschlüsse gibt.

Schließlich darf nicht außer acht gelassen werden, was es bedeutet, wenn die Meinung von *Carrel* und *Ebeling* sich bestätigen läßt. Wir müßten dann annehmen, daß die an lebendige Zellen gebundene Umwandlung von Stoffen in solche, die zum Aufbau geeignet sind, eine spezifisch-embryonale Stoffwechselkraft in bestimmten Zellen voraussetzt, eine solche, die verbraucht wird oder Hemmungen erfährt, so daß es zum Wachstumsstillstand kommt.

Es bedarf kaum des Hinweises, wie eng solche Aufschlüsse mit Fragen des krankhaften Wachstums zusammenhängen und die Fragen nach dessen Auslösung und Stillstand berühren.

Eine letzte Erwägung verdient die Wahl des Untersuchungsobjektes. Zweifelsohne liefert der Hühnerembryo das am leichtesten zu hand-

habende Material. Das gilt zunächst für die Gewinnung der Feten, sodann mit Rücksicht auf die beim Säugetierblut viel größeren Schwierigkeiten der Plasmagewinnung. Endlich ist die Verwendung von Hühnergewebe auch deshalb von Wert, weil die Mehrzahl der vorliegenden Arbeiten an diesem Objekt ausgeführt wurde. Die Möglichkeit, fremde und eigene Befunde miteinander zu vergleichen und auf vorhandene Angaben aufzubauen, ist damit ohne weiteres gegeben. Natürlich ist der Wachstumsvorgang beim Huhn nur dann einigermaßen beachtenswert, wenn sich die Befunde verallgemeinern lassen, so daß Vergleichsuntersuchungen an anderem Material, besonders an Säugetieren, notwendig sind. Es gibt eine große Menge widerspruchsvoller Angaben in den vorliegenden Veröffentlichungen, die daran denken lassen, daß Unterschiede in den Ergebnissen durch Unterschiede im verwendeten Material mindestens teilweise begründet sind. Zur Klärung solcher Widersprüche wird die gleichzeitige Verwendung mehrerer Tierarten mutmaßlich beitragen. Auch mit Rücksicht auf die wünschenswerte Beherrschung der technischen Schwierigkeiten und Möglichkeiten scheint es ratsam, mit der Züchtung verschiedenartiger Gewebe zu beginnen.

#### *Das Untersuchungsmaterial und die verwendeten Züchtungsverfahren.*

Die technischen Einzelheiten der im folgenden beschriebenen Versuche lassen sich zum Teil nicht aus dem Zusammenhang der Schilderung einzelner Versuchsreihen herauslösen. Nur in gewissem Umfange ist die zusammenfassende Darstellung möglich.

Die Anzahl der als Ausgangsmaterial verwendeten Explantate beträgt 249. Davon entfallen 30 auf wirbellose Seetiere, und zwar auf Hydrozoen (Cordylophora) und Anthozoen (verschiedene Actiniarien), auf Echinodermen (Asteroideen), einige choetopode Anniden und decapode Crustaceen. Weitere Züchtungen betreffen niedere Wirbeltiere, nämlich 8 Fische und 11 Frösche. Die Züchtung von Säugetiergewebe (und zwar ausschließlich Bindegewebe) wurde in 200 Versuchen unternommen. Darunter waren 8 Züchtungen von erwachsenen Mäusen, 6 von erwachsenen Meerschweinchen, 83 von Gewebe erwachsener und embryonaler Kaninchen. Vom Hühnerembryo wurden 103 mal Kulturen angelegt.

Dieses Ausgangsmaterial von 249 Kulturen war in einem Teil der Fälle nur wenige Tage lang der Züchtbarkeit oder anderer Aufgaben wegen benutzt. In anderen Fällen wurde in wochen- oder monatelang fortgesetzter Züchtung das ursprüngliche Explantat zur Herstellung eines Stammes benutzt, von dem bald früher, bald später Tochterkulturen (Passagen) zum Versuch verwendet wurden. Je nachdem wurden weiter im einzelnen Versuch aus dem verwendeten Material neue Tochterkulturen hergestellt. Die Gesamtzahl der auf diese Weise

angelegten Kulturen und Übertragungen beträgt 876. In dieser Zahl sind also enthalten die angestellten Versuche zusammen mit außerhalb von Versuchen angelegten Passagen.

Von den bekannten Züchtungsgefäßen wurden zahlreiche benutzt und je nach Art des verfolgten Ziels wechselnd geeignet gefunden. Die Methode des am Deckglase hängenden Tropfens erwies sich vorzugsweise beim Arbeiten mit Geweben niederer Tiere brauchbar und ferner überall da, wo die Nährbodenbestandteile ohne erstarrende oder mit nur unvollkommen erstarrenden Zusätzen benutzt wurden. Die Adhäsion des möglichst flach gestalteten hängenden Tropfens ergab in solchen Versuchen eine vielfach ausreichende Starrheit des Tropfens und Fixation des Explantates in diesem. Die Methode besitzt ferner darin große Vorteile, daß sie die mikroskopische Untersuchung mit stärkeren Vergrößerungen gestattet als die übrigen, besonders als die gleich einfachen und ist dadurch oft allen anderen überlegen. Die Schwierigkeiten der Asepsis und die geringe Menge des Mediums sind ausgesprochene Nachteile dabei. Bei vielen Züchtungen, die außerhalb jeder Untersuchung nur dahin zielten, einen Gewebebestamm weiter zu erhalten, war die Kultur im Reagensglase, das mit Watte und Gummikappe verschlossen wurde, die bei weitem handlichste Arbeitsweise. Die verhältnismäßig geringe Weite und große Tiefe des Gefäßes ist kaum ein Nachteil, sobald die ohnehin unentbehrlichen langen Platinspatel benutzt werden. Gleichzeitig sind die Infektionsgefahren beim Arbeiten mit schräg gehaltenen Reagensgläsern besonders gering. Die übrigen, von verschiedenen Seiten empfohlenen Züchtungsgefäße kamen nur in Ausnahmen zur Verwendung und zeigten keine nennenswerten Vorteile im Vergleich mit den von *Carrel* angegebenen, wohl am meisten benutzten Schalen. Bei entsprechender Auswahl unter den verschiedenen Formen dieser Schalen sind sie für die Zwecke des mit Messungen verbundenen Versuches und für viele andere, auch für histologische Zwecke bei weitem die günstigsten. Auch den Anforderungen an die Asepsis kann mit diesen Züchtungsgefäßen am besten entsprochen werden. Zu besonderen Zwecken wurden ferner Kulturen in Petrischalen gezüchtet. Die Schalen wurden in andere, weitere hineingestellt, die mit Glycerin oder flüssigem Paraffin gefüllt waren und das Austrocknen so verhinderten. In gelegentlich angestellten Durchströmungsversuchen wurden bald der von *Romeis* angegebene Apparat, bald *Carrelsche* Schalen, bald improvisierte Kammern verwendet, die aus feinen Glasröhren und Glasleisten mit Kitt auf Objektträgern hergestellt wurden. Solche Kammern dienten der genaueren mikroskopischen Untersuchung im Durchströmungsversuch, genauer als sie die Größe und Glasdicke der anderen Schalen gestatten.

Die Nährböden und zur Züchtung verwendeten Substanzen waren entsprechend der großen Verschiedenheit der untersuchten Gewebearten sehr zahlreich. Beim Arbeiten mit Geweben von Seetieren wurden verwendet 5—20 proz. Gelatine und Agar in Konzentration von 0,5 bis 2,0% als erstarrende Stoffe. Dazu oder ausschließlich wurde Seewasser gegeben, und zwar entsprechend der Benutzung von Nordseetieren, natürliches oder künstlich bereitetes Nordseewasser. Als Zusätze zur Kulturflüssigkeit wurden Extrakte ganzer Tiere oder einzelner Teile verwendet, die durch Autolyse, Eintrocknen im Vakuum, Auspressen des Gewebesaftes, Zerstückelung oder Verreiben im Mörser gewonnen und je nach Art der Herkunft durch Berkefeldfilter keimfrei gemacht oder ohne weiteres verwendet wurden.

Die Züchtung von Fisch- und Froschgeweben geschah in Ringerlösung, Extrakt der genannten Herstellungsart und Froschlymphe, Agar oder Gelatine angegebener Konzentrationen.

Die Gewinnung des Plasmas, das allen Erfahrungen nach fast unentbehrlich ist und nur durch minderwertige Stoffe ersetzt werden kann, stellt die größte Schwierigkeit in der Gewebezüchtung überhaupt dar. Diese Schwierigkeiten, zusammen mit den hohen Anforderungen an die Asepsis, bedingen zweifelsohne durch ihre Größe die verhältnismäßig seltene Verwendung der Gewebezüchtung, die an sich zu biologischen Arbeiten verschiedenster Art sicher ganz besonders geeignet ist. Es ist bezeichnend, daß zwar zahlreiche Forscher gelegentlich einmal die Gewebezüchtung verwendet haben, daß die Methode aber nicht dazu angetan erscheint, dem Bestande unserer Untersuchungsverfahren schlechthin eingereiht zu werden. Die Bemühungen um die Beseitigung der zugrunde liegenden Schwierigkeiten sind sehr zahlreich gewesen. Sie gingen vor allem von solchen Arbeiten aus, die sich mit Säugetiergeweben beschäftigten und entsprechend Plasma von Säugetieren verwendeten. Dessen Gerinnungsverhältnisse sind derart ungünstige, daß sie mit denen des Hühnerblutes kaum verglichen werden können. Darauf beruht ein Teil der widersprechenden Angaben, die das Verfahren bald als denkbar einfach, bald als undurchführbar schwer bezeichnen.

Das Hühnerplasma gerinnt bei geschickter Entnahme in eisgekühlten und paraffinierten Gefäßen aus der stark blutenden Arterie oder Vene (etwa des Flügels) auch bei wochenlanger Aufbewahrung in der Kälte nicht, wenn es nach kurzem Zentrifugieren des Blutes abpipettiert, in paraffinierte Gefäße gebracht und mit Paraffinum liquidum überschichtet wurde. Keimfreies Arbeiten ist natürlich dabei unerlässlich, weil Filtersterilisation oder sonstige Eingriffe unmöglich sind. Unvermeidlich tritt die Gerinnung mehr oder weniger schnell ein, wenn das Blut nicht unmittelbar aus dem Blutgefäß in das Zentrifugenglas

geflossen, sondern mit der Wunde in Berührung gekommen war, das heißt Beimengungen von Gewebesaft erhalten hatte. Nimmt man hinzu, daß die gut zugänglichen Gefäße beim Huhn nicht gerade groß sind und entsprechende Anforderungen an die Operationstechnik gestellt werden, so ergibt sich eine keinesfalls leichte Arbeitsweise. Hinzu kommt ferner der sicher oft wesentliche Umstand, daß bei umfangreichen Arbeiten für die Gewinnung von Plasma und Serum ein großes Tiermaterial verbraucht wird und daß auch der Bedarf an nötigen Einrichtungen und Hilfskräften eine höchst umständliche Arbeitsweise entstehen läßt.

Das Plasma der Säugetiere unterscheidet sich durch seine viel leichtere Gerinnung vom Vogelplasma. Außerdem bestehen Unterschiede in der Festigkeit des Gerinnsels und in der Verflüssigung, die das wachsende Gewebe bedingt. Beim Menschenplasma ist die Verflüssigung besonders groß und störend. Die Blutentnahme geschieht, je nach Art des verwendeten Tieres, aus der angeschnittenen und spritzenden Arterie, bei den üblichen Versuchstieren aus Carotis oder Femoralis, nötigenfalls auch durch Herzpunktion mit geölter Kanüle und beim Menschen mit gleichartig vorbereiteter Kanüle aus der Arterie. Bei Verwendung von Rinderplasma wurde bei der Schlachtung aus den spritzenden Halsgefäßen Blut entnommen. Es ist wie beim Huhn wichtig, daß Beimengungen von Gewebesaft oder Gerinnseln vermieden werden. Im ganzen ist es bei den verwendeten Säugetieren eher leichter als beim Huhn Blut zu entnehmen. Weit schwieriger als bei diesem ist es aber, aus dem erhaltenen Blut Plasma zu gewinnen. Dazu ist erforderlich, daß vor dem Zentrifugieren sehr sorgfältig mit Eis gekühlt wird, daß höchstens 2 Minuten lang ausgeschleudert wird, unter Verwendung einer Zentrifuge mit hoher Umdrehungszahl. Erst nach dem Abpipettieren des gewonnenen Plasmas und erneuter Eiskühlung kann durch erneutes Zentrifugieren versucht werden, die restliche Blutmenge auszunutzen. Es bleibt meist bei dem Versuch, dessen Gelingen durch die einsetzende Gerinnung vereitelt wird. Etwas günstiger gestalten sich die Verhältnisse durch die Verwendung solcher Behälter für die Zentrifugengläser, die weit genug sind, um die Eiskühlung während des Zentrifugierens zu gestatten. Das erhaltene und in paraffinierten Gläsern kalt aufbewahrte Plasma hält sich unter Paraffinum liquidum im Gegensatz zu dem des Huhnes nur kurze Zeit ungeronnen. Die dadurch notwendige häufige Plasmabereitung bei fortlaugenden Arbeiten bedeutet eine große Erschwerung.

Von den Verfahren, die zur Vereinfachung des Arbeitens angegeben sind, erschienen in der Nachprüfung 2 von bedingtem Wert. Das eine, von *Krontowski-Poleff* angegebene, besteht darin, daß durch Zusatz von oxalsaurem Natrium zu einer Blutmenge und von Calciumchlorid

zu einer anderen Blutmenge und durch Zentrifugieren Oxalatplasma und Calciumchloridserum als 2 getrennte Bestandteile erhalten werden, die auch ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen nicht gerinnen, die andererseits nach der Vereinigung gleicher Teile ein gerinnendes Plasma ergeben. Von *Barta* ist eine Verbesserung der Methode dadurch erzielt worden, daß er äquimolekulare Mengen der beiden Zusätze verwendet. In dieser Fassung gestaltet sich die Arbeitsweise so, daß 1,11 g  $\text{CaCl}_2$  auf 200 Wasser und 1,34 g  $\text{C}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  auf 200 gelöst und von jeder Lösung  $\frac{1}{10}$  zu  $\frac{9}{10}$  Blut zugefügt werden. Auf diese Weise wird zwar für manche Zwecke sehr viel gewonnen, leider aber gar nichts bei der Verwendung der *Carrelschen* Schalen. Denn dieses künstliche Plasma erstarrt weniger gut als das natürliche, und zwar um so viel weniger, daß im hängenden Tropfen zwar die nötige Festigkeit erreicht wird, aber in der Schale ein im Verhältnis zu seiner Größe zu dünnes, zerreibliches und kaum am Glase haftendes Fibrinhäutchen erhalten wird. Auch indem man versucht, für besonders gut gerinnende Plasmasorten diese Vereinfachung nutzbar zu machen, etwa für Meerschweinchenplasma, kommt man zu keinem anderen Ergebnis.

Viel genannt ist ferner die von *Ebeling* ausgearbeitete Methode der Verwendung von „reinen Fibrinogenlösungen“. Zunächst ist wohl diese Bezeichnung unzutreffend. Was aus Hühnerplasma nach Verdünnung 1 : 10 mit Wasser, Zusatz von 1 ccm einer 1 proz. Essigsäure auf 100 ccm des verdünnten Plasmas durch Schütteln und Zentrifugieren erhalten wird, dürfte eher ein durch Ansäuerung und Verdünnung vor der Gerinnung geschütztes Plasma sein. Jedenfalls wird es sich nicht um reines Fibrinogen handeln, dessen chemische Reindarstellung bekannt ist und in anderer Weise vorgenommen wird. Im übrigen bedeutet die Methode vielleicht deshalb keine wesentliche Verbesserung, weil Plasma das Ausgangsmaterial ist. Beim Vogel hat es offenbar keinen großen Wert, einmal gewonnenes Plasma, das ohnehin haltbar ist, durch weitere Bearbeitung vor der Gerinnung zu schützen. Beim Säugetier ist die Anwendung deshalb schwierig, weil man hier größere Plasmamengen, die bis zur Essigsäurefällung ungeronnen bleiben, kaum gewinnen kann. Es ist ja eben eine solche Methode zur Verbesserung notwendig, die es gestattet, wirklich große Mengen von Plasma als Vorrat in ungeronnenem Zustande zu erhalten. Oder auch reines Fibrinogen keimfrei zu gewinnen, das mit anderen Blutbestandteilen zusammen ein ausreichend festes Gerinnsel liefert.

In Verfolg dieser Aufgabe, deren Lösung für die Gewebezüchtung eine Daseinsfrage zu bedeuten scheint, wurden zahllose Versuche unternommen, um zu brauchbaren Ergebnissen zu führen. Die sämtlichen bekannten Möglichkeiten, Plasma vor der Gerinnung reversibel zu schützen, wurden durchgeprüft. Zusätze von Salzlösungen, von Kohlen-

säure, Kalkfällungsmittel, Säuren oder Verdünnung ergaben entweder Beeinträchtigungen des Wachstums oder keine Vereinfachung der Arbeitsweise. Auch alle Bemühungen, die Reindarstellung von Fibringen in chemisch einwandfreier und gleichzeitig keimfreier Weise durchzuführen, schlugen insofern fehl, als bisher keine Möglichkeit gefunden wurde, große technische Schwierigkeiten dabei zu beseitigen. Das gilt auch für die Verwendung von Heparin, das zwar vielfach eine vereinfachte Arbeitsweise ergeben kann, sich bei den hier zu erörternden Versuchen aber auch zumeist als ungeeignet erwies. Es besteht die Absicht, die abgebrochenen Versuche zur Vereinfachung des Verfahrens wieder aufzunehmen.

Aus naheliegenden Überlegungen heraus entstand ferner die Absicht, das Plasma als Gerüstsubstanz durch andere Stoffe zu ersetzen. Unter natürlichen Bedingungen wächst embryonales Gewebe ja niemals und anderes Gewebe nur in einzelnen Fällen auf oder im Plasma. Der die natürlichen Verhältnisse nachahmende Versuch dürfte also, streng genommen, nur selten Plasma verwenden. Die Erfahrung lehrt, daß die Gewebe eben auch auf Plasma wachsen; aber das ist noch keine ausreichende Rechtfertigung für dessen Verwendung. Regelrecht wächst das Gewebe vielmehr, etwa im Hühnerei, gar nicht infiltrierend in ein Medium, sondern infiltrierend in sich selbst innerhalb der Organgrenzen, im übrigen aber expansiv zwischen Eidotter und Eiweiß. Die Lagefixation scheint dabei zu geschehen durch die Widerstände der Dotteroberfläche — in den also der Embryo so nicht hineinfallen kann — und durch das infiltrierende Wachstum bestimmter Teile der Eihüllen in die Dotterhaut. Ähnliche Verhältnisse gelten ja auch für den im Uterus wachsenden Embryo: infiltrierend wachsen nur Teile der Eihäute. Versuche, etwas von diesen Verhältnissen nachzuahmen, scheiterten bisher. Vor allem stört die Färbung und starke Lichtabsorption der Eidottersubstanz, die so als Kulturmedium entweder die Untersuchung der Kultur im durchfallenden Licht nicht gestattet oder bei geringerer Schichtdicke das Gewebe nicht ausreichend umschließt. Ferner gelang bisher nicht, eine der Dotterhaut vergleichbare feinste Gerinnungshaut an der Oberfläche solcher Schichten zu bilden, wenigstens nicht unter den Bedingungen der chemischen Unversehrtheit und der Asepsis.

Zum Abschluß des Berichtes über diesen schwierigsten Teil der Züchtungstechnik ist zu bemerken, daß die dem Fibringerinnsel innerwohnende Fähigkeit der Schrumpfung zu Mißerfolgen führen kann, die vermindert werden durch ausgiebige Benetzung der Wände der Kulturschale mit der noch nicht erstarrten Flüssigkeit. So wird auch auf großer Fläche eine gut haftende Schicht erhalten. Auch nachträgliche Verletzungen dieser Schicht haben oft Schrumpfungen zur Folge,

die zu fortschreitenden Zerreißungen der Schicht führen und Explantate freilegen können. Nötigenfalls werden derartige Schwierigkeiten umgangen, indem man die Plasmaschicht auf einen schon erstarrten Untergruß von Agar bringt. Dieser haftet am Glase wie am Plasma in ausreichender Weise, um gelegentlich eine Verbesserung der Arbeitsbedingungen zu ergeben. Es ist bekannt, daß je nach Art der Zusätze zum Plasma, je nach dem Maß der Verdünnung mit Lockelösung, nach der Menge und Konzentration zugesetzter Extrakte und Sera die Gerinnungszeit wechselt. Dem muß durch die Schnelligkeit des Arbeitens Rechnung getragen werden. Es ist nämlich erforderlich, daß sich das Explantat in der gewünschten Lage im Plasma befindet, ehe die Gerinnung vollzogen ist. Nachträgliches Eindringen in das Plasma während des Wachstums ist nur in Ausnahmen zu erreichen. Außerdem stört von Anfang an die Verschieblichkeit des nur auf das geronnene Plasma aufgelegten Explantates. Und wenn erst eine Flüssigkeitsschicht auf das Gerinnel aufgebracht ist, so ist das nachträgliche Festwachsen des schwimmenden Gewebstückes vollständig unmöglich. In entgegengesetzter Richtung ist es nicht gleichgültig, wie tief in das Plasma vor der Gerinnung die Einpflanzung erfolgte. Wenigstens nicht immer. Die Wachstumsbedingungen sind nämlich bei 2 Explantaten verschieden, von denen das eine oberflächlich, das andere tief und völlig überdeckt im Plasma eingeschlossen ist. Wachstum erfolgt in beiden Fällen, aber bei oberflächlicher Einpflanzung ein so viel besseres, daß bei vergleichenden und messenden Untersuchungen eine große Einiformigkeit dieses Teiles der Technik erforderlich ist. Die günstigste Lage des Explantates in der Oberfläche des Gerinnsels wird hergestellt, indem man im Augenblick der eben beginnenden Gerinnung die Einpflanzung vornimmt. Bei mehreren Explantaten gleichzeitig erfordert das einige Übung. Die für die Plasmaarbeiten günstigsten Gefäße sind graduierte Reagensgläser mit eingepaßten Pipetten.

Agar wurde als erstarrender Zusatz und als Ersatz des Plasma mehr versucht als benutzt. Die Gewinnung des Serums bietet keine Besonderheiten.

Die Embryonalextrakte von Warmblütern wurden anfangs in Anlehnung an vorhandene Vorschriften gewonnen: Der keimfrei entnommene und zerkleinerte Embryo wird möglichst vollständig mit Lockescher Lösung blutfrei gewaschen, im Mörser mit keimfreien Sand und dem gleichen Volumen Lockescher Lösung zerrieben, zentrifugiert, abpipettiert und bei Bedarf Berkefeld-filtriert. Vor dem Zentrifugieren wird der Gewebsbrei für eine Stunde in den Brutschrank bei 37° gebracht. Eine im Brutschrank 24 Stunden lang aufgehobene und auf Platten überimpfte Probe dient der Feststellung der Keimfreiheit. Im allgemeinen wurden die Extrakte in größeren Mengen hergestellt,

in keimfreie Ampullen abgefüllt, eingeschmolzen und kalt aufbewahrt. Beim Kaninchen gelingt es bei geeigneter Operationstechnik, mehrere Trächtigkeiten eines Tieres zur Gewinnung von Feten zu benutzen.

Die Sterilisation der zahlreichen verwendeten Flüssigkeiten wurde überall da angewendet, wo das nachträgliche Keimfreimachen einfacher ist als die keimfreie Behandlung während der Herstellung. Vorausgesetzt natürlich, daß aus der Sterilisation keine Nachteile entstehen. Neben der Behandlung im strömenden Dampf wurde ausgiebig von der Berkefeld-Kerze Gebrauch gemacht. Deren Filtrate sind nur dann schwer herzustellen, wenn es sich bei Extrakten oder Serum um Lösungen handelt, die das Filter zu schnell verstopfen. In solchen Fällen wurde mit Asbestfiltern vorfiltriert, mit selbstverfertigten oder mit den Seitzschen Asbestfiltern. Dieses allein liefert oft schon keimfreie Lösungen und macht dann die 2. Filtration überflüssig. Wenn eine solche notwendig ist, muß sie sofort vorgenommen werden; denn im Verlauf von Stunden verschlechtert sich die Filtrierbarkeit wieder erheblich. Auch die verwendeten Salzlösungen wurden meist im Berkefeld-Filter keimfrei gemacht. Die Lockesche Flüssigkeit muß anderenfalls, im Dampf, in getrennten Anteilen sterilisiert werden. Und zwar werden  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  und  $\text{MgHPO}_4$  in gemeinsamer Lösung,  $\text{CaH}_2(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{NaHCO}_3$  in getrennten Lösungen in Dampf gebracht und erst nach dem Erkalten werden die Anteile vereinigt (in der richtigen Reihenfolge).

Im übrigen entstehen für die Asepsis bei den Gewebezüchtungen verschiedene Aufgaben je nach Art des verwendeten Gewebes. Bei niederen Tieren enthalten die Gewebeflüssigkeiten normalerweise zahlreiche Mikroorganismen, die bekanntlich auch bei den niederen Wirbeltieren noch verhältnismäßig häufig sind. Dabei handelt es sich um Lebewesen, die meist in einem beziehungsarmen Gemeinschaftsverhältnis mit den Zellen des betreffenden Tieres leben, so daß also in vielen Fällen ihr Vorhandensein nicht die Bedeutung einer Infektion, sondern nur die eines Nebenbefundes besitzt. Es gelingt im Versuch oft leicht, durch Vorbehandlung des Gewebes im Durchströmungsverfahren, die Zahl solcher Mikroorganismen stark zu vermindern oder sie vollständig verschwinden zu lassen. Bei den Geweben von wasserlebenden Tieren sind für die keimfreie Entnahme so gut wie keine Möglichkeiten gegeben, vielmehr enthält jede Art der Desinfektion die Gefahr einer unerwünschten Tiefenwirkung und Schädigung der zur Auspflanzung entnommenen Teile. Nur bei Krebsen und Echinodermen wurde die abgetrocknete Oberfläche mit Jod desinfiziert und das Gewebe konnte unter einwandfreien Bedingungen entnommen werden. Im übrigen ist nicht mehr zu tun, als daß unter den Bedingungen der Asepsis trotzdem gearbeitet, so jede weitere Infektionsmöglichkeit vermieden wird, wodurch trotz eines hohen Prozentsatzes unbrauchbarer Kulturen

eine Anzahl geeigneter Ausgangskulturen erhalten wird. Bei höheren Wirbeltieren sind die Bedingungen der Asepsis die bekannten und müssen besonders streng befolgt werden. Denn die verwendeten Flüssigkeiten sind ja meist geeignete Nährböden für Spaltpilze, denen außerdem durch Zahl und Umstände der nötigen Arbeiten reichlich Gelegenheit zum Eindringen gegeben wird. Zur Vermeidung eines Teiles der Mißerfolge ist es nötig, grundsätzlich jede zu verwendende Flüssigkeit erst bakteriologisch auf ihre Keimfreiheit hin zu prüfen. Ein Teil der Arbeitsbedingungen ist auch in der Art der verwendeten Arbeitsräume bedingt. Es erwies sich als nötig, alle Flüssigkeiten, die nicht unmittelbar verwendet wurden, in zugeschmolzenen Gefäßen aufzubewahren. Die Zahl der Infektionen wird auch dadurch erheblich vermindert, daß man die Zerkleinerung des Gewebes und die Auspflanzung in Glaskästen vornimmt, die seitlich offen und geräumig genug sind, um beim Arbeiten nicht zu hindern und Infektionen aus der Luft, durch Sprechen usw. vermeiden lassen.

Das im übrigen erforderliche Instrumentarium besteht aus den notwendigen und bekannten ophthalmologisch-chirurgischen Instrumenten, aus Platinspateln jeweils geeigneter Form, aus Nadeln und Kanülen des gleichen Materials. Das Absaugen von Kulturflüssigkeit geschieht mit Rekordspritzen und passenden geraden oder gebogenen Nadeln, die gelegentlich auch für die Mischung und das Einführen von Kulturflüssigkeiten geeignet sind.

Für die Züchtung selbst läßt sich zusammenfassend nur sagen, daß Abstände und Zahl der Passagen in etwa belanglos sind, solange es nur darauf ankommt, das Gewebe dauernd lebendig zu erhalten. Die Möglichkeit der Infektion wächst natürlich mit der Häufigkeit der Übertragung in ein neues Medium. Andererseits verbessert sich die Wachstumsstärke bei kürzeren und verschlechtert sich bei größeren Abständen der Übertragungen. Die meist benutzte Zeitspanne von 2 Tagen ist vielleicht unnötig kurz. Jedenfalls genügen Passagen jeden 6. oder 8. Tag vollkommen, um einen Stamm lebendig zu erhalten. Das gilt bei Verwendung *Carrelscher Schalen*. Im Versuch ändern sich die Verhältnisse natürlich. Hier ist oft zur Beschleunigung der Wachstumsvorgänge der Zeitabstand von 2 oder 3 Tagen vorzuziehen. Auch zur Vorbereitung der Kultur für den Versuch wird man solche Abstände wählen. Das ist notwendig mit Rücksicht auf die Erfahrung, daß sich der längere Zeit hindurch gezüchtete Stamm vielfach anders verhält als das frische Explantat auf dem ersten Nährboden. Dieser hier nicht näher zu besprechende Unterschied kann nicht ausschließlich ausgedrückt werden durch die Dauer der Züchtung, sondern hängt gleichzeitig ab von der Zahl der Übertragungen. Deren Technik läßt sich nicht einheitlich angeben. Bald ist es vorteilhaft, bei der Über-

tragung das Gewebestück in Lockescher oder Ringerscher Flüssigkeit auszuwaschen, bald empfiehlt es sich mehr, es unmittelbar aus dem erstarnten Plasma hinaus- in erstarrendes hineinzubringen. Als Regel wird nicht das ganze Explantat, sondern dessen auf dem Plasma mit dem Starmesser zerlegte Hälften werden übertragen. Gelegentlich erfolgt eine Zerkleinerung in zahlreichere Stücke. In jedem Falle ist es wichtig, die Teile vor der Übertragung sorgfältig aus der alten Plasmaschicht herauszuschneiden. Anhaftende Reste davon stellen mechanische Wachstumshindernisse dar, die im Versuch erheblich stören können. Bei größeren Abständen der Passagen als 4tägigen, wie sie bei der Züchtung in 2 getrennten Schichten erlaubt sind, muß die Flüssigkeitsschicht etwa alle 4 Tage vom Plasma abgesaugt und durch neue ersetzt werden. Auch dabei kommt zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen das Auswaschen mit physiologischer Salzlösung in Frage.

Die verwendete Untersuchungsart war fast ausschließlich die Messung an der lebenden Kultur. Sie geschieht unter dem Mikroskop oder in der vertikalen Mikroprojektion. Bei der Verwendung des Mikroskops empfiehlt sich das aus der Histologie bekannte Verfahren. Mit Hilfe des Kreuztisches werden 2 aufeinander senkrecht stehende größte Durchmesser bestimmt und aus der Ablesung können unter Berücksichtigung der für die Vergrößerung geltenden Werte absolute Zahlen erhalten werden. Oder die Werte der Kreuztischeinteilung werden umgerechnet für bestimmte Vergrößerung und auf Millimeterpapier übertragen. Die gefundenen Punkte werden so miteinander verbunden, daß eine Umrißzeichnung entsteht, die durch Umrechnung auf natürliche Größenverhältnisse bezogen werden kann. Diese Methoden werden benutzt, wenn etwa im hängenden Plasmatropfen kleinste Objekte bei starker Vergrößerung zu messen waren. In anderen und den meisten Fällen wurde die Schalenkultur in der Vertikalprojektion gemessen, ein Verfahren, das auch den später abzubildenden Kurven zugrunde liegt. In der Projektion wird eine Umrißzeichnung angefertigt, aus der in naheliegender Weise zu den Werten der natürlichen Größe gefunden werden kann. Vielfach ist übrigens deren Kenntnis ohne Bedeutung. Zumeist wurde mit dem Winkelschen Mikroluminar 16 mm bei einem Abstand von 54 cm und bei 32facher Vergrößerung gearbeitet.

Bei der Herstellung der Zeichnungen ist eine gewisse Übung dazu erforderlich, daß die notwendige Genauigkeit zugleich mit einiger Schnelligkeit des Arbeitens erreicht wird. Das gilt, sobald es sich um Gewebe von Warmblütern handelt, die außerhalb des Brutschrankes ziemlich schnell durch die Abkühlung geschädigt werden oder doch Änderungen ihrer Wachstumsstärke erfahren können.

Die Umrißzeichnungen werden, gleichgültig auf welche Weise sie entstanden sind, zur Berechnung des Flächeninhaltes benutzt. *A. Fischer*

hat dieses Verfahren der Intensitätsbestimmung zuerst verwendet, das in vielseitiger Weise verändert werden kann, je nach Art des verfolgten Ziels. Die Flächenbestimmung selbst geschieht mit einer meist ausreichenden Genauigkeit dadurch, daß die Zeichnung auf Millimeterpapier ausgezählt und so unmittelbar die Anzahl der Quadratmillimeter gefunden wird. Diese Art der Bestimmung hat bei größeren Versuchsreihen den Nachteil des sehr zeitraubenden Zählens. Um größere Unterschiede ausdrücken zu können, genügt es vielfach, daß der Umfang des kreisförmig gedachten Explantates bestimmt wird. Ähnliche Ergebnisse und Bedingungen hat das Verfahren, an der als kreisförmig gedachten Zeichnung mehrere Durchmesser zu bestimmen und aus deren mittlerem Wert einen mittleren Kreisumfang zu bestimmen. Dieses Verfahren ist das einfachste.

Am genauesten sind die mit dem Planimeter gemessenen Werte, die je nach Art des Instrumentes unmittelbar oder nach einer Umrechnung verwendet werden können. Solche Messungen liegen den mitzuteilenden Tabellen und Kurven zugrunde.

Gleichgültig ob das eine oder das andere Verfahren gewählt worden war, ergibt sich aus der Überlegung für alle Fälle ein unvermeidlicher Messungsfehler. Es ist nämlich, streng genommen, nicht erlaubt, die projizierte Fläche dem räumlich wachsenden Gebilde gleichzusetzen und die oberhalb oder unterhalb der projizierten Umrisse liegenden Teile bei der Größenbestimmung zu vernachlässigen. Indessen ist deren Erfassung mit keiner der uns bekannten Methoden möglich, und der entstehende Fehler muß in Kauf genommen werden.

Von der Messung und ihren Zahlenwerten findet man leicht zu anschaulichen graphischen Darstellungen und übersichtlichen Tabellen. Die erste Möglichkeit ist, die gefundene Anzahl der Quadratmillimeter unmittelbar als Wachstumsausdruck zu verwenden. Aber da es nicht möglich ist, die Explantate genau gleich groß zu machen, wird man bei der Messung unmittelbar nach der Einpflanzung etwa 0,56 qmm in einem und 1,27 qmm im anderen Falle finden. Nach 2 Tagen wird etwa die Messung 3,23 und 4,18 ergeben. Aus der Abb. 1 geht hervor, daß diese Zahlen nichts besagen über die Wachstumsstärke, die offenbar, ohne sich in den Zahlen auszudrücken, im 1. Falle größer ist als



Abb. 1.

im 2. Die gesuchten Zahlen werden in dem Verhältnis  $\frac{\text{Endgröße}}{\text{Anfangsgröße}}$  gefunden; das heißt also im Beispiel der Abbildung und der Zahlen  $\frac{A_1}{A} = \frac{3,23}{0,56} = 5,76$  und  $\frac{B_1}{B} = \frac{4,18}{1,27} = 3,29$ . Diese Verhältniszahlen beitreffen erst die Wachstumsstärke und drücken aus, daß die Kultur A

stärker gewachsen ist als *B*. Etwas anders werden die Ergebnisse, wenn die Wachstumsstärke ausschließlich ausgedrückt wird durch das Verhältnis  $\frac{\text{Zuwachsgröße}}{\text{Anfangsgröße}}$ . Die Größe des Zuwachses wird dabei bestimmt als  $A_1 - A = 3,23 - 0,56 = 2,67$ . Die erhaltenen Werte für die Intensität (*I*) von *A* und *B* sind um 1 niedriger, nämlich  $IA = 4,76$  und  $IB = 2,29$ . Das Verhältnis beider Wachstumsintensitäten zueinander — eine in Vergleichsversuchen ausschlaggebende Zahl — hat sich dabei verschoben zugunsten von *IB*, welches bei der ersten Art der Bestimmung im Verhältnis zu *IA* kleiner war. Zu den gleichen Zahlen gelangt man natürlich bei der Bestimmung des prozentualen Zuwachses und findet einen Zuwachs von 476 % und 229 %.

Diese Grundlagen der Bestimmung enthalten zahlreiche Darstellungsmöglichkeiten, die aus der Art der anzustellenden Prüfung gefunden werden. Soll etwa das Wachstum für bestimmte Zeitabschnitte graphisch dargestellt werden, so wird man die Zeit in Tagen und die Größe in gemessenen Quadratmillimetern angeben. In anderen Fällen wird an Stelle der letztgenannten Zahl der für die Wachstumsstärke gefundene Wert gesetzt. Sollen endlich Unterschiede im Verhalten mehrerer Kulturen ausgedrückt werden, so bedient man sich entweder getrennter Kurven oder einer einzelnen, gebildet aus der Zeit und dem Quotienten  $\frac{IA}{IB}$ .

#### *Die Unterscheidung der Überlebungsvorgänge von echtem Wachstum.*

Als Überleben sollen solche Vorgänge bezeichnet werden, bei denen unentbehrliche Stoffe oder Kräfte zu dem betreffenden Vorgang nicht mehr erworben werden, sondern nur noch aus dem Bestand an solchen Stoffen oder Kräften Leistungen erfolgen, die mit dem Verbrauch der gedachten Bestände aufhören.

Als echtes Wachstum werden im Gegensatz dazu solche Vorgänge bezeichnet, bei denen (für die Leistung unentbehrliche) Stoffe oder Kräfte neu erworben werden. Es werden also Leistungen vollführt, zu denen der Bestand an Stoffen oder Kräften nicht ausreicht, der sich im Zeitpunkt der Abtrennung des Teiles vom Ganzen im abgetrennten Teil befand.

Es ist bekannt, daß unter diesen beiden verschiedenen Bedingungen als Fortsetzung eines gerade ablaufenden Geschehens oder als neu einsetzendes Ereignis an der Kultur Veränderungen der äußeren Form und der inneren Struktur vorkommen können, die sich zunächst nicht voneinander unterscheiden.

Bringt man 2 herausgeschnittene Gewebestücke unter die Bedingungen der Gewebekultur, aber das eine davon unter Verwendung von Embryonalextrakt, das andere ohne dessen Zugabe, so kann man

nach Stunden oder Tagen Veränderungen gleicher Art erhalten. Der einzige, in den ersten Tagen aber nicht festzustellende Unterschied ist die Zeit, während der das Verhalten beider Stücke gleich ist. Das eine wird unbegrenzt lange bei geeigneter Behandlung die anfänglichen Veränderungen weiter zeigen, das andere wird zugrunde gehen.

Die anfängliche Gleichheit im Verhalten beider Teile ist auch bei Verwendung feinster Untersuchungsarten eine vollkommene. Die Auswanderung der Zellen in die Umgebung ist der Zellzahl nach und im Bezug auf die Länge der durchwanderten Strecken vollkommen gleich. Das Aussprossen von Zellen, die im gewöhnlichen Zusammenhang mit dem Explantat bleiben und zu dessen Vergrößerung führen, zeigt keinerlei Verschiedenheiten. Ebensowenig die Zahl und Art der Kernteilung, die Art der Zellgranulationen und Zellformen. Trotzdem beweist das Endergebnis, daß es sich um verschiedene Vorgänge handelt, zum mindesten von einem bestimmten Zeitpunkt ab. Man könnte einwenden, daß in beiden Fällen Wachstum vorgelegen habe, das aber in einem Falle aus unbekannten Gründen zum Stillstand gekommen ist. Diese Meinung wird leicht dadurch widerlegt, daß man genau gleiche Ergebnisse hat, wenn man an Stelle der üblichen Nährböden Locke-Lösung verwendet, in die als Gerüstsubstanz etwa Wattefäden gebracht werden. Es kann nicht angenommen werden, daß auch jetzt Wachstum stattfindet; denn weder der notwendige Energieverbrauch noch die erforderlichen Stoffe könnten aus der Salzlösung bestritten werden. Vielmehr wird es sich in beiden genannten Fällen um Verschiedenheiten handeln müssen im Sinne der gegebenen Definition des Überlebens und des echten Wachstums.

Wird zu gleichen Versuchen Gewebe verwendet, das nicht unmittelbar vorher dem Körper entnommen, sondern tage- oder wochenlang nach der Entnahme auf Eis aufbewahrt wurde, so läßt sich in oft bestätigter Weise ebenso gutes, wenn nicht noch besseres Wachstum im einen und Überleben im anderen Falle nachweisen.

Vielleicht kann man die Ausdrucksweise noch genauer wählen und sagen, daß in beiden Fällen die Explantate überleben und erst von dem Zeitpunkte ab, in dem die eine Kultur zugrunde geht, die Leistung der anderen wirklich größer gefunden wird, als ihren Beständen entspricht. Daraus ergibt sich, daß die Feststellung von Wachstumsvorgängen in der Kultur erst möglich ist, nachdem die gleichartig aussehenden Überlebungserscheinungen ausgeschaltet sind. Es wäre denkbar, daß die Wachstumsvorgänge erst einsetzen, nachdem die Überlebungserscheinungen abgeklungen sind. Es könnte sein, daß aus dem Bestande des überlebenden Teiles eine Wachstumsstärke ermöglicht würde, die gleich groß ist mit der, die nach dem Abklingen des Überlebens aus dem echten Wachstumsvorgang geschaffen wird. Ebensogut

könnte es sein, daß in dem Zeitabschnitt des Überlebens sich auch schon solche Stoffe oder Kräfte im Wachstumsgrad äußern, die zugeführt wurden, etwa in Form von Extrakt. Mit anderen Worten wäre eine Summation gegebener Wachstumsmöglichkeiten so gut denkbar wie ihre getrennte, zeitlich aufeinander folgende Wirkung.

Die Feststellung dieser Verhältnisse ist aus besprochenen Gründen unerlässlich. Sie kann in sehr einfacher Weise geschehen. Falls nämlich die Kräfte gleichzeitig wirken, muß die Wachstumsstärke größer sein als bei ihrer Wirkung nacheinander.

Von 2 möglichst gleich großen Explantaten vom Herzen des Hühnerembryo wird das eine eingebettet in Lockesche Lösung und Hühnerplasma (1,5 : 0,5) und mit Lockescher Lösung überschichtet. Das andere wird bei sonst gleicher Behandlung eingebettet in Plasma und Lockesche Lösung, die 5proz. Embryonalextrakt enthält. Die Kulturen werden sofort und nach 48stündigem Bebrüten gezeichnet und gemessen. Die Versuche werden wiederholt. Das Ergebnis zeigt Tab. 1 und Abb. 2.

Tabelle 1.

Ver- suchs- Nr.	Kultur-Nr.	Relativer Zuwachs	Züchtungs- substanz
1	118/6a	4,2	
2	118/6b	3,8	
3	118/6c	4,3	
4	118/6d	3,2	
5	118/7a	2,9	
6	118/7b	2,6	

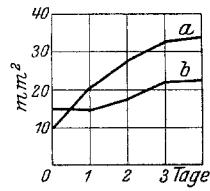


Abb. 2. Echtes Wachstum gemeinsam mit Überlebungserscheinungen (a); Überlebungserscheinungen allein (b).

Daraus geht hervor, daß echtes Wachstum schon einsetzt, ehe die Überlebungserscheinungen abgelaufen sind. Die Kräfte aus beiden Quellen summieren sich, ausgedrückt als vergrößerte Wachstumsstärke.

Diese Feststellung hat zum Ergebnis, daß Messungen nur Wert haben, wenn sie nach abgelaufenen Überlebungserscheinungen im Stadium des ausschließlich echten Wachstums vorgenommen sind.

Das wirft auch Licht auf die viel besprochenen Unterschiede zwischen Passagen von Stämmen, die längere Zeit gezüchtet waren, und frisch dem Organismus entnommenen Gewebestücken. Zwischen beiden bestehen oft störende Verschiedenheiten der Wachstumsstärke, die mindestens teilweise in den dargelegten Verhältnissen begründet sein müssen. Aus dem Gesagten geht unmittelbar hervor, daß es zur Schaffung klarer Versuchsbedingungen nötig ist, das Explantat in einen Zustand zu versetzen, in dem es frei von allen Wachstumskräften ist. Das gilt für das frisch entnommene Gewebe so gut wie für die zum Versuch verwendete ältere Passage. Auch sie besitzt ja im Augenblick

der Auspflanzung Bestände an wirksamen Faktoren und kann so gut überleben wie weiterwachsen. Man wird niemals den Wachstumserfolg eines Eingriffes bestimmen können, solange dieser Erfolg mit den Wirkungen unbestimbarer Faktoren summiert erscheint.

Die Aufgabe kann auf 2 Arten gelöst werden. Es ist möglich, das völlige Abklingen aller Überlebungserscheinungen abzuwarten, ehe die Verwendung des Gewebestückes zum Versuch erfolgt. Dazu wird unter Überprüfung durch Messungen solange ohne Übertragungen in Plasma, verdünnt und überschichtet mit Lockescher Lösung, gezüchtet, bis das Wachstum zum Stillstand kommt. Solche Kulturen fangen nach Zugabe von Embryonalextrakt erneut zu wachsen an. Auf diese Weise ist also eine ausschließliche Bestimmung der Extraktwirkung möglich.

Die Kurve Abb. 3 enthält das Ergebnis solcher Versuche.

Eine Schwierigkeit bleibt dabei noch bestehen. Das Abnehmen des Wachstums beim Abklingen der Überlebungserscheinungen erfolgt nicht steil, sondern zuletzt um geringe Beträge. Diese werden schließlich

kleiner, als daß die Methoden zu ihrer Bestimmung ausreichten. Also ist damit zu rechnen, daß zum Schluß ein unmeßbarer Rest von Wachstum übrigbleibt, und es wird vorteilhaft sein, auch nach dem meßbaren Wachstum noch einige Zeit vergehen zu lassen, ehe man mit dem Versuch beginnt. Es ist aber schwer, den Zeitpunkt zu bestimmen, bis zu dem man warten kann, ohne das Gewebe zu schädigen. Erst das Endergebnis dieser Schädigung, der eingetretene Tod, läßt sich wieder bestimmen, während der dahin aufsteigende Teil einer Schädigungskurve anfangs ebenso unmeßbare kleine Werte enthalten muß, wie die Wachstumskurve in ihrem absteigenden Teil. Folglich ist es nicht möglich, die gesuchte Bestimmung der Zeit messend vorzunehmen, sondern sie muß auf ungefähr aus der Erfahrung abgelesen werden. Diese ergibt, daß in hohem Prozentsatz der Kulturen kein Wachstum mehr erfolgt, wenn nach dem letzten meßbaren Zuwachs länger als 24 Stunden gewartet wird. Durchschnittlich wurde nicht diese Zeit, sondern eine kürzere von 4—8 Stunden eingehalten, soweit es sich um möglichst genaue Versuchsergebnisse an ungeschädigten Kulturen handelte.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, mit Vergleichskulturen zu arbeiten. Aus der möglichst genauen Teilung eines Gewebestückes in 2 gleich große werden 2 Explantate erhalten, von denen eines in der

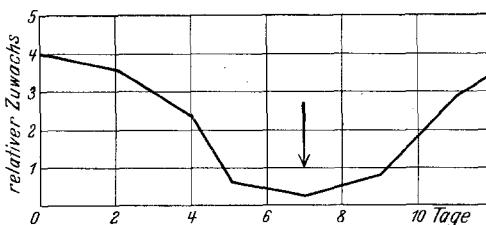


Abb. 3. Nachdem die Überlebungserscheinungen abge- laufen sind, wird durch Embryonalextrakt (↓) echtes Wachstum ausgelöst. Kultur 108; Kaninchen von 12 Tagen

gerade gewünschten Zusammensetzung von Bestandteilen des Mediums gezüchtet wird, während das zweite unter sonst gleichen Bedingungen, aber ohne Zusatz von Embryonalextrakt, eingepflanzt wird. Die Anordnung des betreffenden Versuches hat dabei im einzelnen zu entscheiden, welche Zusätze in beiden Schalen und welche nur in einer gemacht werden. Im richtig geleiteten Versuch zeigt sich dann, daß die eine Kultur zugrunde geht und nur die andere weiterwächst über beliebig lange Zeiträume. Man findet also einen Wachstumsverlauf, bei dem der Wachstumsgrad im Vergleichsversuch von Anfang der niedrigere war und im weiteren Verlauf eher oder später den Nullwert erreichte. Gleichzeitig besaß der Hauptversuch eine unverminderte Stärke, die von vornherein höhere Werte ergab. Bei diesem Verfahren ist die Gefahr vermieden, daß die Kultur zugrunde geht, weil zu spät nachgefüttert wurde und sie gewissermaßen verhungerte. Es ist im Gegenteil erreicht, daß die Kultur von Beginn an beste Daseinsbedingungen hat. Trotzdem aber ist ermöglicht, die Wachstumsstärke auch zu Beginn des Versuches zu zerlegen in ihre Bestandteile, in die aus echtem Wachstum und die aus Überleben bedingten Anteile. Diese Möglichkeit geht aus der Abb. 4 hervor.

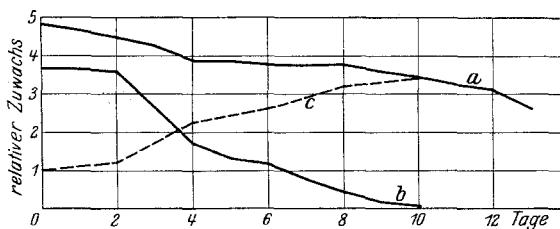


Abb. 4. Überleben und echtes Wachstum bei der Kultur (a) werden mit Hilfe der Vergleichskultur (b) getrennt. Aus der Rechnung ergibt sich für das echte Wachstum der Kultur (a) die Kurve (c). Kulturen Nr. 98 und 99, Kaninchen-embryo, 12 Tage alt.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß wegen der eigenartigen Bedingungen und Schwierigkeiten des Gewebezüchtungsverfahrens die Einzelheiten der Methode eine weitestgehende Beachtung erfordern, insbesondere da, wo Überlebungsvorgänge und echtes Wachstum als Vorbedingung für den Versuch auseinandergehalten werden müssen. Die Trennung beider Vorgänge gelingt mit vollkommener Genauigkeit und ohne unerträgliche Erschwerungen des Verfahrens, wenn weder wachsende noch überlebende, sondern ruhende Kulturen verwendet werden. Dann kann das erst im Versuch beginnende Wachstum ausschließlich auf die Bedingungen des Versuches bezogen werden.

#### Störende Einflüsse der Explantatgröße.

Im allgemeinen wird man bei Gruppenversuchen nicht nur bemüht sein, möglichst gleiche Gewebeteilchen zur Auspflanzung zu verwenden,

sondern man wird vor allem darauf achten, daß die Stücke möglichst klein sind. Es besteht das bekannte Verhältnis zwischen Wachstumsstärke und Explantatgröße: je kleiner das Gewebestück ist, desto schneller und besser wächst es an.

Aus technischen Gründen ist es unmöglich, die Gleichheit der Stücke und ihre möglichst geringe Größe gut zu verwirklichen. Mit Hilfe der Lupe und genügend feiner Instrumente kann man allerdings diesen Anforderungen teilweise genügen und kann bei der Präparation des Stückes unter dem Mikroskop zu recht genauen Ergebnissen kommen. Die Schwierigkeiten sind besonders dann zu bewältigen, wenn man Okulare verwendet, die ein aufrechtes Bild entwerfen. Aber diese Versuche haben nur den Wert, wirklich klar zu erweisen, daß gleich große Stücke gleiche Stärken haben und daß Unterschiede verschwinden, nachdem die Stücke gleich groß gemacht werden. Solche Arbeitsweise ist als regelrechte natürlich unbrauchbar, zu schwierig, enthält zu große Infektionsgefahren und zieht zu leicht andersartige, z. B. mechanische Schädigungen nach sich. Als Regel ist geradezu erforderlich, daß zur Auspflanzung Stücke verwendet werden, die so wenig wie möglich mit Pinzetten, Nadeln und schneidenden Instrumenten berührt und beschädigt wurden. Also muß man häufig mit Größenunterschieden rechnen.

Zwar ist nichts darüber bekannt, welcher Art die Faktoren sind, die das bessere Wachstum des kleineren Stückes bedingen. Aber es läßt sich aus Messungen entnehmen, daß ziemlich regelmäßige Verhältnisse dafür gelten. Das größere Explantat bleibt um einen bestimmten Betrag in der Größe der Wachstumsstärke hinter dem kleineren zurück. In der Tab. 2 sind aus allen möglichen Messungen solche Werte zusammengestellt. Da es sich nur darum handeln soll, diese Unterschiede der damit verbundenen Ungenauigkeiten und Störungen wegen zu beseitigen, so schien es ausreichend, aus größeren Reihen solcher

Tabelle 2.

Größe in mm <sup>2</sup>	Relativer Zuwachs	Größe in mm <sup>2</sup>	Relativer Zuwachs
12,32	1,0	5,41	5,3
8,15	3,6	4,63	6,1
7,88	4,0	3,33	6,6
6,30	4,3	2,72	7,9
5,93	4,2	1,08	8,3

Zahlen zu entnehmen, in welchem Verhältnis die Wachstumsstärke abnimmt, während die Flächengröße zunimmt. Daraus geht hervor, daß die Stärken ungefähr in dem Maße wachsen, in dem die Oberfläche des Explantates im Verhältnis zur Masse größer wird. Dieses Ergebnis ist ein sehr naheliegendes; denn es ist klar, daß die Stärke des Wachstums, als eines vorwiegend die Oberfläche des wachsenden Teiles betreffenden Geschehens, bestimmt wird von der Größe dieser Oberfläche. Als Folgerung ergibt sich, daß zur weiteren Korrektur der

gemessenen Wachstumsstärke deren Wert herabgesetzt wird entsprechend dem gefundenen Verhalten. Und zwar wird verbessert der verhältnismäßig zu kleine Wert des größeren Explantates. Die Zahlen werden gefunden in einfacher Weise durch Umrechnung der gemessenen. Sie wurden nicht regelmäßig benutzt, sondern nur bei nennenswerten Größenunterschieden in Vergleichsversuchen.

Damit sind die Grenzen erreicht, bis zu denen vorläufig die Genauigkeit der Versuchsergebnisse vorgeschoben werden konnte. Der Erfolg solcher Verschiebung ergab sich deutlich bei allen Arbeiten, bei denen diese gefundenen Fehler beseitigt waren. Die folgenden Mitteilungen enthalten in ihren zahlenmäßigen Angaben Werte, die in den angeführten Punkten der Berichtigung unterzogen wurden.

#### *Untersuchungen über Extraktwirkungen.*

Die Bedeutung des Embryonalextraktes für das Wachstum der Gewebekultur findet ihren Ausdruck in der besprochenen Tatsache, daß ausschließlich solchen Extrakten die Fähigkeit zukommt, dauerndes Wachstum der Kultur zu unterhalten. Die einzige unserem bestehenden Wissen nach geltende Ausnahme machen die Kulturen von Gewächsen. Eindeutig klargestellt sind diese Verhältnisse indessen noch nicht. Teils ist bisher nicht eine ausreichende Menge verschiedenartiger Gewächse gezüchtet worden, teils ist nicht in allen Fällen genügend lange Zeit hindurch das Leben der betreffenden Gewächskultur verfolgt worden, um sagen zu können, daß es auch ohne Embryonalextrakt dauernd fortbesteht. So entspricht es unserem bisherigen begründeten Wissen nur zu sagen, daß das Roussche Hühnersarkom sicher ohne jede Extraktzugabe in Skelettmuskulatur vom Huhn als Medium beliebig lange wachsend lebendig bleibt (*A. Fischer*), und daß zahlreiche menschliche und tierische Krebse in Extrakten von Krebsen wahrscheinlich ebenso gute Wachstumsbedingungen finden, wie andere Gewebe im Embryonalextrakt.

Bei dem absichtlichen vorläufigen Verzicht auf die Untersuchung von Gewächskulturen gilt also für alle zur Erörterung gestellten Gewebearten, daß ohne Embryonalextrakt Wachstum nicht zustande kommt.

Dieser Umstand ist in ganz besonderem Maße befremdend, wenn die zum Versuch verwendeten Gewebe vom erwachsenen Tier stammen, oder jedenfalls nicht von Embryonen. Denn ohne Rücksicht darauf, ob es sich um junge oder alte Tiere handelt, müssen für ihre Gewebe unter natürlichen Bedingungen die Möglichkeiten zum Wachstum vorausgesetzt werden. Das Wachstum in der Kultur, bedingt durch Vorhandensein von Embryonalextrakt, kann ja bei solchen Geweben nicht als Wachstum unter natürlichen Bedingungen bezeichnet werden.

Die erste sich daraus ergebende Folgerung ist von großer Wichtigkeit: So viele der im Blut oder Gewebe des erwachsenen Tieres vorhandenen Stoffe wir einzeln oder zusammen in der Gewebekultur darauf prüfen, ob sie zum Wachstum führen, wir haben bisher nicht einen unter normalen Verhältnissen vorkommenden gefunden, der Wachstum auszulösen vermag. Nur Stoffe von wachstumsfördernden Eigenschaften lassen sich nachweisen. Auch im Zusammenhang mit den hier vorgelegten Arbeiten wurde in monatelangen und zahlreichen Versuchen in allen erdenklichen Anordnungen und unter allen Begünstigungen, die unseren Kenntnissen nach für das Wachstum des Gewebes geschaffen werden können, erfolglos versucht, das Wachstum auszulösen. Auf die nähere Darstellung solcher Versuche, das heißt unaufhörlicher Mißerfolge, soll verzichtet werden.

Nur auf eine einzige Weise kann am Gewebe des erwachsenen Tieres echtes Wachstum durch Bestandteile des erwachsenen Gewebes ausgelöst werden. Das gelingt mit autolysierten Gewebeauszügen. Das Gewebestück — Skelettmuskulatur von 1 Jahr alten Kaninchen — wird zerschnitten, gewaschen und im Mörser mit Sand und gleichem Volumen Lockescher Lösung zu Brei verrieben. Dabei wird aseptisch gearbeitet. Der gewonnene keimfreie Brei wird 24 Stunden lang bei 37° autolysiert. Daraufhin wird zentrifugiert und die abgefüllte Flüssigkeit durch die Berkefeld-Kerze filtriert. Das auf seine Keimfreiheit hin geprüfte Filtrat wird unverdünnt als Zusatz zum Plasma verwendet (0,5 Plasma und 1,5 Extrakt). Beim Arbeiten mit ruhenden — nicht wachsenden — Kulturen zeigt dieser Extrakt eine deutliche Wachstumswirkung. Aus einer Versuchsreihe von 10 Versuchen, die sämtlich gleiche Ergebnisse hatten und nur Verschiedenheiten in den normalen Grenzen individueller Schwankungen zeigten, ist durch Berechnung der mittleren Wachstumsstärke die Kurve Abb. 5 entstanden.

Die wachstumsauslösende Wirkung geht aus den Versuchen unmittelbar hervor. Daß ruhende Kulturen verwendet wurden, sei ausdrücklich betont. Trotzdem wurden 5 von den Versuchen über 8 Passagen weitergeführt, bei jedesmaliger Zugabe von gleichen Mengen des gleichen Extraktes. Das geschah, um auch den unmittelbaren Vergleich mit der sonst üblichen Versuchsanordnung zu ermöglichen und hatte zum Ergebnis, daß keine der Kulturen vor Ablauf dieser Frist zugrunde gegangen war. Sonst sterben Kulturen, die ohne geeigneten Extrakt gezüchtet werden, nach 4—5 Passagen ab.

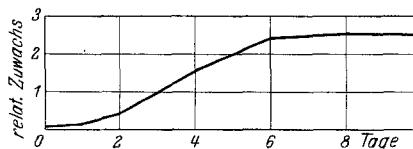


Abb. 5. Autolyziter Gewebeextrakt; mittlere Wachstumsintensität aus 10 Versuchen. Kultur Nr. 121/9a—k; Kaninchen von 15 Tagen.

Diese Versuche wurden angestellt zur Prüfung gleichartiger Ergebnisse von *Drew*, die bisher aus unbekannten Gründen nicht die Beachtung gefunden haben, die ihnen zuzukommen scheint. *Drews* Angaben lassen sich durch diese Ergebnisse bestätigen und seine unbestimmte Stellungnahme zu der Frage, ob das Autolysat nur das Wachstum verbessert oder geradezu bedingt, scheint bei der hier benutzten Anordnung unnötig. Von einer Wachstumsverbesserung kann keine Rede sein, wenn die Wirkung erst nach dem Wachstumsstillstand erzielt wurde.

Zusammenfassend gilt also die bemerkenswerte Tatsache, daß die normalerweise im Körper vorhandenen gelösten Stoffe ausnahmslos keine unmittelbar geeigneten Aufbaustoffe sind. Die Stoffwechselenergien des wachsenden Organismus können offenbar gar nicht zur Wachstumsleistung herangezogen werden und scheinen also zwangsläufig ausschließlich den übrigen Leistungen zur Verfügung zu stehen. Nur aus der Zerstörung von Zellen, wie sie durch die künstliche Autolyse nachgeahmt wird, entstehen nachweisbare Stoffe, die zum Wachstum verwendbar sind. Damit wird zugleich auch dem Verständnis näher gebracht, daß und weshalb im lebendigen Organismus nach geschehener Verwendung dieser Stoffe das Wachstum wieder zum Stillstand kommen muß.

Es ist auch ohne die genannten Versuchsergebnisse naheliegend, daran zu denken, daß die Wirksamkeit des Embryonalextraktes auf stofflichen Veränderungen mütterlicher Blutbestandteile oder entsprechender Stoffe im Ei beruht, vergleichbar den bei der Autolyse stattfindenden Vorgängen. Hinderlich ist für die Vorstellung als eine erklärende der Umstand, daß die Wirkung des Embryonalextraktes unspezifisch zu sein scheint. Wenigstens ist es mit Hilfe der Wachstumsmessung nicht möglich, am Gewebe des Hühnerembryos Unterschiede der Wirksamkeit zwischen den Embryonalextrakten von Kaninchen und Huhn zu finden. Auch umgekehrt wirken am embryonalen Kaninchengewebe die Extrakte von Hühner- und Kaninchenembryonen vollkommen gleich stark. Die Tab. 3 belegt solche Versuche zahlenmäßig.

Tabelle 3.

Kultur Nr.	Tierart	Extrakt vom	Relativ. Zu-wachs	Kultur Nr.	Tierart	Extrakt vom	Relativ. Zu-wachs
187/9	Huhn	Kaninchen	7,3	131/2	Kaninchen	Huhn	3,3
187/10	"	"	3,5	131/4	"	"	2,2
187/11	"	"	6,1	131/5	"	"	3,7
193/3	"	Huhn	4,6	132/6	"	Kaninchen	2,1
193/6	"	"	2,9	132/7	"	"	2,4

Dieser eigenartige Umstand ist vorläufig und in diesem Zusammenhang keiner Erklärung zugänglich. Er verdient nur, seiner Sonder-

barkeit wegen festgestellt und gegenwärtig gehalten zu werden mit Rücksicht auf weiter unten besprochene Befunde.

Bemerkenswert ist auch, daß die Wirkungsstärke der Auszüge von Embryonen verschiedenen Alters nicht gleich groß sein soll. Diese Feststellung scheint allerdings im Schrifttum nirgends genauer dargelegt zu sein. Bei der deshalb angestellten Prüfung dieser Angaben fand sich nun ein erklärender Fehler in der Berechnung. Die übliche Weise der Extraktherstellung geschieht nach der Vorschrift, das Volumen der verwendeten Embryonen mit gleichem Volumen Flüssigkeit zu verdünnen. Vorausgesetzt nun, daß wirksame Stoffe im Embryo in bestimmter Menge vorhanden sind, so würde deren Konzentration ohnehin mit zunehmendem Alter der Embryonen verringert werden. Die Konzentration würde aber vor allem durch die Zugabe mit dem Alter wachsender Volumina Flüssigkeit erheblich abnehmen. Diese Abnahme müßte, entsprechend der erheblichen Volumzunahme des Embryo während seiner Entwicklung, beträchtlich groß sein, und es müßten auf diese Weise also Stoffe, deren Wirksamkeit von der Konzentration abhängt, durch die Art der Extraktbereitung ausgeschaltet werden. So ergibt sich also aus einem rechnerischen Fehler ein möglicherweise falscher Schluß. Möglicherweise nur, denn es könnte ja trotzdem eine Abnahme der Wirksamkeit vorhanden sein.

Diese Mängel der Extraktherstellung können natürlich leicht abgestellt werden. Dazu wurden die Extrakte, nachdem der Fehler in ihrer Herstellung erkannt war, nicht mehr in der oben erwähnten Weise gewonnen, sondern auf ein jedesmal gleiches Volumen, berechnet auf den einzelnen Embryo, gebracht. Dieses Volumen beträgt für den Hühnerembryo 7 ccm und für den Kaninchenembryo 15 ccm. Gelegentlich wurde auch abweichend von diesen Zahlen mit anderen Flüssigkeitsmengen gearbeitet, dann aber der Auszug hinterher nicht als 100 proz., sondern als entsprechend stärkerer oder schwächerer verwendet. Versuche mit solchen Extrakten ergaben, daß Unterschiede in der Wirkung in bezug auf das Alter der Feten nicht festzustellen waren. Entsprechend der Zahl der Versuche und gelegentlichen Unregelmäßigkeiten in den Ergebnissen ist es aber nicht gestattet, sich ein abschließendes Urteil zu bilden.

Von der Art der Extraktherstellung findet man zu weiteren Fragen. Es ist besprochen worden, daß die ursprüngliche Bewertung von Serum und Embryonalauszug in neuerer Zeit eine durchgreifende Wandlung erfahren hat. Das Serum scheint außer fördernden und hemmenden Faktoren nichts für das Wachstum zu enthalten. Durch Zugabe von Serum kann also nur die Wachstumsstärke vergrößert oder verkleinert werden, und solange nicht andere Bedingungen erfüllt sind, ist mit Serum allein kein Wachstum zu erzielen. Diese anderen Bedingungen,

die scheinbar vom Embryonalextrakt erfüllt werden, lassen sich sehr schwer von der Serumwirkung getrennt untersuchen, weil im Embryonalauszug unvermeidlich Serum enthalten ist, wenn auch embryonales. Da wir wissen, daß die Größe der Serumwirkung abhängt vom Alter des Tieres und mit dem Alter abnimmt, wird das Embryonalserum mutmaßlich besonders wirksam sein. Die Abtrennung der Wirkung des embryonalen Serum von der übrigen Wirkung des Embryonalextraktes wird also besonders wünschenswert. Den Embryo vor der Extraktbereitung vom Serum zu befreien, wäre die eine dafür bestehende Möglichkeit. Eine andere, in der Ausführung einfachere, könnte darin bestehen, daß die Wirkung des Embryonalserum allein bestimmt und mit der Wirkung des Gesamtauszuges verglichen wird. Durch die Untersuchung einzelner Teile des Gesamtextraktes wird sich auch etwas darüber aussagen lassen, ob die Extraktwirkung bedingt ist durch Bestandteile der Zellen oder durch Stoffe, die in den Gewebeflüssigkeiten vorhanden waren und vielleicht von Zellen geliefert wurden.

Mit Rücksicht auf diese Fragen wurde bei älteren Feten, bei denen die technischen Schwierigkeiten nicht zu groß sind, nach dem Durchschneiden des Nabelstranges das ausströmende Blut aufgefangen. Bei anhaltender Herzaktivität ist es möglich, mehrere Tropfen davon zu gewinnen. Dieses Blut gerinnt je nach dem Alter des Embryos gar nicht oder doch nicht leicht, und kann also ohne große Schwierigkeiten in flüssigem Zustande erhalten werden. Nach Zugabe von gleicher Menge Lockescher Lösung wird zentrifugiert und eine klare Flüssigkeit erhalten. Diese wird an Stelle von Embryonalauszug verwendet. Der beim Ausschleudern erhaltene Niederschlag wird erneut mit einigen Tropfen Lockescher Lösung versetzt. Die mikroskopische Untersuchung dieser Flüssigkeit beweist, daß die Blutzellen erhalten sind und morphologisch nachweisbare Schädigungen nicht aufweisen. Es wird darauf geachtet, daß alles, was zu Schädigungen dieser Zellen führen kann, vermieden wird, ehe die Trennung der flüssigen und zelligen Blutbestandteile durchgeführt ist. Vor allem wird die geschilderte Arbeit möglichst schnell ausgeführt, und die verwendeten Gefäße werden eisgekühlt. Man darf dann wohl auf Grund der Arbeitsweise sagen, daß die gewonnene zellfreie Flüssigkeit keine Stoffe enthält, die sie nicht schon im strömenden Blut des Embryo enthalten hatte. Und man darf verneinen, daß diese Flüssigkeit Stoffe enthält, die erst nachträglich aus geschädigten oder zerfallenen Zellen frei geworden sind.

Die Prüfung dieses embryonalen Serums ergibt nun, daß seine Wirkung gleich zu sein scheint der des Embryonalauszuges. Entsprechend den Schwierigkeiten bei der Gewinnung des embryonalen Serums mußte auf größere Versuchsreihen verzichtet werden. Die Ergebnisse von 5 angestellten Versuchen, die völlig miteinander überein-

stimmen, veranschaulicht Abb. 6. Sie enthält die mittleren Werte der in den Versuchen gefundenen Wachstumsstärken.

Der Vergleich zwischen der Wirkung des Embryonalextraktes und des Embryonalserums zeigt also keinerlei Unterschiede in der Wirksamkeit. Zu bedenken ist dabei nur, daß beim Extraktionsverfahren nicht nur auch Serum erhalten werden kann, sondern vielleicht sogar mehr Serum als beim Ausbluten. Außerdem werden im Auszug auch andere, möglicherweise wirksame Stoffe enthalten sein, und endlich auch solche, die durch die Zellzerstörung frei gemacht werden. Obgleich die Gradmessung ergibt, daß Unterschiede in der Wirkung von Auszug und Serum nicht bestehen, darf man also nicht schließen wollen, daß die Wirkung ausschließlich auf Stoffen des Serums beruht, sondern man darf nur feststellen, daß die größte Menge der Wuchsstoffe des Embryo sich gelöst in dessen Serum befindet.

Die Herkunft der Wuchsstoffe als nächste Frage ist sehr schwer zu entscheiden. Es würde nötig sein, aus der Nabelvene und -arterie getrennt Blut zu entnehmen, wozu die Embryonen von Huhn und Kaninchen zu klein sind. Aus den durchgeführten Versuchen würde hervorgehen, ob die Umwandlung der mütterlichen Blut- oder der Eidotterbestandteile in den fetalnen Chorionzotten oder erst im Embryo selbst erfolgt. Im voraus läßt sich darüber gar nichts vermuten. Man müßte in der angegebenen Richtung eine Analyse dieser Frage versuchen. Diese ursprünglich beabsichtigte Arbeit wurde mit Rücksicht auf Befunde unterbrochen, die im folgenden mitgeteilt werden.

Zusammenfassend gesagt wurde also dem Embryonalauszug mit seiner ausschlaggebenden Bedeutung für das Wachstum auch durch neue Untersuchungen in Frage kommender Stoffe seine Sonderstellung nicht genommen. Wir müssen annehmen, daß die normalerweise im Blut kreisenden Stoffe nicht unmittelbar Aufbaustoffe darstellen. Nur die aus der autolytischen Gewebezerstörung frei gemachten Stoffe stellen unmittelbar Aufbaustoffe dar und sind in etwa dem Embryonal-extrakt vergleichbar.

Die Wirkung des Embryonalextraktes scheint wenigstens teilweise unspezifisch zu sein, da sich Auszüge verschiedener Tiere gegenseitig vertreten können.

Durch das Alter der Embryonen bedingte deutliche Unterschiede der Wirksamkeit werden nicht gefunden, solange die Konzentration

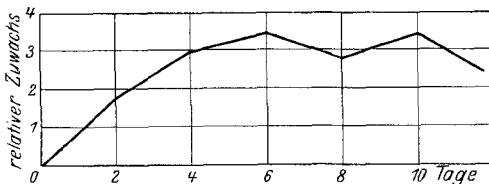


Abb. 6. Wirkung von reinem Embryonalserum; mittlere Werte aus 5 Versuchen. Kulturen Nr. 175/6, 7, 8; 176/2, 8.

der wirksamen Bestandteile unverändert bleibt. Im Versuch, nicht aber unter natürlichen Bedingungen, kann diese Konzentration erhalten bleiben, und da sie unter natürlichen Bedingungen mit zunehmendem Alter des Embryos abnimmt, kann dadurch das Nachlassen des Wachstums dem Verständnis nähergebracht werden.

Zur Feststellung der Herkunft der wirksamen Bestandteile des Embryonalauszuges wurden die im embryonalen Blute kreisenden Stoffe getrennt vom übrigen Embryonalauszug untersucht. Sie zeigten sich in solchem Maße wachstumsauslösend, daß sie möglicherweise die wichtigsten wirksamen Teile des Embryonalextraktes überhaupt darstellen. Aus der Art der Gewinnung läßt sich vermuten, daß die genannten Stoffe nicht dem Zellzerfall entstammen, sondern unter natürlichen Bedingungen im Blute des Embryos kreisen. Diese Stoffe entstehen den Versuchen nach erst im Embryo oder in den fetalen Eihäuten und scheinen weder im kreisenden Blut lebendgebärender Muttertiere noch im Eidotter oder Eiweiß des Huhnes vorhanden zu sein. Es ist also daran zu denken, daß die Bildung von Aufbaustoffen eine spezifische Leistung darstellt.

#### *Über gegenseitige Beeinflussung wachsender Gewebekulturen.*

Es ist bekannt, daß beim Wachstum des Explantates eine gleichbleibende Wachstumsstärke in einigen Tagen erreicht wird, die im weiteren Verlauf ungefähr beibehalten wird. Etwa auftretende Schwankungen pflegen sich durch solche in entgegengesetzter Richtung von einem Tag zum anderen oder auch innerhalb mehrerer Tage wieder auszugleichen. Größere Änderungen der Stärke treten bei gleichbleibenden Bedingungen nicht auf. Dabei wird abgesehen von solchen Veränderungen, wie sie die amerikanischen Forscher am Jahrzehnte alten Fibroblastenstamm beobachten konnten, die nach Jahren auftreten und jahrelang bestehen bleiben. Bekannt ist ferner auch, daß unter gleichen Bedingungen die Stärke verschieden ist für Gewebestücke verschiedener Herkunft. So erreicht etwa im Hühnerplasma und Embryonalextrakt vom gleichen Tier das Herzexplantat vom 4. Bebrütungstag eine andere Wachstumsstärke als das vom 8. oder 20. Tage. Methodisch ist zur Feststellung nur nötig, daß in vollkommen gleichbleibenden Zeitabständen auf neues Medium übertragen wird, und zwar in Zeitabständen, die vorteilhaft ebenso groß gewählt werden, wie die zwischen 2 Messungen, die also 48 Stunden betragen. Unter solchen Bedingungen werden Kurven der Wachstumsstärke wie die in Abb. 7 dargestellten erhalten.

Bei den Arbeiten, über die in vorhergehenden Abschnitten berichtet wurde, schien es häufig eine erlaubte methodische Vereinfachung zu sein, daß man mehrere Explantate in einer Schale gemeinsam züchtete.

Ohne weiteres naheliegend war das bei Vergleichsversuchen. Die *Carreelschen* Schalen sind ja genügend groß, um jede räumliche gegenseitige Behinderung der Gewebestücke leicht vermeiden zu lassen.

Mit Rücksicht darauf, daß jede Vereinfachung bei den im übrigen so großen Schwierigkeiten der Züchtung doppelt hoch zu werten ist, wurde gelegentlich auch versucht, solche Kulturen in einer Schale gemeinsam zu züchten, die auf Grund von Altersunterschieden oder verschiedener Vorbehandlung untereinander größere Abweichungen in der Wachstumsstärke gezeigt hatten. Wurden solche Explantate, deren Wachstumsstärke seit einiger Zeit gemessen und bekannt war, gemeinsam in einer Schale gezüchtet, so entstanden Veränderungen der Wachstumsstärke, die aus den Kurven der Abb. 8 u. 9 hervorgehen.

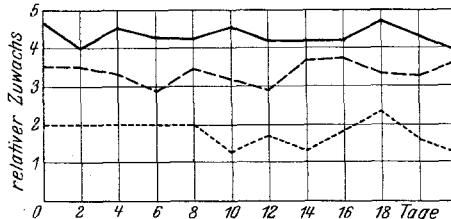


Abb. 7. Gleichbleibender relativer Zuwachs nach erreichtem Durchschnittswert. Hühnerembryonen vom 4. (—), 8. (---) und 20. (.....) Bebrütungstage. Kulturen Nr. 148/12, 148/6 und 149/6.

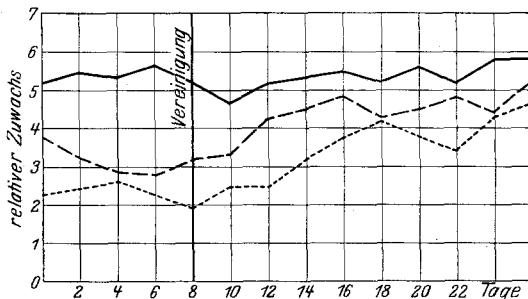


Abb. 8. Verschwinden von Wachstumsunterschieden bei gemeinsamem Wachstum in gleicher Schale. Hühnerembryonen am 5. (—), 11. (---) und 20. (.....) Tage. Kulturen Nr. 144/3, 153/9 und 149/18.

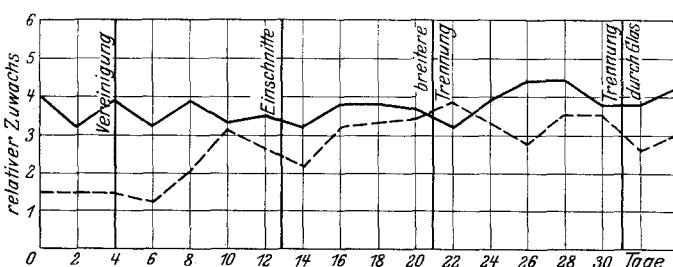


Abb. 9. Die Wachstumsart der Kultur wird von der Nachbarkultur beeinflußt. Einschnitte und Lücken im Plasma schalten die Beeinflussung nicht aus. Hühnerembryonen vom 5. (—) und 18. (---) Tage. Kultur Nr. 144/4 und 148/8.

Dieses Verhalten, das deutlich genug war, um schon ohne Messung und Rechnung aufzufallen, wurde anfangs nur als Störungsfaktor gewertet, dessen Beseitigung wünschenswert erschien. Indessen gab schon bald die Regelmäßigkeit dieser Beeinflussung und die Unmöglich-

keit, sie leicht zu beseitigen, die Veranlassung dazu, diesen Beziehungen ihrer selbst wegen nachzugehen. Auffallend war an den Befunden auch, daß weder eine unregelmäßige Beeinflussung, noch eine mittlere Wachstumsstärke entstand. Sondern mehr oder weniger deutlich blieb die größte Wachstumsstärke unverändert, während die kleineren größer wurden. Auch das geht aus den abgebildeten Kurven verschieden deutlich hervor.

Bei dem Wunsch, eine Erklärung für dieses Verhalten zu finden, lag es nahe, an chemische Wirkungen zu denken oder sich doch wenigstens vorzustellen, daß ein Stoffaustausch zwischen den Kulturen, vermittelt durch das Medium, stattfinden würde. Die gegenseitige Beeinflussung müßte demnach verschwinden, sobald die Wege dieses Stoffaustausches versperrt würden.

Zu diesem Zweck wurden Explantate verschiedener Wachstumsstärke in Schalen vereinigt, in denen sie ohne Zugabe von Flüssigkeit, ausschließlich im halbstarren Plasma gezüchtet wurden. Das Plasma befand sich zur Verbesserung seiner Haftfähigkeit auf einem Unterguß von Agar (2proz.), der möglichst dick gewählt wurde (2,0—3,0 Agar auf *Carrel*-Schalen von 5 cm Durchmesser).

Bei solchen Züchtungen wurden, nachdem die gegenseitige Beeinflussung der Gewebestücke in der geschilderten Weise sichergestellt war, die einzelnen Kulturen durch tiefe Einschnitte voneinander getrennt. Diese Einschnitte wurden bald bis auf die Agarschicht, bald bis auf den Schalenboden geführt. Die Absicht war, dadurch Lücken im Medium zu schaffen, die als Schranken für den Stoffaustausch wirken sollten. Solche Versuche hatten zum Ergebnis, daß die gegenseitige Beeinflussung in keiner Weise behindert zu werden schien, je nachdem sogar noch zunahm (vgl. Abb. 9). Es war nun daran zu denken, daß die sehr unvollkommene Anordnung der Versuche für den Mißerfolg verantwortlich sein könnte. Die Einschnitte zwischen den Kulturen klafften an der einen Stelle weit, an einer anderen kaum oder gar nicht, und es war nicht erlaubt, zu sagen, daß wirkliche und unüberwindliche Schranken für den Stoffaustausch errichtet worden seien.

Eindeutiger schien das Ergebnis werden zu müssen durch Verbreiterung der Lücken in der Plasmaschicht. Dazu wurde, ebenfalls mit einer Agarschicht als Unterguß, eine nur kleine Zahl von Explantaten (2—3) in eine gemeinsame Schale gebracht. Sobald sich dann die Wachstumsstärken einander näherten, wurden Streifen der Plasma- und Agarschicht zwischen den Kulturen herausgeschnitten, so daß breitere Räume entstanden, durch die hindurch ein Stoffaustausch unmöglich zu sein schien. Es braucht kaum gesagt zu werden, daß auch so keine guten Versuchsbedingungen hergestellt waren und daß der Versuch, Plasmastreifen herauszuschneiden, ohne die Kultur zu

stören oder zu infizieren, häufiger mißlang, als er durchgeführt werden konnte. Es genügte ja auch für den einzelnen Versuch nicht die einmalige Ausführung, die vielmehr in jeder Passage aufs neue gelingen mußte. Indessen gelang das zu wiederholten Malen. Mehrfach wurden dabei auch ohne nachweisbare Schädigung der Kulturen die geschaffenen Lücken im Plasma und Agar mit sterilen Tupfern ausgetupft. Es sollte dadurch um so sicherer unmöglich gemacht werden, daß ein Stoffaustausch durch die Lücken hindurch stattfinden könnte. Die Versuche hatten kein einheitliches Ergebnis. Einige Male schien die vorher deutliche Beeinflussung nachher zu verschwinden, in anderen Fällen, entsprechend den Abb. 9 u. 10, fiel die Beeinflussung nicht fort.

Mit Rücksicht auf die Möglichkeit, daß Fehler in der Anordnung immer noch für die Ergebnisse verantwortlich sein könnten, und daß trotz allem doch ein Stoffaustausch durch Einschnitte und Lücken im Plasma stattfände, wurde auf eine 3. Weise versucht, zu klaren Ergebnissen zu gelangen.

Es ließ sich ja auch nicht sagen, ob in der gut verschlossenen Schale und dem Feuchtigkeitsgehalt in ihr die Feuchtigkeit in den Lücken der Schicht nicht genügen könnte, um den Stoffaustausch zu ermöglichen. Ohne allzu große Aussicht auf Erfolg wurde deshalb die nachträgliche Trennung vorher vereinigter Kulturen durch Glaswände ausgeführt. Dazu kamen die Gewebestücke bekannter und verschiedener Wachstumsstärken gemeinsam in Plasmaschichten ohne Unterguß von Agar. Sobald die erwarteten Veränderungen der Wachstumsstärke deutlich waren, wurden schmale Streifen von Glas (Objektträgern) auf halbem Weg zwischen den Kulturen aufgestellt. Dabei wurde von den Glasstreifen die Plasmaschicht meist nicht zerrissen und unterbrochen, sondern nur eingedrückt. Es war also zu erwarten, daß unter dem Glase der Stoffaustausch stattfinden würde, der vorher auch durch Lücken im Plasma nicht hatte verhindert werden können. Ehe indessen dieser Fehler, der nicht vor den Versuchen, sondern erst nach einigen solchen erkannt wurde, abgestellt war, zeigten die ersten Versuche schon das in Abb. 11 dargestellte Ergebnis: die gegenseitige Beeinflussung verschwand.

Das ließ sich in weiteren Versuchen mit großer, wenn auch nicht mit vollständiger Regelmäßigkeit bestätigen.

Wie nebenbei bemerkt sei, befinden sich bei diesen und allen folgenden Versuchen die technischen Schwierigkeiten so hart an der Grenze des

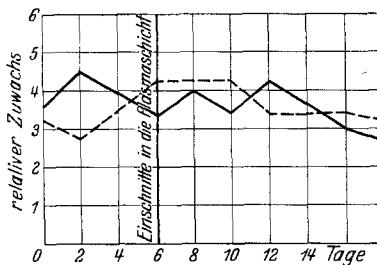


Abb. 10. Durch Einschnitte in das Plasma und Entfernen der eingeschnittenen Teile wird die gegenseitige Beeinflussung der Kulturen nicht aufgehoben. Hühnerembryonen vom 5. (—) und 18. (---) Tage. Kultur Nr. 144/6 und 148/11.

Möglich, daß größere Versuchsreihen kaum aufgestellt werden können. Gleichzeitig können hier aber auch kleinere Versuchszahlen dadurch an Beweiskraft gewinnen, daß der einzelne Versuch schon mehrere Gewebekulturen enthält, von denen jede nicht nur über sich selbst, sondern

zugleich über ihre Nachbarkultur etwas aussagt. Die Versuche enthalten so in sich selbst mehrere Vergleichsversuche.

Mit einer anderen und besseren Anordnung ließ sich zum gleichen Ergebnis kommen. Von Kulturen verschiedener Wachstumsstärken wurden möglichst genau gleich große Tochterkulturen angelegt. Je eine

Kultur mit größerer Wachstumsstärke wurde gemeinsam gezüchtet mit je einer anderen von der geringeren. Von diesen Paaren ungleicher Partner kam das eine ohne jede Trennung in eine Schale und zeigte nach einiger Zeit die zu erwartende Annäherung der Stärken. Das andere Paar wurde in einer Schale vereinigt, in der die beiden Kulturen von Anfang an durch Glaswände getrennt wurden. Das sehr klare Ergebnis wird durch die Kurven der Abb. 12 dargestellt. Die Glaswände hindern in diesen Versuchen das Zustandekommen von Beeinflussungen.

Es zeigte sich also, daß Einflüsse von einer Kultur auf die

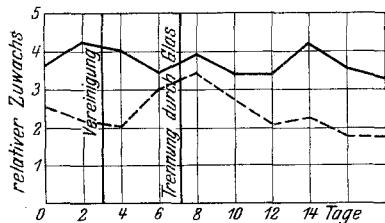


Abb. 11. Durch Glas wird die gegenseitige Beeinflussung der Kulturen aufgehoben. Hühnerembryonen vom 5. (—) und 18. (---) Tage. Kultur Nr. 210/2 und 215/2.

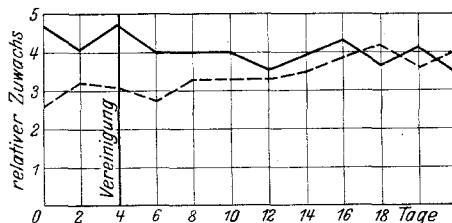


Abb. 12a. Nach der Vereinigung in gemeinsamer Schale erfolgt gegenseitige Beeinflussung des Wachstums.

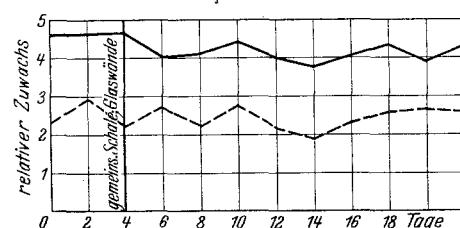


Abb. 12b. Bei Vereinigung in gemeinsamer Schale und gleichzeitiger Trennung durch Glaswände entsteht keine Beeinflussung. In Abb. 12a und 12b Hühnerembryo vom 5. (—) und 18. (---) Tage. Kulturen Nr. 210/5a und b; 215/9a und b.

andere nachweislich stattfanden, die durch Glaswände unmöglich gemacht werden konnten. Die Bedingungen, unter denen dabei das Glas als Hindernis wirkte, die zunächst noch nicht genauer in Betracht gezogen worden waren, bedürfen näherer Untersuchung.

Die Anordnung der Glasstreifen in der Schale und in bezug auf die darin vorhandenen Gewebestücke wurde in einer weiteren Versuchsreihe in verschiedener Weise verändert. Dabei leitete die Vorstellung, daß

die Behinderung durch das Glas bestehen müßte in einer Vergrößerung der Entfernung zwischen den Kulturen. Der gedachte Stoffaustausch würde nicht mehr auf geradem Wege, sondern auf dem Umwege vor sich gehen, der durch die Breite der Schranken bedingt wurde. Durch Wechsel in der Größe dieses Umweges, das heißt durch wechselnde Stellung der Glaswände zwischen den Kulturen, mußte Näheres über die bestehenden Einflüsse zu erfahren sein.

Zu diesem Zwecke wurden Anordnungen getroffen, wie sie in den Abb. 13—17 dargestellt sind.

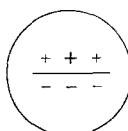


Abb. 13.

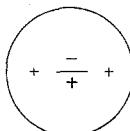


Abb. 14.

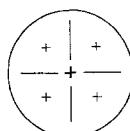


Abb. 15.

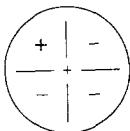


Abb. 16.

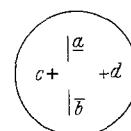


Abb. 17.

4—6 Explantate wurden in einer Schale vereinigt und waren so ausgewählt, daß eine der Kulturen eine erheblich bessere Wachstumsstärke als die anderen besaß, die ihrerseits möglichst gleiche Wachstumsstärke hatten und nahe miteinander verwandt waren. Die Kultur von größerer Wachstumsstärke ist in den Zeichnungen mit fettgedrucktem + versehen. Im übrigen ist mit + oder − bezeichnet, ob die betreffende Kultur eine Änderung der Wachstumsstärke erfahren hat oder nicht. Die Glaswände sind als Striche eingetragen. Die Abb. 13 entspricht dem schon Gesagten und zeigt, daß bei nahe benachbarten Kulturen, die in keiner Weise getrennt sind, eine Beeinflussung erfolgt, während die abgetrennten Kulturen in der Wachstumsstärke nicht verändert werden. Auch die in Abb. 14 gegebene Anordnung gibt keine neuen Aufschlüsse, sondern bestätigt nur die alten. Auffallend ist dagegen der Befund, der Abb. 15 u. 16 entspricht. Je nachdem, ob die Kultur stärksten Wachstumsgrades zentral oder peripher in einer Kreuzfigur angeordnet ist, scheinen ihre Wirkungen zur Geltung zu kommen oder unterbunden zu werden. Die Glasstücke wirken als Schranken, die scheinbar nicht umgangen werden. Es würde zu erwarten sein, daß die Glaswände, die zwar in einem Unterguß von Agar angebracht sind, seitlich sich aber nicht berühren und ebensowenig die Schalenwände, den Stoffaustausch zwar verzögern, aber nicht unterbinden können. Messungen lehrten außerdem, daß die Strecken, die als Umwege für den Stoffaustausch in Frage kamen, vielfach kleiner waren als die in anderen Fällen vorhandenen geraden Wege. So schien es mehr und mehr wahrscheinlich, daß die gefundenen Einflüsse nur auf geraden Wegen stattfanden, daß sie nicht um Ecken gehen konnten. Die Abb. 17 zeigt eine Anordnung, die darüber Aufschluß geben sollte. Sie zeigt ferner, daß

dieser Aufschluß wirklich zu erhalten war. Die Kulturen a und b sind von c durch Glaswände getrennt, die nur für geradlinige Einflüsse ein Hindernis bedeuten. Die Kultur d ist der Strecke nach von c weiter entfernt als a und b durch den Umweg von c entfernt sind. Trotzdem findet ein Einfluß zwischen c und d statt, während auf die kleinere Entfernung zwischen a und c bzw. b und c keine Beeinflussung zustande kommt. Der einzige dafür ersichtliche Grund ist die Biegung in den letztgenannten Strecken.

Diese zunächst höchst merkwürdige Tatsache ist auf keine Weise einer Erklärung zugänglich, solange zwischen beiden Kulturen ein Stoffaustausch angenommen wird. Die geltenden Gesetzmäßigkeiten für die Diffusion oder andere Vorgänge chemisch-stofflicher Art geben keinerlei Aufschlüsse über diesen Befund. Dagegen legen die letztbesprochenen Versuche die Vermutung nahe, daß es sich bei den Beeinflussungen um Kräfte handelt, die ihren Kraftfeldern nach oszillativer Art sind und strahlender Energie entsprechen. Für die Absicht, weitere und unterstützende Anhaltspunkte für diese Meinung zu finden, sind im wesentlichen 2 Wege gegeben. Deren einer ist der schon beschrittene: der Nachweis mit Hilfe der biologischen Wirkungen. Er scheint in besonderem Maße günstig zu sein, weil erfahrungsgemäß vielfach biologische Reaktionen durch Kräfte oder Stoffe von zu geringem Maß oder zu kleiner Menge ausgelöst sind, als daß sie physikalisch oder chemisch nachzuweisen wären.

Ging, wie vermutet werden mußte, das Wachstum in der Kultur einher mit chemischen Vorgängen, in deren Verlauf strahlende Energie als wachstumsfördernder Faktor gebildet wurde, dann war an die Möglichkeit zu denken, daß der Embryonalextrakt dabei eine Rolle spielen könnte. Besonders wahrscheinlich wurde das auf Grund der erwähnten unspezifischen Wirkungsweise des Auszuges, wie dies sich z. B. in der Wirkung des Kaninchenextraktes auf Hühnerkulturen und umgekehrt äußerte. Der Embryonalauszug könnte nun etwa Stoffe enthalten, die zusammen mit anderen, etwa im Gewebe vorhandenen, strahlende Energie freiwerden ließen. Oder der Auszug könnte auch in sich die nötigen Stoffe zur Bildung solcher Energie enthalten. Endlich wäre möglich, daß der Embryonalextrakt gar nicht im unmittelbaren Zusammenhang mit diesen Vorgängen steht, sondern daß ihm eine ganz andere Rolle zufiele. Der Ursprungsort der genannten Energie müßte dann in anderem Zusammenhang, etwa in dem Embryonalgewebe, ohne jede nähere Bestimmung gesucht werden. Im wesentlichen war zu erreichen, daß eine größere Quelle der Energie gefunden würde, als die wachsende Kultur darzustellen schien, denn nur so würden sich auch größere Möglichkeiten für die Versuchsanordnung ergeben.

Zu diesem Zwecke wurden in einhalsigen *Carrel'schen* Schalen, entsprechend der Abb. 18 u. 19, Kulturen angelegt, die sämtlich gleiche Wachstumsstärke besaßen und deren Lage zueinander und zum Schalenhalse aus den Abbildungen hervorgeht. In den Schalenhals wurde eingepaßt ein Glasröhrchen, das an einem Ende zugeschmolzen war. Es wurde mit passendem Gummischlauch dicht in den Schalenhals eingepaßt, sowohl zum Schutze gegen Austrocknen, wie zur Vermeidung von Infektionen. Das Röhrchen wurde mit Watte gefüllt und diese mit unverdünntem Embryonalextrakt getränkt. Es kam bei dem Einführen des so hergerichteten Röhrchens mehrfach vor, daß sich dieses mit der Plasmaschicht an der Ansatzstelle des Halses berührte. Dann war ein Übertritt des konzentrierten Auszuges in die Schale möglich, ebenso wie seine Diffusion und entsprechende Wachstumsbeeinflussung

der benachbarten Kulturen. Deshalb mußte darauf geachtet werden,

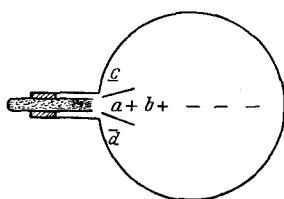


Abb. 18.

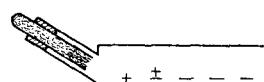


Abb. 19.

daß die durchtränkte Watte nicht aus dem Röhrchen herausragte, sondern eher etwas hinter dem offenen Rande zurückblieb, ferner darauf, daß das Röhrchen nicht zu tief in den Hals eingeführt wurde. Um einen Übertritt des Inhaltes des Röhrchens gänzlich ausschließen zu können, wurde in 3 von 6 Versuchen vor dem Einführen des Röhrchens der Rand seiner Öffnung infiziert. Wenn jetzt ein Übertritt stattfinden sollte, so müßte zuerst die Infektion übertragen, was ohne weiteres festzustellen sein würde.

Diese Versuche, die rein technisch eine wünschenswerte Vorübung zu folgenden darstellen, hatten ein vollkommen negatives Ergebnis. Das heißt, die gesuchte Energie ist im Embryonalauszug nicht nachzuweisen.

Der Bericht über die Einzelheiten der Versuchsanordnung wird nur deshalb gegeben, weil in einer folgenden Versuchsreihe mit der gleichen Anordnung gearbeitet wurde mit nur einer Abweichung. Außer der mit Embryonalextrakt getränkten Watte kam in das Röhrchen, und zwar nahe an seine Öffnung, der Kopf oder ein Stück Kopf von 3—6 Tage alten Hühnerembryonen. Diese Teile wurden schonend so angebracht, daß sie von der durchtränkten Watte umgeben waren.

Im ersten Versuch stellte sich heraus, daß in der Wärme des Brutschrankes die Embryonalköpfe oder Kopfteile mit fortschreitender Autolyse so sehr verflüssigt werden, daß die ohnehin durchtränkte Watte die

Flüssigkeit nicht zu fassen vermag, der Überschuß in die Schale läuft und das Versuchsergebnis gefährdet. Also war es nötig, die Köpfe nach bestimmter Zeit zu entfernen und durch neue zu ersetzen. Die Schalen wurden nicht dauernd mit derartigen Röhrchen versehen, sondern täglich nur etwa 6—10 Stunden lang. Das in sämtlichen 4 so angestellten Versuchen gewonnene Ergebnis war vollkommen eindeutig und ist in den Abb. 18, 19 und 20 dargestellt. Als positiv sind dabei solche Kulturen bezeichnet, die eine Verbesserung der Wachstumsstärke erfahren haben, als negativ solche, die keine Veränderung zeigten. Die zwischen den Kulturen *c*, *a* und *d* der Abb. 18 eingezeichneten Striche entsprechen feinen Glasstreifen aus Deckgläsern, die die Kulturen gegen einander abblenden und gegenseitige Beeinflussungen verhindern sollen.

Das eindeutige Ergebnis dieser Versuchsreihe lautet also, daß die gemeinsam von Extrakt und embryonalem Gewebe ausgehende deutliche Wirkung sich der Erwartung entsprechend verhält, sich ausschließlich

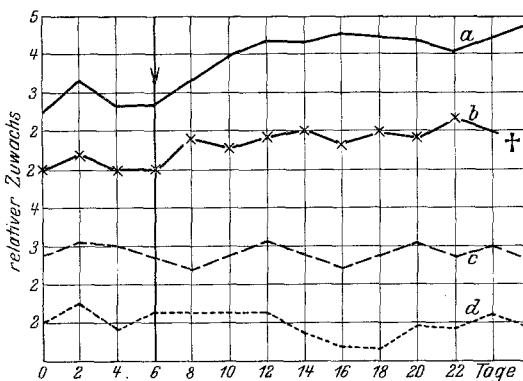


Abb. 20. Beeinflussung des Wachstums durch Embryonalgewebe (im Schalenhals), zugeführt bei  $\downarrow$ . Die Bezeichnungen *a*—*d* beziehen sich auf Abb. 18. Die Kurven zeigen die nur gradlinig wirksame Beeinflussung. Hühnerembryo vom 5. Tag, Kultur Nr. 210/12a—d. — Die aus Gründen der Übersichtlichkeit übereinander gezeichneten Kurven haben verschiedene Lagen des Nullwertes.

geradlinig fortpflanzt und nicht anders als auf physikalisch-optische Gesetzmäßigkeiten bezogen werden kann. Auch hier sei besonders darauf aufmerksam gemacht, daß die Strecke zwischen Energiequelle und der Kultur *b* aus naheliegenden Gründen größer gewählt war als die gebogene Strecke zwischen Schalenhals und den Kulturen *c* und *d*.

Wenn die bisherigen Beobachtungen und die daraus abgelesenen Folgerungen richtig sein sollten, dann müßten auch Reflektionswirkungen der nachgewiesenen Energie zu erhalten sein. Allerdings schien es möglich, daß die Undurchlässigkeit des Glases für die nachgewiesenen Einflüsse Glasspiegel zu solchen Versuchen ungeeignet machte und Metallspiegel vorzuziehen waren. Aus solcher Überlegung entstand eine

letzte Anordnung, die eine Bestätigung der Befunde bringen sollte und die in Abb. 21 dargestellt ist.

In Petrischalen wurden in einen Unterguß von Agar Glaswände eingebracht, die den ausgezogenen Linien der Zeichnung entsprechen. Die fettgedruckten Linien geben die Stellung kleiner Metallspiegel an, die 1 und 2 cm Seitenlänge haben. Die punktierten Linien sind dazu bestimmt, zusammen mit entsprechenden, am Boden der Petrischale außen angebrachten Hilfslinien, die genaue Orientierung der einzelnen Teile zueinander während des Versuches zu ermöglichen. Das war erforderlich teils zum nachträglichen Anbringen der Spiegel, teils zur Nachprüfung der richtigen Lageverhältnisse einzelner Teile, insbesondere beim Einpflanzen der Kulturen. Der Anordnung liegt eine genaue geometrische Zeichnung zugrunde, in der die Spiegelstellung und Blendenwirkung bestimmt worden ist. Die Feldmitte ist als Wirkungszentrum gedacht und zur Aufnahme der wirkenden Stoffe bestimmt. Die nicht abgeblendeten

Kulturen *a*, *c*, *e*, *g* müßten bei vorhandener Wirkung eine Beeinflussung ihres Wachstums im Sinne der Verbesserung erfahren. Die abgeblendeten Kulturen *b* und *f* müßten unbeeinflußt bleiben, die Kulturen *d* und *h* müßten nach dem Anbringen der Spiegel eine Vergrößerung der Wachstumsstärke zeigen. Diese Vergrößerung kann aber nur auf Spiegelwirkung zurückgeführt werden, wenn Beeinflussungen der Nachbarkulturen *a*, *c*, *e* und *g* auszuschließen sind. Dieses geschah dadurch, daß die Kulturen, deren Einfluß unerwünscht war, gelegentlich durch eingebrachte Glaswände abgeblendet oder zumeist vollständig entfernt bzw. gar nicht erst eingepflanzt wurden. Obgleich der Versuch nur 4 mal durchgeführt werden konnte, war bei der Anzahl der Explantate genügend Gelegenheit gegeben, sämtliche Möglichkeiten der Anordnung zu verwirklichen und mehrfach zu wiederholen.

Die mit Agar ausgegossenen Schalen wurden probeweise in den Brutschrank gebracht, nachdem die Glaswände der Schilderung entsprechend angeordnet waren und die von den Glaswänden umstellte Schalenmitte von dem erstarrten Agar wieder befreit worden war. Stellte sich heraus, daß diese Vorbereitungen nicht zu einer Infektion der Schale geführt hatten, so wurden die zum Versuch gewählten Explantate bekannter Wachstumsstärke an den vorgesehenen und aus der untergelegten

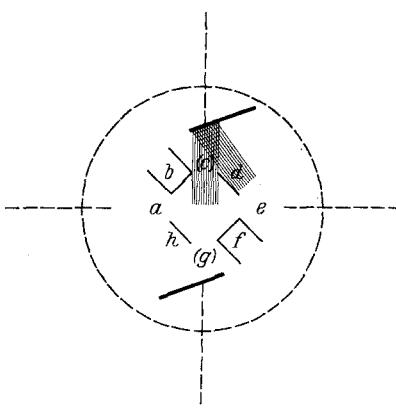


Abb. 21.

Zeichnung genau abgelesenen Stellen im Plasma eingepflanzt. Die dann in der üblichen Weise folgenden Messungen und Übertragungen machten für einen Teil der Explantate den anzustellenden Versuch aus. Für den Spiegelversuch mit den Explantaten *d* und *h* wurden diese mehrere Tage lang in den Schalen gemessen, nötigenfalls gegen Nachbarkulturen abgeblendet. Nachdem ihre unbeeinflußte Wachstumsstärke sichergestellt war, wurden die Spiegel eingebracht. Dieser schwierigste Teil des Versuches scheiterte, von 4 Fällen abgesehen, daran, daß entweder der Spiegel nicht richtig stand oder beschlagen war und mit keimfreier Watte abgewischt werden mußte und jedenfalls zwischen Schale und Instrumenten so oft hin und herging, daß ausgiebige Infektionsmöglichkeiten gegeben waren. Als wirksame Substanz wurden wie vorher Embryonalgewebe und -auszug verwendet, indem in der Schalenmitte, die frei von Agar war, auf dünner, mit Auszug durchtränkter Watte-schicht das Embryonalgewebe aufgelegt wurde. Die Schalen wurden in andere, weitere gestellt, in denen sich Paraffinum liquidum befand, das vor dem Verdunsten von Flüssigkeit schützen sollte.

Die Ergebnisse der Versuche zeigen die Abb. 22, 23 und 24. Sie entsprechen genau den Voraussetzungen und zeigen eine direkte Beeinflussung der Kulturen *a*, *c*, *e* und *g* und eine indirekte, auf die Mitwirkung des Spiegels zu beziehende der Kulturen *d* und *h*. Sie zeigen endlich die Undurchlässigkeit des Glases an den Kulturen *b* und *f*.

Die Richtigkeit der aufgestellten Behauptung, daß es sich um Beeinflussungen handeln müsse entsprechend physikalisch-optischen Gesetzmäßigkeiten, ist damit wohl bewiesen. Die Möglichkeit der experimentellen Bestätigung ist natürlich noch lange nicht erschöpft. Weitere solche Möglichkeiten sind vor allem mit der Verwendung von Quarz und Gefäßen aus solchem Material gegeben. Solche Versuche sind vorgesehen.

Hinausgeschoben sind auch weitere Arbeiten, die sich mit dem physikalischen Nachweis der gefundenen Energie beschäftigen sollen. Es ist gesagt worden, inwiefern dieser Nachweis nicht unbedingt gefordert werden muß. Da er aber nicht im voraus als unmöglich bezeichnet werden kann, so wird man ihn wenigstens versuchen. Dazu gehört eine Vorstellung vom Zustandekommen der Beeinflussung. Vielleicht sind an ihrer Entstehung lebendige Zellen beteiligt. Die fehlende Wirkung des reinen Embryonalauszuges spricht dafür. Wie sich beweisen ließ, wirken herausgeschnittene überlebende Embryonalteile eine nicht näher bestimmte Zeit lang, aber es ist anzunehmen, daß sie jedenfalls kaum lange genug wirken, um den photographischen Nachweis zu ermöglichen. Dieser würde ja eine der nächst gelegenen Nachweisarten sein. Die meiste Aussicht würde zweifelsohne bieten, den photographischen Nachweis am lebenden und unbeschädigten Embryo zu versuchen. Diesen außerhalb des Uterus oder der Eischale lange lebend zu erhalten,

ist aber bekanntlich nicht möglich. Dagegen gelingt es ohne allzu große Schwierigkeiten am bebrüteten Hühnerei, in die Kalkschale ein Fenster zu schneiden, das man aseptisch anlegt und mit sorgfältig aufgekleitetem Glase verschließt. Man beobachtet durch das Glasfenster hindurch Herztätigkeit und Größenzunahme und überzeugt sich leicht davon, daß dieser Embryo tagelang weiterlebt. In diesem Stadium der Vorversuche befindet sich zur Zeit die Frage des photographischen Nachweises. Wird an Stelle des Glasfensters ein solches aus Quarz gesetzt, so müßten die erfüllbaren Vorbedingungen zum Versuch vollzählig gegeben sein. Selbst wenn man damit rechnet, daß tagelange Belichtungszeiten erforderlich sind, so bestehen dafür keine größeren Hindernisse mehr. Es bleibt aber abzuwarten, ob bei allen erfüllten Bedingungen

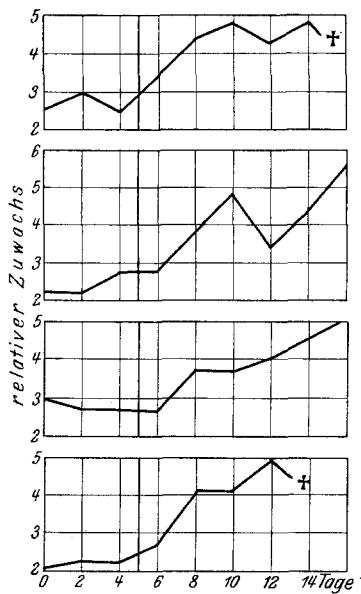


Abb. 22.

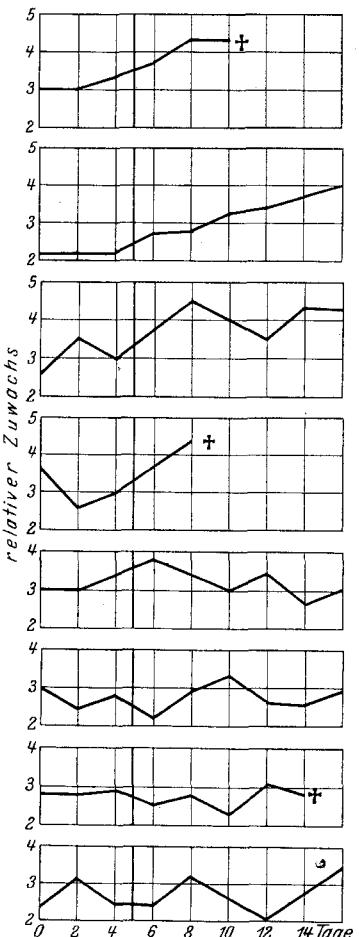


Abb. 23. Abb. 24.

Abb. 22. Beeinflussung des Wachstums durch räumlich getrennt (am 5. Tag) angebrachtes Embryonalgewebe. Vgl. Abb. 21 Kulturen *a*, *c*, *e* und *g*. Hühnerembryo vom 5. Tage. Kulturen 231/5a-d.

Abb. 23. Änderung des Wachstums nach dem Aufstellen der Spiegel am 5. Tage. Keine Beeinflussung durch das Embryonalgewebe vorher. Vgl. Abb. 21 *d* und *h*. Hühnerembryo vom 5. Tage. Kulturen 231/9a; 238/2a und *f*; 238/6c.

Abb. 24. Keine Beeinflussung durch Embryonalgewebe oder Nachbarkulturen beim Abblenden durch Glaswände. Vgl. Abb. 21 *b* und *j*. Zugabe von Embryonalgewebe am 5. Tage. Hühnerembryo vom 5. Tage. Kulturen 231/2 a und *f*; 231/9 b und 238/2 e.

die Wirkungen des Embryos ihrer Stärke nach ausreichen und eine solche Richtung nehmen, um den photographischen Nachweis zu ermöglichen. Diesen wird man aus guten Gründen voranschicken, um erst dabei zu ermitteln, ob für interferometrische Messungen und andere mögliche Arten der weiteren Untersuchung Aussicht auf Erfolg besteht.

Aber auch ohne weitere Bestätigung ergibt sich aus den biologischen Versuchen mit aller wünschenswerten Klarheit, daß beim embryonalen Gewebe das Wachstum unter Mitwirkung von Einflüssen geschieht, die physikalisch-optischen Gesetzen gehorchen.

Dieses zunächst so unerwartete Ergebnis fügt sich in den Rahmen unserer allgemeinbiologischen Anschauungen ohne Schwierigkeiten ein. Um etwas Neues handelt es sich dabei gar nicht. Abgesehen von dem Vergleich dieser Energiequelle mit der gleichartigen in den Leuchtdrüsen von Tieren finden sich auch sonst genügend Beispiele dafür, daß die nachgewiesene Energie im embryonalen Gewebe nichts Außergewöhnliches darstellt. Bekanntlich sind chemische Vorgänge zur Bildung solcher Energie befähigt, und es ist geläufig, sich die Stoffwechselvorgänge im Organismus mit einer Unzahl chemischer Prozesse verknüpft zu denken. Es ist weiter dann nicht einzusehen, warum sich darunter nicht auch solche befinden sollten, die die genannte Energie frei werden lassen. Auch der Einfluß dieser Energie auf chemische Vorgänge ist so wenig neu, wie ihr Einfluß auf biologisch-chemisches Geschehen.

Wichtiger als solche Beachtung allgemeiner Gesichtspunkte ist die Stellungnahme zu den Arbeiten von *Gurwitsch*, die in ihren Ergebnissen engste Berührung mit den dargestellten Untersuchungen haben. Die zuletzt genannten von diesen, die Anordnungen entsprechend den Abb. 18 und 21, sind nach dem Kennenlernen der Arbeiten von *Gurwitsch* und von diesen beeinflußt entstanden.

Anschließend an theoretische Erwägungen findet *Gurwitsch* Verlauf, Zahl und Ort der Mitosen dazu geeignet, etwas über die Dynamik der Zellteilung zu erfahren. Das verwendete Material ist embryonales Gewebe, besonders pflanzliches. Es zeigt sich, daß die Mitosen, die ausgezählt und ihrem Orte nach auf Karten eingezeichnet werden, in rhythmischen Schüben auftreten. Die Zellen teilen sich gleichzeitig oder gar nicht. Diese Rhythmen sind zum Teil nicht unmittelbar, sondern erst mittelbar festzustellen, da sie sich unter Umständen überlagern. Aus ihrem Vorhandensein wird darauf geschlossen, daß die zur Zellteilung führenden Bedingungen zerlegt werden können in Möglichkeitsfaktoren und in Verwirklichungsfaktoren. Die ersten äußern sich als Teilungsbereitschaft, die Verwirklichungsfaktoren in den Antrieben, die Rhythmen der Zellteilung entstehen lassen.

Sämtliche teilungsbereite Zellen teilen sich beim Auftreten des rhythmischen Impulses, und bei den nicht teilungsbereiten findet die Mitose

erst beim nächsten Antrieb statt. Also ist ein außerhalb der Zelle gelegener verwirklichender Faktor vorhanden. Dessen Wirkungsfeld ist nach Aussage von Karten, die den Ort der Mitosen angeben, immer dekrementlos und homogen, d. h., es entspricht nicht einem chemischen, sondern einem physikalischen Kraftfeld. Der Teilungsreiz kann demnach nicht chemischer Natur sein.

Bei der Zellreaktion, die nach experimentellen Brandwunden an der Froschcornea auftritt, entstehen Mitosen, die in der weiteren Umgebung der Wunde zahlreicher sind als in der näheren. Es gehen also scheinbar von der Wunde Hemmungseinflüsse aus, die sich auch nachweisen lassen durch die gegenseitige Beeinflussung mehrerer und verschieden alter Wunden. In solchen Versuchen zeigt sich weiter, daß die von Wunde zu Wunde wirksamen Faktoren sich nur geradlinig fortpflanzen und geradezu Schatten werfen können. Der seiner Richtung nach an einer Wunde vorbei sich fortpflanzende Reiz wirkt auch jenseits der Wunde. Aber er biegt nicht um und betrifft ausschließlich ein geradlinig begrenztes Gebiet.

An Pflanzen gelingt es ferner, Wurzeln in Glaskübeln hineinwachsen zu lassen, die so gebogen sind, daß bei ausschließlich geradliniger Fortpflanzung des Teilungsreizes Stellen großer Wirkungsstärke und andere von geringerer entstehen müssen. Bei nachträglicher histologischer Untersuchung und Bestimmung der Orte der Mitosen finden sich vermehrte oder verminderte Mitosenzahlen an den der Rechnung entsprechenden Stellen. Indem es endlich gelingt, den Strahlungsgesetzen entsprechende Induktionswirkungen nachzuweisen, die zwischen räumlich getrennten Wurzeln stattfinden, scheint sichergestellt zu sein, daß es sich bei den extracellulären Teilungsfaktoren um Strahlungen handelt, die als „mitogenetische Strahlen“ bezeichnet werden.

Es folgen weitere Untersuchungen über die induzierenden Wirkungen, die Diffraktionsverhältnisse und Dispersion, Feststellung der Durchlässigkeit verschiedener Medien für die gefundenen Strahlen und anderes. Die Wellenlänge wird ungefähr mit 1900—2000 Ångström angegeben. Spiegelversuche mißlingen bei der Verwendung von Mikroskopspiegeln. Das Strahlungszentrum wird in der Zwiebelwurzel angenommen. Analogien zum histologischen Ursprungsort und der Entstehungsweise der Strahlungen bei Leuchtdrüsen von Tieren werden gefunden. Auch Induktionswirkungen zwischen Pflanze und Tier sind beschrieben. Im ganzen aber werden Untersuchungen an Tieren wegen zu großer methodischer Schwierigkeiten als vorläufig unausführbar bezeichnet.

*Gurwitsch* selbst wertet seine Befunde nur vorsichtig und glaubt, nur einen von mehreren Faktoren gefunden zu haben. Besonders mit Rücksicht auf die Lehre *Haberlandts* von Wundhormonen wird das betont

und das Verhältnis beider Faktoren zueinander erwogen. Auch wird ausdrücklich gesagt, daß nur Zellteilungsbedingungen gefunden sind, von denen noch nicht behauptet werden kann, daß sie Wachstumsbedingungen darstellen.

Der von *Gurwitsch* und seinen Schülern geführte Nachweis mitogenetischer Strahlen steht offenbar in enger Berührung mit den hier nachgewiesenen physikalischen Wachstumsbedingungen. Wenngleich es aber auch selbstverständliche Pflicht ist, diese Beziehungen zu betonen, so muß doch gleichzeitig hervorgehoben werden, daß die Angaben von *Gurwitsch* von seiten der Anatomen wiederholt bestritten worden sind und nur seltene, bisher jedesmal ablehnende Nachuntersuchungen erfahren haben. Schon beim Lesen der Mitteilungen *Gurwitschs* entstehen Bedenken gegen einige seiner Angaben und in der Nachprüfung, besonders durch *Frederikse*, ließen sich schwerwiegende Einwände gegen *Gurwitsch* erheben.

Hier, bei den Arbeiten an der Gewebekultur, fanden sich zunächst unabhängig von *Gurwitsch* physikalische Einflüsse auf das Wachstum, und wenn diese hinterher mit der älteren Beschreibung ähnlicher Einflüsse verglichen werden, so geschieht das mit allem Vorbehalt und nicht in der Absicht einer bestätigenden Nachuntersuchung. Zwar scheinen die Ergebnisse an der Gewebekultur in erforderlichem Maße eindeutig zu sein, aber mit Rücksicht auf Verschiedenheiten der Verfahren darf daraus eine Bestätigung der Angaben von *Gurwitsch* nicht ohne weiteres abgeleitet werden. Auch ist zu beachten, daß Wachstum und Zellteilung nicht zwangsläufig verbundene Vorgänge sind. Vielmehr besitzt die Zellteilung zunächst nur die Bedeutung der Oberflächenvergrößerung und steht damit noch nicht in untrennbarem Zusammenhang mit Wachstumsvorgängen.

Die Bedeutung der nachgewiesenen Energie für das Wachstum läßt sich noch nicht übersehen. Vorläufig ist nur der Nachweis eines Wachstumsfaktors sichergestellt. Aber wie eingangs besprochen wurde, setzen wir eine große Zahl solcher Faktoren voraus, und welche Rolle der einzelne für das Wachstum spielt, bleibt weiter eine unbeantwortete Frage.

Ob es möglich sein wird, auf dem beschrittenen Wege weiter vorzudringen, läßt sich noch nicht übersehen. Daß es versucht wird, bedarf kaum der Erwähnung. Und daß der erfolgreiche Versuch möglicherweise zu weiteren Ergebnissen führen kann, darf man vermuten. Ob aber und wie solche Untersuchungen ausführbar sein werden, ist angesichts der großen methodischen Schwierigkeiten vorerst fraglich.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß sich benachbart wachsende Gewebekulturen in einer Weise beeinflussen, die nicht als stoffliches Geschehen irgendwelcher Art gedeutet werden kann. Vielmehr zeichnen sich die von einer Kultur zur anderen wirkenden Kräfte dadurch aus, daß

sie sich ausschließlich geradlinig fortpflanzen. Sie gehorchen ferner den Reflektionsgesetzen und müssen als physikalisch-optische Einflüsse gedeutet werden. Es entsteht die Vorstellung, daß es sich um Kräfte handelt, die aus chemischen Umsetzungen bei Stoffwechselvorgängen hervorgehen und mutmaßlich ihrerseits erneut in das chemische Geschehen bei der Bildung oder Aufnahme der Aufbaustoffe eingreifen. Ob die nachgewiesenen Kräfte eine für den Wachstumsvorgang wesentliche oder untergeordnete Bedeutung haben, läßt sich noch nicht beurteilen.

### Literaturverzeichnis.

- Akamatsu, N.*, Über Gewebekulturen von Lebergewebe. *Virchows Arch.* **240**, 308 (1923). — *Aschoff, L.*, Über die Bedeutung der Gewebekulturen. *Berl. klin. Wschr.* **51**, Nr 7, 333 (1914). — *Barta, E.*, Über eine leichte Methode der Gewebezüchtung. *Z. Mikrosk.* **40**, 178 (1923). — *Bostroem*, Das Chorioneupitheliom. *Beitr. path. Anat.* **76**, 293 (1927). — *Braus, H.*, Methoden der Explantation. *Abderhalden*, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden. 1922. — *Brumann, F.*, Ein Beitrag zur Methodik der Gewebekultur. *Z. Mikrosk.* **40**, 374 (1923). — *Burrows, M.*, *C. r. Soc. Biol.* **69**, 291 (1910). — *Burrows, M.*, *J. med. Assoc.* **55**, 2057 (1910). — *Burrows, M.*, *J. of exper. Zool.* **10**, 63 (1911). — *Burrows, M.*, *Münch. med. Wschr.* **59**, Nr 27, 1473 (1912). — *Burrows, M.*, A method of furnishing a continuous supply of new medium to a tissue culture in vitro. *Anat. Rec.* **6** (1912). — *Burrows, M. T.*, and *C. A. Neymann*, Studies on the metabolism of cells in vitro. *J. of exper. Med.* **25**, 93 (1917). — *Busse, O.*, Über Züchtungsversuche nach Carrel. *Verh. dtsch. path. Ges.*, 17. Tag., München 1914. — *Busse, O.*, Auftreten und Bedeutung der Rundzellen bei den Gewebekulturen. *Virchows Arch.* **229**, 1 (1921). — *Busse, O.*, Welcher Art sind die Rundzellen, die bei den Gewebekulturen auftreten? *Virchows Arch.* **239**, 475 (1922). — *Carrel, A.*, Die Kultur der Gewebe außerhalb des Organismus. *Berl. klin. Wschr.* **1911**, 1364. — *Carrel, A.*, Neue Fortschritte in der Kultur der Gewebe außerhalb des Organismus. *Berl. klin. Wschr.* **1912**, 533. — *Carrel, A.*, Neue Untersuchungen über das selbständige Leben der Gewebe und Organe. *Berl. klin. Wschr.* **1913**, 1097. — *Carrel, A.*, Growth promoting function of leucocytes. *J. of exper. Med.* **36**, 385 (1922). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Heat and growth-inhibiting action of serum. *J. of exper. Med.* **35**, 647 (1922). — *Carrel, A.*, A method for the physiological study of tissues in vitro. *J. of exper. Med.* **38**, 407 (1923). — *Carrel, A.*, Measurement of the inherent growth energy of tissues. *J. of exper. Med.* **38**, 521 (1923). — *Carrel, A.*, *South. med. J.* **17**, Nr 4 (1924). — *Carrel, A.*, and *M. T. Burrows*, La culture des tissus adultes en dehors de l'organisme. *C. r. Soc. Biol.* **69**, 293 (1910). — *Carrel, A.*, and *M. T. Burrows*, Cultures de sarcome en dehors de l'organisme. *C. r. Soc. Biol.* **69**, 365 (1910). — *Carrel, A.*, and *M. T. Burrows*, *J. of exper. Med.* **14** (1911). — *Carrel, A.*, and *M. T. Burrows*, A propos de cultures „en vitro“ des tissus des mammifères. *C. r. Soc. Biol.* **70**, 3 (1911). — *Carrel, A.*, and *M. T. Burrows*, *Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden* **5**, T. 2, 838 (1913). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Age and multiplication of fibroblasts. *J. of exper. Med.* **34**, 599 (1921). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, The multiplication of fibroblasts in vitro. *J. of exper. Med.* **34**, 317 (1921). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Leucocytic secretions. *J. of exper. Med.* **36**, 645 (1922). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Action of shaken serum on homologous fibroblasts. *J. of exper. Med.* **36**, 399 (1922). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Pure cultures of large mononuclear leucocytes. *J. of exper. Med.* **36**, 365 (1922). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Heterogenetic serum, age and multipli-

cation of fibroblasts. *J. of exper. Med.* **35**, 17 (1922). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Action of serum on fibroblasts in vitro. *J. of exper. Med.* **37**, 759 (1923). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Antagonistic growth-activating and growth-inhibiting principles in serum. *J. of exper. Med.* **37**, 653 (1923). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Antagonistic growth principles of serum and their relation to old age. *J. of exper. Med.* **38**, 419 (1923). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Action on fibroblasts of extracts of homologous and heterologous tissues. *J. of exper. Med.* **38**, 499 (1923). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Survival and growth of fibroblasts in vitro. *J. of exper. Med.* **38**, 487 (1923). — *Carrel, A.*, and *A. H. Ebeling*, Action of serum on lymphocytes in vitro. *J. of exper. Med.* **38**, 513 (1923). — *Chlopin, N.*, Über „in vitro“ Kulturen der embryonalen Gewebe der Säugetiere. *Arch. mikrosk. Anat.* **96**, 435 (1922). — *Chlopin, N.*, Über „in vitro“-Kulturen von Geweben der Säugetiere mit besonderer Berücksichtigung des Epithels. I. Kulturen der Submaxillaris. *Virchows Arch.* **243**, 373 (1923). — *Chlopin, N.*, Einige Betrachtungen über das Bindegewebe und das Blut. *Virchows Arch.* **252**, 25 (1924). — *Collier*, Biochemische Feststellung der Verwandtschaft bei Insekten. *Z. Insektenbiol.* **16** (F. 25), H. 1/2 (1920). — *Drew, A. H.*, Three lectures on the cultivation of tissues and tumours in vitro. *Lancet* **204**, 1 for 1923. 785, 833. — *Drew, A. H.*, Growth and Differentiation in tissue cultures. Rep. 8 on the investigat. of the Imp. Cancer Research Fund., S. 547 (1923). — *Drew, A. H.*, A comparative study of normal and malignant tissues grown in artifical culture. On the investigat. of the Imp. Cancer Research Fund., 8, 37 (1923). — *Drew, A. H.*, Growth and differentiation in tissue cultures. *Brit. J. exper. Path.* **4**, 46 (1923). — *Dobrowolski, N. A.*, Sur la culture des tissus de poissons et d'autres animaux inférieurs. *C. r. Soc. Biol.* **79**, 789 (1916). — *Ebeling, A. H.*, *J. of exper. Med.* **17**, 273 (1913). — *Ebeling, A. H.*, A strain of connective tissue 7 years old. *J. of exper. Med.* **30**, 531 (1919). — *Ebeling, A. H.*, Fibrin and serum as a culture medium. *J. of exper. Med.* **33**, 641 (1921). — *Ebeling, A. H.*, Measurement of the growth of tissues in vitro. *J. of exper. Med.* **34**, 231 (1921). — *Ebeling, A. H.*, A ten year old strain of fibroblasts. *J. of exper. Med.* **35**, 755 (1922). — *Ebeling, A. H.*, and *A. Fischer*, Mixed cultures of pure strains of fibroblasts and epithelial cells. *J. of exper. Med.* **36**, 285 (1922). — *Erdmann, Rh.*, Die Bedeutung der Gewebezüchtung für die Biologie. *Dtsch. med. Wschr.* **1920**, H. 48, 1327. — *Erdmann, Rh.*, Einige grundlegende Ergebnisse der Gewebezüchtung aus den Jahren 1914—1920. *Erg. Anat.* **23** (1921). — *Erdmann, Rh.*, Das Verhalten der Herzkappen der Reptilien und Mammalier in der Gewebekultur. *Arch. Entw.mechan.* **48**, 571 (1921). — *Erdmann, Rh.*, Praktikum der Gewebepflege oder Explantation, besonders der Gewebezüchtung. Berlin: Jul. Springer 1922. — *Erdmann, Rh.*, Die biologischen Eigenschaften der Krebszelle nach Erfahrungen der Implantation, Explantation und Reimplantation. *Z. Krebsforschg* **20**, 322 (1923). — *Erdmann, Rh.*, Züchtung von Säugetiergebwe in vitro. *Verh. anat. Ges.*, 33. Tag., Halle; *Anat. Anz.* **58**, Ergänzungsh., 247 (1924). — *Erdmann, Rh.*, Die Eigenschaften des Grundgewebes (Bindegewebes im weiteren Sinne) nach seinem Verhalten in der in vitro-Kultur. *Naturwiss.* **12**, H. 31 (1924). — *Erdmann, Rh.*, Verzeichnis der in den Jahren 1920—1924 erschienenen Arbeiten aus dem Gebiete der Explantation. *Arch. exper. Zellforschg* **1**, I 130 (1925). — *Fischer, A.*, Growth of fibroblasts and hydrogenion concentration of the medium. *J. of exper. Med.* **34**, 447 (1921). — *Fischer, A.*, Action of antigen on fibroblasts in vitro. II. *J. of exper. Med.* **36**, 535 (1922). — *Fischer, A.*, A three month old strain of epithelium. *J. of exper. Med.* **35**, 367 (1922). — *Fischer, A.*, Action of antigen on fibroblasts in vitro. *J. of exper. Med.* **35**, 661 (1922). — *Fischer, A.*, A pure strain of cartilage cells in vitro. *J. of exper. Med.* **36**, 379 (1922). — *Fischer, A.*, Cultures of organized tissues. *J. of exper. Med.*

36, 393 (1922). — *Fischer, A.*, Contribution to the biology of tissue cells. *J. of exper. Med.* **38**, 667 (1923). — *Fischer, A.*, Die Gewebekultur und ihre Bedeutung in der experimentellen Medizin und Biologie. *Acta med. scand. (Stockh.)* **57**, 1 (1923). — *Fischer, A.*, The interaction of two fragments of pulsating heart tissue. *J. of exper. Med.* **39**, 577 (1924). — *Fischer, A.*, The differentiation and keratinization of epithelium in vitro. *J. of exper. Med.* **39**, 585 (1924). — *Fischer, A.*, Ein Stamm bösartiger Sarkomzellen in vitro, 6 Monate alt. *Klin. Wschr.* **1924**, Nr 28, 1267. — *Fischer, A.*, Beitrag zur Biologie der Gewebezellen. *Arch. mikrosk. Anat.* **104**, 210 (1925). — *Foot, N. Ch.*, Über das Wachstum von Knochenmark in vitro. Experimenteller Beitrag zur Entstehung des Fettgewebes. *Beitr. path. Anat.* **53**, 446 (1912). — *Frederikse, A. M.*, Ursachen der Mitose. *Z. Zellforschg* **6**, H. 5, 759. — *Gassul, R.*, Experimentelle Studien über die Auspflanzung, Überpflanzung und Regeneration von Explantaten aus erwachsener Froschhaut. *Arch. Entw.mechan.* **52/97**, 400 (1923). — *Goldschmidt, R.*, Notiz über einige bemerkenswerte Erscheinungen in Gewebekulturen von Insekten. *Biol. Zbl.* **36**, 160 (1916). — *Gravitz, P.*, Wanderzellenbildung in der Hornhaut. *Dtsch. med. Wschr.* **39**, Nr 28, 1345 (1913). — *Gravitz, P.*, Abbau und Entzündung des Herzkloppengewebes. Berlin: Schötz 1914. — *Gravitz, P.*, Erklärung der Photogramme über zellige Umwandlung von fibroelastischem Gewebe. Greifswald: Adler 1914. — *Gravitz, P.*, Die Lösung der Keratitisfrage unter Anwendung der Plasmakultur. *Nova Acta Acad. Caes. Leopold Car. Germ. Naturae Curiosorum, Abh. d. Leopold Car. Dtsch. Akad. d. Naturforscher* **104**, Nr 4, 305 (1920). — *Gravitz, P.*, Eine induktiv aufgebaute Entzündungstheorie. *Arch. klin. Chir.* **136** (1921). — *Gurwitsch, A.*, Über den Begriff des embryonalen Feldes. *Arch. Entw.mechan.* **51**, 383 (1922). — *Gurwitsch, A.*, Über Ursachen der Zellteilung. *Arch. Entw.-mechan.* **52/97**, 167 (1923). — *Gurwitsch, A.*, Physikalisches über mitogenetische Strahlen. *Arch. Entw.mechan.* **103**, 490 (1924). — *Gurwitsch, A.*, Die Natur des spezifischen Erregers der Zellteilung. *Arch. Entw. mechan.* **100**, 11 (1924). — *Gurwitsch, A.* und *L.*, Über den Ursprung der mitogenetischen Strahlen. *Arch. Entw.mechan.* **105**, 471 (1925). — *Gurwitsch, A.* und *L.*, Weitere Untersuchungen über mitogenetische Strahlen. *Arch. Entw.mechan.* **104**, 109 (1925). — *Gurwitsch, A.* und *L.*, Über die präsumierte Wellenlänge mitogenetischer Strahlen. *Arch. Entw. mechan.* **105**, 473 (1925). — *Gurwitsch, A.* und *N.*, Fortgesetzte Untersuchungen über mitogenetische Strahlung und Induktion. *Arch. Entw.mechan.* **103**, 68 (1924). — *Gurwitsch, L. F.*, Die Verwertung des Feldbegriffes zur Analyse embryonaler Differenzierungsvorgänge. *Arch. Entw.mechan.* **101**, 40 (1924). — *Gurwitsch, L. F.*, Untersuchungen über mitogenetische Strahlen. *Arch. Entw.mechan.* **103**, 483 (1924). — *de Haan*, Nederl. Tijdschr. Geneesk. **68**, Nr 19 (1922). — *Haberlandt, G.*, Zur Physiologie der Zellteilung. *Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss.*, 1.—6. Mitt., 1913 bis 1921. — *Haberlandt, G.*, *Biol. Zbl.* **42** (1921). — *Hadda, S.*, Die Kultur lebender Körperzellen. *Berl. klin. Wschr.* **1912**, Nr 1 u. Diskussion in Nr 5, 231. — *Hannemann, F.*, Über die Bildung von Zellen aus dem fibroelastischen Gewebe bei Entzündung. *Virchows Arch.* **226**, Beih., 123 (1919). — *Harrison, J. of exper. Zool.* **17**. — *Hertwig, O.*, Methoden und Versuche zur Erforschung der *Vita propria* abgetrennter Gewebs- und Organstückchen von Wirbeltieren. *Arch. mikrosk. Anat.* **79 II**, 113 (1912). — *Herzog, G.*, Experimentelle Zoologie und Pathologie. *Erg. d. allg. Path. u. path. Anat. v. Lubarsch-Ostertag*, **21** (1925). — *Hogue, M. J.*, The effect of hypotonic and hypertonic solutions on fibroblasts of the embryonic chick heart in vitro. *J. of exper. Med.* **30**, 617 (1919). — *Ingelbrigtzen, R.*, The influence of heat on different sera as culturmedia for growing tissues. *J. of exper. Med.* **15**, 397 (1912). — *Jones, F. S.*, and *Peyton Rous*, The phagocytic power of connective tissues cells. *J. of exper. Med.* **25**, 189 (1917). — *Krontowski, A.*, Über

die Kultivierung der Gewebe außerhalb des Organismus bei Anwendung der kombinierten Medien. *Virchows Arch.* **241**, 488 (1923). — *Krontowski, A.*, und *J. Hach*, Die Anwendung der Methode der Gewebekulturen zum Studium des Fleckfiebervirus. *Klin. Wschr.* **1924**, Nr 36, 1625. — *Krontowski, A.*, und *L. Poleff*, Über das Auftreten von lipoiden Substanzen in den Gewebekulturen und bei der Autolyse der entsprechenden Gewebe. *Beitr. path. Anat.* **58**, 407 (1914). — *Krontowski, A.*, und *Radsimowska*, *J. of Physiol.* **56**, Nr 5 (1922). — *Kuczynski, M. H.*, Studien zur Ätiologie und Pathogenese des Fleckfiebärs. *Virchows Arch.* **242**, 355 (1923). — *Kuczynski, M. H.*, Experimentelle Untersuchungen über die funktionellen Beziehungen der Zellen im entzündlichen Gebiet. *Verh. dtsch. path. Ges.* 1923. — *Lambert, R. A.*, The effect of dilution of plasma medium on the growth and fat accumulation of cells in tissue cultures. *J. of exper. Med.* **19**, 398 (1914). — *Lambert, R. A.*, Technique of cultivating human tissues in vitro. *J. of exper. Med.* **24**, 367 (1916). — *Lambert* und *Hanes*, Beobachtungen an Gewebekulturen in vitro. *Virchows Arch.* **211** (1913). — *Laser, H.*, Über Zellverbindungen in vitro als Voraussetzung für Zellwachstum. *Arch. exper. Zellforschg* **11**, 125 (1925). — *Lewis, W. H.*, Observations on cells in tissue cultures with dark-field illumination. *Anat. Rec.* **26** (1923). — *Lewis, M. R.*, Granules in the cells of chick embryos produced by Egg-albumin in the medium of tissue cultures. *J. of exper. Med.* **33**, 485 (1921). — *Lewis, M. R.*, The importance of dextrose in the medium of tissue cultures. *J. of exper. Med.* **35**, 317 (1922). — *Lewis, W. H.*, and *R. M. Lewis*, The cultivation of chick tissues in media of known chemical constitution. *Anat. Rec.* **6**, 207 (1912). — *Lewis, W. H.*, und *L. T. Webster*, Wandering cells, endothelial cells and fibroblasts in cultures from human lymph nodes. *J. of exper. Med.* **34**, 397 (1921). — *Lewis, W. H.*, und *L. T. Webster*, Migration of lymphocytes in plasma cultures of human lymph nodes. *J. of exper. Med.* **33**, 261 (1921). — *Loeb, L.*, Über die Entstehung von Bindegewebe, Leukocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebestücke zu züchten. Chicago 1897. — *Loeb, L.*, und *M. Fleisher*, Über die Bedeutung des Sauerstoffs für das Wachstum der Gewebe von Säugetieren. *Biochem. Z.* **36**, 98 (1911). — *Losee, I. R.*, and *A. H. Ebeling*, The cultivation of human tissue in vitro. *J. of exper. Med.* **19**, 593 (1914). — *Löwenstädt, H.*, Über die Anwendung gelochter Objektträger zur histologischen Technik. *Z. Mikrosk.* **39**, 221 (1922). — *Lubarsch, O.*, und *E. K. Wolff*, Der heutige Stand der Gewebezüchtung, im besonderen in ihrer Bedeutung für die Pathologie. *Jkurse ärztl. Fortbildg Januar 1925*. — *Maximow, A.*, Über zweckmäßige Methoden für cytologische und histogenetische Untersuchungen am Wirbeltierembryo, mit spezieller Berücksichtigung der Celloidinschnittserien. *Z. Mikrosk.* **26**, 177 (1909). — *Maximow, A.*, Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. VII. Über „in vitro“-Kulturen von lymphoidem Gewebe des erwachsenen Säugetierorganismus. *Arch. mikrosk. Anat.* **96**, 495 (1922). — *Maximow, A.*, Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. VIII. Die cytologischen Eigenschaften der Fibroblasten, Reticulumzellen und Lymphocyten des lymphoiden Gewebes außerhalb des Organismus, ihre genetischen Wechselbeziehungen und prospektiven Entwicklungspotenzen. *Arch. mikrosk. Anat.* **97**, 283 (1923). — *Maximow, A.*, Über krebsähnliche Verwandlung der Milchdrüse in Gewebekulturen. *Virchows Arch.* **256**, 813 (1925). — *Melczer, N.*, Explantationsversuche mit der Locke-Lewisschen Lösung. *Z. Mikrosk.* **40**, 157 (1923). — *Mitsuda, T.*, Über die Beziehungen zwischen Epithel und Bindegewebe bei Transplantation und Explantation. *Virchows Arch.* **242**, 310 (1923). — *Mitsuda, T.*, Untersuchungen über Transplantation von Lebergewebe unter besonderer Berücksichtigung der Pigmentfrage. *Virchows Arch.* **248**, 91 (1924). — *Mjasojedoff, S. W.*, Über in vitro-Kulturen von Eifollikeln der Säugetiere. *Arch. mikrosk. Anat.* **104**, 1 (1925). — *Murphy, J. B.*, The effect of adult chicken organ

grafts on the chick embryo. *J. of exper. Med.* **24**, 1 (1916). — *Nasu, S.*, Beiträge zur Frage der Überlebensfähigkeit der Gewebe. *Virchows Arch.* **243**, 388 (1923). — *Oppel, A.*, Explantation. *Zbl. Zool. u. exper. Biol.* **3**, 209 (1913). — *Oppel, A.*, Gewebekulturen. *Braunschweig* 1914. — *Radzimowska, W.*, Die Wirkung verschiedener Säuren auf die Gewebezellen warmblütiger Organismen. *Biochem. Z.* **142**, 36 (1923). — *Rawin, W.*, Weitere Beiträge zur Kenntnis der mitotischen Ausstrahlung und Induktion. *Arch. Entw.mechan.* **101**, 53 (1924). — *Romeis*, Ein verbesserter Kulturapparat für Explantate. *Z. Mikrosk.* **29**, 530 (1912). — *Rous, P.*, *J. of exper. Med.* **12**, 696 (1910). — *Rous, P.*, and *J. B. Murphy*, On the causation by filtrable agents of the distinct chicken tumors. *J. of exper. Med.* **19**, 52 (1914). — *Rusinoff, P. G.*, Weitere Untersuchungen über mitogenetische Strahlen und Induktion. *Arch. Entw.mechan.* **104**, 121 (1925). — *Rosenow, E. C.*, Eine einfache Methode für das Anfertigen von Gewebekulturen. *Zbl. Bakter. Orig.* **74**, 366 (1914). — *Sallkind, S. J.*, Weitere Untersuchungen über mitogenetische Strahlen und Induktion. *Arch. Entw.mechan.* **104**, 116 (1925). — *Schukowsky, D. E.*, Die Beschaffenheit der Zelloberfläche als bestimmender Faktor des Zustandekommens der Zellteilung. *Arch. Entw. mechan.* **103**, 499 (1924). — *Uhlenhuth, E.*, The form of the epithelial cells in cultures of frag skin, and its relation to the consistency of the medium. *J. of exper. Med.* **22**, 76 (1915). — *Uhlenhuth, E.*, Die Zellvermehrung in den Hautkulturen von *Rana pipiens*. *Arch. Entw.mechan.* **42**, 168 (1917). — *Walton, A. J.*, On the survival and transplantability of adult mammalian tissue in simple plasma. *J. of exper. Med.* **19**, 121 (1914). — *Walton, A. J.*, The artificial production in mammalian plasma of substances inhibitory to the growth of cells. *J. of exper. Med.* **22**, 194 (1915). — *Weidenreich, F.*, Über Differenzierung und Entdifferenzierung. *Arch. mikrosk. Anat.* **97**, 227 (1923). — *Wolff und Zondek*, Die Kultur menschlichen Ovarial- und Amniongewebes. *Virchows Arch.* **254**, 1 (1925). — *Wollstein, L.*, Studies on the phenomenon of d'Hérelle with bacillus dysenteriae. *J. of exper. Med.* **34**, 467 (1921).