

(Aus dem Institut der Kontrolle von Serum und Vaccina des Volkskommissariats
für Gesundheitswesen zu Moskau.)

Reaktion der Zellen auf Tuberkelinfektion in den Gewebskulturen.

Von
E. M. Wermel.

Mit 15 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 2. Januar 1931.)

I. Einleitung.

Es gibt bereits eine größere Zahl von Veröffentlichungen über Infektion von Gewebskulturen mit Tuberkelbacillen. Verfasser dieser Arbeiten sind *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* (1924—1928), *Maximow* (1924 bis 1928), *Smyth* (1916), *Smith, Willes, Lewis* (1922), *Lang* (1925), *Haagen* (1928), *Lewis* (1926). Alle diese Arbeiten sind an den verschiedenartigsten Tieren und Bakterienstämmen ausgeführt worden.

Die Hauptschlußfolgerung aller Untersuchungen ist folgende: Die tuberkulösen Gewebsveränderungen verlaufen in den Gewebskulturen grundsätzlich ebenso wie im Organismus; mit anderen Worten, es erfolgt eine Aufnahme der Bacillen durch die Zellen und Bildung spezifischer epithelioider Zellen und *Langhansscher Riesenzellen* am Bacillenhäufchen herum; die Bildungen können mit Tuberkeln verglichen werden. Unter einfacheren Bedingungen als im Organismus gestatten die Gewebskulturen als Untersuchungsmethode eine Reihe wichtiger Schlußfolgerungen bezüglich der strittigen Fragen zu ziehen. Die Arbeiten von *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* (1924—25) und *Maximow* haben die Möglichkeit lokaler wie auch hämatogener Abstammung der Tuberkel endgültig bewiesen. Obengenannte Forscher infizierten Leukocytenkulturen mit Tuberkelbacillen und erhielten aus Monocyten und Lymphocyten epithelioidre und Riesenzellen, die tuberkelähnliche Gebilde erzeugten. Es muß auch noch betont werden, daß in der Entwicklung der Tuberkel die Haupt-, wenn auch nicht ausschließliche Rolle die reticulo-endothelialen Zellen spielen; weniger beteiligen sich dabei die Lymphzellen und wohl kaum Fibroblasten und Blutgefäßdeckzellen.

Besondere Beachtung erheischen die Arbeiten über die Infektion von Gewebskulturen mit Bacillen von *Calmette-Guerin* (BCG). Dazu

gehören die Untersuchungen von *Timofeewsky-Benewolenskaja* (1927) und *Maximow* (1928); ihre Ergebnisse widersprechen sich vielleicht deshalb, weil sie an verschiedenem Material und mit etwas verschiedener Methodik ausgeführt wurden; die erste Untersuchung ist an embryonalem Menschengewebe und auch mit normalem menschlichem Blut, die zweite am Gewebe eines Lymphknotens des Kaninchens (*Pancreas aselli*) angestellt worden.

Die Hauptschlußfolgerung von *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* (S. 487) lautet folgendermaßen:

„BCG sind unfähig, in Gewebskulturen Entwicklung von Tuberkeln hervorzurufen und auf die *in vitro* wachsenden Zellen zerstörend zu wirken; dabei rufen sie eine fast nur mechanische Hemmung des Wachstums derselben hervor.“ Gleichfalls betonen sie, daß in den Kulturen von Fibroblasten aus dem Herzfleisch eine Giftwirkung der BCG auf das Explantat fast fehlt. Ferner weisen sie darauf hin, daß Phagocytose überhaupt schwach ausgeprägt ist, Riesenzellen sich selten bilden, da echte Tuberkel fehlen, obgleich eine Anhäufung von Epithelioidzellen an Stellen, wo BCG sich befanden, wiederholt gesehen wurde.

Maximow erhielt beim Untersuchen der Kaninchengewebe etwas andere Ergebnisse. BCG werden aktiv und zuweilen vollständig von Makrophagen, die oft Haufen epithelioider Zellen bilden, aufgenommen; auf diese Weise bildet sich ein Tuberkel, in dem sich auch Riesenzellen zeigen; die Fibroblasten verhalten sich passiv; an der Zerstörung der BCG beteiligen sich nur Polyblasten. Der Untergang oder „die Genesung“ der Kultur hängt davon ab, ob genügend Polyblasten zur Aufnahme der Bacillen vorhanden sind, ist das nicht der Fall, was meistenteils so ist, dann verdrängen die Spaltpilze die Zellen. Demgemäß stellt *Maximow* fest, daß das Gewebe auf BCG vollkommen spezifisch reagiert und Tuberkelzellen bildet; gleichfalls stellt er das Fehlen der Giftigkeit fest.

Eine der Hauptaufgaben, die ich mir in vorliegender Arbeit stellte, ist die Frage: Auf welche Weise und durch welche Zellen geschieht die Zerstörung der Kochschen Bacillen in den Gewebskulturen?

Als Versuchstier nahmen wir das Meerschweinchen, als Bacillenstamm die BCG; zum Vergleich bedienten wir uns eines stark virulenten Stammes vom Typus *humanus*. Die Arbeit zog mich in erster Linie als Histologen an; die Infektion durch Tuberkelbacillen betrachtete ich als einen, besondere Differenzierungen hervorrufenden, phagocytären oder vielleicht auch verdauenden Fähigkeiten bewirkenden Faktor; die Tatsachen kann man auch von einem anderen Standpunkte aus betrachten, da ja das Studium der Tuberkelbildung an und für sich theoretisch und praktisch höchst anziehend ist. Darum werde ich in vorliegender Beschreibung die erhaltenen Ergebnisse von diesen 2 Standpunkten aus betrachten müssen.

II. Methodik.

Vorliegende Arbeit ist an Milzkulturen eines erwachsenen Meerschweinchens ausgeführt worden. Die Infektion erfolgte durch Eintauchen der Stückchen in Emulsion (in eine von unserem Institut gelieferte Vaccina BCG), die durch die Lösung von Tyrode 5—10mal verdünnt wurde (die Vaccina enthält 5 mgr Bacillen auf 1 ccm); der Stamm virulenter Bacillen wurde auf gewöhnliche Weise in Tyrode-Flüssigkeit emulgiert. In der Emulsion lag das Stückchen nicht länger als 10 bis 15 Sekunden und wurde danach in einem Tropfen von Autoplasma gebracht. Das Plasma wurde immer mit Heparin zubereitet und schwach mit destilliertem Wasser verdünnt. Als Extrakt nahm ich verdünnten Milzextrakt. Wichtig ist zu betonen, daß der Extrakt verdünnt gebraucht werden muß, da er sonst alle Histiocyten tötet. Die Kulturen wurden nach der Methode von *Maximow* geführt, d. h. auf kleinen Glimmerplatten, die unter einem großen Deckglase untergebracht sind. Man nahm die Erneuerung alle 4—5 Tage vor, wobei nur eine kleine Extraktmenge zugeführt wurde.

Für die Endokardkultur nahm man das Material aus dem Herzen eines Meerschweinchembryos von 25 mm Länge, als Medium diente die Heparin-Plasma und embryoneller Extrakt. Nach der Methode von *Carell* wurden Passagen jeden 4. Tag vorgenommen.

Fixierung: Für ganze Stücke 10% Formol auf 1% Kochsalz und Flüssigkeit von *Carnoy*; für die Mikrotomschnitte *Zenker* mit 10% Formol.

Färbung: Stücke wurden mit Fuchsin nach *Ziehl* gefärbt, dann nachgefärbt mit 4—5mal verdünntem Hämatoxilin von *Carazzi*. Die Mikrotomschnitte wurden meistenteils mit Azur II-Eosin gefärbt.

III. Die Kulturen von Milz.

1. Allgemeine Beschreibung der Kulturen.

Sowohl in Vergleichs- wie auch in Versuchskulturen wandern aus den Stückchen zuerst Leuko- und Lymphocyten aus; etwas später zeigen sich histioide Zellen.

Alle Forscher, die sich mit Züchtung durch BCG infizierter Gewebe beschäftigt haben, behaupten, daß BCG auf Wachstum und Wanderung keinen Einfluß haben. Um diese Tatsache nachzuprüfen, unternahm ich Messungen der Wanderungs- und Wachstumszone 48 Stunden nach Anlegung der Kulturen. Die Methodik war wie gewöhnlich: die Kulturen wurden bei gleicher Vergrößerung (Ob. 3, Ok. 1, *Reichert*) aufs Papier projiziert; die Umrisse des Stückchens der Wanderungs- und Wachstumszone wurden mit Hilfe der Zeichenprismas von *Abbée* festgelegt und mit Hilfe des Planimeters gemessen. Im ganzen wurden 45 Kulturen gemessen.

Die Flächen der Wanderungs- und Wachstumszone (die Fläche des Explantats wird außer Acht gelassen), der Vergleichskulturen, der Kulturen mit infizierten BCG und mit virulenten Bacillen verhalten sich zu einander ungefähr wie 3,5:2:1. Die Schlußfolgerung ist klar: das Vorhandensein von BCG und auch virulenter Bacillen übt einen hemmenden Einfluß auf Wanderung und das Wachstum der Milzzellen aus; diese Hemmung ist aber schwächer ausgeprägt.

2. Über die Bedeutung der Lympho- und der Leukocyten.

Bevor ich zur Beschreibung der Beziehungen der Zellen zu den Bacillen übergehe, muß ich vor allem von den Lymphocyten sprechen. Von der Umwandlung der Lymphzellen in Polyblasten und ferner in epithelioide Zellen haben *Maximow*, *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* berichtet. Am deutlichsten ist die Beteiligung dieser Zellen in den Kulturen der weißen Blutzellen; in den Kulturen der lymphoiden Organ (wie sogar *Maximow* schreibt) gehen die Lymphzellen zugrunde, bevor sie Zeit haben sich in Polyblasten zu verwandeln und am Kampf mit den Bacillen teilzunehmen. Obenerwähnte Forscher betonen, daß es ihnen nur selten gelang, eine Aufnahme der Tuberkelbacillen durch Lymphzellen zu beobachten. Mir persönlich gelang es nie, die Beteiligung der Lymphzellen beim Vorgang festzustellen, obgleich ich in einigen Kulturen in den ersten Tagen des Wachstums zuweilen bedeutende Mengen dieser Zellen sah, die aus dem Stückchen austraten, aber gar keinen Einfluß auf die Tuberkelbacillen ausübten. Neben ihnen befanden sich einzelne histioide Zellen mit zahlreichen phagocytierten Tuberkelbacillen im Protoplasma. Ich beobachtete nur eine Wanderung der Lymphocyten, danach gingen sie zugrunde. Deshalb erwähne ich sie hier nicht mehr.

Die Beteiligung der polymorphkernigen Leukocyten ist in den ersten Tagen der Kultivierung stark aktiv; ihre Bedeutung darf meiner Ansicht nach nicht zu gering eingeschätzt werden. Sie sind zwar wenig lebensfähig und schon am 3.—5. Tage gehen die meisten zugrunde; ihnen ist jedoch eine gewisse Bedeutung zuzuschreiben, da sie in den ersten Tagen zuweilen in bedeutenden Mengen auftreten und als erste gleich nach der Auspflanzung des Stückchens wandern. Dank der Fähigkeit zur Phagocytose isolieren die Leukocyten zuweilen einen Teil der Bacillen; es ist schwer zu sagen, ob das ihre Degeneration beschleunigt oder nicht, da sie ohne diese schnell umkommen; jedenfalls läßt sich keine schnellere Beschleunigung des Zerfalls der Zellen feststellen und man kann alle allmählichen, für die polymorphkernigen Leukocyten typischen Stadien der Degeneration beobachten: den Zerfall des Kerns in einzelne Bruchstücke, die Abrundung und Homogenisierung des Chromatins darin, den Zerfall großer Bruchstücke in kleine, runde Tropfen usw.

3. Die Phagocytose der Tuberkelbacillen durch histioide Zellen.

Als erste Reaktion der Zellen auf die Infektion (weiterhin ist die Rede von BCG; wo es sich um virulenten Stamm handelt, wird es besonders erwähnt) sei die Phagocytose der Tuberkelbacillen durch polymorphkernige Leukocyten und Histiocytes der ganzen Wanderungszone genannt. Etwas später kann man Anhäufung dieser Zellen um Bacillenhaufen beobachten.

Histioide Zellen, die aus der Milz wachsen, sind schon wiederholt von verschiedenen Untersuchern beschrieben worden. Es sind gestreckte, sternartige Zellen, die durch dünne Anastomosen miteinander verbunden sind. Ihr Protoplasma ist hell und in guten Kulturen frei von Fetttropfen; der Kern ist eiförmig, etwas faltig, chromatinreich. Aus diesen Zellen bilden sich in Gewebskulturen Makrophagen, Fibrocyten (Desmocyten), ebenfalls Epithelioid- und Riesenzellen.

Die Tuberkelbacillen können durch die verschiedensten histioiden Zellen aufgenommen werden, wie z. B. durch die obenbeschriebenen sternartigen zu einem Netz verbundene Zellen, die ich als monocytenähnliche Zellen bezeichne; ebenfalls können es typische Makrophagen mit einem hellen Zelleib am Rande sein und auch epithelioidie Zellen, deren helles Protoplasma und Kern so kennzeichnend sind. Auch in den Riesenzellen sind gewöhnlich Bakterien vorhanden. Die Phagocytose ist deutlich in den histioiden Zellen ausgeprägt. Abb. 6 stellt eine derartige Zelle, die nur einige Spaltpilze aufgenommen hat, dar; das ist die erste Phase des gleichzeitigen Daseins von Spaltpilzen und Zellen.

Das Ergebnis der Phagocytose kann nur zweierlei Ausgang haben: entweder zerstört die Zelle die Bakterien und bleibt am Leben oder diese nehmen überhand und dann degeneriert die Zelle. Eine dauernde Nebeneinanderexistenz oder sogar Symbiose, wie *Calmette* und nach ihm auch viele andere sich darüber äußern, habe ich in den Kulturen nicht beobachtet.

Häufig bilden die Bacillen in der Mitte der Zelle Anhäufungen, wobei die Zellen ihre Fortsätze verlieren und sich abrunden (Abb. 7). Der Kern wird verdrängt, pyknotisch und kann in einzelne Teile zerfallen. Der Zelleib schwollt meistenteils stark an; seltener finden wir in ihm eine bedeutende Menge von Fetttropfen. Danach zerfällt die Zelle und die Bacillen gelangen wieder in das Medium, wo sie auf keine Wachstums-hindernisse stoßen, wenn sie nicht wieder aufgenommen werden, sich schnell vermehren und das Wachstum der Kultur hemmen und danach vernichten. Diese Tatsache ist schon von *Maximow* beschrieben worden.

Meinen Beobachtungen gemäß kann eine Vermehrung der BCG im Zelleib stattfinden. Es sei betont, daß die BCG im Protoplasma frei liegen, von nichts umgeben, ich persönlich konnte in diesem Stadium nie echte Vakuolen finden. Sehr oft sehen wir, daß in einer Gruppe gleicher Zellen nur 1—2 von ihnen große Mengen von Bakterien enthalten, andere jedoch danebenliegende keine oder nur einzelne Exemplare.

In Kulturen, die durch den virulenten Stamm Typus humanus infiziert sind, beobachtete ich entsprechende Vorgänge, mit dem Unterschiede, daß die Degeneration der Zellen schneller und in größerer Anzahl vor sich ging. Der Grundunterschied im Vergleich zu den BCG ist das Fehlen

bei letzteren einer bedeutenden allgemeinen Giftigkeit für die Kulturhistiozyten. Indem die histoiden Zellen Bacillen aufnehmen, erhalten sie (weiter unten genauer) einen epithelialen Charakter, runden sich meistenteils sofort ab. In Kulturen, die mit menschlichem Stamm infiziert sind, läßt sich die Neigung zur Abrundung bei vielen Zellen, die keine Spaltpilze enthalten, beobachten. Solche Zellen verfallen bei virulenten Stämmen gewöhnlich einer schnellen, typischen Entartung; dabei befinden sie sich in keiner unmittelbaren Berührung mit den Bacillen.

Bevor wir diesen Teil unserer Abhandlung schließen, möchte ich noch einmal die Frage von der Virulenz der BCG erörtern. *Maximow* zieht den Schluß einer vollkommenen Avirulenz dieser Bacillen. Auf Grund der Beobachtungen an Bindegewebszellen beweist er, daß sogar bei sehr großen Mengen von Bakterien im Protoplasma dieser Zellen sie ein gesundes Aussehen haben und sogar Mitosen erzeugen. In meinen weiter unten beschriebenen Versuchen mit dem Endokard, dem Herzen des Embryo eines Meerschweinchens, machte ich dieselben Beobachtungen. Man muß jedoch darauf hinweisen, daß man sich auf die Fibrocyten nicht stützen kann, da diese Zellen sehr wenig empfindlich sind und zwar nicht nur hinsichtlich der Bakterien, sondern überhaupt auch verschiedener Gifte. Die histoiden Zellen sind unvergleichlich empfindlicher gegen die verschiedensten Reaktionen; im gegebenen Falle kann man mit Bestimmtheit sagen, daß sie eine Überschwemmung ihres Zelleibes mit Tuberkelbacillen, wenn auch des Stammes BCG, nicht vertragen und dem Zerfall unterliegen. Der Unterschied zwischen dem BCG und dem virulenten Stamm ist nur ein gradmäßiger. Deshalb ist es vielleicht richtiger, die BCG wenig oder schwach virulent zu nennen und nicht einfach avirulent.

4. Zerfall der Bacillen und Bildung eines gelben Pigments.

Eine bedeutende Menge der BCG wird in den Kulturen zerstört; ein Teil der Kultur kann, wie schon hingewiesen wurde, sich ganz von den Bacillen befreien. Dieses Verschwinden geht meinen Beobachtungen nach durch Zerstörung in der Zelle des Tuberkelbacillus selbst vor sich. Ich verteidige den Standpunkt der Verwandlung der Tuberkelbacillen im Pigment; diese Ansicht ist nicht neu und zuerst von *Metschnikoff* ausgesprochen worden; in den Gewebekulturen wurde die Bildung vom Pigment von *Maximow*, *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* sehr vorsichtig und ohne Beschreibung des Vorgangs in seinem Werden erklärt. Die zwei letzten Forscher betonen, daß dieser Vorgang noch ungenügend erforscht ist.

Auf Grund der Studien an meinen Präparaten stelle ich mir diesen Vorgang folgendermaßen vor: die durch die Zelle fagozitierten Bakterien bilden Haufen (Abb. 1). Die weiteren Stadien verlaufen scheinbar

schnell. Auf Abb. 2 sehen wir den epithelioiden Makrophag. In seinem Leib ist eine große Vakuole zu sehen und in ihr die verschiedenen Stadien des Zerfalls der Bakterien; im oberen Teil der Abbildung sind noch körnige Ketten zu sehen, unten liegen schon einzelne Körner. Diese veränderten Bacillen sind blasser als gewöhnlich (vgl. Abb. 1), weiterhin zerfallen sie, nachdem sie ihre Färbung verlieren, in kleine Körner von



Abb. 1. Eine monocytenähnliche Zelle mit einem Haufen von phagocytierten Bakterien.

schwach gelber Farbe; in der Vakuole sind sie stark vertreten. Den nachfolgenden Prozeß muß man sich auf Grund der Präparate als vollständigen Zerfall der Tuberkelbacillen in der Vakuole vorstellen und als Konzentration ihres Stoffes mit der Bildung von Einschlüssen, wie auf Abb. 3 u. 4 dargestellt ist. Diese zuweilen bedeutenden Klumpen mit einer ziemlich regelmäßigen Form bestehen aus einzelnen kleinen Häufchen von Körnern; auf Abb. 3 ist eine dreikernige Zelle mit kugelförmigem Einschluß zu sehen, einesteils besteht er aus Körnern von dunkler roter Farbe, so daß man von einiger Säurefestigkeit sprechen kann, andererseits ist die Färbung schwach rosa und hell gelb. Häufiger sind diese

Einschlüsse von einer eintönigen schwach grau-gelben Farbe, seltener mit einer rosa Schattierung. Das Gelbe hängt nicht von der Färbung ab, sondern ist die eigentliche Farbe der Körner. Wir haben amorphes Pigment; in diesem Zustande befindet es sich in der Zelle wahrscheinlich ziemlich lange. Gerade dieses Stadium beobachteten hauptsächlich

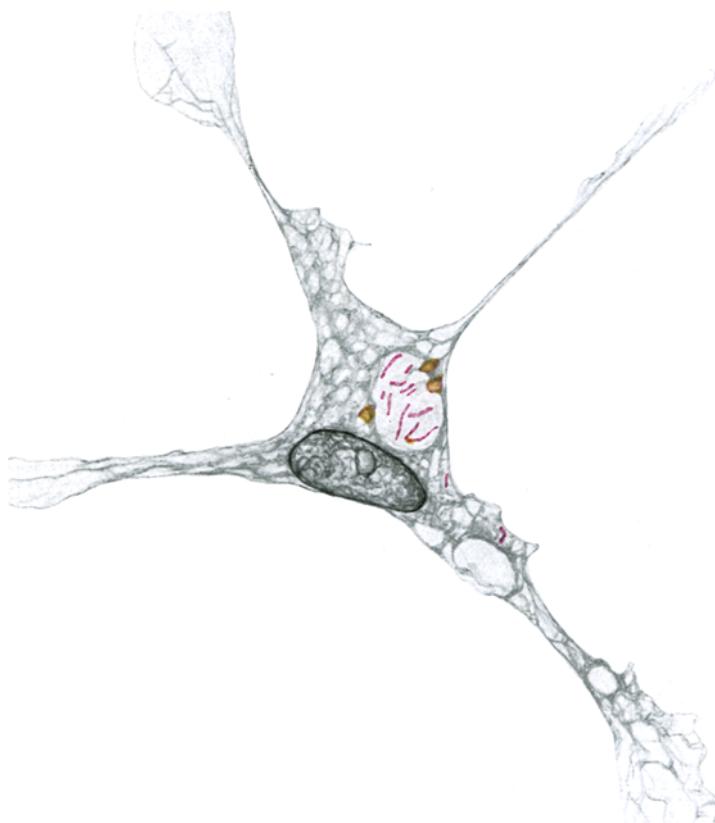


Abb. 2. Ein epithelioider Makrophag; in seinem Protoplasma eine große Vakuole mit Tuberkelbacillen in verschiedenen Stadien des Zerfalls.

Maximow, Timoфеевский и Беневоленская und beschrieben deshalb nur das gelbdunkelbraune Pigment, das schwarzdunkelbraune Pigment haben sie scheinbar nicht beobachtet und wohl deshalb, weil sie ihn an Kulturen mit virulenten Stämmen der Tuberkelbacillen erforschten. Eine so klare Form der Entwicklung des Pigments sah ich nur in mit BCG infizierten Kulturen und deshalb wage ich die Beschreibung derselben.

Einschlüsse, wie sie in Abb. 8, dargestellt sind, versammeln sich weiterhin in Haufen von verschiedener Größe, die sich sodann im ganzen Zelleib zerstreuen. Wenn zuweilen lange nach Stadien (Abb. 2) gesucht werden muß, in denen der Zerfall der Bacillen vor sich geht, so haben wir meistenteils sehr viele Zerfallsstadien der Einschlüsse, von Verdunkelung ihres Pigments und seiner Zerstreuung in der Zelle. Auf Abb. 5 ist ein Makrophag mit im ganzen Zelleib zerstreuten Körnern dargestellt; häufiger jedoch bleiben die zerfallenen Körner an einer Stelle als Anhäufungen liegen (Abb. 10). Das letzte Stadium der Pigmentbildung ist seine Konzentration, die allem Anschein nach schnell auftritt, da wir wenig Übergänge finden; in der Zelle erscheinen zuweilen ziemlich große (Abb. 10) von schwarz-dunkelbrauner Farbe mit schwach grünlicher Schattierung, die das Licht stark brechen. Das ist die endgültige Phase der Entwicklung des Pigments, d. h. die Bildung des typisch tuberkulösen schwarzdunkelbraunen Pigments. Die Pigmentkörper haben das Aussehen runder und kleiner Körner.

Die Entwicklung des gelben Pigments hemmt eine Aufnahme neuer Tuberkelbacillen durch die Zellen durchaus nicht. Deshalb können wir in ein und derselben Zelle neben dem sich bildenden Pigment vollständig normale Bacillen sehen. Man gewinnt den Eindruck, daß die Zelle nach Zerstörung einer Gruppe von Tuberkelbacillen mit den neuen



Abb. 3. Dreikernige monocytenähnliche Zelle mit kugelförmigem Einschluß von sich bildendem gelbem Pigment.

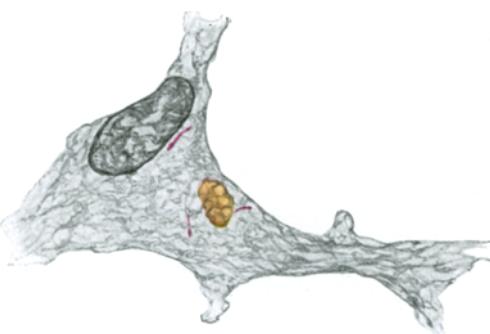


Abb. 4. Eine monocytenähnliche Zelle mit gelbem Pigment und Bacillen im Protoplasma.

Bacillen leichter fertig wird. Ich sah jedoch auch deutliche Bilder degenerierter Zellen, die schon ein gelbes, dunkelbraunes Pigment enthielten. Im allgemeinen muß bemerkt werden, daß eine vollständige Befreiung von Bacillen, wie von allen festgestellt wird, sehr selten vorkommt.

Entsprechende Vorgänge der Entwicklung des Pigments kann man auch in Kulturen mit virulentem Stamm beobachten; in diesen Kulturen ist der Vorgang weniger deutlich und nicht so ausgeprägt, da die

meisten Zellen noch vor Entwicklung des Pigments zugrunde gehen; in denjenigen jedoch, wo es sich trotzdem bildet, erreicht es sehr selten das „schwarzdunkelbraune“ Stadium.

Kehre ich nun zur Frage über die Natur der Vakuole, in der sich die Tuberkelbacillen befinden, zurück, so muß ich betonen, daß ich es nicht wage es den Verdauungsvakuolen der Einzelligen gleichzustellen. Meiner Ansicht nach, ist es richtiger, diese Vakuole als eigene Art zu betrachten, da die echten Verdauungsvakuolen der Protozoen auf eine andere Weise gebildet werden (auf einmal und nicht allmählich, wie im vorliegenden Falle) eine andere Gestalt besitzen und endlich der in ihr vorgehende Vorgang schwerlich eine Verdauung ist. Im Zu-



Abb. 5. Ein zweikerniger epithelioider Makrophag mit zerstreutem dunkelbraunem Pigment.

sammenhang damit ist es bemerkenswert, auf die Arbeiten von *Apraksina* und *Gamaléia* (1929) hinzuweisen, die experimentelle Beweise der Verwandlung von Tuberkelbacillen in Pigment durch Oxydation geben. Es scheint nur möglich, daß vorliegender Prozeß nach einer Reihe von Erwägungen eine Oxydation sein kann, entschieden kann diese Frage nur durch besondere Untersuchungen gelöst werden.

5. Über Epithelioidie und Riesenzellen.

Die Ausgangs- und Grundform der aus der Milz wachsenden Zellen sind Zellen von gestreckter Form. Anfangs sind es längliche Zellen mit anastomosierenden Fortsätzen, die in ein Netz gebunden sind; sie lassen

sich leicht isolieren (besonders in Kulturen mit virulentem Stamm der Tuberkelbacillen) und sind dann entweder rund oder ihr Protoplasma bildet fadenähnliche Fortsätze. Diese Zellen sind von vielen beschrieben worden. *Lang, Haagen, Timofeewsky* und *Benevolenskaja* beschreiben sie augenscheinlich auch bei Kulturen von Lungengewebe, wo sie sich aus den Zellen der Scheidewände entwickeln; diese Forscher sehen ihren Ursprung in Epithelien, womit man jedoch schwerlich einverstanden sein kann. *Haagen* nennt diese Zellen fibroblastenähnliche, er schreibt ihnen die Fähigkeit der Phagocytose zu und glaubt, daß sie Monocyten erzeugen können. Ich halte mich nicht an diese Bezeichnung; gestreckte, wandernde Zellen nenne ich (wie oben schon beschrieben) monocytenähnliche und meine, daß sie aus den Reticulo-Endothelien der Milz ihren Ursprung nehmen. Freie Zellen mit breitem, handförmigem Protoplasma, die sich aus den Reticulumzellen bilden, nenne ich Makrophagen.

Die monocytenähnliche Zelle unterscheidet sich durch ihre ganz bestimmte Form mit deutlichen Konturen, was für Fortsätze sie auch haben möge (meistenteils sind sie fadenähnlich). Das Protoplasma ist hell, in der ganzen Zelle gleichmäßig, oxyphil und enthält meistenteils sehr wenig Tropfen von Fett. Am typischsten ist der Kern: er hat eine etwas faltige Membran, ist reich an zerstreutem Chromatin und besitzt einen dunklen Kernsaft; ein einigermaßen deutliches Kernkörperchen ließ sich nicht aufweisen.

Die Makrophagen bilden sich aus monocytenähnlichen Zellen etwas später und besonders bei Verflüssigung des Plasma. Man kann sie nicht nur als zeitweilige Veränderung der Gestalt ein und derselben Zelle ansehen, wie wir es z. B. bei den Fibrocyten beim Kultivieren in verschiedenen Medien sehen. Die Makrophagen stellen eine bestimmte Zellart dar. Die Form des Zelleibs ist ziemlich mannigfaltig, aber fast immer ist die oberflächliche Schicht des Zelleibs, zuweilen längs des ganzen Umfangs, zuweilen nur an einigen Stellen, sehr helle und man kann sie sogar Hyaloplasma nennen (einige nennen sie undulierende Membran); oft sind nur die Enden der Fortsätze geschwollen. Die Kerne der Makrophagen in den Vergleichskulturen der Milz haben glatte Umrisse mit einer gut ausgeprägten Membran; Chromatin, das reichlich vorhanden ist, ist zerstreut; außerdem gibt es viele große Klümpchen; die Kernkörperchen sind gut ausgebildet, um sie herum kleben Klümpchen von Chromatin.

Es ist häufig sehr schwer in den Kulturen eine deutliche Grenze zwischen den monocytenähnlichen Zellen und Makrophagen zu ziehen, da wir zwischen ihnen alle Übergänge sehen. In den alten Kulturen haben die Mehrzahl der Zellen den Typus der Makrophagen; das Verflüssigen des Plasmas auf dem Glimmerplättchen begünstigt das Heraustreten der Zellen in den Tropfen; in vielen Kulturen sah ich ihre Massenbildung auch in dichten Medien unter Fibrinfäden.

Die Bildung der epithelioiden Zellen vollzieht sich so wie die Bildung der Makrophagen nur aus monocytenähnlichen Zellen. Im wesentlichen unterscheiden sie sich wenig von den Makrophagen; der Zellform nach braucht kein Unterschied zu sein, der Unterschied im Bau des Kerns ist viel schroffer. Der Kern besitzt eine ziemlich bedeutende Größe, ist meistenteils richtig geformt mit einer deutlichen und sehr glatten Membrane und, was das Wichtigste ist, das Chromatin ist gleichmäßig verteilt. Bei der Bildung der epithelioiden Zelle aus der monocytenähnlichen Zelle entsteht, wenn man sich so ausdrücken kann, eine Verhellung des Kerns, wobei er nicht verödet, sondern mit winzigen Körnern von Chromatin gefüllt ist, die sich nur selten in kleine Klümpchen sammeln. Außerdem tritt ein großes deutliches Kernkörperchen zutage, zuweilen sind es ihrer mehrere. Die Form des Makrophagen behalten nur die epithelioiden Zellen bei, die die von ihnen aufgenommenen Bacillen bewältigen. In den Fällen, wo zu viele Bacillen sich in der Zelle entwickeln, runden sich, wie schon beschrieben, die Zellen ab und zerfallen allmählich. Nichtsdestoweniger hat der Kern in diesen Fällen meistenteils Zeit den epithelioiden Charakter anzunehmen, d. h. er hellt sich auf und ein klares Kernkörperchen tritt hervor. Gerade diese Form beschrieben hauptsächlich die früheren Forscher; ihre Darstellungen mit dem Protoplasma, das von Tuberkelbacillen überfüllt ist, sehen wir in den Tabellen von *Maximow, Timofeewsky u. a.*

Es sei betont, daß in meinen Kulturen, bei Infektion mit BCG, die meisten monocytenähnlichen Zellen Tuberkelbacillen enthielten und ihrer Reaktion unterworfen wurden. Dabei hatten sie alle, wie ich schon erwähnte, mehr oder weniger die Bauart der Makrophagen. Auf Grund dessen, d. h. der Gleichheit in der Bauart, mit den Makrophagen und dank der Abstammung unmittelbar von den monocytenähnlichen Zellen und nicht durch das Stadium des Makrophagen (obgleich auch diese Möglichkeit nicht zu verwerfen ist) finde ich es nicht notwendig, die epithelioiden Zellen als besondere Zellform anzusehen und halte es für möglich, sie epithelioider Makrophagen zu nennen. Mir scheint es, daß der epithelioider Makrophag als gewisse Hypertrophie der Zelle zu verstehen ist. Morphologisch zeigt sich die Hypertrophie in ihrem etwas größerem Ausmaße; das bezieht sich auf das Protoplasma, sowie auch auf den Kern; das Chromatin verteilt sich regelmäßiger und deshalb färbt sich der Kern schwächer. In einigen Kulturen hatten die einzelnen epithelioiden Makrophagen eine bedeutendere Größe, die die normale 2,3—4mal überstieg.

Die Riesenzellen (oder Zellen von *Langhans*, wenn Tuberkelbacillen oder Pigment vorhanden ist) werden meinen Beobachtungen nach durch Zusammenschmelzen der normalen, wie auch epithelioiden Makrophagen gebildet. Die Bildung der vielkernigen Zellen ist eine der Eigenschaften der Makrophagen; darin ist bei Gewebskulturen kaum etwas

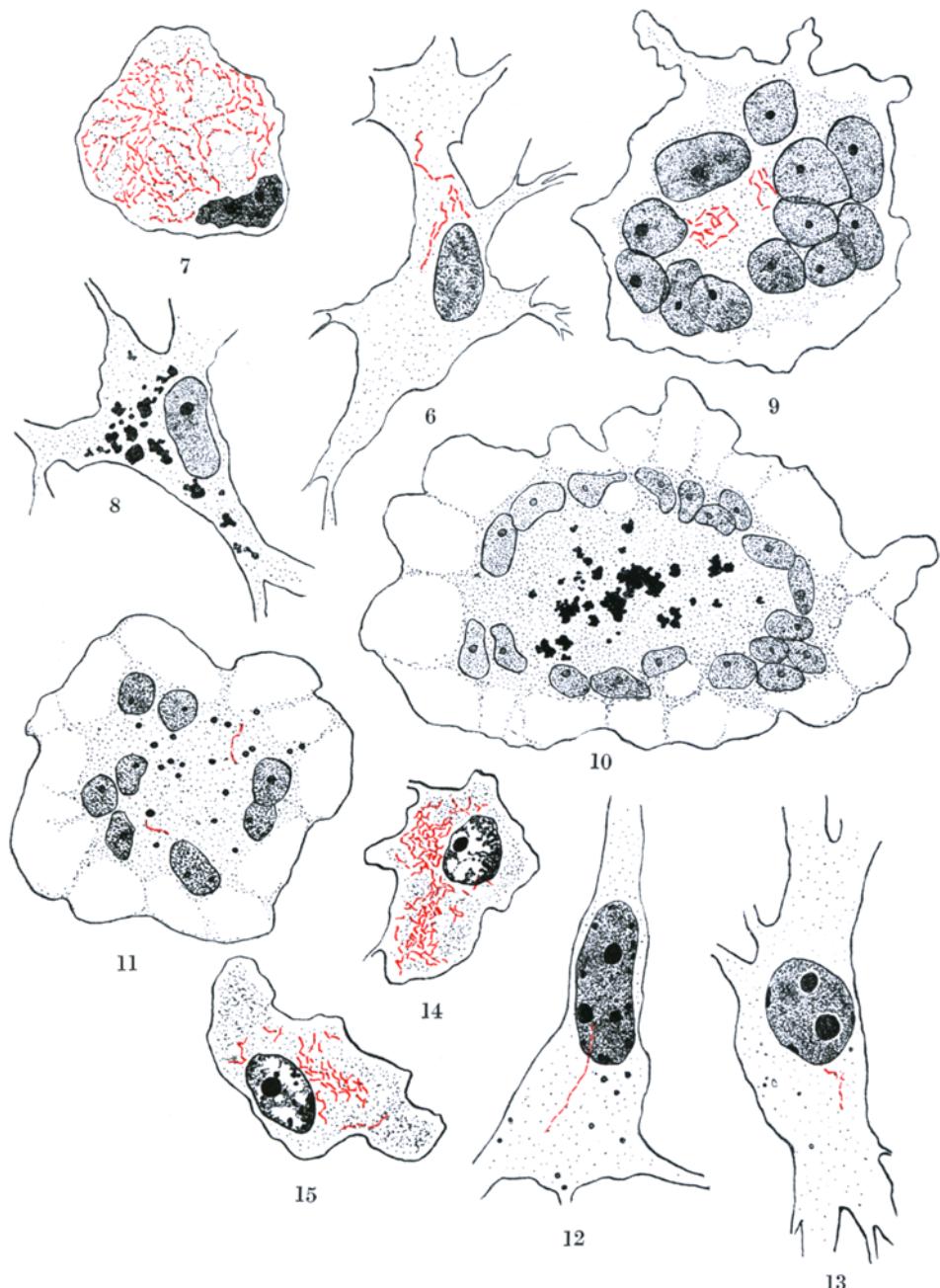


Abb. 6–15. 6 Eine monocytenähnliche Zelle mit Tuberkelbacillen im Protoplasma. 7 Eine abgerundete degenerierende Zelle, das Protoplasma ist mit Bacillen überschwemmt. 8 Eine Zelle mit klumpigem gelbbraunem Pigment. 9 Eine Riesenzelle, die Tuberkelbacillen aufnehmen. 10 Eine Riesenzelle mit klumpigem schwarzbraunem Pigment. 11 Eine kleine Riesenzelle mit zerstreutem dunkelbraunem Pigment und einzelnen Bacillen. 12 u. 13 Fibrocytenähnliche Zellen mit Tuberkelbacillen und zerstreutem dunkelbraunem Pigment. 14 u. 15 Endokardzellen mit großen Mengen von Tuberkelbacillen im Protoplasma.

Spezifisches zu sehen. Ich besitze normale Kulturen, wo Makrophagen sich fast überall vereinigen; hier kann man Zellen mit der verschiedensten Anzahl von Kernen, von zwei bis mehreren Zehnteln finden (vgl. auch die Arbeit von *Freifeld und Giesburg* 1930). Die Vereinigung erfolgt, soweit man nach den Präparaten urteilen kann, auf dem Wege der allmählichen Beifügung einzelner Zellen und auch gleichzeitiger Verschmelzung einer großen Anzahl derselben. Keinmal sah ich Mitosen, ebensowenig Amitosen. Auf Grund dessen werde ich jedoch die Möglichkeit der Bildung vielkerniger Zellen durch Teilung der Kerne ohne Teilung des Protoplasmas nicht leugnen. In mit Tuberkelbacillen infizierten Kulturen geht die Bildung der Riesenzellen im Verhältnis zu den normalen Kulturen in größerem Maße vor sich und tritt früher auf.

Ich finde es notwendig hier noch einmal zu betonen, daß die Kerne der Makrophagen und Riesenzellen sich nicht voneinander unterscheiden und zwar nicht nur in Kulturen, sondern auch im Organismus des Meerschweinchens (ich beobachtete Tuberkel, die unter Einfluß virulenter Stämme sich gebildet haben). Ferner sei noch die bedeutende Menge von Pigment bemerkt, das häufig in Langhanszellen gefunden wird; es entwickelt sich nicht in ihnen, sondern besteht als Teil des Protoplasma der Makrophagen, die Riesenzellen gebildet haben. Häufig enthalten sie nicht nur gelbdunkelbraunes Pigment, sondern auch schwarzdunkelbraunes, das aus gelbdunkelbraunen Klümpchen gebildet ist; dieser Vorgang verläuft meistenteils schon im Leib der vielkernigen Zellen selbst. Die Riesenzellen verlieren nicht die Fähigkeit zu phagocytieren; wir sehen in ihnen oft Tuberkelbacillen und ebenso absterbende Leukocyten (Abb. 9, 10, 11).

Beim Vergleich unserer Beobachtungen mit den Schrifttumsangaben müssen wir vor allen Dingen die Arbeiten von *Timofeewsky* und *Benevolenskaja* berücksichtigen; in ihren Arbeiten mit der Milz kann ich einige Meinungsverschiedenheiten feststellen [sie nehmen zwar die Milz eines Kaninchens, das halte ich jedoch nicht für wesentlich (1926)]. Diese Forscher kamen zu dem Schluß, daß für die Milz die Bildung der Riesenzellen beim Fehlen der epithelioiden Zellen charakteristisch ist. Es ist möglich, daß beim Kaninchen der Vorgang schneller verläuft und die Riesenzellen sich früher bilden; Fehlen der epithelioiden Makrophagen kann man kaum zugeben, um so mehr, als *Maximow* sie in seiner Arbeit an dem Lymphknoten aus der Bauchwand beschreibt. Ebenso kann ich nicht einverstanden sein mit der Erklärung der Entwicklungsgründe der mehrkernigen Zellen, die die obengenannten Verfasser in der Giftigkeit des Stammes der Tuberkelbacillen sehen. Es wird durch die Kultur des myeloiden Blutes bewiesen; es ist weniger empfindlich gegen die Tuberkelinfektion und weist keine Riesenzellen auf. Ich bin mit dieser Erklärung nicht einverstanden, da Riesenzellen sich auch beim Fehlen der Spaltpilze bilden.

Es ist lehrreich, die Schlußfolgerungen im allgemeinen nach den Arbeiten von *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* zusammenzufassen. Diese Forscher stellen fest, daß die Schnelligkeit der Reaktion auf Tuberkelbacillen von der Empfindlichkeit des Tieres zur Infektion und von der Virulenz des gegebenen Stammes abhängt. Die Schnelligkeit der Reaktion, d. h. die Schnelligkeit des Erscheinens epithelioider und Riesenzellen und die Phagocytose der Tuberkelbacillen entspricht den erwähnten Besonderheiten. Die von ihnen beobachtete, gewisse Hypertrophie der Zellen ist ihrer Meinung nach der Virulenz des Stammes proportionell (1926). Ferner sprechen sie vom stimulierenden Einfluß des Giftes und weisen darauf hin, daß da, wo viel Nekrosen und absterbende Tuberkelbacillen vorhanden sind, auch viele Teilungen auftreten (in myeloidem Blute bis 30%). Diese Beobachtungen sind sehr beachtenswert, sie müssen aber mit den Angaben von *Gurwitsch* und seinen Schülern über die mitogenetischen Strahlen verglichen werden; wie bekannt, fanden sie, daß als Quelle der Strahlen gerade die nekrotischen Gewebe dienen können. In dieser Hinsicht wird die Frage natürlich nicht im Sinne der spezifisch tuberkulösen Wirkung gelöst werden.

Hinsichtlich dessen, was denn den Anlaß zur Umwandlung von Markophagen in Epithelioidzellen bildet — das Vorhandensein der Bacillen in der Zelle oder das Vorhandensein von Gift im Nährboden — besitzen wir, wie mir scheint, vorläufig noch keine Angaben.

Zum Schluß des Kapitels muß ich bemerken, daß die Reaktion auf die BCG-Infektion in meinen Kulturen meistenteils einen allgemeinen Charakter besaß, mit anderen Worten, waren epithelioidre und Riesenzellen vorhanden, aber ein Tuberkel als solches fehlte.

IV. Über die Endothelien und Bindegewebszellen.

Einige Histologen sind der Meinung, daß die Bestandteile des Tuberkels sich aus Fibrocyten und aus dem Endothel bilden können. Lehrreich wäre es, diese Frage mit Hilfe der Auspflanzungsmethode zu prüfen. *Maximow* stellt in seiner ersten Arbeit mit Netzkulturen (1924) fest, daß man die Beteiligung der Fibrocyten und des Endotheliums in der Bildung des Tuberkels nicht ablehnen kann und erklärt es durch ihren embryonalen Charakter. *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* verneinen die Beteiligung der Fibrocyten, halten jedoch die Beteiligung der Endothelien für möglich.

Um das Verhältnis von Endothelien zu den Tuberkelbacillen zu prüfen, infizierte ich mit BCG reine Kultur des Endokards, die ich aus dem Herzen des Embryo eines Meerschweinchens genommen habe. In einer Reihe wuchsen die Bindegewebszellen aus unbekannten Gründen gar nicht und deshalb gelang es mir, eine Reinkultur des Endokards zu gewinnen. Die Kulturen lebten bei mir 38 Tage, wobei 9 Passagen gemacht

wurden; sie gingen durch zufällige Ursachen zugrunde, ihr Wachstum war während der ganzen Zeit sehr kräftig.

Die Zellen des Endokards hatten in den Kulturen eine geringe Größe; sie sind eiförmig, zuweilen sogar kubisch und spindelförmig wie die Bindegewebszellen, diese sind ziemlich protoplasmareich, ihr Kern ist rund, zuweilen eiförmig mit vielen dunklen Chromatinklumpchen und einem sehr hellen Kernsaft; sie besitzen meistenteils nur ein rundes und deutliches Kernkörperchen. Während der vierten Passage führte ich in die Kultur BCG ein. Von der fünften Passage an konnte ich in den Stückpräparaten keine Bacillen finden und sah darum ihre vollständige Zerstörung. Nachdem ich jedoch die Schnitte durchsah, stellte ich fest, daß nicht alle BCG umgekommen waren, sondern in allen von mir untersuchten Kulturen sehr große Haufen bildeten, die von allen Seiten mit Schichten von Endokardzellen bewachsen waren. Die Tuberkelbacillen und Zellen lebten nebeneinander, ohne sich gegenseitig zu zerstören. Während der sechsten und achten Passage schnitt ich einen Teil der Stückchen zur Hälfte und trotzdem traten die Bacillen nicht heraus, sondern wurden von neuem von Zellen bewachsen.

Das genaue Studium der Präparate zeigte, daß die Zellen des Endokards im Laufe der ganzen Zeit keine anderen Zellen bildeten. In einigen Kulturen konnte man Häufchen von Bindegewebszellen finden, die aber zweifellos von Anfang an da waren.

Es war wichtig festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den Zellen und den Tuberkelbacillen gibt oder beide vollständig unabhängig sind. Das aufmerksame Studium zeigte, daß in den Haufen der Bacillen eine gewisse Menge nekrotisierter Zellen liegt; sie sind scheinbar die Grundlage des bakteriellen Klumpens. Man mußte das Präparat sehr aufmerksam durchforschen, um den Untergang der Zellen zu sehen. Der Bacillenhaufen ist von Zellschichten umgeben, die an eine Kapsel erinnern; von ihr hängen häufig nach innen Stränge von Zellen herab und an ihnen kleben ziemlich viele Bacillen. Das Herabhängen der Stränge ist in den Fällen deutlich zu sehen, wenn innerhalb der Kultur (was häufig vorkommt) sich eine Höhle mit Flüssigkeit bildet. Schließlich reißen die Stränge und die Zellen gehen zugrunde. Vom ursprünglichen Stückchen blieb bei der fünften bis sechsten Passage nichts mehr übrig; es ist möglich, daß während der Nekrose das Stückchen den Grund bildete, in dem die Entwicklung der BCG stattfand, die lebenden Zellen der Wachstumszone verwuchsen jedesmal nach Verpflanzung des Stückchens im alten Plasma, noch früher, als Bacillen aus ihm austreten konnten.

Ferner mußte festgestellt werden, auf welche Weise die Zellen des Endokards absterben: durch den extra- oder intracellulären Einfluß der Tuberkelbacillen. An Stellen, wo viele Bacillen und Zellen sind, kann es nicht festgestellt werden und deshalb muß man Zellen mit einer

verhältnismäßig kleinen Menge von Bacillen suchen. Die Bacillen selbst unterscheiden sich durch nichts von denen außerhalb der Zellen; sie sammeln sich oft in Haufen an und kommen in Form von Ketten vor. Der Untergang der Bacillen konnte nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zu den histioiden Zellen sind die Zellen des Endokards im Verhältnis zu den Tuberkelbacillen sehr standhaft (Abb. 14 u. 15). Sogar bei einer sehr großen Menge von Tuberkelbacillen haben die Kerne selten ein degeneratives Aussehen. Der Tod tritt scheinbar durch Platzen des Zelleibs bei Überfüllung mit Bacillen ein; auch dann befindet sich der Kern in den ersten Stadien der Degeneration.

Über das Verhalten der Bindegewebszellen in mit Tuberkelbacillen infizierten Kulturen ist manches mitgeteilt. Vor allen Dingen sei der Streit zwischen *Maximow* und *Timofeewsky* und *Benewolenskaja* erwähnt. Jener schreibt von der kräftigen und beschleunigten Entwicklung die Bindegewebszellen, die sogar eine Kapsel um die Tuberkel bilden; diese wollen das Gegenteil gesehen haben. Scheinbar spielt dabei die Methodik eine Rolle, wie es *Timofeewsky* selbst bemerkt. *Maximow* infiziert der Kultur durch Anstechen, *Timofeewsky* durch das Eintauchen des Stückchens in Emulsion von Tuberkelbacillen.

Ich wendete, wie oben erwähnt, die zweite Methode an und konnte ebenfalls kein bedeutendes Wachstum von Bindegewebszellen nachweisen. Mir persönlich scheint es, daß man kein beschleunigtes Wachstum der Fibrocyten erwarten kann, da diese Zellen für ihren Wuchs eine bedeutende Menge von Gewebsextrakten verlangen; das Vorhandensein der letzteren wirkt zerstörend auf die Histiocyten.

Die Bindegewebszellen sind nach Angaben aller Untersucher sehr wenig empfindlich gegen Tuberkelinfektion und nicht nur gegen die BCG, sondern auch gegen die virulenten Stämme. Wahrscheinlich ist dadurch erklärlich, daß *Smith, Willes, Lewis* (1922) zum Schlusse kamen, daß das Gewebe in der Kultur auf die Tuberkelinfektion nicht reagiert. Sie nahmen Gewebe aus Hühnerembryonen, aus denen meistenteils nur Fibrocyten wachsen; sie nahmen den Stamm vom Typus der Vogeltuberkelbacillen. Ich kultivierte ebenfalls Bindegewebszellen aus dem Herzen eines 7tägigen Hühnerembryos mit Bacillen desselben Stammes und muß die vollkommene Passivität der Zellen gegen die Tuberkelbacillen feststellen; ich sah nicht einmal Phagocytose.

In den Kulturen von Milz eines erwachsenen Meerschweinchens sah ich, wenn auch in seltenen Fällen, ein bedeutendes Wachstum der Bindegewebszellen; dabei fand man bei vielen im Zelleib Tuberkelbacillen. *Maximow* und auch *Timofeewsky* bemerken, daß diese Zellen leben und sich sogar teilen können, wenn sie im Protoplasma Bacillen besitzen. Dagegen läßt sich nichts einwenden.

Sehr anziehend ist die Frage vom Eindringen der Tuberkelbacillen in das Protoplasma. In dieser Hinsicht gibt es 3 Möglichkeiten: 1. eine

aktive Phagocytose der Zellen, 2. eine aktives Eindringen der Tuberkelbacillen in die Zelle, 3. Bildung der Bindegewebszellen aus histioiden Zellen, welche Bacillen enthielten. Am wahrscheinlichsten finde ich die 3. Möglichkeit, die zuerst von *Timojeewsky* erwähnt wurde; er schreibt, daß in den histioiden Zellen, die Tuberkelbacillen aufnehmen und sich danach in Fibrocyten verwandeln, die Bacillen unverändert im Protoplasma liegen. Als Beweis zugunsten einer solchen Umwandlung kann ich meinerseits folgendes anführen: Ich beobachtete in einer Kultur den Massenübergang von histioiden Zellen in Fibrocyten. In dieser Kultur (am 6. Tage nach der Auspflanzung, eine Renovation) konnte man alle Übergänge sehen; dabei konnte man in vielen Fibroblasten und Fibrocyten (in Desmoplasten und Desmocyten von Chlopin) nicht nur einzelne Bacillen, sondern auch Körner von gelbdunkelbraunem Pigment beobachten (Abb. 12 u. 13). Das ist meiner Meinung nach ein besonders überzeugender Beweis zugunsten der Entstehung der gegebenen Zelle aus einer histioiden.

Schluß.

1. BCG werden aktiv und in bedeutender Menge nur durch histioide Zellen und polymorphkernige Leukocyten aufgenommen; weder Lympho-, noch Bindegewebszellen beteiligen sich an der Phagocytose.
2. Polymorphkernige Leukocyten und ein Teil der Histiocytien, die BCG aufnahmen, gehen zugrunde.
3. Wenn die Zelle imstande ist, die Infektion zu überwinden, bilden BCG Anhäufungen im Zelleib; sie werden von einer Vakuole umgeben und ferner werden die Bakterien von der Zelle bis zu einem gelbdunkelbraunen Pigment verarbeitet, welches später in ein schwarzdunkelbraun körniges übergeht.
4. Die epithelioidie Zelle ist keine spezifische Zellart; sie muß als vergrößerter Makrophag betrachtet und deshalb kann sie „epithelioider Makrophag“ genannt werden. Die epithelioiden Zellen, ebenso wie die Riesenzellen, bilden sich leicht bei der Infektion von Kulturen mit Tuberkelbacillen. Die Bildung der Riesenzellen kann nicht als spezifische Reaktion betrachtet werden.
5. Bei Infektion von Gewebskulturen mit Tuberkelbacillen sind zweierlei Ausgänge möglich; entweder zerstören die aufgenommenen Bacillen die Zellen und verdrängen das ganze Gewebe oder die Zellen zerstören die Tuberkelbacillen, indem diese zu Pigment verarbeitet werden. Ein dauerndes Vorhandensein der Zellen in Gewebskulturen ist bis jetzt nur in einem Falle bewiesen. *Fischer* hat es bei Zellen des Roussarkoms (1927) bewiesen. Bei allen anderen Versuchen konnte niemand etwas Ähnliches beobachten.

Schrifttum.

Apraksina, V. et Gamaléia: Sur la desagrégation des bacilles tuberculeux dans un organisme animal. Вопросы Туберкулеза. 7 (1929). — *Fischer, A.:* Sarkomzellen und Tuberkelbacillen in vitro. Arch. exper. Zellforschg 3, 389 (1927). — *Freifeld, E. u. A. Ginsburg:* Wirkung des Anilins auf Gewebekulturen mit histotypischem Wachstum. Arch. exper. Zellforschg 10, 128 (1930). — *Haagen, E.:* Das Verhalten von Lungengewebskulturen gegenüber Tuberkelbacillen. Arch. exper. Zellforschg 5, 127 (1928). — *Lang, F. J.:* The reaktion of lung tissue to tuberculosis infection in vitro. J. inf. Dis. 37, 430—442 (1925). — *Lewis:* Arch. exper. Zellforschg 2, 265 (1926). — *Lubarsky, W. A.:* Du Sort du BCG dans l'organisme considéré dans son rapport avec le mecanisme de l'immunité dans la vaccination BCG. Вопросы Туберкулеза. 6 (1928). — *Maximow, A. A.:* J. inf. Dis. 34, 549 (1924). — Roll of the non granular Cloud leukocytes in the formation of the tubercle. J. inf. Dis. 37, 430 (1925). — Etude comparative des Cultures de tissue inoculéss soit avec le bacille tuberculeux du type bovin soit avec le bacille BCG de Calmette-Guérin. Ann. Inst. Pasteur 42, 225 (1928). — *Smith, Willis, Lewis:* Amer. Rev. Tbc. 1922. Zit. nach Timojeewsky. — *Smyth:* J. exper. Med. 23, 265 (1916). Zit. nach Timojeewsky. — *Timojeewsky, A. D. u. S. W. Benevolenskaja:* Explantationsversuche von weißen Blutkörperchen mit Tuberkelbacillen. Arch. exper. Zellforschg 2, 1 (1925). — Туберкулезная инфекция в культурах белых кровяных телеу. Юбилейный сборник проф. В. М. Мыши. Томск. стр. 1. — Zur Frage über die Reaktion von Gewebskulturen auf Tuberkuloseinfektion. Virchows Arch. 225, 613 (1925). — Опыты эксплантации тканей в среде, содержащей туберкулезные бактерии. Известия Томского Гос. Ун-та. Т. 76. (1926). — La culture des tissue et des leucocytes de l'homme avec les bacilles tuberculeux. Calmette-Guérin (BCG). J. de Microbiol. 4, 479 (1927). Virchows Arch. 264.