

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin  
[Direktor: Professor Dr. R. Rössle].)

## Studien über die Entstehung der Bindegewebsfibrille.

Von

L. Doljanski und Fr. Roulet.

Mit 39 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 25. Juli 1933.)

### Inhaltsverzeichnis.

Einleitung. S. 260.

Die Struktur des Plasmamediums der Gewebekultur. S. 265.

Histogenese und Morphologie der Mesenchymfibrille und der kollagenen Faser in Gewebekulturen. S. 274.

a) Mesenchym-(„Silber“-)Fibrille. S. 276.

b) Die kollagenen Fasern. S. 285.

Die Beziehungen zwischen Kultur und umgebendem plasmatischem Medium vom Standpunkt der Fibrillogenese. S. 293.

Zusammenfassende Besprechung. S. 299.

Die ursprünglich scharf gegeneinander abgegrenzten Theorien über die Frage der extra- oder intracellulären Genese der Mesenchymfibrille sind in der letzten Zeit sehr verschwommen geworden. Die präzise Formulierung und unzweideutige Entscheidung, die *Henle*, *Kölliker*, *Ranvier*, *Merkel*, *v. Ebner* einerseits und *Schwann*, *Meves* u. a. andererseits glaubten aufstellen zu können, haben mehr und mehr Überlegungen Platz gemacht, die einer klaren Stellungnahme in der einen oder der anderen Richtung ausweichen. Die Hauptschuld an diesem Umstand trägt die gegenwärtige Krise des Zellbegriffes.

Es soll hier nicht im einzelnen verfolgt werden, wie der durch geniale Arbeiten von *M. Heidenhain* gelockerte Bau der klassischen Zellehre zum Schauplatz von Theorien wurde, deren heuristischer Wert ebenso gering zu sein scheint wie ihre tatsächlichen Begründungs- und Beweismöglichkeiten. Die „sogenannte Zelle“ (*Hueck*) wurde zu einer von vielen Organisationserscheinungen der lebenden Masse degradiert. Das Postulat von der Einheitlichkeit der körperlappenden plasmatischen Substanz machte die ursprüngliche Fragestellung nach der extra- oder intracellulären Fasergenese überflüssig, ohne eine neue Grundlage für die

Erklärung des Vorgangs der Fibrillenbildung schaffen zu können. Dadurch, daß man der Grundsubstanz die Eigenschaften des „echten“ Lebens zuerkannte, hat man die Frage nach der *Art* der Entstehung der interplasmatischen Strukturen keineswegs gefördert.

Ebensowenig befruchtend erwies sich die Vorstellung, die zwar die grenzenlose Einheit von cellulären und intercellulären Bestandteilen des tierischen Körpers ablehnte und die Realität des Zellbegriffes, die Existenz eines Territoriums mit stabiler räumlich begrenzter Wechselwirkung zwischen Kern und bestimmten Zytoplasmaanteil anerkannte, aber gleichzeitig die These vom Vorhandensein eines „extracellulären Cytoplasmas“ aufstellte (*Renaut* 1893, *Hansen* 1899, *Mall* 1902). Das Cytoplasma soll nicht nur in Zellen organisiert sein, sondern sich auch außerhalb des Zellkörpers und außerhalb der syncytialen zelligen Zusammenhänge (*Studnicka* 1911) vorfinden. Diesem extracellulär gelagerten Cytoplasma käme entschieden die Rolle zu, Mutterboden der gesamten Grundsubstanz zu sein. Die Fibrillenbildung geht laut dieser Auffassung, falls sie nicht in den Zellen selbst stattfindet, in dem außerhalb des organisatorischen Bereiches der Zelle liegenden Cytoplasmas oder in der direkt von ihr abstammenden Grundsubstanz vor sich (*Hansen* 1899, *Studnicka* 1902—1903, *Hartmann* 1910, *Laguerre* 1921, *Zawarzin* 1926 u. a.). Von diesem Standpunkt aus erschiene der Widerstreit zwischen der extra- und intracellulären Theorie der Faserogenese als „überwunden“ und gegenstandslos (*Wassermann* 1929). Denn die primäre Entstehung der Mesenchymfibrille geschähe immer *intraplasmatisch*, sei es, daß sie im Endoplasma der Mesenchymzelle oder in ihren exoplasmatischen Bildungen zuerst hervortritt. Das fibrillenbildende Exoplasma bedarf nicht einmal unbedingt der Zelle zu seiner formativen Tätigkeit. Und da die Grundsubstanz nach dieser Vorstellung immer protoplasmatischen Ursprungs ist, kann der Schluß gezogen werden, daß „die fibrilläre Differenzierung sowohl *in den Zellen* wie auch in der Grundsubstanz *ohne Zellen* vor sich gehen kann“.

Diese Anschauung, die in der Abhandlung von *Wassermann*: „Die Differenzierung der lebendigen Masse“ (*v. Möllendorffs* Handbuch der mikroskopischen Anatomie) die schärfste Form gefunden hat, überbrückt nur scheinbar die alten Gegensätze zwischen den Vertretern der intra- und extracellulären Theorien der Faserogenese. Ihr Hauptmangel liegt darin, daß sie die Frage nach der Entstehung der Mesenchymfibrille allein auf den Wegen der *formalen* Histogenese zu lösen versucht. Demgegenüber muß man mit besonderem Nachdruck betonen, daß hinter den lebhaften Auseinandersetzungen über das Thema der Faserentstehung immer die Überzeugung stand, daß nicht der Ort der Entstehung maßgebend ist, sondern daß im Hinweis auf die Tatsache der Entstehung der Fasern innerhalb oder außerhalb der Zelle

die Fragen nach der *Art* der Entstehung beantwortet werden könnten. Nicht auf dem *Wo*, sondern auf dem *Wie* lag das innere Gewicht der Untersuchungen. Durch „die extreme Ausdehnung des Zellbegriffes auf die Intercellularsubstanzen“ (Patzelt 1925) verlor zwar die Antwort auf die Frage nach dem Ort der Entstehung entschieden an Dringlichkeit, für die Erklärung der Art der Entstehung wurde aber nichts gewonnen.

Nach der heute allgemein verbreiteten Vorstellung *entstehen die Fasern also nicht nur innerhalb der Zelle, sondern auch in der aus der Zelle stammenden intercellulären Substanz, in der Grundsubstanz selbst*. Sie ist fähig, mit oder ohne unmittelbare Beteiligung der Zelle sich fibrillär zu differenzieren.

Diese durch viele Beobachtungen erhärtete Tatsache bedarf noch dringend einer weiteren Ausarbeitung. Zwar wurde der Vorgang der Umwandlung eingehend beschrieben, die Kräfte aber, die diesen morphologisch in allen Einzelheiten beschriebenen Prozeß einleiten, die Bedingungen, unter denen die Faserdifferenzierung sich verwirklichen kann, der chemisch-physikalische Bau des Substrates, das diesem Vorgange zugrunde liegt, ist uns fast völlig unbekannt geblieben. Der morphologischen Ausarbeitung des Problems muß eine physiologische Analyse des Prozesses der Faserbildung folgen. Die Aufgabe der neuen, funktionell orientierten Morphologie ist die kausale Analyse des Vorganges, dessen äußere Umrißformen durch zahlreiche Untersuchungen schon eingehend geklärt sind.

Die Theorien der Faserogenese sind untrennbar gebunden an die Vorstellungen über den Bau und die histogenetischen Schicksale der Grundsubstanz überhaupt. Es besteht jetzt allgemein die Neigung, diese scharf von der intercellulären Flüssigkeit oder den Gewebssäften zu trennen. Nur die geformten Substanzen, die aus dem lebenden Protoplasma stammen, auf Zellen bzw. Zellsyncytien zurückgehen, vermögen sich als echte Grundsubstanz zu differenzieren, vermögen die Strukturen neu zu bilden. Die Gewebslymphe, die intercelluläre Flüssigkeit, das Blutplasma, die Zellsekrete sind „tot“ und als solche zur Differenzierung nicht fähig.

Diese völlig willkürliche Trennung ist heute äußerst schwer aufrechtzuerhalten. Wenn man bedenkt, wie kompliziert die Funktionen eines Fermentpartikelchens, wie ungemein verwickelt die Vorgänge in einem kolloidalen Substrat wie Gewebslymphe oder Blutplasma sind, so erscheint es weit überholt, den einen oder anderen Teil des Organismus oder der Gewebe zu etwas Lebendigem oder Unlebendigem zu stempeln. Für denjenigen, der die Umbildungsvorgänge am organischen Substrat nicht durch geheime Lebenskräfte, sondern durch streng bestimmbare physikalische und chemische Faktoren geleitet sieht, ist ohne weiteres

denkbar, daß die Organisierung einer Mesenchymfibrille innerhalb Abkömmlingen des Protoplasmas, *sowie* in anderem, mit dem Protoplasma in keiner unmittelbaren Beziehung stehendem Material ablaufen könnte, daß neben Protoplasmaumbildungsprozessen („Umbildungstheorie“) auch zahlreiche *andere* Momente an der Histogenese der Mesenchymfibrille beteiligt sein dürften.

Zwar können wir nach den Untersuchungen von *Laguesse*, *Studnička* u. a. als gesichert betrachten, daß die protoplasmatischen Netze und Lamellen, daß sich in Grundsubstanz umgewandelte protoplasmatische Anteile der „Gesamtzelle“ bei dem Vorgang der Fibrillenbildung weitgehend beteiligen, aber ebenso sicher und kaum anders vorstellbar ist die Tatsache, daß die Grundsubstanz beständig von gelösten Stoffen mannigfacher Art durchtränkt ist, daß die Körperflüssigkeiten — Plasma und Lymphe — ihren ständigen Bestandteil bilden, daß die cellulären Sekrete, zahlreiche Fermente, Ausscheidungsstoffe und Stoffwechselschlacken zu ihrer Bildung in hohem Maße beitragen (*Biedermann* 1917). Wir haben keinen Grund, das *ungemein mannigfach zusammengesetzte interplasmatische Milieu nicht als einheitliche Realität zu betrachten* und bei Beziehung des Fibrillenbildungsvorganges auf dieses Substrat eine willkürliche Trennung in bildungsfähige „lebendige“ und bildungsunfähige „tote“ Teile durchzuführen, sondern wir müssen unsere Betrachtung der *Gesamtheit der interplasmatischen Masse* widmen. Dann bleibt die ursprüngliche Fragestellung vollauf zeitgemäß, denn die Grundfragen, die am Anfang der Erforschung der Fibrillengenese standen, die Frage, ob die Fibrillenbildung extra- oder intracellulär stattfindet, ob die Grundsubstanz als solche, *ohne Rücksicht auf ihren cellulären Ursprung*, zur Fibrillenbildung befähigt ist, welche Rolle die Zelle bei dem Vorgang der fibrillären Differenzierung der Grundsubstanz spielt, wurden zwar zurückgedrängt, aber durchaus nicht gelöst.

Es muß ausdrücklich betont werden, daß für die Ausbildung der Vorstellungen über die Entstehung der Mesenchymfibrille die Art des Materials, das den Untersuchungen zugrunde lag, von größter Bedeutung war. Die Wahl des Untersuchungsobjektes (Chordascheide der niederen Fische — *v. Ebner*, Gerüst des embryonalen Glaskörpergewebes — *v. Szily*, Zahnpapille von Selachiern — *Studnička*, subcutanes Bindegewebe der Selachierembryonen — *Laguesse*, entzündliche Bindegewebsneubildung bei niederen Tieren — *Zawarzin* und seine Schule, um nur einige wichtige Etappen herauszugreifen), spielte eine kaum zu verleugnende Rolle für die entsprechende Entscheidung. Wie verschieden aber auch die Untersuchungsobjekte sein mögen, die Verhältnisse im tierischen Körper bleiben immer unübersichtlich und verschwommen. Immer wieder wird sogar von den Vertretern der Theorie des Exoplasmas betont, daß die wirkliche Abgrenzung der echten Grundsubstanz vom Exoplasma, sowie die Unterscheidung zwischen dem



eigentlichen Cytoplasma von exoplasmatischen Gebilden auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten stößt (Hartmann 1910, Zawarzin 1926, Wassermann 1926 u. a.).

Die Voraussetzung für die eindeutige Klärung des Problems der Fibrillenentstehung ist das Auffinden eines Objektes, an welchem sich die fibrillenbildenden Vorgänge in vollem Umfange abspielen und an dem gleichzeitig die Beziehungen zwischen den Zellen und den „exoplasmatischen“ Bildungen leicht zu übersehen sind. *Diese Verhältnisse sind in Kulturen der mesenchymalen Gewebe gegeben, und zwar in unerreicher klarer Form.* Der Forscher findet hier die Bedingungen, die die experimentelle Entscheidung der Frage der Fibrillengenese in hohem Maße begünstigen.

Eine Kolonie der Bindegewebszellen *in vitro* weist in ihrem Aufbau ähnliche Verhältnisse auf, wie sie jedes undifferenzierte Mesenchym *in vivo* bietet. Sie stellt ein in einem halb flüssigen, halb festen Substrat ausgespanntes Zellnetz, ein in eiweißreicher kolloidaler Masse schwebendes zelliges Maschenwerk dar. Über die Art, wie die einzelnen Zellindividuen dieses Netzwerkes vereinigt sind, herrschen keine klaren Ansichten. Nach manchen Anschauungen bilden die Zellen ein syncytiales Geflecht (Carrel, A. Fischer, v. Möllendorff), nach anderen stehen sie zwar in gewissem Kontakt miteinander, bewahren aber dabei ihre Selbständigkeit: „adherent reticulum“ (Levi 1918, 1923, Lewis 1922). Die einzelnen Zellen der Kultur sind jedoch stets bis in ihre feinsten Ausläufer von der plasmatischen Umgebung abgrenzbar. Jeder Zellfortsatz, jede vom Zelleib sich ausbreitende Membran ist in ungefärbtem wie in gefärbtem Zustande klar und gut erkennbar. Von gleicher Wichtigkeit ist auch der Umstand, daß das scharf von der Zelle abgrenzbare Milieu in seinen Eigenschaften und seiner Natur genau bekannt ist und in breiten Grenzen experimentell verändert werden kann. Hier ist in klaren, experimentell völlig übersichtlichen Bedingungen die Zelle als solche dem die Zellücken ausfüllenden Substrat gegenübergestellt.

Nach den grundlegenden Untersuchungen von Maximow (1928 bis 1929) kann es als gesichert gelten, daß die Gewebekulturen nicht nur zur Fibrillenbildung fähig sind, sondern auch in hohem Maße eine fibrillenbildende Tätigkeit ausüben. Wenn auch das Geschehen in der „Kultur“ sich nicht unmittelbar mit der Histogenese innerhalb des Körpers vergleichen läßt (Wassermann 1927), so ist doch der Forscher von heute verpflichtet, die im *in vitro*-Versuch in beinahe schematischer Übersichtlichkeit ablaufenden Prozesse entsprechend zu berücksichtigen. Denn wenn auch die äußeren Formen der sich *in vitro* abspielenden Vorgänge von denen *in vivo* grundverschieden sein können, so sind doch die Prinzipien, die die Fibrillenbildung beherrschen, immer die gleichen.

Das Ziel unserer Untersuchung ist demnach die möglichst eingehende Erkenntnis der Genese der Bindegewebsfibrillen in der Kultur, und zwar sowohl ihrer äußeren Formen als auch des ihr zugrunde liegenden Mechanismus überhaupt. Für die Gestaltung der Arbeit waren folgende Hauptpunkte leitend:

1. Wie sind die strukturellen Eigenschaften des Milieus, in welchem die fibrillenbildenden Vorgänge sich abspielen, und was für Strukturierungspotenzen liegen in ihm?

2. In welcher Form bilden sich die fibrillären Strukturen *in vitro* und was für Beziehungen bestehen zwischen den Faserstrukturen und Zellen?

3. Welches sind die Wechselbeziehungen zwischen den Zellen und dem umgebenden Medium und welches ihre Bedeutung vom Standpunkt der Fibrillengenese?

Die zahlreichen Teilfragen lassen sich alle in das gegebene Schema einordnen.

### Die Struktur des Plasmamediums der Gewebekultur.

Es ist üblich, in der Gewebezüchtung vom Plasmakoagulum als von einem feinstrukturierten dreidimensionalen, aus Fibrinfäden bestehenden Netzwerk zu sprechen und diese Fibrinfäden als Stützgerüst für die *in vitro* wachsenden Zellen zu betrachten (*Carrel, A. Fischer*). Obwohl die Mehrzahl der Forscher im Anschluß an die klassische Vorstellung die netzige oder fibrilläre Plasmastruktur als gegeben annimmt (*Maximow* 1928, *Huzella* 1929, *Ludwig* 1930, usw.), fehlt es uns fast gänzlich an systematischen Untersuchungen über den Aufbau des Kulturmediums, die diese Anschauung rechtfertigen könnten. Die Arbeiten *Baitsells* (1917), des einzigen Autors, der sich mit diesem Problem eingehend auseinandersetzte, scheinen allein die Auffassung über den fibrillären Bau des Kulturmilieus experimentell begründen zu können.

Nach den Untersuchungen von *Baitsell* weist das von ihm zur Züchtung verwandte Froschplasma im Dunkelfeld ein Netzwerk von Fibrinfädchen oder eine aus feinsten Fibrinnädelchen bestehende Struktur auf. Bei Färbung nach *Mallory* nach vorangehender Fixierung mit *Zenkerscher* Flüssigkeit lassen sich diese feinsten Netzstrukturen leicht darstellen. Diese Fibrinnetze erfahren bei mechanischer Inanspruchnahme (Aufhängen des Koagulums in einer feuchten Kammer und Beschweren mit Bleigewichten) wesentliche Veränderungen, indem sich die einzelnen Fädchen zu dickeren welligen Bündeln zusammenlagern. Obgleich *Baitsell* aus der Tatsache der Umwandlung des Fibrinnetzes zu faserigen Strukturen weitgehende und zu den allgemein herrschenden Vorstellungen in scharfem Widerspruch stehende Schlüsse zog, fand seine Arbeit keine besondere Beachtung. Seine Versuche wurden weder nachgeprüft noch fortgesetzt.

In allerletzter Zeit werden sogar Stimmen laut, die die Vorstellung von einem faserigen Bau des Gewebekulturmediums überhaupt ablehnen. So betont *Bofill-Deulofeu* (1932) in einer vor kurzem erschienenen Arbeit ausdrücklich, daß das plasmatische Milieu seiner Kulturen gänzlich strukturlos sei. Es gelang ihm weder mit dem *Weigertschen* Verfahren, noch durch Versilberung nach der Methode von *del Rio Hortega* in zellfreiem Plasmakoagulum irgendwelche faserige oder netzige Strukturen zur Darstellung zu bringen. Er glaubt daraus schließen zu dürfen, daß die Behauptung des Bestehens eines Fibrinnetzes im Plasmakoagulum „lediglich auf irrtümlicher Annahme beruht“.

Da dem Medium der Gewebekulturen das geronnene Blutplasma als ständiger und wichtigster Bestandteil zugrunde liegt und es allein die Struktur des Kulturgerinnsels bedingt, erscheinen uns diese Erörterungen überholt; es wurde nämlich übersehen, daß das Problem der Struktur des Plasmakoagulums in Untersuchungen auf dem Gebiete der Blutgerinnungslehre eine eingehende Ausarbeitung bereits gefunden hat.

*A. Mayer* (1907) konnte erstmalig bei Dunkelfeldbeleuchtung als erste Anzeichen der Gerinnung das Auftreten kleiner sich zu Reihen agglutinierender Fibrinkörnchen beschreiben. *Stübel* (1914), dem wir besonders eingehende Studien des mikroskopischen Bildes des Gerinnungsvorganges verdanken, sah bei eintretender Gerinnung das Fibrin in deutlicher Nadelform sich ausscheiden. Die Nadeln haben die Eigenschaft, sich miteinander zu mehr oder weniger weitmaschigen Netzen zu verflechten. Auf Grund dieser Beobachtungen kam *Stübel* zu der Überzeugung, daß es sich bei der Bildung des Fibrins um einen Krystallisationsprozeß handelt, eine Anschauung, die bereits lange vorher von *Virchow* (1856) und von *Ranvier* (1875) ausgesprochen und von *Schimmelbusch* (1885) auf Grund seiner mikroskopischen Studien des Blutgerinnungsprozesses vertreten wurde. Die Beobachtungen von *Stübel* fanden eine weitgehende Ausarbeitung und Bestätigung (*Howell* 1914, *Barrat* 1920). *Mangold* (1924) und seine Schüler *Kitamura* (1924), *Masuda* (1925) und *Watanabe* (1925) beschrieben charakteristische Abweichungen in der Struktur des Plasmagerinnsels bei verschiedenen Tierspezies und unter pathologischen Bedingungen.

Alle Untersucher stimmen miteinander darin überein, daß das Auftreten von feinsten Fibrin-„Krystallen“ als die erste Stufe des Vorgangs der Plasmagerinnung zu betrachten ist, und daß diese beim weiteren Verlauf der Gerinnung sich zu Fädchen und später zu Fibrinnetzen zusammenschließen.

Dieses klassische Schema der Koagulumbildung ist aber nicht in allen Fällen anwendbar. *Hekma* (1914—1916, 1932) konnte in einer Reihe von Arbeiten zeigen, daß die Fibrin-Gelbildung nicht nur in Form eines groben oder zarten Netzwerkes ablaufen kann, sondern daß das Fibrin auch oft als eine echte vollkommen *strukturlose Gallerte* ausfällt.

„Das Fibrin kann in verschiedenen Gelformen auftreten, und zwar wären ein gallertiges, ein elastisches und ein festes starres Gel zu unterscheiden.“ Das erstere ist strukturlos und optisch leer. Das Fibringel kann leicht von einem Zustand in den anderen überführt werden. So

kann unter verschiedenen Einwirkungen ein gallertiges Gel in ein pektöses umgewandelt werden, wobei die gelbildende Micelle weitgehend entquellen muß. Die entquollenen „Micellarkristalle“ ordnen sich in der Längsrichtung und treten dann als ultramikroskopische oder mikroskopische Elemente auf. In strukturloser Gallerte erscheinen Körnchen, Flocken, Membranen, Fädchen und Bündel. Dieser Umwandlungsprozeß kann auf verschiedenen Entwicklungsstufen stehenbleiben. *Barrat* (1920) berichtet andererseits, daß das in Fädchenform ausgeschiedene Fibrin gel bei steigendem Alkaligehalt der Lösung allmählich wiederum unsichtbar wird, bis sich das ganze Fibrin in eine strukturlose Masse umgewandelt hat. Über ähnliche strukturlose Fibringerinnsel berichtet *Howell* (1921).

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß die Fibrinengele in verschiedenartigster Form (strukturlose Gallerte, fädige Netze, feste Membranen) ausflocken können, und daß es sich dabei nur um *verschiedene ineinander übergehende Zustände ein und derselben Substanz handelt*. In strukturlosen Koagula können fädige Strukturen erscheinen, ebenso vermögen aber die fädig strukturierten Blutgerinnsel sich in eine strukturlose Gallerte wieder umzuwandeln. Die Struktur des Plasmagerinnsels kann also nicht als beständig, sondern nur als *wandelbar* betrachtet werden.

Dem unter normalen Bedingungen gebildeten Plasmakoagulum liegt eine netzfaserige Struktur zugrunde. Diese Fasernetze können ohne jede besondere Bearbeitung mittels Ultramikroskop beobachtet werden. Sie lassen sich mit *Weigertscher* Fibrinfärbung darstellen.

Das Medium, das bei den meisten gewebzüchterischen Arbeiten benutzt wird — das Plasma vom Huhn — nimmt in bezug auf seine Strukturierung eine etwas abweichende Stellung ein. So beschreibt *Stübel* (1920), daß auch in ihm (bei der durch Hinzufügen von Gewebs-extrakt hervorgerufenen Gerinnung) zwar das Fibrin in Form von zahlreichen winzigen Nadelchen, die gleichmäßig das ganze Gesichtsfeld erfüllen, auftritt; aber im Gegensatz zu anderen Plasmen ist das im Vogelplasma entstandene Fibrinnetz so schwach lichtbrechend und so fein, daß es sogar im Dunkelfeld nur äußerst schwer wahrgenommen werden kann.

Die Ursachen, warum das Vogelplasma ein abweichendes Verhalten zeigt, sind ungeklärt geblieben. Wir möchten annehmen, daß der feine Bau des Gerüsts des Hühnerplasmakoagulum mit seiner völligen Unfähigkeit zur Retraktion (*Vinci* und *Christoni* 1909, *Fuchs* 1931) zusammenhängt. *Die Morphologie des Blutgerinnsels wird anscheinend durch den Grad der Synärese, zu dem die einzelnen Fibrinfäden fähig sind, entscheidend bestimmt*. Da die Blutplättchen die ausgesprochene Eigenschaft haben, die Synärese des Fibrins zu begünstigen, oder gar zu ermöglichen, indem sie auf fermentativem Wege dem Fibrin die Kontraktionsfähigkeit verleihen (*Fonio* 1928) oder indem sie nur den homogenen Aufbau des Fibrinnetzes rein mechanisch aufheben (*Fuchs* 1931), muß das

vollkommen thrombocytenfreie Vogelplasma andere morphologische Beschaffenheit aufweisen als die Plasmen, bei denen infolge ihres Thrombocytengehaltes die Fibrinkontraktion sich mehr oder weniger lebhaft auswirkt.

Die Fibrinausscheidung bei der Gerinnung von Plasma *kann also in verschiedener Form erfolgen, je nach den physikalisch-chemischen Bedingungen, unter denen sie abläuft und je nach der Art des Plasmas selbst. Es ist aber durchaus zu erwarten, daß eine Ausscheidung von groben Fibrinstrukturen, wie sie in strukturlosen Fibringelen vorkommt, unter*

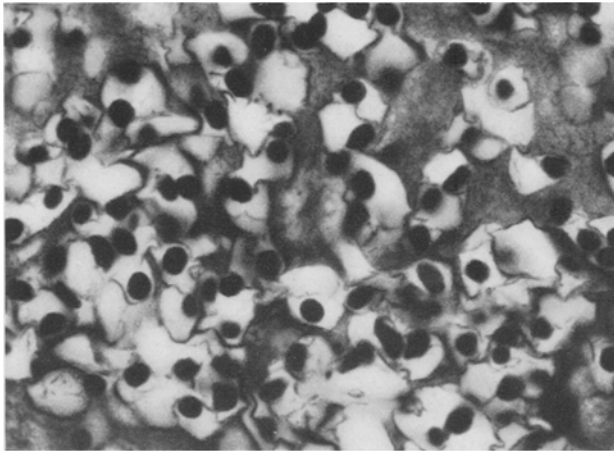


Abb. 1. Blutkuchen. Azan. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

*entsprechenden Bedingungen auch in metastrukturierten Plasmen (z. B. Hühnerplasma) auftreten kann.*

Unbedingte Voraussetzung für unsere Untersuchungen war die genaue Kenntnis des Substrats, in dem sich die fibrillenbildenden Vorgänge abspielen, des plasmatischen Milieus, in dem die Zellkulturen sich entwickeln. Wir haben deshalb versucht, systematisch zu verfolgen, wie das Plasmagerinnsel der Kulturen sich unter verschiedenen Bedingungen morphologisch verhält.

Wir benutzten dazu Paraffinschnitte von formol- und zenkerfixiertem Material; sie wurden nach der Methode von *Foot* und nach *Maresch-Bielschowsky* versilbert, nach dem *Heidenhainschen* „Azan“-Verfahren sowie nach der Fibrinfärbungsmethode von *Weigert* gefärbt.

Zum Unterschied vom gewöhnlichen Blutkuchen mit seinem breiten und starren Fibrinmaschenwerk, das aus wirr angeordneten Septen und den in ihm eingeschlossenen Blutzellen besteht (Abb. 1), bietet das vollkommen durchsichtige gallertige, sich nicht zusammenziehende Hühnerplasmagerinnsel auch mikroskopisch ein vollkommen homogenes

Aussehen. Bei Betrachtung von versilberten und mit Azan gefärbten, wie auch nach der *Weigertschen* Fibrinfärbung verarbeiteten Schnitten bestätigt sich immer wieder die völlige Unmöglichkeit, mit den angewandten Methoden irgendwelche Strukturen darzustellen. Das Silber schlägt sich in Form feinsten Körnchen nieder, die manchmal vollkommen gleichmäßig verteilt sind, manchmal aber sich stellenweise verdichten und dadurch dem Schnitt eine eigenartige Maserung verleihen; es gelingt aber in keinem Falle, diese auftretenden Silberniederschläge auf eine präformierte Struktur zurückzuführen. Es braucht kaum erwähnt zu werden, daß sich am Rande von Spalten und Rissen, wie sie in jedem Schnitt vorkommen, die Silberkörnchen etwas dichter niederschlagen können. Nach Azanfärbung ist der Schnitt ganz homogen, rotbläulich. Die Präparate, die nach *Weigert* bearbeitet wurden, lassen keine Fibrinnetze erkennen.

Das Gemisch von Plasma und dem zweiten Hauptbestandteile des Kulturmediums — dem Embryonalextrakt — zeigt unter den gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls keine Struktur.

Wir haben versucht zu klären, ob bei längerem Stehen bzw. Bebrüten bei Körpertemperatur im mikroskopisch-homogenem Plasmaextraktgemisch das Erscheinen von neu entstandenen Strukturen zu beobachten ist, ob unter der Wirkung von Bebrütung gewisse „Reifungs“-Vorgänge im Plasmagerinnsel auftreten können.

Zu diesem Zweck haben wir Plasma in 1 cm hohe Röhren gebracht, die mit Kork verschlossen und paraffiniert wurden. Das Plasma wurde durch Zusatz von Embryonalextrakt zur Koagulation gebracht. Der Röhreninhalt wurde nach verschieden langer Bebrütungszeit bearbeitet. Diese Versuche wurden selbstverständlich unter strengsten Sterilitätsmaßnahmen durchgeführt.

Das Plasma behält eine Zeitlang seinen homogenen Bau. Nach 3—4 Tagen treten aber Veränderungen auf, die das erste Glied einer Reihe von weitgehenden Strukturierungsvorgängen bilden. Bei mikroskopischer Betrachtung eines etwa 4 Tage lang bebrüteten Plasmagerinnsels sehen wir in dem ursprünglich homogenem Plasma ein äußerst feines, kleinmaschiges, gleichmäßig dichtes Fibrinfasernetz auftreten. Die Maschen des Netzes sind von annähernd gleicher Größe.

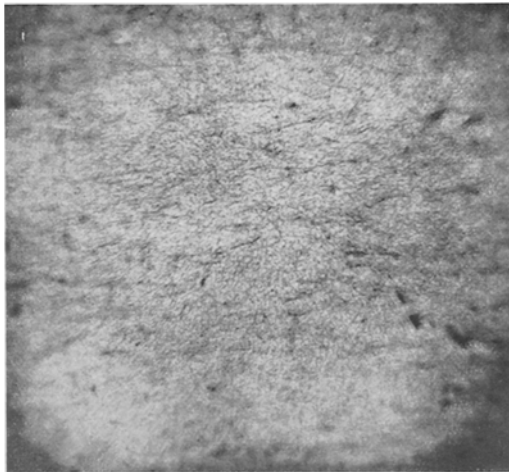


Abb. 2. 4 Tage lang bebrütetes Plasma. Azan.  
Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Dort, wo sich die Fäden kreuzen, verdichten sie sich zu feinsten Knötchen. Am besten lassen sich diese Netze in Azanpräparaten beobachten, in denen sie oft einen hellen blauroten Farbton annehmen (Abb. 2). Diese Plasmastrukturierung entspricht genau derjenigen, die *Baitsell* (1917) am Froschplasma gesehen und in seiner Arbeit (S. 122) abgebildet hat. Die Plasmastrukturen lassen sich mit den Versilberungsmethoden kaum darstellen; die *Weigertsche* Fibrinfärbung fällt leicht positiv aus.

Bei lange dauernder Bebrütung verdichten sich oft die fädigen Netze, auch die Fädchen selbst nehmen an Dicke zu. Das weitere Schicksal der Plasmastrukturen kann in zweierlei Richtungen verlaufen: Oft sieht man die aufgetretenen Strukturen sich allmählich lockern, die Fäden zerbröckeln und das ganze Netzgebilde sich in eine körnige Masse umwandeln; tritt aber diese Auflösung nicht ein, so schreitet die Ausbildung von Fibrinstrukturen weiter fort, und als Endergebnis findet man dann die ursprünglich feinen Netze in ein Filzwerk von Fäden umgewandelt. Diese heben sich scharf von ihrer Umgebung ab, verlaufen in verschiedensten Richtungen, sind manchmal dichter zusammengeballt, manchmal lockerer verteilt. Die Bildung von Fibrinstrukturen scheint von gewissen Zentren auszugehen, in deren Bereich sich die Fäden zusammenschließen.

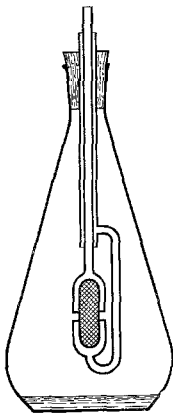


Abb. 3.  
Ausziehbarer Glas-  
rahmen zum An-  
spannen des  
Plasmahäutchens.

*Im Laufe der Zeit kann also das ursprünglich kaum wahrnehmbare Fibringerüst des Plasmas in Gegenwart von Embryonalextrakt sich in Fibrinfasernetze umwandeln*<sup>1</sup>.

Im Hinblick auf die *Baitsellschen* Versuche war es durchaus naheliegend, zu prüfen, ob bei mechanischer Inanspruchnahme eine weitere Umgestaltung des Fibrinfasernetzes des Hühnerplasmagerinnsels erreicht werden kann. Diese Versuche haben wir an gespannten Plasmahäutchen ausgeführt.

Um eine Spannung der Plasmahäutchen zu erzielen, benutzten wir entweder starre oder ausziehbare Glasrahmen; die letzteren wurden aus zwei Teilen zusammengestellt, wie es aus Abb. 3 hervorgeht. Der Rahmen wurde in ausgezogenem Zustande durch einen am Stiel des beweglichen Armes angebrachten Paraffintropfen befestigt. Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: In flachgehaltenen Rahmen wurde durch Eintauchen in Plasma bzw. Plasmaextraktgemisch ein Häutchen eingespannt und nach Gerinnung durch nachträglichen Plasmazusatz verdickt. Die Spannung wurde am nächsten Tage durch Ausziehen des Rahmens verstärkt. Die so beschickten Rahmen wurden in Kolben gebracht, die, um das Eintrocknen zu vermeiden, geringe Mengen von Wasser enthielten.

<sup>1</sup> Es ist höchst auffallend, wie sich verschiedene Plasmaproben andersartig verhalten; oft lassen sich in größeren Versuchsreihen überhaupt keine Strukturierungen beobachten.

Die Kolben wurden sorgfältig paraffiniert und verschieden lange im Brutschrank aufbewahrt.

Als erste Wirkung der Spannung beobachtet man, daß die gleichmäßig ausgebreiteten und ein wirres, engmaschiges Netz bildenden

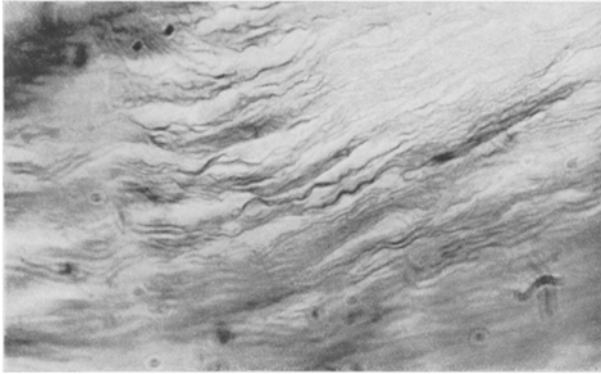


Abb. 4. Gespanntes Plasmahäutchen. Azan. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Fädchen sich stellenweise in parallel verlaufende Strukturen umwandeln. Die Fädchen verdichten sich hier und da (Abb. 4) und schließen sich zu Bündeln zusammen. Diese zu Faserbündeln zusammengeführten fibrillären

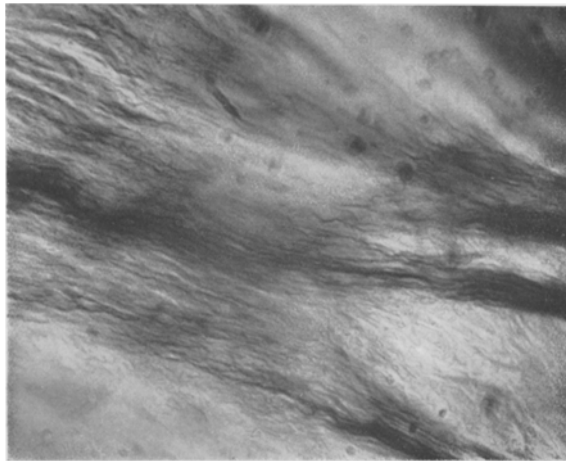


Abb. 5. Gespanntes Plasmahäutchen. Azan. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Gebilde bleiben eine gewisse Strecke beisammen, um sich dann pinselförmig in Einzelfäden aufzulösen (Abb. 5). Es ist von der Bebrütungszeit sowie von der Stärke der angewandten Zugwirkung abhängig, ob es dabei nur zur Ausbildung einzelner Bündel kommt, oder ob sich ein dickes Fasergerüstwerk bildet (Abb. 6).



Während in starren Glasrahmen der Spannungszustand des Plasmahäutchens zur Entwicklung von verstärkten Faserstrukturen beiträgt, ohne jedoch die Fasern gleichsinnig zu richten, ordnen sich in ausgespannten Rahmen die Fibrinbündel in der Richtung des stärksten Zuges an. Diese Neuorientierung trägt ihrerseits zur Weiterdifferenzierung der einzelnen Fibrille bei. Die Fibrillen lösen sich teilweise von ihrer Umgebung, die Faserbündel nehmen einen leicht welligen Verlauf, endlich liegen oft die einzelnen Bündelchen als ausgebildete, korkzieherartige, starre Gebilde zwischen nicht soweit entwickelten Strukturen.

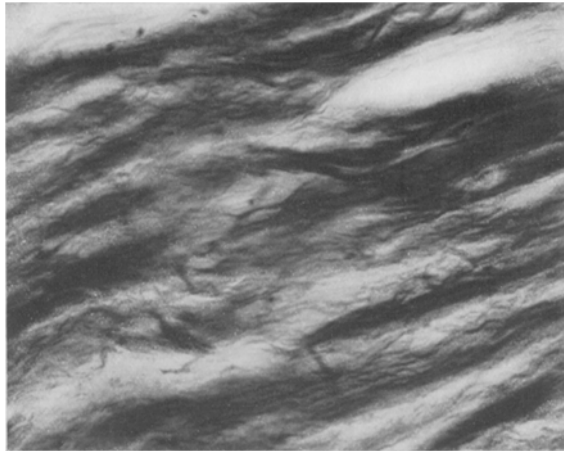


Abb. 6. Gespanntes Hühnerplasmahäutchen. Azan. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Der fibrilläre Aufbau des Plasmagerinnsels läßt sich am besten in Azanpräparaten verfolgen. Die Fibrillen treten in einem leicht bläulichrot gefärbten Grund als stahlblaue Gebilde hervor. In Silberpräparaten erscheinen die Fasern goldbräunlich. Niemals sind sie schwarz (Abb. 7).

Jede noch so geringe Spannungsänderung innerhalb des Plasmagerinnsels ruft entsprechende Verschiebungen im Gleichgewicht der Fasernetze hervor. Das gelegentliche Auftreten von gerichteten Strukturen, die ab und zu auch in ungespanntem Gerinnsel beobachtet werden können, sind mit größter Wahrscheinlichkeit auf die örtlich auftretenden Spannungsdifferenzen zurückzuführen.

In diesem Zusammenhang verdient die Tatsache Erwähnung, daß im Bereich der Randzone oder in den Schichten, die an eingeschlossene Luftblasen grenzen, ebenfalls deutliche Verdichtungen der Plasmastrukturen mit verstärkter Affinität zum Anilinblau ziemlich regelmäßig auftreten. Diese örtlichen Verdichtungen sind aber nie deutlich gefasert, sondern stellen eine lokale, gleichmäßige Kondensierung des Gesamtgerüsts dar.

*Es kann also aus dem ursprünglich mikroskopisch fast homogene Hühnerplasmakoagulum ein Faserwerk entstehen, das bei mechanischer Inanspruchnahme die höchste Entwicklung zu welligen Faserbündeln erlangt.*

Diesem Vorgang der morphologischen Plasmaumwandlung liegen zweifellos tiefere, chemisch-physikalische Änderungen des Substrates zugrunde. Vieles spricht dafür, daß das Fibrin des Gerinnsels dabei in einen neuen chemisch-physikalischen Zustand übergeht.

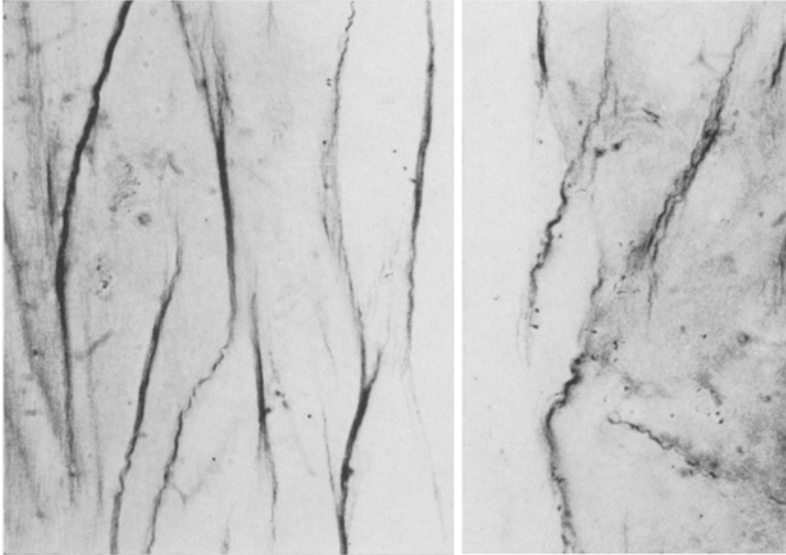


Abb. 7. Gespanntes Plasmahäutchen. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Der Erforschung der stofflichen Grundlage dieses Umbildungsvorganges stellen sich große Schwierigkeiten entgegen. Die Fibrinnatur der ursprünglich im Plasmakoagulum auftretenden Fasernetze ist unbestreitbar. Die Eigenschaften der sich später entwickelnden Strukturen weichen aber von denen des Fibrins ab. Die Art ihres Gesamtaufbaus, ihr welliger Verlauf erinnern sogar an die Struktur der kollagenen Fasern. Diese Ähnlichkeit kommt auch in ihrem Verhalten zu Farbstoffen (Färbung nach *van Gieson* und mit Azan) zum Ausdruck, denn bei fortschreitender Strukturierung steigt ihre Affinität zu Fuchsin S und Anilinblau. Demgegenüber sind aber andere chemische Reaktionen der durch Spannung erzeugten fibrillären Gebilde von denjenigen des Kollagens verschieden; die Plasmafibrillen sind z. B., auch wenn sie vollentwickelt sind, durch Trypsin gut verdaulich.

Wir weisen hier nur kurz auf diesen Umstand hin und behalten uns eine Besprechung der stofflichen Grundlage des sich im Plasmagerinnsel abspielenden Umwandlungsprozesses in anderem Zusammenhang vor.

### Histogenese und Morphologie der Mesenchymfibrille und der kollagenen Faser in Gewebekulturen.

Die erste Beobachtung über das Auftreten von Mesenchymfibrillen in Gewebekulturen stammt von *Baitsell* (1917). Er sah in Kulturen von Froschgewebe in homogenem Plasma Faserbündel auftreten, die sich nach *Mallory* intensiv blau färbten. Er hielt sie für kollagene Fasern, die durch Umformung des Fibrins entstanden waren.

In einer fast gleichzeitig erschienenen Arbeit konnte *M. Lewis* (1917) die Möglichkeit der Bildung kollagener Fasern *in vitro* bestätigen. Da die Verfasserin die Entstehung der Fasern in fibrinfreier *Locke-Lewisscher* Lösung beobachtete, konnte sie sich der Ansicht *Baitsells* über ihre Entstehung nicht anschließen.

Die Ergebnisse der *Baitsellschen* und *Lewis'schen* Versuche wurden in nachfolgender Zeit oft bestritten. Die Autoren (*Maximow*, *Nageotte*) stellten mehrfach die kollagene Natur der von *Baitsell* und von *Lewis* beschriebenen Fasern in Frage.

Die erste sichere Darstellung des argyrophilen Gerüsts und von kollagenen Fasern in der Gewebekultur verdanken wir *Maximow* (1928—1929). Er machte seine Studien an Kulturen von Kaninchenthymus sowie Meerschweinchenleukozyten. Die sich entwickelnden Fasersysteme wurden von ihm beschrieben und ihre wahre Natur außer Zweifel gestellt. Die Stärke des Fasergerüsts nimmt mit dem Alter der Kultur (bis zu 60 Tagen) dauernd zu. Die Fasern entstehen immer extracellulär in der näheren Umgebung der Zellen. Das Fibrin nimmt an ihrer Bildung nicht teil. Die Fasern entstehen auch nicht durch Umformen der Grundsubstanz. Sie müssen als „Produkte eines Niederschlages oder einer Krystallisation einiger löslicher Substanzen im Medium“ betrachtet werden.

Die nachfolgenden Arbeiten enthalten hauptsächlich die Nachprüfungen und die Bestätigungen der *Maximowschen* Befunde oder sind der Ausarbeitung von Teilfragen gewidmet.

So beschreibt *Huzella* (1929) ein sich in Gewebekulturen bildendes Gitterfasergerüst, das außerhalb der Zellen als Folge eines eigenartigen Sekretionsvorganges gebildet wird, und entwickelt anschließend seine Anschauung über die physiologische Bedeutung dieses Gerüsts (1930—1931).

*Ludwig* (1929) beobachtete in Kulturen das Auftreten von „Primitivfibrillen“ (Tonofibrillen) und verlegt ihren Ursprung in das Ektoplasma der Zelle.

*Olivo* (1930) gelang es, nachzuweisen, daß sogar die Kulturen des 18 Jahre alten *Carrel'schen* Fibroblastenstammes zahlreiche Fibrillen bilden können.

*Bojill-Deulofeu* (1932) untersucht die Beziehungen zwischen Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur und ihrer Fähigkeit, argyrophile Strukturen zu bilden. Diese Beziehungen lassen sich aber schwer erfassen. Jedenfalls sind auch die kräftigsten argyrophilen Netze in der Wachstumszone der *intensiv* proliferierenden Hühnerherz-Fibroblastenkolonien zu sehen.

*Momigliano-Levi* (1930—1932) verfolgt den Prozeß der Faserbildung an Serulkulturen von Hühnerembryonen im Dunkelfeld. Die Plasmakulturen zeigen bei Versilberung nach der Methode von *Achucarro-del Rio Hortega* die fibrillären Gitter schon nach 24 Stunden. Die Bindegewebsfasern bilden sich ausschließlich außerhalb der Zellen, wobei diese sich anscheinend durch Erzeugung von „gewissen Substanzen“ an der Faserbildung beteiligen. Die argyrophilen Gitterfasern werden als früheste Erscheinungsform des Kollagens gedeutet.

Zu unseren Untersuchungen verwandten wir Kulturen verschiedener Organe und Gewebe von 8—16 Tage alten Hühnerembryonen. Die Kulturen wurden entweder frisch angesetzt oder stammten aus

verschieden alten Zellstämmen. Die Züchtung geschah in homologem Plasma auf Deckgläsern oder in Flaschen nach der klassischen Methode von *Carrel*. Neben den einfachen *Carrel*-Flaschen wurden solche mit abnehmbarem Boden benutzt. Die Mengen des zugesetzten Embryonal-extraktes wurden in weiten Grenzen variiert. Große Versuchsreihen

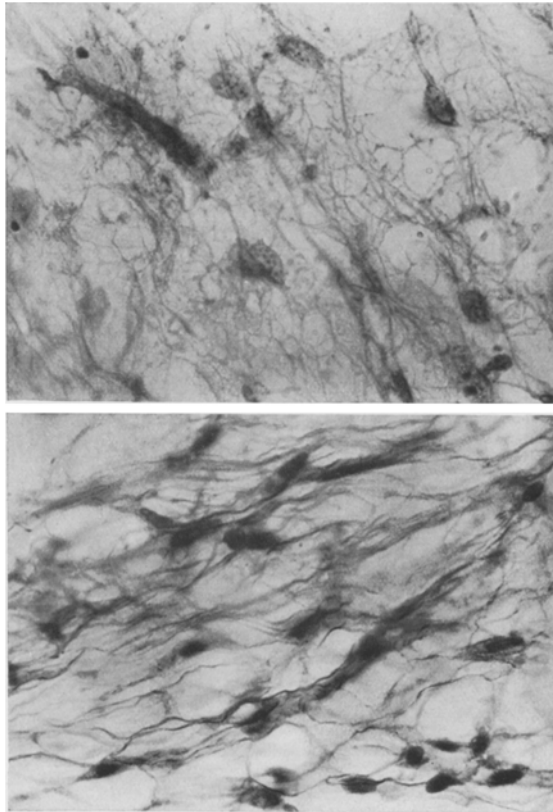


Abb. 8. 6 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach *Foot*. Immer.  $\times \frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

wurden nach der Methode von *Fischer* und *Parker* (1929) angelegt, wobei der Embryonalextrakt durch regelmäßiges Füttern mit Heparinplasma und dazwischen folgende Tyrodewaschungen ersetzt wird („gehemmte Kulturen“). Andere Versuchsreihen wurden in besonderen Explantationsgefäßen angelegt (*Doljanski* 1933), wobei das Gewebestück von einem Plasmamantel umgeben und diese „Plasmakugel“ in verschiedene regelmäßig gewechselte Nährflüssigkeiten (Embryonal-extrakt, Hühnerserum, Heparinplasma) getaucht wird. Alle Kulturen wurden bei 39° bebrütet.

Die meisten unserer Befunde sind an Serienschnitten erhoben worden. Das Material wurde in Zenkergemisch oder Formalin fixiert. Die

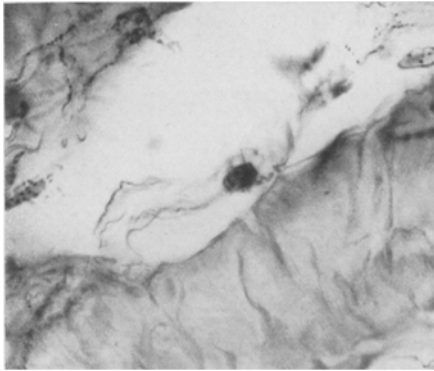


Abb. 9. 2 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Fixierung, das Waschen und das Härten geschah in den Flaschen selbst, wobei es beim Gebrauch der Flaschen mit abnehmbarem Boden gelingt, das erstarrte Gerinnsel mit der Kultur mühelos in Form eines vollkommen planen Plättchens vom Flaschenboden zu trennen. Die ausgeschnittene Kultur wird nach Einbetten in Paraffin in Schnitte von  $5\ \mu$  Dicke zerlegt. Als Färbeverfahren wurde Versilberung mit Kerngegenfärbung nach der Methode von *Maresch-Bielschowsky* oder *Foot* und

*Heidenhainsche Azanfärbung* angewandt. Für spezielle Zwecke dienten uns die *Weigertsche Fibrinfärbung*, verschiedene Verdauungsmethoden,

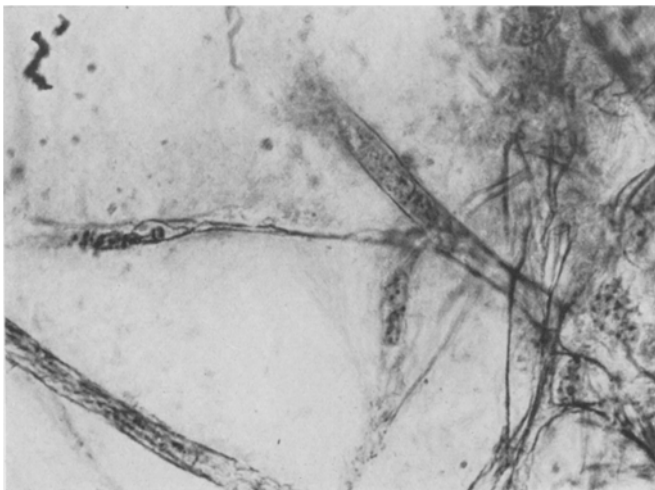


Abb. 10. 1 Tag alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme. sowie Chondriomdarstellung (Eisen-Hämatoxylin) mit vorangehender Fixierung in Osmiumsäuregemischen.

*a) Mesenchym-(„Silber“-)Fibrille.*

Die Erscheinungsform der versilberten Mesenchymfibrille ist außerordentlich mannigfaltig. In Kulturen von mittlerem Alter finden sich

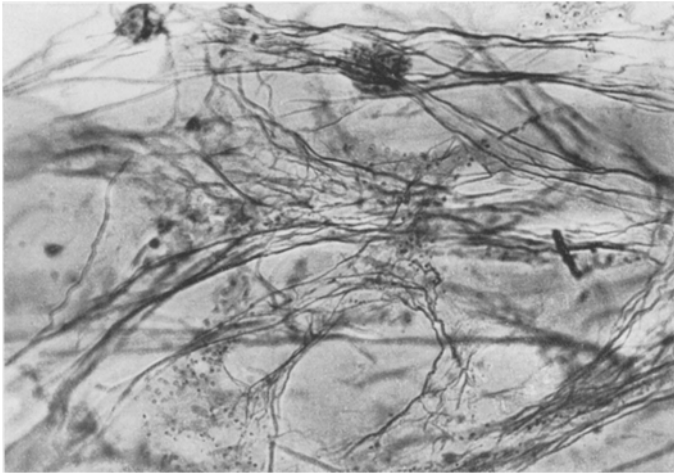


Abb. 11. 7 Tage alte Leberendothelkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

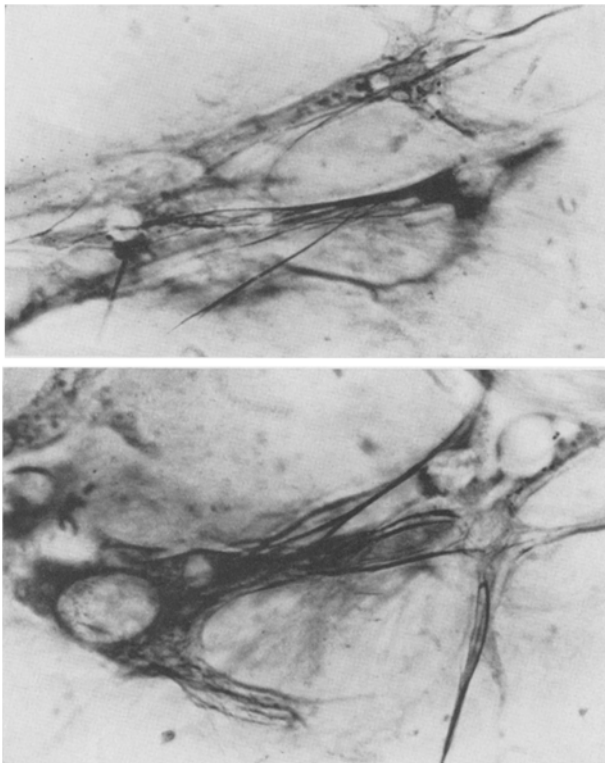


Abb. 12. 3 Tage alte Leberendothelkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

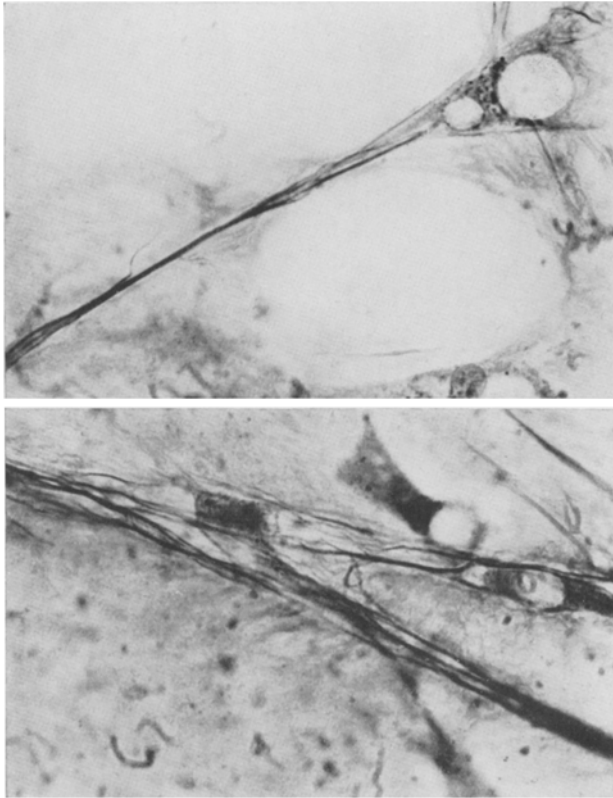


Abb. 13. 3 Tage alte Leberendothelkultur. Versilberung nach *Foot*. Immer,  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

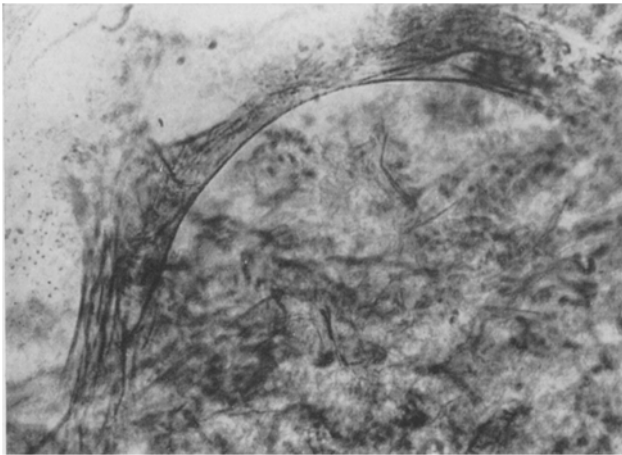


Abb. 14. 2 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach *Foot*. Immer,  $\frac{2}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

feinste, nicht zusammenhängende, dünnste Fädchen, ziemlich lose verstreute gröbere Fibrillen, dann wieder ausgedehnteste, aus feinsten Fäserchen bestehende Netze, sowie schließlich kräftige Faserbündel, die sich ihrerseits wieder zu Netzen oder Zügen von radiär oder zirkulär verlaufenden größeren Bündeln anordnen.

Die dünnsten Fasern, die oft noch kaum zu versilbern sind, stellen die ursprünglichste Erscheinungsform der Silberfibrille dar. Sie sind äußerst zart, meist von vollkommen gleichmäßiger Beschaffenheit und heben sich schon im frühesten Stadium (nach 24 Stunden), wenn auch schwach, so doch schon deutlich wahrnehmbar, von ihrer Umgebung ab. In ihren weiteren Entwicklungsstufen sind sie in den Silberpräparaten mit äußerster Deutlichkeit zu verfolgen (Abb. 8). Ihre Größe wechselt in weiten Grenzen. Diese Silberfäserchen können oft auch kommaförmig oder keulenartig erscheinen, oder sie lassen sich als lange, durch zwei Immersions-Gesichtsfelder hindurchziehende Fäden verfolgen. Ihre Enden sind stets zugespitzt. In ihrem Verlauf zeigen die Fäserchen oft Knickungen und scharfe, charakteristische Krümmungen.

Die Silberfibrille tritt meist in unmittelbarer Nähe einer Zelle in Erscheinung (Abb. 9 und 10). Niemals haben wir in unseren Präparaten intracelluläres Auftreten und intracelluläre Lagerung der Fibrillen beobachten können. Ebenso sind die freien Zellausläufer, die sich oft durch das Silber in leicht grauer Tönung darstellen lassen, mit äußerster Deutlichkeit von Fibrillen zu unterscheiden. Der scharf umgrenzte Zelleib ist in Silberpräparaten bis zur äußersten Cytoplasmaschicht immer faserfrei.

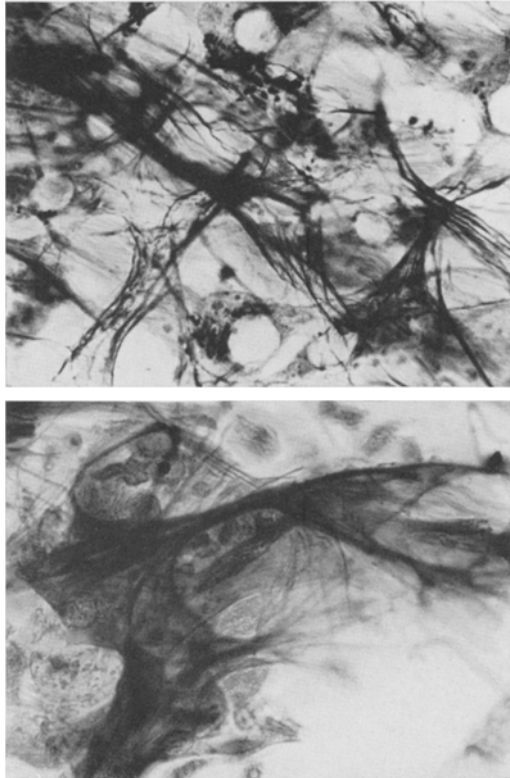


Abb. 15. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.



Dort, wo der Vorgang der Fibrillenbildung stark ausgeprägt ist, erscheint jede Zelle von zahllosen Fäserchen dicht umspinnen (Abb. 11). Wenn die Zahl der Fibrillen nicht allzu groß ist und infolgedessen die Verhältnisse klar zu überblicken sind, kann man sich leicht überzeugen, daß Form und Verlauf der Fibrille weitgehend von der Zellgestalt bestimmt wird (Abb. 12). Der erste Eindruck, den man bei der Betrachtung von solchen Präparaten gewinnt, ist der, daß die Zellen von den Fibrillen begleitet werden, und daß die Anordnung und Gestalt der Zellen für die Orientierung der Fäserchen gewissermaßen verantwortlich gemacht

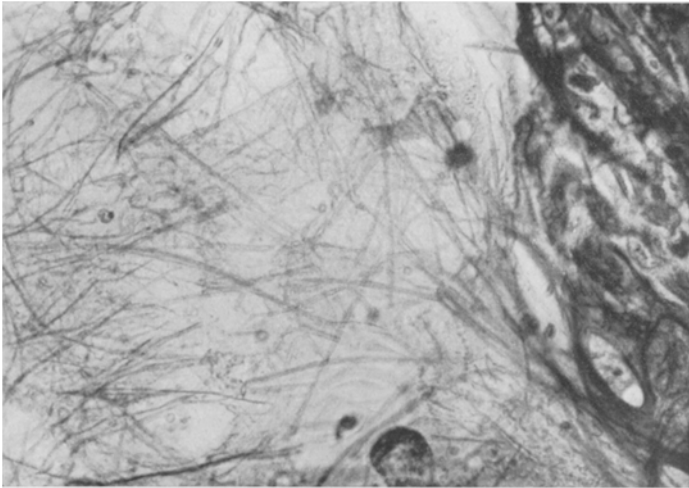


Abb. 16. 2 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

werden kann. Die Fibrillen schmiegen sich den kleineren und größeren Zellfortsätzen, die in das freie Plasma hineinstrahlen, eng an, indem sie die Begrenzungslinien dieser Fortsätze streng nachahmen (Abb. 13). Wenn die Fasern in größerer Zahl auftreten, erscheint der Zellfortsatz wie von einer Fibrillenhülle umgeben. Die Umrisse der Zellkörper selbst werden durch einzelne oder durch Gruppen von Silberfibrillen begrenzt (Abb. 14). Dieses Gebundensein an Zellgrenzen wirkt sich bei fortschreitender Fibrillenbildung in der Weise aus, daß oft architektonisch komplizierte Faserstrukturen entstehen, denen eine Zellgestalt zugrunde liegt (Abb. 15).

Jede Zelle der Kultur scheint wie von einem Kraftfeld umgeben zu sein, im Bereich dessen sie auf die Gestaltung der fibrillären Strukturen einwirkt. Man sollte das Gesamtgerüst der Kultur nicht als starres Skelet betrachten, sondern als ein anpassungsfähiges Werk, das dem im Bereich der Kultur herrschenden Spiel der Kräfte elastisch angepaßt ist.

*Zelle und Zellkomplexe bestimmen eindeutig die Architektonik des Fasergerüsts.*

Die Beziehungen der Fasern zur Zellgrenze sind nicht immer zu verfolgen. Es fehlt nicht an Stellen, die deutlich zeigen, wie die Fibrillen an einer Zelle vorbeiziehen, ohne im geringsten zu ihr in Beziehung zu treten, wie die Silberfäserchen Zellfortsätze durchqueren, ohne daß ihr Verlauf eine Ablenkung dabei erleidet, oder wie sich einzelne Fibrillen vom Gefüge eines pericellulären Fasernetzes lösen, um sich einem anderen Netze einzuverleiben. Ebenso begegnet man in der Peripherie der Kultur Fasern, die sich aus dem Zellgefüge loslösen und in das freie Plasma hineindringen (Abb. 16).

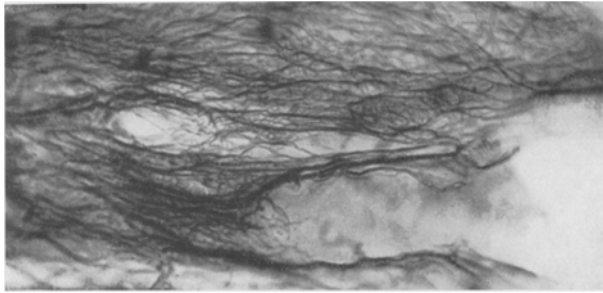


Abb. 17. 5 Tage alte Leberendothelkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Man kann sich leicht überzeugen, daß die fibrillenbildenden Vorgänge immer in innigstem Zusammenhang mit der Zellkolonie selbst stehen. Die Fibrillenbildung geht am stärksten dort vor sich, wo die Zellen am dichtesten liegen. Mit Abnahme der Dichte der Zellverteilung wird auch das Fibrillengerüst lockerer. Die feinsten Fäserchen sind aber auch in der weitesten Umgebung der Kultur frei im Plasma anzutreffen. Das Mutterstück wird ebenfalls in geringem Maße von Silberfibrillen durchsetzt, die von der Umgebung eindringen. Die gewebeeigenen Gitterfaserstrukturen lassen sich immer leicht von diesen unterscheiden.

Der von der Zelle ausgehende formative Impuls kann sich nicht nur an Zellgrenzen, sondern auch diffus in der Umgebung der Zelle auswirken. Die Wirkung äußert sich dabei grundsätzlich in gleicher Form: Die argyrophile Substanz schlägt sich als feines Faserwerk nieder (Abb. 17), aber in weiterer Entfernung der Zelle. Die gesamte Umgebung kleinerer oder größerer Kulturbezirke wird oft gänzlich in argyrophile Netze umgewandelt. Die Silberfäserchen, die auf diese Weise entstehen, sind besonders fein, und die Netze, die sie bilden, sind außerordentlich zart, dicht und zeigen sehr gleichmäßigen Aufbau.

Die Zellen, die in dieses diffuse Fibrillenmaschenwerk einwachsen, scheinen zuerst in ihm wie in einem Spinngewebe aufgehängt zu sein.

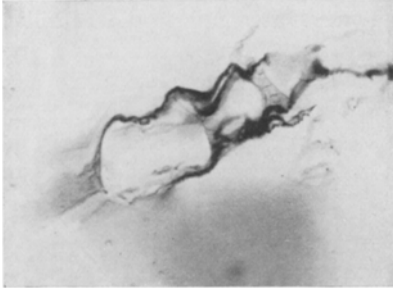


Abb. 18. 1 Tag alte Leberendothelkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Bald aber wird das Faserwerk von ihnen gänzlich umgestaltet und in das System des argyrophilen Gerüsts der Zellkolonie allmählich eingeordnet. Hier, bei sekundärer Umwandlung des Fasergerüsts, äußert sich die gestaltende Funktion der Zelle besonders übersichtlich und klar.

Neben den zwei eben beschriebenen Formen des Auftretens der Mesenchymfibrille in Gewebekulturen gibt es noch eine dritte, die von den vorher erwähnten abweicht. An frei im Kulturmedium

liegenden Zellen kann man das Erscheinen von Fibrillen von außerordentlicher Stärke beobachten. Diese bilden sich an den Wänden

von Spalträumen des Plasmas, in denen die Zellen liegen, und passen sich genau der Spaltbegrenzung an (Abb. 18).

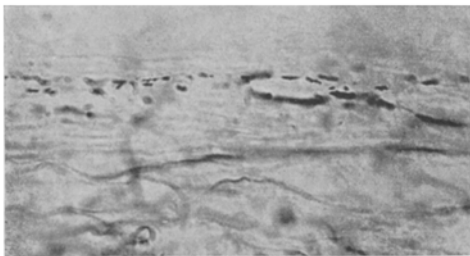


Abb. 19. 3 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

In diesen Spalträumen kann man deutlich verfolgen, daß die argyrophile Substanz sich nicht nur in fädiger Form, sondern auch in Gestalt von ungleichmäßigen Körnchen entwickeln kann. Die Körnchen erfahren weiterhin eine Längenzunahme und ordnen sich linear an (Abb. 19). Durch das Zusammenrücken dieser allmählich an Länge zunehmenden Partikelchen und Stäbchen entstehen schließlich wiederum dicke, argyrophile Fasern, die sich ihrerseits auch an

der Bildung des Gitterwerkes beteiligen. Die so entstandenen Fasergebilde sind meist von auffallender Stärke.

Auf die Möglichkeit der Entstehung der Mesenchymfibrille aus reihenförmig zusammengeschlossenen Körnchen haben schon Flemming (1897), Golowinsky (1907),

Mewes (1910) aufmerksam gemacht. Es wurde dabei auf die Beziehung der fibrillenbildenden Körnchen zum chondriomalen Apparat der Zelle hingewiesen. Die Natur dieser Gebilde, die in *in vitro*-Kulturen entstehen, schaltet diese Möglichkeit aus. Die Körnchen treten immer extracellulär auf, ohne irgendwelchen Zusammenhang mit dem Chondriom in einem ihrer Entwicklungsstadien zu zeigen.

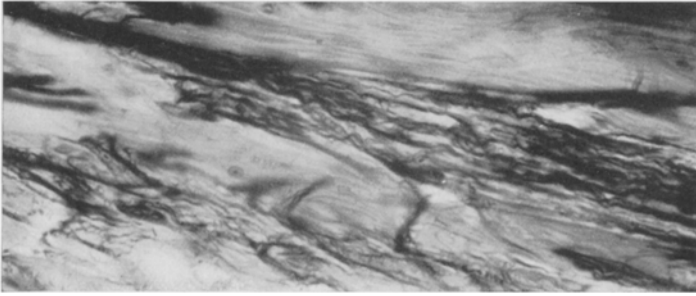


Abb. 20. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Man kann sich leicht überzeugen, daß die auf diese Weise entstandenen fibrillären Gebilde sich auch in ihrem weiteren Verhalten von den

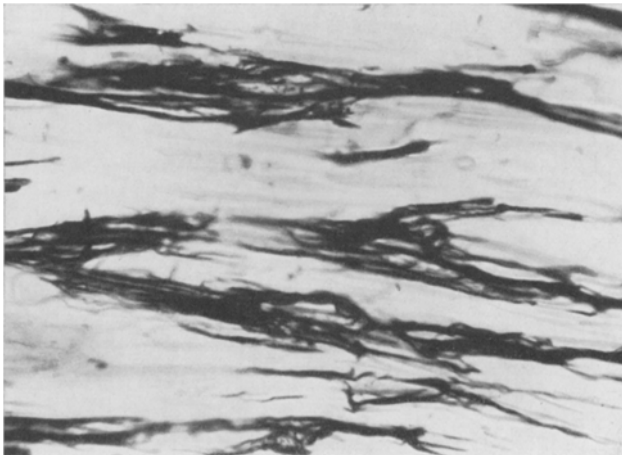


Abb. 21. 14 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

anderen unterscheiden. Die durch bündelförmiges Zusammenschließen der feinsten Fibrillen gebildeten Fasern weisen oft eine pinselartige Auflösung und Aufsplitterung in feinste Einzelfibrillen auf (Abb. 20), während die durch Zusammenrücken von Körnchen entstandenen ihren massiven Bau beibehalten; ihre Enden erscheinen dann stumpf und wie abgebrochen. Sie liegen oft als dicke, ungeformte Bröckel oder echte Splitter in dem Plasma verstreut (Abb. 21).

In einem endgültig ausgebildeten Silberfasergerüst einer älteren Mesenchymkultur lassen sich die Beziehungen der Fibrillen zueinander und zu den einzelnen Zellen kaum mehr verfolgen. Der fertige Faserbau besteht aus dickeren Fibrillenbündeln und argyrophilen Stäbchen, sowie zwischen ihnen liegenden feinen Netzen. Die gröberen Elemente des Gerüsts weisen keine direkte Beziehung zu einzelnen Zellen und Zellsprossen auf; sie werden im Gegenteil stets als vollkommen selbständige Gebilde angetroffen. Sie liegen als mäßig oder stark schwarz

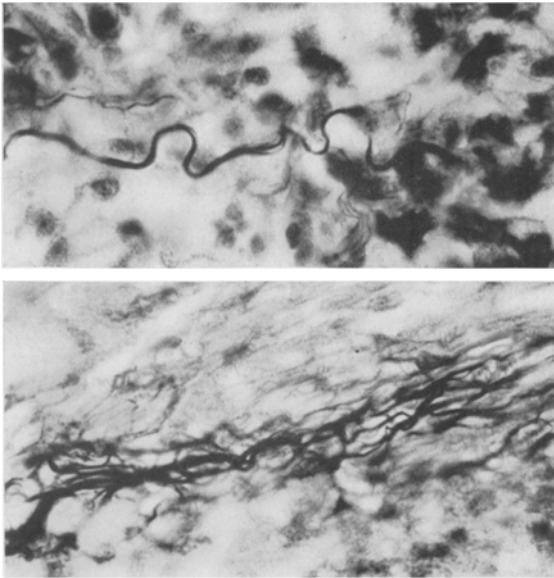


Abb. 22. 14 Tage alte Leberendothelkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

tingierte Faserbündel (Abb. 22) längs oder quer zur Wachstumsrichtung der Zellzüge und passen sich in keiner Weise dem Zellverlauf an. Ihre Anordnung wird einzig und allein durch die Gesamtstruktur der Kultur als einer architektonischen Einheit bestimmt.

Die viel erörterte Frage, ob die argyrophilen Fasern echte Netze zu bilden imstande sind, oder ob sie ihre Unabhängigkeit innerhalb des Fibrillenkomplexes beibehalten, können wir im Sinne der Theorie der Selbständigkeit (v. Ebners 1902, Rankes 1913, Quasts 1926) beantworten. Die Fasern auch in der Kultur sind unabhängig voneinander. Die Zusammenhänge zwischen den Fibrillen sind selten so innig, daß man von einem geschlossenen Netz sprechen könnte. Die Fasern können sich zweifellos überlagern, auf weite Strecken zusammen

verlaufen, die Faserbündel können sich aufsplintern, äußerst selten aber gehen sie ineinander über. Oft sieht man, daß die Einzelfibrillen sich gabelförmig verzweigen (Abb. 23). Solche Gabelungen wurden vielfach als die erste Stufe zur Bildung der echten Netze betrachtet, aber wie sich immer wieder leicht feststellen läßt, kommt es hier nie zu weiterer Aufteilung, noch zur Bildung von Einheiten größerer Ordnung. Meistens liegt diesen Bildern eine Nachahmung der Zellstrukturen und der verzweigten Zellausläufer zugrunde. Eine Ausnahme bilden die bereits beschriebenen im Plasma diffus ohne direkte Beziehungen zu Zellen entstandenen Silberfasern, deren netzige Struktur außer Zweifel steht.

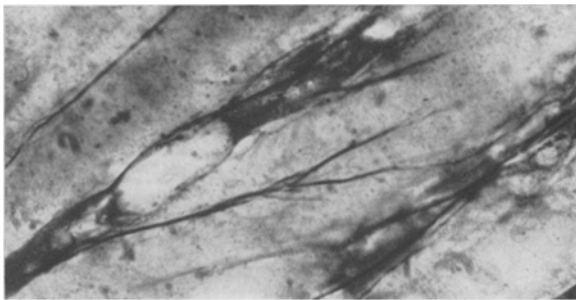


Abb. 23. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Versilberung nach Foot. Immer.  $\frac{1}{13}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

#### b) Die kollagenen Fasern.

In diesem Abschnitt sollen in der Kultur auftretende Faserstrukturen besprochen werden, die nach ihrem färberischen und physikalischen Verhalten allgemein als kollagene gedeutet werden. Da diese Strukturen teilweise mit dem im vorigen Kapitel beschriebenen argyrophilen Gerüst übereinstimmen, müssen wir eine grundsätzliche Erläuterung der Frage vorausschicken, inwiefern überhaupt eine scharfe Trennung zwischen argyrophilem und kollagenem Fasersystem möglich ist.

Als Ergebnis von zahlreichen experimentellen Arbeiten tritt mehr und mehr die Vorstellung in den Vordergrund, daß die Mesenchymfibrille (Silberfibrille) „als direkte Vorstufe der kollagenen Faser“ betrachtet werden muß. Aus diesem Grunde wird die erstere oft als „prä-kollagene“ (Golowinski 1903, Laguesse 1921, Plenk 1927) bezeichnet.

Nach dieser Auffassung kann eine scharfe Trennung zwischen kollagenem und argyrophilem Fasersystem überhaupt nicht durchgeführt werden. Das kollagene Bündel entwickelt sich aus den feinsten Netzen der mit Silber darstellbaren Mesenchymfibrille und weist ständig Verwandtschaft mit ihren Ursprungsstrukturen auf. Die direkten Übergänge und unmittelbaren Umwandlungen der Silberfasern zu kollagenen

Bündeln lassen sich an embryonalem Material (*Laguesse* 1921, *Mallory* 1903, *Alfejew* 1926), sowie an Organen unter pathologischen Bedingungen (*Rössle* und *Yoshida* 1909, *Russakoff* 1909, *Krauspe* 1922, *Orsós* 1926—1927) genau verfolgen.

Die Beobachtungen an Objekten, bei denen beide Faserarten gleichzeitig nebeneinander auftreten, zeigen, daß unsere Methoden, die ursprünglich als spezifisch für den Nachweis für kollagene bzw. Gitterfasern galten, die klare Unterscheidung beider überhaupt nicht ermöglichen. Es häufen sich die Angaben (*Laguesse* 1921, *Nageotte* 1922,

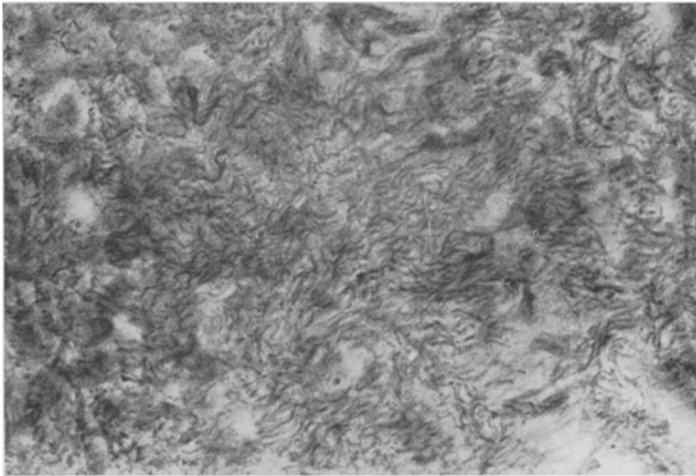


Abb. 24. 2 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

*Orsós* 1927, *Wassermann* 1928), daß es mit *Heidenhainscher* Azanfärbung, mit der Methode von *Mallory* und sogar nach *van Gieson* (*Russakoff* 1909) gelingt, Silberfibrillen zur Darstellung zu bringen. Andererseits ist es anscheinend nicht schwer, die typischen kollagenen Bündel zu versilbern (*Wassermann* 1928, *Nageotte* 1930).

Die nahen morphologischen Beziehungen beider Faserarten, sowie die Unbestimmtheit ihrer chemisch-färberischen Eigenschaften erschweren ihre Trennung ungemein.

Da die stoffliche Eigenart der Silberfibrille schon an sich sehr problematisch ist und von keiner Seite sichergestellt wurde, liegt die Frage nahe, ob überhaupt zwischen Silber- und kollagener Fibrille irgendwelche stofflichen Unterschiede bestehen, ob ein Prozeß der *Reifung* des Präkollagens zu Kollagen angenommen werden darf. Gegen die Anschauungen der Forscher (*Mall* 1902, *Hansen* 1905, *Ranke* 1913, *Matsui* 1915 u. a.), die die Theorie der *Reifung* des Präkollagens zum Kollagen vertreten, sprechen zahlreiche Befunde.

So konnte *Nageotte* (1927) in seinen Experimenten an Kollagenlösungen („Collagène A“), die durch Maceration von Sehnen des Rattenschwanzes in verdünnter Essigsäure hergestellt wurden, zeigen, daß sich bei der Gerinnung des Kollagens ein Fasergerüst entwickelt, das sich bei Silberimprägnation wie ein Gitterfasergerüst verhält. Ebenso eindeutig sind seine Befunde an einer künstlichen Ödembule (*Ranvier*), die im subcutanen Gewebe erzeugt wurde: die kollagenen Bündel splitteren



Abb. 25. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 10.

sich auf und bilden ein zartes Netzwerk von Fasern, die sich ihrerseits wieder leicht versilbern lassen (1922). Schon diese beiden einfachen Versuche lassen erkennen, daß das wechselnde Verhalten beider Faserstrukturen nicht mit einer Änderung ihrer chemischen Natur einhergehen muß.

Diese und viele ähnliche Beobachtungen machen die Annahme mehr und mehr wahrscheinlich, daß zwischen der Silberfibrille und der jugendlichen kollagenen Faser eine chemische Gleichheit besteht, daß Präkollagen und Kollagen nur verschiedene Bezeichnungen für das gleiche Substrat sind.

So muß *Plenk* (1927), der die Theorie der Eigenart der Silberfibrille vertritt, doch zugeben, daß es dahingestellt bleibt, „ob sich das Präkollagen vom Kollagen wirklich chemisch oder vielleicht nur durch



eine *etwas andere Struktur* unterscheidet“. *Wassermann* (1929) geht noch weiter, indem er behauptet, daß man keine entscheidenden Einwände dagegen vorbringen kann, wenn „die Silberfibrille geradezu als die jugendliche kollagene bezeichnet“ wird. Unsere Befunde am Fibrillenapparat der Gewebekulturen zwingen uns, uns der *Wassermannschen* Anschauung vollkommen anzuschließen.

Die zuerst in der Kultur erscheinenden und mit dem Azanverfahren darstellbaren Fasergebilde sind nach ihrem Aussehen mit den Silberfasernetzen vollkommen identisch. Sie entwickeln sich schon

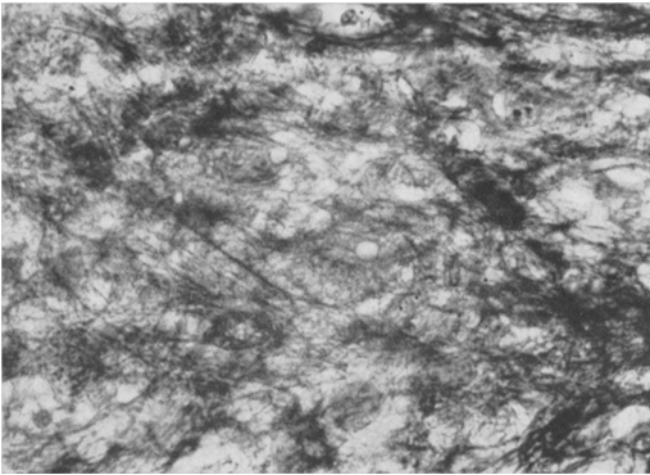


Abb. 26. 14 Tage alte Leberendothelkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

sehr frühzeitig und können dichte Lager bilden. Sehr oft ist schon am Ende des 2. Tages die gesamte Wachstumszone der Kultur in ein bläuliches Filzwerk eingebettet (Abb. 24). Die einzelnen Fibrillen sind gleichmäßig dünn, leicht bläulich gefärbt und bilden ein engmaschiges Reticulum mit leichten Verdickungen an den Knotenpunkten. Diese netzartigen Geflechte scheinen keine *unmittelbaren* Beziehungen zu den Zellen zu haben; sie sind meistens in die Intercellularräume eingespannt (Abb. 25). Hier und da können sie sich verdichten; diese Verdichtungen finden sich hauptsächlich in der Nähe des Mutterstückes (Abb. 26) und längs der radiär aussprossenden Zellstrahlen. Die Verdichtung der Faser-Netzstruktur geht mit einer weitgehenden Umwandlung der netzbildenden Fibrillen parallel. Die näher aneinandergerückten Fäserchen schließen sich zu Einheiten größerer Ordnung zusammen, die eine gewisse Selbständigkeit im Bereich des Maschenwerkes gewinnen. Die größeren Faserbündel sind meist gewellt, oft korkzieherartig. Sie sind

nicht homogen und lassen bei genauer Betrachtung erkennen, daß jedes Bündel aus feinsten Fäserchen zusammengesetzt ist, in die es sich sehr oft an seinen Enden wieder aufsplittert. Die größeren Bündel können

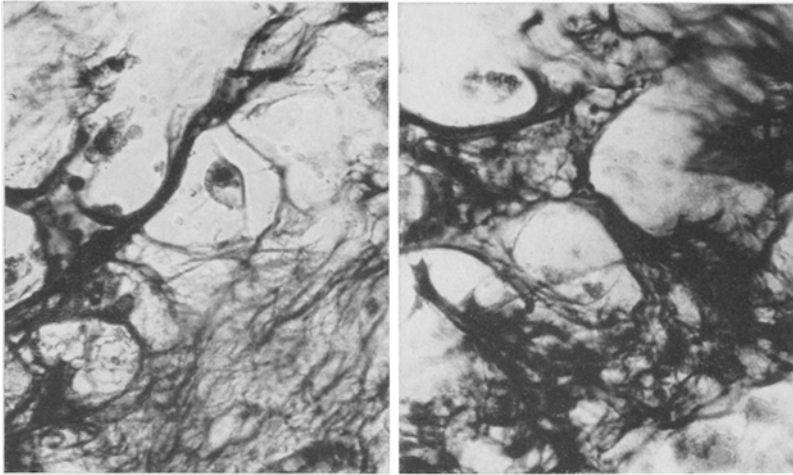


Abb. 27. 14 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

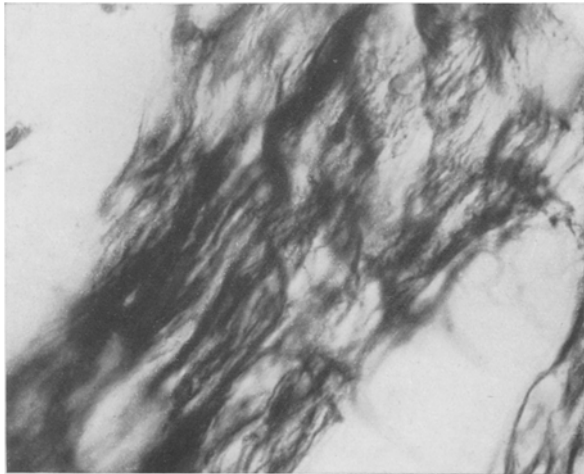


Abb. 28. 21 Tage alte Leberendothelkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

sich zusammenlegen und größere Lager von kollagenen Fasern bilden (Abb. 27), die hin und wieder wie Narbengewebe aussehen (Abb. 28). Oft schieben sich solche Bündel in das Mutterstück hinein und schnüren größere oder kleinere Teile des Explantates ab. Im Gegensatz dazu

zeigen sie wenig Neigung, in die Außenzone vorzudringen, in deren Bereich nur die jüngeren und zarteren Fasersysteme zu finden sind.

Wir möchten betonen, daß die kollagenen Strukturen ebenso wie die argyrophilen Fasern nicht nur als sich in der Umgebung der Zelle diffus ausbreitende Netze entstehen können, sondern auch als an der Zellgrenze verlaufende, scharf umrissene, selbständige Fasern. Das Zusammenschließen der Zellen zu einem zelligen Reticulum führt auch hier wiederum zur Bildung von retikulärem Faserwerk.

Das Verhalten der Fasern bei spezifischen Färbungen ist in den einzelnen Entwicklungsstufen der Kultur verschieden. Die ursprünglich sich an den Zellgrenzen entwickelnden Fasern zeigen gleiche Affinität zu Silber und Anilinblau. In nach *Foot* versilberten Schnitten erscheinen diese Fibrillen schwarz, in mit der Azanmethode verarbeiteten sind sie dunkelblau. Kleine Bündelchen, die durch Zusammenschließen von argyrophilen Fibrillen entstehen, verhalten sich ebenso.

Anders reagieren hingegen die sich diffus entwickelnden fibrillären Netze. Sie haben eine ausgesprochene Affinität zum Anilinblau; mit Silber lassen sie sich fast nicht darstellen. Die jugendlichen Kulturen, die in Silberpräparaten nur spärlichen Fibrillengehalt aufweisen, zeigen in Azanschnitten ausgedehnteste Filzwerke von Fibrillen. Die genaue Betrachtung von Parallelschnitten, die mit beiden Methoden bearbeitet wurden, zeigt immer wieder, daß, obgleich sich alle mit Silber darstellbaren Fasern auch nach Azan färben lassen, die Azanfärbung doch noch weit mehr fibrilläre Strukturen zur Darstellung bringt. Dieser Umstand spricht dafür, daß das Kollagen in den ersten Stufen seiner Erscheinung nur mit Azan dargestellt werden kann, und daß seine Versilberung erst später gelingt.

Von Bedeutung für den Ausfall der Färbung ist auch die Beziehung der Fasern zu den Zellen. Die feinsten pericellulären, fibrillären Netze weisen im Gegensatz zu den oben beschriebenen schon vom Augenblick ihrer Entstehung an eine ausgesprochene Argyrophilie auf (s. *Heringa* 1932).

Das reife kollagene Bündel zeigt wiederum besondere Eigenheiten. Obwohl es sich unter gewissen Umständen mit Silber darstellen läßt, bemerkt man jedoch, daß seine Argyrophilie allmählich verloren geht, sobald das Bündel eine gewisse Dicke erreicht hat. Diese voll entwickelten Faserbündel werden nach Versilberung nur bräunlich oder bräunlichgelb. Die entsprechenden Silberpräparate geben keinen Aufschluß über die wirkliche Dichte des Faserlagers, die in den Azanpräparaten deutlich zutage tritt. Die Abb. 29a und b von entsprechenden Stellen in Silber- und Azanschnitten veranschaulichen diese Verhältnisse deutlich: Die Hauptmasse des Kollagens kommt in Silberpräparaten kaum zur Geltung.

Die ausgebildeten kollagenen Bündel behalten diese färberischen Eigenschaften nur, solange ihre Fasern in engstem Zusammenhang

bleiben. In dem Moment aber, wo dieser Zusammenhang zerstört wird, kommt ihre Argyrophilie wieder zum Vorschein. *Die einzelnen Fasern, in die sich die Fibrillenbündel aufsplittern, lassen sich wieder mit Silber darstellen.*

Das färberische Verhalten der Einzelfasern in Kulturen spricht also gegen jede Annahme ihrer stofflichen Umwandlung. Das gleiche Fibrillengerüst läßt sich sowohl versilbern wie durch Azan zur Darstellung bringen. Die wechselnde Reaktion der

Bindegewebsfasern in verschiedenen Entwicklungsstufen des Gerüsts äußert sich nur im zeitweisen Verschwinden und Wiederauftreten der Argyrophilie. Um diese Erscheinung zu erklären, sind wir nicht unbedingt auf die Annahme einer chemischen Umbildung der Fibrille angewiesen.

Im Gegenteil gestatten die Beobachtungen am Verhalten des Fasergerüsts in Gewebekulturen den Schluß, daß die einzelnen Fibrillen, die einerseits das Gittergerüst der Kultur bilden

und sich andererseits zu kollagenen Bündeln zusammenschließen, völlig identisch sind.

Dem Versuch von *Plenk* (1927), die Unterschiede zwischen kollagenen und Silberfasern durch die Existenz eines versilberbaren, die Fibrille umscheidenden Häutchens, einer argyrophilen Kittsubstanz, zu erklären, möchten wir eine Vorstellung gegenüberstellen, die nicht die Argyrophilie selbst (sie ist jeder Mesenchymfibrille nach einer gewissen Entwicklungsstufe eigen), sondern die Tatsache ihres zeitweisen Schwundes für erklärungsbedürftig hält.

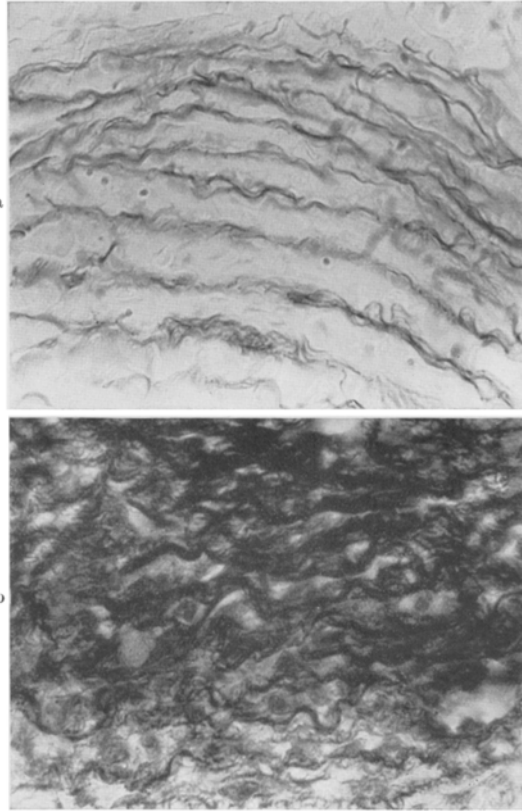


Abb. 29. 14 Tage alte Fibroblastenkultur. a Versilberung nach *Foot*. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme. b 14 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Der Umstand, daß die Silberfibrillen, ohne ihre Silberreduktionsfähigkeit zu verlieren, beim Zusammenschließen zu Bündeln morphologische Einheiten bilden, die sich nicht versilbern lassen, zwingt zur Annahme, daß für den zeitweiligen Schwund der Argyrophilie ein außerhalb der einzelnen Fibrille liegender Faktor verantwortlich gemacht werden muß.

*Das wechselnde Verhalten der Mesenchymfibrille unter verschiedenen Bedingungen scheint einzig und allein durch die Art ihrer gegenseitigen Lagebeziehungen bedingt zu sein.*

Die Frage, ob durch Zusammenschluß der Mesenchymfibrillen zu Kollagenbündeln die physikalischen Eigenschaften der Fibrille entsprechende Änderungen erfahren, oder ob das Vorhandensein gewisser Stoffe, die das Zusammenschließen der Fasern zu Bündeln erleichtern oder sogar ermöglichen, für das Verlorengehen der Argyrophilie verantwortlich gemacht werden muß — eine Erklärung, die wir für die wahrscheinlichste halten — ist mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht zu entscheiden.

Den Zeitpunkt des ersten Auftretens der Bindegewebsfibrillen in der Kultur kann man nicht früh genug ansetzen. Schon die ersten aussprossenden Zellen (6—7 Stunden nach der Explantation) sind von Fibrillen umgeben. *Der Aufbau des Fasergerüsts geht parallel dem Wachstum der Zellkolonie.*

Im Gegensatz dazu erfordert der Zusammenschluß der Fasern zu höheren Einheiten sowie die Entwicklung dicht gelagerter kollagener Strukturen längere Zeit; nach 2 Wochen etwa ist aber der Höhepunkt dieser Entwicklung in den meisten Kulturen erreicht. In gewissen Kulturen spielt sich dieser Prozeß der Organisierung des Fasergerüsts dabei viel schneller als in normal wachsenden ab. *Die Bildung seiner Bausteine — der Mesenchymfibrillen — ist von der Proliferationsintensität völlig unabhängig.*

Der Vergleich der faserbildenden Potenzen von Mesenchymzellen verschiedenen Ursprungs zeigt, daß den Fibroblasten keinerlei bevorzugte Fähigkeiten in dieser Richtung zukommen. Die Kulturen von Leberendothel, von Milz, Knochenmark, Herzmyoblasten, sowie echtem Bindegewebe äußern ihre fibrillenbildende Tätigkeit in gleicher Intensität. Die entsprechenden Angaben von Rössle und Yoshida (1909), Fiessinger (1911), Plenck (1927) finden hier ihre volle Bestätigung.

Auf dem Schnitt einer Kultur, die eine längere Zeit gezüchtet wurde und ihre fibrillenbildende Tätigkeit dabei voll entwickeln konnte, sieht man, daß die neugebildeten kollagenen Fibrillen das ursprüngliche Mutterstück wie konzentrische Ringe umfassen. Es bleibt vom Mutterstück nur ein kleiner Kern fibrillenfrei. Neben den einzelnen kollagenen Ringen, an denen die fibrillären Strukturen besonders dicht erscheinen,

lassen sich auch Schichten von geringerem Fibrillengehalt erkennen. Diesem von konzentrischen Faserringen umgebenen Mutterstück schließen sich die radiär angeordneten Fibrillenzüge an, die an ihrer Basis mit dem konzentrischen Fibrillengeflecht innig verbunden sind; sie lösen sich dann peripherwärts in feinste Fibrillennetze auf.

### Die Beziehungen zwischen Kultur und umgebendem plasmatischem Medium vom Standpunkt der Fibrillengenese.

Wie wir in der Einleitung zu zeigen versuchten, ist die Kenntnis der Beziehungen zwischen *in vitro* wachsenden Zellen und dem sie umgebenden Milieu von grundsätzlicher Bedeutung für das Verständnis des Vorganges der Fibrillenentstehung.

Über die Struktur des Nährmediums der Kultur herrschte bisher vollkommene Unklarheit; so kam es, daß das Problem der Beziehungen zwischen Zelle und Nährbodenplasma nie angegriffen wurde. Wir wollen versuchen, diese Beziehungen sowie die Zusammenhänge zwischen den Strukturen des Plasmagerinnsels und den neu entstandenen Bindegewebsfibrillen einer Besprechung zu unterwerfen.

Entgegen den allgemeingültigen Vorstellungen, daß die sich *in vitro* entwickelnden Zellen in den Maschen des Fibrinnetzes des Plasma-koagulums liegen und an den Fibrinfäden entlang wandern, indem sie diese als Stützgerüst benutzen, läßt sich leicht zeigen, daß die Verhältnisse zwischen Zelle und Plasma doch nicht so einfach liegen.

*Die Zelle in der Kultur ist imstande, das Plasmakoagulum anzugreifen und es weitgehend zu verändern.* Das Koagulum erfährt in der Umgebung der Zellkolonie eine Umbildung, die in der Nähe von Zellen am stärksten zur Ausprägung kommt.

Die Wirkung der Zelle auf das Plasma äußert sich in erster Linie in der Verdauung des plasmatischen Gerüsts, das sie unmittelbar umgibt, und in gewissen Umwandlungsvorgängen, die die Zelle an entfernteren Plasmabezirken hervorruft.

An entsprechend bearbeiteten Präparaten kann man sich leicht davon überzeugen, daß von einem bloßen Fortbewegen der Zellen innerhalb von präformierten Maschenräumen keine Rede sein kann. Die Zellen, die im Schnitt angetroffen werden, liegen in Plasmalücken und Spalten, die manchmal deutlich in Erscheinung treten, manchmal aber, wenn sie die Zelle dicht umschließen, nur schwer wahrgenommen werden können. Die Zelle der Kultur ist imstande, wurmstichähnliche Gänge in das umgebende Kulturmedium zu bahnen. Oft läßt sich verfolgen, wie eine in einer Plasmalücke liegende Zelle mit einem benachbarten Bezirk der Kultur noch durch einen Gang in Verbindung steht. Mehrere dieser Gänge schließen sich zu Spalträumen zusammen, die dicht von Zellen erfüllt sein können. Oft sieht man, wie eine zusammenhängende Zellreihe bei weiterer Fortbewegung größere Lacunen in

dem festen Medium aushöhlt (Abb. 30). Es entsteht auf diese Weise in der Peripherie der Kultur ein Bezirk, den wir als „Frontzone“ bezeichnen möchten. Der sich am Plasma abspielende Vorgang erinnert sehr an den osteoclastischen Knochenabbau. Schmale Zellzüge dringen weit in das zellfreie Plasma hinein (Abb. 31). Zwischen ihnen bleiben Plasmastreifen liegen, die sich allmählich verjüngen.

Bei weiterem Fortbewegen der Zellen werden immer wieder plasmatische Bezirke abgeschnürt und abgebaut. Oft bleiben dann längliche Plasmainseln allseitig von Zellen umgeben inmitten der Wachstumszone liegen, um später allmählich ganz zu verschwinden. Die

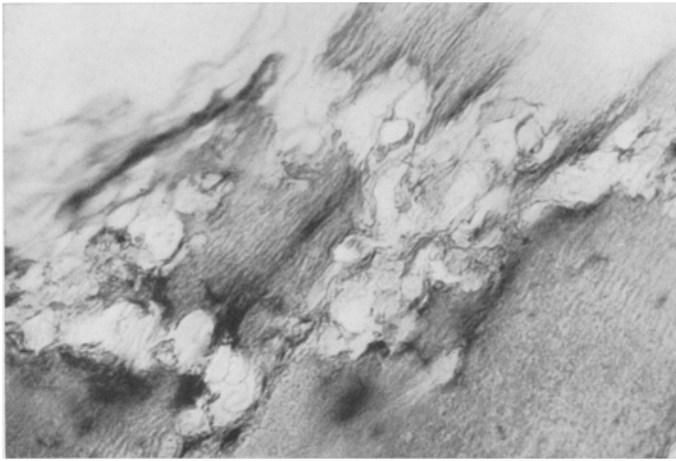


Abb. 30. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer,  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Ränder der abgeschnürten Plasmainseln und Streifen sind nicht glatt, sondern weisen oft nischenartige Aushöhlungen auf, in denen den Abbau fördernde Zellen nach Art von Osteoclasten liegen.

Wir müssen uns vorstellen, daß die Zellen der entwickelten Kultur mit Ausnahme der äußersten Peripherie nicht vom ursprünglichen Plasma umgeben sind, sondern sich in einem durch ihre eigene Tätigkeit gänzlich veränderten Substrat befinden. Wir werden nicht fehlgehen, *dieses intercelluläre Substrat als die eigentliche „Grundsubstanz“ der Kultur zu betrachten.*

Neben dem Abbau des Plasmas, dessen Intensität in verschiedenen Kulturen sehr verschieden sein kann und *dessen Ergebnis stets ein pericelluläres Fibrillen-Gerüst ist*, spielt sich in Kulturen beim stetig fortschreitenden Wachstum noch ein anderer Vorgang ab. Das oft vollkommen homogene, nur selten leicht fädig strukturierte Plasma

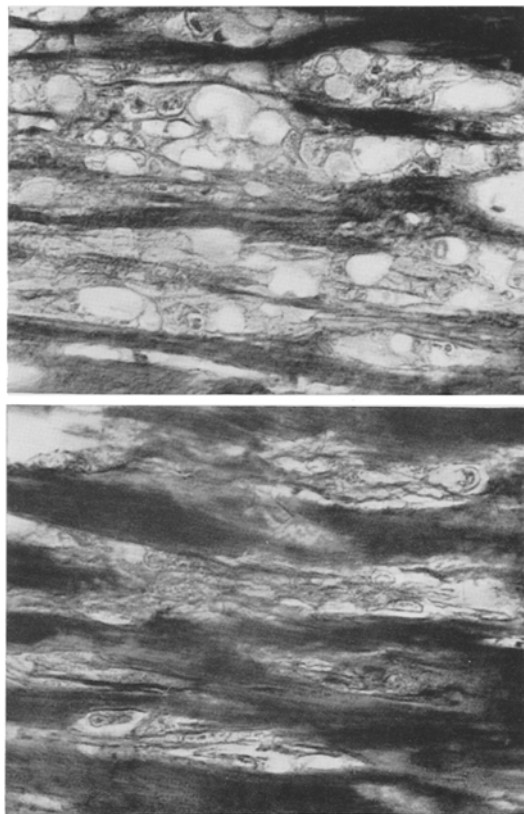


Abb. 31. 10 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8.  
Leica-Aufnahme.

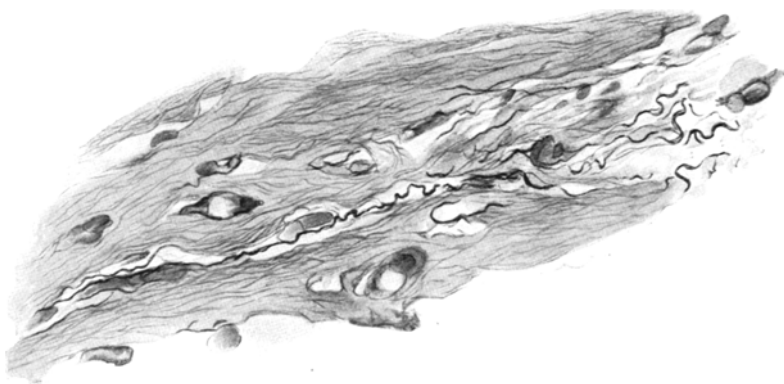


Abb. 32. 3 Tage alte Leberendothelkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 10.



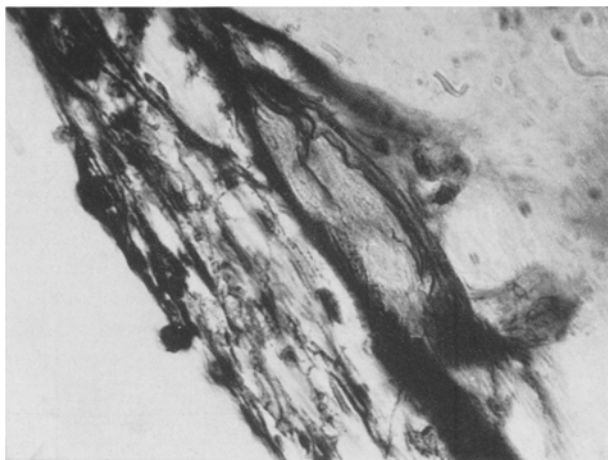


Abb. 33. 4 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8.  
Leica-Aufnahme.

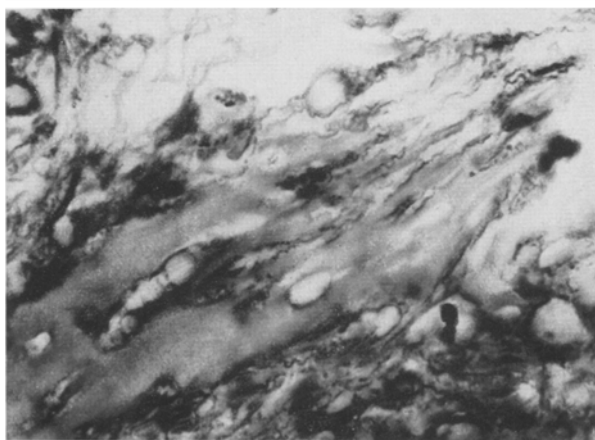
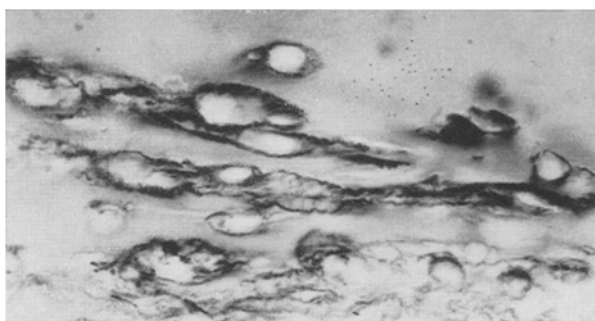


Abb. 34. 10 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8.  
Leica-Aufnahme.

erleidet in der Nähe der Kultur eine Veränderung. Sein Netzwerk vergrößert sich mit zunehmender Nähe der Wachstumszone. Die Fäden werden dichter und lassen sich mit Azan allmählich besser darstellen (Abb. 32). In älteren Kulturen läßt sich ein in der Nähe der Zellkolonien auftretender allgemeiner Farbenumschlag in Blau feststellen.

Diese Vergrößerung der Netzzeichnung im Plasma wird vom Auftreten parallel angeordneter Fasern begleitet (Abb. 33). Am besten läßt sich dieser Vorgang an den zwischen den Zellen eingeschlossenen Plasmainseln und -streifen verfolgen. Hier ist das Plasma am eindeutigsten strukturiert. Die Faserung dieser Bezirke geht den Zellzügen parallel und kommt an den Rändern der Plasmalücken zur stärksten Ausbildung. Die Fäserchen, die ursprünglich alle Merkmale des Fibrins

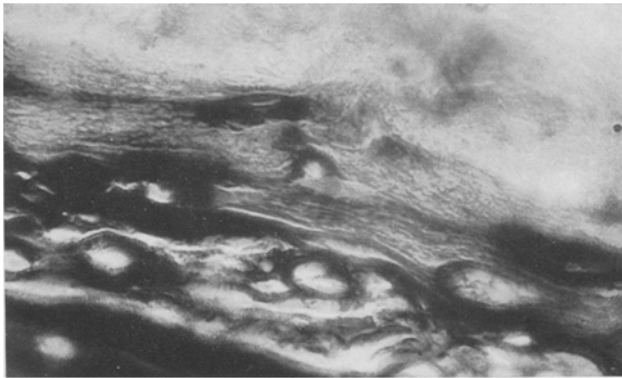


Abb. 35. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer,  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8.  
Leica-Aufnahme.

aufweisen, werden dicker, geordneter, selbständiger. Mit Abnahme der Fähigkeit, sich färberisch wie Fibrin zu verhalten, steigt ihre Affinität zu Anilinblau an.

*Das plasmatische Kulturmedium wird also von in vitro wachsenden Zellen unmittelbar angegriffen. Die Zellen wachsen nicht in präformierte Maschenräume, sondern bauen bei ihrem Fortschreiten das Plasmagerinnsel ab. Neben diesem Abbau äußert sich die Anwesenheit von Zellkolonien durch diffuse Umwandlung des Plasmas in ihrer Umgebung, die zu einer steigenden Durchfaserung des ursprünglichen Plasmagerüsts führt. Je näher dem Zellkörper sich diese Vorgänge abspielen, desto stärker treten die beschriebenen Veränderungen auf.*

Der sich in der Kultur abspielende Vorgang der Fibrillenbildung ist von dem Prozeß des von den Zellen bewirkten Plasmaab- und -umbaus kaum zu trennen. Während in zahlreichen Kulturen dieser Vorgang sich allein unmittelbar an der Zellgrenze abspielt (Abb. 34)

dort, wo die eindeutigen Verhältnisse vorliegen, verläuft er in anderen in einer Weise, die eine besondere Besprechung erfordert.

Dort, wo die Plasmafaserung weit vorgeschritten ist, können wir die an den Zellgrenzen und in der Zellnähe sich bildenden Mesenchymfibrillen ihrer Beschaffenheit und ihrem färberischen Verhalten nach nicht leicht vom zerfaserten Plasmakoagulum abgrenzen (Abb. 35). Die Fasern, die bei fortgeschrittener Plasmastrukturierung entstehen, weisen in Azanpräparaten fast denselben intensiv blauen Farbenton

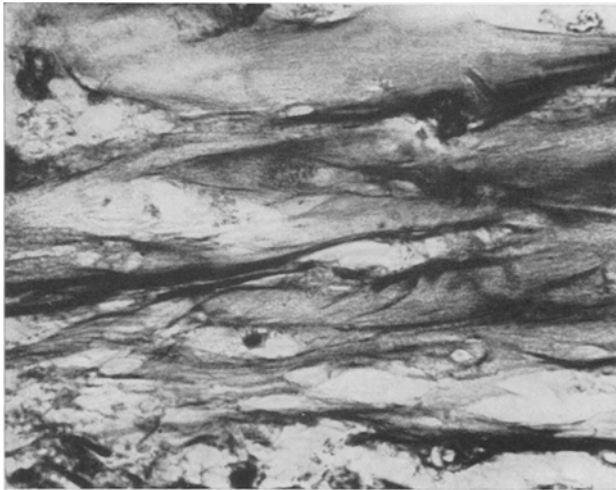


Abb. 36. 4 Tage alte Leberendothelkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8.  
Leica-Aufnahme.

auf wie die echten kollagenen Fibrillen; auch ihr Verlauf ist oft vollkommen identisch.

In jedem Präparat kann man Stellen finden, an denen sich die am Rande der Spalträume am stärksten ausbildenden „plasmatischen“ Fibrillen zu dicken, selbständigen Bündeln zusammenschließen, um später in typische kollagene Fasergerüste überzugehen. Dieser Übergang ist immer fließend, und mühelos lassen sich Schritt für Schritt alle Übergänge von noch homogenem Plasma zu typischen Bindegewebsfasern verfolgen. Immer wieder schließen sich die aus dem Plasma stammenden Fibrillen zusammen, lösen sich von dem Plasma ab, und verlieren sich als typische Bindegewebsfibrillen zwischen den Zellen der Kultur. Auch die an den Plasmagrenzen entstandenen und noch mit dem Plasma in Verbindung stehenden dichten Plasma-Faserstrukturen sind in den meisten Präparaten von echten Bindegewebsfibrillen nicht mehr zu unterscheiden (Abb. 36). Oft trifft man sogar wenig strukturierte Plasmabrücken, die sich *in toto* in kollagene Bündel fortsetzen.

Die in Kulturen diffus vor sich gehenden Umwandlungen der plasmatischen Grundsubstanz führen zur Ausbildung von mesenchymalen Netzwerken, die ebenfalls den Netzen des ursprünglich vorhandenen Fibrins genau entsprechen.

Ohne auf die Bedeutung der Beziehungen zwischen dem faserbildenden Vorgang und der Struktur des Mediums, in dem sich dieser abspielt, näher einzugehen, wollen wir uns hier mit folgender Feststellung begnügen: *Zur Bildung einer Bindegewebsfibrille ist die unmittelbare Fühlungnahme der Zelle oder des Zellkomplexes mit der plasmatischen Grundsubstanz anscheinend unentbehrlich. Die Beobachtungen an Gewebekulturen zeigen, daß die an den Zellgrenzen und in der nächsten Umgebung der Zellen sich abspielenden fibrillenbildenden Vorgänge durch fließende Übergänge mit eigenartigen Strukturierungsprozessen des Plasmas selbst verbunden sind; der Prozeß der Fibrillenbildung erscheint in Zellkulturen als Ergebnis einer örtlichen Kondensierung sich diffus abspielender, gleichsinnig gerichteter, bei weiterer Entfernung von der Zelle allmählich abklingender Organisierungsvorgänge.*

### Zusammenfassende Besprechung.

#### 1.

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, eine eingehende Beschreibung des Vorgangss der Fibrillenbildung in der Gewebekultur zu geben. Wir beschränkten uns bisher auf die rein morphologische Analyse dieses Prozesses. Die Deutung unserer Befunde wollen wir im Rahmen einer allgemeinen Besprechung der sich bekämpfenden Theorien der Faserentstehung vornehmen.

Das Studium des Vorganges der Fibrillengenese in Gewebekulturen zwingt uns, entschieden für die Vorstellung einer *extracellulären* und *extraplasmatischen* Entstehung der Bindegewebsfibrillen einzutreten. Wir schließen uns damit einer Richtung an, die im Beginn der histogenetischen Forschung vorherrschend war, später aber infolge einer Überschätzung der Bedeutung der Zelle stark zurückgedrängt wurde, in der letzten Zeit aber wieder mehr und mehr in den Vordergrund tritt. Es sei hier in wenigen Worten die historische Entwicklung der Gedanken skizziert, die dieser Anschauung zugrunde liegen.

Im Anschluß an die Theorien von *Henle*, *Kölliker* und *Ranvier*, die die Entstehung der Fibrillen in die die Spalträume zwischen den Zellen ausfüllende halbflüssige Zwischensubstanz verlegten, entwickelte *v. Ebner* (1897) als erster auf Grund seiner systematischen Untersuchungen über den Vorgang der Fibrillenbildung an der Chordascheide der niederen Fische, sowie am Zahnbein Vorstellungen, denen noch heute eine grundsätzliche Bedeutung beizumessen ist.

Er kam zu der Ansicht, daß die Bindegewebsfibrillen auch in bedeutender Entfernung von Zellen aus einer von diesen gebildeten homogenen Masse von kolloidalem Bau unter dem Einfluß orientierender Spannungen „geprägt“ werden und sich später zu selbständigen Fasern ausbilden. *v. Ebner* versuchte diesen

Bildungsmodus der Fasern nachzuahmen, indem er tierischen Schleim und Hühner-eiweiß unter orientierenden Druck stellte. Auf diese Weise konnte er fibrilläre Gebilde erzeugen, die echten Bindegewebsfibrillen sehr ähnlich waren. Obgleich *v. Ebner* seinen Versuchen eine rein physikalisch-chemische Deutung gab, ließ er auch eine andere Möglichkeit offen, indem er nämlich annahm, daß „die Faserbildung unabhängig von den Oberflächenspannungen rein durch die ererbte Selbst-differenzierung lebender Substanz zustande käme“.

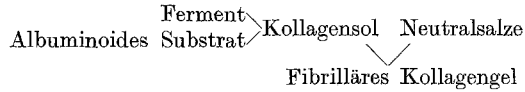
In ähnlicher Weise läßt *Merkel* (1909) die ersten Fasern innerhalb der homogenen gallertigen Interzellularsubstanz entstehen, die die Räume zwischen den Mesenchymzellen ausfüllt und die er als Sekret der letzteren deutet. Die Zellen nehmen an der Bildung von Fasern keinen unmittelbaren Anteil. Die Bindegewebsfibrillen treten zuerst als feinste, netzartige Geflechte auf; bei weiterer Entwicklung entstehen aus den Netzen durch Lösung der Verbindungen selbständige Fasergebilde.

Die von *v. Ebner* und *Merkel* vertretenen Anschauungen fanden zuerst wenig Anklang. Obwohl eine Reihe von späteren Arbeiten anderer Autoren (*Russakoff* 1909, *Dubreuil* 1913, *Hertzler* 1915) eine volle oder teilweise Bestätigung der Theorie der extracellulären Faserogenese enthielten, gingen die meisten Forscher auf diesem Gebiet einen anderen Weg, und erst in der letzten Zeit kamen, hauptsächlich in Arbeiten von *Baitsell* und *Nageotte* die klassischen Vorstellungen wieder zur Geltung.

*Baitsell* (1916—1930) verfolgt in einer langen Untersuchungsreihe den Prozeß der Faserbildung unter verschiedenen normalen und pathologischen Bedingungen und kommt ebenfalls zu der Überzeugung, daß die Fasern immer extracellulär, aber aus verschiedenartigstem, nicht durch Protoplasmaumwandlung entstandenes Material gebildet werden. Er studiert die Faserbildung bei der Wundheilung an der Froshhaut (1916) und stellt dabei fest, daß die Bindegewebsfibrillen selbständig aus Fibrinfäden entstehen. Diese schließen sich zu dünnen Bündeln zusammen und verwandeln sich allmählich in gröbere, wenig gerichtete Faserkomplexe. Obgleich die Beschaffenheit der so entstandenen Fibrillen nicht ganz mit derjenigen des Kollagens übereinstimmt (z. B. in ihrer leichten Verdaulichkeit durch Trypsin), hält *Baitsell* ihre kollagene Natur für sichergestellt. Das färberische Verhalten und das Aussehen der Fasern scheint ihm ein genügender Beweis zu sein. In das schon organisierte Fasergerüst wandern nachträglich die Zellen ein. Ähnlich gehe der Prozeß der Faserogenese bei Amphibienlarven (1921) vor sich. Hier spiele sich die Fibrillenbildung in der Umgebung der Chorda in einer als Zellsekret aufzufassenden, homogenen, gallertigen Substanz, ebenfalls morphologisch vollkommen unabhängig von den Zellen, ab. Gleiche Befunde konnte *Baitsell* an dem periaxialen Mesenchym des Hühnchens (1925) erheben. Beim Studium der Fibrillenbildung bei experimenteller Hodentuberkulose des Meerschweinchens konnte er ebenfalls feststellen, daß die Fibrillen aus dem geronnenen Exsudat ohne nachweisbare Beteiligung der Zellen entstehen (1930). *Baitsell* entscheidet nicht, ob die Zellen bei diesem Vorgang sich überhaupt irgendwie beteiligen. Er hält es jedoch nicht für ausgeschlossen, daß sie gewisse Sekrete ausscheiden, die auf den Prozeß der Faserentstehung Einfluß haben. Die Arbeiten von *Baitsell* wurden von *Harrison* (1925) bei seinen Experimenten an Amphibien vollauf bestätigt.

Bedeutende Fortschritte in der Analyse des Geschehens der extracellulären Faserogenese haben wir *Nageotte* zu verdanken (1916—1931). Seine Lehre läßt sich folgendermaßen darstellen: Die Faserbildung geht immer in der Grundsubstanz vor sich, die als „albuminoides Koagulum“ gedacht wird. Diese „ist ebensowenig lebendig wie ein Korallenstock“. Die Albumine verfallen dem Vorgange der „Metamorphose“ — sie wandeln sich in Kollagen um. Durch Einwirkung von Salzen wird das Kollagen des intercellulären Milieus gefällt und bei dem Übergang vom

Sol- in den Gelzustand orientieren sich die Kollagenpartikelehen neu und bilden die kollagenen Fasern. Die Umbildung von Grundsubstanz geht unter Einwirkung von Zellen vor sich. Diese sind fähig, nicht nur die Grundsubstanz selbst zu bilden, sondern sie auch durch ihre Sekrete weitgehend zu verändern. Der Verfasser gibt folgendes Bildungsschema des Kollagens an:



Während *Baitsell* hauptsächlich an der Umwandlung des Fibrins zu Kollagen festhält, denkt *Nageotte*, obgleich er dieser Umwandlungsart eine große Bedeutung beimißt, vor allem auch an die Umwandlung anderer Eiweißstoffe (gelöste Eiweiße des Blutes und der Lymphe, des toten Cytoplasmas usw.). Sein Schema der Kollagenbildung hat *Nageotte* auch an *in vitro*-Versuchen glänzend nachgeprüft und erhärtet.

In der neuesten Zeit haben die *Nageotteschen* Versuche eine Bestätigung durch *Heringa* (1926 und 1931) erfahren. Seine weiteren Untersuchungen an der Nabelschnur des Kalbes und am subcutanen Gewebe von neugeborenen Ratten zwangen ihn zu der Annahme, daß die Bindegewebsfibrille in intercellulär gelagertem faserbildendem Sol entsteht. Im Gegensatz zu *Nageotte* nimmt er an, daß die Zellen nicht das koagulierende oder „metamorphosierende“ Ferment, sondern das Kollagen selbst ausscheiden. Das Hauptgewicht seiner Untersuchungen verlegt *Heringa* auf die physikalisch-chemische Analyse des Prozesses. Zusammenfassend lassen sich seine Anschauungen folgendermaßen wiedergeben: Die Entstehung von Fibrillen ist ein Prozeß von Gelbildung in einem fibrillenbildenden Sol. Bei Übergang aus dem Sol- in den Gelzustand fällt Kollagen in Form von länglichen Micellen aus. Die letzteren reihen sich zu Fädchen aneinander. Bei weiterer Entwicklung schließen sich auf Grund der den Micellen inhärenten Eigenschaften die einzelnen Fibrillen zu faserigen Komplexen zusammen: Die physikalischen Eigenschaften der fertigen Fibrillen werden durch die „spirale Eigenform“ der Kollagenmicelle bedingt.

*Nageotte* und *Heringa* haben als erste die Möglichkeit der Entstehung von kollagenen Fasern aus leblosem chemischem Substrat nicht nur erwogen, sondern auch durch aufschlußreiche Experimente bewiesen. Hierin liegt die besondere Bedeutung ihrer Untersuchungen; sie dürfen weitgehende Berücksichtigung auf dem Gebiete der Genese der Bindegewebsfibrille beanspruchen. Wir werden bei der Deutung eigener Befunde aus diesen Feststellungen die nötigen Schlüsse ziehen.

## 2.

Wir wenden uns nun dem Problem der extra- oder intracellulären Entstehung der Bindegewebsfasern zu.

Die Vorstellungen über intracelluläre Entstehung der Bindegewebsfasern hat zuerst *Flemming* (1897) in aller Ausführlichkeit entwickelt; er beschrieb, wie einzelne Teile des Mitoms sich zu faserigen Fibrillen ausbilden. Durch *Spuler* (1897) und *Golowinski* (1909) unterstützt, fand diese Lehre weiteren Ausbau bei *Mewes* (1911), der die chondriomale Natur der *Flemmingschen* Filarmasse sicherstellte. Die Chondriokonten schließen sich zu längeren Gebilden zusammen, rücken gleichzeitig an die Zelloberfläche und lagern sich dort als fertige Mesenchymfibrille ab.

Trotz mancher Bestätigungen (*Romeis* 1914, *Frederikse* 1917) wird von der Mehrzahl der Autoren (*Levi* 1911, *Dubreuil* 1913, *Laguesse* 1923, 1926, *Maximow* 1928) die Vorstellung, daß die Mesenchymfibrille aus protoplasmatischen Strukturen entstehe, abgelehnt. Es ist keinem gelungen, einen direkten Übergang der Elemente des Chondrioms in Bindegewebsfibrillen zu sehen. *Mewes* suchte dieses durch die Annahme zu klären, daß die Plastosomen während der kritischen Zeit eine chemische Umwandlung erfahren, die sie färbereich unsichtbar macht. Diese Annahme zu beweisen, ist *Mewes* nie gelungen. Auch das nähere Studium des chondriomalen Apparates der Bindegewebszelle in seiner Verteilung innerhalb des Zellkörpers macht seine Beteiligung an dem Vorgang der Fibrillengenese wenig wahrscheinlich (*Wassermann* 1928).

Obleich die Beteiligung des Chondrioms bei der Entwicklung der Fibrille allgemeine Ablehnung fand, bleibt die Vorstellung, daß die Mesenchymfibrillen innerhalb des Zellkörpers entstehen oder entstehen können, fast überall anerkannt. Den wenigen Befunden, die für die Entstehung der Fibrillen außerhalb des organisatorischen Bereiches der Zelle sprechen, stehen weit mehr Angaben über ihre intracelluläre Entstehung gegenüber. Dieses ist vor allem darauf zurückzuführen, daß es nicht allzu schwer ist, mit verschiedenen färbereichen Methoden sicher intracellulär gelagerte Fasersysteme zur Darstellung zu bringen.

So konnte *Maximow* (1902) und kurz danach *Mallory* (1904) im Corium und Perichondrium des Embryos, sowie im Granulationsgewebe und in Geschwülsten innerhalb der mesenchymalen Zellen feinste Faserstrukturen beobachten, die *Mallory* als „Fibroglia-fibrills“ bezeichnete. Ihre Stellung zur Zelle setzte er zu der der Gliafasern zu der Gliazelle in Analogie. *Coca* (1906) sah ähnliche Fasern in den Mesenchymzellen der Hühnerembryonen. *Tello* (1922) beschrieb argyrophile Netze innerhalb von Bindegewebszellen bei Säugetierembryonen, die vorübergehend auftreten und mit fortschreitender Entwicklung der kollagenen Fasern schwinden. Die Frage, ob diese Strukturen zur Entstehung der Mesenchymfibrillen in direkter Beziehung stehen, wurde nicht einheitlich entschieden. *Krauspe* (1912), *Laguesse* (1920), *Alfejew* (1926), *Plenk* (1927), rechnen die „Fibroglia-fibrills“ den argyrophilen Bindegewebsstrukturen zu, während *Meves* (1911), *Ferguson* (1911–1912) und *Maximow* (1915) eine gegenteilige Anschauung vertreten. Der letztere neigt dazu, die *Mallory*schen Fasersysteme eher den Tonofibrillen zuzurechnen, d. h. den von *Heidenhain* in Knorpel-, Epithelzellen usw. beschriebenen und von *Maximow* in Fibrocyten beobachteten langen, geschwungenen Fasern, die sich mit Eisen-hämatoxylin stark färben lassen und nach allgemeiner Meinung mechanische Bedeutung haben („Mechanofibrillen“ von *v. Tschermak*), ohne sich jedoch histogenetisch weiter entwickeln zu können.

Wenn man auch von dem Befund der sicher intracellulären Fasersysteme, deren Bedeutung wir noch nicht durchschauen können, absieht, bleiben immer noch große Schwierigkeiten in der Lokalisation der Fibrillenentstehung bestehen, wie es die Befunde von *Hansen* (1905), *Dantschakoff* (1908), *Fergusson* (1912), *Krauspe* (1922), *Yamasaki* (1928) u. a. zeigen. Es scheint hier der Beurteilung des Ortes der Entstehung der Mesenchymfibrille eine unüberwindliche Grenze gesetzt, die durch die Eigenart der zu untersuchenden Materie bedingt ist. Die Schwierigkeiten, die einer klaren Entscheidung im Wege stehen, sind so groß, daß die Forscher, die sich entschieden für die extracelluläre Genese der

Mesenchymfibrille einsetzen, wie z. B. *Wassermann* und *Heringa*, sich doch gezwungen sehen, auch eine intracelluläre Entstehung anzunehmen, oder wenigstens zu erwägen.

Mit vollem Recht behauptet *Plenk* (1927), daß an dem dem Histologen zur Verfügung stehenden Material so gut wie immer eine extra- und intracelluläre Entstehung der Fibrillen morphologisch „bewiesen“ werden kann. Seine Schlußfolgerung, daß „diese Frage durch Untersuchung und Berücksichtigung der Frühstadien allein überhaupt nicht zu lösen ist“, möchten wir dahin erweitern, daß die Erforschung im Spätstadium der Entwicklung ebensowenig zur Bestimmung des Ortes der Faserentstehung beitragen kann. Ein vollständig ausgebildetes mesenchymales Gewebe bildet zusammen mit seinem Fasergerüst eine Einheit, bei der die Trennung in einzelne Elemente zwecks histogenetischer Analyse nahezu eine Unmöglichkeit darstellt.

Wir sind überzeugt, daß wir die histogenetischen und strukturellen Verhältnisse innerhalb des fibrillenbildenden Mesenchyms nicht erfassen können, solange wir auf die Beurteilung der ausgebildeten Zustände angewiesen sind; uns scheint, eine Lösung des Problems ist nur zu erhoffen, wenn es gelingt, den Prozeß der Entstehung der Fibrille direkt „*in statu nascendi*“ zu betrachten.

Die erwünschten Bedingungen sind in Gewebekulturen gegeben, wo man nicht auf bloße Beurteilung von statischen Bildern angewiesen ist, sondern die fibrillenbildenden Vorgänge in ihrer Dynamik erfaßt werden können.

*Die Untersuchungen an Gewebekulturen sprechen entschieden für die ausschließliche Entstehung der Mesenchymfibrille außerhalb der Zelle.*

Die Ergebnisse der Arbeiten von *Maximow* (1929), *Huzella* (1929), *Olivo* (1930), *Momigliano-Levi* (1932) sind übereinstimmend und eindeutig.

Eine andere Darstellung finden wir in Untersuchungen von *M. Lewis* (1917) und von *Ludwig* (1930). Nach *Lewis* entstehen die Fasern ausschließlich innerhalb der Zellen. *Ludwig* scheint die *Lewis*schen Befunde der Entstehung der Fasern, die er Primitivfibrillen nennt und mit Tonofibrillen identifiziert, zu bestätigen. Wir schließen uns auf Grund unserer Untersuchungen der Meinung *Blooms* an, der mit vollem Recht behauptet, daß die meisten von *Lewis* beschriebenen Strukturen in das Bereich der Tonofibrillen gehören. Wir zweifeln auch nicht, daß die intracellulären Fasern, die *Ludwig* beschrieben hat — sofern nach seinen Bildern geurteilt werden kann —, zu den Tonofibrillen gerechnet werden müssen und glauben, daß sie von ihm zu Unrecht den Mesenchymfibrillen gleichgesetzt werden.

Im ganzen Verlauf unserer Untersuchungen haben wir niemals Anhaltspunkte für eine intracelluläre Entstehung der Mesenchymfibrille finden können. Die Bindegewebsfasern entstehen immer extracellulär, sei es dicht an der Zellgrenze, sei es in ihrer näheren Umgebung. Zwar sind die Verhältnisse in der Kultur mit ausgebildetem Fasergerüst ebenso



unübersehbar wie im Körper und erlauben ebensowenig eine klare Entscheidung, jedoch sind die Beziehungen zwischen den eben aussprossenden Zellen und den sich bildenden Fasern klar und unproblematisch. Jedes, auch das zarteste Fäserchen, läßt sich vom Augenblick seiner Entstehung an *exakt* von dem Zelleib abgrenzen.

Wenn man von der Entstehung von Fasern in der weiteren oder näheren Umgebung der Zelle absieht — ein Vorgang von grundsätzlicher Bedeutung —, und sich nur den an den Zellgrenzen sich abspielenden Vorgängen zuwendet, so zeigt sich auch hier die völlige Autonomie der entstehenden Fasern. Die ersten Fäserchen schmiegen sich oft den Zellgrenzen an, ahmen ihre äußeren Formen nach, lassen sich aber immer von dem Zelleib abgrenzen und gehen nie durch die Zelle selbst hindurch. Bei Zusammenziehung der Zelle und der Zellfortsätze bei ihrer Fortbewegung sowie bei der die Mitose begleitenden Zellumgestaltung bewahren sie ihre vollständige Unabhängigkeit.

Die Verhältnisse liegen in den Gewebekulturen um so klarer, als sich bei der Azanfärbung sowie bei Versilberung keine intracellulären Faserstrukturen (*Mallorysche „Fibroglia-fibrills“*, *Tellosche Silbernetze*) darstellen lassen. Da die mit diesem Verfahren behandelten Zellen „optisch leer“ erscheinen, ist jede Verwechslung und Mißdeutung ausgeschlossen.

In mit Eisen-Hämatoxylin gefärbten Kulturen sieht man oft in der Zelle längere, sich nicht verzweigende, sehr dünne fibrilläre Züge, die vollkommen den *Heidenhainschen* Tonofibrillen gleichen. Diese Fibrillen weisen, wie sich immer feststellen läßt, *keinerlei* Beziehungen zu der Mesenchymfibrille auf. Sie unterscheiden sich grundsätzlich in Lage, Form und Beschaffenheit von ihnen; es finden sich auch keine Übergänge zwischen ihnen und Bindegewebsfasern.

Desgleichen zeigt sich nach entsprechender Bearbeitung (Vitalfärbung mit Janusgrün, Färbung mit Eisen-Hämatoxylin nach vorangehender Fixierung mit Osmiumgemischen), daß zwischen dem Chondriom der Zelle und dem Vorgang der Fibrillenbildung keine morphogenetischen Beziehungen bestehen. Das Chondriom liegt in Form von Stäbchen und Granula ausschließlich in der Mitte des Zellkörpers; die Randzone der Zelle — das Ektoplasma —, das nach vielfach geäußerter Ansicht für die Bildung von Fasern in Frage kommen könnte, ist immer frei von Plastosomen. Ebenso lassen sich keine Parallelen zwischen dem Aktivitätszustand, in dem sich das Chondriom befindet, und der Intensität der Faserbildung aufstellen.

*Der sich mit größter Intensität in Kultur abspielende fibrillenbildende Prozeß verläuft in näherer oder weiterer Umgebung der Zelle; es finden sich aber keinerlei Anzeichen dafür, daß dieser Vorgang innerhalb des Zellkörpers vor sich gehen kann: die Fibrillen entstehen nie in der Zelle selbst.*

## 3.

Ebenso entscheidend ist eine zweite, auf Grund von Erfahrungen an Gewebekulturen zu erhebende Feststellung:

Die Bindegewebsfibrillen können nicht nur außerhalb der Zellen entstehen, sondern darüber hinaus *in einer „Grundsubstanz“, die in keiner morphogenetischen Beziehung zum Protoplasma steht oder jemals gestanden hat.*

Wir haben in der Einleitung bereits dargelegt, daß die Mehrzahl der Autoren (*Studnička* 1903, *Hansen* 1905, *Laquesse* 1921, *Zawarzin* 1926) u. a., ohne die intracelluläre Fibrillogenese abzulehnen, zur Annahme einer extracellulären Faserentstehung neigt. Bewußt oder unbewußt von der Vorstellung geleitet, daß eine echte histogenetische Differenzierung nur in einem *lebenden* Substrat stattfinden kann, verlegen die meisten Autoren den Vorgang der Fibrillenentstehung in die Nähe der Zellumgebung, in die protoplasmatischen Lamellen, Exoplasmen oder in die Grundsubstanz selbst, die — als Abkömmling des Protoplasmas aufgefaßt — voll oder begrenzt die Eigenschaften des Lebens besitze. Die stoffliche Grundlage der Substanz, in der die Faserbildung sich abspielt, ist stets ursprüngliches Zellprotoplasma oder ein Produkt seiner Umwandlung (*Wassermann* 1928). Auf diese Weise kommt man zum paradox klingenden Schluß, daß die Fibrillenbildung stets intraplasmatisch vor sich geht, selbst wenn sie extracellulär stattfindet.

Den Versuchen, die in der Materie liegenden Schwierigkeiten durch mehr oder weniger gezwungene Hypothesen zu überbrücken, wird sofort die Notwendigkeit genommen, wenn man sich der Gewebezüchtung als Arbeitsmethode bedient. *Die in der Kultur in größerem Ausmaße extracellulär stattfindende Fibrillenbildung läuft in einem Substrat ab, das mit einer Grundsubstanz im Sinne Wassermanns, Studničkas, Laquessees u. a. nicht das geringste zu tun hat.*

Die eingehendste Untersuchung der lebenden Zellkolonien und gefärbten Kulturen zeigt immer wieder einwandfrei, daß die Zellen einschließlich ihres äußersten Ektoplasmas stets scharf von dem umgebenden plasmatischen Milieu abgegrenzt werden können. Ebenso sind die protoplasmatischen Fortsätze und die Membranen, die sich von den Zelleibern ausbreiten, immer als solche deutlich von der Umgebung zu unterscheiden. Nie lassen sich protoplasmatische Bildungen feststellen, die den exoplasmatischen Lamellen von *Laquesse* oder Exoplasmen von *Studnička* entsprechen könnten.

*Das Feld, auf dem die Fibrillenbildung sich abspielt, ist immer das Nährbodenplasma selbst, in ursprünglichem oder durch die Lebenstätigkeit der Kultur verändertem Zustand. Nur dort, dicht an den Zellgrenzen, aber ebensooft in ihrer weiteren Umgebung, finden sich ihre ersten Anfänge, geht ihre weitere Entwicklung fort.*

Diesen unter fast schematisch übersichtlichen Bedingungen der Kultur gemachten Beobachtungen kommt eine grundsätzliche *allgemeine Bedeutung* zu. Wenn auch Wassermann sich nicht durch die „überraschenden“ Ergebnisse der Gewebezüchtung (in seiner Besprechung der Maximowschen Befunde) gezwungen fühlt, den „durch die histogenetischen Studien geschaffenen, sicheren Boden zu verlassen“, so sehen wir keine Veranlassung, die sicher extraplasmatische Entstehung der Fasern in Gewebekulturen als einen Ausnahmefall zu betrachten, denn — wir haben es schon in der Einleitung betont — wenn auch die *äußeren Formen* des Vorganges *in vitro* von denen *in vivo* verschieden sind, so liegt kein stichhaltiger Grund zu der Annahme vor, daß auch die beherrschenden *Prinzipien* verschiedener Natur seien. Die Tatsache, daß die Fibrillen in Gewebskulturen *extraplasmatisch* entstehen, ist zwingend genug, um ein für allemal „der spekulativen Verwischung der Unterschiede zwischen Protoplasma und Grundsubstanz“ (Plenk) ein Ende zu machen und die Gesamtfrage auf wissenschaftlich gesichertem Boden zu erörtern.

#### 4.

*Der Vorgang der Fibrillengenese geht also nicht intracellulär vor sich, er muß sich auch nicht innerhalb der durch Protoplasmaumwandlung entstandenen Grundsubstanz abspielen; die Fibrillen entwickeln sich in der Kultur frei in dem zwischen den Zellen liegenden plasmatischen Medium.*

Das eigentliche Problem, das noch der Lösung harrt, ist folgendes: Welche Rolle spielt die Zelle bei dem Vorgang der Fibrillenentstehung und was ist die Funktion des den Zellen in Kultur zugefügten Mediums, das wir der natürlichen Grundsubstanz in bezug auf die histogenetischen Potenzen gleichstellen müssen. Die beiden Fragenkomplexe sind so innig miteinander verbunden, daß sie nur im Zusammenhang miteinander besprochen werden können.

Es kann nicht bezweifelt werden, daß der Zelle bei dem Vorgang der Fibrillenbildung eine entscheidende Rolle zukommt. Der bloße Vergleich eines zellhaltigen Koagulums mit seinem weit entwickelten Fasergerüst mit einem entsprechend bebrüteten zellfreien Gerinnsel — in dem es bestenfalls zur Entwicklung einer netzigen Fibrinstruktur kommt — veranschaulicht die ausschlaggebende Bedeutung der Gegenwart einer Zellkolonie. Nicht weniger überzeugend wirkt die Verteilung der Fasern innerhalb der Kultur selbst mit ihrer stärksten Verdichtung im Bereiche der dichten Zellansammlungen und ihrer fortschreitenden Abnahme nach der Peripherie der Kultur hin. Auch die Beobachtung, daß die Fibrillen mit Vorliebe in unmittelbarer Nachbarschaft der Einzelzelle auftreten, spricht eindeutig für eine Beteiligung der Zelle bei diesem Vorgang. *Die Fibrillenbildung ist eine Funktion der Zellkolonie.* Über den Mechanismus dieses Vorgangs, über die Art und Weise,

wie unter dem Einfluß der Zellen die Bindegewebsfibrille entsteht, lassen sich vorläufig nur Vermutungen äußern.

Zwei Möglichkeiten der Art der Zellbeteiligung bei dem fibrillenbildenden Prozeß sind denkbar:

1. Die Zellen scheiden selbst Kollagen oder kollagenähnliche Substanzen aus, die in der Nähe der Zelle in faseriger Form ausfallen.
2. Die Zellen wandeln das sie umgebende interplasmatische Substrat zu Kollagen um.

Die Vorstellung, daß die Zelle das Kollagen als solches ausscheidet, ist zwar mehrfach in älteren Arbeiten erwähnt, und auch in neuerer Zeit von *Heringa* (1926) — in zwar etwas unbestimmter Form: „Le sol collagène doit ses micelles caractéristiques aux cellules conjonctives, aux fibroblastes“ — in den Bereich der Möglichkeit gerückt worden, hat aber im großen und ganzen keinen Anklang gefunden.

Ein Übergang von Stoffpartikelchen aus der Zelle in das umgebende Medium wurde von keiner Seite beobachtet. Der Umstand, daß das Chondriom bei der Fibrillenbildung sich im Zustande erhöhter Tätigkeit befindet (*Dubreuil* 1913), eine Erscheinung, die wir in Kulturen nicht beobachten konnten, erlaubt keine bindenden Schlüsse, da diese Tätigkeit sich auf die Bildung verschiedenster Stoffe beziehen könnte. Die einzige Grundlage dieser Annahme könnten die Beobachtungen von *M. Lewis* bilden, die die Fibrillenbildung in Kulturen beschrieb, die in Salzlösung angesetzt waren. Diese Versuche können doch nicht in diesem Sinne verwertet werden, weil einmal die *Locke-Lewissche* Flüssigkeit Bouillon enthielt und zweitens die frisch explantierten Gewebestücke eine gewisse Menge von Zwischensubstanzen mit in die Kultur bringen, deren Differenzierungspotenzen außer Zweifel stehen.

Eigene Befunde mit ausgewachsenen Gewebstüchchen zeigen, daß die Fibrillenbildung (wenn man von der Bildung der Tonofibrillen absieht, die die Hauptmenge der bei *Lewisschen* Kulturen entstandenen Fibrillen bilden), nach dreistündiger Durchspülung ganz kleiner Gewebsfragmente mit *Ringerscher* Lösung weitgehend aufgehoben werden kann.

Die Mehrzahl der Autoren, die eine Fernwirkung der Zelle auf den Vorgang der Fibrillenbildung annehmen, vertreten die Anschauung, daß bei diesem Prozeß die Zellen nicht das Kollagen als solches, sondern gewisse Substanzen ausscheiden, die sich nachträglich in Kollagen umwandeln. So meint *Schaffer* (1933), die Zelle nehme an der Fibrillenbildung teil, indem sie „durch einen Sekretionsvorgang, den wir mikroskopisch bis jetzt noch nicht verfolgen können, das Material zum Aufbau und Anbau“ der fibrillenbildenden Substanz liefert. *Rössle* und *Yoshida* (1909) betrachten „die Gitterfasern als Ausscheidungsprodukt von Zellen“. Zur Zeit der Ausscheidung ist die Gitterfasermasse flüssigfähig. Sie erstarrt erst nachträglich in der umgebenden Flüssigkeit zu festeren Gebilden. Auch für *Maurer* (1915) bildet die Zelle bei Fibrillo-

genese den „Ausgangspunkt, indem sie in besonderer Form gewisse Substanzen synthetisch aufbaut und ausscheidet“. *Biedermann* (1917) stellt sich die morphogenetische Funktion der Zelle in der Art vor, daß „die vorhandenen Zellen fortdauernd neues, gelöstes Bildungsmaterial“ für die Fibrillenbildung liefern („geformte Sekrete“).

Diese Vorstellungen führen uns unmittelbar weiter. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Zellen sich maßgebend an dem Aufbau des Substrats, in dem die Fibrillenbildung stattfindet, beteiligen können. Diese formative Tätigkeit der Zelle muß aber nicht unbedingt an die Bildung einer *direkten* Vorstufe des Kollagens gebunden sein.

Unsere Beobachtungen sprechen dafür, daß die Funktion der Zellen bei dem Prozeß der Fibrillogenese hauptsächlich in der Umformung der intercellulären Masse besteht. Das Studium der Genese der Fibrillen in der Kultur zeugt immer dafür, daß *die Umwandlungsprozesse an dem umgebenden Medium bei der Entstehung der Kollagenfibrille eine grundlegende Rolle spielen müssen.*

## 5.

Es kann nicht nachdrücklich genug betont werden, daß *der Vorgang der Explantation selbst ein auslösendes Moment für intensivste Fibrillenproduktion darstellt.* Die Gewebe, die *in vivo* gewöhnlich nur ein spärliches Fibrillengerüst bilden, werden in dem Augenblick, in dem sie in das Plasma der Kultur kommen, zu höchster fibrillenbildender Tätigkeit angeregt. Es entwickeln sich dichteste kollagene Faserlager, wie wir sie sonst nur in Ausnahmefällen (z. B. bei Narbenbildung) sehen.

Da wir aus der gesamten gewebezüchtlerischen Erfahrung wissen, daß die Zellen in Kultur wenig zur Differenzierung neigen, sondern daß der Explantationsreiz sich eher als Dedifferenzierungsfaktor auswirkt, so muß in diesem Ausnahmefall die Erklärung für die erhöhte Fibrillentätigkeit in der Auslösung spezifischer Wechselbeziehungen zwischen Zelle und umgebendem Plasma gesucht werden. *Die Erfahrungen an Gewebekulturen lehren immer wieder, daß der fibrillenbildende Prozeß immer eine Folge der direkten Fühlungnahme zwischen Zelle und umgebendem plasmatischem Milieu darstellt.*

Das zeigt auch folgender Versuch: Setzt man eine Kulturhälfte in ein Medium, dem unverdünntes Plasma zugrunde liegt, und die andere in eine stark verdünnte Plasmalösung (1:15), so ist die Faserbildung im konzentrierten Plasma bedeutend stärker als im verdünnten.

Wir haben in Kapitel 4 dieser Arbeit dargelegt, daß die fibrillenbildenden Prozesse von Organisationsvorgängen im Plasmagerinnsel, die durch die Anwesenheit der Kultur bedingt werden, oft gar nicht zu trennen sind, daß die Fibrillenbildung, falls sie nicht als Folge des Plasmaabbaues auftreten, sich als eine lokale Kondensierung der sich

diffus im Plasma abspielenden Organisationsprozesse sich äußert. Der Übergang der plasmatischen Strukturen zu kollagenen Fasern ist völlig kontinuierlich; die sich entwickelnden Netze der Mesenchymfibrillen sind von den ursprünglichen Plasmastrukturen kaum zu trennen. Diese Beobachtung zeugt ebenfalls eindeutig für die innige genetische Beziehung zwischen den neugebildeten Bindegewebsfasern und dem Substrat, in und aus dem sie entstehen.

Die Einwirkung der Zelle auf das Plasma kann *mechanisch* oder *chemisch* gedacht werden. Es ist denkbar, daß die Zellen in ihrer Umgebung gewisse Spannungszustände schaffen, unter deren Einfluß sich das intercelluläre Milieu umbildet, oder daß sie gewisse Stoffe (wahrscheinlich fermentativer Natur) sezernieren, die das umgebende Milieu in Kollagen umwandeln.

Die Bedeutung von Spannungszuständen für die Morphogenese der Fasern wurde auch in letzter Zeit wohl auf Grund der neuesten Forschungsergebnisse auf dem Gebiete der Physik faseriger Stoffe stark betont (*Giersberg* 1921, *Huzella* 1925). Wir wissen, daß man durch Einfluß von Zug und Druck den Micellen mancher faserbildenden Gele eine gewisse Orientierung verleihen kann, die die Ausbildung faseriger Strukturen ermöglicht oder bedingt (*Mark, Herzog*). Die Versuche von *Collin* (1928) haben ferner gezeigt, daß unter Spannung gestellte Substrate (z. B. Gelatine) ihre färberischen Eigenschaften und morphologische Beschaffenheit weitgehend ändern können.

Andererseits aber hat uns die moderne physikalische Chemie gelehrt, daß die Eigenart der sich in faseriger Form ausscheidenden chemischen Komplexe auch in der Eigenart der sich bildenden Micellen bedingt sein kann. Es wurde gezeigt, daß in den sog. „Stäbchensolen“ über eine Aneinanderreihung der Micellen hinaus auch ein *spontanes* Zusammenschließen der Fibrillen zu parallelfaserigen Bildungen vorkommt (*Szegvari* 1924, *Zocher* 1925, *Herringa* und Mitarbeiter). Der Anstoß zur Fibrillenbildung muß also nicht unbedingt von außen kommen, sondern kann in dem chemischen Substrat selbst liegen.

Das unter Spannung gestellte plasmatische Gerinnsel wandelt sich — wie wir in Kapitel 2 auseinandersetzen — in einen straff gerichteten Faserkomplex um. *Baitsell* (1917), der als erster diese Veränderungen am Plasmagerinnsel beschrieb, vertritt die Meinung, daß dieser Faserkomplex dem echten kollagenen Fasernetz gleichgestellt werden muß. Seiner Auffassung nach geht das unter Spannung gesetzte Fibrin direkt in Kollagen über.

Die Analyse der unter Spannung entstandenen Fasersysteme zeigt eindeutig, daß, obwohl weitgehende Änderungen der morphologischen und chemischen Eigenschaften des Fibrins hier auftreten, obwohl die

neu entstandenen Fasern im Aussehen und färberischen Verhalten an Kollagen erinnern, doch von einer wirklichen Analogie dieser beiden Substanzen keinesfalls die Rede sein kann (gute Färbbarkeit der Spannungsstrukturen nach *Weigert*, leichte Verdaulichkeit durch Trypsin, morphologisch ungenügende Ausreifung).

Unserer Meinung nach handelt es sich bei diesem Umwandlungsprozeß um eine Erscheinung, die wir seit den klassischen Untersuchungen *v. Ebners* gut kennen.

*v. Ebner* (1897) setzte Eiereiweiß-, Gummi- und Leimfäden unter orientierenden Zug und brachte sie in Alkohol zum Erstarren. Auf diese Weise gelang es ihm, fibrilläre Strukturen darzustellen, die stark an Bindegewebsfasern erinnerten. In neuerer Zeit ist *Giersberg* auf Grund von Untersuchungen über die Schalenhautfasern der Reptilien- und Vogeleier zu ganz ähnlichen Resultaten gelangt. Bei der Bildung der Eihüllen entsteht zunächst eine klebrige kolloide Masse, aus der sich nachträglich, unabhängig von jedem gestaltenden Einfluß lebender Zellen infolge der Zugwirkung, der die Eier während ihrer Rotation im Eileiter ausgesetzt sind, die Fibrillen differenzieren. Wie *v. Ebner* versuchte auch *Giersberg* diesen Vorgang experimentell nachzuahmen. Er benutzte dazu Stücke des *Ligamentum nuchae* oder der Schalenhaut von Reptilien, die er durch Behandlung mit Kalilauge in eine amorphe kolloide Masse verwandelte und dann mit Essigsäure wieder zum Erstarren brachte. Ließ er auf diese Masse während der Neutralisierung eine Zugspannung einwirken, so trat in deren Bereich beim Erhärten Faserbildung auf. *Huzella* (1925) konnte unter mechanischer Zugwirkung in fixiertem Zellsekret außerhalb des Körpers „typische argyrophile Faserkonstruktionen“ nachahmen. Er berichtet über Erzeugung der Fasern in unter hohem Druck aus der gereizten Manteldrüse der Weinbergschnecke hervorschießendem Sekret. *Bresslau* (1928) sah, daß in den Eikapseln einer Landplanarie unter der mechanisch als Zugspannung zu bewertenden Saugwirkung des Embryonalpharynx, die eingesogene Dottermasse fibrilläre Struktur annahm.

Es steht außer Zweifel, daß die durch Zug bewirkte Plasmaumwandlung in den Bereich der beschriebenen Erscheinungen gehört. Das Fibrin kann unter mechanischer Einwirkung eine Umwandlung in gerichtete Fasersysteme erfahren, ähnlich wie zahlreiche andere Substanzen (Gummi, Leim, Schleim, Eiereiweiß) von entsprechender physikochemischer Konstruktion. Es liegt aber keine Veranlassung vor, den Vorgang der Umwandlung des Fibrins *in vitro* dem morphogenetischen Geschehen bei der Fibrillenbildung im Körper oder in der Zellkultur *gleichzustellen*. Wenn sich auch gewisse Vergleichspunkte zwischen den Spannungsversuchen und den histogenetischen Prozessen *in vivo* ergeben, so liegt kein logischer Zwang vor, *allein* an Hand mancher bestehender Analogien eine Erklärung für den Vorgang der Fibrillogenese zu geben <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Wir möchten hier betonen, daß im Gegensatz zu den voreiligen Schlüssen der späteren Autoren *v. Ebner* selbst seine Ergebnisse mit größter Vorsicht auswertete. „Es ist vorläufig nicht möglich — schrieb er — direkt nachzuweisen, daß tatsächlich während der Bildung der Fibrillen die theoretisch geforderten Spannungen bestehen, und es sind nur Wahrscheinlichkeitsgründe, die man dafür geltend machen kann“ (1906, S. 56).

Das Studium der Verhältnisse in der Kultur spricht eher dafür, daß der Vorgang der Fibrillenbildung *in keiner Weise mit den in der Kultur herrschenden Spannungskräften in Zusammenhang gebracht werden kann*.

Der Versuch, in Kulturen sich über die Rolle der Spannung Rechenschaft zu geben, kann ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden. Die ursprünglichen Fibrinstrukturen im Plasma geben ein genaues Bild der in dem Medium herrschenden Spannungsverhältnisse; ihr Studium gibt beim Vergleich mit der Richtung der sich bildenden Mesenchymfibrillen eine Möglichkeit, die Bedeutung der Spannungen für deren

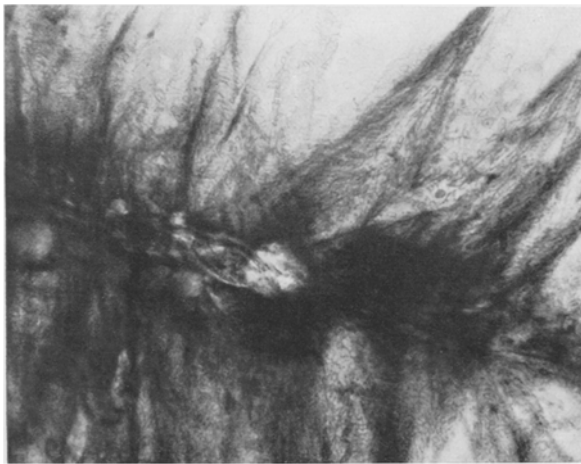


Abb. 37. 7 Tage alte Fibroblastenkultur. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Genese auszuwerten. Die Abb. 37 zeigt uns eine Zelle mit ihrem umgebenden Kraftfeld. Die ursprünglich netzige Struktur des Plasma-koagulums erfährt in der Nähe der Zelle eine starke Veränderung. Die durch Zellen erzeugten Spannungszustände wirken auf das Fibrinnetz, indem sie die einzelne Fibrinfibrille dem Verlauf der Spannungslinien einordnen. Wie aus der Abbildung deutlich zu ersehen ist, verlaufen alle zu Fibrillenbündeln zusammengeschlossenen Fädchen *senkrecht* zu der Längsachse der Zelle. Der Verlauf der neu entstandenen Mesenchymfasern stimmt keineswegs zu der Verteilung der Spannungskräfte, wie sie die Anordnung der Fibrinfäden so deutlich widerspiegelt. Die Mesenchymfibrille entsteht in der Nähe der Zelle immer *parallel* der Längsachse des Fibroblasten.

Wenden wir uns dem Studium der früher mehrfach beschriebenen diffus auftretenden Netze mesenchymaler Fibrillen zu, so finden sich auch dort keinerlei Anzeichen dafür, daß sie unter der Wirkung



irgendwelcher im Plasma bestehenden Spannungszustände stehen. Die fibrillären Netze entstehen ganz diffus und zeigen keine gerichtete Orientierung.

Die unter der speziellen Fragestellung der Bedeutung der Spannung für die Orientierung der Fasersysteme angestellten Untersuchungen gaben uns Gelegenheit, über die morphogenetische Rolle der Spannung auch einen *direkten* Überblick zu bekommen. Die Kulturen, die mit Hilfe einer besonderen Vorrichtung unter verschiedenen gerichteten Spannungen gezüchtet wurden, *zeigen nie eine verstärkte Bildung von Mesenchymfibrillen in der Spannungsrichtung*. Die Verteilung der neu auftretenden Faserstrukturen entspricht durchaus der Verteilung der Zellmasse innerhalb der „gerichteten“ Zellkolonie.

So leicht die Unabhängigkeit der Mesenchymfibrillen von den Spannungszuständen im Moment ihrer Entstehung sich beweisen läßt, so schwer sind die genetischen Beziehungen zwischen Zelle und Fibrille am voll entwickelten Fasergerüst zu überblicken. Dieses steht unter dauernden, von den Einzelzellen und der Gesamtheit der Kultur ausgehenden, mannigfachen gestaltenden Einwirkungen. Die Zellen orientieren die Fasern im Bereich und im Sinne ihres Kraftfeldes, die Kultur als Ganzes ordnet sie zu einer großen architektonischen Einheit.

*Die mechanische Wirkung der Zelle beschränkt sich also auf eine Richtung der fertigen Faserstrukturen, hat aber auf den Vorgang ihrer Entstehung keinen nachweisbaren Einfluß.*

## 6.

So kommen wir zum Schluß, daß der Vorgang der Fibrillengenese am ehesten *durch von der Zelle ausgehende stoffliche Einwirkung auf das umgebende Medium zu deuten ist, daß das intercelluläre Milieu unter dem Einfluß von den Zellen ausgeschiedenen Sekreten sich zu Kollagen umwandelt*. Die Nageotteschen Vorstellungen bekommen so durch Versuche an Gewebekulturen eine experimentelle Unterstützung und Bestätigung.

Die Frage, welche Substrate unter der Einwirkung der fraglichen Zellsekrete sich zu Kollagenstrukturen umwandeln können, läßt sich experimentell angreifen. Schon Nageotte (1930) hat ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Anschauung *Baitsells* von der ausschlaggebenden Bedeutung des Fibrins für die Faserentstehung unbegründet ist. Zwar räumt Nageotte den Vorgängen der Fibrinumwandlung bei den Prozessen, die zur Bildung der kollagenen Fasern führen, eine große Rolle ein. Er konnte aber zeigen, daß ebensogut totes Cytoplasma der Knorpelzelle (1922) sowie anderes organisches Material [*Schwannsche* Scheiden in einem auswachsenden Nerven (1916)] als faserbildende Substanzen in Betracht kommen. Der Umwandlung in gelöste Eiweißstoffe der

Körpersäfte kommt bei der Kollagenbildung sogar die wesentlichste Rolle zu.

Die große Bedeutung des im Plasma enthaltenen Fibrins bei Umwandlungsprozessen des intercellulären Milieus der Kultur zu Kollagen unterliegt keinem Zweifel. Wir haben mit Ausführlichkeit gezeigt, wie innig die ursprünglichen Fibrinstrukturen mit den in der Kultur entstehenden Mesenchymfasersystemen verbunden sind.

Andererseits haben die Versuche von *Momigliano-Levi* (1932) überzeugend bewiesen, daß die Fibrillenbildung auch in den mit *fibrinfreiem* Serum angesetzten Kulturen sich abspielt. Wir haben aus anderem Anlaß diese Versuche wiederholt und können die Ergebnisse von *Momigliano-Levi* voll bestätigen. Darüber hinaus ergaben unsere Versuche mit anderen Kultursubstraten, daß sich auch in diesen Fibrillen entwickeln.

Wir haben versucht, die Kulturen auf Agar-Agar mit geringem Zusatz von Embryonalextrakt zu züchten; obwohl die Zellen sehr ungern auf diesem Medium proliferieren, gelingt es manchmal, ein spärliches Wachstum der angesetzten Fragmente zu erhalten. Die Agar-Agar-Kulturen erwiesen sich in diesen Fällen als fibrillenhaltig.

*Die Art des Substrats, aus dem die Fibrillen hervorgehen, scheint von sekundärer Bedeutung zu sein. Es sind verschiedenartige Eiweißkomplexe, die unter dem Einfluß der Zelltätigkeit sich zu Kollagen umwandeln können.*

Die Überlegung, welche Eiweißstoffe *im lebenden Körper* die Umwandlung durchmachen, muß vorläufig ergebnislos bleiben. Ihre Bedeutung für unsere Fragestellung ist auch gering. Wir wissen ja, daß die „fibrillengebende“ Substanz im Körper nicht einheitlich ist. Indem wir sie ganz allgemein der *Intercellularmasse* gleichstellen, erkennen wir zugleich, wie zahlreich die Stoffe sind, die sie zusammensetzen. Wir haben keinen Grund, bei dem Vorgang der Fibrillenentstehung einem seiner Bestandteile (gelöste Eiweißstoffe, die aus Blut und Lymphe stammen, Produkte der Zellausscheidungen, *auch* totes oder metamorphosiertes Zellprotoplasma, Kittsubstanzen im Sinne *Schaffers*) einen Vorrang einzuräumen.

Eine gewisse Einschränkung erfährt diese Feststellung vielleicht nur in bezug auf das *Fibrin*. Die große Verwandtschaft seiner physikalisch-chemischen Beschaffenheit mit der des Kollagens macht die Annahme wahrscheinlich, daß bei dem Vorgang der Bildung der Kollagensubstanz unter normalen und pathologischen Bedingungen das Fibrin manchmal eine wesentlichere Rolle spielen könnte. Das gesamte Geschehen in der Kultur, die Beobachtungen von direktem Übergang der Fibrinstrukturen in das System der kollagenen Fasern sprechen ebenso dafür. Es ist vielleicht nicht ausgeschlossen, daß die übermäßig starke fibrillenbildende Tätigkeit der Zellkolonien *in vitro* auf dem Umstand beruht, daß das fibrinreiche Plasma als besonders förderndes Substrat den Zellen zugeführt wird. Die Beobachtungen an den Kulturen zeigen aber, daß sogar Fibrin oft nicht als solches, sondern nur nach vorheriger Umbildung (s. S. 298) in Kollagen übergeht.

Wenn aber auch dem Fibrin eine gewisse bevorzugte Stellung bei der Kollagenbildung zukommt, so können wir doch die in der Einleitung

ausgesprochene Behauptung, daß kein Grund vorliegt, „das ungemein mannigfach zusammengesetzte interplasmatische Milieu nicht als einheitliche Realität zu betrachten“, jetzt — als experimentell bestärkt — wiederholen und aufrechterhalten.

Die Entscheidung über die Art des Stoffes, mit dem die Zelle die Fibrillenbildung bewirkt, kann schwer getroffen werden. Es liegt am nächsten, anzunehmen, daß es ein gewisses Ferment ist, das den entscheidenden Beitrag liefert.

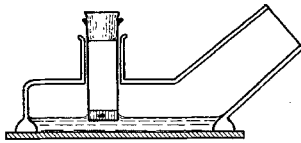


Abb. 38. Carrel-Flasche für Diffusionsversuch.

Die Beobachtungen bei dem Vorgang der Entstehung der Fibrillen zeigen, daß die Wirkung des fraglichen Stoffes die Eigenart hat, sich fast ausschließlich in unmittelbarer Nähe der Zelle zu äußern.

Ob diese Erscheinung auf seiner leichten Zerstörbarkeit innerhalb der Kulturmedien oder auf seiner geringen Diffusionsfähigkeit beruht, müssen wir dahingestellt sein lassen. Die manchmal auftretenden diffusen Umwandlungen mancher plasmatischen Bezirke zu Mesenchymfasernetzen, auch in weiterer Entfernung der Zellkomplexe, sprechen bei begleitender Auflockerung des Plasmas eher für die zweite Deutung.

Es liegt nahe, zur Stützung der Behauptung, daß die Zellwirkung auf humoralem Wege bzw. fermentativem Wege sich äußert, die Wirksamkeit dieses hypothetischen Stoffes *getrennt* von der Zelle zu prüfen.

Schon die Beobachtungen an dem Prozeß der Plasmaveränderung unter der Einwirkung der von der Zelle ausgeschiedenen Stoffe in einer Zellkultur selbst erlaubt weitgehende Schlüsse. In diesem Zusammenhang wollen wir an eine in Kapitel 4 gegebene Beschreibung erinnern. Wir haben dort geschildert, wie sich in der Kultur neben dem Vorgang der Bildung von Bindegewebsfibrillen auch allgemeine Plasmaumwandlungsprozesse abspielen. Diejenigen Bezirke des Plasmas, die sich in unmittelbarer Nähe der Kolonie befinden, erfahren im Gegensatz zu der Plasmaperipherie Veränderungen, die in fortschreitender Auffaserung und in einem Farbumschlag (Färbbarkeit mit Azan, keine Weigertsche Fibrinreaktion) sich äußern und mit dem Vorgang der Fibrillengenesse innigst verbunden sind. *Da diese Veränderungen des Plasmas sich ohne Kontakt mit den Zellen abspielen, ist die humorale Fernwirkung der Kultur auf das Gerinnsel zwingend anzunehmen.*

Die Wirksamkeit der von den Zellen ausgeschiedenen Stoffe auf das Plasmakoagulum kommt am stärksten zum Ausdruck in folgenden zwei Versuchen:

1. Ein Gewebestück wird von einem Plasmamantel umgeben und in besonderen Gefäßen (Doljanski 1933) in verdünnten Embryonalextrakt getaucht. Nach 7 Tagen ist das Wachstum der Zellen noch äußerst spärlich. Dagegen erfährt das umhüllende Plasma unter dem Einfluß des Gewebefragmentes eine weitgehende Umbildung.

2. Eine Carrel-Flasche wird in der Weise verändert, daß mittels eines Ansatzes mit Glasfilterboden (Schott, Jena) Plasma und Kultur getrennt gehalten werden (Abb. 38). Die trennende Glasschicht ist 1 mm dick, ihre Poren genügen, um wohl Zellen, aber nicht kolloidalen Micellen die Passage zu verbieten.

Die weitere Behandlung der Kulturen und des Plasmas bei diesen Versuchen erfolgte in üblicher Weise.

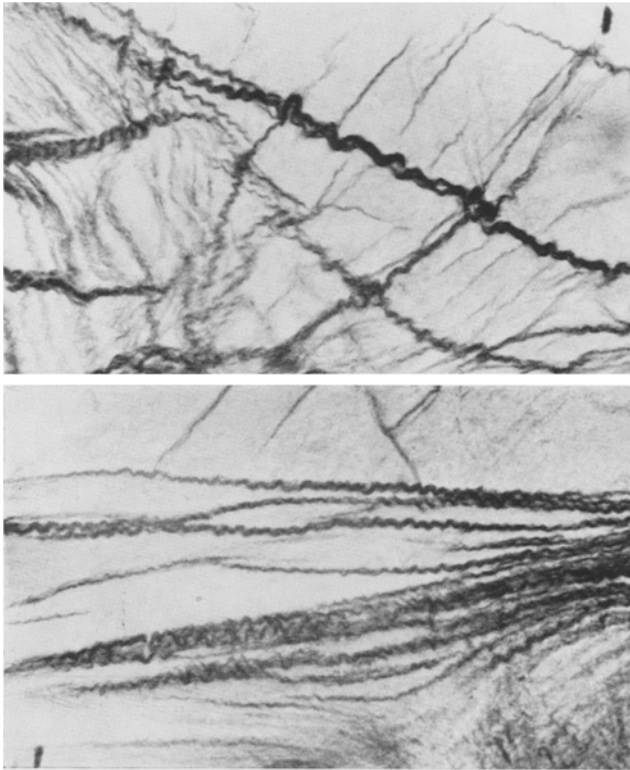


Abb. 39. Azan-Präparat. Immer.  $\frac{1}{12}$ . Ok. 8. Leica-Aufnahme.

Hier dringen die von der Zellkolonie ausgeschiedenen Stoffe *unmittelbar* in ein sicher zellfreies plasmatisches Milieu ein. Das Ergebnis der Versuche ist klar und eindeutig.

Wir finden *das Plasmakoagulum durchsetzt von fibrillären Bildungen, die den echten kollagenen Fasern vollkommen ähnlich sehen*. Es handelt sich hier um größere und kleinere Faserbündel von ausgesprochen welliger Beschaffenheit und dichtem Aufbau. Sie verlaufen vollkommen unabhängig von den ursprünglichen Fibrinstrukturen und können öfters sich pinselartig aufsplintern. Sie färben sich mit Azan intensiv blau, mit Weigertscher Fibrinfärbung lassen sie sich *nicht* darstellen (Abb. 39). Obwohl sie nicht die volle Resistenz der ausgebildeten

Kollagenfibrille gegenüber dem Trypsin besitzen, steigt ihre Unverdaulichkeit bedeutend mit fortschreitender Reifung.

Es gelingt also, in einem *in vitro*-Versuch ohne unmittelbare Gegenwart von Zellen in ursprünglich kaum organisiertem Hühnerplasma-koagulum durch humorale Fernwirkung der Zellen Strukturen zu erzeugen, die mit fortschreitender Entwicklung die Eigenschaften des Fibrins mehr und mehr verlieren, um allmählich die Charakteristika des Kollagens anzunehmen; diese zunehmende Ausbildung der Eigenschaften, die fertigen Kollagenfasern zukommen, ist ein auch für die Entstehung der Bindegewebsfaser *in vitro* charakteristischer Vorgang.

### Schrifttum.

- Alfejew, S.*: Über die embryonale Histogenese der kollagenen und retikulären Fasern des Bindegewebes bei Säugetieren. *Z. Zellforsch.* **3**, 149 (1926). — Beiträge zur vergleichenden Histologie des Blutes und des Bindegewebes. V. Über die entzündliche Histogenese des Bindegewebes beim Frosche. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **9**, 234 (1927). — *Baitsell, G.*: The origin and structure of a fibrous tissue which appears in living cultures of adult frog tissues. *J. of exper. Med.* **21** (1915). — The origin and structure of a fibrous tissue formed in wound healing. *J. of exper. Med.* **23** (1916). — A study of the clotting of the plasma of frog's blood and the transformation of the clot into fibrous tissue. *Amer. J. Physiol.* **44**, 109 (1917). — Observations on the connective tissue ground substance in living amphibian embryos. *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **17** (1920). — A study of the development of connective tissue in amphibia. *Amer. J. Anat.* **28**, 447 (1921). — *Baitsell, G. and K. E. Mason*: The origin of the fibrous tissue arising in the testis of the guinea pig following experimental tuberculosis. *Amer. Rev. Tbc.* **21**, 592 (1930). — *Barrat, J.*: The action of thrombin upon fibrinogen. *Biochemic. J.* **14**, 189 (1920). — *Biedermann, W.*: Sekretion und Sekrete. *Arch. f. Physiol.* **167**, 1 (1917). — *Bofill-Deulofeu, J.*: Die argyrophilen Faserstrukturen in mesenchymalen Gewebekulturen von verschiedener Herkunft und von verschiedener Wachstumsgeschwindigkeit. *Z. Zellforsch.* **14**, 744 (1932). — *Breslau, E.*: Zum Problem der Fibrillenbildung. Entstehung von Fasern durch Zug im lebenden Organismus. *Zool. Jb., Abt. Zool.* **45**, 707 (1928). — *Coca, F.*: Die Bedeutung der „Fibroglia“-Fibrillen. *Virchows Arch.* **186** (1906). — *Collin, R.*: Sur les propriétés des filaments de fibrine coagulée. *C. r. Soc. Biol. Paris* **98**, 1353 (1928). — Propriétés différentielles des fibres collagènes tendues et non tendues. *C. r. Soc. Biol. Paris* **99**, 405 (1928). — *Dantschakoff, W.*: Untersuchungen über die Entwicklung von Blut und Bindegewebe bei Vögeln. Das lockere Bindegewebe des Hühnchens im fetalen Leben. *Arch. mikrosk. Anat.* **73**, 117 (1909). — *Dubreuil, G.*: Le chondriome et le dispositif de l'activité sécrétoire aux différents stades du développement des éléments cellulaires de la lignée connective etc. *Archives Anat. microsc.* **15**, 53 (1913). — *v. Ebner*: Die Chorda dorsalis der niederen Fische und die Entwicklung des fibrillären Bindegewebes. *Z. Zool.* **62**, 469 (1896). — *Köllikers Handbuch der Gewebelehre*, 6. Aufl., Bd. 3. Leipzig 1902. — Über die Entwicklung der leimgebenden Fibrillen, besonders im Zahnbein. *Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. III* **115** (1906). — *Ferguson, Y.*: The application of the silverimpregnation method of Bielschowski to reticular and other connective tissues. I. The mature tissue. *Amer. J. Anat.* **12**, 277 (1911). — The behavior and relations of living connective tissue cells in the fins of fish embryo

with special reference to the histogenesis of the collagenous or white fibres. Amer. J. Anat. **13**, 129 (1912). — *Fischer, A.*: Gewebezüchtung. München: Müller & Steinicke 1930. — *Fischer, A.* u. *R. Parker*: Dauerzüchtung in vitro ohne Wachstumsbeschleunigung. Arch. exper. Zellforsch. **8**, 325 (1929). — *Flemming, W.*: Über die Entwicklung der kollagenen Bindegewebsfibrillen bei Amphibien und Säugetieren. Arch. f. Anat. **1897**. — Die Histogenese der Stützsubstanzen der Binde-  
substanzgruppe. Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungs-  
lehre der Wirbeltiere von *O. Hertwig*, 3. Teil 2, S. 1–20. Jena 1902. — *Fonio, A.*:  
Die Physiologie und die Pathologie der Blutgerinnung. Handbuch der normalen  
und pathologischen Physiologie, 6. Teil, S. 1. 1928. — *Foot, N. C.* and *M. Menard*:  
A rapid method for the silverimpregnation of reticulum. Arch. Path. a. Labor.  
Med. **4**, 211 (1927). — *Francois-Frank, L.*, *L. Guyon* et *J. Nageotte*: Sur la structure  
et la métastructure de la trame collagène chez l'adulte. Bull. Hist. appl. **4**, 1 (1927). —  
*Frederikse, A.*: Der Zusammenhang zwischen Mitochondrien und Bindegewebs-  
fibrillen. Anat. Anz. **50**, 393 (1917). — *Fuchs, H.*: Über die Ursache der Zusammen-  
ziehung des Blutkuchens. Z. exper. Med. **79**, 76 (1931). — *Giersberg, H.*: Eihüllen-  
bildung bei Reptilien nebst einer Untersuchung über die Entstehung von Binde-  
gewebsfasern und Faserstrukturen. Biol. Zbl. **41**, 145 (1921). — *Golowinski, Y.*:  
Zur Kenntnis der Histogenese der Bindegewebsfibrillen. Anat. H. **33**, 205 (1907). —  
*Hansen, F. C. C.*: Über die Genese einiger Bindegewebsgrundsubstanzen. Anat.  
Anz. **16**, 417 (1899). — Untersuchungen über die Gruppe der Binde-substanzen.  
I. Der Hyalinknorpel. Arb. anat. Inst. **27**, 536 (1905). — *Harrison, R.*: The develop-  
ment of the balancer in Amblystoma, studied by the method of transplantation  
and in relation to the connectivetissue problem. J. of exper. Zool. **41**, 349 (1925). —  
*Hartmann, A.*: Zur Entwicklung des Bindegewebsknochens. Arch. mikrosk. Anat.  
**76**, 253 (1910). — *Hekma, E.*: Historisch-kritische Analysen des Blutgerinnungs-  
problems. Internat. Z. physik. chem. Biol. **2**, 279, 299, 352 (1915). — Über den  
physikalischen Fibrinausscheidungs-, bzw. -gebildungsmodus in natürlichen und  
künstlichen Gerinnungsflüssigkeiten. Biochem. Z. **73**, 370 (1916). — Über die  
Ähnlichkeit des Fibrinausscheidungsvorganges mit einem Krystallisationsprozeß  
einerseits und einem kolloidalen Ausfällungsprozeß andererseits, sowie über die Natur  
der Fibringerinnung überhaupt. Biochem. Z. **73**, 428 (1916). — Zur Kenntnis der  
Quellung und Entquellung des Fibrins. Biochem. Z. **74**, 63 (1916). — Weiteres über  
Natur und Eigenschaften der „kolloiden Lösungen“ des Fibrins. Biochem. Z. **74**,  
219 (1916). — Über die zweierlei Fibrinsole und ihre Beziehungen zu der Lehre  
von den kolloiden Lösungen. Biochem. Z. **77**, 249 (1916). — Näheres über die  
dreierlei Fibringle. Biochem. Z. **77**, 256 (1916). — Blutgerinnung als Agglutina-  
tionsprozeß. Biochem. Z. **105**, 143 (1923). — Die Fibringerinnung als Micellar-  
krystallisations- und Agglutinationsprozeß. Nederl. Tijdschr. Geneesk. **72 I**,  
2792 (1928). — Über das Fibrinogen. Kolloid-Z. **58**, 85 (1932). — *Herringa, G.*:  
Untersuchungen über den Bau und die Bedeutung des Bindegewebes. Z. mikrosk.-  
anat. Forsch. **1** (1924). — *Herringa, G.* et *H. Lohr*: Sur la nature et la genèse des  
fibres collagènes. Bull. Histol. appl. **3**, 125 (1926). — Funktionelle Anpassung im  
Bereich des Bindegewebes. Anat. Anz. **72**, Erg.-H. Verh. dtsh. anat. Ges. **1931**,  
123. — *Hertler, F.*: The development of fibrous tissues in peritoneal adhesions.  
Anat. Rec. **9**, 83 (1915). — *Herzog, R.* u. *W. Jancke*: Über Kollagen. II. Ber. dtsh.  
chem. Ges. **59**, 248 (1926). — Über den Zusammenhang zwischen der Struktur der  
organischen Fasern mit den elastischen Eigenschaften. Naturwiss. **16**, 420 (1928). —  
*Howell, W.*: The clotting of blood as seen with the ultramicroscope. Amer. J.  
Physiol. **35**, 143 (1914), **40**, 526 (1916). — *Hueck, W.*: Über das Mesenchym. Die  
Bedeutung seiner Entwicklung und seines Baues für die Pathologie. Beitr. path.  
Anat. **66**, 330 (1920). — *Huzella, Th.*: Der Mechanismus des Capillarkreislaufes  
und der Sekretion im Bindegewebe. I. Untersuchungen über das Fasersystem.  
Z. Zellforsch. **2** (1925). — Über histologische Gerüstbildung im Vergleich der

Organisation der Gewebeskultur mit der des Tierkörpers. *Anat. Anz.* **67**, Erg.-H. Verh. dtsh. anat. Ges. **1929**, 35. — Der Entstehungsmechanismus und die organisatorische Bedeutung des Gitterfasersystems. *Arch. Entw.mechan.* **116**, 430 (1929). — L'origine et le rôle de l'appareil intercellulaire dans la croissance normale et néoplastique de l'organisme et des cultures de tissus. 1. Congr. internat. microbiol. Paris 1930. — Funktionelle Struktursysteme in niederen und höheren Organismen. *Anat. Anz.* **72**, Erg.-H. Verh. dtsh. anat. Ges. **1931**, 255. — *Kitamura, N.*: Die ultramikroskopisch verschiedenen Formen der Blutgerinnung. *Pflügers Arch.* **203**, 651 (1924). — *Kon, Y.*: Das Gitterfasergerüst der Leber unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Arch. Entw.mechan.* **25** (1908). — *Krauspe, C.*: Beiträge zur Kenntnis der Gitterfasern mit besonderer Berücksichtigung der Niere. *Virchows Arch.* **237**, 475 (1922). — *Laguesse, E.*: La structure du tissu conjonctif lâche chez la torpille. *Archives Anat. microsc.* **16**, 67 (1914). — Fibres collagènes, précollagènes, fibres grillagées et fibres de fibrogliie. *C. r. Soc. Biol. Paris* **83**, 373 (1920). — La structure lamelleuse et le développement des tissus conjonctifs lâches chez les mammifères en général et chez l'homme en particulier. *Archives de Biol.* **31**, 173 (1921). — Chondriome et développement des fibrilles dans la cornée. *C. r. Soc. Biol. Paris* **89**, 87 (1923). — La première ébauche des fibrilles conjonctives provient-elle du chondriome? *Archives Anat. microsc.* **22**, 125 (1926). — *Levi, G.*: Sulla presunta partecipazione dei condriosomi alla differenziazione cellulare. *Arch. ital. Anat.* **10** (1911). — L'individualità delle cellule persiste nei sincizi. *Monit. zool. ital.* **29** (1918). — Esiste una continuità protoplasmatica fra individualità cellulari distinte nelle colture in vitro? *Atti Acad. naz. Lincei. Rendic.* **32**, 59 (1923). — Experimentelle Untersuchungen über die Gitterfasern. *Arch. exper. Zellforsch.* **11**, 178 (1931). — *Lewis, M.*: Development of connective tissue fibres in tissue cultures of chicken embryos. *Contrib. to Embryol. Carnegie Publ.* **226**, 6 (1917). — *Lewis, W.*: Is mesenchym a syncytium? *Anat. Rec.* **23**, 177 (1922). — *Löwenstädt, H.*: Untersuchungen über die Vorgänge der Bindegewebsversilberung nach *Belchowsky-Maresch* und über die Konstitution der „Gitterfasern“. *Z. exper. Med.* **39**, 355 (1924). — *Ludwig, F.*: Beobachtungen an explantiertem Bindegewebe mit besonderer Berücksichtigung der Fibrillenbildung. *Arch. exper. Zellforsch.* **9**, 384 (1930). — *Mall, F.*: On the development of the connective tissues from the connective tissue syncytium. *Amer. J. Anat.* **1**, 329 (1902). — *Mallory, F.*: A hitherto undescribed fibrillar substance produced by connective tissue cells. *J. med. Res.* **10**, 334 (1904). — *Mangold, E.*: *Klin. Wschr.* **3** (1924). — *Masuda, S.*: Die ultramikroskopischen Vorgänge bei der Blutgerinnung von Warmblütern. *Pflügers Arch.* **207**, 180 (1925). — Über Veränderungen der ultramikroskopischen Form der Blutgerinnung durch Krankheiten. *Arch. f. exper. Path.* **105**, 124 (1925). — *Matsui, Y.*: Über die Gitterfasern der Milz unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Beitr. path. Anat.* **60** (1915). — *Maurer, F.*: Grundzüge der vergleichenden Gewebelehre. Leipzig 1915. — *Maximov, A.*: Experimentelle Untersuchungen über entzündliche Neubildung von Bindegewebe. *Beitr. path. Anat.* **1902**, Suppl.-H. — Über die Entstehung von argyrophilen und kollagenen Fasern in Kulturen von Bindegewebe und von Blutleukocyten. *Zbl. Path.* **43**, 145 (1928). — Development of argyrophil and collagenous fibres in tissue cultures. *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **25**, 439 (1928). — Über die Entwicklung argyrophiler und kollagener Fasern in Kulturen von erwachsenem Säugetiergewebe. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **17**, 625 (1929). — *Mayer, A.*: La coagulation du plasma sanguin. *C. r. Soc. Biol. Paris* **63**, 658 (1907). — *Merkel, F.*: Betrachtungen über die Entwicklung des Bindegewebes. *Anat. H.* **38**, 321 (1909). — *Meves, F.*: Über die Strukturen in den Zellen des embryonalen Stützgewebes sowie über die Entstehung der Bindegewebsfibrillen, insbesondere derjenigen der Sehne. *Arch. mikrosk. Anat.* **75**, 149 (1910). — *Momigliano-Levi, G.*: Istogenesi delle fibre collagene e reticolari nelle colture in vitro. *Boll. Soc. Biol. sper.* **5** (1930). — Ricerche sulla istogenesi delle fibre collagene e reticolari

nelle colture in vitro. Arch. exper. Zellforsch. **11**, 189 (1931). — Ricerche sulla formazione delle fibre intercellulari e sulle relazioni fra fibre reticolari e collagene in colture viventi di tessuti connettivi. Arch. exper. Zellforsch. **13**, 176 (1932). — *Momigliano-Levi, G.*: Formazione e maturazione delle fibre collagene nelle colture di tessuti etc. Z. Zellforsch. **16**, 384 (1932). — *Nageotte, J.*: Les substances conjonctives sont des coagulums albuminoïdes du milieu intérieur. C. r. Soc. Biol. Paris **79**, 833 (1916). — Essai sur la nature et la genèse des substances conjonctives. C. r. Soc. Biol. Paris **79**, 1121 (1916). — Sur l'origine de la substance conjonctive. C. r. Soc. Biol. Paris **82**, 277 (1919). — L'organisation de la matière dans ses rapports avec la vie. Paris: Alcan 1922. — Il n'y a pas de "substance amorphe" dans la trame conjonctive. C. r. Soc. Biol. Paris **87**, 147 (1922). — La boule d'œdème de Ranvier et la disposition de la trame dans le tissu conjonctif sous-cutané. C. r. Soc. Biol. Paris **87**, 439 (1922). — Note sur le caillot artificiel de collagène. C. r. Soc. Biol. Paris **96**, 172, 464, 828, 1268; **97**, 559 (1927). — Essai de reproduction in vitro de la trame collagène et hypothèses relatives à la construction de cette trame in vivo. Ann. d'Anat. path. **8**, No 1 (1931). — *Nageotte, J.* and *L. Guyon*: Reticulin. Amer. J. Path. **6**, 631 (1930). — *Nageotte, J.* et *L. Guyon*: Considérations générales sur la trame conjonctive. Archives de Biol. **41**, No 1 (1930). — *Olivo, O.*: Differenziazione in vitro di fibre collagene. Boll. Soc. Biol. sper. **5**, No 2 (1930). — *Orsòs, F.*: Das Bindegewebsgerüst der Lymphknoten im normalen und pathologischen Zustande. Beitr. path. Anat. **75**, 15 (1926). — Das Bindegewebsgerüst des Knochenmarks im normalen und pathologischen Zustande. Beitr. path. Anat. **76**, 36 (1926). — *Patzelt, W.*: Zellen, Gewebe, Fasern und die Spezifität der Keimblätter. Z. mikrosk.-anat. Forsch. **3**, 109 (1925). — *Plenk, H.*: Über argyrophile Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen. Erg. Anat. **27**, 302 (1927). — *Quast, P.*: Zur Histologie der Muskel-Sehnengrenze und über das interfasciculäre Bindegewebe des Herzmuskels. Z. mikrosk.-anat. Forsch. **4** (1926). — *Ranke, O.*: Neue Kenntnisse und Anschauungen von dem mesenchymalen Syncytium und seinen Differenzierungsprodukten usw. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. B **1913**, Abh. 3. — Zur Theorie mesenchymaler Differenzierungs- und Imprägnationsvorgänge usw. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. B **1914**, Abh. 2. — *Ranvier*: Traité technique d'histologie, 1875. — *Renaut, J.*: Traité d'histologie pratique. Paris 1893. — Sur la tramule du tissu conjonctif. Archives Anat. microsc. **6** (1903). — *Rössle, R.* u. *T. Yoshida*: Das Gitterfasergerüst der Lymphdrüsen unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Beitr. path. Anat. **45**, 110 (1909). — *Romeis, B.*: Das Verhalten der Plastomosen bei der Regeneration. Anat. Anz. **45** (1914). — *Russakoff, A.*: Über die Gitterfasern der Lunge unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Beitr. path. Anat. **45**, 776 (1909). — *Schimmelbusch, C.*: Die Blutplättchen und die Blutgerinnung. Virchows Arch. **101**, 201 (1885). — *Spuler, A.*: Beiträge zur Histologie und Histogenese der Binde- und Stützsubstanzen. Anat. H. **7**, 115 (1897). — *Stübel, H.*: Ultramikroskopische Studien über Blutgerinnung und Thrombocyten. Pflügers Arch. **156**, 361 (1914); **181**, 285 (1920). — *Studnicka, F.*: Schematische Darstellungen zur Entwicklungsgeschichte einiger Gewebe. Anat. Anz. **22** (1902/03). — Histologische und histogenetische Untersuchungen über das Knorpel-, Vorknorpel- und Chordagewebe. Arb. anat. Inst. **21** (1903). — Das Mesenchym und das Mesostroma der Froschlerven und deren Produkte. Anat. Anz. **40**, 33 (1911). — *Szegvari, A.*: Über die ultramikroskopische Untersuchung linearer Elemente. II. Die Stäbchensole. Z. physik. Chem. **112**, 295 (1924). — *Szily, A. v.*: Über das Entstehen eines fibrillären Stützgewebes im Embryo und dessen Verhältnis zur Glaskörperfrage. Anat. H. **35**, 649 (1908). — *Tello, F.*: Das argentophile Netz der Bindegewebszellen. Z. Anat. **65**, 204 (1922). — *Triepel, H.*: Das Bindegewebe am Schwanz von Anurenlarven. Arch. Entw.mechan. **32** (1911). — *Vinci, G.* et *A. Christoni*: Recherches expérimentales sur le rôle des plaquettes dans la rétraction des caillots sanguins. Arch. internat. Physiol. **8**, 104 (1909). —



*Virchow, R.*: Über den Faserstoff. Ges. Abh. 1856. — *Wassermann, F.*: Die Fettorgane des Menschen. Entwicklung, Bau und systematische Stellung des sog. Fettgewebes. Z. Zellforsch. **3**, 235 (1926). — Die lebendige Masse. Handbuch der mikroskopischen Anatomie von *Möllendorff*. Berlin 1929. — *Watanabe, M.*: Weiteres über experimentelle pathologische Veränderungen des ultramikroskopischen Bildes der Blutgerinnung. Arch. f. exper. Path. **110**, 335 (1925). — *Weiß, P.*: Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe. Roux' Arch. **116**, 438 (1929). — *Wöhlisch, E.*: Die Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. Erg. Physiol **38 I**, 443 (1929). — *Yamasaki, S.*: Über die Gitterfasern, insbesondere über deren Entwicklung. Trans. jap. path. Soc. **16**, 164 (1928). — Über die Gitterfasern, ihre Arten und Entstehung. Trans. jap. path. Soc. **17**, 139 (1928). — *Zachariadès, P.*: Du développement de la fibrille conjonctive. C. r. Acad. Sci. Paris **126**, 490 (1898). — *Zawarzin, A.*: Beiträge zur vergleichenden Histologie des Blutes und des Bindegewebes. IV. Über die entzündliche Neubildung von Bindegewebe bei der Teichmuschel. Z. mikrosk.-anat. Forsch. **6**, 508 (1926).

---