

(Aus dem Anatomischen Institut [Direktor: Prof. Dr. K. Kostanecki] und aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Jagiellonischen Universität in Kraków [Direktor: Prof. Dr. K. Klecki].)

Über die Unterschiede im Fettgehalt maligner (Sarkom) und normaler Zellen; Untersuchungen an in vitro gezüchteten und dem Organismus frisch entnommenen Geweben.

Von
Z. Szantroch und Z. Zakrzewski.

Mit 8 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 22. Oktober 1934.)

Vor kurzem hatte einer von uns¹ auf die Notwendigkeit einer genauen Bearbeitung der Frage über die morphologische Verteilung der Fettsubstanzen in den Zellen der Gewebekulturen in Abhängigkeit vom Alter als auch von den morphologischen und funktionellen Eigenschaften (z. B. Muskelzellen, Leberepithel-, Hautepithelzellen usw.) der gezüchteten Elemente hingewiesen. Unter Anwendung einer Modifikation der Fettfärbung im Alkoholformol², welche auch die feinsten Fetttropfen sichtbar macht, konnte festgestellt werden, daß in Kulturen verschiedener Gewebe, die Hühnerembryonen vom bestimmten Alter (5—7 Tage) entnommen wurden, „das in den neugewachsenen Zellen enthaltene Fett“ eine „für die entsprechende Zellenart eigentümliche Fettausstattung darstellt, welche schon in den Zellen des betreffenden Gewebes gegeben und determiniert ist. Alle weiteren Vorgänge, welche in den Zellen der Gewebekulturen eine Vermehrung der Fettsubstanzen, über die Grenzen des für bestimmte Zellarten eigentümlichen Fettgehaltes hinaus, herbeiführen, stellen eine Verfettung der Zellen dar.“

Gelegentlich der Untersuchungen über den Fettstoffwechsel in den Gewebsexplantaten hatte zum Teil auch E. Rix³ den Unterschied in der Fettverteilung in verschiedenen Zellarten beobachtet. Diesbezüglich hat er z. B. in den Endothelen der Leberkulturen ein ganz anderes Verhalten gefunden als in den Epithelzellen.

Unter Hinweisung auf die Befunde von Szantroch, daß nämlich bezüglich des Fettgehaltes und der Fettverteilung eine Spezifität für bestimmte Zelltypen besteht, hebt G. Levi⁴ hervor, daß dadurch die

¹ Szantroch, Z.: Arch. exper. Zellforsch. **13** (1933). — ² Szantroch, Z.: Virchows Arch. **286** (1932). — ³ Rix, E.: Arch. exper. Zellforsch. **13** (1933). —

⁴ Levi, G.: Erg. Anat. **31** (1934).

Identifizierung der verschiedenen Zellarten in der Wanderungszone erleichtert wird.

J. Zweibaum¹ spricht diesen Befunden einen diagnostischen Wert ab und bemerkt dazu: »la quantité et la grosseur des gouttes dépendent de nombreuses conditions parmis lesquelles l'état du tissu pris pour la culture ainsi que l'état physico-chimique du cytoplasme sur lequel les conditions externes exercent une action très importante, doivent jouer un rôle très important.« Daß der Zustand der zur Züchtung verwendeten Gewebe als auch ihre physiko-chemische Beschaffenheit eine für die Fettverteilung wichtige Rolle spielen, ist selbstverständlich. Diese Faktoren scheinen aber nach einer, der Art der Zellen, der Art ihrer Funktion und dem Alter entsprechender Gesetzmäßigkeit zu wirken, was neuerdings von S. Skouron und T. Keller² bei Gelegenheit der Untersuchungen über die Veränderungen der Fettsubstanzen im Eierstock hervorgehoben wird. Nach diesen Autoren „steht diese Gesetzmäßigkeit in der Verteilung der Fettropfen in verschiedenen Schichten des Follikels während der einzelnen Phasen seines Wachstums im Einklang mit der Beobachtung von Szantroch, die er an Embryonalgeweben erhoben hat, daß nämlich, „betreffs der Größe und der Verteilung der Tropfen eine merkwürdige und beständige Spezifität für bestimmte Zelltypen besteht“.

Zweibaum befaßt sich insbesondere mit der Fettverteilung in den Sarkomzellen von Rous. Er gibt an, daß eine totale Fettdegeneration manchmal in zahlreichen Sarkomzellen schon im Laufe des ersten Tages zu sehen ist. Er schließt daraus, daß das gesamte Zellplasma der Sarkomzellen der Verfettung gegenüber viel weniger widerstandsfähig ist als in den „normalen“ Zellen.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir nachzuprüfen, ob auch die Zellen von Sarkomkulturen charakteristische Merkmale in bezug auf den Gehalt und die Verteilung des morphologisch sichtbaren Fettes aufweisen.

Eigene Untersuchungen.

Als Material zu unseren Untersuchungen diente ein Stamm von Jensen-Rattensarkom, den der eine von uns (Zakrzewski) über 3 Jahre lang in Reinkultur in vitro züchten konnte. Während der ganzen Züchtungszeit behielten die Zellen ihre Malignität, was durch wiederholte gelungene Verimpfungen auf Tiere kontrolliert werden konnte. Das Züchtungsmedium bestand aus einem Teil eines Gemisches von Ratten- und Hühnerplasma im Verhältnis von 3 : 1 und einem Teil unverdünnten Rattenserum. Zur Plasmagewinnung wurde 1 mg Heparin (Hynson, Westcot, Dunning) (0,05% Lösung in 0,85 NaCl) zu 10 ccm Rattenblut und die gleiche Menge zu 20 ccm Hühnerblut vor dem Abzentrifugieren zugesetzt.

¹ Zweibaum, J.: Arch. exper. Zellforsch. 14 (1933).

² Skouron, S. u. T. Keller: Z. Zellforsch. 21 (1934).

Aus dem Stamm wurden mehrere Serien von Deckglaskulturen angelegt und in üblicher Weise im Brutschrank bei 38° C aufbewahrt. Je 12 Stunden wurden von jeder Serie einige Kulturen mit Sudanlösung in Alkoholformol sowohl mit Modifikation I als auch mit Modifikation II fixiert und gefärbt. Die Modifikation II¹ wurde bevorzugt, weil sie nur die Fetttropfen färbt und das Auftreten von feinkörnigem Sudanniederschlag gänzlich vermeiden läßt.

Unsere ersten Befunde waren nicht eindeutig. Während wir nämlich in den Kulturen einer Serie innerhalb des ersten bis dritten Tages nach dem Anlegen der Kulturen keine sichtbaren Fetttropfen in den Zellen nachweisen konnten, enthielten die gleichaltrigen Zellen einer zweiten Serie eine gewisse Menge von kleinen und staubförmigen Fettgranula. Diese Granula nahmen im Laufe der nächsten Tage an Zahl und Größe noch deutlich zu.

Dieser Unterschied hat die Frage auftauchen lassen, ob den Sarkomzellen überhaupt ein Gehalt an morphologisch sichtbarem Fett zukommt — dann wäre die Anwesenheit von Fettgranula eine sekundäre Erscheinung — oder ob nicht etwa der Fettgehalt der Sarkomzellen großen Schwankungen unterliegt, und dann kein charakteristisches Merkmal für diese Zellen darstellt. Als maßgebend für die Lösung dieser Frage schien uns die Untersuchung der Tumorzellen im natürlichen Verband mit dem Organismus. Zu diesem Zwecke wurden Gewebekulturen dieses Sarkoms auf Ratten verimpft. Nachdem Tumoren von beträchtlicher Größe herangewachsen waren, wurden sie den Tieren exstirpiert, in 5% Kaliumbichromat 8 T., Formol 2 T. fixiert, am Gefriermikrotom in 5—10 μ dicke Schnitte zerlegt und mit Sudanlösung in Alkoholformol nach Modifikation I gefärbt. Die Untersuchung ergab vollkommen klar und unzweideutig, daß die Zellen des Sarkomgewebes keine sichtbaren Fettgranula enthalten, während die in der Nähe der Geschwulst reichlich vorhandenen Bindegewebszellen eine beträchtliche Menge von Fetttropfen enthalten. Es lag also die Annahme nahe, daß das Auftreten der Fettgranula, welche wir in den Sarkomzellen der zweiten Serie gefunden haben, gewissen sekundären, den Sarkomzellen selbst fremden Faktoren zuzuschreiben ist.

Es konnte nun folglich festgestellt werden, daß ein frühzeitiges Auftreten der Fetttropfen und die darauf folgende Verfettung der Sarkomzellen jedesmal in Kulturen zustande kommt:

1. Wenn das zur Züchtung verwendete Plasma entweder von einem zu alten Tier stammt oder von einem solchen, dem in kurzen Zeitabschnitten mehrmals Blut entnommen wurde.

2. Wenn das Plasma länger als 6 Tage im Eisschrank aufbewahrt wird; 1. und 2. beziehen sich auch auf Blutserum.

¹ Szantroch, Z.: Arch. exper. Zellforsch. (erscheint Frühjahr 1935).

3. Wenn Plasma oder Serum von einem Tier (Hühner, Ratten) gewonnen wird, dessen Blut aus näher unbekannten Gründen für Züchtungszwecke sich ungünstig erweist.

4. Wenn die Kulturen in einer Temperatur über 38° gezüchtet werden.

5. Wenn dem Züchtungsmedium zuviel wachstumsfördernde Substanzen (Embryonalextrakt) zugefügt werden.

6. Wenn beim Anlegen der Kulturen technische Fehler begangen werden (Quetschung der Explantate bzw. Kulturen, Übertragen von Resten des alten Plasmaplasma-gerinnsels usw.).

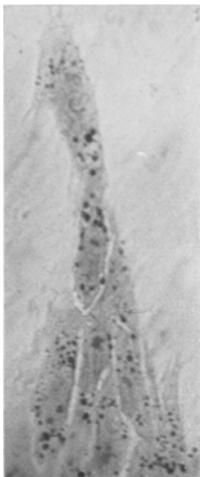


Abb. 1. Hühnerembryo 7 Tage. Eine 24 Stunden alte Kultur des Herzgewebes; Sudan in Alkoholformol Modifikation II. 550mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert; Mikrophotographie.

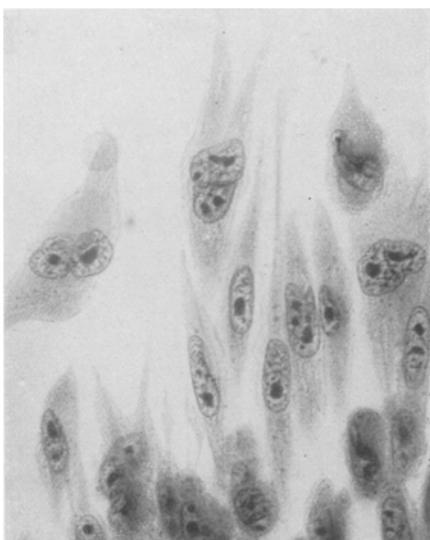


Abb. 2. Jensen-Sarkom; eine 48 Stunden alte Kultur; Sudan in Alkoholformol Modifikation II. 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert; Mikrophotographie.

In dem Fettindex (gleich Null, gering, stark) gewinnt man also ein gutes Mittel zur Abschätzung des Zustandes, sowohl der Sarkomzellen als auch und vor allem der Züchtungsmedien, denn die in optimalen Bedingungen gezüchteten Sarkomzellen enthalten zweifellos keine morphologisch sichtbaren Fettgranula. Werden jedoch die Deckglaskulturen längere Zeit nicht umgesetzt, so degenerieren sie schließlich unter Auftreten von Fettropfen. Aber auch dann bietet der Vorgang der Verfettung und der Degeneration einen Unterschied im Vergleich mit Kulturen von Organgeweben, wovon wir uns überzeugen konnten, indem gleichzeitig und in gleichen Bedingungen mehrere Serien von Herz-, Leber- und Hautkulturen von Hühnerembryonen im Alter von 7 Tagen und parallele Serien von Sarkomkulturen angelegt wurden. Abb. 1 zeigt eine 24 Stunden alte Kultur vom Herzgewebe, wo in allen Zellen kleine

Fetttropfen sichtbar sind. Sie stellen, wie oben bemerkt, die natürliche Ausstattung der Gewebezellen dar, die bereits im Organ selbst vorhanden ist. In Abb. 2 sehen wir mehrere Zellen der Wanderungszone einer 48 Stunden alten Sarkomkultur. Obwohl diese Kultur zweimal so alt ist als die Kultur des Herzgewebes von Abb. 1, so sind doch in den Sarkomzellen keine Fetttropfen sichtbar. Die äußerst feine und blasse Granulierung, welche erst durch Betrachtung der photographischen Aufnahme mit einer Lupe zu Gesicht tritt, ist keine Fettgranulierung, denn sie färbt sich nicht mit Sudan, läßt sich dagegen schön vital durch Neutralrot darstellen. Ohne sich mit dieser Granulierung hier näher zu befassen, wollen wir nur bemerken, daß sie in allen Zellen vorhanden ist und mit dem Alter der Kultur, in manchen Zellen größer und zahlreicher aufzutreten scheint. In den Präparaten, die mit Sudan und Hämatoxylin gefärbt sind, tritt sie meistenteils als feine hellblaue Granulierung (in der Art von winzigen Vakuolen) zutage und unterscheidet sich dadurch von den rot gefärbten Fetttropfen. In den photographischen Aufnahmen sind die Granula den tiefschwarzen, scharf geschnittenen Fetttropfen gegenüber unscharf, verschwommen, und dadurch leicht erkennlich.

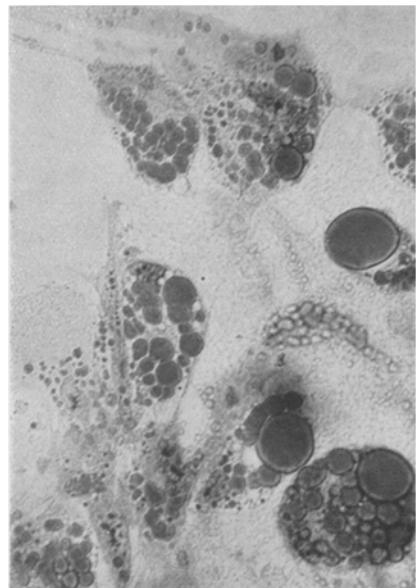


Abb. 3. Hühnerembryo, 7 Tage; eine 144 Stunden alte Kultur des Herzgewebes; Sudan in Alkoholformol Modifikation II; 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert; Mikrophotographie.

Während in den nächsten Tagen die Fettmenge in den Kulturen des Herzgewebes sehr stark zunimmt, bieten die Sarkomzellen vom gleichen Alter kaum merkliche Unterschiede dar.

Nur hier und da können in manchen Zellen ganz spärliche feine Fetttröpfchen auftreten. Bei den 6 Tage alten Kulturen des Herzgewebes (Abb. 3) ist die Verfettung bereits total; die Umrisse der Zellen und ihrer Kerne sind verschwommen, die Zellen vollkommen mit Fetttropfen gefüllt, die in allen Dimensionen von staubförmigen Granula bis zu Riesentropfen auftreten. Die Sarkomkulturen gleichen Alters zeigen dagegen weiterhin eine große Widerstandsfähigkeit der Verfettung gegenüber; zwar sind schon öfters in den Zellen kleine Fetttröpfchen sichtbar, doch ist die Mehrzahl der Zellen noch immer durch Abwesenheit von Fetttropfen ausgezeichnet. Diesen Zustand weisen noch die 10 Tage alten

Kulturen auf, wie es aus Abb. 4 ersichtlich ist. Zu gleicher Zeit nimmt die Neutralrotgranulierung in manchen Zellen deutlich zu; doch gibt es selbst in 10 Tage alten und noch älteren Kulturen, prächtige Zellen, welche keine sichtbaren Fette enthalten und in denen die Neutralrotgranulierung nur äußerst fein erscheint (Abb. 5).

Die Fetttropfen, welche in den Sarkomzellen der nicht umgesetzten Kulturen gewöhnlich erst

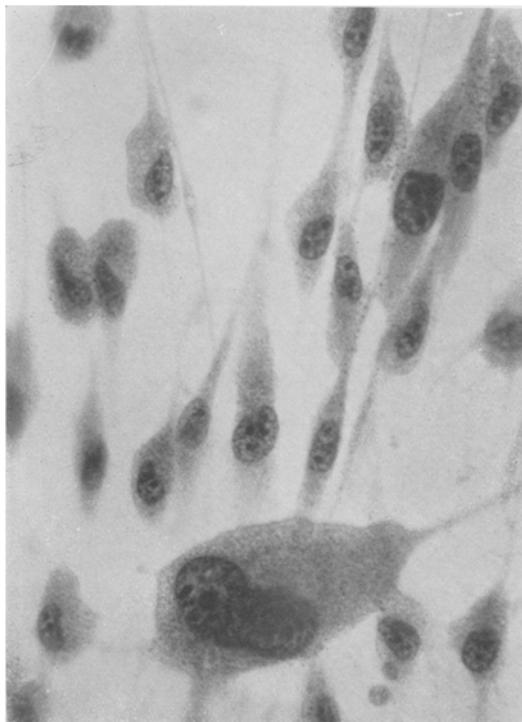


Abb. 4. *Jensen-Sarkom*; eine 240 Stunden alte Kultur; Sudan in Alkoholformol Modifikation II. 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert; Mikrophotographie.



Abb. 5. *Jensen-Sarkom*; eine 240 Stunden alte Kultur; 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert; Mikrophotographie.

gegen Ende der ersten Woche aufzutreten anfangen, sind zuerst sehr spärlich, zerstreut und feinkörnig. Im Laufe der nächsten Tage kann die Zahl der Fetttropfen anwachsen, sie nehmen aber nur langsam und wenig an Größe zu und liegen zerstreut zwischen den Neutralrotgranula. In den Rundzellen dagegen werden sie mit dem Alter größer und ordnen sich dann gewöhnlich kranzförmig rings um den Kern (vgl. die zwei unteren Rundzellen in Abb. 6) an. Doch scheinen die Fette in der Degeneration der Sarkomzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

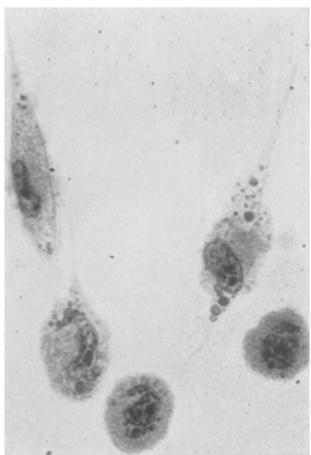


Abb. 6. *Jensen-Sarkom*; eine 228 Stunden alte Kultur; Sudan in Alkoholformol Modifikation II; 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert;
Mikrophotographie.

In 14 Tage alten Kulturen (ohne Umsetzung) kann man nebeneinander alle Stadien der Degeneration und des Zerfalls von Sarkomzellen beobachten. Als erstes Zeichen der Degeneration tritt meistens eine Vakuolisierung des Zellplasmas auf, welche weiterhin sehr stark zunimmt (Abb. 7). Zwischen den einzelnen Vakuolen sind reichliche Neutralrotgranula und kleine Fettropfen sichtbar, besonders deutlich in der Umgebung des Kernes. Endlich zerfallen die Zellen unter Bildung granulierter und vakuolisierter Plasmamassen, in welchen hier und da noch Überreste von zerfallenen Kernen sichtbar sind (Abb. 8). Die geringe Teilnahme der Fette an der Degeneration der Sarkomzellen ist sehr charakteristisch und tritt durch Vergleich der Abb. 8 und 3 (Kultur des Herzgewebes) besonders deutlich hervor.

Wenn man bedenkt, daß den normalen Zellen verschiedener Gewebe meistenteils ein spezifischer, aber der Menge nach stark variierender

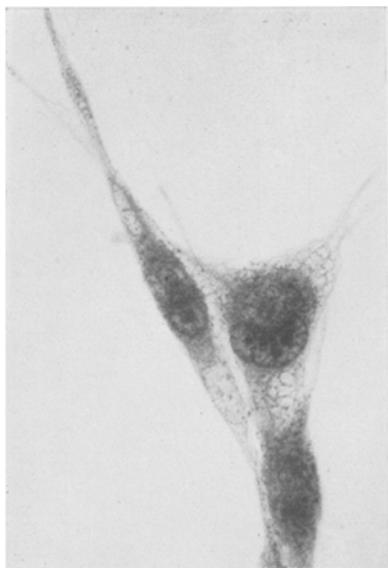


Abb. 7. *Jensen-Sarkom*; eine 336 Stunden alte Kultur; Sudan in Alkoholformol Modifikation II; 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert;
Mikrophotographie.

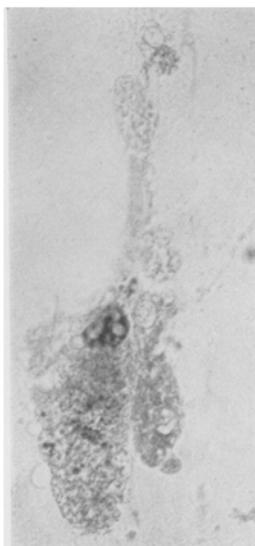


Abb. 8. *Jensen-Sarkom*; eine 288 Stunden alte Kultur; Sudan in Alkoholformol Modifikation II; 650mal, um $\frac{1}{4}$ reduziert;
Mikrophotographie.

Gehalt an morphologisch sichtbarem Fett eigentlich ist, daß weiterhin in Sarkomkulturen, im geeigneten Züchtungsmedium eine nennenswerte Verfettung nicht auftritt selbst dann, wenn sie 14 Tage ohne Umsetzung gezüchtet werden, daß aber diese Kulturen unter gewissen Bedingungen (z. B. ungeeignete Zusammensetzung des Züchtungsmediums) schon sehr frühzeitig verfetten, so liegt der Schluß nahe, daß die Verfettung der Zellen nicht schlechtweg als die Folge von Schädigungen allgemeiner Natur angesehen werden darf, sondern daß sie auf ein Fehlen, oder auch einen Überschuß von besonderen, für den Fettstoffwechsel der Fette wichtigen Substanzen zurückzuführen ist. Das Experiment mit den Sarkomkulturen scheint darauf hinzuweisen, daß diese Substanzen vom Medium aus auf die Zellen einwirken; die großen Unterschiede an Fettgehalt zwischen normalen Zellen verschiedener Gewebe untereinander, und die Unterschiede zwischen den Zellen gleichartiger Gewebe in Abhängigkeit vom Alter und von der Funktion lassen dagegen die Annahme zu, daß außer diesen vermutlichen Substanzen, die als exogene Faktoren den Fettstoffwechsel der Zellen beeinflussen, die Zellen auch noch über endogene Faktoren verfügen, die für die charakteristische Verteilung des Fettes von ausschlaggebender Bedeutung sind.

Zusammenfassung.

1. Für die *Jensen*-Sarkomzellen ist eine vollkommene Abwesenheit von morphologisch sichtbaren Fettgranula eigentlich.
2. Dieses Merkmal bleibt in den Reinkulturen stets erhalten, solange die optimalen Züchtungsbedingungen gewährleistet sind.
3. Die *Jensen*-Sarkomzellen sind im Vergleich mit den Normalzellen der Verfettung gegenüber viel widerstandsfähiger; sie fallen der Verfettung in den nicht umgesetzten Kulturen viel später anheim, als die Normalzellen.
4. Die Verfettung der Sarkomzellen tritt frühzeitig und ausgesprochen nur dann ein, wenn die Züchtungsbedingungen ungünstig sind (ungeeignete Zusammensetzung des Züchtungsmediums) oder wenn beim Ansetzen der Kulturen technische Fehler begangen werden.
5. In dem Fettindex (gleich Null, gering, stark) gewinnt man ein gutes Mittel zur Abschätzung sowohl des Zustandes der Sarkomzellen, als auch vor allem der richtigen Zusammensetzung des Züchtungsmediums.