

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Leipzig.
[Direktor: Professor Dr. Morawitz †].)

Das Wachstum menschlichen Lymphogranuloms in vitro¹.

Von

Rolf Meier, Eva Posern und Georg Weitzmann.

Mit 9 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 1. Oktober 1936.)

In einer früheren Arbeit über das Wachstum des Gewebes der normalen blutbildenden Organe des Menschen haben wir über Lymphdrüsen und Knochenmark berichtet. Aus den Untersuchungen über pathologische Gewebe der gleichen Organe berichten wir zunächst über das Lymphogranulom. Die Durchführung dieser Versuche hängt ziemlich stark von der Beschaffung des Materials ab. Wir konnten dieses bekommen, indem uns ein Teil der zu diagnostischen Zwecken probeexcidierten Drüsen zur Verfügung gestellt wurde.

Befunde über die Züchtung menschlicher lymphogranulomatöser Drüsen sind uns nicht bekannt. Methodisch wurde in gleicher Weise wie in der früheren Arbeit verfahren. Es wurden nur pathologisch-anatomisch sichere lymphogranulomatöse Drüsen verwendet.

Das Wachstum der lymphogranulomatösen Drüsen in vitro geht von der Auspflanzung an in sehr viel schnellerem Tempo vonstatten als das der normalen Drüse. Die Auswanderung von Rundzellen und fibrocytären Elementen erfolgt schnell. Das ganze angesetzte Stück verwandelt sich in wandernde und sich teilende Zellen. Das Bild des Gewebes kann verschieden sein, je nachdem größere oder kleinere Rundzellen es beherrschen. Zunächst liegen die Rundzellen ganz ungeordnet um das Stück herum. Das Bindegewebe sproßt in breiten lockeren Zügen aus, wächst aber zunächst kaum in radiärer Anordnung, sondern entwickelt sich in Zügen um das angesetzte Stück. Von manchen Stellen des Explants scheint das Wachstum mit besonderer Intensität zu erfolgen.

Nach einigen Tagen treten dann in dem ausgewachsenen Bindegewebe nach Ausschwemmung der kleinen lymphocytären Zellen größere Rundzellen auf, die in großer Zahl vorhanden sein können (Abb. 1—2). Die Rundzellen sind nicht ganz gleichartig. Im allgemeinen besitzen sie ein ziemlich stark granulierte Protoplasma und einen hellen runden oder auch einen wenig unterteilten Kern. Sie sind also anscheinend nicht

¹ Die Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung der Lady Tata Memorial-Stiftung, der wir für die Ermöglichung unserer Arbeiten zu größtem Dank verpflichtet sind.

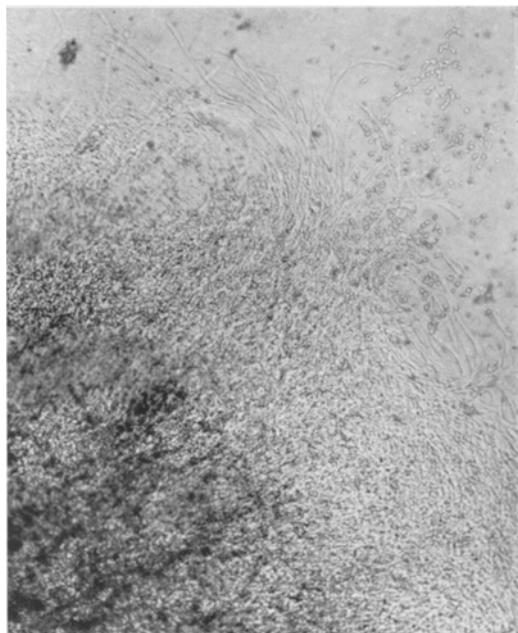


Abb. 1. Menschliches Lymphogranulom. Kleine Rundzellen, Bindegewebewachstum.
I. Passage, 3 Tage in Kultur. Vergr. 36fach.

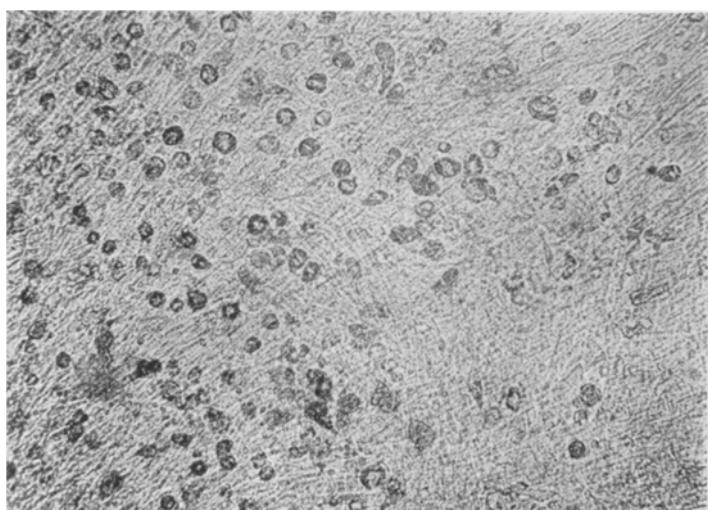


Abb. 2. Bindegewebe, keine kleinen Lymphocyten, nur große lymphocytäre Zeller
Vergr. 86fach.

nur große Lymphocyten, sondern scheinen auch pathologische Formen der lymphocytären Reihe darzustellen. Nicht bei allen lymphogranulomatösen Drüsen sieht man dieses Bild. In manchen Fällen finden sich überhaupt nur wenig große und kleine Rundzellen. Dafür treten am Rande des Zentralstückes ganz große, optisch fast homogen erscheinende Zellen auf (Abb. 3). In manchem Wachstumszustand kann man diese Zellen kaum erkennen, da sie sich vom Bindegewebe nur schwer differenzieren lassen. Plötzlich werden sie, ohne daß man bisher dafür einen Grund angeben könnte, wahrscheinlich durch Auftreten optischer Inhomogenität sichtbar. Zum großen Teil bleiben sie immer in der Nähe des angesetzten Stückes liegen, und meist werden sie auch im Explantat selbst gefunden. Oft bilden sie geradezu ein Syncytium, so daß Zellgrenzen kaum erkennbar sind. Auch im gefärbten Zustande sind sie nur schwer zu differenzieren, da sie wegen ihrer besonderen färberischen Eigenschaften fast ganz im Grundgewebe verschwinden. Sie sind in allen bisher gezüchteten lymphogranulomatösen Drüsen gefunden worden, wenn man nach ihnen sucht. Ihr Auftreten ist so regelmäßig, daß man es als typisch für das Wachstum der lymphogranulomatösen Drüse in vitro ansprechen muß. Sie scheinen im Lymphogranulom eine besondere Rolle zu spielen, auf die später zurückzukommen sein wird. Wir möchten annehmen, daß sie mit den *Sternbergschen* Riesenzellen identisch sind. Doch können wir es mit absoluter Sicherheit noch nicht entscheiden. Manche Eigenschaften dieser Zellen, die wir beobachten konnten, scheinen mit den bisherigen histologischen Beschreibungen der *Sternbergschen* Riesenzellen nicht ohne weiteres übereinzustimmen.

Die Kulturen bekommen schon in der ersten Passage eine erhebliche Größe. Besonders auffallend ist, daß die Kulturen mit zunehmendem Wachstum ganz homogen erscheinen, so daß das angesetzte Stück in der Kultur selbst kaum zu erkennen ist.

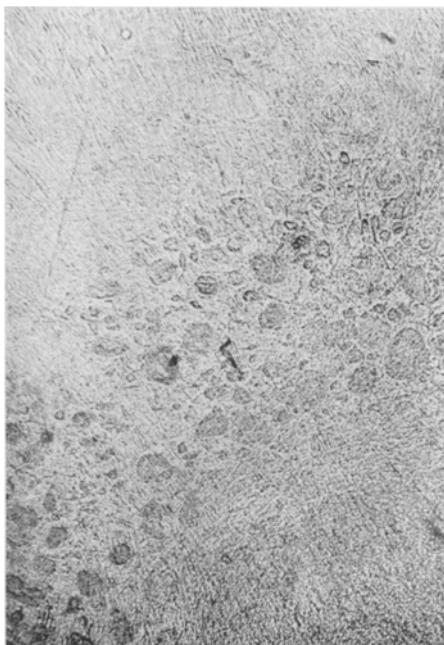


Abb. 3. Menschliches Lymphogranulom. Riesenzellen, große und kleine Rundzellen in der Übergangszone von Rand zum auswachsenden Bindegewebe. Vergr. 86fach.

Nach dem Umsetzen verhalten sich die Kulturen in der zweiten Passage wiederum etwas verschieden. In einigen Fällen bleiben kleine und große Rundzellen erhalten. Allen Kulturen jedoch gemeinsam ist ein überaus starkes Bindegewebswachstum, dessen Intensität größer bleibt als bei allen bisher von uns kultivierten menschlichen Geweben. Das Mittelstück hellt sich auch bei weiterer Züchtung immer schnell

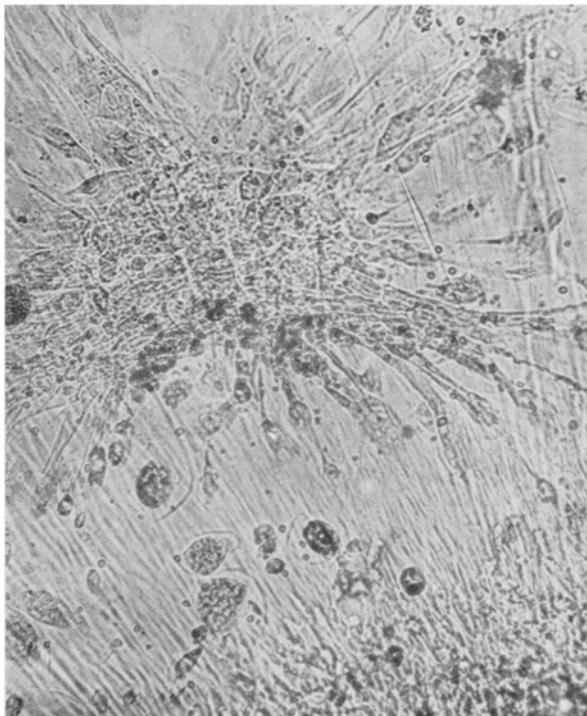


Abb. 4. Lymphogranulom, Von Riesenzellen ausgehendes Wachstum, darunter Bindegewebszüge der Hauptkultur. Vergr. 120fach.

und vollkommen auf. In anderen Kulturen treten nach dem Umsetzen die großen Rundzellen und die Riesenzellen mit besonderer Deutlichkeit hervor. Sie wandern in das Fibringerinnsel aus und lagern sich zu Zellkonglomeraten zusammen. Sie unterscheiden sich von den Bindegewebsszellen durch ihre Größe, das grobgranulierte Protoplasma und durch einen oder mehrere große runde Kerne. Wie die nächsten Abbildungen zeigen, lassen sich unter ihnen verschiedene Typen voneinander trennen. Einige Zellen bleiben immer rund. Diese haben meist ein helleres und etwas homogeneres Protoplasma. Andere Zellen sind entweder von vornherein noch polymorph, grobspindelig, mit mehreren verschiedenen geformten Ausläufern. Ihre Formen sind sehr

veränderlich. Manchmal lagern sie sich wie Fibroblasten zusammen, dann wandern sie wieder auseinander. Bleiben sie etwas getrennt vom übrigen Gewebe erkennbar, so hat man den Eindruck, als ob von ihnen als Zentrum ein neues Wachstum erfolgte. Dieses Verhalten ist bei keinem Bindegewebe, Knochenmark und normaler Lymphdrüse zu beobachten gewesen, während es bei Lymphogranulom sehr häufig ist. Diese Erscheinung ist so

auffallend, daß sie zu dem Schluß führt, daß ganz bestimmte Zellen mit für sie charakteristischer Eigenschaft Ursache dieses pathologischen Wachstums sind (Abb. 4).

In manchen Kulturen finden sich diese Rundzellen mit zahlreichen Riesenzellen zusammen. Die letzteren können sogar die Hauptmasse der pathologischen Zellen ausmachen, wie dies die folgenden Abbildungen besonders schön zeigen (Abb. 5). Auch hier bleiben die Riesenzellen immer schwer zu differenzieren. Sobald das Bindegewebe zu wachsen beginnt, verschwinden die Zellen so vollkommen, daß man nur noch einige wenige erkennen kann. Stets bekommt man ein prachtvolles Bindegewebewachstum. Das Gewebe läßt sich bei seinem schönen Wachstum im allgemeinen leicht weiterzüchten. In weiteren Passagen tritt das jetzt mehr radiär wachsende Bindegewebe in den Vordergrund. Wie die Abb. 6 zeigt, weisen die Kulturen immer das gleiche Verhalten auf. Immer ist eine vollständige Auflockerung des Mittelstücks zu beobachten. Große Rund- und Riesenzellen werden immer gefunden. Das Mittelstück selbst ist schwer zu analysieren. Es gleicht im Wachstum der normalen Lymphdrüse. Daß aber immer wieder Riesen- und große Rundzellen auftreten, spricht dafür, daß diese Zellen im Grundgewebe versteckt liegen. In den nächsten Passagen bleibt das Wachstum ziemlich unverändert. In einigen Kulturen sind Rund- und Riesenzellen noch zu beobachten, während in den meisten das Bindegewebewachstum

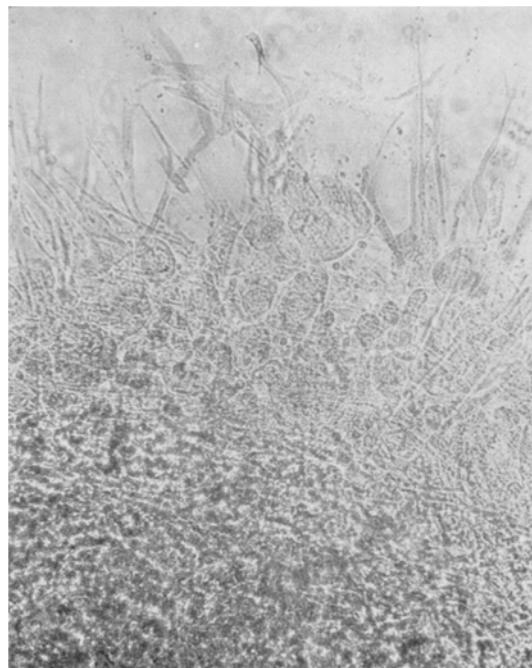


Abb. 5. Riesenzellen zwischen den frisch auswachsenden Bindegewebszellen. Vergr. 86fach.

vorherrschend ist. Immer behält das Gewebe seine hohe Wachstumsintensität. Das Bindegewebe selbst ähnelt dem der normalen Lymphdrüse. Die Einzelzelle ist klein, schlank und unterscheidet sich somit von dem Bindegewebe des Knochenmarkes und den Bruchsackgeweben. Da die Kulturen im allgemeinen dünn und sehr groß werden, ist es zweckmäßig, nicht bei jedem Umsetzen zu teilen. Die Züchtung gelingt bei einiger Erfahrung über Monate, ohne daß sich besondere Schwierigkeiten ergeben.

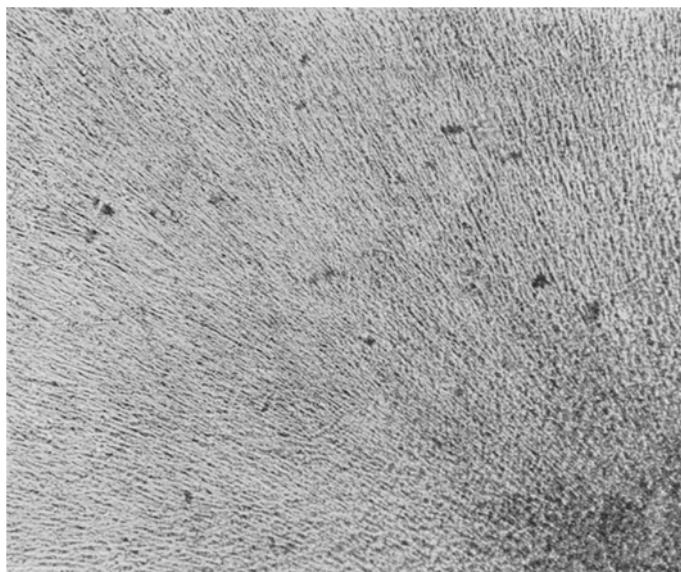


Abb. 6. III. Passage, etwa 2 Monate in der Kultur. Bindegewebswachstum, ganz vereinzelte große Rundzellen. Vergr. 36fach.

Es besteht für die Ausführung verschiedenartiger Versuche, die wir mit diesem Gewebe unternommen haben und noch beabsichtigen, nur ein großes Hindernis. Bei der erheblich größeren Wachstumsperiode des menschlichen Gewebes muß man eine große Zahl von gleichartigen Kulturen haben, um Vergleichsversuche machen zu können. Die Zahl von Flaschenkulturen, die ein Arbeiter versehen kann, ist naturgemäß beschränkt. Aber davon abgesehen, dürfte sich die Züchtung menschlichen Gewebes dauernd durchführen lassen.

Aus den bisherigen Züchtungsversuchen läßt sich schließen, daß das Lymphogranulomgewebe *in vitro* eine für dieses eigenartige Wachstumsart besitzt und behält. Es geht daraus hervor, daß dem Lymphogranulom ein irreversibel veränderter Zustand bestimmter Zellen zukommt.

Außer anderen Versuchen haben wir besonders die Züchtung von menschlichen Lymphdrüsen und von lymphogranulomatösem Gewebe in einer Flasche vorgenommen. Bisher konnten wir eine Veränderung der Kultur der normalen Lymphdrüse nicht feststellen. Es scheint

also den Lymphogranulomzellen nicht ein Faktor anzuhaften, der die pathologischen Eigenschaften durch Diffusion überträgt.

Da es uns in der größten Zahl der Kulturen nie gelang, andere Elemente, z. B. Bakterien, neben den pathologischen Zellen zu beobachten, die als Ursache für die Entstehung des Lymphogranuloms angesehen werden können, bleibt nur die Annahme, daß der die Veränderungen bedingende Faktor den Zellen selbst anhaftet. Damit scheint das Lymphogranulom nach seinem Verhalten in der Kultur der Reihe der Tumoren, vielleicht der besonderen Art, die zwischen den Granulationsgeschwülsten und den echten Tumoren steht, anzugehören. Es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, diese Annahme zu beweisen.

Zunächst war es uns möglich, die Natur und Genese der Riesenzellen näher zu betrachten. Man ist geneigt, diese in unseren Kulturen auftretende Zellart mit den *Paltauf-Sternbergschen* Riesenzellen gleichzusetzen. Wenn wir dies nicht ohne Einschränkung tun, so liegt das daran, daß wir in den Kulturen Lebensarten dieser Riesenzellen beobachten konnten, wie sie in der Literatur bisher nicht beschrieben worden sind. Es ist dies nicht erstaunlich, denn Vergleiche mit in vitro gewachsenem Lymphogranulom und dem pathologisch-anatomischen Schnitt sind bislang nicht bekannt. Wir können erst dann diese Zellart als *Paltauf-Sternbergsche* Riesenzellen ansprechen, wenn sich eine große Anzahl Befunde der Gewebezüchtung mit dem bekannten histologischen Bilde decken.

Die bei der Züchtung gewonnenen Ergebnisse können aber doch zur Differenzierung und Genese dieser Zellart und damit auch des Lymphogranuloms beitragen.

Über die Histiogenese der Riesenzellen des Lymphogranuloms herrscht keine einheitliche Auffassung. Seitdem durch die morphologische Blut- und Knochenmarksanalyse während des Lebens außer dem Lymphogranulom andere ähnliche Systemerkrankungen, wie die „Reticuloendotheliosen“ oder „aleukämischen Reticulosen“ bekannt sind, erfahren die Riesenzellen, die in fast allen diesen Krankheitsfällen zum typischen Bilde gehören, eine verschiedene Deutung. Genetisch sollen sie nach *Lubarsch, Rabinowitsch, Ceelen, Graetz* (zit. nach *Pfennigwerth*) vom Endothel der Blut- und Lymphgefäß abstammen. *Hamdi, Saim-Ali* lassen 3 Möglichkeiten für die Entstehung der Riesenzellen offen: sie können aus den Perithelzellen der Gefäße, aus den Reticuloendothelial- und Konjunktivalzellen (Endothelzellen der Lymphsinus) entstehen oder durch Zusammenfließen der Epitheloidzellen zustande kommen. *Carballo* hält nach seinen Angaben eine syncytiale Proliferation des Reticulums für eine besondere Spielart der *Hodgkinschen* Erkrankung. *Coronini, Terplan und Mittelbach*, wie *Brandt* lehnen die Möglichkeit der Differenzierung, ob die *Sternbergschen* Riesenzellen vom Reticulum oder Endothel abstammen, ab und halten sie auch für unwesentlich. *Brandt* faßt die Lymphogranulomatose als eine unausgeglichene Dysfunktion des Reticuloendothels auf, ohne besondere Beteiligung des Reticulums oder Endothels.

Die *in vitro* gezüchteten Gewebe der blutbildenden Organe sind von ihren Züchtern auf Differenzierungsmöglichkeiten ihrer Zellen bestens untersucht worden. *Rhoda-Erdmann*, *Eisner* und *Laser* konnten in ihren Arbeiten ein verschiedenes Verhalten der Reticulum- und Endothelzellen feststellen, ebenso *Fazzari*. Verglichen mit unseren eigenen Untersuchungen über Reticulum- und Endothelzellen im *in vitro* wachsenden

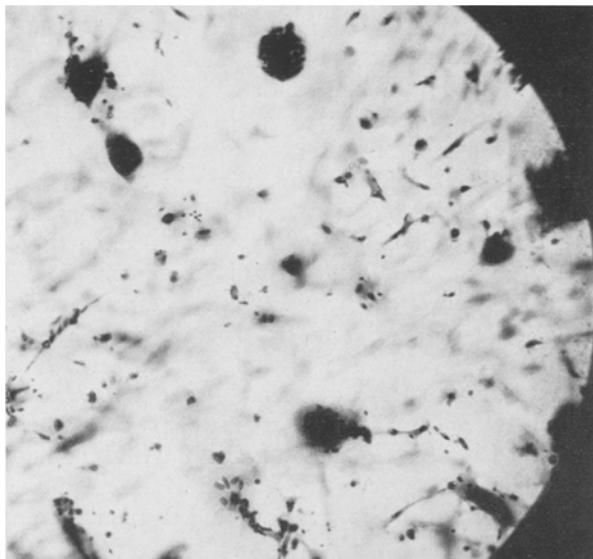


Abb. 7. Fixierung mit 2 % Ringerformol, Färbung mit Hämatoxylin. Vergr. 180 fach. Mehrere Riesenzellen in verschiedenen Stadien der Kernteilung.

menschlichen Knochenmark decken sich unsere Untersuchungen mit denen oben genannter Autoren.

Wenden wir diese Untersuchungsmethoden auf das *in vitro* gewachsene Lymphogranulom an, so kommen wir zu einer Ableitung der Riesenzellen vom Endothel. Wir konnten in unserem Gewebe Riesenzellen beobachten, die am 10. bis 12. Tag nach dem Ansetzen des Gewebsstückes im fibrocytären Gewebe sichtbar wurden. Wenn, wie wir annehmen, die Riesenzellen durch optische Inhomogenität in Erscheinung treten, so liegen sie meist in dem schon dünner werdenden fibrocytären Gewebe, etwa in der Mitte zwischen Zentralstück und Peripherie. Die Zellen haben die Tendenz, nach der Peripherie sich fortzubewegen. Im unfixierten und ungefärbten Zustand kann man meist runde, große Zellen erkennen mit einem großen, vielgestaltigen, oft sternförmigen Kern. Es gelingt eine solche Beobachtung in dieser Vergrößerung nur bei Züchtung in Spezialflaschen mit einer Bodendicke von 0,2 mm. Wir haben solche Kulturen mit 2 %igem Ringerformol fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt. So behandelte Kulturen können auch aus der Flasche herausgenommen

werden, ohne daß eine Lösung aus dem Gerinnsel erforderlich ist, und zwischen Objektträger und Deckglas mikroskopisch untersucht werden. Man kann jetzt Zellen verschiedener Stadien sehen (Abb. 7—9). Allen gleich war ein sehr großer Protoplasmaleib von feinmaschiger Struktur. Der Kern war von verschiedenem Aussehen. Einige Zellen, die im ganzen etwas kleiner waren, hatten einen stark chromatischen Kern, dessen Chromatin meist brockenartig angeordnet war. In manchen Kernen sah man einzelne amitotische Kernteilungen, die dann meist an einem Kernpol besonders gehäuft aufraten. In besonders großen Zellen war die Kernmasse aufgelöst, in eine Vielzahl kleinerer hellerer Kerne von länglich-ovaler Form mit feinen Chromatinfäden und 2—3 Nucleoli. Diese kleineren Kerne konnten in der Mitte der Zelle liegenbleiben. In manchen Zellen konnte man ein Hinstreben der Kerne nach der Peripherie beobachten. Ein ähnliches Verhalten der Kerne und Zellen sahen und beschreiben auch *Favre* und *Croizat*. Sie fanden 3 Formen der *Sternbergschen* Zellen, die junge Zelle im intermediären Stadium hat meist einen ziemlich großen vielgestaltigen Kern, der sich, wenn die Zelle altert, amitotisch in viele kleinere Kerne auflöst. Er kann aber auch ungeteilt als ein Kern bestehen bleiben. Ebenso beschreibt *Coronini* die junge Zelle als eine „Einkernige“, aus der dann die *Sternbergsche* Riesenzelle hervorgeht.

Den Riesenzellen fehlt eine ausgesprochene Phagocytose. Wir sahen nur 2mal Phagocytose von Lymphocyten. Vakuolen im Protoplasma der Riesenzellen konnten wir nicht beobachten. Wir glauben, nach Aussehen und Verhalten dieser Riesenzellen schließen zu können, daß die Endothelzellen ihre Ursprungszellen sind. Ob die von uns beobachteten Zellen mit den *Sternbergschen* Zellen identisch sind, müssen noch weitere Untersuchungen zeigen, wenngleich wir es auch nach unseren bisherigen Beobachtungen als sicher annehmen möchten. Es würde dies dann

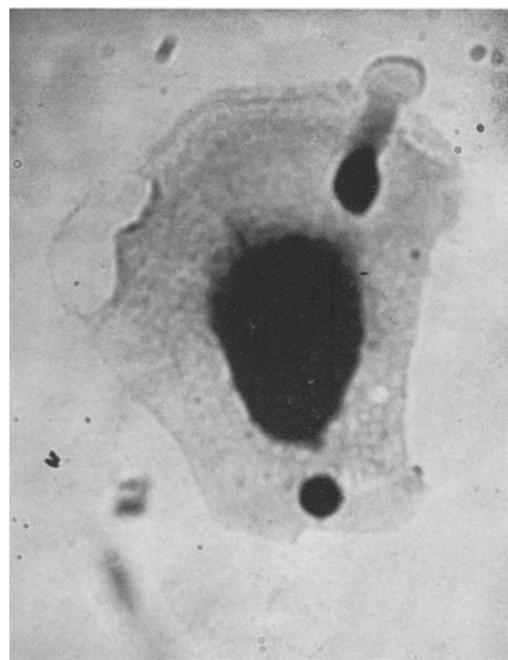


Abb. 8. Fixierung mit 2 % Ringerformol, Färbung mit Hämatoxylin. Vergr. 530 fach. Große „einkernige“ Lymphocyten phagocytierend. Am oberen Kernpol eben erkennbare Kernaufteilung.

Lubarschs Auffassung und die anderer Beobachter sichern, daß die *Sternbergschen* Riesenzellen Endothelabkömmlinge sind. Über diese und andere Versuche wird später noch zu berichten sein.

Durch diese Mitteilung hoffen wir, die prinzipielle Verwendung der Dauerzüchtung von pathologischem Gewebe menschlicher blutbildender Organe gezeigt zu haben. Da das ganze Arbeitsgebiet wegen der zeitraubenden Versuche für den einzelnen kaum zu beherrschen ist, haben



Abb. 9. Fixierung mit 2 % Ringerformol, Färbung mit Hämatoxylin. Vergr. 530fach. Hinstreben kleinerer Kerne mit feinem Chromatinnetz, 2–3 Nucleoli, nach der Zellperipherie.

wir diese Versuche, die Arbeiten in dieser Richtung erleichtern können, schon in diesem Zeitpunkt mitgeteilt.

Literatur.

- Brandt*: Virchows Arch. **272**, 400 (1929). — *Carballo*: Fol. haemat. (Lpz.) **43**, 273 (1931). — *Coronini*: Beitr. path. Anat. **80**, 405 (1928). — *Erdmann, R.*, *H. Eisner* u. *H. Laser*: Arch. exper. Zellforsch. **2**, 361 (1925/26). — *Favre* et *Croizat*: Ann. d'Anat. path. **8**, 838 (1931). — *Fazzari, J.*: Arch. exper. Zellforsch. **2/3**, 307 (1925/27). — *Fegin, B.* u. *M. Plonkier*: Krkh.forsch. **9**, 278 (1932). — *Fraenkel*: Lymphomatosis granulomatosa. Handbuch der speziellen Pathologie und Histologie, Bd. 1, S. 349. 1926. — *Hamdi* u. *Saim-Ali*: Frankf. Z. Path. **44**, 338 (1932/33). — *Letterer*: Frankf. Z. Path. **30**, 377 (1924). — *Lubarsch*: Pathologische Anatomie der Milz. Veränderungen der Milz bei Lymphogranulose. Handbuch der speziellen Pathologie und Histologie, Bd. 1, S. 27, 594. 1927. — *Pfennigwerth, H.*: Frankf. Z. Path. **44**, 85 (1932/33). — *Sachs* u. *Wohlfeld*: Virchows Arch. **264**, 640 (1927). — *Schabad* u. *Wolff*: Beitr. path. Anat. **90**, 285 (1923/33). — *Sternberg*: Erg. Path. **30**, 1 (1936). — *Swirtschewskaja*: Virchows Arch. **264**, 450 (1927). — *Terplan* u. *Mittelbach*: Virchows Arch. **271**, 759 (1929). — *Tschitschowitzsch* u. *Bykowa*: Virchows Arch. **267**, 91 (1928). — *Ziegler, Kurt*: Erg. inn. Med. **32**, 46 (1927).