

(Aus der Abteilung für experimentelle Zellforschung [Leiterin: Dr. E. Knuke]
am Pathologischen Institut der Universität Berlin
[Direktor: Prof. Dr. R. Rössle].)

Untersuchungen über die Fibrillenbildung des Jensen-Sarkoms *in vitro**.

Von
Maryan Rozynek.

Mit 17 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 13. April 1938.)

Es ist bekannt, daß das morphologische Bild der malignen Geschwülste oft von dem ihres Mutterbodens sehr verschieden ist. Aus vielen Beobachtungen läßt sich entnehmen, daß die Ursache für das veränderte morphologische Verhalten der bösartigen Tumoren in ihrem schnellen, eigengesetzlichen Wachstum liegt. Je größer die Wachstumsintensität dieser Geschwülste, um so schwieriger lassen sie sich in der Regel mit ihrem ursprünglichen Muttergewebe vergleichen. Besonders in einem Punkte unterscheiden sie sich von den Geweben des Körpers: sie sind weniger ausgereift, d. h., sie haben sich in nur geringem Maße differenziert.

Diese morphologischen Feststellungen sagen freilich nichts darüber aus, ob die schnell wachsenden Tumorzellen ihre Differenzierungsfähigkeit vollständig verloren haben, oder ob sie diese zwar noch besitzen, aber nicht zur Auswirkung bringen können. Viele Autoren glauben, daß die bösartigen Tumorzellen die Differenzierungsfähigkeit mehr oder weniger verloren haben. So schreibt W. Hueck: „Das Wesen des bösartigen Geschwulstgewebes besteht in seinem Verlust an Gestaltungskraft, an Differenzierungsfähigkeit.“ Auch B. Fischer-Wasels glaubt: „daß der Tumorzelle nicht nur die Differenzierung fehlt, sondern daß sie auch die Differenzierungsfähigkeit vermissen läßt“.

Ob diese Anschauungen richtig sind, läßt sich nur experimentell prüfen. Deshalb wurden die folgenden Versuche unternommen. Es sollte festgestellt werden, ob die Tumorzellen die Fähigkeit zur Differenzierung wirklich endgültig verloren haben. Wir stellten unsere Untersuchungen an einem Spindelzellsarkom an und verstehen daher in dieser Arbeit unter Differenzierung die Bildung von argyrophilen und kollagenen Fasern.

Aus vielen Experimenten wissen wir, daß in der Gewebekultur unter bestimmten Voraussetzungen Differenzierungsvorgänge ausgelöst werden können. Differenzierung, speziell Faserbildung wurde *in vitro* auf verschiedene Weise erreicht, so durch Zusatz von Askorbinsäure (A. v. Jeney

* Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Berlin (D 11).

und *E. Türö*) oder durch Züchtung in einem fortlaufend älteren Embryonalextrakt (*P. J. Guillard*). Wir wandten in unseren Versuchen aber die Methode an, die die gebräuchlichste ist (*A. Fischer* und *R. Parker*). Gewöhnlich wird nämlich eine Ausreifung der Zellen und Gewebe in vitro durch Wachstumshemmung zu erzielen versucht. Denn man weiß aus zahlreichen biologischen Beobachtungen, daß sich Wachstum und Differenzierung weitgehend ausschließen. Allerdings stellen nicht wenige Untersucher fest, daß verlangsamte Zellproliferation keinen Einfluß auf die Differenzierung in vitro hat (*H. B. Fell* und *W. Landauer*, *B. Miszurski*, *C. Olivo*), ja es wird sogar berichtet, daß in den am kräftigsten gewachsenen Kulturen die stärkste Faserbildung beobachtet wurde (*H. Bofill-Deulofeu*).

Da aber ohne größere Schwierigkeiten und ohne Schädigung der Vitalität die Proliferationsintensität des Sarkomgewebes in vitro weitgehend, fast bis zum Wachstumstillstand verlangsamt werden kann, versuchten wir trotz mancher entgegenstehender Angaben durch Hemmung des Wachstums eine Ausreifung der Sarkomzellen zu erreichen.

Material und Methodik.

Die Untersuchungen wurden an einem Tumor ausgeführt, der im Tierkörper kaum irgendwelche Differenzierungsscheinungen aufweist, nämlich am *Jensen-Sarkom*. Diese Geschwulst besteht fast nur aus Sarkomzellen; das Stromagerüst tritt demgegenüber völlig in den Hintergrund. Dieser Aufbau rechtfertigt es, die Versuche nicht an sog. Reinkulturen, sondern an frisch aus dem Sarkomgewebe explantierten Kulturen auszuführen. Inwieweit die sehr geringe Beimischung von Stromazellen in den Kulturen die Deutung der Befunde erschwert, wird später erörtert werden.

Zur Züchtung eignen sich am besten 10—12 Tage alte Tumoren. Sie wurden steril der Ratte entnommen und ihre bindegewebige Kapsel vollständig entfernt. Aus dem markigen Teil des Tumors wurden kleine Stückchen herausgeschnitten, in Tyrode-Lösung gewaschen und unter verschiedenen Bedingungen gezüchtet. Der Rest des Tumors wurde zur histologischen Aufarbeitung fixiert.

Die für unsere Untersuchungen notwendige künstliche Hemmung des Wachstums läßt sich vornehmlich durch drei verschiedene Züchtungsmethoden erreichen. Sie wurden von *A. Maximow*, *A. Fischer* und *R. Parker*, sowie von *Z. Zakrzewski*³¹ ausgearbeitet und für Differenzierungsversuche vorwiegend an Bindegewebekulturen benutzt. Ihr Hauptprinzip besteht darin, die Zellen längere Zeit wachsen zu lassen, ohne sie durch den Wundreiz des Umsetzens zu lebhafter Proliferation anzu-stacheln. Ferner werden wachstumsfördernde Substanzen wie Embryonalextrakt fast ganz vermieden, ja sogar — bei den letztgenannten zwei Methoden — wachstumsbremende Faktoren in Form von Heparin

zugeführt. Diese drei Methoden waren auch für unser Versuchsmaterial sehr geeignet. Es war nur nötig, das Züchtungsmedium durch Zusatz von Säugetierplasma und -serum für Säugetiergebe zu machen.

Im ganzen legten wir vier Versuchsreihen an, und zwar:

1. Sarkomgewebe, gezüchtet in *Carrel*-Flaschen mit Heparinplasma nach *A. Fischer* und *R. Parker*.
2. Sarkomgewebe, gezüchtet in *Carrel*-Flaschen mit Heparinserum nach *Z. Zakrzewski*.
3. Züchtung auf Deckgläsern nach *A. Maximow* und
4. Züchtung auf Deckgläsern in Passagen nach der gewöhnlichen Technik.

Die feste Phase der nach *Fischer* und *Parker* in *Carrel*-Flaschen gezüchteten Sarkomkulturen bestand aus 0,3 ccm Hühnerplasma, 0,3 ccm Rattenplasma, 0,6 ccm Tyrode-Lösung und 1 Tropfen sehr verdünntem Embryonalextrakt zur Gerinnung. Die flüssige Phase bestand aus 0,4 ccm Heparinhühnerplasma. Sie wurde gewöhnlich vorschriftsmäßig nach 4 Stunden abgesaugt. Bei vielen Kulturen blieb sie aber nach dem Vorschlag von *Zakrzewski* bis zur nächsten Waschung, die jeden 3. Tag stattfand. Dieses Vorgehen benachteiligt nach seinen Erfahrungen die Differenzierung nicht und verringert die durch häufiges Öffnen der Flaschen sonst große Gefahr der Infektion außerordentlich. Die nach *Zakrzewski* in *Carrel*-Flaschen gezüchteten Sarkomkulturen wuchsen in folgendem Medium: Die feste Phase war zusammengesetzt aus 0,3 ccm Hühnerplasma, 0,3 ccm Kaninchenserum und 0,6 ccm Tyrode-Lösung. Es ist unnötig Embryonalextrakt zur Gerinnung hinzuzugeben, da diese Mischung ebenso schnell wie ein Plasmaextraktgemisch koaguliert, eine Beobachtung, die schon von *R. Taszman* gemacht wurde. Als flüssige Phase diente 0,6 ccm mit Tyrode-Lösung zu gleichen Teilen verdünntes Heparinhühnerserum. Auch hier wurden die Kulturen jeden 3. Tag gewaschen und ihre flüssige Phase erneuert. Falls die Kulturen schlecht gediehen, wurde nach dem Waschen eine neue feste Phase über die alte geschichtet. Die Kulturen verloren dann oft ihr schlechtes Aussehen. Das Heparin wurde als wäßrige, isotonische Lösung 1:1000 benutzt und in 10%iger Verdünnung zum Hühnerplasma oder -serum hinzugegeben. Die nach *Maximow* auf Deckgläsern gezüchteten Sarkomkulturen befanden sich stets in folgendem Medium: 1 Tropfen eines Gemisches von 2 Teilen Rattenplasma bzw. Kaninchenserum und 1 Teil Hühnerplasma, sowie 1 Tropfen Hühnerembryonalextrakt (4. Zentrifugat). Die Kulturen wurden nach *Maximows* Vorschrift jeden 3. Tag gewaschen und ihnen neues Medium in derselben Zusammensetzung zugesetzt. Die auf Deckgläsern in Passagen gezüchteten Kulturen erhielten das gleiche Medium, wie bei der Züchtung nach *Maximow*. Sie wurden aber jeden 3. Tag umgesetzt. Alle Kulturen wurden bei 37° bebrütet.

Insgesamt wurden 5 solche Versuchsserien, jede bestehend aus den oben beschriebenen 4 Versuchsreihen angelegt, wobei das Material 5 verschiedenen *Jensen-Sarkomen* entstammte. Nach 15 Tagen Züchtungszeit wurde der Versuch abgebrochen. Einige wenige Kulturen, die alle dem gleichen Tumor entstammten, wurden noch über 5 Wochen, insgesamt 56 Tage gezüchtet.

Ungefähr jeden 3. Tag wurden Kulturen mit *Zenkerscher Flüssigkeit* oder mit 10%igem Formalin fixiert, und zwar gewöhnlich aus jeder Versuchsreihe eine. Sie wurden darauf in Paraffin eingebettet und serienweise geschnitten. Die 5μ dicken Schnitte wurden mit Hämalaun-Eosin, mit der Versilberungsmethode nach *Bielschowsky*, mit Azan und nach *van Gieson* gefärbt. Es wurde darauf geachtet, daß die verschiedenen Serienschnitte einer Kultur möglichst mit allen 4 Färbemethoden behandelt wurden. Wir arbeiteten jedoch nicht alle Sarkomkulturen histologisch auf, sondern etwas mehr als den dritten Teil; nämlich 40. Diese 40 Kulturen ergaben so einheitliche Befunde, daß von weiteren Präparaten keine neuen Ergebnisse zu erwarten waren. Wir glauben, auf diese Weise eine hinreichend klare Vorstellung über die Differenzierungsfähigkeit von *Jensen-Sarkomgewebe* in vitro erhalten zu haben.

Histologie des *Jensen-Sarkoms*.

Das *Jensen-Sarkom* (Abb. 1) besteht zum weitaus größten Teil aus großen, breiten und ziemlich langgestreckten, spindelförmigen Zellen, die einen dicken, gewöhnlich noch länglichen, nicht selten aber auch runden Kern besitzen. Die Zellen liegen regellos, ohne eine bestimmte Anordnung beieinander. Ihre Größe und die der Kerne ist recht verschieden. Meistens wird aber das spindelförmige Aussehen beibehalten. Es finden sich viele Mitosen. Außerdem sehen wir, aber in nur sehr geringer Zahl, Zellen von rundlicher Form mit einem runden, sich stark färbenden Kern. Sie sind kleiner als die eben beschriebenen Zellen. Stromazellen sind sehr selten zu sehen, höchstens 2—4 im Gesichtsfeld bei mittlerer Vergrößerung, mit Ausnahme weniger Tumorbezirke, die ungewöhnlich reich an Capillaren sind. Die Stromazellen sind sehr schmal und haben einen langgestreckten dünnen Kern. Dadurch sind sie von den Sarkomzellen leicht zu unterscheiden. Größere Blutgefäße finden sich selten und im allgemeinen auch nur wenige Capillaren. Bindegewebige Septen sind gar nicht nachzuweisen.

Der Tumor enthält nur wenige dünne mit Azan oder nach *van Gieson* färbbare, kollagene Fasern. Sie liegen immer einzeln; weder vereinigen sie sich miteinander, noch bilden sie ein Netzwerk aus. Oft laufen sie zueinander parallel und ziehen in leichten Windungen an 8—9 Zellen vorbei. Es wird bei weitem nicht jede Zelle von einer Faser berührt. Ganze Zellgruppen von 20—30 Zellen besitzen keine Fasern, manche nur

ganze kurze, dünne, schwach färbbare Fäserchen. So wechseln faserreiche mit faserärmeren Gebieten ab, immer aber bleibt die Fasermenge im Verhältnis zur Zellzahl spärlich. Argyrophile Fibrillen sind ebenfalls nur wenig zu finden, wenn auch etwas mehr als kollagene. Sie bilden an manchen Stellen ein Netzwerk, oft aber bleiben auch sie vereinzelt. Sie sind dann kurz, leicht gewunden und verlaufen regellos.

Da das Stroma des *Jensen-Sarkoms* nur sehr schwach ausgebildet ist, und sich auch Fasern dort befinden, wo weder Blutgefäße noch Stromazellen vorhanden sind, muß angenommen werden, daß die Fibrillen



Abb. 1. *Jensen-Sarkom*, Zenker, Azan. Vergrößerung 340mal.

überwiegend von den Sarkomzellen gebildet werden. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, daß die Fasern meistens in der Nähe der Tumorzellen liegen und die Zahl der Bindegewebsfibrillen größer ist als die Zahl der Stromazellen selbst.

Da also unseres Erachtens das *Jensen-Sarkom*, wenn auch nur in sehr geringem Maße, kollagene und argyrophile Fasern bilden kann, verstehen wir hier unter Differenzierung die verstärkte Bildung solcher Bindegewebsfasern in vitro.

Allgemeines über die Züchtung von Sarkomgewebe in vitro.

In der Gewebekultur wird bis jetzt nur eine geringe Zahl von malignen Bindegewebsgeschwülsten dauernd in regelmäßiger Weise, also in sog. Reinkulturen gezüchtet. Es handelt sich bei ihnen in der Regel um Impftumoren. Normales Bindegewebe, auch das der Ratte, wächst in vitro gewöhnlich schneller als Sarkomgewebe. Seine Wachstumszone

ist schon jeden 2. Tag nach dem Umsetzen in der Regel größer und dichter, seine Wachstumsintensität mithin dementsprechend stärker. Das Sarkomgewebe wächst *in vitro* meistens nicht nur langsamer als Bindegewebe vom gleichen Tier, sondern auch langsamer als es *in vivo* gewachsen ist. Seine Züchtung in der Gewebekultur kann aber erleichtert werden durch Zusatz von Heparin, eine Angabe, die *Zakrzewski*³² als allgemein gültig für alle Tumoren gemacht hat und die verschiedentlich bestätigt wurde. Durch Heparin wird jedoch das Wachstum verlangsamt, und es mag verwunderlich erscheinen, daß gerade ein wachstumshemmendes Mittel eine Dauerzüchtung ermöglicht. Man muß aber unterscheiden zwischen dem Gedeihen einer Kultur und ihrer Proliferationsintensität. Gewöhnlich ist das eine mit dem andern eng verknüpft. Jedoch kann ausgepflanztes Sarkomgewebe — wenigstens in den ersten Tagen — schnell wachsen, ohne daß die Zellen auf die Dauer lebenskräftig bleiben. Das Sarkomgewebe gedeiht dann nicht *in vitro*, sondern stirbt bald ab. Hinzugesetztes Heparin bremst zwar darauf sein Wachstum, aber es erhält nach *Zakrzewskis*³² Erfahrung die Zellen in gutem Zustand. Auf diese Weise wird eine zwar langsame, aber dauernde Proliferation ermöglicht.

Auch bei unseren Versuchen war (so weit ein Vergleich möglich ist) die Wachstumsintensität des Sarkomgewebes in der Kultur geringer als auf dem Tier, ein Verhalten, das unserer Aufgabe, Differenzierung durch verlangsamtes Wachstum zu erreichen, sehr gelegen kommt. Desgleichen gelang es auch uns nur durch Zusatz von Heparin, die Kulturen auf längere Zeit am Leben zu erhalten, wodurch außerdem eine weitere Verlangsamung des Wachstums eintrat. Kontrollkulturen ohne Heparinzusatz wuchsen von Anfang an lebhafter und waren stets viel größer. Sie gingen jedoch nach nicht langer Zeit zugrunde. Eine makroskopisch sichtbare Verflüssigung des Kulturmediums trat selten ein.

Cytologie des Jensen-Sarkoms *in vitro*.

Gewebekulturen des *Jensen-Sarkoms* produzieren zu Anfang drei Arten von Zellen (Abb. 2, Abb. 3). Es werden beobachtet Histiozyten, das sind rundliche oder vielgestaltige, bewegliche, freiliegende Zellen. Da sie *in vitro* außerordentlich lebhaft sind, werden sie auch Wanderzellen genannt. Sie und besonders ihre Kerne können dabei die verschiedensten Formen annehmen. Anfangs vermehren sie sich sehr, später aber nehmen sie an Zahl ab und sind nach 10—11 Tagen Züchtungszeit aus der Kultur fast ganz verschwunden. Daneben finden sich noch zwei Arten von Spindelzellen, die im Gewebeverband wachsen. Dabei überwiegt die eine Art an Zahl ganz bedeutend. Es sind dies lange, plumpe Spindelzellen mit grob granuliertem Zelleib und ovalem chromatinreichem Kern. Daneben finden sich sehr spärlich schlankere Spindelzellen mit zarterem, stärker lichtbrechendem Cytoplasma und länglichem,



Abb. 2. Wachstumszone einer 9tägigen *Jensen*-Sarkomkultur, lebend photographiert.
Vergrößerung 60mal.

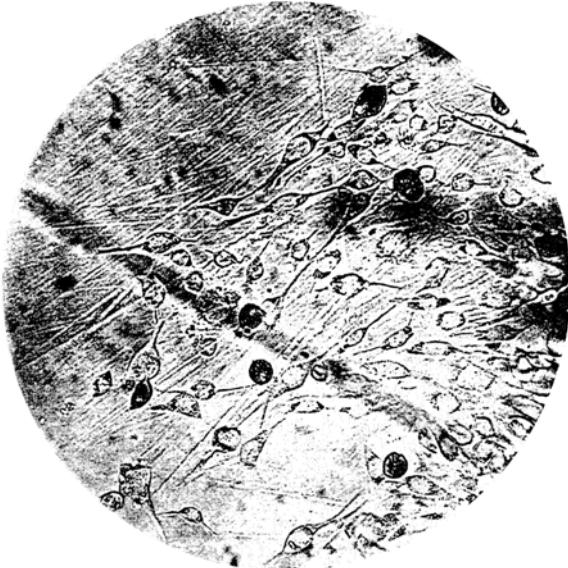


Abb. 3. Wachstumszone einer 10tägigen *Jensen*-Sarkomkultur, lebend photographiert.
Vergrößerung 120mal.

schmälerem Kern (Abb. 4). Von diesen drei Zellsorten werden nach Überzeugung fast aller Untersucher die groben, plumpen, in großer

Mehrheit vorhandenen Spindelzellen als Sarkomzellen angesehen (*G. Levi*). Die spärlichen schlanken Fibroblasten werden als Abkömmlinge der Stromazellen bezeichnet. Diese Auffassungen stützen sich auf vergleichende Betrachtungen der *in vitro* wachsenden und in histologischen Ausgangspräparaten vorhandenen Zellen. Zwar sind diese oben beschriebenen, morphologischen Unterschiede der beiden Arten von Spindelzellen nicht grundsätzlicher Art. Daß aber die überwiegend vorhandenen plumpen Spindelzellen tatsächlich bösartig sind, beweist die Überimpfung

auf das Tier. Denn diese Zellen bilden, auf eine Ratte übertragen, einen schnell wachsenden Tumor, an dem das Tier zugrunde geht. Ob die Histiocytentypen ebenfalls maligne Elemente sind, ist noch nicht in sicherer Weise nachgewiesen. Aber viele Beobachtungen sprechen für ihre Bösartigkeit. *A. Carrel* und *A. H. Ebeling*² sind der Ansicht, daß ihre Anwesenheit in der Gewebekultur für das Wachstum der Spindelzellen notwendig ist. *H. B. Fell* und *J. A. Andrews* sowie *H. Hirschfeld* und *E. Klee-Raviv*



Abb. 4. Aus der Wachstumszone einer Rattenfibroblastenkultur, lebend photographiert.
Vergrößerung 270mal.

dowicz haben Übergangsformen zwischen Histiocytentypen und Sarkomspindelzellen beschrieben sowie die Möglichkeit ihres genetischen Zusammenhangs erwogen und auch *E. G. Craciun* glaubt, daß diese Histiocytentypen eine äußerst maligne Form der Sarkomzellen darstellen.

Versuchsbefunde.

1. Eigene Beobachtungen an den lebenden Sarkomkulturen.

Ungefähr nach 6—12 Stunden wachsen die ersten Zellen aus den in *Carrel*-Flaschen angesetzten Kulturen aus. Wir sehen zuerst in der Mehrzahl rundliche Wanderzellen, die sog. Histiocytentypen. Sie befinden sich dicht gedrängt am Rand der Kultur und wandern dann rasch peripherwärts, oft sehr weit in das plasmatische Medium hinein. Schon nach 3 Tagen Züchtungszeit liegen sie nicht mehr in dicht gelagerten Gruppen,

sondern nur noch einzeln, wenn auch nahe beieinander. 3—4 Tage nach dem Ansetzen zeigen die Histiocyten Anzeichen von Degeneration. Sie beladen sich mit stark leuchtenden Fetttropfen, nehmen an Umfang zu und zeigen eine veränderte Lichtbrechung. Allmählich sterben sie ab. Da der Nachschub aus dem Mutterstück immer geringer wird, verschwinden sie schließlich aus der Kultur. Inzwischen sind aber schon spindelförmige Zellen in der Wachstumszone erschienen. Sie sind größer, massiver und gedrungener und ihr Protoplasma ist dichter und weniger lichtbrechend als bei gutartigen Rattenfibroblasten. Diese Zellen sind die spezifischen Sarkomzellen. Sie nehmen an Zahl schnell zu, wachsen im Gewebsverband und treten in der Wachstumszone infolge des Zugrundegehens der Histiocyten immer deutlicher hervor. Nach etwa 10 Tagen Züchtungszeit besteht die Wachstumszone schließlich fast nur noch aus den spindelförmigen Sarkomzellen. Zu dieser Zeit liegen noch in geringer Zahl Wanderzellen am Rande der Wachstumszone im Plasmamedium. Einige wenige lösen sich immer noch aus dem Mutterstück heraus und verstreuen sich über die Kultur. Das Mutterstück, besonders das der in *Carrel*-Flaschen gezüchteten Kulturen flacht sich in den ersten Tagen immer mehr ab; es wird immer dünner und durchsichtiger, so daß sich der Umfang der Sarkomkulturen zunächst schnell vergrößert. Es handelt sich hier also nicht nur um ein aktives Wachstum durch Zellteilung, sondern auch um ein Auswandern der Zellen in die Peripherie. Die Kulturen selbst sind gewöhnlich fast kreisrund und gleichmäßig dicht. Nach 9—10tägiger Züchtung wachsen sie in den *Carrel*-Flaschen nur noch sehr langsam weiter und vergrößern ihren Umfang nur wenig.

Die auf Deckgläsern gezüchteten Kulturen zeigen ungefähr die gleichen Verhältnisse. Allerdings wachsen sie nicht nach allen Seiten gleichmäßig schnell und dicht.

Bei allen Züchtungsarten werden in der Wachstumszone nur ganz vereinzelt und nur in wenigen Kulturen Spindelzellen beobachtet, welche die von uns oben beschriebenen Unterschiede gegenüber den Sarkomzellen zeigen und damit als Fibroblasten des Stromas angesehen werden müssen.

2. Histologische Befunde an den Sarkomkulturen.

Unsere Beobachtungen erstrecken sich auf die Morphologie und das Verhalten der Zellen des ausgepflanzten *Jensen*-Sarkoms besonders im Mutterstück, dessen Aufbau nur im histologischen Schnittpräparat untersucht werden kann, auf die Entstehung und Entwicklung argyrophiler und kollagener Fasern in den Sarkomkulturen, sowie auf die Veränderungen des plasmatischen Mediums unter dem Einfluß der Zellkolonie. Diese drei Beobachtungsgruppen sollen einzeln für sich beschrieben werden.

Im Mutterstück der Sarkomkultur befinden sich regelmäßig schon nach kurzer Züchtungszeit weniger Zellen als im Ausgangstumor (Abb. 5,

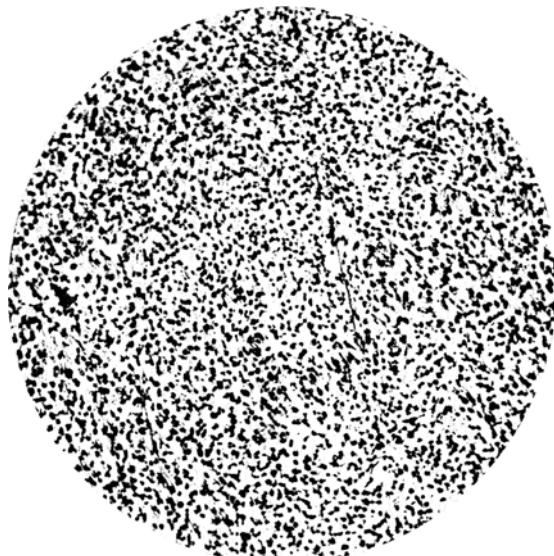


Abb. 5. *Jensen-Sarkom*, Zenker, Azan. Vergrößerung 100mal.



Abb. 6. Schnitt durch eine 3tägige *Jensen-Sarkomkultur*. Zenker, Azan.
Vergrößerung 100mal.

Abb. 6). Wir sehen dort viele regressive Erscheinungen: sich schlecht färbende Zellen, pyknotische Kerne, viele Zelltrümmer und amorphe

Substanzen. Diese Beobachtung wird wohl verständlich, wenn man bedenkt, daß die Tumorzellen *in vitro* sehr anfällig sind und leicht absterben (*A. Fischer*). Da das Mutterstück ihnen im Vergleich zur Wachstumszone schlechtere Ernährungsbedingungen bietet, sehen wir gerade dort relativ wenig Zellen. Die Zellarmut wird scheinbar noch dadurch erhöht, daß sich das Mutterstück abflacht und verbreitert, so daß der Abstand zwischen den Zellen größer geworden ist. Es ist bemerkenswert, daß häufig gerade im Mutterstück sehr junger Kulturen viele Zellen absterben und sich nur relativ wenige Zellen histologisch gut darstellen lassen. *R. Rössle* untersuchte die Transplantation von Tumoren auf das Tier histologisch von den ersten Anfangsstadien an. Er stellte fest, daß kurz nach dem Verimpfen ein Massensterben der Geschwulstzellen einsetzt. Nur wenige Zellen bleiben lebensfähig, und aus ihnen entsteht der neue Tumor. Wir glauben, daß es sich bei unseren Befunden *in vitro* um die gleiche Erscheinung handelt. Auch das Auspflanzen in die Gewebekultur überstehen nur wenige, vermutlich aber sehr bösartige Zellen.

In allen Kulturen des *Jensen-Sarkoms*, jüngeren wie älteren, herrschen auch im Mutterstück die spindelförmigen, etwas plumpen Sarkomzellen mit nicht selten rundlichem Kern vor (Abb. 14). Sie stimmen morphologisch mit den Geschwulstzellen des Ausgangstumors überein. In jüngeren — 3—6-tägigen Kulturen — zeigen sich besonders in der Wachstumszone, kleine rundliche Zellen mit rundem, aber auch oft vielgestaltigem Kern. Sie entsprechen morphologisch den in der Wachstumszone der lebenden Sarkomkulturen beobachteten Histiocyten. Ihre Zahl bleibt relativ gering. Die Sarkom- und Wanderzellen zeigen auch in der Kultur einen gewissen Polymorphismus. Oft läßt es sich deshalb nicht feststellen, welcher Gruppe manche Zellen angehören. Sie dürften Übergangsformen darstellen. Zellen, die infolge ihres Aussehens als Stromazellen angesehen werden können, sind in allen Kulturen ebenso spärlich wie im Ausgangstumor. Nur hin und wieder findet sich — und dann gewöhnlich im Mutterstück — solch eine schlanke Zelle mit schmalem, langgestrecktem Kern. Die Zellen des Stützgerüsts haben sich also weder im Mutterstück der Sarkomkultur noch in ihrer Wachstumszone vermehrt.

Der Zusammenhang der Zellen ist im äußeren Teil der Wachstumszone sehr locker. Gewöhnlich wachsen dort alle Zellen in langen Reihen strahlenförmig in die Peripherie und lassen viel Raum zwischen sich. Nach innen zu liegen die Zellen viel dichter beieinander. Die innere Wachstumszone kann man von dem Mutterstück zwar lebend, aber nicht im histologischen Schnittpräparat abgrenzen. Nur der äußere Teil der Wachstumszone läßt sich wegen seines sehr lockeren und radiären Wachstums von allen anderen Bezirken gut trennen. Den inneren Teil der Wachstumszone rechnet man dagegen im gefärbten Präparat wohl

gewöhnlich dem Mutterstück zu. Zwischen ihnen wird die Unterscheidung deshalb schwierig, weil die Zellen in beiden ungefähr gleich dicht und in ähnlicher gegenseitiger Anordnung liegen. Diese Feststellung ist wichtig für die Beurteilung der Frage, ob auch in der Wachstumszone von Sarkomkulturen Fasern entstehen können.

Viele Sarkomzellen verflüssigen das plasmatische Medium um sich herum (Abb. 7). Es fehlt daher in ihrer Nähe. Sie befinden sich in einem ungefärbten Hof, der optisch völlig leer ist. Wir sehen besonders in der

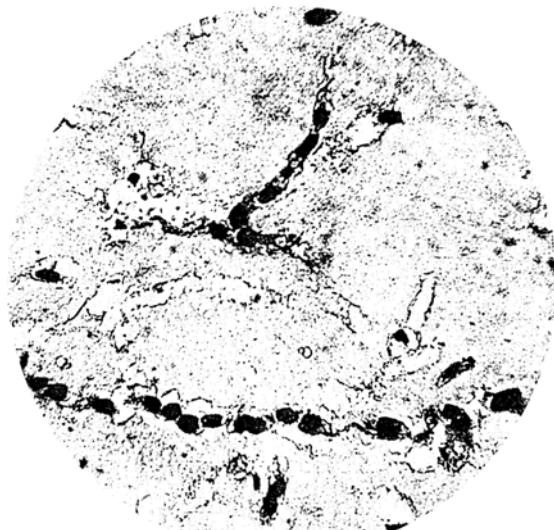


Abb. 7. Äußerster Teil der Wachstumszone einer 14-tägigen *Jensen-Sarkomkultur*, Zenker, Azan. Vergrößerung 250mal.

Wachstumszone die Sarkomzellen gewöhnlich in Lücken oder Spalten des Plasmas, die dort nicht präformiert waren, sondern durch die aktive abbauende Tätigkeit der Sarkomzellen entstanden sind. Im Mutterstück, wo die Zellen sehr dicht liegen, ist kaum noch plasmatisches Medium vorhanden. Die Zellen haben es von allen Seiten verdaut. Nirgends läßt sich nachweisen, daß sie eine Grundsubstanz gebildet haben.

Das plasmatische Medium ist fast immer homogen und strukturlos, bisweilen aber leicht gefasert. Es färbt sich stets gleichmäßig mit Azan graublauish, nicht selten auch graurötlich, mit *van Gieson* hellrot.

Die kollagenen Fasern einer 3-tägigen Kultur verlaufen nicht mehr einzeln wie im Ausgangstumor, sondern bilden schon ein Netzwerk. Sie sind noch dünn, weich, leicht geschlängelt und schließen größere Gruppen von Sarkomzellen ein. Das Netzwerk ist gleichmäßig über die ganze

Kultur ausgebreitet. Eine Vereinigung der Fasern zu dicken Bündeln findet noch nicht statt. Manche Kulturen, aber noch nicht alle, zeigen jetzt schon mehr Fibrillen als der Ausgangstumor. Sie sind ebenfalls dünn und gewöhnlich kurz, manchmal aber verlaufen sie in vielen Windungen in der Nähe der Sarkomzellen. Oft bezeichnen sie den Weg, den die schon außerhalb der Zellkolonie befindlichen Zellen bei ihrer Auswanderung genommen haben. In unmittelbarer Nähe der einzelnen Fasern sehen wir Histiocyten und viel häufiger noch Sarkomzellen. Es

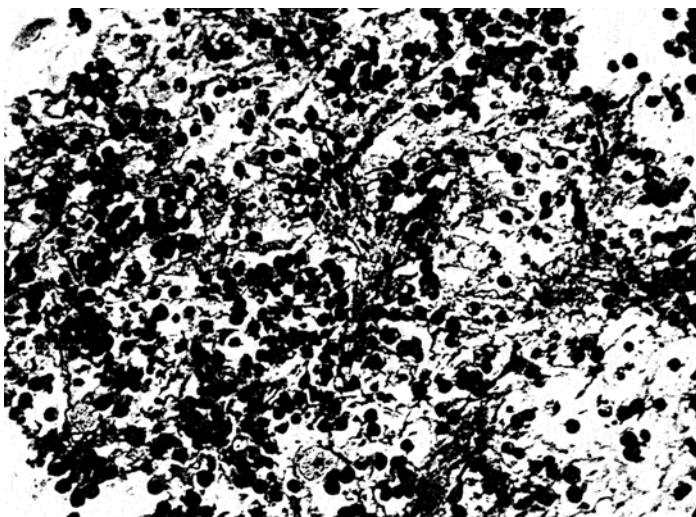


Abb. 8. Schnitt durch das Mutterstück einer 6tägigen Jensen-Sarkomkultur. Zenker, Azan. Vergrößerung 240mal.

finden sich aber auch kollagene Fasern in der Umgebung der wenigen Zellen, die wir aus morphologischen Gründen als Stromazellen betrachten.

6tägige Kulturen besitzen eindeutig mehr kollagene Fibrillen als der Ausgangstumor (Abb. 8). Die Faserbildung ist bei den im Wachstum gehemmten Kulturen am stärksten. Weniger Bindegewebsfibrillen haben die auf Deckgläsern mit der gewöhnlichen Umsetzungstechnik gezüchteten Sarkomkulturen produziert. Innerhalb von 6 Tagen ist in vitro aus den vereinzelt laufenden Fasern des Ausgangstumors zunächst ein zartes und weites Netz, schließlich ein enggespanntes Maschenwerk entstanden, das fast jede im Mutterstück befindliche Sarkomzelle umgibt und aus recht dicken kollagenen Fasern besteht. Diese färben sich mit *van Gieson* in typischer Weise. Die Wachstumszone enthält jetzt weniger Bindegewebsfibrillen als das Mutterstück. Diese Beobachtung lässt sich von diesem Zeitpunkt an bei allen gleichaltrigen und älteren Kulturen machen. Im Gegensatz zur Wachstumszone vereinigen sich die kollagenen

Fasern des Mutterstücks bisweilen schon zu dickeren Bündeln und ballen sich an manchen, noch regellos im Mutterstück verteilten Stellen zu dichteren Strukturen zusammen. Diese stark differenzierten Gebiete sind besonders zellarm. Alle kollagenen und argyrophilen Fasern liegen extracellulär. Ganz kleine Fibrillen schmiegen sich den Zellen eng an, so daß aus ihrem Verlauf die Zellform besonders leicht erkannt werden kann. Aber nie tritt eine Faser mit dem Zellinnern in Beziehung. Größere Fibrillen haben gewöhnlich einen geringen Abstand von den Zellen. Mehr als eine Zellbreite liegen einzeln verlaufende Fasern selten von den

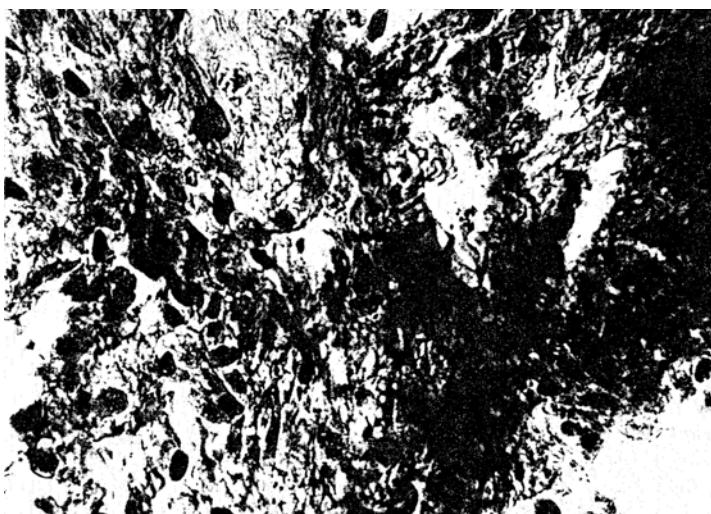


Abb. 9. Schnitt durch das Mutterstück einer 9tägigen *Jensen-Sarkomkultur*, Zenker, Azan. Vergrößerung 430mal.

Sarkomzellen entfernt. Sie befinden sich entweder in dem noch unveränderten Medium oder in dem von den Sarkomzellen durch Verflüssigung des Plasmas gebildeten, farb- und strukturlosen Hof, oft aber auch an der Grenze zwischen Zellhof und Nährplasma. Gelegentlich, aber im ganzen nur selten, stellen wir argyophile und kollagene Fasern außerhalb der Kultur in weiterer Entfernung von den nächsten Sarkomzellen fest. Da sich manchmal in ihrer Nähe auch keine Überreste abgestorbener Zellen nachweisen lassen, muß ihre acelluläre Entstehung in Erwägung gezogen werden (*L. Doljanski und Fr. Roulet*⁶).

9tägige Kulturen weisen im histologischen Präparat noch mehr kollagene Fasern auf als die eben beschriebenen 6 Tage alten (Abb. 9). Die argyrophilen Fibrillen haben sich nicht in dem gleichen Maße vermehrt wie die kollagenen. Auch nach 9tägiger Züchtung besitzen die langsam wachsenden, im Heparinplasma und Heparinserum gezüchteten Zell-

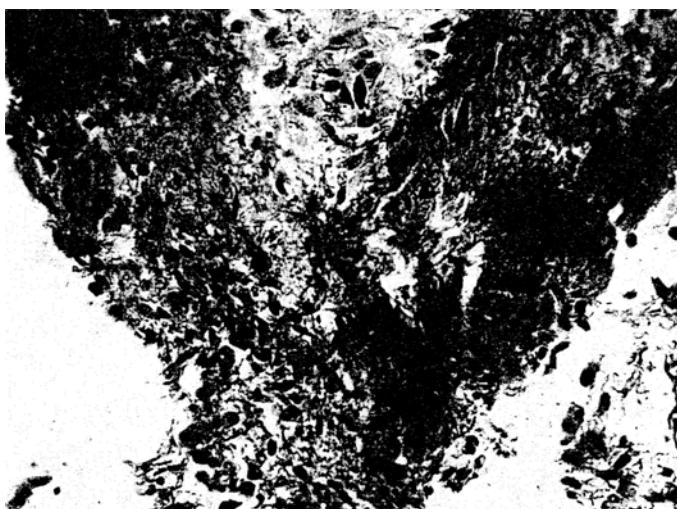


Abb. 10. Schnitt durch das halbe Mutterstück einer 9tägigen Jensen-Sarkomkultur, Zenker, Azan. Vergrößerung 240mal.

kolonien mehr Fasern als die auf Deckgläsern regelmäßig umgesetzten Kulturen. Diese aber haben ihrerseits wieder mehr Fasern produziert als der Ausgangstumor.

Die im Wachstum gehemmten Sarkomkulturen zeigen jetzt im Mutterstück ringförmige, konzentrisch angeordnete, breite kollagene Fasermassen (Abb. 10), die es vollständig ausfüllen und aus einem Filz dünner und dicker, welliger, in gleicher Richtung verlaufender Fasern bestehen (Abb. 11). Zwischen den Bindegewebsfibrillen sind nur noch wenige Sarkomzellen zu sehen. Diese liegen einzeln, gewöhnlich durch dicke, kollagene Bündel voneinander getrennt, ähnlich wie Knorpelzellen in der Knorpelgrundsubstanz. Sie lassen größtenteils



Abb. 11. Schnitt durch das Mutterstück einer 9tägigen Jensen-Sarkomkultur, Zenker, Azan. Vergrößerung 750mal.

weder färberisch noch morphologisch Anzeichen von Degeneration erkennen. Auf sonstige Veränderungen der Zellen im Laufe der Fibrillenbildung soll hier nicht eingegangen werden. Zellen, die von besonders viel Fasern umgeben sind, färben sich manchmal schlecht und zeigen einen pyknotischen Kern. Im Vergleich zum Mutterstück bleibt die Faserproduktion des Teiles der Kultur, den wir im Präparat deutlich als Wachstumszone erkennen, relativ schwach. Die Fasern sind hier

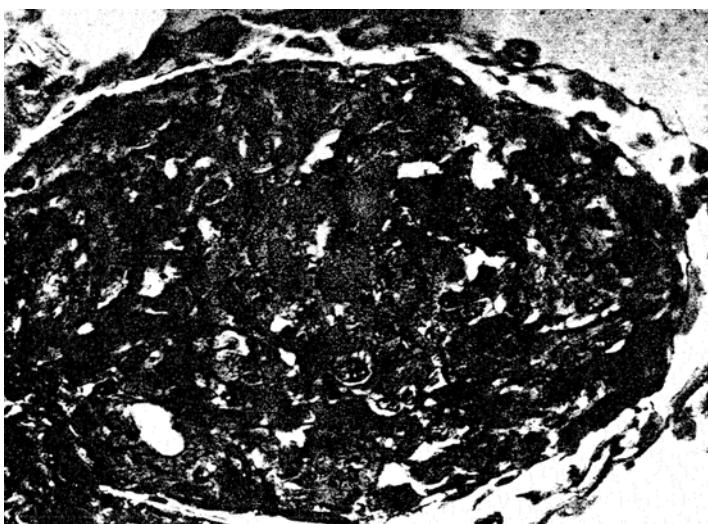


Abb. 12. Schnitt durch eine 14tägige *Jensen*-Sarkomkultur, Zenker, Azan. Vergrößerung 240mal.

zart, kurz und dünn. Sie verlaufen meistens einzeln und radial. Im Mutterstück der normal wachsenden 9tägigen Sarkomkulturen sind keine ringförmigen, zellaren Strukturen nachweisbar, sondern nur ein dichtes, aus dicken kollagenen Fasern bestehendes Filzwerk, das jede Zelle umgibt und dessen einzelne Äste oft bis zu Zellbreite dick werden können.

Bei 12–15tägigen Kulturen hat die Faserbildung hinsichtlich ihrer Menge, sowie ihrer strukturellen und qualitativen Entwicklung wohl den Höhepunkt erreicht (Abb. 12). Die stärkste Faserbildung ist wie gewöhnlich im Mutterstück festzustellen. Viele kollagene Fasern haben sich hier zu dicken und starren kollagenen Bändern verschmolzen. Ihr homogenes Aussehen, ihre starke Färbbarkeit und ihre starre Architektur lassen sie schon fast sklerotisch erscheinen. Andere Faserbündel sind aber aus dicht gepackten Einzelfasern aufgebaut, die entweder parallel eng nebeneinander liegen oder sich gegenseitig verflechten. Immer ist bei den kollagenen Fasern des Mutterstücks die Neigung vorhanden, sich in konzentrischen Kreisen anzulegen. Jedoch werden

solche ringförmigen Strukturen selten in vollkommener Weise gebildet. Denn häufig ziehen dicke Faserbündel kreuz und quer durch das Mutterstück und überlagern die kreisrund angeordneten Fibrillen. Die Sarkomzellen des Mutterstücks liegen in schmalen Lücken, die die Bindegewebsfibrillen freigelassen haben. Wo sich besonders viele Fasern befinden, sind stets wenig Sarkomzellen zu sehen. Da sie sich oft nicht mehr einwandfrei färben lassen, sondern pyknotische Kerne zeigen, dürfen wir annehmen, daß sie allmählich absterben. Niedergeschlagene Kalksalze sind nirgends im Mutterstück bemerkt worden. Überreste von plasmatischem Medium sind dort nur sehr selten zu sehen, während sie von anderen (*W. v. Möllendorff, A. Paravicini*) oft im Mutterstück von Bindegewebeskulturen beobachtet wurden.

In der Wachstumszone ist die Fasermenge weiterhin viel geringer als im Mutterstück. Gewöhnlich hört die überaus starke Faserbildung des Mutterstückes schlagartig an der Grenze zur Wachstumszone auf (Abb. 14). Nur an einigen wenigen Stellen gehen die Bindegewebsfibrillen allmählich in die Wachstumszone über. Hier liegen sie einzeln, bilden auch bei 12tägigen Kulturen selten ein Netzwerk, und dann auch nur über ein kleines Gebiet. Sie sind kürzer und dünner als die Fasern des Mutterstücks und färben sich einwandfrei mit Azan, nach *van Gieson* und nach *Bielschowsky*.

In der Wachstumszone werden aber noch andere faserige Bildungen beobachtet, die infolge der engen Beziehungen der Wachstumszone zum plasmatischen Medium sich allmählich entwickeln und in älteren Kulturen deutlich zu sehen sind. Sie sollen im nächsten Abschnitt besprochen werden.

Eine 33tägige Sarkomkultur zeigt uns keine wesentlichen neuen Befunde (Abb. 13).

Einige Kulturen aus dem gleichen Tumor wurden 56 Tage lang gezüchtet. Bei der histologischen Bearbeitung erwiesen sie sich als abgestorben. Doch hat sich das Fasergerüst an manchen Stellen noch gut erhalten, und es ist deutlich zu erkennen, wie zwischen den von kollagenen Fasern gebildeten Lücken die Zellen gelegen haben. Wir können noch feststellen, daß jede Zelle von einem enggesponnenen fibrillären Netzwerk umgeben war. An anderen Stellen befinden sich die kollaginen Fasern im Stadium des Zerfalls.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in den Mutterstücken aller langsam wachsenden Sarkomkulturen in äußerst starkem Maße Bindegewebsfasern gebildet werden. Ihre Wachstumszonen besitzen gewöhnlich viel weniger Fibrillen. Oft sind hier zahlreiche Gebiete faserarm, auch wenn sie reich an Zellen sind, häufig sind aber auch dort Bindegewebsfibrillen in reichlicher Menge entstanden. Genau so unregelmäßig wie in der Wachstumszone ist die Faserbildung der auf Deckgläsern in

Passagen gezüchteten Kulturen. Stets aber bleibt sie geringer als die Fibrillenproduktion der im Wachstum gebremsten Sarkomkulturen.

Die von uns benutzten drei Differenzierungsmethoden haben sich in unseren Versuchen hinsichtlich Faserbildung als nicht gleichwertig erwiesen. Nämlich die nach *Maximow* gezüchteten Kulturen differenzierten sich in geringerem Maße als die nach *Fischer-Parker* oder nach *Zakrzewski* behandelten; während die beiden letzten Methoden ungefähr das gleiche leisteten.



Abb. 13. Schnitt durch das Mutterstück einer 33-tägigen *Jensen*-Sarkomkultur. *Zenker, Bielschowsky*. Vergrößerung 240mal.

Berichtet wurde schon davon, daß die Sarkomzellen häufig ihren Nährboden, das Plasmaextraktgemisch angreifen und um sich herum verflüssigen. Besonders die Zellen der Wachstumszone liegen wie die Osteoklasten des Knochens in den von ihnen im Plasmaextraktgemisch gebildeten Höhlen. Da die Sarkomzellen besonders im äußeren Teil der Wachstumszone sehr locker wachsen, bleibt viel plasmatisches Medium zwischen ihnen bestehen. Aber auch weiter nach innen zu lassen sich an manchen Stellen noch Überreste des Plasmas erkennen. Sie zeigen die Form von langen, schmalen Streifen und Bändern, die zur Peripherie hin immer weiter werden. Denn die Sarkomzellen wachsen in langen Reihen strahlenförmig nach außen und entfernen sich mit ihren Längsseiten immer mehr voneinander. Diese Plasmabänder sind nicht selten schmäler als die Zellen selbst. Bei oberflächlicher Betrachtung können sie in solchen Fällen für eine von den Zellen produzierte Grundsubstanz angesehen werden. Doch eine genauere Betrachtung zeigt deutlich ihre

nicht unterbrochene, fortlaufende Verbindung mit dem peripher liegenden plasmatischen Medium. Diese Plasmastreifen und alles Nährbodenplasma in der Nähe der Zellen überhaupt, ist in den ersten Tagen nach dem Ansetzen der Kultur vollkommen homogen und strukturlos. Ungefähr nach dem 6. Tag zeigt sich in ihm eine leichte, später immer stärker werdende Durchfaserung. Im Anfang sehen wir nur eine ganz zarte faserige Zeichnung (Abb. 14). Im Laufe der nächsten Tage wird sie immer schärfner und deutlicher. Allmählich heben sich selbständige Fibrillen aus dem durchfaserten Plasma hervor und modellieren sich immer schärfter aus ihm heraus (Abb. 15). Sie färben sich allmählich in typischer Weise mit Azan, sehen dabei aber noch etwas glasig und durchsichtig aus. Später kann man dann nicht mehr sagen, ob es sich bei ihnen schon um kollagene Fasern oder noch um gefasertes Plasma handelt (Abb. 16). Diese Vorgänge spielen sich am deutlichsten und am schnellsten in unmittelbarer Nähe der Sarkomzellen ab, also besonders in den langen Plasmabändern zwischen den Sarkomzellen der Wachstumszone. In etwas weiterer Entfernung der Sarkomzellen treten



Abb. 14. Schnitt durch eine 9tägige Jensen-Sarkomkultur, Zenker, Azan. Vergrößerung 560mal.

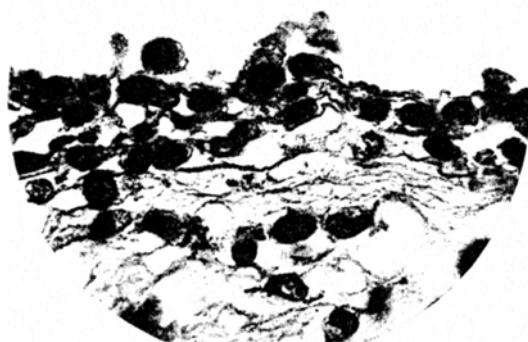


Abb. 15. Schnitt durch die Wachstumszone einer 14tägigen Jensen-Sarkomkultur, Zenker, Azan. Vergrößerung 560mal.

diese Veränderungen in geringem Maße auf, und außerhalb des Bereiches der Kultur fehlen sie gänzlich. Sie sind nicht in allen Kulturen in gleichmäßiger Stärke vorhanden. Diese aus dem Plasma entstehenden Fasern verlaufen meistens in leichten Windungen stets parallel zur Zellänge und befinden sich gewöhnlich an den Rändern der von den Sarkomzellen gebildeten Plasmahöhlen. Sie sind dünn, liegen fast immer einzeln und bilden nur dort ein Netzwerk aus, wo sie sich in größerer Zahl finden, also dort, wo die Zellen der Wachstumszone dichter gelagert sind als an anderen Stellen. Die Plasmafasern lassen sich histologisch



Abb. 16. Schnitt durch die Wachstumszone einer 9tägigen *Jensen*-Sarkomkultur. Zenker, Azan. Vergrößerung 560mal.

von zweifellos echten Kollagenfasern dadurch unterscheiden, daß sie ohne scharfe Begrenzung mehr oder minder ausgesprochen ins Plasma übergehen. Dieses sehr schmale Übergangsgebiet färbt sich auch mit Azan weder wie das Plasmaextraktgemisch noch wie die Plasmafaser. Seine Farbe stellt eine Übergangsnuance dar.

Alle diese Befunde hinsichtlich Faserbildung stehen im Widerspruch zu den Feststellungen Zakrzewskis³³, der nachgewiesen zu haben glaubte, daß „das wesentliche Merkmal einer Geschwulstzelle in ihrem Mangel an Differenzierungstendenz unter der Einwirkung von physiologischen Differenzierungsfaktoren liegt“. Es bleibt unverständlich, warum unsere Untersuchungen zum entgegengesetzten Resultat führten, obwohl wir dafür das gleiche Material und die gleichen physiologischen Differenzierungsfaktoren benutztten. Allerdings ist aus Zakrzewskis Arbeit nicht zu entnehmen, ob er seine Befunde mit den gleichen histologischen Methoden erhoben hat, da er wohl im Gegensatz zu uns vornehmlich

die biologische Seite der Differenzierung und nicht ihre morphologische untersucht hat.

Deutung der Befunde.

Welche Zellen bilden hauptsächlich die Fasern?

Da unsere Sarkomkulturen auch gutartige, vom Stroma des Ausgangstumors abstammende Zellen enthielten, soll zunächst untersucht werden, welchen Anteil sie an der Fibrillenbildung genommen haben können. Zweifellos haben sie in vitro ebenfalls Fasern gebildet. Und es ist für unsere Frage nach der Differenzierungsfähigkeit der *Sarkom*-Zellen wichtig zu entscheiden, ob die in der Kultur beobachteten Bindegewebsfasern ausschließlich oder auch nur vorwiegend durch ihre Tätigkeit entstanden sind.

Unsere Beobachtungen und Überlegungen sprechen dafür, daß die Fibrillenproduktion ganz vorwiegend von den Sarkomzellen ausgegangen ist. Wir gehen von zwei für diese Fragestellung äußerst wichtigen histologischen Befunden aus. Zuerst einmal ist die Zahl der gutartigen Zellen im Ausgangstumor verschwindend gering. Auch unsere Sarkomkulturen enthalten mithin von vornherein fast nur bösartige Zellen. Aber auch weiterhin vermehren sich die Stromazellen in der Sarkomkultur nicht, wie wir histologisch feststellen konnten. Also überwiegen auch im Laufe der Züchtungszeit vollständig die Sarkomzellen.

Dabei setzen wir freilich voraus, daß die Zellen, die in vitro und in vivo morphologisch einander gleichen, auch tatsächlich in ihrem Wesen übereinstimmen. Es könnte jedoch der Einwand erhoben werden, daß die gutartigen Spindelzellen sich stark in der Sarkomkultur vermehrt, aber dabei ihr Aussehen so verändert haben, daß sie nicht mehr als solche erkannt werden können. Dann würden sie zu Unrecht zu den malignen Zellen gerechnet werden. Beide Überlegungen sind aber sehr unwahrscheinlich. Denn gerade die gutartigen Zellen bewahren ihr morphologisches Aussehen mit großer Konstanz, während die Form der Tumorzellen mehr oder weniger großen Schwankungen unterworfen ist. Es ist unseres Wissens nicht beschrieben worden, daß die gutartigen Fibroblasten ihre Gestalt ändern, weder bei normaler Züchtung noch bei Versuchen, die in vitro das Eindringen von Tumorzellen in normales Gewebe beobachteten. Auch wir beschrieben zwar Übergangsformen zwischen Sarkomzellen und Histiozyten, aber keine zwischen normalen Fibroblasten und Sarkomspindelzellen bzw. Wanderzellen.

Aber die morphologische Untersuchungsmethode bringt uns allein nicht weiter. Die Richtigkeit unserer auf diese Weise erhobenen Befunde kann bestätigt werden durch biologische Nachprüfungen. Zur Entscheidung der Frage, ob unsere Sarkomkulturen in nennenswerter Zahl Sarkomzellen enthielten, wurden einige Kulturen aufs Tier verimpft. Sie waren über 14 Tage nach der Methode von *Fischer* und *Parker*

gezüchtet worden, hatten also wohl, wie alle anderen 14tägigen Kulturen, Fasern in reichlicher Menge gebildet. Ungefähr nach 10 Tagen zeigte sich an der Impfstelle ein kleiner Tumor, der anfangs langsam, später aber sehr rasch größer wurde. Als er nach weiteren 12 Tagen etwa pfauenengroß war, wurde er operativ dem Tier entnommen und histologisch untersucht. Es handelte sich um ein typisches *Jensen-Sarkom*. Sein Fasergehalt war nicht deutlich größer als der sonst in Tierpassagen gezüchteten *Jensen-Sarkome*. Die Zellen dieser Geschwulst erwiesen sich als mit der überwiegenden Mehrzahl der Zellen in den Sarkomkulturen morphologisch völlig identisch. Diese erfolgreiche Verimpfung aufs Tier beweist nun, daß sich in der Kultur Sarkomzellen befinden haben, und zwar in der Zahl, die für das Gelingen der Impfung notwendig ist.

Es ist von der Virulenz der Geschwulstzellen abhängig, wieviel Zellen dafür nötig sind. Nach einer neueren Arbeit von *A. Symeonidis*, die sich mit diesem Problem beschäftigte, steht „die Zellanzahl, die für die erfolgreiche Verimpfung eines Transplantationstumors nötig ist, im direkten Verhältnis zum Durchschnittsvirulenzgrad dieser Geschwulstzellen“. Aus dieser Arbeit und der darin herangezogenen Literatur läßt sich ersehen, daß die Zahl von 50 000 Zellen ungefähr das Minimum darstellt, mit der es unter günstigen Umständen mitunter gelingt, ein *Ehrlich-Sarkom* aufs Tier zu übertragen. Es sei angenommen, daß ebenso viele Zellen zur erfolgreichen Verimpfung eines *Jensen-Sarkoms* von normaler Virulenz notwendig sind. Eine Gewebekultur enthält aber etwa 60 000 Zellen (*A. Fischer*). Es ist nicht ausgeschlossen, daß unsere Sarkomkulturen weniger enthielten, da das Mutterstück zellarm war und ein ansehnlicher Teil der Wachstumszone beim Ausschneiden im Züchtungsmedium zurückbleiben mußte. Diese Ziffern lassen die Annahme zu, daß mindestens $\frac{5}{6}$ aller Zellen in der Sarkomkultur Sarkomzellen waren. Andererseits besagt aber diese Feststellung nicht, daß das restliche Sechstel aus gutartigen Zellen bestand. So groß war die Zahl der Zellen im histologischen Präparat nicht, die morphologisch einwandfrei ihre Herkunft von den gutartigen Fibroblasten erkennen ließen.

Das Impfergebnis hat also damit die morphologische Feststellung bestätigt, daß die Mehrzahl unserer Zellen Sarkomzellen waren.

Außer den oben erwähnten histologischen Befunden und der gelungenen Verimpfung sprechen noch manche Überlegungen dafür, daß die Bindegewebsfasern durch die Tätigkeit der Sarkomzellen entstanden sind.

Wir können im histologischen Präparat erkennen, daß sich die Fasern stets über das ganze Mutterstück in häufig gleichmäßiger Dichte ausbreiten (Abb. 17). Dieser Befund spricht wohl dafür, daß alle im Mutterstück verstreuten Zellen an der Fibrillenbildung beteiligt waren, mithin auch die Sarkomzellen. Waren die Fasern ein Produkt der Stromazellen, so dürften sie nur selten und so unregelmäßig verteilt anzutreffen sein,

wie diese Elemente. Weiterhin können wir beobachten, daß in der näheren Umgebung der wenigen normalen Fibroblasten — wie schon oben beschrieben — auch nicht mehr kollagene Fasern vorhanden sind, als an anderen Stellen des Mutterstücks. Daraus schließen wir, daß die Spindelzellen der bösartigen Geschwulst in ihrer Differenzierungsfähigkeit den Fibroblasten nicht nachstehen.

Wir beobachten ferner in vitro die Entwicklung komplizierter Fasersysteme, ganz ähnlich denen, wie sie bei gutartigen Bindegewebekulturen zu sehen sind. Wollte man annehmen, daß nur die Stromazellen der Sarkomkultur die Fasern gebildet hätten, so wäre es schwer verständlich, daß diese geringe Zahl von Zellen ungefähr das gleiche leisten kann, was in der Bindegewebekultur nur die Gesamtheit der Zellen zustande bringt.

Wir haben weiterhin beschrieben, daß in manchen Kulturen schon 3 Tage nach dem Ansetzen oft mehr Fasern gefunden werden als im Ausgangstumor, daß aber immer statt der vereinzelt laufenden Bindegewebsfibrillen ein Fasernetzwerk entstanden ist. Auch diese Feststellung spricht dafür, daß in der Sarkomkultur schon von Anfang an Zellen vorhanden sind, die in bedeutender Zahl an den Differenzierungsvorgängen teilnehmen. Unsere Präparate zeigen aber, daß die gutartigen Zellen sich überhaupt nicht so sehr vermehren, daß sie in stärkerem Maße an der Fasergenese mitwirken können. Auch aus diesem Grunde müssen wir annehmen, daß sich daran hauptsächlich die Sarkomzellen beteiligen. Alle diese Beobachtungen machen es sicher, zumindestens aber sehr wahrscheinlich, daß die Bildung und weitere Entwicklung der Fasern ganz überwiegend von den Sarkomzellen ausgegangen ist.

Wie entstehen die Fasern?

Ähnliche Veränderungen des plasmatischen Mediums, wie wir sie in unmittelbarer Nähe der Sarkomzellen sehen (s. S. 423 ff.), haben *L. Dolijski* und *Fr. Roulet*⁵ sowie *A. W. Rumjantzev* und *W. Suntzow* bei ihren Untersuchungen an gutartigen Bindegewebekulturen beschrieben. Sie zogen aus ihren Beobachtungen den Schluß, daß die Bindegewebsfasern im plasmatischen Medium mit Hilfe von Stoffen entstehen, die von den Zellen sezerniert werden, ins Plasma diffundieren und seine Durchfaserung begünstigen. Da die Konzentration dieser Stoffe in der



Abb. 17. Schnitt durch das Mutterstück einer 32-tägigen Jensen-Sarkomkultur. *Zenker, Bielschowsky*. Vergrößerung 100mal.

nächsten Umgebung der Zellen am größten ist, geht die Faserbildung dort auch am schnellsten und deutlichsten vor sich. Diese Anschauung über die Entstehung der kollagenen und argyrophilen Fasern läßt sich auch auf unsere Sarkomkulturen übertragen. Denn sie weisen die gleichen Befunde auf. Unsere Präparate zeigen, daß dieser eben beschriebene Vorgang der Fibrillenbildung sich besonders in der Wachstumszone abspielt, ungefähr am 6. Tage beginnt und nach weiteren 6 Tagen noch nicht abgeschlossen ist. Er verläuft jedoch nicht in allen Kulturen in gleichmäßiger Stärke, bisweilen fehlen diese Veränderungen des Nährmediums fast vollkommen. Die Fibrillen entstehen bei unseren Versuchen aber häufig auch im völlig unveränderten Plasma und ebenso dort, wo, wie im Mutterstück, sich kein plasmatisches Medium mehr befindet. Dort ist es von den Zellen oft völlig abgebaut worden, so daß der Raum zwischen ihnen leer erscheint. Die hier vorhandenen Fasern scheinen ganz plötzlich zu entstehen, und sowohl bei jüngeren wie bei älteren Kulturen ohne irgendwelche Beteiligung des Nährmediums. Solche Fasern fanden wir besonders im Mutterstück, und zwar schon von den ersten Tagen der Züchtung an. Diese Beobachtungen scheinen für die Ansichten von *A. Maximow* und *G. Momigliano-Levi* zu sprechen. Sie kamen auf Grund ihrer Befunde zu der Vorstellung, daß ein von den Zellen sezerniertes Sol plötzlich in den Gelzustand übergeht und auf solche Weise Fibrillen bildet.

An Hand unserer Präparate glauben wir also, daß die Fasern *in vitro* auf zwei verschiedene Weisen gebildet werden. Es bleibt aber unentschieden, ob es sich dabei tatsächlich um qualitative oder quantitative Unterschiede handelt. Denn es wäre denkbar, daß die Faserbildung sich im Mutterstück und in der Wachstumszone auf grundsätzlich gleichem Wege, aber nur mit verschiedener Geschwindigkeit abspielt. So könnte sie in der Wachstumszone so langsam verlaufen, daß man hier alle Stadien der Fasergenese genau verfolgen kann, also auch die Etappen, die bei der überstürzten Fibrillenbildung im Mutterstück der Beobachtung entgehen.

Ohne auf das Problem der extra- oder intracellulären Faserentstehung näher einzugehen, möchten wir zusammenfassend betonen, daß wir argyophile und kollagene Fasern stets nur außerhalb der Zellen gesehen haben und daß sie nie in Beziehung zum Zellinnern traten. Damit bestätigen wir die Befunde der Mehrzahl der Gewebezüchter, die fast stets für die extracelluläre Faserbildung eingetreten sind. Ausnahmen bilden z. B. *D. Odiette* und *M. R. Lewis*, deren Untersuchungen sind aber nicht unwidersprochen geblieben (*G. Levi*).

*Wodurch wird die verstärkte Faserbildung *in vitro* ausgelöst?*

Nachdem auseinandergesetzt wurde, welche Zellen der Sarkomkultur hauptsächlich die Fasern gebildet haben und auf was für eine Art und

Weise die Fibrillen in vitro entstanden sind, soll nun untersucht werden, durch welche Umstände bei einem in vivo sehr faserarmen Tumor in der Gewebekultur eine reichliche Fibrillenproduktion ausgelöst wurde.

Das künstlich unterhaltene Leben in vitro begünstigt auf zweierlei Weise die Differenzierung von Zellen. Die Gewebekultur befreit das Gewebe von den Einflüssen des Körpers, sie schafft also dadurch die Voraussetzung, daß latent vorhandene, aber im Organismus nicht zur Auswirkung gelangende Eigenschaften manifest werden. Ferner liegt es in der Hand des Experimentators, die Lebensbedingungen des Gewebes so zu gestalten, wie es für seine Fragestellung notwendig ist.

In unseren Versuchen wurde, um die Faserentstehung zu begünstigen, das Kulturwachstum künstlich gebremst. Und die Befunde sprechen dafür, daß die Verlangsamung der Proliferation die Differenzierung der Sarkomzellen begünstigt hat. Denn wir können feststellen, daß sämtliche im Wachstum gehemmten Kulturen im verstärktem Maße Fasern gebildet haben, und daß gerade die meisten Fasern in den am langsamsten wachsenden Kulturen entstanden sind. In diesen Kulturen entwickelten sich die kollagenen Fibrillen auch am schnellsten und eindrucksvollsten zu komplizierteren Strukturen. Die Differenzierung des Sarkomgewebes war also bei unseren Versuchen von der Wachstums geschwindigkeit abhängig. Daß in den auf Deckgläsern gezüchteten Kontrollkulturen ebenfalls in mäßigem Grade Differenzierungerscheinungen aufgetreten sind, erklären wir durch die geringe Proliferationsintensität des Sarkomgewebes in vitro gegenüber der Wachstumsenergie in vivo.

Es fragt sich aber, ob auch die Loslösung des bösartigen Gewebes vom Einfluß des Körpers die Faserproduktion in vitro ermöglicht hat. Folgende Erwägungen sprechen gegen diese Annahme. Man nimmt zwar für Spontantumoren an, daß bei ihrer Entstehung und mangelhafter Ausreifung die allgemeine Krebsdisposition des Organismus irgendwie mitbeteiligt ist. Unsere Untersuchungen sind aber an Impftumoren ausgeführt worden. Deren Träger sind nun bis zur Verimpfung völlig gesunde Tiere, die wahrscheinlich nie an einer Spontangeschwulst erkrankt wären. Ihnen fehlt also der allgemeine Faktor, der für die geringe Differenzierung eines malignen Tumors mitverantwortlich sein könnte. Er kann deshalb nicht für die mangelhafte Ausreifung verantwortlich gemacht werden.

Es bleibt noch zu erörtern, ob nicht die Explantation an und für sich die Fibrillenbildung begünstigt hat. *L. Doljanski* und *Fr. Roulet* sowie *v. Jenev* und *Törö* vertreten die Ansicht, „daß die Gewebe, die in vivo nur ein spärliches Fibrillengerüst bilden, in dem Augenblick, in dem sie in das Plasma der Kultur kommen, zu höchster fibrillenbildender Tätigkeit angeregt werden“⁵. Nach ihrer Ansicht befinden sich die

Bindegewebzellen in vitro in einem für die Differenzierung günstigen Milieu. Die Bindegewebfasern entstehen ja direkt aus dem Plasmamedium, haben also das Material zur Faserproduktion reichlich zur Verfügung. Daraus könnte man folgern, daß die Fibrillenbildung in einem sehr konzentrierten, eiweißreichen Züchtungsmedium am stärksten ist. *Dokjanski* und *Roulet* erwähnen derartige Versuche, die diese Ansicht bestätigen. Unsere dementsprechend ausgeführten Experimente am Sarkomgewebe führten zu keinem eindeutigen Ergebnis, da die Kulturen derartige konzentrierte Züchtungsmedien nicht vertrugen und abstarben. Deshalb können wir zu diesem Problem keine Stellung nehmen.

Vergleich der Faserbildung bei benignen und malignen Kulturen.

Es bleibt noch zu untersuchen, ob sich die Entstehung und Entwicklung der Bindegewebfasern bei Sarkom- und gutartigen Bindegewebekulturen unterscheidet. Unsere histologischen Befunde machen es wahrscheinlich, daß Sarkomzellen argyophile und kollagene Fibrillen auf gleiche Art wie Bindegewebzellen bilden. Auch in zeitlicher Hinsicht bestehen anscheinend keine Unterschiede. Die ersten Bindegewebfasern entstehen in der gutartigen Bindegewebekultur schon sehr früh (*G. Momigliano-Levi*, *A. W. Rumjantsew* und *A. Suntzova*). Am 3.—4. Züchtungstage beginnt sich ein Fasernetz zu entwickeln, das sich später in ein aus dicken Fasern bestehendes Flechtwerk umwandelt. Ungefähr nach 2 Wochen ist der Höhepunkt der Faserentwicklung in vitro erreicht. Auch die Sarkomzellen scheinen dieselbe Zeit zu benötigen. Sie bilden nach 3 Tagen ein Netzwerk von kollagenen Fasern, das später in ein dichtes Fasergeflecht übergeht, und sich mit ungefähr 9—10 Tagen im Mutterstück zu Strukturen entwickelt, die für Gewebekulturen typisch sind. Diese sind nach Ablauf der 2. Woche vollständig ausgebildet.

Die Gewebekultur ist eine selbständige biologische Erscheinung besonderer Art mit eigenen Gesetzen und Entwicklungsmöglichkeiten, die nicht ohne weiteres denen des tierischen Organismus entsprechen. So folgt der Aufbau der Fasersysteme in vitro den Bedingungen, die in der Kultur vorhanden sind, er entspricht den dort vorhandenen Spannungslinien (*W. v. Möllendorff*). Durch Änderung des Spannungssystems mittels Zug entstehen neue Faserstrukturen, die sich den nun herrschenden mechanischen Anforderungen anpassen (*O. Düggeli*, *Th. Huzella*). Die zentralen Anteile des Mutterstücks sind bei langsam wachsenden Kulturen oft arm an Lebenserscheinungen und hier bilden sich infolgedessen selten gesetzmäßige Anordnungen aus; wohl aber an der Grenze zur Wachstumszone hin. In der Randzone des Mutterstücks sind die Fasern lagenweise in konzentrischen Ringen angeordnet. Dazu kommen noch senkrecht von oben nach unten verlaufende Faserzüge, „die um den Kern des Mutterstücks herum nach innen zu der hinteren

und vorderen Begrenzungsfläche zustreben“ (*W. v. Möllendorff*). Oft ist jedoch diese Grundform im Mutterstück nicht typisch ausgebildet, sondern wird durch Unregelmäßigkeiten gestört. In der Wachstumszone verlaufen die Fasern ganz vorwiegend radiär, werden nach außen zu immer dünner, zarter und seltener, während sie nach innen zu sich mit den Faserringen des Mutterstücks vereinigen. Diese Strukturen sind für alle Bindegewebefasern bildende Kulturen typisch, einerlei von welchen Organen oder Tieren sie abstammen. Unsere Sarkomkulturen haben gleichfalls Fasersysteme entwickelt, die sich von den Strukturen gutartiger Bindegewebekulturen weder im Mutterstück noch in der Wachstumszone unterscheiden. Für gutartige Bindegewebekulturen wird weiter beschrieben, daß die Faserbildung in dem Mutterstück viel stärker ist als in ihrer Wachstumszone. Auch in diesem Punkt besteht zwischen dem Sarkomgewebe und dem normalen Bindegewebe keine Differenz.

Wir haben weiterhin gefunden, daß nicht wenige Sarkomzellen im Mutterstück sich im Stadium der Nekrobiose oder des Verdämmerns befinden. Und zwar sind das besonders die Zellen, die zwischen dichten Fasermassen liegen (Abb. 11). Bei langsam wachsenden Bindegewebekulturen wurden ebenfalls im Mutterstück regressive Vorgänge beobachtet (*W. v. Möllendorff, A. Paravicini*).

Es ist noch zu erörtern, ob die Faserproduktion des Sarkomgewebes in vitro genau so stark ist, wie die des gutartigen Bindegewebes. Darüber können wir keine endgültigen Angaben machen. Vergleiche unserer histologischen Präparate mit photographischen Abbildungen verschiedener Autoren, die Differenzierungsversuche an normalem Bindegewebe angestellt haben, scheinen für eine geringere Faserbildung des Sarkomgewebes zu sprechen. Jedoch ist das Vergleichsmaterial wenig einheitlich, weil oft verschiedenes Gewebe mit wechselnder Methodik gezüchtet wurde. So ist es schwierig, zu einem endgültigen Urteil zu kommen. Es wäre aber nicht verwunderlich, wenn die Faserproduktion unserer Sarkomzellen tatsächlich geringer ist. Denn der Ausgangstumor — das *Jensen-Sarkom* — ist vor über 30 Jahren entstanden. Seine Zellen haben möglicherweise infolge ihrer lebhaften Proliferation seitdem nicht mehr die Gelegenheit zur Faserbildung gehabt, und sie könnten deshalb die Fähigkeit, Fasern zu produzieren, nur noch in abgeschwächtem Maße beibehalten haben. Auch dafür gäbe es entsprechende, an benignen Gewebekulturen gesammelte Erfahrungen. Aus Versuchen *Olivos* weiß man nämlich, daß der zur Zeit seiner Untersuchungen 16 Jahre alte *Carrel'sche Fibroblastenstamm*, der wohl aus einer Mischung von Muskelzellen, Fibroblasten und auch Endothelzellen besteht (*G. Levi*), weniger Fasern gebildet hat als frisch ausgepflanzte Kulturen. Diese mit der Zeit fortschreitende Einschränkung in der Differenzierungsfähigkeit der Sarkomzellen wäre aber noch genauer zu untersuchen.

Folgerungen für die Biologie der Tumorzellen.

Unsere Versuche haben aufgedeckt, daß die Sarkomzelle die Fähigkeit besitzt, *in vitro* mehr Bindegewebsfasern zu bilden als im Ausgangstumor. Sie ist also demnach prinzipiell imstande, sich unter entsprechenden Bedingungen zu differenzieren. Unsere Versuche zeigen weiter, daß das Sarkomgewebe Fasersysteme höherer Ordnung entwickeln kann, die denen gutartiger Mesenchymkulturen gleichen. Wir möchten annehmen, daß dafür die den gut- und bösartigen Bindegewebsszellen gemeinsame Eigenschaft, im Gewebsverband zu wachsen, mit verantwortlich ist. Die Sarkomzellen sind weiterhin anscheinend imstande, je nach der Stärke der Wachstumshemmung mehr oder weniger Fasern zu produzieren. Ihre tatsächliche Differenzierungsleistung scheint im umgekehrten Verhältnis zu ihrer Wachstumsintensität zu stehen. Das mag erklären, warum es trotz bestehender Differenzierungsfähigkeit in der Regel nicht zu einer Ausreifung kommt. Nämlich im Tierkörper, wo das Sarkomgewebe besonders gut gedeihen kann, wird vorzüglich sein Wachstum begünstigt. Wenn es aber einmal sich unter besonderen Umständen differenziert, wird es dadurch nicht gutartig. Es behält seine Bösartigkeit nach wie vor, was wenigstens für unser Material die erfolgreiche Rückimpfung der Sarkomkultur auf das Tier erwiesen hat. Die Malignität des *Jensen-Sarkoms* scheint danach nicht in direkter Beziehung zu seiner Differenzierungsfähigkeit und tatsächlicher Differenzierungsleistung zu stehen.

Zusammenfassung.

1. Das Sarkomgewebe des *Jensen-Impftumors* bildet *in vitro* bei verlangsamtem Wachstum in bedeutend stärkerem Maße argyrophile und kollagene Fasern als *in vivo*.
 2. Es wird sehr wahrscheinlich gemacht, daß diese Bindegewebsfasern durch die aktive Tätigkeit der Sarkomzellen entstanden sind.
 3. Aus diesen Untersuchungen wird geschlossen, daß die Sarkomzellen die Fähigkeit zur Differenzierung nicht verloren haben.
 4. Sarkomkulturen, die *in vitro* vermehrt Fasern gebildet hatten, lassen sich mit Erfolg auf ein Tier verimpfen. Der Gehalt des neu entstandenen Impftumors an Bindegewebsfasern ist aber nicht deutlich vermehrt; er ist wohl so gering, wie bei allen *Jensen-Impfsarkomen*.
 5. Alle Beobachtungen, die an normalen Bindegewebeskulturen hinsichtlich Faserentstehung und Faserentwicklung gemacht wurden, treffen auch bei Sarkomkulturen zu.
 6. Die Bedeutung dieser Befunde für die Biologie der Sarkomzellen wird kurz besprochen.
-

Schrifttumsangabe.

- ¹ *Bofill-Deulofeu, H.*: Z. Zellforsch. **14**, 744 (1932). — ² *Carrel, A. and A. H. Ebeling*: J. of exper. Med. **48**, 105 (1928). — ³ *Carrel, A. and A. H. Ebeling*: J. of exper. Med. **48**, 286 (1928). — ⁴ *Craciun, E. G.*: C. r. Soc. Biol. Paris **108**, 309 (1931).
- ⁵ *Doljanski, L. u. Fr. Roulet*: Virchows Arch. **291**, 260 (1933). — ⁶ *Doljanski, L. u. Fr. Roulet*: Protoplasma (Berl.) **23**, 443 (1935). — ⁷ *Düggeli, O.*: Z. Zellforsch. **26**, 351 (1937). — ⁸ *Fell, H. B. and J. A. Andrews*: Brit. J. exper. Path. **8**, 413 (1927).
- ⁹ *Fell, H. B. and W. Landauer*: Proc. roy. Soc. Lond. B **118**, 133 (1935). — ¹⁰ *Fischer, A.*: Gewebezüchtung. München: R. Müller u. Steinicke 1930. — ¹¹ *Fischer, A. n. R. Parker*: Arch. exper. Zellforsch. **8**, 325 (1929). — ¹² *Fischer-Wasels, B.*: Allgemeine Geschwulstlehre, Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 14, Teil 2. 1927. — ¹³ *Gaillard, P. J.*: Protoplasma (Berl.) **23**, 145 (1935).
- ¹⁴ *Hirschfeld, H. u. E. Klee-Ravidowicz*: Z. Krebsforsch. **30**, 406 (1930). — ¹⁵ *Hueck, W.*: Morphologische Pathologie. Leipzig: Georg Thieme 1937. — ¹⁶ *Huzella, Th.*: Anat. Anz. **67**, Erg.-H., 36 (1929). — ¹⁷ *Jeney, v. A. u. E. Törö*: Virchows Arch. **298**, 87 (1936). — ¹⁸ *Lexi, G.*: Erg. Anat. **31** (1934). — ¹⁹ *Lewis, M. R.*: Contrib. to Embryol. Carnegie Inst. Wash. Publ. **226**, 45 (1917). — ²⁰ *Maximow, A.*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **17**, 625 (1929). — ²¹ *Misurski, B.*: Arch. exper. Zellforsch. **20**, 122 (1937). — ²² *Möllendorff, W. v.*: Z. Zellforsch. **15**, 131 (1932). — ²³ *Momigliano-Leri, G.*: Z. Zellforsch. **16**, 389 (1932). — ²⁴ *Odiette, D.*: C. r. Assoc. Anat. **27**, Réun. **416** (1932). — ²⁵ *Olivo, C.*: Boll. Soc. Biol. sper. **5**, 109 (1930). — ²⁶ *Paravicini, A.*: Z. Zellforsch. **21**, 733 (1934). — ²⁷ *Rössle, R.*: Sitzgsber. Preuß. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. III **1936**. — ²⁸ *Rumjantsev, A. W. u. W. Suntzowa*: Arch. exper. Zellforsch. **17**, 360 (1935). — ²⁹ *Symeonidis, A.*: Virchows Arch. **300**, 429 (1937). — ³⁰ *Taszkan, R.*: Virchows Arch. **299**, 106 (1937). — ³¹ *Zakrzewski, Z.*: Klin. Wschr. **1932 I**, 113. — ³² *Zakrzewski, Z.*: Arch. exper. Zellforsch. **13**, 152 (1932). — ³³ *Zakrzewski, Z.*: Z. Krebsforsch. **36**, 513 (1932).