

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln
[Direktor: Prof. Dr. E. Leupold].)

Über die Bedeutung des Serums für den Abbau geschädigten Gewebes; Untersuchungen an Explantaten¹.

Von
Otto Löbber.

(Eingegangen am 20. März 1939.)

Die an frischen Infarkten zu beobachtende entkernte Randzone wird seit den Untersuchungen von *Schürmann* vielfach als dys- bzw. anorisch bedingt aufgefaßt, d. h. also als Schädigung lebenden Parenchyms durch unmittelbare Einwirkung von Blutflüssigkeit, die nicht mehr durch eine Gefäßwand abgegrenzt wird. Ebenso wird die sog. Randnekrose an Explantaten in Serum und an Transplantaten als anorisch bedingt aufgefaßt. Einige Einwände gegen die Annahme einer dysorischen Gewebsschädigung hat *Schürmann* selbst gemacht, ohne sie wirksam entkräften zu können, so z. B. den Hinweis auf die fehlende Muscularisnekrose beim Aneurysma dissecans. Gegen eine dysorische Entstehung der entkernten Randzone spricht ferner die Feststellung *Rössles*, daß bei Tumortransplantaten gerade die äußersten Randzellen oft sicher überleben. Dieser Befund wurde auch bei späteren Explantatversuchen des öfteren bestätigt. — Diese und andere „Ausnahmen“ haben zu verschiedenen Erklärungsversuchen geführt, die aber die Widersprüche nicht befriedigend gelöst haben. — Die im Zentrum der Infarkte bzw. Ex- und Transplantate entstehende Parenchymzerstörung gilt allgemein und unwidersprochen als autolytisch bedingt.

Es ist nicht sichergestellt, daß unmittelbar, d. h. also anorisch zur Einwirkung kommendes Serum, bisher ungeschädigtes Gewebe primär abbaut. Es ist dies auch experimentell mit den meist angewendeten Methoden kaum zu beweisen, da eine vorhergehende anoxämische Gewebsschädigung einfach nicht zu umgehen ist. Dagegen läßt sich manches dafür anführen, daß gerade auch unmittelbar einwirkendes Serum auf nur unwesentlich geschädigtes, d. h. noch lebensfähiges Gewebe zunächst stets erhaltend wirkt (*Guillery*).

Im Zusammenhang mit den zuletzt genannten Arbeiten sollte durch die vorliegende Arbeit genauer geklärt werden, ob die Randentkernung des Explantates nur als Folge der Serumwirkung und nicht ebenso als Folge einwirkender Gewebsbestandteile gedeutet werden könnte. Es schien so besser als bisher die Möglichkeit gegeben zu sein, die Entstehungsbedingungen der Randzonen zu erkennen.

¹ D. 38.

Zur Gewinnung blutfreier Organsäfte wurden Kaninchen verwendet, aus der Carotis entblutet und anschließend mit einer einfachen Durchströmungsapparatur bei noch schlagendem Herzen von einer Jugularis aus mit Tyrodelösung durchspült. Nach dem Herzstillstand wurde die Durchströmung von einer Carotis aus fortgesetzt. Die Verwendung mehrerer Liter Flüssigkeit, vorübergehende Zugabe von Suprarenin, die Verwendung eines Wasserbades zur Einhaltung der Körpertemperatur und die Einschaltung von Manometern zur Beachtung des geeigneten Durchströmungsdruckes sollten dazu dienen, alle Organe möglichst vollkommen blutfrei zu machen und dabei die Gewebe möglichst wenig zu schädigen. Anschließend wurden von Leber, Nieren und Milz kleine Stücke als Explantate und zur Anfertigung von Kontrollpräparaten entnommen, der Rest der Organe zerkleinert, mit sterilem Sand zerrieben und mit Tyrodelösung versetzt. In die durch Zentrifugieren erhaltenen Gewebssäfte von Leber, Nieren und Milz wurden die vorher entnommenen Explantate gebracht und 6, 12 und 24 Stunden im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Zum Vergleich wurden Organstücke in defibriniertem Blut und in Serum vom gleichen Tier ebenso behandelt. Anschließend Formalinfixation, Paraffineinbettung, Serienschnitte, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Über die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ist zusammenfassend folgendes zu berichten:

Bei Einwirkung der *blutfreien Gewebssäfte* auf entblutete Organstücke haben sich nirgends Zonen ausgebildet. Nach 6 Stunden lassen die Organe gegenüber Kontrollpräparaten der frisch entnommenen und unbehandelten Organstücke keinerlei Abweichungen erkennen. Die Zellkerne sind größtenteils tadellos erhalten und zeigen ein deutliches Chromatingerüst. Die Epithelgrenzen sind bei den gewundenen Harnkanälchen zum Teil verwischt, aber gleichmäßig im ganzen Präparat. Nach 12 Stunden zeigt sich im Nierenpräparat eine teilweise fortgeschrittene Entkernung, die aber auch über das ganze Präparat gleichmaßen verteilt ist. Bei der Milz zeigt sich ein ebenfalls über das ganze Präparat gleichmäßig verteilter Zerfall der Pulpa bei gut erhaltenen Lymphfollikeln und zum Teil auch Sinusendothelien. — Nach 24 Stunden zeigt sich bei sämtlichen Organen eine weiter fortgeschrittene, das ganze Explantat gleichermaßen befallende Zerstörung; d. h. die noch vorhandenen Epithelkerne sind größtenteils pyknotisch bei im ganzen gut erhaltener Organstruktur. Die Befunde zeigen so weitgehende Übereinstimmung, daß ein Unterschied, ob z. B. ein Leberstück in Leber-, Nieren- oder Milzextrakt aufbewahrt wurde, nicht zu erkennen ist.

Über eine Ausnahme muß ich berichten: Die mit einem Milzextrakt behandelten Leberexplantate zeigten eine ganz schmale, unvollständige, entkernte Randzone.

Bei den mit *defibriniertem Blut* behandelten Explantaten finden sich nach 6 Stunden angedeutet, nach 12 und 24 Stunden deutlich ausgeprägt entkernte Randzonen. Beim Leber- und beim Nierenexplantat sind dabei in nahezu sämtlichen Präparaten gut erhaltene Zellen und Zellgruppen erkennbar, die zum Teil am äußersten Saum der entkernten Randzone, zum Teil in dieser eingeschlossen liegen. In einzelnen Einsen finden sich kleine Blutlachen, in denen eingeschlossen abgesprengte, zum Teil entkernte und völlig destruierte, zum Teil auch sehr gut

erhaltene Zellen mit guter Kernfärbbarkeit liegen. Die zentralen Abschnitte der Explantate lassen noch gute Zellstruktur erkennen, die Kerne sind aber nach 24 Stunden meist pyknotisch, zum Teil völlig geschwunden. Eine „innere nekrotische Zone“ findet sich bei Leber- und Nierenexplantaten nicht. Die Milzexplantate zeigen eine deutliche Dreischichtung, d. h. einen schmalen Saum zerfallenen Gewebes, das keine Kernfärbung mehr zeigt, darunter eine etwas breitere Zone gut erhaltenen Gewebes und einen nach 6 Stunden bereits nachweisbaren, nach 24 Stunden voll ausgebildeten, völlig zerfallenen, zentralen Abschnitt.

Eine alle Einzelheiten berücksichtigende Aufführung der mikroskopischen Befunde erübrigt sich, weil sie sich im wesentlichen mit den bei gleichartigen Versuchen schon wiederholt mitgeteilten Befunden decken. Aus diesem Grunde kann wohl auch die Wiedergabe von Mikrophotogrammen unterbleiben.

Bei den in *Serum* aufbewahrten Explantaten finden sich im wesentlichen die gleichen Befunde wie bei den mit defibriertem Blut behandelten. --- Typische entkernte Randzonen, darin vereinzelt auffallend gut erhaltene Randzellen und Zellgruppen. Der zentrale Abschnitt ist bei Leber- und Nierenexplantaten gleichermaßen gut erhalten. Bei den Milzexplantaten findet sich ein deutlich destruiert Zentralabschnitt.

Bei der *Deutung* vorstehender Befunde scheint sich zunächst zu ergeben, daß das Entstehen einer entkernten Randzone an die Anwesenheit von Blutbestandteilen bzw. von Serum gebunden ist. Zu diesem Schluß muß man kommen, wenn man annimmt, daß die nach dem Auswaschen des Tieres hergestellten Organsäfte wirklich blutfrei waren. Da sich nun bei der histologischen Untersuchung der ausgewaschenen Organe nur noch vereinzelt spärliche rote Blutkörperchen fanden und die Organe bei der Extraktbereitung mit reichlich Tyrodelösung versetzt wurden, so daß diese Blutspuren noch einmal eine hochgradige Verdünnung erfuhren, ist mit der praktischen Richtigkeit der Annahme zu rechnen, daß wirklich blutfreie Organsäfte verwendet wurden. — Es ist ja bekannt, daß im voraus nie zuverlässig mit dem Erfolg des Auswaschens gerechnet werden kann, und daß manche Organe trotz sorgfältigen Durchspülens beträchtliche Blutmengen zurückbehalten. So ergab sich z. B. auch einmal bei einem mit Milzextrakt behandelten Leberstück eine schmale entkernte Randzone. Dieses ließ sich dadurch zwanglos erklären, daß die Milz, aus der der Extrakt bereitet wurde, beim Entbluten des Tieres ihr Blut nur sehr unvollständig hergegeben hatte, wie es auf einem histologischen Kontrollpräparat deutlich zu sehen war, während in Kontrollpräparaten von Leber und Nieren nur ganz vereinzelt Blutkörperchen zu finden waren. Die Extrakte dieser letzten Organe hatten keine entkernten Randzonen hervorgerufen.

Um nun genauer die wirksame *Serumkonzentration* zu ermitteln, wurde folgender Versuch gemacht:

In Reagensgläsern wurden stufenweise Serumverdünnungen mit Tyrodelösung angesetzt, so daß sich ein Prozentgehalt von 100, 33, 11, 3,3, 1,0 und 0,3 ergab. In diese Serumverdünnungen wurden Explantate von Kaninchenleber, -niere und -milz eingebracht und 24 Stunden bei 37° aufbewahrt. Formalinfixation, Paraffineinbettung, Stufenserien, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Das *Ergebnis* ist folgendes: Bei den Leberexplantaten finden sich deutlich erhaltene Peripheriezellen bei Einwirkung von 100-, 33- und 11% igem Serum. Bei den weiteren Verdünnungen sind histologisch gut erhaltene Außenzellen nicht mehr nachweisbar. Die entkernte Außenzone findet sich in sämtlichen Explantaten, und zwar wird sie mit fallender Serumkonzentration deutlich schmaler, ist aber auch bei Einwirkung von 0,3% igem Serum noch sicher nachweisbar (vgl. den obenbeschriebenen Versuch mit unvollständig entblutetem Milzextrakt). — Die zentralen Abschnitte sind bei 100-, 33- und 11% igem Serum fast gleich gut erhalten. Bei Einwirkung von 3% igem Serum hat sich eine deutliche zentrale Zerfallschicht ausgebildet, die etwa $\frac{1}{3}$ des Präparates einnimmt und ohne scharfe Grenze in die weiter peripher gelegene, ziemlich gut erhaltene Zwischenschicht übergeht. Bei 1% igem Serum ist die zentrale Zerfallschicht bedeutend größer und nimmt fast $\frac{2}{3}$ des Präparates ein; die Zwischenschicht ist entsprechend schmaler. Bei 0,3% igem Serum ist diese zentrale Zerfallschicht noch bedeutend größer und geht stellenweise direkt in die entkernte Randzone über. — Bei den Nierenexplantaten finden sich ganz ähnliche Veränderungen, mit dem Unterschied, daß die Zonen hier nicht so gut abgrenzbar sind und der Zerfall im Bereiche der gewundenen Harnkanälchen weit stärker ist als in dem der geraden. Die Befunde bei den Milzexplantaten weichen insofern ab, als keine besonders erhaltenen Peripheriezellen nachweisbar sind und bereits bei 3% igem Serum Zonen überhaupt nicht mehr abgrenzbar sind. Vielmehr ist hier wie bei den weiteren Serumverdünnungen ein völliger Zerfall des ganzen Gewebes eingetreten.

Zusammengefaßt: Gut erhaltene „Außenzellen“ finden sich nur bei relativ hohen Serumkonzentrationen. Entkernte Randzonen finden sich aber noch bei stärksten Verdünnungen. Eine destruierte Zentralschicht bildet sich auch bei kleinen Explantaten dann aus, wenn die Konzentration des einwirkenden Serums geringer wird, und zwar wird der zentrale destruierte Abschnitt bei fallender Serumkonzentration größer.

Die meisten der bei den Versuchen verwendeten Explantate hatten eine durchschnittliche Kantenlänge von etwa 3 mm. Daß sich bei Stücken dieser Größe und einer Versuchsdauer von höchstens 24 Stunden in konzentriertem Serum keine „innere autolytische Schicht“ ausbildete (abgesehen von den Milzexplantaten, die ja stärker zur Autolyse neigen), entspricht den bei ähnlichen Versuchen von anderer Seite häufig gemachten Beobachtungen. Wählt man für die Explantate größere Ausmaße, so bildet sich auch bereits nach 24 Stunden in konzentriertem Serum eine deutliche zentrale Zerfallschicht aus, wie sich an einem Vergleichsversuch mit einem etwa 1 cm großen Leberexplantat zeigen ließ.

Die bisher geschilderten, dem ursprünglichen Arbeitsplan entsprechenden Versuche führten zu einer Beobachtung, die anschließend noch erörtert werden muß:

Ein Milzstück war nach 12stündigem Aufenthalt in defibriniertem Blut von einer dünnen Blutschicht bedeckt, die eine der Zonenbildung an Organen vergleichbare Schichtung zeigte. Es fand sich ein äußerer Saum geschrumpfter, schwach mit Hämatoxylin färbbarer roter Blutkörperchen; nach innen folgte eine Schicht verquollener und ausgelaugter Blutkörperchen, dann folgte, nach dem Organstück zu, die Hauptmasse gut erhaltener und normal färbbarer roter Blutkörperchen. Hier lagen, wie auch in den benachbarten obersten Schichten des Organstückes, kleinste Ansammlungen von Leukozyten. Die Schichtung dieses dem Milzstück aufsitzenden Blutes führte wegen der Ähnlichkeit mit der Zonenbildung bei Serumeinwirkung auf Explantate zu folgendem weiteren Versuch:

Durch Zentrifugieren defibrinierten Blutes wurde auf ein etwa 0,5 cm großes Leberstück eine durchschnittlich 5 mm hohe Schicht von Blutkörperchen abgesetzt, das darüber befindliche Serum stehengelassen und das Ganze 24 Stunden bei 37° aufbewahrt. Anschließend Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Gelatine-einbettung.

Es ergab sich folgender Befund: An der Berührungsstelle von Serum und Blutkörperchen hat sich eine etwa 1 mm tiefe Schicht ausgebildet, in deren Bereich die Erythrocyten restlos zerfallen und zu einer amorphen wabigen Masse zusammengesintert sind. Diese Schicht hat sich schwach mit Hämatoxylin gefärbt. Es folgt gegen das Explantat zu eine ziemlich scharf begrenzte, ganz schmale Übergangszone, in deren Bereich die Erythrocyten völlig ausgelaugt sind und keine Farbe angenommen haben. Der weitaus größte zentrale Abschnitt zeigt weniger ausgedehnten Zerfall, läßt noch herdförmig erhaltene Erythrocyten erkennen und zeigt im ganzen guten Hämoglobingehalt. An der Berührungsstelle mit dem Explantat hat sich eine ähnliche schmale „Übergangsschicht“ ausgebildet, wie sie oben beschrieben wurde. — Das Organstück selbst zeigt eine spärliche, aber deutlich ausgeprägte Randentkernung, eine relativ gut erhaltene Zwischenschicht und weitgehenden Zerfall des zentralen Abschnittes.

Einer *zusammenfassenden Deutung* der mitgeteilten Versuchsergebnisse muß ich einen Hinweis auf die eingangs erwähnten Arbeiten vorausschicken. Das Wort „Nekrose“ wurde in den bisherigen Ausführungen mit Absicht vermieden, da am histologischen Präparat durch die üblichen Färbemethoden lebendes von totem, also nekrotischen Gewebe überhaupt nicht sicher zu trennen ist. *Guillery* kommt durch seine zum Teil noch nicht veröffentlichten Untersuchungen zu dem Schluß, daß lediglich ein Teil der gut erhaltenen äußersten Peripheriezellen als sicher lebend anzusprechen ist. Alle übrigen Erscheinungen sind Abbau-

vorgänge an schwer geschädigtem oder totem Gewebe. Diese Annahme erfährt auch durch die Untersuchungen von *Heim* eine weitgehende Bestätigung. Danach ist also speziell die sog. nekrotische Randzone nicht Ausdruck der dysorischen Gewebsschädigung, sondern es handelt sich hier um eine heterolytische Entkernung bereits vorher anoxämisch geschädigten Gewebes. In dem Vorhandensein nachgewiesener „lebenden Außenzellen“ ist ein Anhalt dafür zu erblicken, daß Serum auch außerhalb der Blutgewebsschranke zunächst gewebserhaltend wirkt.

Ich sehe in meinen Versuchsergebnissen eine weitgehende Bestätigung vorstehender Ansichten. Wenn die an Explantaten entstehenden entkernten Randzonen tatsächlich ausschließlich der Einwirkung von Serum und nicht von anderen Gewebssäften zuzuschreiben sind, so beweist das noch keine dys- bzw. anorische Schädigung dieser Bezirke. Das erhellt erst recht daraus, daß sich an Blutgerinnseln nach dem Zentrifugieren oder nach einfacher Senkung des Blutes nach mehrstündiger Einwirkung des eigenen Serums ganz ähnliche „Zonen“ ausbilden wie an Organexplantaten; und zwar ist hier nach 24 Stunden eine besonders breite, völlig destruierte Außenschicht feststellbar. Dieses als anorische Schädigung aufzufassen geht aber erst recht nicht an, da ja Blutkörperchen und Serum in vivo überhaupt in innigst möglicher Berührung stehen. Die von der Serumberührungsstelle her schichtweise abgebauten Blutkörperchen waren tot, bevor das Serum nekrolytisierend zur Wirkung kam. Daß bei diesen Versuchen keine überlebenden Randzellen gefunden wurden, beweist natürlich nichts gegen die primär gewebserhaltenden Eigenschaften unmittelbar zur Einwirkung kommenden Serums.

Aus der Versuchsreihe mit stufenweisen Serumverdünnungen zeigt sich klar, daß die gut erhaltenen, also wahrscheinlich lebenden Peripheriezellen bei fallender Serumkonzentration verschwinden. Auch hieraus läßt sich auf eine primär gewebserhaltende Wirkung des Serums schließen.

Im übrigen bestätigt es sich, daß der Abbau des Explantates einen komplexen Vorgang darstellt, indem zu der von innen her fortschreitenden Autolyse ein von außen wirkender Abbauvorgang hinzukommt, welcher dem umgebenden Serum zuzuschreiben ist. Dabei scheint die histologisch gut erhaltene Zwischenschicht (die bei kleinen Explantaten den ganzen inneren Abschnitt einnimmt, so daß also hier keine „zentrale Autolyse“ histologisch nachweisbar ist) gerade durch das Serum vor der Autolyse geschützt zu werden. Gerade bei kleinen Explantaten, bei denen sich in Vergleichsversuchen in konzentriertem Serum keine innere Zerfallschicht ausbildet, findet sich eine solche, deutlich ausgeprägte Schicht, sobald man mit der Serumkonzentration weiter heruntergeht, und zwar wird diese Schicht bei fallender Serumkonzentration auf Kosten der inneren Abschnitte der erhaltenen Zwischenschicht deutlich größer. Diese letzte Annahme einer Schutzwirkung

des Serums vor Autolyse erwähne ich nur mit allem Vorbehalt. Es handelt sich hier sicher um komplizierte physikalisch-chemische Vorgänge, die mit rein morphologischen Untersuchungen nicht geklärt werden können. Zudem ist das untersuchte Material zu gering, um hieraus sichere Schlüsse ziehen zu können.

Unter anderem ist es in diesem Zusammenhang nicht ganz verständlich, warum sich bei stark verdünntem Serum nach 24 Stunden bereits eine große zentrale Autolyse ausbildet, während bei dem im eigenen Organextrakt behandelten gleichen Organstück noch eine durchgehend gute Zellstruktur zu finden ist. Wenn sich bei diesem letzteren Versuch keine Zonen ausbilden, so könnte man das dadurch erklären, daß die im Organinnern etwa frei werdenden autolytischen Fermente die gleichen sind wie die, welche sich in dem umgebenden Gewebssaft bilden. Auch dann bleibt aber noch die Frage unbeantwortet, warum die Autolyse auch nach 24 Stunden noch nicht histologisch deutlich faßbar in Gang ist.

Zusammenfassung.

Unmittelbar, d. h. ohne Trennung durch die Blutgewebsschranke zur Einwirkung kommendes Serum erhält lebendes bzw. lebensfähiges Gewebe und baut totes Gewebe heterolytisch ab. — Dieser Abbau erstreckt sich auch auf die eigenen cellulären Blutbestandteile. — Alles spricht dafür, daß die entkernten Außenzonen an Explantaten nicht durch das Serum nekrotisiert, sondern abgebaut worden sind, nachdem sie abgestorben waren.

An Organstücken in blutfreien Organsäften entsteht keine entkernte Randzone.

Bei Einwirkung stufenweise verdünnten Serums nimmt die zentrale, autolytische Schicht entsprechend der fallenden Serumkonzentration bedeutend an Größe zu. Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß Serum die Parenchyme vor autolytischem Zerfall schützt.

Literaturverzeichnis.

Beneke, R.: Beitr. path. Anat. **74**, 2 (1925). — *Büchner, F.*: Klin. Wschr. **1937** **1**, 1409. — *Guillery, H.*: Virchows Arch. **304**, 317, 336 (1939). — *Heim, G.*: Frankf. Z. Path. **1939** (im Druck). — *Letterer, E.*: Verh. dtsh. path. Ges., 27. Tagg. **1934**, 254. — *Richter, P.*: Arb. path. Inst. Tübingen **5**, 25 (1906). — *Rössle, R.*: Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. III—V, 22 (1936). — *Schürmann, P.*: Verh. dtsh. path. Ges., 29. Tagg. **1936**, 234. — *Schürmann, P.* u. *H. E. MacMahon*: Virchows Arch. **291**, 47 (1933). — *Terbrüggen, A.*: Beitr. path. Anat. **98**, 264 (1936).