

(Aus der „Clinica Alemana“, Córdoba [Argentinien].)

Wie reagiert eine gekochte Hornhaut?

Von

Prof. Dr. Paul Busse-Grawitz.

Mit 7 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 14. Juli 1939.)

An anderer Stelle habe ich mitgeteilt, daß ich Kaninchenhornhäute immer höher erhitzte und sie dann einem lebenden Tier implantierte; wie diese Hornhäute abnehmend schwächer reagierten und bei 195° C kein Leben mehr zeigten und auch keine Einwanderung von Leukocyten. Daß diese Einwanderung bei der Implantationsmethode nicht stattfindet, konnte ich unter anderem an implantierten Lungenstückchen zeigen, deren Parenchym zellige Reaktionen aufwies, ohne daß die Alveolen von Leukocyten ausgefüllt wären, wie das etwa bei einem implantierten Stück Holundermark der Fall ist.

Es bedeutete seinerzeit eine große Überraschung für mich, als ich im Beginn meiner Versuche feststellte, daß eine Kaninchenhornhaut noch reagiert hatte, nachdem sie 10 Min. in physiologischer Lösung gekocht und dann 2 Tage implantiert war. Makroskopisch ist eine gekochte Hornhaut trübe, verdickt und in ihrem Durchmesser verringert. Mikroskopisch zeigt sie bei schwacher Vergrößerung eine nahezu homogene Grundsubstanz, deren Faserstruktur nicht oder kaum mehr erkennbar ist.

Es erhob sich die Frage: Was reagiert denn in einer gekochten Hornhaut? Nur die Hornhautkörper? Oder ist auch die offenbar so veränderte Grundsubstanz befähigt, an der Reaktion sich zu beteiligen? Wird die Grawitzsche Lehre vom zelligen Abbau der Gewebe auch bei einem gekochten Objekt bestätigt?

Würden nur die Hornhautkörper zur Reaktion befähigt sein, zellig werden und sich teilen, so müßte man erwarten, in der homogenen Grundsubstanz an den Orten dieser Hornhautkörper Zellanhäufungen zu finden, ähnlich wie in der Petrischale aus jedem Bakterium eine punktförmige mit bloßem Auge sichtbare Bakterienkolonie wird.

Würde dagegen auch die Grundsubstanz sich beteiligen, so müßte man bei ihrer größeren Gleichmäßigkeit besonders leicht das Auftreten neuer Chromatinbröckel und ihre Übergänge zu Spindel- und Rundzellen zwischen den fertigen Rundzellen an Stellen lebhafter Reaktion beobachten können.

Um diese Frage zu klären, kochte ich Kaninchenhornhäute je 10 Min. in physiologischer Lösung und verbrachte sie in die Bauchhöhle oder subcutane Hauttaschen lebender Kaninchen. Die erste gekochte Hornhaut wurde, ohne eingepflanzt zu werden, untersucht; je eine weitere

nach 1, 2, 3, 4 $\frac{1}{2}$, 6, 9, 12 Stunden und 1, 2, 4, 8, 16 Tagen Implantation. Von allen wurden 6 μ dicke Schnitte in sagittaler Richtung angelegt und mit Hämatoxylin = Eosin gefärbt.

Wie immer bei dem Implantationsverfahren haben die Hornhäute nicht mathematisch progressiv reagiert: das Zentrum stets geringer und auch die Peripherie im gleichen Präparat verschieden stark. Zur Abbildung gelangte stets die Stelle stärkster Reaktion. Obgleich diese, besonders bei den länger implantierten Hornhäuten, verschieden intensiv ist, ermöglicht sie doch eindeutige Entscheidungen über den Ablauf des Geschehens.

Folgende Regeln wurden bei der Durchmusterung beobachtet: Schnitttrand aufsuchen, wo weder *Bowmannsche* noch *Descementsche* Membran den ernährenden Lymphzutritt hinderten. Zuerst die am wenigsten reagiert habenden Bezirke des Schnitttrandes betrachten, systematisch zu denen stärkerer Reaktion übergehend. Zeichnen und Schreiben während der Betrachtung mit Ölimmersion. Die Lage der Kerne zum Protoplasma und die Differenzierung des letzteren beachten, da manchmal breite Protoplasmaflecken unscharf zur Grundsubstanz übergehen. Systematisch die Grundsubstanz zwischen den zelligen Elementen unter Heben und Senken des Tubus beachten, weil nur so Chromatinbröckel und schwach gefärbte Gebilde sichtbar werden. Objektive Beschreibung dieser von der schulmäßigen Zellenlehre durchaus abweichenden Bilder, ohne atypische Bildungen zu übersehen oder sie für Kunstprodukte zu halten, nur weil die Lehrbücher nichts über sie aussagen. Schwach gefärbte Objekte oder schmutzig gefärbte (wenn Protoplasma und Chromatin schlecht differenziert waren) nicht der — im übrigen stets guten — Färbetechnik zuzuschreiben, da ja gut gefärbte Elemente stets im Präparat sichtbar sind.

Beschreibung.

Gekochte Kaninchenhornhaut, nicht implantiert (Abb. 1). Die Hornhautkörper haben intensiv Chromatinfärbung angenommen, Protoplasma ist kaum erkennbar. Zwischen den ausgebildeten Hornhautkörpern befinden sich in der Grundsubstanz 1. hauchartige Gebilde von Gestalt der Hornhautkörper, aber kleiner, die den Chromatinfarbstoff schlecht annahmen; 2. Fäserchen, die Chromatinfärbung annahmen; manchmal sind sie als Verlängerung des Schwanzes eines Hornhautkörperchens erkennbar; 3. wabige Gebilde von teilweise bizarrer Form, die schwach Chromatinfärbung annahmen; 4. feinste Spindeln mit bacillenartigen Chromatinstäbchen.

Überall, wo die Grundsubstanz auf den ersten Blick „homogen“ erscheint, erkennt man bei Heben und Senken des Tubus solche Chromatinbröckel (die teilweise sehr schwach gefärbt sind) sowie die andern Gebilde.

1 Stunde Implantation: Die Hornhautkörper in der Nähe des Schnitt-randes sind geschwollen, in ihrem Innern läßt sich die beginnende Differenzierung zwischen Protoplasma und Kern erkennen.

In der Grundsubstanz Waben und Saftlücken, in manchen Waben Chromatingebilde wie kleine schwachgefärbte Hornhautkörper oder gut gefärbte Kokken.

2 Stunden Implantation: An Stellen des Randbezirkes mit schwacher Reaktion sieht man keine deutliche Chromatinvermehrung, aber fast



Abb. 1.

alle Hornhautkörper sind geschwollen, und in ihnen hat sich Protoplasma und Chromatin differenziert. Stellen mit mehr Reaktion zeigen Zellen von Gestalt und Größe geschwollener Hornhautkörper mit vier oder mehr runden Kernen. Solche Hornhautkörper stehen manchmal in Zusammenhang mit Protoplasma, in dem Chromatigranula oder hauchartige polynukleäre Kerne sichtbar sind. Anderswo reihenförmige schlanke Hornhautkörper mit manchmal schwach gefärbtem Protoplasma und Chromatin, gelegentlich untereinander zu einer Reihe verbunden durch eine Protoplasmabrücke, die von der Grundsubstanz schlecht abgesetzt ist. In der Grundsubstanz schattenhafte Chromatingebilde.

Stellen noch stärkerer Reaktion zeigen polynukleäre Zellen, von denen einige sich der Rundzellenform nähern; ihr Protoplasma ist schlecht von der Grundsubstanz abgesetzt und zeigt bei Heben und Senken des Tubus protoplasmatische Verbindungen zu benachbarten Hornhautkörpern oder zu Waben, in denen nur basophil granuliertes Protoplasma

vorhanden ist. Außerdem sieht man Kernreihen in zusammenhängendem Protoplasma.

Eine Stelle des Randbezirkes, die einen Einriß zeigt, hat besonders stark reagiert und ist voller rundlicher oder ovaler Kerne, die hintereinander und nebeneinander in sehr schlecht differenziertem Protoplasma liegen und nirgends die Form polynukleärer Leukocyten haben. Alle Kerne sind leicht blasenförmig und lassen rotes Protoplasma hindurchschimmern. Die Grundsubstanz ist hier bis auf schmale Brücken verschwunden, in denen sich wenige Chromatinbröckel befinden.

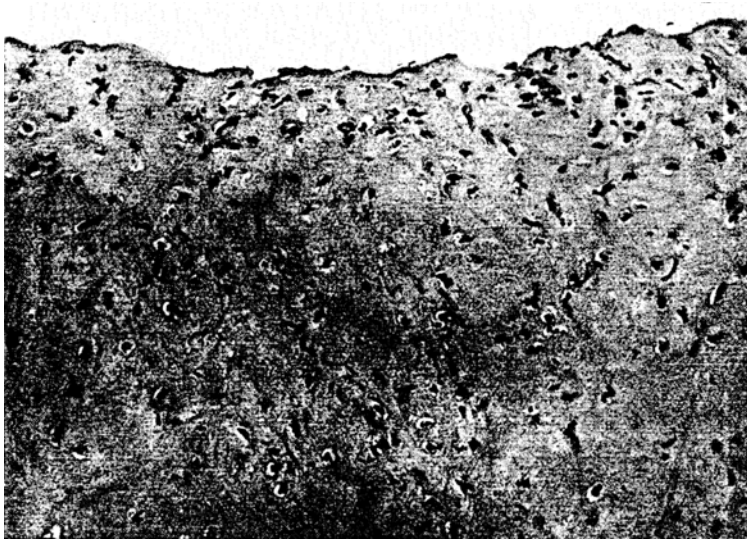


Abb. 2.

Wieder an einem Riß findet sich ein Gebiet, das reagiert hat, aber andersartig. Man erkennt: 1. Waben mit schlecht abgesetztem Protoplasma in Rundzellenform mit 3 blasigen Kernen, neben diesen schattenhaft ein kaum differenzierter ovaler Kern; 2. Waben mit Protoplasma, an deren Rand Kerne sichtbar sind; 3. Waben mit einem oder zwei gut gefärbten Kernen ohne deutliches Protoplasma; 4. Waben mit stabförmig ovalen Kernen oder mit schwachgefärbten bizarren. In der Grundsubstanz bizzare, breite, schwach chromatingefärbte Gebilde, andere von Gestalt eines Hornhautkörpers, spindlig breit, etwas gewellt.

Zentralwärts im Präparat typische Hornhautkörper, die aber besser Chromatin von Protoplasma unterscheiden lassen.

3 Stunden Implantation (Abb. 2): Hat nicht so gut reagiert. Zum Teil sieht man Waben mit zwei Kernen, fast nirgends Protoplasma, zum Teil Waben mit polynukleären Rundzellen. Es sind auch kleine Waben

mit Chromatinbröckeln erkennbar. Die Grundsubstanz ist wabig und weitgehend homogen.

$4\frac{1}{2}$ Stunden *Implantation* (Abb. 3): Die Reaktion ist schwach und nirgends sind Rundzellen erkennbar, aber Protoplasma in granulierter Form und auffällig wenig, um Kerne, die reihenförmig gelagert sind. In der Grundsubstanz 1. hauchartige flächenhafte Chromatingebilde; 2. Chromatinbrocken reihenförmig in der Richtung des Faserverlaufes, jeder in einem Ausschmelzungshof, was zusammen wie eine Saftspalte erscheint, aber nicht ist; 3. Waben mit gut gefärbten Chromatinbrocken;

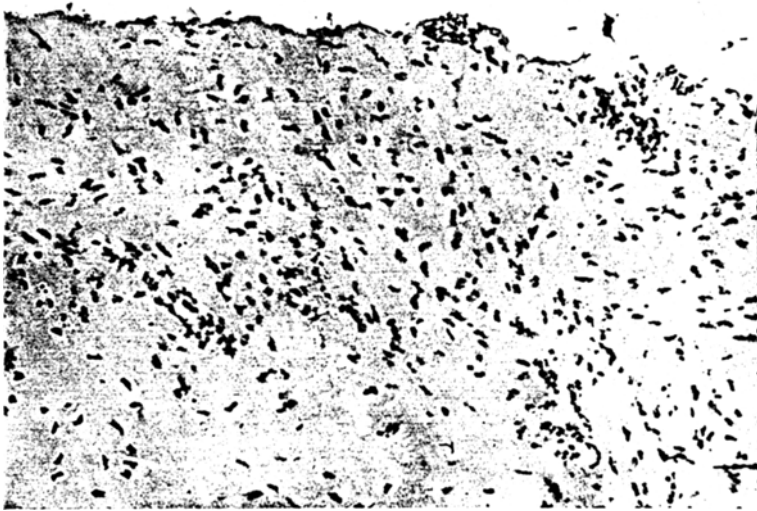


Abb. 3.

4. Waben mit schwachgefärbten Chromatingebilden von Gestalt eines Miniaturhornhautkörpers.

6 Stunden *Implantation*: Im Bezirk geringerer Reaktion beobachtet man 1. Waben mit typischen polynukleären Rundzellen; 2. Waben mit zweiblasigen Kernen, kaum Protoplasma enthaltend; 3. Waben mit kleinen Chromatinbröckeln ohne Protoplasma; 4. schattenhafte Wabe mit hauchartigem Chromatin von Größe und Form eines geschwollenen Hornhautkörpers; 5. Wabe mit einem Hornhautkörper, dessen blasige Kerne und Protoplasma schlecht differenziert sind. In Verlängerung seiner Achse drei Chromatinbrocken in der Grundsubstanz.

An anderer Stelle starker Reaktion sieht man Waben mit Rundzellen aber auch breite Spindeln von schmutziger Färbung (= schlecht differenziertes Chromatin im Protoplasma) und ovalem, schwach gefärbtem Kern, auch Fasern mit unscharfem Kern oder schmutzig

gefärbte Fäserchen, oder hauchartige Fasern mit Verdickungen, als ob dort Kerne entstehen sollten.

Im Zentrum finden sich differenzierte Hornhautkörper und Rundzellen in Waben.

Besonders bemerkenswert ist eine Stelle (Abb. 4), wo sich die Grundsubstanz völlig in protoplasmatische Waben gruppierte, deren jede eine *Rundzelle mit Protoplasma, aber ohne Kern*, enthält. Wo in einer Ebene protoplasmatische Brücken erscheinen, lösen sich auch diese, bei Heben

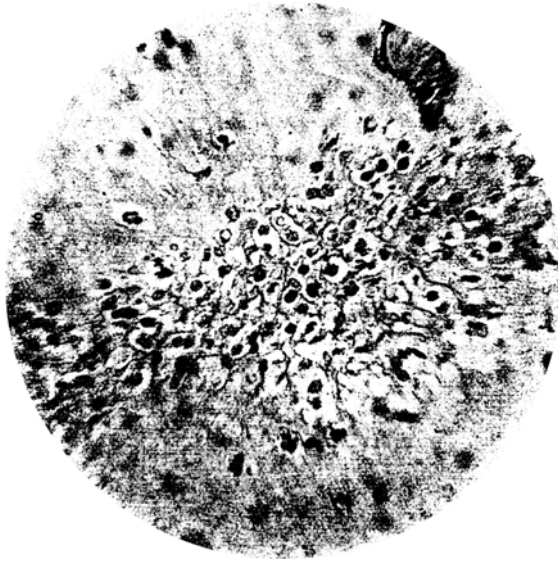


Abb. 4.

und Senken des Tubus in Waben mit Rundzellen ohne Kern auf. Das Protoplasma erscheint granuliert und etwas schwach gefärbt. *Das merkwürdige ist aber, daß pro Gesichtsfeld zwei oder drei Rundzellen in diesem Gebiet 5 intensiv gefärbte Kerne haben*, während doch alle andern kernlos sind. An einer anderen Stelle sieht man in einer protoplasmatischen Rundzelle Chromatinbröckel ohne Gruppierung zu Kernen.

9 Stunden Implantation: Rundzellen in Waben. Spindeln in Waben mit kaum schwach oder gut gefärbten Kernen. Waben mit Chromatinbröckeln, Kerne in verschiedener Ebene hintereinander liegend, granuliertes Protoplasma dazwischen. Breite Formen, größer als Rundzellen, schmutzig gefärbt mit schlecht differenziertem Kern, ebensolcher hauchartig. Schon beschriebene Waben mit kleineren Gebilden.

12 Stunden Implantation (Abb. 5): Rundzelle mit zwei normalen Kernen und zwei gut gefärbten Chromatinbröckeln. Waben mit größeren

ovalen, auch blasigen Kernen, schlecht differenziert, ohne Protoplasma, außerdem Waben mit beschriebenen kleineren Gebilden.

1 Tag Implantation: Spalten mit teils hauchartigen, teils gut gefärbten Kernen in gemeinsamem Protoplasma. Am Rand braunschwarze Granula in und um Zellformen (auch in der Descementschen Membran; Eisen vom Instrument?).

2 Tage Implantation: Schwache Reaktion. Schlecht differenzierte Hornhautkörper mit einem blasigen Kern. Schlecht abgesetztes Protoplasma mit blasigem Kern und gut gefärbten Chromatinbrocken.

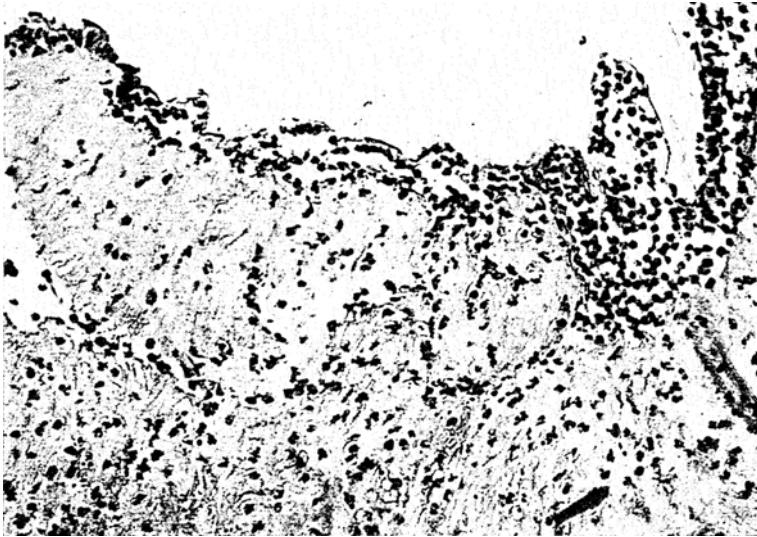


Abb. 5.

Schwach gefärbtes Protoplasma mit gut gefärbtem Kern oder hauchartigen, flächenhaften Figuren. Polynukleäre runde und ovale Zellen. Überall ist das Protoplasma schlecht von der Grundsubstanz abgesetzt. Wenn die Kerne intensiv gefärbt sind, ist das auch beim dazugehörigen Protoplasma der Fall. Die Grundsubstanz ist faserig, einzelne Fäserchen haben deutlich stärkere Chromatinfärbung angenommen. Chromatinbrocken.

4 Tage Implantation (Abb. 6): An einer Stelle finden sich feine stark gefärbte Chromatinbrocken neben blasigen Kernen in schlecht abgesetztem Protoplasma. Die Granulierungen sind manchmal in Spindelform gruppiert. Außer den blasigen Kernen, die im Innern rotes Protoplasma durchscheinen lassen und granulierte oder faserige Chromatineinschlüsse zeigen, auch intensiv gefärbte Kerne. Eine andere Stelle stärkerer Reaktion zeigt breite, schwach protoplasmatische Bänder,

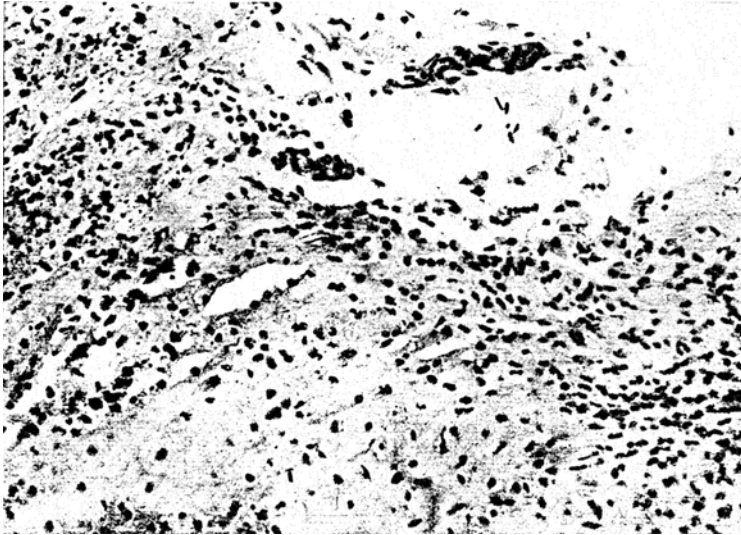


Abb. 6.

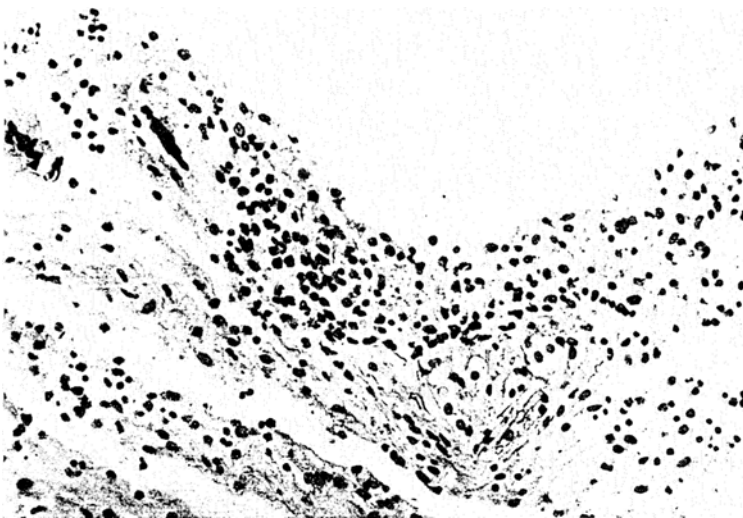


Abb. 7.

deren längliche oder runde Blasenkerne selten stärker, nie intensiv gefärbt sind. In der Grundsubstanz Fäserchen und beschriebene Figuren. Übrigens zeigt nur eine schmale Randzone stärkere Zellbildung.

8 Tage Implantation: Spärliche Reaktion. Fast alle Kerne sind blasig mit beschriebenen Einschlüssen, kleine Kerne auch ohne Protoplasma. Dieses ist im allgemeinen besser abgesetzt aber schwächer gefärbt.

Auch hier hat nur die Randzone reagiert. Im Zentrum sind in weiten Gebieten nur Schattenfiguren oder Blasenkerne oder Gruppen von Chromatin- oder Protoplasmagranulationen sichtbar, außer gefärbten Fäserchen.

16 Tage Implantation (Abb. 7): Es überwiegen weitaus die Blasenkerne, fast alle haben nur sehr schwach gefärbtes Protoplasma um sich gruppiert. Gut gefärbte Elemente sind selten, aber vorhanden. Die blasigen Kerne sind im allgemeinen größer als die intensiv gefärbten. Das Protoplasma ist immer schlecht von der Grundsubstanz abgesetzt.

Im Zentrum typische, gut gefärbte Rundzellen und blasige Kerne mit Kernkörperchen. Blasenkerne in wabigem Protoplasma, dunkle Kerne mit kaum erkennbarem Protoplasmahof. In der Grundsubstanz hauchartige Kerne und Protoplasma. Schattenfiguren manchmal protoplasmatisch, manchmal schmutzig gefärbt. Nirgends intensiv gefärbte Chromatinbröckel in der Grundsubstanz.

Deutung.

Wir können an den gekochten implantierten Kaninchenhornhäuten zwei Phasen der Reaktion erkennen, zuerst den zelligen Abbau des Gewebes und später degenerative Vorgänge an diesen Zellen.

In der ersten Stunde nach der Implantation schwellen die Hornhautkörper an, ohne daß bereits in ihnen Protoplasma und Chromatin gut zu unterscheiden ist.

In der zweiten Stunde haben sich in den Hornhautkörpern vielfach das Protoplasma und intensiv gefärbte runde oder ovale Kerne herausdifferenziert. Meistens liegen die Kerne noch rund oder vorwiegend oval hintereinander; doch ist schon zu dieser Zeit die erste Rundzelle zu beobachten und alle nur wünschbaren Übergänge zwischen diesen und den weniger peripheregelegenen Hornhautkörpern.

Während diese Umbildung in den folgenden Stunden sich fortsetzt, ist in den Bezirken stärkerer Reaktion festzustellen, daß die Grundsubstanz in dem Maße sich vermindert, als zellige Elemente und deren Vorstadien beobachtet werden.

Solche Bezirke stärkerer Reaktion finden sich schon an der zwei Stunden implantierten Hornhaut dort, wo die Schnittflächen Einrisse haben, die dem ernährenden Lymphstrom den Zutritt besonders leicht machten.

Die Umbildung der Grundsubstanz zu Zellen scheint mir mindestens auf zwei Arten zustande zu kommen: entweder tauchen in der Grundsubstanz a priori größere flächenhafte Gebilde auf, die sich hauchartig schattenhaft zunächst kaum von derselben abheben und erst beim genauen

Durchmustern der Grundsubstanz unter Heben und Senken des Objektives entdeckt werden.

Diese Gebilde vergrößern sich manchmal und nehmen jedenfalls intensiver Farbstoff an. Da in ihnen Chromatin und Protoplasma noch nicht von einander differenziert sind, ist ihre Färbung ein schmutziges Violett. In diesem heben sich sodann, wieder schattenhaft, 2—5 runde oder ovale Kerne ab; allmählich nimmt auch das Protoplasma eine reinere Färbung an. Trotzdem kann man auch in reinem Protoplasma sekundär hauchartige Kerne sich differenzieren sehen. Die Anordnung dieser zunächst meist länglichen Zellgebilde ist vorzugsweise in Richtung des Faserverlaufes.

Bei der zweiten Art der Zellbildung sehen wir als Anfangsstadium kleine intensiv gefärbte Chromatinbröckel, rund oder oval, frei in der Grundsubstanz. Durch Heben und Senken des Tubus kann jeder Zweifel darüber leicht ausgeschlossen werden, daß diese Chromatinbröckel in keinerlei Beziehung zu anderen Gebilden stehen. Von diesen führen alle Übergänge zu größeren, ovalen oder runden, stets intensiv gefärbten, zunächst nackten Kernen, die, wenn sie größer sind, etwas Protoplasma um sich haben.

Ich urteile, daß bei den gekochten Hornhäuten, an Stellen die intensiv reagieren, die Zellentstehung aus schattenhaften Gebilden die weitaus häufigste ist; in weitem Abstand folgt die zellige Umbildung der Hornhautkörper, und am geringsten häufig ist die Entstehung aus intensiv gefärbten Chromatinbrocken. Mitosen und amitotische Vorgänge konnte ich dagegen nirgends finden. Ebenso sieht man niemals Kerne, die schwanzartig in eine Faser auslaufen.

Die Zellvermehrung in der gekochten Hornhaut ist in zunehmendem Grade etwa bis zur 12. Stunde nach der Implantation zu beobachten. Von diesem Zeitpunkt an beginnen die degenerativen Vorgänge zu überwiegen. Wie ich schon 1927 ausführte, ist ihr Kennzeichen: schwache Färbung von Chromatin und Protoplasma, trotz guter Differenzierung von beiden. Daß es sich nicht um schlechte Färbetechnik handelt, geht daraus hervor, daß auch gut gefärbte Elemente neben den schwach gefärbten zu sehen sind.

Bei der gekochten Hornhaut werden die Kerne blasig und zeigen oft faserige oder bröcklige Chromatineinschlüsse. Selten findet sich auch granuliertes Chromatin an Stelle der Kerne.

Das Protoplasma ist stets sehr schwach gefärbt, wo blasige oder schwach gefärbte Kerne in ihm liegen. Vielfach kann auch ebenso schwach gefärbtes Protoplasma ohne oder mit hauchartigen Kernen gefunden werden.

Da der Zellreichtum bei längerer Implantation eher abnimmt und faserige Grundsubstanz zwischen den Zellgebilden liegt, muß angenommen werden, daß sich viele Zellen wieder in Fasern zurückbildeten. An den

schattenhaften Figuren, die gerade bei den länger implantierten Hornhäuten in der Grundsubstanz überall angetroffen werden (die vor allem im Zentrum oft rein faserig ist), kann man dies Verschwinden beobachten.

Von sonstigen Degenerationsvorgängen, die auf die Schädigung des Kochens zurückzuführen sind, seien große protoplasmatische Flecke in den zentralen Teilen erwähnt und die schmutzigen Spindeln und Chromatingranula; vor allem aber die Umbildung eines Teiles der 6 Stunden implantierten Hornhaut, wo sich die Grundsubstanz zu protoplasmatischen Rund- und Spindelzellen fast völlig umgruppierte, wobei nur ganz wenige dieser sonst typischen Rund- und Spindelzellen — dann aber intensiv gefärbte — Kerne haben. Aus dieser totalen — aber pathologischen — Gewebsumbildung geht der Mechanismus der Zellentstehung besonders eindringlich hervor. Eine Rundzelle ohne Kern habe ich nur einmal, bei einer im Trockensterilisator auf 170° C erhitzten Hornhaut gesehen und erwähnt (Arch. für Ophthalmologie).

Nachtrag.

Ich konnte inzwischen eine Methode finden, die auf denkbar einfache Weise erlaubt, auch im Reagensglas beliebig lange gekochte Hornhäute oder sonstige Gewebe zu üppiger Proliferation und Kernbildung zu veranlassen: Menschliches Blut wird im Verhältnis 9:2 mit 3%iger Natriumcitratlösung versetzt und intensiv zentrifugiert. 2—3 ccm des zellfreien Citratplasmas werden abgehebert und zu dem gekochten Gewebsstück in ein steriles Reagensglas gebracht, das im Brutofen bei 37° C belassen wird. Bei 48stündigem Plasmawechsel haben die gekochten Hornhäute in 4—6 Tagen Bilder geliefert, die mit den hier beschriebenen durchaus identisch sind. An der erstaunlichen Tatsache, daß gekochte Gewebe leben, kann also nicht gezweifelt werden. Hat man sich von dem Vorurteil der Leukocytenwanderung, das ich auf verschiedenen Wegen restlos widerlegt zu haben glaube, erst einmal freigemacht, so darf die Implantationsmethode, die bei vorstehender Arbeit zur Anwendung gelangte, als die ideale bezeichnet werden, während den Zweiflern einsteilen das Citratplasma zwecks Nachprüfung zur Verfügung steht.
