

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

## Beitrag zur Frage der Gewebskorrelation<sup>1</sup>.

Von

Else Knaake.

Mit 9 Abbildungen im Text und 14 Tabellen.

(Eingegangen am 13. November 1939.)

*Heidenhain* hat der „Zellentheorie analytischen Charakters“ eine „synthetische Theorie der Gewebe“ gegenübergestellt. Ihn beschäftigt die Frage, durch welche Regelung z. B. Drüsen während des Wachstums ihre charakteristischen Formen behalten. Und er nimmt an, daß hochkomplizierte Gewebsysteme als Ganzes ebenso wie Einzelzellen die Fähigkeit haben, sich zu teilen und ihre Formeigenschaften auf ihre Nachkommen zu übertragen. Geschmacksknospen, Schilddrüsenfollikel, Dünndarmzotten und andere „Teilkörper“ bringen immer wieder ihresgleichen hervor. Während sie wachsen, teilen sie sich so, daß dieselben zusammengesetzten Gewebeinheiten wieder entstehen. Die *anatomisch-architektonischen* Regeln, nach denen dieser Vermehrungsprozeß abläuft, wurden von *Heidenhain* eingehend untersucht; es sind die Gesetze des spaltenden und sprossenden Wachstums. Unbekannt sind noch die *physiologischen* Kräfte, die während des Wachstums die bestehenden Formen erhalten und sie immer wieder neu schaffen. *Heidenhain* weist darauf hin, daß die Fortpflanzung solcher Histosysteme eine besondere Korrelation aller in ihnen enthaltenen geweblichen Einzelbestandteile voraussetzt. Jedes derartige System beruht nach ihm auf einer besonderen histodynamischen Verfassung, die in dem Ganzen liegt. — Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dieser Frage. Sie handelt von den Kräften, die bei der Korrelation des Epithel- und Bindegewebswachstums wirksam sind und dazu führen, daß die äußere Gestalt der aus diesen beiden Geweben aufgebauten Teile auch während des Wachstums erhalten bleibt.

Dieser Fragekomplex ist ein Teilgebiet des Formproblems, für das *Roux* mit seiner Entwicklungsmechanik ein Programm von ungeheurem Ausmaß entworfen hat: „Die Entwicklungsmechanik ist die Lehre von der Beschaffenheit und Anordnung aller, sei es physikalischen oder chemischen, einfachen oder komplexen, physischen oder psychischen Faktoren, welche die typische oder normale Gestaltung der Lebewesen determinieren und das Determinierte aktivieren, das Typische alterieren;

<sup>1</sup> Als Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät der Universität Berlin vorgelegt.

sie ist ferner die Lehre von den Wirkungsweisen dieser Faktoren. Voraussetzung ist nur, daß die Faktoren in ihrem Wirken durchaus dem Kausalgesetz unterstehen; das ist die Bedeutung des Wortes mechanistisch im Sinne Kants“ (*Roux*).

Nach dem von *Roux* gegebenen Anstoß hat die experimentelle Biologie mit mannigfachen Methoden die Kräfte untersucht, die bei der Formbildung mitwirken. Die Teilergebnisse sind bunt und vielfältig. Aber eine durchgehende Feststellung und wohl grundlegende Erkenntnis vermag man aus ihnen herauszulesen: *Der Körper bedient sich bei der Formbildung oft chemischer Mittel.*

Das sei ganz kurz für die verschiedenen Gebiete, die sich mit dem Formproblem beschäftigen, anschaulich gemacht. Es sind dies Genetik, Entwicklungsmechanik im engeren Sinne, Teratologie und Endokrinologie.

Die Erbsfaktoren haben wohl die weitesttragende Bedeutung für alle Formbildungen. Die Gene, die in den Keimzellen gelegen sind und von ihnen an die Körperzellen weitergegeben werden, bestimmen stärker als alle Umweltfaktoren die grundlegenden Züge unserer Erscheinung, denn von ihnen hängt es ab, wie die wachsenden Zellen auf die Außenbedingungen reagieren. Es ist noch wenig bekannt, auf welche Art und Weise die Gene die Ausbildung der Merkmale zu beeinflussen vermögen. Aber ein erster Lichtschimmer fiel auf die Frage nach ihren möglichen Wirkungsweisen, als nachgewiesen wurde, daß es genabhängige Wirkstoffe gibt: Bei bestimmten Raupen und ihren Schmetterlingen werden Pigmentierung und Augenfarbe durch hormonartige Substanzen ausgelöst, deren Zugehörigkeit zu einem bestimmten Gen im Vererbungs-experiment erwiesen wurde (*A. Kühn*). *Einer der Wege, die Gen und Außenmerkmal miteinander verknüpfen, ist also der der Beeinflussung von Körperzellen durch chemische Stoffe.*

Die experimentelle Analyse der Entwicklung während der Embryonalperiode ist Sache der Entwicklungsmechanik im engeren Sinne. Entscheidende Gestaltungsvorgänge spielen sich an dem meist untersuchten Amphibienei während der Gastrulation ab. Hier kommen Organanlagen zur Ausbildung, die die Kraft haben, ihre Nachbarbezirke zu beeinflussen und sie zur Bildung anderer Organanlagen zu zwingen. Der große Schritt in der tieferen Erfassung dieser Vorgänge war getan, als festgestellt wurde, daß der lebende „Organisator“ *Spemanns* durch abgetötete Gewebsstücke, ja durch chemische Stoffe ersetzt werden kann. Der stoffliche Charakter der Induktion, *die abhängige Differenzierung als chemischer Vorgang war damit aufgedeckt* (*Bautzmann, Holtfreter, Fischer und Wehmaier, Needham, Waddington*).

Ähnliche Erkenntnisse lieferte die experimentelle Teratologie. *Mißbildungen sind durch alle möglichen chemischen Einflüsse erzeugt worden*, sei es, daß man sie, wie beim Fisch- oder Vogelei direkt auf die in Entwicklung begriffene Frucht einwirken oder sie aus dem Blutkreislauf

der Mutter durch die Placenta an den Keim herantreten ließ. Ob und wo eine Mißbildung entsteht, scheint davon abhängig zu sein, ob Zellen, die gerade besonders lebhaft wachsen, durch chemische Einflüsse darin gestört werden (*Stockard*).

Für einen Teil der embryonalen und für die postfetale Entwicklung bis zur Pubertät und schließlich auch für die Altersrückbildungen deckt sich die Frage der Gestalterhaltung und -veränderung weitgehend mit der Lehre der Endokrinologie. Der Mangel oder die Insuffizienz und ebenso auch die Hypertrophie von verschiedenen endokrinen Drüsen drückt sich klinisch sehr eindrucksvoll in veränderten Körperperformen aus. *Eingehender als in allen den anderen genannten Gebieten wurde hier schon herausgearbeitet, daß es sich um chemische Vorgänge handelt* („Harmazone“). Die Hormone sind chemische Stoffe. Von verschiedenen ist die Konstitution bekannt, und die synthetisch hergestellten Substanzen besitzen dieselbe spezifische Wirksamkeit in physiologischer und morphogenetischer Hinsicht wie die natürlichen.

So summarisch und einseitig diese kurze Darstellung unserer heutigen Kenntnisse vom Formproblem ist, sie läßt doch erkennen, daß verschiedene Forscher an mannigfaltigen Objekten und mit unterschiedlichsten Methoden zu einer gemeinsamen Grunderkenntnis kamen, die für die weitere Forschung dieser Arbeitsgebiete grundlegend erscheint: *Formbildungen können auf chemischem Wege beeinflußt und teilweise sogar hervorgerufen werden.*

Diese grundsätzliche Feststellung gilt aber vorläufig nur für die Formbildungen ganzer Organe und Organismen. Über die Gesetze des Gewebswachstums und seine Korrelation sind wir bisher noch ganz ungenügend unterrichtet. Der Entwicklungsphysiologie des Körperganzen und seiner Teile steht noch keine ähnlich ausgebauten Gewebsphysiologie zur Seite.

Von pathologischen Anatomen, die das ganze Gebiet übersehen, wird bis in die neueste Zeit nachdrücklich auf diese Rückständigkeit unserer Kenntnisse hingewiesen. Nach *Benda* sind uns die Vorgänge der Gewebskorrelation so dunkel, daß wir jeden Strohhalm einer Deutung ergreifen müßten. *Aschoff* stellt fest, daß die Korrelationen, die bei der Regeneration im erwachsenen Körper angenommen werden müssen, uns noch ganz unbekannt sind. Nach *Beneke* ist in der Frage nach den Korrelationen der Organteile noch nicht das letzte und oft noch nicht das erste Wort gesprochen. In neuerer Zeit hat *Rößle* wiederholt darauf hingewiesen, daß das Warum und Wie der Einwirkungen von Zellen aufeinander unaufgeklärt ist. „Wir sehen die Erscheinung, ohne ihre Veranlassung und ihren Mechanismus zu begreifen.“ Und noch ganz kürzlich erklärte *Borst*, daß wir das Wesen von Störungen der Regulation, der Differenzierung und des Wachstums bisher nicht erfassen können; erst wenn wir die physiologischen Entwicklungs- und Wachstumskorrelationen kennen, werden wir auch deren Störung begreifen (1938).

Diese mangelhafte Kenntnis der Korrelationsvorgänge betrifft auch das Epithel und Bindegewebe. Das ist bemerkenswert, weil diese beiden Gewebe schon seit langem mit besonderer Aufmerksamkeit beobachtet werden. Ihr gegenseitiges Verhältnis wird immer wieder untersucht und erörtert, weil unzählige Befunde in Entwicklungsgeschichte, Anatomie und Pathologie enge Beziehungen zwischen ihnen beweisen. Bei Drüsenerentwicklungen z. B. wird jedes Vorspriessen des Epithels von Veränderungen im anliegenden Bindegewebe begleitet, so daß sich dieses der neuen Knospe anzupassen scheint. In der Haut findet die Anordnung und Beschaffenheit des Epithels ihren Widerschein in der des subcutanen Bindegewebes; auf einer sklerotischen Dermis kann z. B. kein weiches Epithel gedeihen (*Kromayer*). Die Form der Epithelzellen ist von der Art des stützenden Bindegewebes abhängig; so bleibt das Uterusepithel nur solange zylindrisch, als es von einer Schicht cytogenen Gewebes umgeben ist (*Josselin de Jongh*). Bei allen Katarren und vielen Parenchymerkrankungen bestehen zugleich ausgesprochene Veränderungen im Bindegewebe. — Solcherlei Beobachtungen schaffen fast zwangsläufig die Vorstellung, daß zwischen beiden Geweben Wechselwirkungen bestehen (z. B. *Alfejew, Bullock* und *Rohdenburg*).

Aber in so allgemeiner Form von Wechselwirkungen schlechthin zu sprechen, ist fruchtlos. Damit aus dem Problem ein greifbares Forschungsprogramm entsteht, muß vor allem geklärt werden, ob nicht etwa nur eines der beiden Gewebe aktiv formbildend ist, das andere sich dagegen passiv verhält, also gewissermaßen geformt wird (*Gurwitsch*).

In diesem Sinne haben schon viele Forscher seit *Thiersch* Stellung genommen. Die Mehrzahl ist davon überzeugt, daß das Epithel die Führung hat, indem es seine Form selbstständig entwickelt und das Bindegewebe in eine ihm gemäße Anordnung zwingt. *Beneke* kommt zu diesem Ergebnis auf Grund von Vergleichen der sich entwickelnden embryonalen Brustdrüse und der gutartigen Geschwülste dieser Drüse. Den gleichen Schluß ziehen aus dem Aufbau der Fibroadenome der Mamma *Schimmelbusch, Haeckel* und *Bender*. Die Betrachtung der Speicheldrüsenerwicklung führte *Flint* und *Löwenkron* zu derselben Feststellung, wobei *Flint* allerdings auch dem Bindegewebe Aktivität zuschreibt, die Führung aber dem Epithel überläßt. *Steiner* sah Granulationsgewebe in Fistelgängen unter dem Einfluß von darüberwachsendem Epithel einen Papillarkörper bilden, der teilweise sogar hypertrophisch war; er sieht das als eindeutigen Beweis für die gestaltende Wirkung des Epithels auf das Bindegewebe an. *Fischel* beschäftigt sich mehrfach in embryologischen Untersuchungen mit dieser Frage. Nach ihm hat nur der Teil des Mesenchyms die Fähigkeit zur Selbstdifferenzierung, der allein aus embryonalem Bindegewebe oder seinen Derivaten besteht und von einer Bindegewebshülle umgeben ist. Wenn das Bindegewebe dagegen an Epithellamellen angelagert ist, wie z. B. im Verdauungstrakt, so erfolgt seine Differenzierung in Abhängigkeit von diesem. Selbst die Anordnung der Muskulatur in Längs- und Querlagen wird nach seiner Auffassung vom Epithel bewirkt. Und selbst da, wo das Bindegewebe offensichtlich lebhafter wächst wie in Extremitätenanlagen oder Chorionzotten, bestimmt das quantitativ zurücktretende Epithel die Form. — Nach *Eugen Albrecht* hängt selbst im Carcinom, bei dem doch nach Ansicht vieler Pathologen die Epithel-Bindegewebskorrelation gesprengt ist, die Art des Bindegewebes vom Epithel ab; jeder

Krebs schafft sich das für ihn passende Stromia. — Ähnliche Anschauungen vertritt auch *Borst* (1902).

Ebensogut wird allerdings auch die gegenteilige Ansicht verfochten. Nach *Ribbert* ist das Bindegewebe führend. Gerade die fibroepithelialen Geschwülste der Mamma, aus denen verschiedene Untersucher so sicher eine formgebende Bedeutung des Epithels herauszulesen glauben, können nach seiner Meinung nur durch aktiv wucherndes Bindegewebe ihre Form erhalten. In späteren Arbeiten gibt er zwar zu, daß wenigstens im Krebs auch das Epithel selbständig ist, doch müßte es erst durch das entzündlich veränderte Bindegewebe gereizt werden. — Auch *Robert Meyer* ist der Ansicht, daß *Beneke* und andere zu einseitig das Epithel in den Vordergrund stellen. Er weist z. B. auf die Entwicklung der Extremitäten hin, wo sichtlich nicht dem Epithel die Führung zukäme. Das Bindegewebe hätte hier offenbar die Fähigkeit zur Selbstdifferenzierung. Im ganzen betrachtet hält er manchmal das Bindegewebe mehr für ausschlaggebend, manchmal mehr das Epithel. — Dieser Meinung schließt sich auch *Herzheimer* an. — In neuerer Zeit wird eine ähnliche Auffassung von *Hueck* zum Ausdruck gebracht. Neben einer gewissen Unabhängigkeit sowohl des Epithels als auch des Bindegewebes im Wachstum müßte man für die Ausgestaltung der endgültigen Form doch eine Gemeinschaftsreaktion, ein harmonisches Zusammenarbeiten beider Gewebe anerkennen. — Auf Grund von vergleichenden Untersuchungen an pathologischem und normalem Material bei der Bildung des Riechgrübchens kommt auch *H. Maurer* neuestens zu dem Schluß, daß beide Keimblätter formgebend sind.

Das Problem, in welcher Weise die beiden Gewebe an der Formbildung beteiligt sind, ist also noch recht ungeklärt. Ein und derselbe Befund wird von verschiedenen Untersuchern als Beleg für genau entgegengesetzte Anschauungen herangezogen. Die einen glauben in den gutartigen Brustdrüsentumoren mit Sicherheit eine aktive Führung des Epithels zu erkennen (z. B. *Beneke*), andere gerade das Gegenteil (*Ribbert*). Eine ebenso widerspruchsvolle Bewertung erfahren die Verhältnisse bei der Extremitätenentwicklung (einerseits *Robert Meyer*, andererseits *Fischel*). Der Widerstreit der Meinungen erklärt sich leicht, wenn man berücksichtigt, durch welches Vorgehen diese Anschauungen gewonnen wurden: Sie stellen subjektive Auslegungen von gegebenen histologischen Befunden dar. Beispielsweise werden Organanlagen in verschiedenem Entwicklungsalter oder Geschwülste in aufeinanderfolgenden Ausbildungsstadien daraufhin untersucht, welches Gewebe zuerst wucherte. Diesem Gewebe wird dann die Führung zuerkannt. Nun folgt aber aus einem post hoc nicht zwingend ein propter hoc. Man kann einem Gewebe auch mit keinem optischen Hilfsmittel ansehen, ob es aus eigenem Antrieb zu wachsen anfing oder durch außer ihm gelegene Kräfte veranlaßt wurde. Die Tatsache der abhängigen Differenzierung wurde ja erst entdeckt — konnte erst entdeckt werden —, als man von der rein beschreibenden Entwicklungsgeschichte zur experimentellen Entwicklungsmechanik überging. Auch in der Frage, *wie sich die beiden Gewebe bei der Formbildung verhalten, dürfte eine Klärung lediglich durch das Experiment zu erwarten sein.*

Einige wenige Anfänge in dieser Richtung liegen vor, führten aber begreiflicherweise noch nicht zu eindeutigen Ergebnissen. So haben

*Ebeling* und *A. Fischer* behauptet, daß Epithelkulturen einen deutlich formativen Reiz auf Bindegewebeskulturen ausübten. Sie züchteten nämlich Reinkulturen von Irisepithel einige Zeit lang in unmittelbarem Kontakt mit Fibroblastenkulturen und beobachteten auf Schnittpräparaten angeblich drüsenaartige Bildungen, die von Zylinderepithel ausgekleidet und im Inneren von einer kolloidalartigen Substanz erfüllt waren. Ähnliche Verhältnisse wurden von *Drew* für Kulturen aus Nierenepithel und Fibroblasten und von *Doljanski* und *Roulet* für Mischkulturen aus Leberepithel und Mesenchym beschrieben.

So verlockend es auch ist, in solchen Befunden den Ausdruck spezifischer formbildender Kräfte zu sehen, bin ich doch mit *Demuth* (1933) und *K. Bauer* der Ansicht, daß die beobachteten Formen durchaus nicht denjenigen Gebilden im Körper entsprechen, die ihre Beschreiber darin sehen wollen. Und ebenso wie *Demuth* und *Bauer* bin ich auf Grund eigener Beobachtungen davon überzeugt, daß ihr Zustandekommen anders zu erklären ist.

*Törö* pflanzte Kulturen aus Darmepithel und solche von Darmfibroblasten an Stelle der Linse in das Auge junger Küken; beide Kulturrearten zusammen brachten ein darmartiges Gebilde hervor. — *Bentley* untersuchte die Wundheilung der Haut in vitro. Er beschreibt, daß die Dermis hinsichtlich Zellaktivität, Fibrillenbildung und -orientierung durch wachsendes Epithel beeinflußt wurde. Diese Wirkung ging nur von Hautepithel aus und hörte auf, sobald die Basalmembran gebildet war. — Im allgemeinen sprechen aber die Erfahrungen der Gewebezüchter dafür, daß Epithel und Bindegewebe in vitro unabhängig voneinander wachsen (*Lewis* und *Lewis*, *G. Levi*, *Maximow*, *Mitsuda*). Sie beeinflussen sich während des Wachstums nur auf rein mechanische Weise.

So haben die wenigen bisher vorliegenden Experimente noch nicht viel zur Klärung der Formbildung beigetragen. Trotzdem wird man sie als erste Schritte auf einem Wege bewerten, der sich bei hartnäckiger Verfolgung vielleicht einmal bewährt.

Einen Hinweis darauf, wie fruchtbare die Betrachtungsweise der Entwicklungsmechanik auch für Probleme der Pathologie sein kann, geben die Arbeiten von *Schürmann* und seinen Mitarbeitern *Pflüger* und *Noerrenbrock* sowie von *Schürmanns* Schülern *Schmidt* und *Möller*. Diese Untersucher ziehen den Begriff der Organisatorwirkung für die Erklärung des Aufbaus bestimmter Tumoren heran; allerlei histogenetisch undurchsichtige Befunde wurden auf diese Weise verständlich.

Meine eigenen Experimente betreffen nicht, wie die bisher genannten Arbeiten, das Problem der *Formbildung*, sondern beschäftigen sich mit der Frage der *Formerhaltung*. Es wurde schon daran erinnert, daß systematisierte Zellkomplexe ebenso wie Zellen Nachkommen erzeugen können, die dieselben Formeigenschaften wie sie selbst haben (*Heidenhain*). Das Wachstum und die Vermehrung solcher Histosysteme setzt eine Korrelation aller an ihrem Aufbau beteiligten Gewebskomponenten voraus;

das Wesen dieser Korrelation aber ist uns noch unklar. Ausgehend von umfangreichen Untersuchungen an Gewebekulturen habe ich mir nun eine Vorstellung darüber gebildet, worin diese Korrelation speziell für das Wachstum des Epithels und des Bindegewebes bestehen könnte. Die Kräfte, die das „Gleichgewicht“ dieser beiden Gewebe bestimmen, sind dieselben, von denen es abhängt, ob die aus Epithel und Bindegewebe aufgebauten Histosysteme beim Wachstum ihre Form behalten oder verlieren. *Im Gegensatz zu den schon aufgeführten Theorien über das Verhältnis der beiden Gewebe bei der Formbildung verzichtet meine Vorstellung auf die Annahme undefinierbarer Einwirkungen der Zellen aufeinander. Sie sieht in chemischen Säfteveränderungen und spezifischen Reaktionen der Gewebe das Mittel des Körpers, um bestehende Formen zu erhalten oder zu verändern. Durch diese Grundeinstellung reiht sie sich zwanglos in die Zusammenhänge ein, die uns heute über das Formproblem des Körpers und seiner Organe bekannt sind.*

Mein Gedankengang über die Korrelation des Epithel- und Bindegewebewachstums ist folgender:

Der Zustand, den wir als „Gleichgewicht“ zwischen diesen beiden Geweben bezeichnen, besteht — anatomisch betrachtet — in einem bestimmten quantitativen und topographischen Verhältnis beider Gewebe zueinander. Mehr ist aus dem histologischen Befund nicht herauszulesen. Lediglich das eingebürgerte Wort „Gewebsgleichgewicht“ täuscht gegenseitige Beziehungen vor, die darüber hinausgehen. Denn es vermittelt die Vorstellung, als ob dieses räumlich und mengenmäßig definierte Verhältnis dadurch zustande käme, daß zwei Kräfte sich die Waage halten, Kräfte, die von dem einen Gewebe auf das andere einwirken und sein Wachstum so beeinflussen, daß es zu dem eigenen Wachstum in einem harmonischen Verhältnis steht. Aber sowohl diese von den Geweben ausgehenden Kräfte als auch ihr Ausgleich, die Einstellung des Gleichgewichtszustandes, sind rein hypothetisch. Diese Kräfte wurden nie bewiesen<sup>1</sup>, für ihr Vorhandensein wurden nicht einmal Indizien gebracht und über ihre Wirkungsweise wurden nur ganz vage Vermutungen geäußert.

Man darf folglich von diesem Gewebsgleichgewicht auch nicht sprechen, als ob die darin ausgedrückten Wechselbeziehungen zwischen den Geweben eine reale Gegebenheit wären. Keinerlei Tatsachen stehen der Annahme entgegen, daß lediglich vom Beschauer zwei Größen aufeinander bezogen werden, die in Wirklichkeit unabhängig voneinander sind. Alle Befunde aus Entwicklungsgeschichte, Anatomie und Pathologie, die auf

<sup>1</sup> Die von Holtfreter kürzlich im Experiment nachgewiesenen Gewebsaffinitäten positiver und negativer Art bilden zu dieser Feststellung keinen Widerspruch. Denn sie sind den Geweben nur während einer eng umschriebenen Formbildungsperiode des Organismus eigen, die innerhalb der ganzen Lebensdauer nach unseren bisherigen Kenntnissen einmalig ist.

enge Beziehungen zwischen beiden Geweben hinweisen, besagen ja nur, daß ihr Wachstum durch irgendwelche übergeordnete Kräfte reguliert und koordiniert wird. Diese Kräfte brauchen aber keineswegs für das Bindegewebe im Epithel und für das Epithel im Bindegewebe zu liegen. Nach meiner Vorstellung gehen sie vom Körporganen aus, insofern nämlich, als dieses die chemische Zusammensetzung der Körpersäfte bedingt, auf die die Gewebe spezifisch reagieren. *Es läßt sich nämlich zeigen, daß das Wachstum des einen Gewebes unabhängig vom Wachstum des anderen durch chemische Außenbedingungen gesteuert werden kann.* Beide Gewebe werden von der Säftezusammensetzung beherrscht, beide reagieren auf Säfteveränderungen in ihrem Wachstum in typischer Weise. Nur weil Wachstumsabnormitäten eindrucksvoller sind und unmittelbarer wahrgenommen werden als eine dahinter verborgene pathologische Säftebeschaffenheit, wird in dem abnormen Wachstum des einen Gewebes die Ursache für das gleichfalls veränderte Wachstum des anderen Gewebes vermutet und von einer Störung des Gewebsgleichgewichtes gesprochen.

Das Gewebsgleichgewicht und die Wechselwirkungen, die es angeblich zustande bringen, sind also nach meiner Vorstellung keine reale Gegebenheit, sondern Ausdruck einer Betrachtungsweise. Nach meiner Auffassung wird das Wachstum beider Gewebe in erster Linie vom Säftemilieu gesteuert. Ähnlich wie sich *Merkel* die normale Form der Epithelien entstanden denkt, so kommt nach meiner Vorstellung das normale Verhältnis von Epithel und Bindegewebe, ihr „Gleichgewicht“ zustande. Nach *Merkel* ist die Gestalt der Epithelzellen nichts Präformiertes, erblich Festgelegtes, sondern ergibt sich aus den mechanischen und physiologischen inneren und äußeren Einflüssen. Wenn trotz dieser Abhängigkeit die Epithelzellen doch meistens bestimmte Formen zeigen, so erklärt *Merkel* das daraus, daß die Funktion der Epithelschichten in den meisten Organen konstant ist. — In analoger Weise wird nach meiner Auffassung das gegenseitige Verhältnis von Epithel und Bindegewebe nicht oder zumindest nicht ausschließlich durch Wechselbeziehungen stabilisiert. Wenn wir gewöhnlich beide Gewebe in konstanten räumlichen und mengenmäßigen Beziehungen zueinander antreffen, so ist das vor allem deshalb der Fall, weil im gesunden Körper die chemische Zusammensetzung der Säfte sehr regelmäßig und gleichartig ist. Auf diese reagieren Epithel und Bindegewebe in typischer Weise. Sie sind weitgehend unabhängig voneinander, aber streng gebunden an die Beschaffenheit ihres Außenmilieus: *Sie werden also in erster Linie nicht durch gegenseitige Wechselwirkungen, sondern vom Gesamtkörper gesteuert. So formt sich im gesunden Organismus das Gewebsbild, das wir als normal empfinden und als Ausdruck eines Gleichgewichtszustandes ansehen.* In dem Befund, daß Epithel und Bindegewebe histologisch in richtiger Menge, Anordnung und Beschaffenheit vorhanden sind, sehe ich vor allem den gewöhnlichen Ausdruck dafür,

daß die Säfte des Körpers, soweit ihre Zusammensetzung das Gewebswachstum angeht, gesund sind.

Für manche Gewebsbilder ist uns die Abhängigkeit von der Säftezusammensetzung ganz geläufig. So wandelt sich die Uterusschleimhaut in ihrem epithelialen und bindegewebigen Anteil in zeitlicher Übereinstimmung mit dem Zyklus des Ovars und ist dabei ursächlich abhängig von dem in die Säfte übergetretenen Follikelhormon. Der Aufbau des Brustdrüsengewächs und die gleichzeitigen Veränderungen im Stroma erfolgen in Gebundenheit an die hormonalen Umstellungen im Säfteleumfeld der schwangeren Frau. Eine solche Bedingtheit besteht nach meiner Vorstellung immer, nicht nur in den wenigen Fällen, in denen sie uns jetzt bekannt ist.

Epithel und Bindegewebe könnten nun auf Säfteveränderungen in gleicher Weise reagieren. Dann bliebe das Gewebsbild auch unter pathologischen Umständen dem Ausgangsbild ähnlich, nur die absolute Größe würde beeinflußt. Wenn beide Gewebskomponenten im selben Verhältnis zunehmen oder aber schwinden, so wird das aus ihnen zusammengesetzte Gebilde entweder ins Große gesteigert oder atrophisch; immer aber entspricht sein Aufbau dem des normalen Vorbildes.

So ist der wirkliche Vorgang aber nicht. Das pathologische Gewebsbild ist ein *verzerrtes* Abbild der normalen Verhältnisse. „Das Gewebsgleichgewicht ist gesprengt.“ Beide Gewebe reagieren nämlich auf Säfteverschiebungen verschieden, ihre Wachstumsreaktion auf chemische Einflüsse ist spezifisch. Bestimmte Abnormitäten unterdrücken das Wachstum des einen Gewebes, während sie ein Wachstum des anderen noch zu lassen. So kann es geschehen, daß unter gewissen Bedingungen ausschließlich eins der beiden Gewebe wuchert, weil das andere unter diesen Umständen gelähmt ist. Hochgradige Säfteveränderungen haben ihr charakteristisches Gewebsbild; manche sind vorzugsweise dem Bindegewebewachstum ungünstig, andere hemmen in erster Linie das Wachstum des Epithels. Das wird aber nur in extremen Fällen deutlich. Denn bei schwächeren Störungen können beide Gewebe noch wuchern, das eine vielleicht spärlicher als unter normalen Verhältnissen, das andere noch ungestört. Ist die Säfteverschiebung aber stark, so tritt das eine so sehr zurück, daß das andere dem Bilde das charakteristische Aussehen gibt.

Die Möglichkeiten der Säfteveränderungen sind mannigfaltig, die Gewebsreaktionen darauf aber sehr eintönig. Wie ähnliche Blutbilder verschiedene Krankheiten begleiten, so können dieselben Gewebsbilder auch durch mehrere Einflüsse entstehen; sie sind nicht für ganz bestimmte Abnormitäten spezifisch. Denn der Wachstumsvorgang ist so komplex, daß der Mechanismus durch mancherlei Umstände ausgelöst oder gesperrt werden kann. *Aber die verschiedenen Faktoren, die das Bindegewebewachstum unterdrücken, sind von den für Epithel schädlichen so*

grundsätzlich verschieden, wie z. B. eine Veränderung der Säfte im Sinne der Hypotonie eine solche im Sinne der Hypertonie ausschließt.

Es ist wohl anzunehmen, daß es auch eine ganze Reihe von Säfteveränderungen gibt, auf die das Gewebe stumm bleibt. Nicht jede Krankheit ist mit Wachstumsvorgängen verknüpft, obwohl wohl jeder Krankheitsprozeß in den Säften zum Ausdruck kommt.

Auch das Ausmaß, in dem sich die Zellen an der Reaktion beteiligen, ist verschieden. Manchmal sind die Säfteveränderungen auf ein umschriebenes Gebiet beschränkt, wie Hypertonie und Acidität bei der Entzündung. In solchen Fällen ist es verständlich, daß nur die betroffenen Zellen darauf ansprechen und daß nur diese entzündliches Granulationsgewebe bilden. Aber daneben gibt es ganz sicher auch rein lokales Wachstum als Reaktion auf Säfteveränderungen allgemeiner Natur; die fremden Stoffe bespülen alle Zellen des Körpers und finden doch nur in wenigen einen Widerhall. Ein anschauliches Beispiel für solche Zusammenhänge ist die Wirkungsweise mancher Wuchshormone: Sie strömen mit dem Blut überall hin, aber ein Erfolg tritt nur an den spezifischen Zellen bestimmter Organe ein. Offenbar muß eine Bereitschaft, eine besondere Verfassung in den Zellen bestehen, damit sie auf chemische Außenbedingungen mit Wachstum antworten. Ein großer Teil der Zellen im erwachsenen Körper ist für Wachstumsreize zweifellos taub; sie sind in „stationärem Zustand“, in Wachstumsruhe befindlich. Aber gewisse Keimpläne von jugendlichen Zellen bleiben in fast allen Organen erhalten. Andere können durch gesteigerte Funktion in einen wachstumsbereiten Zustand zurückversetzt werden. Auch Verwundung des Gewebes macht Zellen wieder jung und teilungsfähig. Nur wenn diese Voraussetzungen in irgendeiner Weise erfüllt sind, kann überhaupt auf Säfteveränderungen eine Antwort erfolgen. Da das fast immer auf bestimmte Stellen im Körper beschränkt ist, wird die Wachstumsreaktion auf *allgemeine* Säfteveränderungen doch meist *lokaler* Natur sein.

Von den zweifellos sehr zahlreichen Faktoren, die das Epithel- und Bindegewebewachstum in spezifischer Weise zu beeinflussen vermögen, habe ich bisher drei Gruppen aufgefunden und im einzelnen geprüft<sup>1</sup>. Es sind das hypo- und hypertonische Lösungen, quellend und entquellend wirkende wasserlösliche Salze und schließlich oberflächenaktive Substanzen.

Diese Stoffgruppen wurden in ihrer Wirkung auf Pankreasexplantate des Hühnchens und auf Reinkulturen von embryonalem Bindegewebe und Epithel geprüft. Sie wurden dem gewöhnlichen Nährmedium aus Blutplasma und embryonalem Gewebssaft zugesetzt. Das Wachstum ist im zusatzfreien Medium schon optimal; keine der untersuchten Substanzen vermag die Zellproliferation darüber hinaus zu steigern. *Im*

<sup>1</sup> Einen großen Teil meiner früheren Experimente zu diesem Thema habe ich an der Klinik meines früheren Chefs, Geheimrat Sauerbruch, ausgeführt.

*Gegenteil besteht ihr besonderer Einfluß in charakteristischen Wachstumshemmungen.*

*Diese Hemmungen sind in zweierlei Hinsicht spezifisch.* Das sei zunächst an der Gruppe der quellenden und entquellenden Salze erläutert<sup>1</sup>.

*Die Wachstumshemmung, die ein Salz bei gleicher Konzentration hervorbringt, ist bei den beiden Geweben in gesetzmäßiger Weise verschieden.* Jedes dieser Salze verlangsamt entweder das Wachstum des Epithels stärker als das des Bindegewebes oder umgekehrt. Welches der beiden Gewebe intensiver betroffen wird, hängt davon ab, ob das Salz quellend oder entquellend wirkt. Von den hierhergehörigen Salzen haben diejenigen mit einwertigem An- oder Kation quellende Wirkung. Es sind das Natrium- oder Kaliumchlorid, -acetat, -bromid, -jodid, -rhodanid, -salicylat, -zinnamat. Alle diese quellend wirkenden Salze hemmen immer das Bindegewebswachstum stärker als das des Epithels. Dagegen wirken entquellend die Salze mit 2- oder mehrwertigem An- oder Kation, also Natriumsulfat oder -phosphat und Calciumchlorid. *Im Gegensatz zu den quellenden werden diese entquellenden Salze immer vom Bindegewebe besser vertragen als vom Epithel.*

*Der Grad der Wachstumshemmung hängt davon ab, in welchem Maße eine Substanz die für sie charakteristische physikalisch-chemische Eigenschaft hat, mit welcher Intensität sie also quellend oder entquellend wirkt.* Bekanntlich ordnen sich diese Salze nach dem Grade ihrer quellenden Wirkung in einer bestimmten Reihenfolge, die nach ihrem Entdecker Hofmeistersche Reihe genannt wird: Die quellende Wirkung des Natriumchlorids und -acetats ist ziemlich gering, sie steigt an beim Natriumnitrat, -bromid und -jodid und ist sehr erheblich beim Natriumrhodanid, -salicylat und -zinnamat. In derselben Reihenfolge steigert sich ihre gewebspezifische Wirkung. Je stärker quellend ein Salz wirkt, um so geringer ist der notwendige Zusatz, der stärkste Bindegewebshemmung hervorruft.

Analoge Verhältnisse bestehen für die Wirkungen, die durch Veränderungen des osmotischen Druckes an den Geweben hervorgebracht werden. Auch die hier eintretenden Wachstumshemmungen sind in zweierlei Hinsicht spezifisch: *Hypotonie schädigt das Bindegewebswachstum stärker als das des Epithels, Hypertonie wird umgekehrt vom Bindegewebe besser vertragen.* Also haben auch hier entgegengesetzte physikalisch-chemische Einflüsse eine spezifische, in gewisser Hinsicht gegenteilige Wirkung auf die beiden Gewebe. Und ferner steigt die gewebsspezifische Wirkung mit dem Ausmaß der physikalisch-chemischen Veränderung. Je stärker z. B. die Hypotonie der untersuchten Lösung ist, um so geringer ist der Zusatz, der das Bindegewebswachstum ganz unterdrückt<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Siehe Arch. exper. Zellforsch. **14**, 616 (1933); Dtsch. Z. Chir. **242**, 655 (1934) und diese Arbeit, Experimenteller Teil, S. 107—112, mit Tabellen 2, 3 und 4.

<sup>2</sup> Siehe Arch. exper. Zellforsch. **14**, 611 (1933); Dtsch. Z. Chir. **242**, 655 (1935) und diese Arbeit, Experimenteller Teil, S. 106—107, mit Tabellen 1 und 4.

*Auch die dritte der untersuchten Stoffgruppen zeigt Spezifität.* Es sind zahlreiche Substanzen von sehr verschiedener Oberflächenaktivität bekannt. Ich habe sie in großer Zahl und verschiedener Art untersucht, und zwar Cholesterin, ein oberflächenaktives Kolloid, die Reihen der oberflächenaktiven Alkohole, Fettsäuren und Basen. Sie alle hemmen das Bindegewebewachstum stärker als das des Epithels. Auch hier besteht Parallelität zwischen Ausprägung der physikalisch-chemischen Wirkung und Intensität der gewebsspezifischen Beeinflussung: *Je stärker eine Substanz die Oberflächenspannung herabsetzt, um so geringer ist wiederum der notwendige Zusatz, der das Bindegewebewachstum völlig unterdrückt.* — Die umgekehrte Prüfung könnte in dieser Versuchsgruppe nicht vorgenommen werden, denn es sind keine Stoffe bekannt, die die Oberflächenspannung erheblich erhöhen<sup>1</sup>.

Auf die Experimente selbst gehe ich in *Einzelheiten* an dieser Stelle nicht ein. Sie werden im experimentellen Teil mit Angabe der Technik und der Versuchsprotokolle wiedergegeben. Auch die zu diesen Experimenten vorliegende Literatur wird dort zusammengestellt. Die Beobachtungen anderer Untersucher bestätigen fast ausnahmslos meine Befunde. Teilweise beziehen sie sich auf ein anderes Material als in meinen Versuchen. Das spricht dafür, daß die hier erörterten Zusammenhänge nicht allein für die von mir untersuchten Gewebe gültig sind, sondern eine allgemeinere Bedeutung haben.

An diese ihrem Wesen nach kurz geschilderten Experimente über die spezifische Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeiten von Epithel und Bindegewebe habe ich die Theorie geknüpft, daß das Gewebe wachstum auch im Organismus wenigstens zum großen Teil durch wechselnde chemische Säftezusammensetzung gesteuert wird. Es erscheint mir recht möglich, daß auch im kranken Körper durch ähnliche Säfteveränderungen das Wachstumstempo der Gewebe in spezifischer Weise verändert und dadurch das Gewebsbild verzerrt wird. Die von mir untersuchten Stoffgruppen sind zwar nur Beispiele; ob gerade sie in den realen Bedingungen des Tierkörpers im beschriebenen Sinne zur Auswirkung kommen, soll nicht erörtert werden. Doch sind diese Beispiele nicht ganz ohne Überzeugung gewählt: Wir wissen, daß der Körper über vielerlei Mittel verfügt, um die Isotonie der Säfte zu schützen. Allgemein wird darin ein Hinweis erblickt, daß Konstanz der Gefrierpunktserniedrigung für den normalen Ablauf des Körpergeschehens von Bedeutung ist. Ebenso ist uns bekannt, daß Quellung und Entquellung und Oberflächenaktivität für das Eiweiß des Körpers wie für alle in kolloidalem Zustand befindlichen Substrate von eingreifender Wichtigkeit sind. Und es ist deshalb nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, daß die untersuchten Säfteveränderungen — neben anderen — auch das

<sup>1</sup> Siehe Z. Krebsforsch. 33, 378 (1931).

Gewebewachstum in dem beschriebenen Sinne beeinflussen. So könnte man es z. B. deuten, daß in einem entzündeten Gebiet mit der bekannten osmotischen Hypertension eine bindegewebige Proliferation begünstigt wird oder daß im krebskranken Körper infolge der häufig herabgesetzten Oberflächenspannung seiner Säfte eine vorwiegend epitheliale Wucherung einsetzt<sup>1</sup>. Unsere Kenntnisse über die allgemeinen und lokalen Säfteverhältnisse im Körper sind freilich vorläufig noch zu gering, als daß hier schon mit Sicherheit konkrete Beispiele genannt werden könnten.

Wenn diese aus Versuchen an Gewebekulturen abgeleitete Anschauung auch für das Wachstum im Körper gültig sein soll, so ist Voraussetzung, daß die untersuchten Stoffe das Wachstum *direkt* beeinflussen. Nur wenn sie in der Gewebekultur unmittelbar in das Zelleben eingreifen, können die *in vitro*-Befunde auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen werden. *Heubner* und *v. Möllendorff* (1937) haben nun allerdings die Anschauung vertreten, daß die Zusammenhänge in meinen Experimenten anders liegen. Nach ihrer Meinung verändern die zugefügten Substanzen die physikalische Beschaffenheit des Nährmediums, und nur durch diesen Umstand, also auf rein mechanische Weise, soll einmal das Bindegewebe, ein anderes Mal das Epithel in der Kultur bessere Wachstumsbedingungen vorfinden. — Wenn diese Anschauung richtig wäre, so würde damit allerdings meiner Vorstellung vom Wesen der Gewebskorrelation weitgehend der Boden entzogen; denn für eine solche rein mechanische Wirkungsweise meiner Versuchsbedingungen auf dem Umweg über den Nährboden fände sich im Körper nur recht gezwungen ein Analogon. Ich habe aus diesem Anlaß umfangreiche Experimente ausgeführt, die die behaupteten Zusammenhänge von mechanischen Strukturverhältnissen des Nährmediums und Wachstumsgeschwindigkeit der Gewebekulturen untersuchen. Ihre Darstellung erfolgt nur im experimentellen Teil, weil sie Fragen von ausschließlich gewebezüchterischem Interesse behandeln. Diese Untersuchungen haben nun nicht den geringsten Anhalt dafür erbracht, daß die Deutungen von *Heubner* und *v. Möllendorff* berechtigt sind. Und auch die in der Literatur vorliegenden hierhergehörigen Angaben vermögen die Deutung der beiden Verfasser nicht zu stützen. Ich stelle sie im experimentellen Teil im Zusammenhang mit meinen Experimenten dar.

Danach glaube ich folgern zu dürfen, daß die spezifischen Wachstumshemmungen in meinen Versuchen nicht auf mechanischem Wege zu stande kommen. Sie erfolgen doch wohl dadurch, daß die Versuchsfaktoren unmittelbar in das Zelleben eingreifen und den Wachstumsvorgang beeinflussen. Auf welche Weise das erfolgen könnte, habe ich schon früher erörtert (1935). Meine Vorstellung ist die, daß die untersuchten

---

<sup>1</sup> Ich abstrahiere dabei völlig vom Faktor der Malignität und habe nur den geweblichen Aufbau im Auge.

Substanzen die Zellpermeabilität verändern<sup>1</sup>. Wenn der Eintritt von wachstumswichtigen Stoffen in die Zellen durch die Versuchssubstanzen reguliert wird, so würde damit auch das Wachstum selbst betroffen werden. Freilich ist ein *Beweis* für eine solche Annahme bei dem heutigen Stande unserer Kenntnis nicht möglich. Ein solcher Erklärungsversuch kann zur Zeit nichts weiter bedeuten als einen *Hinweis auf erwägbare Möglichkeiten*.

Allgemeiner gesehen ist er der Ausdruck dafür, daß die Forschung sich nicht darauf beschränken soll, die äußereren Ursachen des Wachstums festzustellen. Die Faktoren, die dafür verantwortlich gemacht werden, sollten außerdem zu dem Wachstumsvorgang selbst in eine konkrete Beziehung gebracht werden. Dieser Prozeß stellt sich uns als stoffwechselchemisches, kolloidchemisches, fermentchemisches oder energetisches Problem dar, und mit wenigstens einer dieser Teilerscheinungen müssen Wachstumsreiz und Wachstumsbremsung auch gedanklich verknüpft werden. Freilich fehlen uns zu einer solchen Arbeitsrichtung vorläufig noch vielerlei Kenntnisse. Aber nur wenn überhaupt in diesem Sinne gedacht und gesucht wird, werden allmählich die festen Grundlagen dazu geschaffen.

**Zusammenfassung.** Das Problem der Epithel- und Bindegewebskorrelation wird auf Grund von Untersuchungen an Gewebekulturen behandelt. Es wurden verschiedene physikalisch-chemische Bedingungen aufgefunden, die im Experiment das Wachstum der beiden Gewebe in spezifisch verschiedener Weise zu hemmen vermögen. An diese Befunde wird die Vorstellung geknüpft, daß das Gewebswachstum auch im Körper durch chemische Bedingungen beeinflußt, wenn nicht reguliert wird, es wird durch die Säftezusammensetzung gesteuert. Die Gewebe reagieren darauf in einer einem jeden eigentümlichen Weise. Sie sind also dem Körperorganen passiv unterworfen und in ihrem Wachstum in erster Linie von ihm und weniger voneinander abhängig.

Diese Anschauung unterscheidet sich grundsätzlich von den Theorien, die bisher über das Verhältnis von Epithel und Bindegewebe aufgestellt wurden. Im Gegensatz zu diesen sieht sie weniger in undefinierbaren Kräften und Wechselwirkungen das Mittel zur Gewebssteuerung als in der spezifischen Reaktion jedes Gewebes auf physico-chemische Einflüsse. Diese Auffassung eines Vorganges, der einen Teil des Formproblems darstellt, fügt sich zwanglos in die Zusammenhänge ein, die heute vom Wesen der Formbildung bekannt sind.

### Experimenteller Teil.

Die im Vorstehenden dargestellte Theorie vom Wesen der Korrelation des Epithel- und Bindegewebswachstums habe ich aus Befunden an

<sup>1</sup> *Heubner* machte mit Recht darauf aufmerksam, daß meine Ableitung nicht in allen Einzelheiten mit unseren physikalisch-chemischen Kenntnissen vereinbar ist. Doch wird dadurch nicht die ganze Vorstellung in Frage gestellt.

Gewebekulturen abgeleitet. Es ist nicht zu leugnen, daß solche Untersuchungen nur eine schmale Basis für ein so ungeklärtes und schwieriges Problem abgeben. Doch wurde schon dargestellt, wie wenig Konkretes und Begründetes auf diesem Gebiete bisher überhaupt vorliegt. Das eingehendste histologische Studium der Frage führte nur zu rein spekulativen und überdies widerspruchsvollen Behauptungen. Bei einer solchen Sachlage erscheint mir jeder experimentelle Beitrag erwünscht, auch wenn dabei eine Vereinfachung des Versuchsobjekts unumgänglich ist. Zweifellos kann man die Verhältnisse in der Gewebekultur auch nicht mit denen im Körper identifizieren. Aber es erscheint mir immerhin fruchtbarer, aus Befunden an Gewebekulturen auf Zelleigenschaften zu schließen, als aus morphologischen Bildern in Schnittpräparaten Eigenschaften von Zellen herauszulesen, sie neu zu benennen und daran weitgehende Theorien zu knüpfen<sup>1</sup>. Ich betrachte Untersuchungen an Gewebekulturen als einfache Modellversuche für die komplexen Verhältnisse im Körper. Man darf diese Methode dann für ein bestimmtes Problem heranziehen, wenn die Grundvoraussetzungen für die Untersuchung der Frage im Gewebekulturversuch sinngemäß nachgeahmt werden können; sie dürfen aber dabei in vereinfachter Form vorliegen. Diese Bedingung trifft für die Frage der Gewebskorrelation gerade in Verbindung mit Gewebekulturen zu. Es muß nämlich zunächst einmal ein reaktionsfähiges Objekt vorhanden sein. Das ist in unserem Fall in lebenden Epithel- und Bindegewebszellen gegeben, die auf die Versuchsbedingungen mit spezifisch verändertem Wachstum antworten können. Ferner müssen die Faktoren, die im Tierkörper für die Gewebskorrelation verantwortlich sein sollen, im Kulturversuch sinngemäß dargestellt werden können. Das ist in idealer Weise der Fall; denn die für ursächlich gehaltene pathologische Säftebeschaffenheit kann durch eine besondere Zusammensetzung des Nährmediums nachgeahmt werden. Schließlich müssen Kontrollmöglichkeiten bestehen, die erkennen lassen, ob die Versuchsbedingungen spezifisch oder unspezifisch wirken. Das geschieht in unseren Experimenten, indem entgegengesetzt gerichtete Versuchsbedingungen darauf geprüft werden, ob sie, wie zu fordern, die gegenteilige Wirkung haben. — Wie diese Analyse zeigt, sind Gewebekulturen durchaus geeignet, die Frage der Gewebskorrelation experimentell zu untersuchen.

Ein Teil der Experimente, aus denen ich meine Vorstellung vom Wesen der Korrelation des Epithel- und Bindegewebewachstums abgeleitet habe, wurde schon früher veröffentlicht. *Heubner* hat gegen sie verschiedene Einwände erhoben. Darauf glaube ich *im einzelnen* nicht eingehen zu müssen, da die im folgenden dargestellten Experimente die früher beobachteten Zusammenhänge bekräftigen und zugleich die Lücken ergänzen, auf die *Heubner* hingewiesen hat.

<sup>1</sup> So versucht *Kromayer* „durch Annahme der veränderten Epithelio- und Desmophilie der Carcinomepithelien Wachstum und Metastasierung der Carcinomzellen befriedigend zu erklären“.

*Material.*

Das Material für alle Versuche an Reinkulturen waren höhere Passagen von Irisepithel und Fibroblasten verschiedener Herkunft vom Hühnerembryo, meistens sogenannte Osteoblasten. Für Versuche an Mischkulturen<sup>1</sup> wurde Pankreasgewebe vom Hühnerembryo oder von jungen Küken benutzt.

In meinen früheren Versuchen an Mischkulturen handelte es sich um den Nachweis, daß bei Gegenwart oberflächenaktiver Substanzen, quellend wirkender Salze oder bei bestehender Hypotonie des Mediums das Bindegewebewachstum weitgehend unterdrückt wird, das Epithel dagegen in einem solchen Medium noch gedeihen kann und großenteils in der Wachstumszone an Stelle des Bindegewebes tritt. Zu diesem Zweck mußte ein Organ gewählt werden, das ohne experimentelle Beeinflussung, also in normalem Züchtungsmedium, vorwiegend bindegewebig wächst. Diese Anforderungen erfüllt das Pankreas des 17 bis 19tägigen Hühnerembryos. — In den jetzt ausgeführten Versuchen kommt es in Ergänzung der früheren Befunde darauf an zu zeigen, daß die *gegentiligen physikalisch-chemischen Einflüsse auch den entgegengesetzten Gewebeeffekt haben, also das Epithelwachstum weitgehend unterdrücken, ohne das Bindegewebewachstum zu verhindern*. Eine solehe Wirkung ist nur an einem Organ festzustellen, das unbeeinflußt vorwiegend epithelial wächst; daran kann gezeigt werden, daß die Versuchseinflüsse das Epithelwachstum weitgehend zurückdrängen und daß an seine Stelle Bindegewebe tritt. Ein für diesen Zweck geeignetes Versuchsobjekt stellt das Pankreas des schon geschlüpften Küken dar.

Die Wachstumsart des Pankreas hängt nämlich vom Alter des explantierten Organs ab (*Knake 1935*); während aus dem Pankreas des 17 bis 19tägigen Hühnerembryos im normalen Medium überwiegend oder sogar fast ausschließlich Bindegewebe wächst, besteht beim Organ des 20 bis 21tägigen Hühnerembryos ein großer Teil der Wachstumszone aus Epithel. Dieser Anteil wird bei Explantaten aus dem Pankreas des 1 bis 2 Tage alten Küken noch reichlicher; hier bildet es oft ganz allein die Wachstumszone. Ich habe diese wechselnden Verhältnisse auf die Dotterresorption in den Darm bezogen, da ich ein Ansteigen des Epithelwachstums mit fortschreitender Dotterresorption beobachtete. Es wurde zur Erklärung dieser Parallelität angenommen, daß gleichzeitig mit der Resorption des Dotters die Pankreasaktivität einsetzt oder gesteigert wird und daß diese physiologische Funktion für die Epithelzellen mit

<sup>1</sup> Unter Mischkulturen versteht man Explantate aus Organen, die wie diese verschiedene Gewebskomponenten in sich vereinigen. Aus ihnen wachsen in der Gewebekultur zunächst fast immer mehrere Zellarten nebeneinander aus; in unserem Zusammenhange interessieren davon nur der epitheliale und der bindegewebige Anteil. Durch besondere Verfahren kann unter Umständen aus Mischkulturen eine einzige Zellsorte isoliert und dann als sogenannte Reinkultur weitergezüchtet werden.

einem wachstumsbereiten Zustand verknüpft ist (1935). Die Koinzidenz beider Vorgänge wurde von *I. Fischer* und *Ries* durch Vitalfärbungsversuche bestätigt. Ein ähnliches Zusammentreffen von Drüsenfunktion und Wachstumsbereitschaft des Parenchyms wurde von *Francescon* und *Zambelli* für die Milchdrüse im Explantat beschrieben.

#### *Meßmethoden.*

In Reinkulturversuchen kann die Wachstumsgröße genau bestimmt werden. Es stehen dazu die Methoden der Arealmessung und der Mitosenzählung zur Verfügung. Die vorliegenden Versuche wurden mit der Arealmessung ausgeführt.

In letzterer Zeit haben wir in unserem Laboratorium für quantitative Versuche verschiedentlich die Mitosenzählung bevorzugt (*Paulmann, Silva-Lafrentz*). Der Grund liegt nicht etwa in einer Unverlässlichkeit der Arealmessung. Ich halte diese für sehr genau, wenn alle methodischen Voraussetzungen sorgfältig beachtet werden; Parallelversuche von *Paulmann* und mir (unveröffentlicht) mit Mitosenzählung einerseits und Arealmessung andererseits haben auch gute Übereinstimmung ergeben. Der Vorzug der Mitosenzählung als Meßmethode ist vielmehr rein praktischer Art: Die Arealmessung erfordert unter Umständen einen bedeutend größeren Arbeitsaufwand. Wenn nämlich, wie es die Methode verlangt, wirklich nur solche Hälften miteinander verglichen werden, die in Zellform und -größe, Wuchsform der Gesamtkultur und Lagerungsdichtigkeit der Zellen übereinstimmen, sind zahlreiche Versuche nicht anszuwerten, weil sie diese Voraussetzungen nicht erfüllen. Das ist besonders häufig der Fall, wenn beide Hälften unter verschiedenen mechanischen Bedingungen wachsen. Tatsächlich habe ich für verschiedene Versuchsreihen nicht nur die jeweils ausgewerteten 18 Experimente gemacht, sondern häufig ein Vielfaches davon. Demgegenüber hat die Mitosenzählung, wenn sie im einzelnen auch zeitraubender als die Arealmessung ist, den großen Vorteil, daß jeder Versuch als auswertbar gilt, ganz gleich, ob die beiden Kulturhälften in ihrer Wachstumsart übereinstimmen. Allerdings erscheint es mir noch zweifelhaft, ob nicht doch z. B. Lagerungsdichtigkeiten die Mitosenzahl beeinflussen können und also auch hier beim Vergleich von Hälften zu berücksichtigen wären; Anhaltspunkte für solche Zusammenhänge liegen vor (*Gaillard*). Die Grundlagen der Mitosenzählung als Meßmethodik müßten noch kritisch nachgeprüft werden. Für die Arealmessung ist das bereits geschehen (*Edm. Mayer* 1930), und man darf bei sinngemäßer Beobachtung aller ihrer Voraussetzungen die Arealmessung als durchaus zuverlässig betrachten.

Bei den Versuchen mit Mischkulturen muß anders vorgegangen werden. Feststellungen der absoluten Wachstumsgröße durch Arealmessung oder Mitosenzählung haben hier keinen Wert, weil sie nicht, wie bei Reinkulturhälften, auf gleiche Ausgangsvolumina bezogen werden können. Die Voraussetzung für beide Methoden ist ja, daß die in Vergleichsobjekten aufgefundenen Werte von gleich großen und gleich dicken Ausgangsmutterstücken hervorgebracht wurden, was bei gut geteilten Reinkulturen praktisch der Fall ist. Diese Voraussetzung erfüllen frische Explantate niemals, und eine Methode zur Bestimmung der Wachstumsgröße von Mischkulturen fehlt bisher. In meinen Versuchen an Mischkulturen war es nun gar nicht notwendig, die absolute Größe des Epithel- und Bindegewebswachstums zu bestimmen. Hier interessiert allein das

prozentuale Verhältnis, in dem sich beide Gewebsarten an der Bildung der Wachstumszone beteiligen. Dieser Anteil wurde in meinen Versuchen geschätzt und die Kulturen dementsprechend in 4 Kategorien eingeordnet. Diese Methode wird, obwohl sie nur auf Schätzung beruht, hinreichend genau, wenn jede einzelne Kultur schriftlich protokolliert wird und wenn genügend große Zahlen von Kontroll- und Versuchskulturen miteinander verglichen werden. — Auch *Willmer* wendet ein ähnliches Verfahren an und begründet seine Berechtigung (1927).

*Versuchsanordnung und Auswertung.*

Die Versuche an Reinkulturen wurden auf Deckgläsern ausgeführt, und zwar an halbierten Kulturen. Es kam immer je eine Epithel- und eine Fibroblastenhälfte in etwa 0,7 mm Entfernung zusammen auf ein Deckglas. Dabei wurden die Bindegewebshälften im Tropfen, die Epithelkulturen auf dem Tropfen mit Extraktdecke gezüchtet. Die Kontrollhälften wurden im normalen Medium, die Versuchshälften im gleichen Medium mit Zusatz des zu untersuchenden Stoffes gezüchtet; für diese wurde im Kontrollmedium ein Volumausgleich durch *Ringer*-Lösung geschaffen. — Die morphologischen Verhältnisse, also Zellform und -größe, Fettgehalt, Dicke der Wachstumszone und Lagerungsdichtigkeit der Zellen wurden protokolliert und beim Vergleich der Hälften berücksichtigt. — Die Umrisse der Kulturen wurden alle 24—48 Stunden mit dem *Abbé*schen Apparat gezeichnet und die Figuren mit dem Planimeter ausgemessen. Die in den folgenden Tabellen angegebenen Größen sind absolute Werte in  $1/10$  qmm. In jeder Versuchsgruppe wurden die Mittelwerte aller Kontroll- und Versuchshälften bestimmt, der mittlere Fehler des Mittelwertes und der Wert  $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}}$  berechnet. Ist dieser Wert kleiner als 2, so beruht die Differenz der Mittelwerte auf zufälligen Schwankungen des Versuchsmaterials; liegt er zwischen 2 und 3, so ist sie mit Wahrscheinlichkeit nicht auf die normale Streuung, sondern auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen. Das ist mit Sicherheit der Fall, wenn der Wert  $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}}$  größer als 3 ist; die Differenz gilt dann als significant.

Die Berechnung geschah im einzelnen nach folgenden Formeln:

Mittelwert  $M = A + b$  ( $A$  = angenommener Mittelwert).

$$b = \frac{\sum pa}{n}.$$

Streuung  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum pa^2}{n} - b^2}$  ( $a$  = Abweichung jeder Variante vom angenommenen Mittelwert  $A$ ).

Mittlerer Fehler des Mittelwertes  $m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ .

$$\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = \frac{M_a - M_b}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}.$$

Bei den Versuchen an Mischkulturen wurde jeweils ein frisch entnommenes Pankreas in Stückchen zerteilt und diese teilweise im normalen Medium<sup>1</sup>, zum anderen Teil im Versuchsmedium angesetzt. Auch hier enthält das Kontrollmedium an Stelle der Versuchslösung einen Volumausgleich durch *Ringer*-Lösung. Die Pankreaskulturen wurden (mit Ausnahme der Versuchsgruppe 5 C) immer auf dem festen Medium mit Extraktdecke gezüchtet.

*1. Wirkung eines hypertonischen Mediums auf Reinkulturen von Fibroblasten und Irisepithel.*

*Versuchsmedium:* 1 Tr. Plasma + 1 Tr. EE<sub>Versuch</sub>  
*Extraktdecke:* 1 Tr. EE + 1 Tr. EE<sub>Versuch</sub>  
 (EE<sub>Versuch</sub>: 3 EE + 1 NaCl 2,7%)  
*Kontrollmedium:* 1 Tr. Plasma + 1 Tr. EE<sub>Kontrolle</sub>  
*Extraktdecke:* 1 Tr. EE + 1 Tr. EE<sub>Kontrolle</sub>  
 (EE<sub>Kontrolle</sub>: 3 EE + 1 Ringer)

*Morphologische Bemerkungen.* Die Zellen beider Gewebsarten zeigen lebend im hypertonischen Medium meistens ein sehr klares transparentes Cytoplasma, das sich schärfer gegen das Medium abhebt als der trübere Zelleib der im normalen Medium wachsenden Kontrollhälften. Bei den Epithelversuchshälften treten die einzelnen Zellterritorien oft sehr deutlich hervor. Die Fibroblastenkulturen haben im hypertonischen Medium oft etwas schmälere und fettärmere Zellen als ihre normal gezüchteten Schwesternhälften. Zuweilen sind sie aber auch reicher an Körnchen, von denen sich die meisten mit Scharlachrot oder Sudan III färben; dazwischen liegen einzelne Granula, die ungefärbt bleiben. Bemerkenswert ist, daß die Fibroblastenleiber häufig zahlreiche bucklige und halbkugelförmige Ausbuchtungen haben, die auf lebhafte Cytoplasmabewegung im Moment der Fixation hindeuten. Diese Erscheinungen entsprechen morphologisch durchaus dem Wogen und Wallen des Protoplasmas, das an der sich teilenden Zelle vor der Durchschnürung bekannt ist. — An den Epithelkulturen waren solche Veränderungen nur ganz selten und immer nur leicht angedeutet.

*Literatur.* Zusammenstellungen über die Wirkung von Veränderungen des osmotischen Drucks auf Gewebekulturen finden sich z. B. bei *Levi, v. Möllendorff* (1937, 1938) und *Verne*. — Die Arbeiten von *Carrel* und *Burrows, Lambert, Ruth* und *Hogue* (1917) werden häufig als Beleg dafür angeführt, daß leichte Hypotonie das Wachstum begünstigt. Es ist aber zu bemerken, daß diese Untersuchungen noch aus der Zeit stammen, ehe die Umsatztechnik allgemein angewandt wurde. Sie beziehen sich daher nicht auf Reinkulturen und berichten von vermehrter *Zellauswanderung*, z. B. bei Milzkulturen. — Auch nach *Willmer* werden die amöboiden Bewegungen der Zellen durch Hypotonie begünstigt (1927). — *Ebeling* fand in seinen an Reinkulturen ausgeführten Experimenten im hypotonischen Medium gleichfalls eine stärkere Auswanderung, dabei aber kein wirkliche Substanzvermehrung. Hingegen war bei Hypertonie des Mediums die Zellproliferation in den ersten Tagen größer und zugleich dichter; später trat Schädigung ein (1914). — Nach

<sup>1</sup> Als normales Medium gilt 1 Tropfen Hühnerplasma + 1 Tropfen Hühnerembryonalextrakt (= EE).

*Olivo* und *Gomirato* ist die Reaktion des Gewebes auf Veränderungen des osmotischen Druckes je nach dem Entwicklungsgrad, den es *in vivo* erreicht hatte, verschieden. An einem bestimmten Objekt fand er bei Hypotonie des Mediums eine Erhöhung des Mitosekoeffizienten. — *v. Möllendorff* beobachtete sowohl bei Hypo- als auch bei Hypertonie einen schädigenden Einfluß auf die Zellteilung. Und zwar wirkt sich vermehrter Salzgehalt hinderlich auf alle Teilevorgänge der Mitose aus, die mit Quellung verbunden sind; Verringerung des Salzgehaltes hat einen umgekehrten Einfluß (1938). — *Auler* verglich die Wirkungen der Hypertonie auf Epithel- und Bindegewebekulturen. Fibroblasten waren, wie auch in meinen Experimenten, resisterenter dagegen als Epithel. Am wenigsten widerstandsfähig waren Sarkomzellen. — Nach *Jachimsky* läßt sich Benzypyrensarkomgewebe im iso- und hypertonischen, aber nicht im hypotonischen Medium züchten.

Tabelle 1. Wirkung eines hypertonischen Mediums auf Reinkulturen von Irisepithel und Osteoblasten.

Versuchs-Nr.	Irisepithelkulturen		Osteoblastenkulturen		Versuchs-Nr.	Irisepithelkulturen		Osteoblastenkulturen		
	Größe am 4. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		Größe am 3. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm			Größe am 4. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		Größe am 3. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		
	a Kontrollhälften	b Versuchshälften	a Kontrollhälften	b Versuchshälften		a Kontrollhälften	b Versuchshälften	a Kontrollhälften	b Versuchshälften	
6476	25	10	84	68	6481	34	12	152	82	
6293	27	12	76	59	6478	34	29	84	78	
6291	27	24	95	81	6485	26	14	99	89	
6276	36	22	119	138	6480	36	20	122	78	
6279	28	17	81	69	6540	28	18	77	76	
6274	23	14	105	104	6541	20	13	111	109	
6256	33	18	86	96	6442	20	9	131	101	
6258	22	15	72	58	6471	42	34	140	83	

Epithelkulturen:  $M_a = 29$ ;  $m_a = 2$ .  
 $M_b = 18$ ;  $m_b = 2$ .

$$\frac{Diff.}{m_{Diff.}} = 3,9.$$

Osteoblastenkulturen:  $M_a = 102$ ;  $m_a = 6$ .  
 $M_b = 85$ ;  $m_b = 5$ .

$$\frac{Diff.}{m_{Diff.}} = 2,1.$$

*Ergebnis.* Epithelkulturen erfahren in einem hypertonischen Medium eine bedeutend stärkere Wachstumshemmung als Bindegewebekulturen im gleichen Medium. Die Differenz der Wachstumsgrößen von Versuchs- und Kontrollhälften ist bei Epithelkulturen significant, d. h. mit Sicherheit auf die Versuchsbedingungen, also die Hypertonie des Mediums, zurückzuführen ( $\frac{Diff.}{m_{Diff.}} > 3$ ). Bei Bindegewebekulturen ist das mit großer Wahrscheinlichkeit der Fall ( $\frac{Diff.}{m_{Diff.}} > 2, < 3$ ).

In früheren Versuchen wurde gezeigt, daß umgekehrt Hypotonie des Versuchsmediums das Bindegewebewachstum stärker verlangsamt als das des Epithels<sup>1</sup>.

## 2. Wirkung eines Zusatzes von Kaliumrhodanid in isotonischer Lösung auf Reinkulturen von Fibroblasten und Irisepithel.

*Versuchsmedium:* 1 Tr. Plasma + 1 Tr. EE<sub>Versuch</sub>

Extraktdecke: 1 Tr. EE + 1 Tr. EE<sub>Versuch</sub>

(EE<sub>Versuch</sub>: 16 Tr. EE + 1 Tr. KCSN)

*Kontrollmedium:* 1 Tr. Plasma + 1 Tr. EE<sub>Kontrolle</sub>

Extraktdecke: 1 Tr. EE + 1 Tr. EE<sub>Kontrolle</sub>

(EE<sub>Kontrolle</sub>: 16 Tr. EE + 1 Tr. Ringer)

<sup>1</sup> Dtsch. Z. Chir. 242, 655 (1934).

*Morphologische Bemerkungen.* Die Fibroblastenkulturen erreichen im Versuchsmedium bei weitem nicht die Zellagerungsdichtigkeit wie in den Kontrollhälften, denn der wachstumshemmende Einfluß durch die Versuchsbedingungen ist außerordentlich stark. — Diese Ungleichheit in der Wachstumsart muß, da sie eine unmittelbare Folge der Versuchseinflüsse ist, in Kauf genommen werden, obwohl sie den Voraussetzungen der Arealmessung widerspricht. Es ist das sinngemäß auch erlaubt, weil die geringere Dichtigkeit der Wachstumszone eine weitere Bestätigung

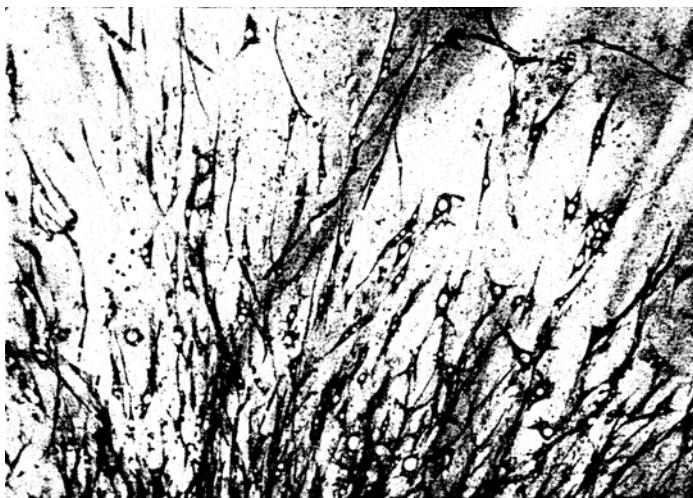


Abb. 1. Fibroblastenkultur mit Zusatz von Rhodankalium.

für die starke Hemmung des Fibroblastenwachstums ist, die auch in den Werten der Arealmessung deutlich zum Ausdruck kommt.

Die Fibroblasten enthalten im Versuchsmedium eine große Zahl kleinerer und besonders auch größerer Granula, die zum großen Teil stark lichtbrechend sind. Durch diese Einlagerungen werden sie viel breiter als die Zellen der Schwesternhälften im normalen Medium. Sie machen immer einen sehr stark geschädigten Eindruck (Abb. 1). — An den Epithelkulturen sind die einzelnen Zellterritorien zuweilen durch feine Spalten getrennt. Auch dort, wo man sie nicht voneinander abgrenzen kann, sind die Kerne meistens in größeren Abständen über das Syncytium verstreut als in den Kontrollhälften (Abb. 2).

Sowohl bei Fibroblasten als auch bei Epithel bestehen also Verschiedenheiten in der Zellgröße zwischen Versuchs- und Kontrollhälften. Es widerspricht das zwar den Voraussetzungen der Meßmethode, ist aber als unmittelbare Folge der Versuchsbedingungen nicht zu vermeiden.

Da die Verschiedenheiten beide Gewebe betreffen, dürften sie das Gesamtergebnis dieser Versuchsreihe auch nicht allzusehr beeinflussen. Sowohl die Wachstumsgröße als auch der Gesundheitszustand zeigen an, daß bei Gegenwart eines stark quellend wirkenden Salzes die Fibroblasten bedeutend stärker geschädigt werden als Epithel.

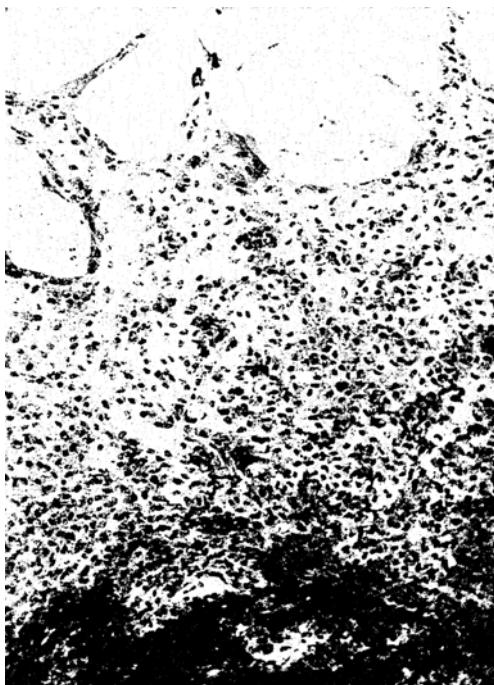


Abb. 2. Epithelkultur mit Zusatz von Rhodankalium. Die Kulturen von Abb. 1 und 2 wachsen seit 3 Tagen zusammen im gleichen Tropfen.

*Literatur.* Cytologische Beobachtungen über die Wirkung von Kalium- und Calciumchlorid werden von *Rumjantzev* mitgeteilt. *Jazimirska-Krontowska* beobachtete, daß Kaliumchlorid das Fibroblastenwachstum stärker hemmt als Calciumchlorid. Der Zelleib wird durch KCl bis zum 2,5fachen vergrößert, durch  $\text{CaCl}_2$  etwas verkleinert. — *Saito* stellte fest, daß Natriumsalicylat bei gleicher molarer Konzentration das Fibroblastenwachstum stärker hemmt als das Epithelwachstum. Auch *Törö* fand bei Zusatz der (stark quellend wirkenden) Salzsäure und Milchsäure zu Darmexplantaten eine Verschiebung des Verhältnisses von Epithel und Bindegewebe, und zwar zugunsten des Epithels. — Alle diese Untersuchungen stehen also mit meinen Versuchsergebnissen in gutem Einklang. Dagegen fand *v. Möllendorff*, allerdings bei nur sehr kurzer Beobachtungsdauer und nicht durchgehend, an seinen Fibrocytenkulturen eine erhebliche Mitosenförderung durch einige mäßig quellend wirkende Salze, dagegen eine Verminderung durch ein entquellend wirkendes Salz (1937).

Tabelle 2. Wirkung eines Zusatzes von Rhodankalium in isotonischer Lösung auf Reinkulturen von Irisepithel und Osteoblasten.

Ver- suchs- Nr.	Irisepithel- kulturen		Osteoblasten- kulturen		Ver- suchs- Nr.	Irisepithel- kulturen		Osteoblasten- kulturen		
	Größe am 4. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		Größe am 3. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm			Größe am 4. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		Größe am 3. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		
	a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften	a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften		a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften	a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften	
6491	32	31	95	38	6455	29	13	164	93	
6492	22	28	104	38	6446	30	29	107	62	
1472	22	21	70	44	6457	44	39	148	71	
1475	33	25	88	41	6460	41	31	117	78	
1412	65	50	117	33	6451	35	22	153	63	
6452	39	24	135	96	6448	20	15	104	58	
6456	42	27	107	57	6489	56	21	77	28	
6458	24	20	142	83	6490	38	25	75	34	

Iriskulturen:  $M_a = 36$ ;  $m_a = 3$ .  
 $M_b = 26$ ;  $m_b = 2$ .

$$\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 2,8.$$

Osteoblastenkulturen:  $M_a = 113$ ;  $m_a = 7$ .  
 $M_b = 57$ ;  $m_b = 5$ .

$$\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 6,5.$$

**Ergebnis.** Der Unterschied in der Wachstumsgröße zwischen Versuchs- und Kontrollhälften geht bei den Epithelkulturen mit großer Wahrscheinlichkeit ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 2, < 3$ ), beim Bindegewebe mit absoluter Sicherheit auf die Versuchsbedingungen zurück ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 6$ ). Die Hemmung, die das Bindegewebewachstum durch Zusatz von Rhodankalium erfährt, ist beträchtlich größer als die des Epithels. Das quellend wirkende Salz ist also besonders für das Bindegewebewachstum ungünstig. — Tabelle 3 zeigt, daß im Gegensatz hierzu ein entquellendes Salz in erster Linie das Epithelwachstum beeinträchtigt.

### 3. Wirkung von Dinatriumphosphat in isotonischer Lösung auf Reinkulturen von Fibroblasten und Irisepithel.

**Versuchsmedium:** 1 Tr. Plasma + 1 Tr. EE<sub>Versuch</sub>

Extraktdecke: 1 Tr. EE + 1 Tr. EE<sub>Versuch</sub>

(EE<sub>Versuch</sub>: 3 Tr. EE + 1 Tr. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

**Kontrollmedium:** 1 Tr. Plasma + 1 Tr. EE<sub>Kontrolle</sub>

Extraktdecke: 1 Tr. EE + 1 Tr. EE<sub>Kontrolle</sub>

(EE<sub>Kontrolle</sub>: 3 Tr. EE + 1 Tr. Ringer)

**Morphologische Bemerkungen.** Die Fibroblasten, besonders der inneren Wachstumszone, sind sehr schmal und haben ein klares, transparentes Cytoplasma, das sich scharf vom umgebenden Medium abhebt. Die äußeren Zellen werden dagegen häufig durch eingelagerte Fetttröpfchen aufgebläht. Auch in dieser Versuchsreihe zeigen viele Fibroblastenleiber das Wogen und Wallen des Cytoplasmas, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie bei den Kulturen im hypertonischen Medium. Die Kulturen (Abb. 3) sind nicht in so gutem Zustand wie die Kontrollen (Abb. 4), aber die Schädigung ist verhältnismäßig gering: alle Kulturen lassen sich im normalen Medium weiterzüchten.

Die Irisepithelkulturen werden viel stärker geschädigt. Am auffallendsten ist die starke Dissoziation der Epithelzellen. Alle Membranen



Abb. 4. Schweißerkulture der Kultur in Abb. 3, in Zusatzreinem Medium.



Abb. 3. Fibroblastenkultur mit Zusatz von Natriumphosphat.

lösen sich fast völlig in ihre Einzelbestandteile auf. Die Zellen runden sich nicht ab, sie bleiben ausgebreitet, aber sie verlassen oft ihre ursprüngliche Ebene und sind durch breite Spalten voneinander getrennt. Das Cytoplasma ist merkwürdig substanzlos und trübe, enthält aber nur

wenige und nur sehr feine Fetttröpfchen (Abb. 5 und 6). — Ungefähr die Hälfte der Mutterstücke (ohne die zu stark geschädigte Wachstumszone) lassen sich in normalem Medium weiterzüchten.

Tabelle 3. Wirkung eines Zusatzes von Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) in isotonischer Lösung auf Reinkulturen von Irisepithel und Osteoblasten.

Ver- suchs- Nr.	Irisepithel- kulturen		Osteoblasten- kulturen		Ver- suchs- Nr.	Irisepithel- kulturen		Osteoblasten- kulturen		
	Größe am 4. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		Größe am 3. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm			Größe am 4. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		Größe am 3. Tag in $\frac{1}{10}$ qmm		
	a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften	a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften		a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften	a Kon- troll- hälften	b Ver- suchs- hälften	
6890	45	26	79	87	6837	69	35	129	121	
6924	27	18	95	67	6839	66	49	154	146	
6925	41	21	73	46	6984	50	24	98	68	
6900	27	20	86	72	6985	34	22	100	98	
6884	51	36	147	131	6986	70	54	92	70	
6891	25	30	72	75	6991	104	62	102	86	
6840	68	51	167	119	6989	84	54	122	96	
6833	39	33	177	149	6987	70	52	96	66	

Irisepithelkulturen:  $M_a = 54$ ;  $m_a = 6$ . Osteoblastenkulturen:  $M_a = 112$ ;  $m_a = 8$ .  
 $M_b = 37$ ;  $m_b = 4$ .  $M_b = 94$ ;  $m_b = 8$ .  
 $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 2,4$ .  $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 1,6$ .

*Ergebnis.* Die Wachstumshemmung infolge des Zusatzes eines entquellenden Salzes ist beim Epithel so stark, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Versuchsbedingungen bezogen werden darf ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 2, < 3$ ). Dagegen wird das Bindegewebswachstum im statistischen Sinne nicht eindeutig geschädigt ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 1, < 2$ ). — Das entquellend wirkende Dinatriumphosphat schafft also die umgekehrten Verhältnisse wie das quellend wirkende Rhodankalium (siehe Tabelle 2).

4. Die Wirkung hypertoner Lösungen und entquellender Salze in isotonischer Lösung auf Mischkulturen<sup>1</sup> (Pankreas des 0—2tägigen Kückens).

Versuchsdauer 3—4 Tage.

Bei der Protokollierung der Versuche wurden die Kulturen nach dem Aufbau ihrer Wachstumszone in 4 Gruppen eingeordnet, nämlich: 1. In der Wachstumszone überwiegt das Bindegewebe. 2. Der bindegewebige Anteil ist ebenso groß wie der epitheliale. 3. Der epitheliale Anteil ist größer. 4. Es wächst nur Epithel. In der folgenden Tabelle 4 sind die ursprünglichen Gruppen 2—4 zusammengefaßt und der ursprünglichen Gruppe 1 gegenübergestellt.

<sup>1</sup> Siehe Fußnote auf S. 103.

*Ergebnis.* Hypertonie und entquellend wirkende Salze haben die gleiche gewebsspezifische Wirkung, sie unterdrücken nämlich das Epithelwachstum weitgehend. Während 70—80% der unbeeinflußten Kulturen vorwiegend epitheliales Wachstum zeigen, wachsen unter dem Einfluß hypertoner Lösungen oder entquellender Salze in isotonischer Lösung 60—95% vorwiegend bindegewebig aus. —

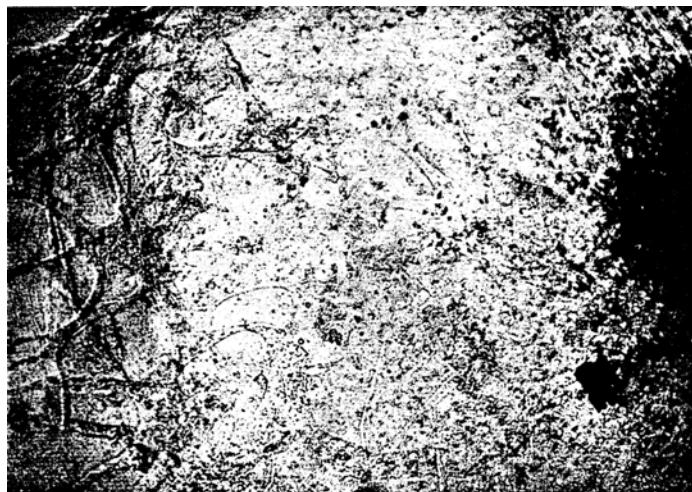


Abb. 6. Schwesternhälfte der Kultur in Abb. 5, in Zusatzreinem Medium. Die Kulturen von Abb. 4 und 5 wachsen seit 4 Tagen zusammen im gleichen Tropfen.

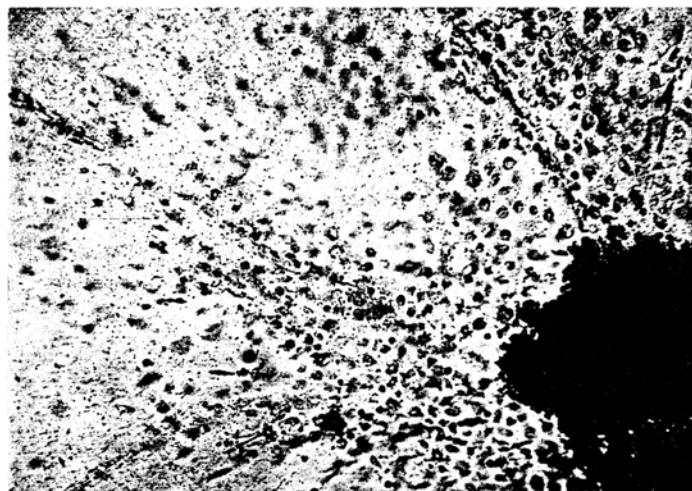


Abb. 5. Epithelkultur mit Zusatz von Natriumphosphat. Die Kulturen von Abb. 3 und 5 wachsen seit 4 Tagen zusammen im gleichen Tropfen.

Hiermit sind meine früheren Befunde zu vergleichen (1933). Dort wurde gezeigt, daß unter dem Einfluß von Hypotonie oder quellend wirkenden Salzen in isotonischer Lösung umgekehrt das Bindegewebswachstum maximal geschädigt wird. — Entgegengesetzte physikalisch-chemische Einflüsse haben also auch an Mischkulturen den entgegengesetzten Gewebeffekt.

Das Medium besteht immer aus 1 Tropfen Plasma und einem Tropfen Versuchs- bzw. Kontrolleextrakt. Der Versuchsextrakt enthielt einen Zusatz des betreffenden Stoffes, der Kontrolleextrakt die gleiche Menge Ringer-Lösung wie unten im einzelnen angegeben. Die Extraktdecke bestand immer aus einem Tropfen unveränderten Extrakt und einem Tropfen Versuchs- bzw. Kontrolleextrakt.

EE<sub>Versuch</sub>: 5 EE + 2 NaCl 1,8% EE<sub>Kontrolle</sub>: 5 EE + 2 Ringer

EE<sub>Versuch</sub>: 3 EE + 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> EE<sub>Kontrolle</sub>: 3 EE + 1 Ringer

EE<sub>Versuch</sub>: 6 EE + 3 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> EE<sub>Kontrolle</sub>: 6 EE + 3 Ringer

Tabelle 4. Wirkung von Hypertonie oder entquellenden Salzen in isotonischer Lösung auf das Verhältnis von Epithel und Bindegewebe in der Wachstumszone von Mischkulturen (Pankreasexplantaten).

Art der Medium- veränderung	In den Kontroll- kulturen		Kontroll- kulturen Gesamt- zahl	In den Versuchs- kulturen		Versuchs- kulturen Gesamt- zahl
	wächst mehr Binde- gewebe bei %	wächst ebensoviel oder mehr Epithel bei %		wächst mehr Binde- gewebe bei %	wächst ebensoviel oder mehr Epithel bei %	
Hypertonie . . .	29	71	165	67	33	154
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . .	27	73	197	94	6	189
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . .	21	79	124	62	38	114

Auch der Einfluß entquellender Salze und hypertonischer Lösungen auf Mischkulturen wurde von mir früher schon einmal untersucht (1933). Damals stellte ich fest, daß diese Faktoren „keine Anreicherung des Epithelwachstums zur Folge haben und also insofern nur wie unspezifische isotonische Verdünnungen des Mediums wirken“. Das ist aber nicht so zu verstehen, als ob das Epithel- und Bindegewebswachstum durch sie überhaupt nicht in spezifischer Weise beeinflußt würde. Diese Frage konnte an dem damaligen Versuchsstoff, dem vorwiegend bindegewebig wachsenden Pankreas des Huhnenembryos, gar nicht in Angriff genommen werden (s. „Material“ S. 103); daran war nur festzustellen, daß Hypertonie und entquellende Salze nicht etwa ebenso wie Hypotonie oder quellende Salze wirken. Jetzt (Tabelle 4) wurde darüber hinaus bewiesen, daß sie den gegenteiligen Effekt mit sich bringen.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß Hypertonie und entquellende Salze das Epithelwachstum maximal schädigen und daß im Gegensatz dazu Hypotonie und quellende Salze in erster Linie das Bindegewebswachstum beeinträchtigen. Diese Feststellung bezieht sich sowohl auf Reinkulturen als auch auf Mischkulturen. Eine gewisse Verschiedenheit besteht allerdings im Ergebnis dieser beiden Versuchsanordnungen. Ich halte sie zwar für meine eigentliche Fragestellung nicht von grundsätzlicher Bedeutung, muß aber kurz darauf eingehen, worin sie besteht und wie ich sie mir erkläre.

Im Reinkulturversuch erfahren immer *beide* Gewebe eine Hemmung, und zwar ist diese, wie schon beschrieben, je nach dem Charakter der physikalisch-chemischen Veränderung an dem einen oder dem anderen Gewebe ausgeprägter. Reinkulturen von Epithel werden stärker als Bindegewebe durch Hypertonie oder entquellende

Salze geschädigt; Reinkulturen von Bindegewebe dagegen erfahren durch Hypotonie oder quellende Salze eine stärkere Wachstumsverlangsamung als Epithel. Im Mischkulturversuch beschränkt sich diese Wachstumsverlangsamung auf die im Reinkulturversuch stärker gehemmte Gewebssorte. Die andere ist zwar zuweilen auch nicht in bester Gesundheit, wird aber im Wachstumstempo nicht betroffen: sie wächst weder langsamer noch schneller. Aber sie proliferiert reichlicher als in den Kontrollen. Denn die Stellen der Wachstumszone, die bei unbeeinflußten Kulturen vom anderen Partner eingenommen werden, bleiben im Versuchsmedium, in dem dieser Partner nur spärlich gedeihen kann, nicht leer; sie werden mehr oder weniger vollständig auch noch von der wachstumsfähigen Zellsorte besetzt. In gemischtgewebigen Kulturen verbindet sich also mit der starken Bindegewebshemmung durch oberflächenaktive und quellende Stoffe oder hypotonische Lösungen ein reichlicheres Epithelwachstum, und umgekehrt tritt gleichzeitig mit der hochgradigen Epithelunterdrückung durch hypertonische Lösungen und entquellende Salze ein reichlicheres Bindegewebswachstum auf. — Ich glaube nicht mehr, daß dieses reichlichere Wachstum auf eine direkte fördernde Wirkung durch den lahmegelegten Partner zurückzuführen ist. Es hängt wohl damit zusammen, daß frische Explantate weniger empfindlich sind als Reinkulturen, was häufig beschrieben wurde. Diese größere Resistenz mag dazu führen, daß die im Reinkulturversuch weniger gehemmte Gewebssorte im frischen Explantat ungestört wächst und höchstens in ihrer Gesundheit betroffen wird. Ich habe früher schon auseinandergesetzt, daß diese Zusammenhänge vorläufig nur vermutungsweise deutet werden können, weil die technischen Voraussetzungen für eine experimentelle Klärung noch nicht bestehen (1934).

Für mein eigentliches Thema halte ich die beschriebene Differenz zwischen Rein- und Mischkulturversuchen nicht für wesentlich. Wenn man Untersuchungen an Gewebekulturen als Modellversuche für die Verhältnisse *in vivo* gelten läßt, so dürfen die Besonderheiten, die wohl allein auf Eigentümlichkeiten der Gewebe- kultur zurückgehen, als belanglos vernachlässigt werden.

*5. Die Wirkung besonderer mechanischer Züchtungsbedingungen auf Reinkulturen von Fibroblasten und Irisepithel und auf frische Explantate aus dem Pankreas.*

Von Orzechowski, Heubner und Orzechowski und von v. Möllendorff wurde bezweifelt, daß die gewebsspezifischen Einflüsse der von mir untersuchten Faktoren durch direkte Einwirkung auf die Zellen zustande kommen. Der beobachtete Unterschied im Wachstum beider Zellarten beruht nach Heubner und Orzechowski lediglich auf ihrer verschiedenen Reaktionsfähigkeit gegenüber Veränderungen, die der Zusatz meiner Versuchslösungen zum Züchtungsmedium in dessen mechanischer Struktur hervorruft. Sie erinnern an die „alte gewebezüchterische Erfahrung, daß Fibroblasten nur beim Haften an gewissen geformten Oberflächen wachsen und ihr Wachstumstempo von diesen Formen abhängt“. In geronnenem Blutplasma wären die entstehenden Fibrinfäden solche Formen. Deren Dichte und Straffheit würde durch Verdünnung des Gerinnungs- ansatzes (Hypotonie) abgeschwächt, und auch ein Einfluß quellungs- begünstigender Salzionen im gleichen Sinne wäre leicht verständlich. Die Wirkung der oberflächenaktiven Stoffe soll damit zusammenhängen, daß diese wahrscheinlich gerade an denjenigen Grenzflächen, an denen sich die Ausläufer der Fibroblasten festhafteten, einen monomolekularen

Überzug bilden, der ihnen einen stofflich andersartigen Charakter gibt. „Durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung ist dem Fibroblasten die Möglichkeit genommen, eine langgestreckte spindelige Gestalt anzunehmen, wenn nicht überhaupt an der Grenzfläche eine narkotische Konzentration herrscht. Der Weg, auf dem das Wachstum der Fibroblasten erfolgt, ist jedenfalls versperrt. Die in membranösen Verbänden wachsenden Epithelzellen bedürfen der Leitschienen des Fibrinfadens nicht. Für sie besteht die Möglichkeit, in abgerundeter Zellform zu wachsen.“

Gegen diese Auffassungen ist nun Verschiedenes einzuwenden.

Zunächst ist die Deutung, die *Heubner* und *Orzechowski* meinen Hypotonieversuchen geben, dadurch gegenstandslos, daß auch bei Kontrollkulturen (wie auch in den betreffenden Arbeiten angegeben ist) der Gerinnungsansatz im gleichen Maße, nur unter Aufrechterhaltung der Isotonie, verdünnt wurde; es wurde ja ein Volumausgleich durch *Ringer*-Lösung geschaffen.

Ferner ist dieser Auffassung ganz allgemein entgegenzuhalten, daß ihr Anschauungen zugrunde liegen, die lange umstritten waren und jetzt wohl als widerlegt angesehen werden dürfen. Die Frage, ob im Plasmagerinnsel Fibrinfäden vorhanden sind, wird seit 1919 diskutiert (*Levi* S. 238). Im Gegensatz zu den alten Vorstellungen vom Fibrinschwamm geht aus neueren Untersuchungen *Howells* hervor, daß das Plasma normalerweise in Form eines krystallinischen Gels und ohne sichtbare Struktur gerinnt. Die Fibrinfäden sind äußerst winzig, unterhalb des Auflösungsvermögens nicht nur des Mikroskops, sondern auch des Ultramikroskops. Sie können also schon wegen der Differenz der Größenordnungen den auswandernden Zellen nicht als Stütze oder Leitschienen dienen (*Großfeld* 1934).

Warum aber die Struktur des Plasmagerinnsels nur für die Fibroblasten von so vitaler Bedeutung sein soll, daß sich daraus meine Versuchsergebnisse erklären lassen, erscheint etwas willkürlich. Die Arbeiten *Großfelds*, die *Heubner* und *Orzechowski* in diesem Zusammenhang zitieren, wurden nicht mit quantitativen Methoden und nicht in vergleichenden Untersuchungen an Epithel<sup>1</sup> und Bindegewebe unternommen und geben infolgedessen auch keine genügende Basis für diese Anschauungen. Es ist der Überzeugung dieser beiden Verfasser auch die gegenteilige Meinung von *A. Fischer* gegenüberzustellen, daß nämlich Wachstum und Vermehrung gerade bei Epithelzellen mehr von mechanischen Faktoren abzuhängen scheint als bei Fibroblasten (1930, S. 177 f.). Quantitative

<sup>1</sup> Was *Großfeld* in seiner Arbeit als Epithel bezeichnet, ist nicht Epithel im histologischen Sinne, wie er selbst betont (1933). Diese Feststellung befindet sich im Einklang mit dem Urteil verschiedener erfahrener Gewebezüchter (*G. Levi, Demuth* 1933, *Des Ligneris*).

Experimente zu diesem Thema liegen aber auch von *A. Fischer* nicht vor; ich habe sie ausgeführt und gehe weiter unten darauf ein.

Auch *v. Möllendorff* (1397a) zweifelt, ob der in meinen Experimenten beobachtete Wachstumseffekt auf zellspezifische Einflüsse zurückgeht. Nach seiner Meinung sollen vielleicht quellende Einflüsse auf das Medium die Hauptrolle spielen, da ja Epithelmembranen auch noch im verflüssigten Medium wachsen, ja teilweise sogar selbst verflüssigten, während eine Plasmaverflüssigung für Fibroblasten ein ernstes Wachstumshindernis bedeutete.

Gegen die letzte Behauptung ist nur kurz an die Tatsache zu erinnern, daß in den letzten Jahren von rein flüssigen Medien gerade dann gerne Gebrauch gemacht wird, wenn monatelange oder jahrelange Fibroblastenzüchtung beabsichtigt (und erreicht) wird (*Parker, Des Ligneris, Hogue*). Fibroblasten finden genau wie Epithelzellen unter solchen Verhältnissen einen hinreichenden Halt am Deckglase. Wenn die Solidität des Plasma-gerinnsels für das Fibroblastenwachstum wirklich von so vitaler Bedeutung wäre, wie es als Dogma aus den Anfangszeiten der Gewebezüchtung überliefert wird, so bestände aller Grund, die Züchtung in rein flüssigem Medium zu vermeiden.

Darüber hinaus vermag ich *v. Möllendorff* auch sonst nicht zu folgen. Er selbst hat ja genau die gleichen Substanzgruppen wie ich studiert, und zwar in ihrer Einwirkung auf die Mitose von Fibroblastenkulturen. Dabei fand er so spezifische Veränderungen, daß er daraus eine Theorie über den Mechanismus der Mitose abzuleiten vermochte. Wenn dabei, wie er es für seine Experimente in Anspruch nimmt, die zugesetzten Substanzen direkt auf die Zellen einwirken, so ist nicht einzusehen, warum dasselbe nicht auch für meine Experimente gültig sein soll. Allerdings war unsere Methodik verschieden. *v. Möllendorff* fügte zu der in normalem Medium gewachsenen Kultur die Versuchslösungen in den Hohlschliff des Objektträgers hinzu. Die Substanz diffundierte durch das Gerinnsel und wirkte auf die Zellen ein. In meinen Experimenten wurde die Versuchslösung dem Plasma-Extrakt-Medium vor der Gerinnung zugesetzt, beeinflußte also — was nicht zu bestreiten ist — möglicherweise dessen Gerinnungsvorgang, kam dann aber während der ganzen Versuchsdauer von mehreren Tagen in ständigen Kontakt mit den in das Medium vordringenden und es aktiv verflüssigenden Zellen. Und es besteht kaum eine Möglichkeit, wie die von *v. Möllendorff* in ganz kurzfristigen Versuchen festgestellte direkte Einwirkung auf die Zellen in meinen verhältnismäßig langfristigen Experimenten ausbleiben sollte, zumal er ja selbst nicht glaubt, daß die Versuchssubstanzen restlos im Plasmagel adsorbiert werden. Das Argument, was er für seine Versuche zugunsten einer direkten Einwirkung auf die Zellen anführt, kann ich jedenfalls im vollen Umfange auch für meine Experimente in Anspruch nehmen, „daß nämlich mit allen Substanzen schädigende Wirkungen

hervorgerufen werden konnten, die zum Teil sich sehr wohl auf die Wirkung der Substanzen und nicht etwa auf uncharakteristische Allgemeinschädigungen beziehen lassen". Entsprechende morphologische Veränderungen der Zellen wurden ja auch von mir kurz beschrieben und vorher schon von *Demuth* (1931) und neuestens von *Rumjanizew* in quantitativen Experimenten festgestellt. *Demuth* kommt denn auch auf Grund seiner Messungen von Zellkern und Zelleib zu dem Schluß, daß, abgesehen von der Beeinflussung des Mediums durch die zugesetzten Substanzen, auch eine direkte Einwirkung auf die Zellen erfolgt.

Obwohl ich glaube, die Deutungsversuche von *Orzechowski*, *Heubner* und v. *Möllendorff* schon durch diese Hinweise weitgehend entkräftet zu haben, erschienen mir die von diesen Verfassern herangezogenen Zusammenhänge doch noch aus allgemeineren Gründen einer experimentellen Untersuchung wert. Denn Behauptungen über die Bedeutung der mechanischen Struktur des Nährbodens für das Wachstum findet man in der gewebezüchterischen Literatur und darüber hinaus gelegentlich allgemeiner Abhandlungen über das Wachstum außerordentlich häufig und meistens in so vorbehaltloser Darstellung, als ob es sich um gesicherte Tatsachen handelte. Das darüber vorliegende gewebezüchterische Material rechtfertigt jedoch keineswegs eine solche Wiedergabe. Quantitativ auswertbare Experimente wurden dazu nur ganz vereinzelt angestellt (*Ebeling*, *Leri*, *Willmer*, s. S. 129—130). Im allgemeinen basiert allerdings die Behauptung, daß die mechanischen Faktoren des Nährmediums für das Wachstumstempo von Gewebekulturen von großer Bedeutung sind, gar nicht auf diesen quantitativen Experimenten, sondern auf den aus den Anfangszeiten der Gewebezüchtung stammenden Versuchen, in denen alle möglichen Gerüstsubstanzen, wie Spinnweben, Glaswolle, Baumwollfäden usw. ausprobiert wurden. Bei der Erwähnung dieser Experimente wird gewöhnlich übersehen, daß ein regelmäßiges, *meßbares* Wachstum in diesen Versuchen überhaupt nicht bestand; es kann darum aus ihnen auch nichts über die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von mechanischen Faktoren abgeleitet werden. Diese Untersuchungen wurden ferner nur an Fibroblasten ausgeführt, dagegen nicht auch vergleichsweise an Epithelzellen; infolgedessen darf daraus auch nicht geschlossen werden, daß das Stützgerüst für die Fibroblasten von vitalerer Bedeutung als für Epithelzellen wäre. Aus diesen Anfangsexperimenten folgt einzig und allein die Tatsache, daß eine Zellauswanderung nicht frei in das flüssige Medium erfolgt, sondern entlang irgendeinem soliden Halt. — Dieser braucht keine fädige Struktur zu haben; die Oberfläche des Deckglases wie auch die des Explantates selbst ist dazu *für Fibroblasten ebensogut wie auch für Epithelzellen geeignet*. — Diese Versuche dürfen weiterhin nicht dazu herangezogen werden, den Wachstumsvorgang im Plasmagerinnsel zu erklären, denn es gibt darin kein grobes

Fibringerüst, das den Wattefäden usw. irgendwie vergleichbar wäre (*Edm. Mayer* 1933).

Auch die bekannten Versuche von *Weiß* werden oft fälschlicherweise als Kronzeugen dafür angeführt, daß die mechanische Spannung die Wachstumsgeschwindigkeit begünstige. Das ist nicht bewiesen, weil das Material nicht daraufhin untersucht wurde (*Levi* S. 245). Ähnliche Experimente wurden von *Diggeli* unter ausdrücklicher Berücksichtigung dieser Zusammenhänge ausgeführt. Er stellt eine bevorzugte Proliferation in den Hauptspannungsrichtungen, jedoch ohne *Mitosenvermehrung*, fest.

Die größte Verwirrung über die tatsächliche Bedeutung mechanischer Faktoren für das Wachstum von Gewebekulturen geht wohl aber auf die mißverstandene sogenannte Oberflächenmethode für Epithel nach *A. Fischer* zurück. Als es *A. Fischer* 1922 erstmalig gelang, Epithel, und zwar Irisepithel, in Rein- und Dauerkulturen zu züchten, wich er in einer Kleinigkeit von der Technik der Fibroblastenzüchtung ab: Er ließ das Medium gerinnen, setzte die Kultur (und zwar erst in späteren Passagen!) auf die feste Oberfläche und bedeckte sie mit einer Spur Extrakt. Seitdem gilt es als feststehende Lehre, daß Epithel besser oder gar ausschließlich auf der Oberfläche wächst. Die Analogie zu der Eigenschaft des Epithels, *in vivo* Oberflächen zu bekleiden, hat sicherlich zu dem Mißverständnis beigetragen. Denn *A. Fischer* beschreibt ganz richtig nur Verschiedenheiten in der *Form* (nicht in der Wachstumsgeschwindigkeit) von Zellen und Gesamtkulturen, je nachdem ob diese in oder auf dem Gerinnsel wachsen. Tatsächlich ist diese erste Möglichkeit, Epithel rein und dauernd zu kultivieren, nicht der Oberflächenmethode, sondern allein der glücklichen Wahl des Ausgangsmaterials zu verdanken. Es hat nämlich vor allen anderen bisher untersuchten epithelhaltigen Explantaten den technisch ungeheuer großen Vorteil, daß daraus von vornherein reines Epithel wächst und daß dieses das Medium nicht stärker verflüssigt als Fibroblasten, so daß eine Dauenzüchtung nicht in Frage gestellt wird. Von der Züchtung in oder auf dem Gerinnsel ist dieser Erfolg völlig unabhängig. Ich habe mich mit aller Sicherheit davon überzeugt, daß man dasselbe Objekt, Irisepithel vom 8—9tägigen Hühnerembryo, genau so gut im Tropfen wie auf dem Tropfen züchten kann und dabei Rein- und Dauerkulturen erhält (Experimenteller Teil, 5 D, S. 131). Beeinflußt wird davon lediglich die Form von Zellen und Gesamtkultur, und auch das nur in gewissem Grade und nicht durchgehend, was mit den Angaben von *A. Fischer* u. a. (*Fischer* und *Ebeling*, *Demuth*, *Winnikow*) übereinstimmt.

Da keine systematischen Untersuchungen in der Literatur vorliegen, die das Verhältnis von Mediumkonsistenz und Wachstumsgeschwindigkeit klären, bin ich dieser Frage in eigenen Experimenten nachgegangen. Ich untersuchte die für mich wichtigsten Fragen, also ob es wirklich mechanische Bedingungen gibt, die für Bindegewebswachstum günstig,

für Epithel aber ungünstig sind, und ferner, ob die Dichtigkeit des Gerinnsels etwas mit der Wachstumsgeschwindigkeit zu tun hat.

Für die erste Teilfrage liegt es nahe, Bindegewebeskulturen den Züchtungsbedingungen zu unterwerfen, die für Epithel als optimal gelten, und umgekehrt. Es wurden also Experimente an halbierten Reinkulturen ausgeführt, von denen die eine Hälfte auf die dem Gewebe „natürliche“, die andere auf die ihm „fremde“ Art wuchs. Von beiden Reihen von Hälften wurden die Wachstumsgrößen und deren Mittelwerte bestimmt und die Differenz der Mittelwerte mit dem Verfahren der statistischen Fehlerrechnung auf Significanz geprüft. Zum Vergleich wurde festgestellt, wie groß die Differenz der Mittelwerte wird, wenn beide Hälften unter gleichen Bedingungen wachsen, und zwar entweder unter den für diese Gewebsart angeblich mechanisch günstigen oder aber unter den angeblich mechanisch ungünstigen Verhältnissen. Als „natürlich“ bzw. „mechanisch günstig“ galt dabei für Bindegewebeskulturen die Züchtung im Gerinnsel, für Epithel auf dem steifen Medium mit Extraktdecke: als fremd bzw. mechanisch ungünstig die für das andere Gewebe günstige Züchtungsart. So ergaben sich 6 Versuchsreihen, nämlich je 3 an Epithel und 3 an Bindegewebsreinkulturen, und zwar jeweils folgende Kombinationen: Beide Hälften wachsen im Gerinnsel; beide werden auf den Tropfen gesetzt und mit Extraktdecke bedeckt; die eine Hälfte wird auf die erste Art, ihre Schwesterhälfte auf die andere Art gezüchtet. — In keiner dieser 6 Versuchsreihen ergab sich eine significante Differenz  $\left( \frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} < 2 \right)$  (s. Tabelle 5—7, 9—11 und 13).

Die Verdünnung des Gerinnungsansatzes spielt zwar, wie schon auseinandergesetzt, für die Auswertung meiner eigenen Experimente keine Rolle, weil sie stets Versuchs- und Kontrollkulturen in gleicher Weise betraf. Doch ist es im Rahmen der allgemeinen Frage nach der Auswirkung mechanischer Wachstumsbedingungen interessant, festzustellen, ob die Wachstumsgeschwindigkeit von der Dichtigkeit des Gerinnsels abhängt. Deshalb wurde von Reinkulturen die eine Hälfte in Nativplasma, die Schwesterhälfte im gleichen Plasma nach Verdünnung mit *Ringer*-Lösung 1:1 gezüchtet. Auch dabei ergab sich sowohl an Epithel- als auch an Bindegewebeskulturen keine significante Differenz der Mittelwerte, obwohl die Hälften unter so verschiedenen mechanischen Bedingungen wuchsen (s. Tabelle 8, 12 und 13).

Schließlich berücksichtigte ich noch die Möglichkeit, daß sich Wachstumsschwierigkeiten infolge ungeeigneter mechanischer Kulturbedingungen erst bei längerer Einwirkung herausstellen könnten. Es wurde schon berichtet, daß Epithelkulturen mit dem gleichen Dauererfolg im Tropfen gezüchtet werden können wie üblicherweise auf dem Tropfen. Entsprechendes gilt für Bindegewebe. Fibroblastenkulturen gedeihen ganz normal, auch wenn man sie auf den Tropfen setzt und mit Extrakt

bedeckt. Von beiden Geweben züchtete ich je zwei Stämme über etwa 2 Monate, und zwar wurde je einer von Anfang an, der andere erst nach der 6. Passage der ungewöhnlichen Züchtungsbedingung unterworfen (Experimenteller Teil 5 D, S. 130—132).

Aus diesen Experimenten ergibt sich eindeutig, daß die oft behaupteten Zusammenhänge zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und mechanischer Struktur des Nährbodens, wenn überhaupt, höchstens in Sonderfällen Gültigkeit haben können. Es ist auf Grund meiner Experimente natürlich nicht auszuschließen, daß es irgendwelche mechanischen Bedingungen gibt, die auf das Wachstumstempo tatsächlich einen Einfluß haben; aber solche Bedingungen müßten erst experimentell nachgewiesen werden. In der allgemeingültigen Art, wie es oft behauptet wird, besteht sicherlich keine Abhängigkeit beider Faktoren voneinander.

Vor allen Dingen haben diese Experimente auch *keinerlei Unterschied in der Reaktion von Epithel und Bindegewebe auf verschiedene mechanische Bedingungen ergeben*. Auch hierfür gilt, wie für alle negativen Feststellungen, selbstverständlich die obige Einschränkung. Solange aber solche Bedingungen nicht experimentell aufgedeckt sind, verdient mein Befund Berücksichtigung, daß die Wachstumsgeschwindigkeiten von Epithel und Bindegewebe in gleicher Weise von mechanischen Bedingungen unabhängig sind.

Diese Feststellungen erscheinen mir allgemein für die Gewebezüchtung von Bedeutung, darüber hinaus aber auch für die Auswertung meiner oben dargestellten Befunde. Es darf danach behauptet werden, daß *die verschiedene Reaktion von Epithel und Bindegewebe auf bestimmte physikalisch-chemische Bedingungen in einer diesen beiden Zellarten innerwohnenden spezifischen Empfindlichkeit gegen diese begründet ist*.

#### *Versuchsprotokolle zu 5.*

Alle Experimente wurden als Deckglasversuche an halbierten Reinkulturen ausgeführt. Das Medium war mit Ausnahme der in Tabelle 8 und 12 dargestellten Experimente für Versuchs- und Kontrollhälften quantitativ und qualitativ gleich; es bestand jeweils aus einem Tropfen Plasma und einem Tropfen Extrakt. Bei Züchtung im Gerinnsel wurden die Kulturen, gleichgültig ob Fibroblasten oder Epithel, in den Plasmatropfen gesetzt, dann wurde Extrakt zugefügt und umgerührt. Bei Züchtung auf dem Medium wurden Plasma und Extrakt ohne Kultur gemischt und erst, nachdem das Medium völlig steif, nicht mehr fadenziehend, sondern schneidbar geworden war, die Kultur darauf gesetzt. Sie wurde, gleichgültig ob sie aus Epithel oder Bindegewebe bestand, mit einer dünnen Schicht Extrakt bedeckt.

#### *A. Fibroblastenkulturen.*

a) Beide Hälften wachsen auf verschiedenen Deckgläsern im Tropfen. Die am 3. Tag größere Hälfte wird a genannt.

Tabelle 5. Beide Hälften von Fibroblastenreinkulturen wachsen im Gerinnsel.

Versuchsdauer 3 Tage.

Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm		Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm	
			a	b				a	b
431	Gefäße	13	116	92	2594	Osteoblasten	28	108	93
486	"	14	235	221	2595	"	28	116	116
557	"	17	128	120	572	Gefäße	19	177	162
558	"	17	158	144	2177	Osteoblasten	21	110	93
1843	"	16	115	101	1839	Gefäße	16	101	79
1842	"	16	114	92	2415	Herz	35	90	81
1841	"	16	105	77	588	Gefäße	20	248	170
1840	"	16	155	119	589	"	19	189	179
2597	Herz	39	103	73	591	"	20	196	175

$$\frac{M_a = 142; m_a = 11.}{M_b = 122; m_b = 10.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 1,3.$$

*Ergebnis.* Schwesterhälften, die beide im Gerinnsel wachsen, zeigen, wie zu erwarten, in ihrer Wachstumsgröße keine nennenswerte Differenz. Die vorhandenen Unterschiede gehen auf die allen biologischen Objekten innewohnende spontane Streuung zurück ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 1, < 2$ ).

b) Beide Hälften wachsen auf verschiedenen Deckgläsern auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke. Die am 3. Tag größere Hälfte wird a genannt.

Tabelle 6. Beide Hälften von Fibroblastenreinkulturen wachsen auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke.

Versuchsdauer 3 Tage.

Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm		Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm	
			a	b				a	b
2718	Herz	41	124	93	2054	Herz	17	129	121
2719	"	41	110	107	2055	"	17	106	104
2721	"	41	87	87	2056	Gefäße	16	107	70
2720	"	41	79	73	2058	"	16	93	91
592	Gefäße	20	183	179	434	"	13	140	134
593	"	20	178	158	433	"	13	187	164
594	"	20	203	165	597	"	20	172	152
596	"	20	218	187	556	"	17	159	136
2053	Herz	16	131	128	555	"	17	104	88

$$\frac{M_a = 139; m_a = 10.}{M_b = 124; m_b = 9.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 1,2.$$

*Ergebnis.* Auch hierfür trifft das zu Tabelle 5 Gesagte zu. ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 1, < 2$ ).

c) Eine Hälfte wächst im Gerinnsel; sie wird a genannt. Die andere Hälfte wird auf den Tropfen gesetzt und mit Extraktdecke versehen; sie heißt b.

Tabelle 7. Von Fibroblastenreinkulturen wächst eine Hälfte (a) im Gerinnsel, die andere Hälfte auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke. Versuchsdauer 3 Tage.

Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm		Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm	
			a	b				a	b
5513	Gefäße	18	83	108	1716	Osteoblasten	12	116	112
5511	"	18	78	93	554	Gefäße	17	129	132
5508	"	18	135	172	574	"	19	165	174
1698	"	11	101	98	1721	Osteoblasten	12	138	110
1705	"	11	101	95	1717	"	12	82	106
1699	"	11	75	86	1710	Herz	13	103	98
1709	"	13	78	88	1719	Osteoblasten	12	135	118
1703	"	14	88	83	1720	"	12	140	90
1713	Osteoblasten	12	91	95	1699	Gefäße	11	75	86

$$M_a = 106; m_a = 6. \quad \frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} = 0,3.$$

$$M_b = 108; m_b = 6.$$

*Ergebnis.* Obwohl beide Hälften unter verschiedenen mechanischen Bedingungen wachsen, sind ihre Wachstumsunterschiede nicht größer, als es der normalen Streuung biologischer Objekte entspricht ( $\frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} < 1$ ).

d) In dieser Versuchsreihe ist das Medium für beide Hälften quantitativ gleich, aber qualitativ verschieden. Die a-Hälften bekommen 1 Tropfen Plasma + 1 Tropfen Extrakt. Für die b-Hälften wurde daselbe Plasma mit Ringer-Lösung 1:1 verdünnt; von dieser Verdünnung wird jeweils 1 Tropfen mit 1 Tropfen Extrakt gemischt. Beide Hälften wachsen im Gerinnsel.

Tabelle 8. Von Fibroblastenkulturen wächst eine Hälfte (b) in einem Medium, bei dem das Plasma zur Hälfte mit Ringer verdünnt wurde. Versuchsdauer 3 Tage.

Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm		Ver- suchs- Nr.	Gewebe	Pas- sage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm	
			a	b				a	b
1855	Osteoblasten	12	77	102	5847	Gefäße	29	145	145
2162	"	21	85	93	5848	"	29	168	170
1860	Gefäße	24	93	81	5862	"	29	90	137
1859	"	24	97	123	5855	"	29	119	136
1858	"	24	84	91	5867	"	29	122	94
1857	"	24	112	134	5870	"	29	111	131
2164	Osteoblasten	21	104	102	5872	"	29	156	168
2165	"	21	99	112	5873	"	29	168	155
2011	Gefäße	29	76	96	5874	"	29	131	136

$$M_a = 113; m_a = 7. \quad \frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} = 1,1.$$

$$M_b = 123; m_b = 6.$$

*Ergebnis.* Sogar unter diesen in mechanischer Hinsicht recht unterschiedlichen Bedingungen sind die Wachstumsdifferenzen von Schwesterhälften nicht größer als die normale Streuung biologischer Objekte. ( $\frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} > 1, < 2$ ).

Tabelle 7 und 8 haben also ergeben, daß solche Unterschiede in den mechanischen Züchtungsbedingungen, wie sie in der gewebezüchterischen Praxis tatsächlich vorkommen, auf die Wachstumsgröße von Bindegewebeskulturen keinen Einfluß haben. Die entstehenden Differenzen sind nicht größer als die Streuung von Schwesterhälften unter gleichen mechanischen Bedingungen (Tabelle 5 und 6).

### B. Irisepithelkulturen.

a) Beide Hälften wachsen auf verschiedenen Deckgläsern im Gerinnsel. Die am 4. Tag größere wird a genannt.

Tabelle 9. Beide Hälften von Irisepithelkulturen wachsen im Gerinnsel.

Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm		Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm	
		a	b			a	b
1907	10	56	52	720	20	64	62
1824	14	53	51	5168	11	43	39
1825	14	66	57	6971	14	59	57
690	21	66	57	6770	12	83	78
721	20	57	48	6968	14	51	43
5167	11	42	39	6964	14	34	32
2528	21	64	64	6963	14	55	55
2531	21	55	58	6962	14	77	74
1906	10	67	61	1944	17	41	36

$$\frac{M_a = 57; m_a = 3.}{M_b = 53; m_b = 3.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} = 1.$$

*Ergebnis.* Ebenso wie Bindegewebeskulturen (Tabelle 5 und 6) zeigen Epithel Schwesterhälften unter gleichen mechanischen Bedingungen, wie zu erwarten, nur die Wachstumsunterschiede, die in statistischem Sinne als normale Streuung biologischer Objekte anzusehen sind  $\left( \frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} = 1 \right)$ .

b) Beide Hälften wachsen auf verschiedenen Deckgläsern auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke. Die am 4. Tag größere wird a genannt.

Tabelle 10. Beide Hälften von Irisepithelkulturen wachsen auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke.  
Versuchsdauer 4 Tage.

Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm		Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\frac{1}{10}$ qmm	
		a	b			a	b
500	17	87	59	2478	22	67	64
637	17	28	26	1913	10	60	60
640	17	32	30	1834	14	70	59
639	17	35	29	1833	14	62	49
1939	17	58	53	1829	14	45	32
1909	10	80	75	1830	14	85	70
1911	10	64	60	1850	37	53	38
2534	21	64	62	1940	17	53	46
724	19	71	49	1852	15	33	31

$$\frac{M_a = 58; m_a = 4.}{M_b = 50; m_b = 4.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} = 1,3.$$

*Ergebnis.* Das zu Tabelle 9 Gesagte trifft auch hier zu.  $\left( \frac{\text{Diff.}}{m \text{Diff.}} > 1, < 2 \right)$ .

c) Die a-Hälften wachsen im Gerinnsel, die b-Hälften auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke.

Tabelle 11. Von Irisepithelkulturen wächst eine Hälfte (a) im Gerinnsel, die andere (b) auf dem Gerinnsel mit Extraktdecke.  
Versuchsdauer 4 Tage.

Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\mu_{10}$ qmm		Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\mu_{10}$ qmm	
		a	b			a	b
3984	15	30	28	1734	11	41	50
3920	12	25	29	1935	10	52	55
1733	11	32	38	1923	17	31	51
425	15	45	50	1722	11	38	65
426	15	31	52	1725	11	30	28
498	14	52	62	6261	15	65	44
579	25	40	33	6263	15	53	54
726	22	56	47	6264	15	61	56
1938	39	28	33	6265	15	38	43

$$\frac{M_a = 42; m_a = 3.}{M_b = 45; m_b = 3.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 0.7.$$

*Ergebnis.* Genau so wenig wie bei Bindegewebeskulturen (s. Tabelle 7) rufen verschiedene mechanische Züchtungsbedingungen an Epithelschwesterhälften Wachstumsunterschiede hervor, die über die normale Streuung biologischer Objekte hinausgehen ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} < 1$ ).

d) In dieser Versuchsreihe ist, wie bei Tabelle 8, das Medium für beide Hälften quantitativ gleich, aber qualitativ verschieden; die b-Hälften wachsen in einem durch *Ringer*-Lösung auf die Hälfte verdünnten Plasma. Beide Hälften wurden auf dem Tropfen mit Extraktdecke gezüchtet.

Tabelle 12. Von Irisepithelkulturen wächst eine Hälfte (b) auf einem Medium, in dem das Plasma zur Hälfte mit *Ringer* verdünnt wurde.  
Versuchsdauer 4 Tage.

Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\mu_{10}$ qmm		Versuchs-Nr.	Passage	Größe in $\mu_{10}$ qmm	
		a	b			a	b
1845	15	54	41	5164	11	58	55
1847	15	54	69	5128	11	66	64
1838	11	58	46	4868	11	86	77
1837	11	118	96	4798	10	127	92
1836	11	58	59	4797	9	98	76
1819	14	70	63	4799	10	103	81
1817	14	62	67	4803	10	59	72
4166	18	44	46	1762	12	41	40
4212	20	51	67	1848	37	40	37

$$\frac{M_a = 69; m_a = 6.}{M_b = 64; m_b = 4.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} = 0.7.$$

*Ergebnis.* Das für Tabelle 11 Gesagte trifft auch hier zu. ( $\frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} < 1$ ).

Tabelle 13. Zusammenstellung der Werte  $\frac{\text{Diff.}}{\text{mDiff.}}$  aus den Tabellen 5-12.

Gewebe	Züchtungsart in bezug auf das Gefüsse	Diff. mDiff.	Bemerkungen
Fibroblasten	im/im	1.3	a ist immer die am 3. Tag größere Hälfte
	auf/auf	1.2	
	im/auf	0.3	a ist immer die am 3. Tag größere Hälfte
	Plasma	1.1	
	— 2 —	— 2 —	
Epithel	im/im	1	a ist immer die am 4. Tag größere Hälfte
	auf/auf	1.3	
	im/auf	0.7	a ist immer die am 4. Tag größere Hälfte
	Plasma	0.7	
	— 2 —	— 2 —	

In Tabelle 13 werden der Übersichtlichkeit wegen die Werte für  $\frac{\text{Diff.}}{\text{mDiff.}}$  noch einmal zusammengestellt. Es zeigt sich ganz eindeutig, daß die in diesem Abschnitt untersuchten verschiedenen mechanischen Züchtungsbedingungen keine signifikante Differenz der Wachstumsgrößen verursachen.

Vielleicht könnte es auf den ersten Blick überraschen, daß die Werte für  $\frac{\text{Diff.}}{\text{mDiff.}}$  gerade in den Experimenten am größten sind, in denen beide Hälften unter denselben mechanischen Bedingungen wachsen. Der Grund liegt aber in der Art der tabellarischen Zusammenstellung: Da beide Kulturhälften unter gleichen Verhältnissen gezüchtet wurden, war kein äußerer Grund vorhanden, welche Hälften als a-Hälften und welche als b-Hälften bei der Errechnung der Mittelwerte einander zugeordnet werden sollten. Es wurde, wie angegeben, in diesen Versuchsreihen so verfahren, daß jeweils die am 3. bzw. 4. Tag größere a genannt wurde. Auf diese Weise setzen sich die Mittelwerte einmal (bei a) aus allen größeren und das andere Mal (bei b) aus allen kleineren Hälften zusammen, und die Differenz beider Mittelwerte wird damit notwendigerweise maximal groß. In den anderen Versuchsreihen wuchs eine Hälfte unter normalen (a), die andere Hälfte unter Versuchsbedingungen, und damit war von vornherein festgelegt, welche Hälften bei der Bestimmung der Mittelwerte zueinander gehörten. Da die mechanischen Verhältnisse, wie sich ergeben hat, auf die Wachstumsgröße keinen entscheidenden Einfluß haben, finden sich sowohl unter den Kontroll- (a) als auch unter den Versuchshälften (b) jeweils ein Teil kleinerer und ein Teil größerer Kulturen. Die Differenz zwischen ihnen wird damit notwendigerweise kleiner, als wenn jeder Mittelwert aus einer Gruppe von Extremen gebildet wird.

*C. Pankreasexplantate.*

Frisch entnommenes Pankreas von Küken, die vor 0—2 Tagen geschlüpft waren, wurde in Stückchen zerteilt und ein Teil im Tropfen nach Art von Fibroblastenkulturen, der andere Teil auf dem Gerinnsel nach dem für Epithel üblichen Verfahren gezüchtet. Das Medium war für beide Gruppen quantitativ und qualitativ gleich, es bestand aus 1 Tropfen Plasma und 1 Tropfen Extrakt: nur bekommen die auf dem Gerinnsel wachsenden Explantate die übliche Decke aus Extrakt. Die untersuchten 437 im Gerinnsel bzw. 426 auf dem Gerinnsel wachsenden Kulturen stammen aus dem Pankreas von 7 Küken. Wie in Tabelle 4 wurden auch in der folgenden Tabelle 14 die ursprünglich im Protokoll vorhandenen Gruppen 2—4 zusammengefaßt und der ursprünglichen Gruppe 1 gegenübergestellt.

Tabelle 14. Wirkung der Züchtung im Gerinnsel oder auf dem Gerinnsel auf das Verhältnis von Epithel und Bindegewebe in der Wachstumszone von Pankreasexplantaten.

Bei den im Gerinnsel wachsenden Kulturen besteht die Wachstumszone	Gesamtzahl der im Gerinnsel wachsenden Kulturen	Bei den auf dem Gerinnsel wachsenden Kulturen besteht die Wachstumszone		Gesamtzahl der auf dem Gerinnsel wachsenden Kulturen			
		überwiegend aus Fibroblasten bei	aus ebensoviel oder mehr Epithel bei				
überwiegend aus Fibroblasten bei	aus ebensoviel oder mehr Epithel bei	68 %	32 %	437	58 %	42 %	426

*Ergebnis.* Auch auf die Wachstumsart von Mischkulturen haben verschiedene mechanische Züchtungsbedingungen keinen nennenswerten Einfluß: Von den untersuchten Pankreasexplantaten wachsen bei Züchtung im Gerinnsel 68 %, bei Züchtung auf dem Gerinnsel 58 % vorwiegend bindegewebig.

**Morphologische Bemerkungen.**

Die Kulturen wurden nach den — meistens mit Eisenhämatoxylin *Heidenhain* und oft auch mit Scharlachrot — gefärbten Präparaten protokolliert.

*1. Fibroblasten.*

Keine der beiden Züchtungsarten in oder auf dem Gerinnsel hat charakteristische Formen für die Gesamtkultur oder für die einzelnen Zellen. Vielschichtigkeit entsteht sowohl bei Züchtung in als auch auf dem Medium. Die beiden Hauptwachstumsarten, nämlich netzförmige Verflechtungen von Zellsträngen oder scheinbar unverbundenes Über-einanderlagern vorwiegend zweidimensional wachsender Zellschichten gibt es hier wie da. Spindelförmige, an den Polen zugespitzte, durch Ausläufer zusammenhängende Zellen oder syncytiale Bänder aus einreihig angeordneten Zellen mit schmalen Spalten zwischen ihren Längsseiten sind weder für die eine noch für die andere Züchtungsart charakteristisch. Der Fetttröpfchengehalt ist bald bei Züchtung im Medium, bald beim Wachstum an der Oberfläche größer.

Nur für die im halbverdünnten Plasma wachsenden Kulturen bestehen einige Eigentümlichkeiten, die aber auch nicht ganz durchgehend auftreten: Die Zellen sind hier meistens schmal, an den Polen deutlich zugespitzt und in verschiedenen Schichten netzartig miteinander verflochten. Die feinen Spalten zwischen ihnen, die aus zellfreiem Medium bestehen, werden dadurch etwas breiter. Es verändert sich also nur die Zellbreite, nicht die Zellagerungsdichtigkeit. Häufig aber ist die Wachstumszone der in verdünntem Plasma gezüchteten Hälften weniger dicht, d. h. weniger zellreich und zugleich breiter als die der Kontrollen. Solche Hälften dürfen nicht miteinander verglichen werden. Gerade dieser Umstand macht es sehr mühsam, eine genügende Anzahl gleichartig wachsender und damit für die Arealmessung geeigneter Kulturen zu bekommen. — Auf den Fetttröpfchengehalt hat die Verdünnung des Plasmas keinen gleichmäßigen Einfluß, was allerdings nicht in Einklang mit den Befunden von *Willmer* steht (1933).

Wenn ich also bei Fibroblasten keine charakteristische Wuchsform für die eine oder andere Züchtungsart feststellen konnte, so sind die mechanischen Züchtungsbedingungen doch keineswegs ohne Einfluß auf die Morphologie von Zellen und Gesamtkultur. Wenn nämlich zwei Schwesternhälften unter verschiedenen Verhältnissen wachsen, so reagieren sie darauf oft ganz verschieden, ihre Variabilität ist viel größer als wenn ihnen die gleichen mechanischen Verhältnisse zur Verfügung stehen. Danach sind bei Fibroblasten bestimmte Zell- und Gesamtwuchsformen weder an ein bestimmtes Züchtungsverfahren noch an eine bestimmte Kultur gebunden. Sie ergeben sich als Reaktion der in der Kultur liegenden Formmöglichkeiten auf ihre äußeren Lebensumstände.

Für die Arealmessung hat das praktische Konsequenzen. Es ist ein sehr großer Aufwand an Experimenten notwendig, bis sich eine Reihe von Kulturen zusammenfindet, *in denen beide Hälften trotz verschiedener mechanischer Bedingungen vergleichbar wachsen*. Auf gleiche Wuchsform durfte aber in dieser Versuchsreihe bei Anwendung der Arealmessung nicht verzichtet werden. Denn hier sind verschiedene Wuchsformen zwar häufige, aber nicht zwingend notwendige Folgen der Versuchsbedingungen. Die Variabilität ist größer, aber die eine oder andere Wuchsform ist nicht gesetzmäßig an eine bestimmte Züchtungsart gebunden. Hingegen ist in den in Tabelle 2 dargestellten Experimenten die äußerst lockere spärliche Wachstumsart der sichtlich geschädigten Fibroblasten eine zwingende Folge der Versuchseinflüsse, des zugesetzten Rhodankaliums, und als solche auf keinen Fall zu vermeiden.

#### *Epithelkulturen.*

Ich stimme mit *A. Fischer* darin überein, daß die physikalischen Züchtungsverhältnisse für die Wuchsform von Epithel bedeutungsvoller sind als für die von Fibroblasten. Während für Bindegewebskulturen

nur festgestellt werden konnte, daß die Variabilität bei Hälften unter verschiedenen mechanischen Bedingungen größer wird, bestehen bei Epithelkulturen doch Wuchsformen, die für das eine oder andere Züchtungsverfahren ziemlich charakteristisch sind. So findet man das typische pflasterepithelartige Aussehen der Kulturen mit nahezu rund oder oval begrenzter Peripherie besonders häufig bei Züchtung auf dem Tropfen (Abb. 2). Die Zellterritorien sind von schwankender Größe, die rundlichen Kerne liegen verschieden dicht, sehr kernarme Bezirke existieren neben solchen, in denen sich eine wahre Brut von Kernen drängt. Auch die Kerngrößen sind recht veränderlich. — Werden die Epithelkulturen im Gezinnsel gezüchtet, so sind sie meistens kleiner, aber sehr dick. Entweder liegen mehrere gleichförmige Zellagen übereinander und lösen sich an der Peripherie in dicke Kolben und Zapfen auf (Abb. 7), oder es wachsen außer einer membranösen Schicht viele Zungen über- und durcheinander. Die Kerne sind nicht selten radiär zur Gesamtkultur gestellt, oval, manchmal sogar schmal länglich, die Zellen sind häufig nicht pflasterepithelartig, sondern gestreckt vieleckig (wenn auch nur ganz selten wirklich spindelig, wie so häufig in der Literatur behauptet wird). Kerne und Zellen sind ziemlich einheitlich mittelgroß. — Diese Eigentümlichkeiten sind zwar nicht mit ausnahmsloser Regelmäßigkeit an die eine oder andere Züchtungsart gebunden, ergeben sich aber doch bei Vergleich größerer Reihen als Durchschnittsbilder. — Hinsichtlich des Fetttröpfchengehaltes konnte ich keine regelmäßigen Besonderheiten feststellen.

Bezüglich der Konsequenzen für die Arealmessung gilt das für Fibroblastenkulturen Gesagte.

*Literatur.* Quantitative Untersuchungen über die Zusammenhänge von Nährboden und Wachstumsgröße liegen nur sehr spärlich vor. *Ebeling* sah bei isotonischer



Abb. 7. Häufige Wuchsform von Epithelkulturen, die im Tropfen wachsen.

Verdünnung des Mediums eine größere, aber weniger dichte Wachstumszone ohne wirkliche Massenzunahme des neugebildeten Gewebes (1914). — *Levi* berichtet allerdings, daß auch die Mitosenzahl im isotonisch verdünnten Medium erhöht sein kann, doch wäre das nur in geringem Grade und nicht regelmäßig der Fall. — *Willmer* stellte keinen Einfluß auf die Zellteilungszahlen fest, wenn bei konstanter Gesamtmediummenge und gleichem Extraktgehalt der Plasmaanteil durch Tyrodebeigabe variiert wurde (1933). — *Fischers* Beschreibung, daß Epithelkulturen im Gerinnsel mit röhrenförmigem Typ nur sehr spärlich wachsen, ist nicht als quantitative Angabe zu werten<sup>1</sup>. Auch er beobachtete, daß bei längerer Züchtung im Gerinnsel ein sehr intensives und regelmäßiges Wachstum einsetzen kann.

Die wenigen in der Literatur vorliegenden quantitativen Untersuchungen stehen also mit meinen Untersuchungsbefunden im Einklang: Die besprochenen mechanischen Bedingungen haben keine Wirkung auf die Wachstumsgröße.

Andererseits zeigen vielerlei Beobachtungen, wie leicht Form und Anordnung der Zellen von äußeren Faktoren beeinflußt werden.

Schon *Uhlenhuth* hat das für die Froschhaut beschrieben. — Daß die Lage der einzelnen Zellschichten in bezug auf das Medium den Aufbau der Gesamtultur formt, zeigte *Edmund Mayer* für Fibroblasten (1933) und *Robinsow* für Epithelkulturen. — Auf *Ebrüing* und *A. Fischer* geht die Angabe zurück, daß Irisepithelzellen bei Züchtung im Gerinnsel länglich werden, ohne ihren Epithelcharakter zu verlieren (1922). *Ebeling* (1925) und *Demuth* (1933) dehnten diese Feststellung auf Schilddrüsenepithelzellen aus. *Winnikow* sah allerdings keinen direkten Zusammenhang zwischen Explantationsbedingungen und dieser oder jener Struktur der Wachstumszone. Aber auch *Jablonksi* fand bei verschiedenen Züchtungsverfahren ein Vorwiegen von bestimmten Wuchsformen. Nach ihm ändert sich die Flinstruktur der Epithelzellen, ihre Form und ihr gegenseitiges Verhältnis mit den äußeren Bedingungen. — *Großfeld* hat sogar angegeben, daß ein teils festes, teils flüssiges Medium zur getrennten Herauszüchtung verschiedener Gewebe aus ein- und demselben Explantat dienen kann (1931, 1933). Dabei deckt sich sein Begriff Epithel zwar nicht mit dem der Histologie (s. S. 116), seine Experimente zeigen aber sehr anschaulich, wie sehr die Zellen durch die physikalischen Faktoren ihrer Umgebung geformt werden. — Auch *Düggeli* beschreibt, wie die Zellform durch ihr Lageverhältnis zum Medium beeinflußt wird.

Somit besteht fast allgemeine Übereinstimmung darin, daß enge Beziehungen zwischen Mediumkonsistenz und Zell- und Wuchsform bestehen. Auch meine Experimente sprechen in diesem Sinne.

#### *D. Fortgesetzte Züchtung von Fibroblastenkulturen auf dem Gerinnsel und von Epithelkulturen im Gerinnsel.*

Ich züchtete einen Fibroblastenstamm aus den großen Herzgefäßern und hielt ihn von Beginn bis zur 22. Passage auf dem Tropfen mit Extraktdecke. Ebenso behandelte ich einen Osteoblastenstamm von der 6. bis 22. Passage. Beide Stämme wuchsen genau so gut wie Fibroblasten im Gerinnsel. Der erste Stamm neigte etwas dazu, daß die Kulturen klein und dick blieben, weil sich ihre Mutterstücke nicht so sehr durch spontanes

<sup>1</sup> Denn seine Abb. 83 zeigt, daß es sich in diesem Falle nicht um gesunde, kräftige Kulturen handelte.

Auseinanderweichen des Gewebes abflachen wie bei Züchtung im Tropfen. Man muß das beim Teilen der Kulturen berücksichtigen, es ergeben sich daraus aber keinerlei Schwierigkeiten für die Dauerzüchtung. Abgesehen von dieser Eigentümlichkeit war dieser Stamm und ebenso der Osteoblastenstamm nicht von normal gezüchteten Stämmen zu unterscheiden. Es ist besonders zu betonen, daß beide Bindegewebsstämme nicht im geringsten epithelialartiges Aussehen annahmen. Die Zellen flachten sich nicht ab; sie waren bei Gefäßfibroblasten manchmal schmal, manchmal breiter und wuchsen deutlich netzartig. Die Zellen des Osteoblastenstammes waren immer schmal und regelmäßig radiär gelagert, wie es für diese Art von Kulturen charakteristisch ist (Abb. 8).

Ferner züchtete ich einen Irisepithelstamm von Beginn bis zur 12. Passage und einen anderen von der 5. bis zur 25. Passage im Gerinnsel. Die Kulturen waren gewöhnlich gedrungen, vielschichtig und lösten sich am Rande in breite Zungen und kolbenartige Ausläufer auf (Abb. 9). Zuweilen bestand die ganze Kultur aus netzartig verflochtenen Epithelbändern und -zungen. Membranöses Wachstum mit typischer Mosaiklagerung der Zellen (s. Abb. 2) war seltener als bei Züchtung auf dem Tropfen und blieb dann niemals einschichtig. Zellgrenzen waren — wie bei Züchtung auf dem Tropfen — nicht immer zu erkennen. Die runden oder ovalen Kerne lagen oft ohne besondere Ausrichtung, oder sie reihten sich auch radiär zur Gesamtkultur aneinander. Statt zusammenhängender Membranen bildeten in höheren Passagen manchmal nur breite nebeneinanderliegende Epithelbänder die Wachstumszone. Es kam auch vor, daß diese Bänder in sich wieder durch feinste Spalten zwischen den Zellängsreihen aufgesplittet wurden, wobei die Zellen mit denen benachbarter Längsreihen nirgends durch Zellausläufer in Kontakt



Abb. 8. Fibroblastenkultur 15 Passagen auf dem Tropfen mit Extraktdecke gezüchtet.

traten. Auch dann blieb der Epithelcharakter fast immer einwandfrei erhalten; nur einzelne Bezirke können, wenn man sie nicht im Zusammenhang mit der übrigen Kultur sieht, gelegentlich zweifelhafter Natur sein. — Diese Aufsplittung zusammenhängender Membranen tritt allerdings zuweilen auch bei anhaltender Züchtung auf dem Gerinnsel auf, immerhin ist sie bei längerer Züchtung im Tropfen häufiger. Die Wachstumsintensität wird durch fortgesetzte Züchtung im Tropfen nicht beeinflußt.



Abb. 9. Epithelkultur 16 Passagen im Tropfen gezüchtet.

Epithelwachstum stärker schädigt als das Bindegewebswachstum. Die Gegenwart eines stark quellenden Salzes beeinträchtigt ferner das Bindegewebswachstum viel stärker als das Epithel, während umgekehrt entquellende Salze das Epithelwachstum weitgehend hemmen, während sie für das Bindegewebswachstum fast indifferent sind. Diese Feststellungen beziehen sich sowohl auf Reinkulturen als auch auf Mischkulturen. Im Gegensatz zur Auffassung anderer Forscher wird die Ansicht aufrechterhalten, daß die erhobenen Befunde nicht dadurch zustande kommen, daß durch die Versuchssubstanzen einzig und allein die physikalischen Verhältnisse des Züchtungsmediums verändert und damit für die eine oder die andere Gewebsart mechanisch günstigere Wachstumsmöglichkeiten geschaffen werden. Aus der Literatur ergibt sich lediglich, daß

#### Zusammenfassung des experimentellen Teiles.

In Bestätigung früherer Untersuchungen hat sich ergeben, daß die beiden Zellarten Epithel und Bindegewebe auf eine voneinander verschiedene Weise beeinflußbar sind.

Physikalisch-chemische Veränderungen, die das Wachstum des einen Gewebes sehr stark beeinträchtigen, sind für das andere weniger schädlich. In Ergänzung früherer Versuche über den Einfluß der Hypotonie auf das Wachstum von Gewebekulturen wird jetzt nachgewiesen, daß Hypertonie des Nährmediums das

die mechanischen Züchtungsbedingungen einen starken Einfluß auf die *Wuchsform* haben; ihre Auswirkung auf die *Wachstumsgroße* wurde bisher nicht systematisch untersucht. In eigenen umfangreichen Experimenten werden diese Zusammenhänge quantitativ nachgeprüft. Es ergibt sich, daß Schwesterhälften von Reinkulturen oder Mischkulturen aus ein und demselben Ausgangsobjekt unter verschiedenen mechanischen Züchtungsbedingungen lediglich solche Unterschiede in ihrer Wachstumsgroße haben, wie sie allen biologischen Objekten als normale Streuung eigentlich ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Unterstützung dieser Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet.

### Literatur.

- Albrecht, Eugen:* Verh. dtsch. path. Ges. 1904. — *Alfejew:* Z. mikrosk.-anat. Forsch. 20, 373 (1930). — *Aschoff:* Erg. Path. 1, 255 (1895). — *Auter:* Z. Krebsforsch. 44, 332 (1936). — *Bauer, K.:* Erg. Biol. 16, 336 (1939). — *Benda:* Erg. Path. 1, 565 (1895). — *Bender:* Dtsch. Z. Chir. 70, 316 (1903). — *Beneke:* Festschrift für Orth. 1903, S. 570. — *Bentley:* J. of Anat. 70, 498 (1936). — *Borst:* Die Lehre von den Geschwülsten, Bd. 2, S. 514. Wiesbaden 1902. Schweiz. med. Wschr. 1938 I, 811. — *Bullock and Rohdenburg:* J. med. Res. 33, 53 (1915). — *Carrel and Burrows:* J. of exper. Med. 13, 562 (1911). — *Denehut:* Arch. exper. Zellforsch. 13, 329 (1933). — Verh. dtsch. path. Ges. 1931, 98. — *Des Ligneris:* Arch. exper. Zellforsch. 18, 450 (1936). — *Doljanski u. Roulet:* Virchows Arch. 292, 256 (1934). — *Drew:* Brit. J. exper. Path. 4, 46 (1923). — *Düggeli:* Z. Zellforsch. 26, 351 (1937). — *Ebeling:* J. of exper. Med. 20, 130 (1914); 41, 337 (1925). — *Ebeling and Fischer:* J. of exper. Med. 36, 285 (1922). — *Fischel, A.:* Roux' Arch. 30, 34 (1910). — Vorträge und Aufsätze über Entwicklungsmechanik der Organismen, Heft 16. Leipzig 1912. — *Roux' Arch.* 41, 312 (1915). — Lehrbuch der Entwicklung des Menschen. Berlin-Wien 1929. — *Fischer, A.:* J. of exper. Med. 35, 367 (1922). — Gewebezüchtung. München 1930. — *Fischer, J. u. Ries:* Arch. exper. Zellforsch. 18, 280 (1936). — *Flint:* Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1903, 61. — *Francescon et Zambelli:* Bull. Assoc. Anatomistes 28, 316 (1933). — *Gaillard:* Protoplasma (Berl.) 24, 384 (1936). — *Großfeld:* Arch. exper. Zellforsch. 11, 648 (1931). — Z. Krebsforsch. 39, 36 (1933). — Arch. exper. Zellforsch. 16, 317 (1934). — *Gurwitsch:* Die histologischen Grundlagen der Biologie. Jena 1930. — *Haeckel:* Arch. klin. Chir. 47, 274 (1894). — *Heidenhain, M.:* Roux' Arch. 49, 1 (1921). — *Herzheimer:* Gewebsmißbildungen. In Schwalbe: Morphologie der Mißbildungen des Menschen und der Tiere, Bd. 3. 1909. — *Heubner u. Orzechowski:* Z. Krebsforsch. 43, 284 (1936). — *Hogue:* J. of exper. Med. 30, 617 (1917). — Anat. Rec. 67, 521 (1937). — *Holtfreter:* Arch. exper. Zellforsch. 23, 169 (1939). — Roux' Arch. 139, 110 u. 227 (1939). — *Hueck:* Naturwiss. 1923, 141. — *Jablonski:* Archives de Biol. 49, 251 (1938). — *Jachinsky:* Arch. exper. Zellforsch. 23, 68 (1939). — *Jazimirsk-Krontowska:* C. r. Soc. Biol. Paris 103, 1182 (1930). — *Josselin de Jongh:* Schweiz. med. Wschr. 1935 I, 197. — *Katzenstein u. Knaake:* Z. Krebsforsch. 33, 378 (1931). — *Knaake:* Arch. exper. Zellforsch. 14, 611, 616 (1933). — Dtsch. Z. Chir. 242, 655 (1934). — Z. Zellforsch. 22, 754 (1935). — Z. Krebsforsch. 42, 329 (1935). — *Kromayer:* Roux' Arch. 8, 253 (1899). — *Kühn:* Angew. Chem. 1939, 309. — *Lambert:* J. of exper. Med. 19, 398 (1914). — *Leri, G.:* Explantation. Erg. Anat. 31, 125 (1934). — *Lewis and*

*Lewis*: In General Cytology, herausgeg. von *Cowdry*, p. 449. Chicago 1924. — *Löwenkron*: Z. Anat. **93**, 370 (1930). — *Maurer, H.*: Anat. Anz., Erg.-H. zu **87**, 388 (1938). — *Maximow*: Virchows Arch. **256**, 813 (1925). — *Mayer, Edm.*: Arch. exper. Zellforsch. **10**, 221 (1930). — *Roux' Arch.* **130**, 382 (1933). — *Merkel*: Epithelium. Erg. Anat. **18**, 21 (1908). — *Meyer, Robert*: Erg. Path. **15**, 607 (1911). — *Mitsuda*: Virchows Arch. **242**, 310 (1923). — *Möllendorff, W. v.*: Arch. exper. Zellforsch. **19**, 263 (1937); **21**, 1 (1937a). — Z. Zellforsch. **28**, 512 (1938). — Jkurse ärztl. Fortbild., Januar 1938, 1. — Arch. exper. Zellforsch. **22**, 3 (1938). — *Möller, A.*: Virchows Arch. **291**, 478 (1933). — *Olivo u. Gomirato*: Zit. nach *Leri*. — *Orzechowski*: Arch. exper. Zellforsch. **15**, 61 (1934). — Arch. f. exper. Path. **178**, 229 (1939). — *Parker*: J. of exper. Med. **64**, 121 (1936). — *Paulmann*: Arch. exper. Zellforsch. **20**, 253 (1937). — *Ribbert*: Allgemeine Geschwulstlehre. Bonn 1904. — Das Carcinom des Menschen. Bonn 1911. — *Robinow*: Protoplasma (Berl.) **27**, 86 (1936). — *Rössle*: Wachstum der Zellen und Organe. Hypertrophie und Atrophie. In Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. **14/1**, S. 903. 1926. — *Roux*: Virchows Arch. **209**, 168 (1912). — *Rumjantzev*: C. r. Acad. Sci. U. R. S. S. **20**, 627 (1938). — *Ruth*: J. of exper. Med. **13**, 559 (1911). — *Saito*: Fol. pharmacol. jap. **20**, 79 (1935). — *Schimmelbusch*: Arch. klin. Chir. **44**, 102 (1892). — *Schmidt, J.*: Virchows Arch. **291**, 491 (1933). — *Schürmann, Pflüger u. Norrenbrock*: Die Histogenese ekto-mesodermaler Mischgeschwülste der Mundhöhle. Ein Beitrag zur Frage der Organisatorenwirkung (*Spannann*) beim pathologischen Wachstum. Leipzig 1931. — *Silva-Lajrentz*: Z. Krebsforsch. **48**, 532 (1939). — *Steiner*: Virchows Arch. **149**, 307 (1897). — *Stockard*: Amer. J. Anat. **28**, 115 (1920). — *Törö*: Arch. exper. Zellforsch. **9**, 285 (1930). — *Uhlenhuth*: J. of exper. Med. **20**, 614 (1914); **22**, 76 (1915). — *Verne*: La vie cellulaire hors de l'organisme. Paris 1937. — *Weiß*: Roux' Arch. **116**, 438 (1929). — *Willmer*: Brit. J. exper. Biol. **4**, 280 (1927). — J. of exper. Biol. **10**, 317 (1933). — *Tissue culture*. London 1935. — *Winnikow*: Arch. exper. Zellforsch. **19**, 53 (1936).