

(Aus der Abteilung für Zellforschung [Dr. *H. Vollmar*] des Forschungsinstituts für Chemotherapie zu Frankfurt a. M. [Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *Otto*.])

## Über die Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber verschiedenen Schädigungen.

(Zugleich ein Beitrag zur Frage der Lebensfähigkeit des Mumiengewebes.)

Von

Dr. Hildegard Vollmar.

Mit 25 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 3. April 1941.)

Der Einfluß von besonderen Versuchsbedingungen (von verschiedenen Substanzen oder äußeren Einwirkungen) auf den Organismus bzw. das lebende Gewebe beruht letzten Endes auf der Ansprechbarkeit oder der Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber diesen Einwirkungen, d. h. auf seiner Reaktionsfähigkeit.

Eine Methode, die uns Einblick in das Leben der Zellen und Gewebe unter verschiedenen Versuchsbedingungen bietet, besitzen wir in der Methode der Gewebezüchtung.

Eine Gewebekultur gibt *mit Sicherheit* darüber Aufschluß, ob das Gewebe lebt oder nicht; sie läßt einwandfrei erkennen, ob bzw. wie weit die Kultur geschädigt ist, ob einzelne Zellen der Kultur noch lebensfähig sind, während andere es nicht mehr sind, ob sich die Zellen nach einer Schädigung wieder erholen oder nicht — all dies ist in der Kultur nicht nur mit Sicherheit, sondern auch mit Leichtigkeit zu verfolgen. Das Leben der Zelle in der Kultur vollzieht sich eben in *allen* Äußerungen des Lebens, die die Zelle besitzt, vor allem in ihrer Fähigkeit, sich zu vermehren, in ihrer Gestaltung und Beweglichkeit, — Äußerungen, die ohne weiteres bei direkter und fortlaufender Beobachtung der Kultur, eventuell außerdem mit dem Film wahrzunehmen sind.

In den letzten Jahren, namentlich im vergangenen Jahr, ist nun eine Reihe von Veröffentlichungen von *Busse-Gräwitz* erschienen, die sich mit der Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber verschiedenen Schädigungen befassen und die *zur Prüfung der Widerstandsfähigkeit eine neue Methode: die Kultur der Gewebe in Citratblut und -plasma angeben*.

In diesem Zusammenhang berichtet *Busse-Gräwitz* auch über das „Leben der Mumie nach 5000 Jahren“ und beweist das „Leben“ mit dem Vorhandensein, bzw. dem Auftreten von Chromatinschollen in verschiedenen Stadien und Formen<sup>1, 2</sup>.

Es fragt sich nun, ob aus dem Auftreten und den Formveränderungen solcher Chromatinschollen, wie sie *Busse-Gravitz* auch an anderen Untersuchungsobjekten, z. B. implantierten Hornhäuten beschreibt, auf Reaktionen *im Sinne von Lebenserscheinungen* geschlossen werden kann. Das Erhaltensein von Chromatinsubstanz, sowohl bei Eintrocknung (wie sie bei der Mumie vorliegt), wie Fixierung durch Hitze oder eiweißfällende Stoffe (Formol, Sublimat) ist nicht überraschend und ist bekannt. Es ist ja die Voraussetzung jeder histologischen Technik. Veränderungen dieser Chromatinmassen bei irgendwelchen Einwirkungen in erwärmten Lösungen oder im Blutplasma, durch welche Quellungen oder andere chemische oder physikalische Änderungen ausgelöst werden können, beweisen jedoch noch keine Lebensvorgänge. Solche Lebenserscheinungen, die oft physikalisch-chemischen Reaktionen täuschend ähnlich sein können, sind aus den Untersuchungen über flüssige Krystalle auch an unbelebten Stoffen hinlänglich bekannt.

Leider wird in der erwähnten Arbeit von *Busse-Gravitz* nicht angegeben, mit welcher Methode die Entwicklung der „schwach gefärbten Chromatin-Granula zu großen, blasigen Kernen, die Gewebe um sich herum differenzieren“<sup>1</sup>, fortlaufend verfolgt wurde; wiedergegeben sind lediglich einzelne Schnitte, bei denen man sich ohne weiteres nicht von einer Größen- bzw. Mengenzunahme der Chromatinschollen überzeugen kann.

Gegenüber dem Studium von einzelnen Schnitten und gegenüber der von *Busse-Gravitz* angegebenen Kultur in Citratblut, bzw. Plasma besitzt aber die Gewebezüchtung mit unmittelbarer Beobachtung des explantierten Gewebes den Vorteil, die namentlich bei der Neubildung von Zellen auftretenden Ortsverschiebungen und die freie Beweglichkeit, auf die ja auch die Untersuchungen von *Busse-Gravitz* hinauslaufen, verfolgen zu können und nicht nur aus Schnittpräparaten erschließen zu müssen.

Die Entscheidung darüber, ob ein Gewebe lebt oder nicht, muß nach dem oben Gesagten zum mindesten ebenso leicht mit der Gewebekultur wie mit der von *Busse-Gravitz* angegebenen Methode der Kultur in Citratblut und -plasma zu treffen sein.

Ich habe deshalb auf *Anregung* von Herrn Geh.-Rat Otto mit der *Methode der Gewebekultur* nachgeprüft, *welchen Schädigungen ein Gewebe ausgesetzt werden kann, bis es seine Lebensfähigkeit in vitro, eventuell auch in vivo, verliert*.

Dabei habe ich zunächst das Gewebe den *gleichen Schädigungen* unterworfen, wie es *Busse-Gravitz* getan hat.

So gibt *Busse-Gravitz* an, daß unsere Fixierungsmittel „Formol, Sublimat usw. niemals die Reaktionsfähigkeit der Gewebe zu vernichten vermögen“.

Diese Widerstandsfähigkeit habe ich nun zu ermitteln versucht, indem verschiedene Gewebe, die verschieden lange Zeit den betreffenden Schädigungen ausgesetzt waren, auf ihre Lebensfähigkeit in der Gewebekultur geprüft wurden.

*I. Zunächst das Formol:*

*a) Lange Einwirkungszeiten.* Von einer Kaninchenleber, die seit 1929, also 11 Jahre, in Formol gelegen hatte (*Busse-Gräwitz* gibt an, daß durch 13 Jahre langes Fixieren in 10%igem Formol die Reaktionsfähigkeit des Gewebes nicht erlischt), wurden nach langem Auswaschen Gewebekulturen angelegt. Es war *keinerlei Wachstum* in einer größeren Anzahl von Gewebekulturen zu beobachten, auch nicht nach dem Umsetzen in neues Medium und nach einer Beobachtungszeit von 28 Tagen. Ein menschlicher Muskel, ein Stück des *Musc. sartorius*, der seit 1935 in *Zenker-Formol* aufbewahrt war, zeigte ebenfalls kein Wachstum.

Auch embryonales Gewebe, von dem vielleicht eine größere Wachstumstendenz erwartet werden konnte — ein menschlicher Fetus, der seit 1925 in Formol gelegen hatte — zeigte in den Explantaten von den verschiedensten Geweben nicht die geringste Lebensäußerung\*.

*b) Kürzere Einwirkungszeiten.* Von verschiedenen frischen Geweben wurden kleine Stückchen von etwa Erbsengröße eine bestimmte Zeit lang in Formol gehalten, dann gründlich gewaschen und von den Stückchen eine Reihe von Gewebekulturen angelegt. Mit Absicht wurde sowohl embryonales Gewebe als auch Milz- und Lungengewebe benutzt, um ein gut wachsendes Gewebe zu haben, bzw. ein solches, bei dem eventuell das Auswandern *einzelner Zellen* leicht als eine Lebensäußerung zu deuten gewesen wäre.

*1. Formol 10%.* Eine Einwirkungszeit von 2 Tagen bis herunter zu 1 Stunde schädigte das Gewebe so stark, daß die nach der Formol-Behandlung angelegten Gewebekulturen kein Wachstum mehr zeigten:

*Einfluß von 10% Formol auf das Angehen von Gewebekulturen.*

Gewebe	Zeit	Wachstum der Kulturen
Milz, Huhn . . . .	2 Tage	nach 10 Tagen: kein Wachstum
Lunge, Huhn . . . .	2 "	" 10 " " "
Muskel, Huhnenembryo	3 "	" 10 " " "
" "	1 Tag	" 10 " " "
" "	3 Std.	" 10 " " "
" "	2 "	" 10 " " "
" "	1 "	" 10 " " "

*2. Formol 4%.* In der zu Fixierungszwecken üblichen 4%igen Formol-Lösung wurden Muskelgewebe vom Huhn-Embryo und Milzgewebe der Maus  $\frac{1}{2}$ —10 Min. gehalten und dann explantiert. Die nachfolgende

\* Die beiden letzten Präparate wurden mir von Herrn Prof. *Hirt*, Direktor des Anatomischen Instituts der Universität, liebenswürdigerweise überlassen.

Übersicht zeigt, daß nach einer Einwirkungszeit von  $\frac{1}{2}$  und 1 Min. noch ein ganz schwaches Wachstum der Kultur zustande kommt. Die Muskelkulturen zeigen am 1. Tag eine ganz geringe Aussprossung (Abb. 1

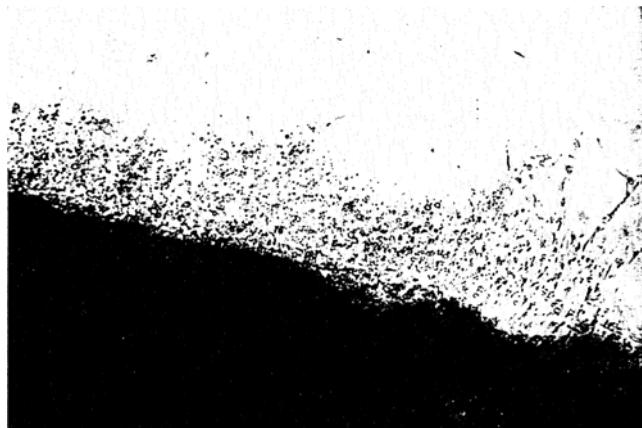


Abb. 1. Muskel, Huhn-Embryo. Vor Explantation  $\frac{1}{2}$  Min. in Formol. Gewebekultur.

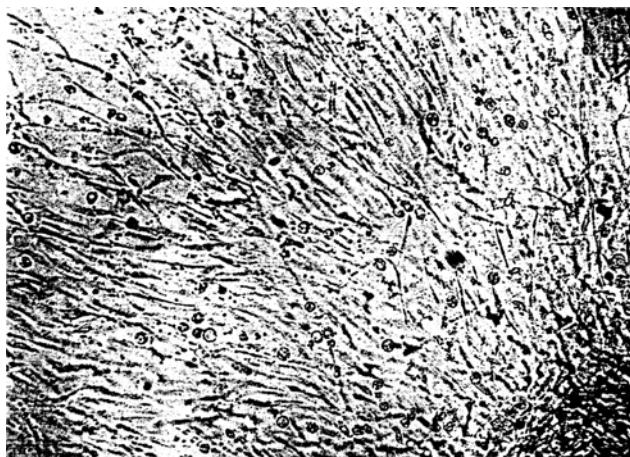


Abb. 2. Muskel, Huhn-Embryo. Kontrolle.

u. 2), am 2. Tag kein Neuwachstum; die Zellen, die aus den Milzstückchen auswandern, zeigen am 1. Tag nur geringe Beweglichkeit, am 2. Tag sind sie unbeweglich geworden.

Außerdem wurde die Wirkung des Formol auf das spätere Angehen von *Carcinomgewebe* geprüft: es erwies sich als noch weniger widerstandsfähig, indem schon durch eine Einwirkungszeit von  $\frac{1}{2}$  Min. seine Lebensfähigkeit vernichtet wurde.

## Einfluß von 4% Formol auf das Angehen von Gewebekulturen.

Gewebe	Zeit	Wachstum der Kulturen
Muskel, Huhnembryo	10 Min.	nach 7 Tagen: kein Wachstum
" "	5 "	" 7 " " "
" "	2 "	" 7 " " "
" "	1 "	" 7 " " ganz geringes Wachstum
Milz, Maus	10 "	" 7 " " kein Wachstum "
" "	5 "	" 7 " " "
" "	1 "	" 7 " " ganz geringes Wachstum
" "	1/2 "	" 7 " " "

## II. Sublimat.

In derselben Weise wie das Formol wurde das Sublimat auf seine schädigende Wirkung an verschiedenen Geweben untersucht. Die untenstehende Übersicht zeigt, daß das Sublimat die Zellen bei *kurzer Einwirkungszeit* nur in geringem Maße schädigt. Vom embryonalen Muskelgewebe wie vom Milzgewebe wachsen noch ganz vereinzelte Zellen aus, wenn das Stückchen vor der Explantation bis zu 30 Min. mit 1%igem Sublimat vorbehandelt war. (Busse-Gräwitz gibt an, daß monatelanges Einlegen in 1%iges Sublimat die Reaktionsfähigkeit des Gewebes nicht zum Erlöschen bringt<sup>2</sup>.)

Eine Vorbehandlung von 1 Stunde zerstörte die Wachstumsfähigkeit des Muskelgewebes völlig; beim Milzgewebe kommt es hier und da noch zum Auswandern einzelner Leukozyten.

## Einfluß von Sublimat auf das Angehen von Gewebekulturen.

Gewebe	Zeit	Wachstum der Kulturen	Bemerkungen
Muskel, Huhnembryo	24 Std.	nach 6 Tagen: kein Wachstum	
" "	3 "	" 7 " " "	
" "	2 "	" 7 " " "	
" "	1 "	" 7 " " "	
" "	30 Min.	" 3 " fast kein Wachstum	nur Wachstum in den ersten Stunden
" "	10 "	" 3 " ganz geringes Wachstum	
" "	5 "	" 3 " "	
" "	1 "	" 3 " gutes Wachstum	Wachstum über mehrere Tage
Milz, Maus	24 Std.	" 3 " kein Wachstum	Zellen fast unbeweglich
" "	1 "	" 3 " ganz geringes Wachstum	Zellen schwach beweglich
" "	30 Min.	" 3 " geringes Wachstum	Zellen gut beweglich
" "	10 "	" 3 " "	
" "	5 "	" 3 " "	
" "	1 "	" 3 " sehr gutes Wachstum	gut beweglich
" "	1/2 "	" 3 " " "	

Um auch menschliches Gewebe in seiner Widerstandsfähigkeit dem Sublimat gegenüber zu prüfen, wurden Gewebestückchen vom Skelet-

muskel eines menschlichen Fetus\* vor der Explantation mit Sublimat behandelt.

Auch hier ist bei einer Einwirkungszeit von 10 Min. noch ein — wenn auch etwas verzögertes — Wachstum möglich.



Abb. 3. Carcinom, Maus. Vor Explantation 1 Min. in Sublimat 1:1000, Gewebekultur.

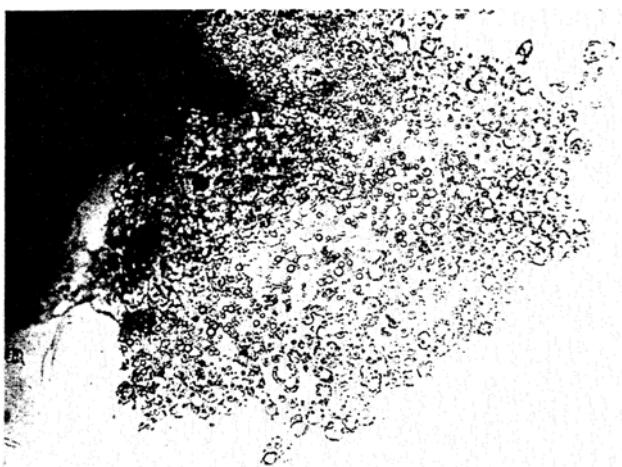


Abb. 4. Carcinom. Kontrolle.

Weniger widerstandsfähig als das normale Gewebe ist das *Tumorgewebe*, das bei Vorbehandlung der Stückchen mit Sublimat schon nach 1 Min. Einwirkungszeit in der Gewebekultur nicht mehr zur Entwicklung kommt. Bei 1½ Min. Einwirkungszeit zeigt sich hier und da noch geringes Wachstum (Abb. 3 u. 4). So ist also jedenfalls die Widerstands-

\* Der menschliche Fetus wurde mir durch das liebenswürdige Entgegenkommen des Direktors der Univ.-Frauenklinik, Herrn Prof. *Guthmann*, zur Verfügung gestellt.

fähigkeit des Gewebes gegenüber „unseren Fixierungsmitteln Formol, Sublimat usw.“ nicht zu verallgemeinern, da das Tumorgewebe sich als noch weniger widerstandsfähig gegenüber dem Sublimat erwiesen hat als das normale Gewebe.

Beim normalen Gewebe handelt es sich dabei — wie schon erwähnt — um solches Gewebe, das an sich eine gute Wachstumstendenz hat, wie embryonales Gewebe; um so weniger dürfte man also davon sprechen, daß „die Reaktionsfähigkeit des Gewebes niemals vernichtet wird“, wenn schon nach kürzester Einwirkungszeit z. B. das Sublimat eben diese Reaktionsfähigkeit zu hemmen imstande ist.

### III. Alkohol.

Auch der Alkohol schädigt das Gewebe schon innerhalb ganz kurzer Zeit; so läßt sich aus Gewebestückchen, die länger als  $\frac{1}{2}$  Min. in 98%igem Alkohol gelegen haben, schon nicht mehr das den Kontrollen entsprechende gute Kulturwachstum erzielen. Ein 5 Min. langer Aufenthalt in Alkohol vernichtet die Wachstumsfähigkeit von embryonalem menschlichem Skelettmuskel vollkommen und hemmt das Wachstum von embryonalem Hühnernmuskel, sowie der Mäusemilz, stark.

## Einfluß von Alkohol 98% auf das Angehen von Gewebekulturen.

Gewebe	Zeit	Wachstum der Kulturen				Bemerkungen
Muskel, Huhnenembryo	10 Min.	nach 4 Tagen:	ganz geringes Wachstum			
" "	5 "	" 4 "	"			
" "	1 "	" 4 "	gutes Wachstum	"		
" "	1/2 "	" 4 "	sehr gutes Wachstum			
„ menschl. Embryo	10 "	" 5 "	kein Wachstum			
" "	5 "	" 5 "	"			
" "	1 "	" 5 "	geringes Wachstum			
" "	1/2 "	" 5 "	gutes Wachstum			
Milz, Maus	10 "	" 4 "	ganz geringes Wachstum			
" "	5 "	" 4 "	"			
" "	1 "	" 4 "	gutes Wachstum	"		
" "	1/2 "	" 4 "	sehr gutes Wachstum			

Auch hier zeigt das *Carcinom* eine noch geringere Widerstandsfähigkeit, indem der Alkohol nach einer Einwirkungszeit von 1 Min. das Carcinomgewebe schon so weit geschädigt hat, daß in der Mehrzahl der Kulturen überhaupt keine lebensfähigen Zellen mehr erhalten sind.

#### IV. Gekochtes Gewebe.

Auch das Kochen soll das Gewebe in seiner Reaktionsfähigkeit nicht beeinflussen, wie durch eine andere Arbeit von *Busse-Gravitz* an Blut- und Plasmakulturen der Kaninchenharnhaut bewiesen sein sollte.

Inwieweit das Gewebe in der Gewebekultur durch das Kochen beeinflußt wird, zeigen folgende Versuche: von dem zu untersuchenden Gewebe wurde ein kleines (etwa erbsengroßes) Stückchen in kochende *Ringer*-Lösung gebracht und darin bis zu 1 Min. (= die von *Busse-Granitz* angegebene Zeit) am Kochen gehalten. Dann wurden die Stückchen geschnitten und als Gewebekulturen angelegt; das Ergebnis der Kochversuche zeigt folgende Übersicht:

Einfluß des Kochens auf das Angehen von Gewebekulturen.

Gewebe	Zeit	Wachstum der Kulturen				
Leber, Kaninchen	1 Min.	nach 8 Tagen:	kein Wachstum			
Skelettmuskel, menschl. Fetus	1 ..	7 ..	..	..	..	..
Milz, Maus	60 Sek.	.. 6 ..	..	..	..	..
" "	30 ..	.. 6 ..	..	..	..	..
" "	10 ..	.. 6 ..	..	..	..	..
Carcinom, Maus	60 ..	.. 6 ..	..	..	..	..
" "	30 ..	.. 6 ..	..	..	..	..
" "	10 ..	.. 6 ..	..	..	..	..

Keines der untersuchten Gewebe hat, nachdem es auch nur für kurze Zeit — also auch weniger als 1 Min. — gekocht worden war, in der Gewebekultur irgendeine Spur von Wachstum gezeigt, selbst nicht die Milzgewebestückchen; wenn hier nur wenige Zellen trotz des Kochens erhalten geblieben wären, dann wären die Zellen kraft ihrer lebhaften Eigenbeweglichkeit nach außen ausgewandert.

#### V. Getrocknetes Gewebe.

Ich habe im Rahmen der Versuche an verschiedenartig verändertem Gewebe ebenso wie *Busse-Granitz* auch *Mumiengewebe* untersucht, um auch über dessen Lebensfähigkeit Aufschluß zu erhalten.

Das Mumiengewebe ist charakterisiert durch das *Alter* und durch *Eintrocknungsvorgänge*, die sich am Gewebe infolge verschiedener Maßnahmen abspielen.

Das Eintrocknen des Gewebes, also die Wasserentziehung, läßt sich verhältnismäßig leicht experimentell erzielen. Ich habe es mit zweierlei Methoden versucht, mit dem Eintrocknen im Exsiccator und mit Trocknen an der Luft.

1. *Exsiccator*. Die Gewebe verschiedener Herkunft (außer Normalgewebe auch Tumorgewebe) wurden in Stückchen von etwa Kirschkerngröße in einem Schälchen in den Exsiccator gebracht (über Silika-Gel). Der Exsiccator blieb am Tage durchschnittlich 4—5 Stunden an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen, dann nach Abstellen des Wasserstrahls über Nacht im Vakuum. Beim Herausnehmen waren die Stückchen jeweils auf  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  ihres Volumens geschrumpft und kamen dann zum Aufquellen für verschieden lange Zeit in *Ringer*-Lösung (Eisschrank); sie wurden also nicht einmal im getrockneten Zustand angesetzt.

Die Trocknungszeiten liegen zwischen 5 Tagen und 20 Stunden, die Quellungszeiten zwischen 1 Stunde und bis zu ebenfalls 5 Tagen.

Selbst wenn ein Gewebe, das nur 20 Stunden im Vakuum war, 4 Tage — also um das Vielfache der Zeit — in *Ringer*-Lösung lag, um durch Aufquellen den Wasserverlust wieder zu ersetzen, ist es in keinem Fall gelungen, die aus diesem Gewebe explantierten Gewebekulturen zum Wachstum, also zum Leben zu bringen (Beobachtungszeit 20 Tage).

Auch *Carcinomgewebe*, das nach 20 Stunden Vakuum für 6 Stunden, bzw. 4 Tage, in *Ringer*-Lösung gelegen hatte und dem Aussehen nach von frischem Gewebe nicht mehr zu unterscheiden war, zeigte in der Gewebekultur nicht die geringste Sprossung oder irgendeine Lebensäußerung.

Um festzustellen, ob nicht etwa innerhalb des Stückchens sich noch lebensfähige Zellen finden, die, wenn nicht *in vitro*, so doch *in vivo* noch ihre Lebensfähigkeit entwickeln würden, wurde das getrocknete und aufgequollene *Carcinomgewebe* auf Mäuse verimpft:

*Maus 18*: Carcinomstückchen von Kirschkerngröße 20 Stunden im Exsiccatoren getrocknet, 6 Stunden in *Ringer*-Lösung; als Brei auf 1 Maus subcutan verimpft; nach 4 Wochen hat sich keinerlei Tumor entwickelt; an der Impfstelle keinerlei Reaktion.

*Maus 19*: Kontrolle. Carcinomstückchen vor der Verimpfung entsprechende Zeit im Eisschrank: nach 3 Wochen hat sich ein großer Tumor von 4,42 g Gewicht entwickelt.

*Maus 106*: Carcinomstückchen 20 Stunden im Exsiccatoren, 4 Tage in *Ringer*, nach 25 Tagen kein Tumor.

*Maus 107*: Kontrolle. Nach 25 Tagen: Tumor von 4,85 g Gewicht.

Das getrocknete Gewebe zeigt also weder in der Gewebekultur *in vitro* noch nach seiner Implantation *in vivo* irgendeine Lebensäußerung. Die Zeit, in der sich das getrocknete Gewebe hätte entwickeln können, ist wohl für die Kultur mit 20 Tagen, bzw. für die Maus mit etwa 4 Wochen nicht zu knapp bemessen.

2. *Lufttrocknung*. Auch das an der Luft getrocknete Gewebe ist durch nachträgliches Aufquellen nicht wieder in einen lebens- und reaktionsfähigen Zustand zu bringen, wie aus nachstehender Übersicht hervorgeht.

Selbst wenn das Gewebe das Vielfache der Eintrocknungszeit zur Feuchtigkeitsaufnahme in Lösung blieb, war es sowohl für das Kulturrwachstum wie für das Angehen im Organismus so weit verändert, daß keinerlei Lebensäußerungen mehr wahrnehmbar waren. So hat z. B. ein Stückchen Muskelgewebe vom Huhnembryo, das nur 24 Stunden an der Luft getrocknet worden war und dann *mehrere* Tage (bis zu 6 Tagen) gequollen war und äußerlich wieder das Aussehen des frischen Gewebes hatte, in keiner Kultur auch nur das geringste Wachstum gezeigt.

Carcinomstückchen (Maus), die 1 und 2 Tage an der Luft getrocknet waren und dann bis zu ebenfalls 2 Tagen wieder in *Ringer*-Lösung lagen,

Gewebe	Dauer	Ringer	Wachstum
<i>Gewebe, im Exsiccator getrocknet:</i>			
Muskel, Huhnembryo . . . . .	1 Tag	5 Std.	kein Wachstum
"      "      "      "      "	3 Tage	5 "	" "
"      "      "      "      "	20 Std.	4 Tage	" "
Lunge, Huhn . . . . .	4 Tage	5 Std.	" "
Milz, Huhn . . . . .	1 Tag	5 "	" "
"      "      "      "      "	3 Tage	5 "	" "
Leber, Kaninchen . . . . .	24 Std.	1 "	" "
"      "      "      "      "	5 Tage	2 "	" "
Niere, Kaninchen . . . . .	1 Tag	4 "	" "
"      "      "      "      "	4 Tage	4 Tage	" "
Muskel, menschlicher Fetus . . . . .	24 Std.	24 Std.	" "
Carcinom, Maus . . . . .	20 "	6 "	" "
"      "      "      "      "	20 "	4 Tage	" "
<i>Gewebe, lufttrocken:</i>			
Muskel, Huhnembryo . . . . .	2 Tage	24 Std.	kein Wachstum
"      "      "      "      "	20 Std.	2 Tage	" "
"      "      "      "      "	24 "	2 "	" "
"      "      "      "      "	24 "	3 "	" "
"      "      "      "      "	24 "	6 "	" "
Muskel, menschlicher Fetus . . . . .	2 Tage	24 Std.	" "
Carcinom, Maus . . . . .	24 Std.	3 "	" "
"      "      "      "      "	24 "	24 "	" "
"      "      "      "      "	2 Tage	2 "	" "
"      "      "      "      "	2 "	4 "	" "
"      "      "      "      "	2 "	24 "	" "
"      "      "      "      "	2 "	24 "	" "
"      "      "      "      "	2 "	48 "	" "

ergaben weder bei der Explantation ein Wachstum der (in größerer Zahl angelegten) Kulturen, noch hatte die Verimpfung auf die Maus die Entwicklung eines Tumors zur Folge.

#### VI. Mumien Gewebe.

Am Gewebe von ägyptischen Mumien, die etwa 5000 Jahre alt sind, bzw. von Mumien der Vor-Inkaischen Indianer, die ein Alter von 600 Jahren haben, wurden von *Busse-Gravitz* „Gewebereaktionen“ als „fortschreitende Differenzierungen einer Mumien sehne“ beobachtet. Es handelt sich bei den Mumien um Gewebe, das, soweit bekannt, wohl vorwiegend durch Trocknen und Dörren an der Luft konserviert worden ist, ohne daß bei den Mumien dieser Völker besondere Konservierungsmittel angewandt worden sind (vgl. 3 u. 4).

Durch die liebenswürdige Vermittlung von Fr. Dr. *Hissink* wurde uns vom Forschungsinstitut für Kulturmorphologie der Frankfurter Universität ein Stückchen Mumien Gewebe einer aus Peru stammenden, etwa 500—600 Jahre alten Mumie überlassen. Das vom Unterarm abgeschnittene, etwa 5 cm große Stückchen Skeletmuskel war lederhart, in der Längsrichtung kaum zerreißbar, zerfiel aber leicht in einzelne Fasern und kleine staubfeine Teilchen.

Vor der weiteren Verarbeitung wurde das Mumien Gewebe zuerst zum Aufquellen in Aqua dest. bzw. *Ringer*-Lösung gebracht, das Gewebe nahm

nach und nach Feuchtigkeit auf, wurde weicher und ließ sich in kleine Stückchen schneiden, bzw. zerzupfen.

1. *Untersuchung des frischen Gewebes.* Die Abb. 5 zeigt ein ungefärbtes Stückchen Mumiengewebe bei 400facher Vergrößerung. Folgendes ist zu beobachten:

1. Es ist eine längsgerichtete Anordnung der einzelnen Muskelfasern zu erkennen. 2. Quer zur Längsrichtung ist eine unregelmäßige Querstruktur zu erkennen; auch in dieser Richtung ist das Gewebe geschrumpft und zeigt noch die mehr oder weniger starke Faltenbildung. 3. Längsverlaufende geschlängelte Gebilde, die später beschrieben werden.

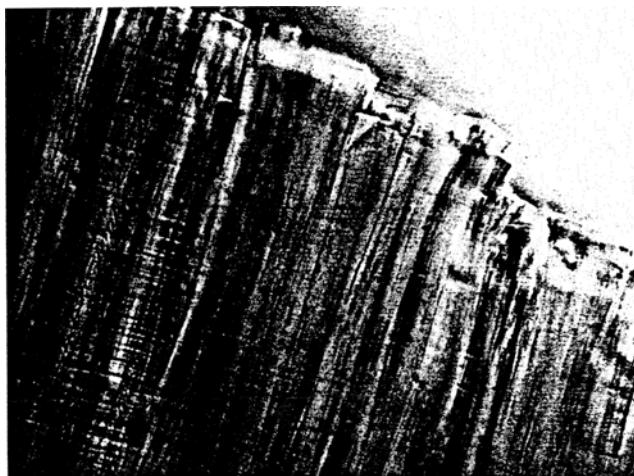


Abb. 5. Mumiengewebe, ungefärbt, Vergr. 400fach.

4. Eine Querstreifung des Muskels ist nirgends zu erkennen. Auch bei 1000facher Vergrößerung ist nicht die Spur einer Querstreifung wahrzunehmen (Leuchtbildaufnahme, Abb. 6). Eine Kontrollaufnahme von normalem menschlichem Skelettmuskel zeigt, unter den gleichen Bedingungen aufgenommen, die Querstreifung sehr deutlich (Abb. 7). Während im normalen Muskel die Kerne in allen Einzelheiten deutlich hervortreten, war bei dem mumifizierten Muskel niemals ein Kern, weder im frischen noch im gefärbten Präparat oder im Dunkelfeld zu erkennen.

2. *Frische, mit Methylenblau angefärbte Präparate.* Diese zeigen ebenfalls weder Querstreifungen noch Kerne oder Kernbestandteile.

3. *Schnitte.* Es war recht schwierig, von dem mürben und spröden Gewebe überhaupt Schnitte zu bekommen; erst nach langem Aufquellen in Wasser oder *Ringer*-Lösung wurden die Stückchen eingebettet; wir konnten sowohl bei der Paraffin- wie bei der Celloidineinbettung immer nur ganz kleine Schnitte erhalten, die Abb. 8 gibt einen solchen Schnitt

wieder\*: eine strukturlose Masse, die aber auch nicht die geringste Struktur oder Zeichnung erkennen läßt. Auch von Chromatinbestandteilen konnte ich bei genauester Durchmusterung nicht das kleinste Bröckelchen erkennen.

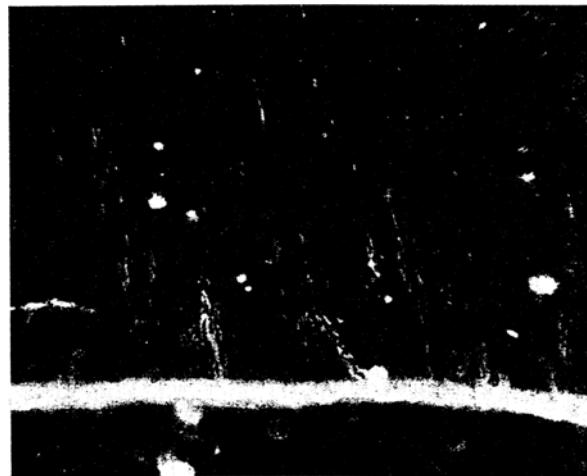


Abb. 6. Mumien Gewebe, Leuchtbild, Vergr. 1000fach

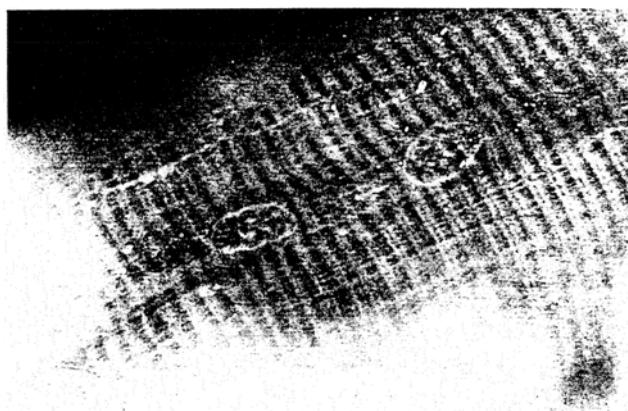


Abb. 7. Menschlicher Skelettmuskel, Dunkelfeld, Vergr. 1000fach.

*4. Mumien Gewebe in der Gewebekultur.* Kleine Stückchen des Mumien gewebes (etwa 1 mm Seitenlänge und so dünn wie möglich) wurden in der üblichen Weise als Gewebekulturen angelegt. (Medium: Normales

\* Ausgeführt von Frl. Noeggerath und Frl. Schmitt.

menschliches Plasma, Heparin- und auch Citratplasma mit einem Zusatz von normalem Huhnplasma und Hühner-Embryonalextrakt.)

Vor der Explantation war das Ausgangsmaterial für die einzelnen angelegten Serien verschieden lange Zeit zum Aufquellen in Aqua dest. bzw. in *Ringer*-Lösung gehalten worden. Freilich spielt es gegenüber dem Eintrocknungsalter der Mumie keine Rolle, ob das Gewebe jetzt 1 oder 2 Wochen länger aufquellen kann; aber innerhalb der hier angestellten Versuche wollte ich wenigstens — teils etwas kürzere, teils etwas längere Quellungszeiten in Betracht ziehen. Nach einem Aufenthalt des Mumien-gewebes in Aqua dest. und *Ringer*-Lösung von 2, 5, 20, 27, 34 und 37 Tagen

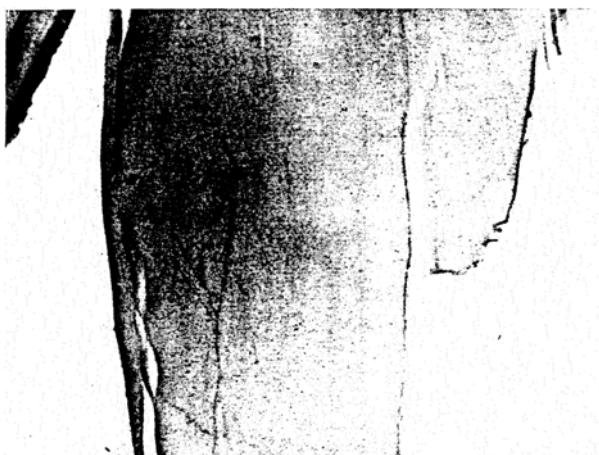


Abb. 8. Mumien Gewebe, Schnitt, Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Vergr. 200fach.

wurden Gewebekulturen angelegt, die bei einer Beobachtungszeit von bis jetzt mehreren Monaten *nicht das geringste Wachstum zeigten*. Die Kulturen wurden jeden Tag beobachtet, einzelne Kulturen wurden in bestimmten Abständen photographiert, sämtliche Kulturen wurden umgesetzt — auch das nach verschieden langen Wachstumszeiten — *niemals zeigte sich an der Kultur auch nur die geringste Veränderung*, die auf eine „Reaktion“ des Gewebes würde schließen lassen.

5. *Film*. Zur einwandfreien Feststellung, ob innerhalb einer längeren Beobachtungszeit sich etwa Veränderungen an dem Mumien Gewebe abgespielt hätten, die dem Beobachter — auch bei genauestem, direktem mikroskopischem Studium vielleicht entgangen sein könnten, wurden auf der mikrokinematographischen Abteilung gemeinsam mit *H. Maas* von mehreren Mumienstückchen *Film* aufnahmen hergestellt. Bei starker Vergrößerung (Objektiv 6 L Leitz) wurden mit einem Intervall von 2 Min., also bei 2880facher Beschleunigung, die Aufnahmen über mehrere Tage und Nächte ausgedehnt. Die Scharf-Einstellung war schwierig,

weil selbst das mit feinen Instrumenten feinst geschnittene Mumienstückchen immer noch aus mehreren übereinanderliegenden Gewebschichten bestand, da ja z. B. in einem Stückchen von 1 mm Seitenlänge das Vielfache der ursprünglichen Gewebsmasse in der Länge und Breite auf einen kleinen Raum zusammengepreßt ist.

Die beiden Photos Abb. 9 und 10 zeigen das erste und das letzte Bild eines Filmstreifens, der in 3 Tage langer Aufnahme gewonnen



Abb. 9. Mumiengewebe, Gewebekultur,  
Film 465. Anfang des Films (sofort  
nach Anlegen der Kultur).

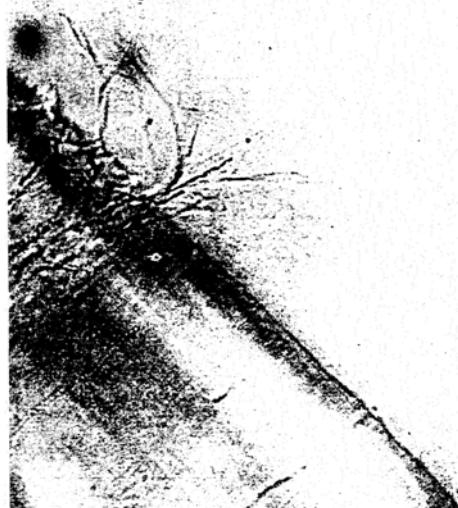


Abb. 10. Mumiengewebe, Gewebekultur,  
Film 465. Ende des Films (nach  
3tägiger Beobachtung).

wurde. Die bei der frisch angelegten Kultur an einer Stelle vorhandene Aufsplitterung einer Muskelfaser (?) konnte für lebensfähiges Gewebe gehalten werden; wenn aber nach 72 Stunden Beobachtungszeit nicht die geringste Veränderung festzustellen ist, dann kann wohl von einer Reaktionsfähigkeit des Gewebes wirklich nicht gesprochen werden.

Während der Aufnahmen glaubten wir manchmal, kleine Verschiebungen an den kleinen Ausläufern zu beobachten, beim Betrachten des fertigen Films erwies sich aber alles als Täuschung. Keiner der Filme zeigt auch nur die Spur einer Bewegung oder irgendeines Vorganges, den wir als „Reaktion“ deuten könnten.

6. *Mumiengewebe in der Blut- und Plasmakultur.* Ein weiterer Versuch, das Mumiengewebe zur Reaktion zu bringen, wurde mit der von

*Busse-Gravitz* angegebenen Blut- und Plasmakultur unternommen. Nach seinen Angaben<sup>2</sup> wurde das Medium für die Blutkultur aus menschlichem *Citratblut* (18 ccm Blut + 4 ccm 3%igem Natr. citr.) bzw. *Citrat-*

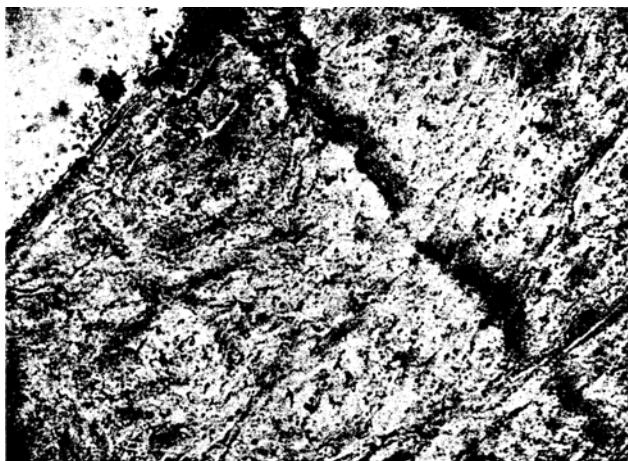


Abb. 11. Mumiengewebe, Stückchen aus 48stündiger Blutkultur (ungefärbt). Vergr. 82fach.



Abb. 12. Mumiengewebe, Stückchen aus 48stündiger Plasmakultur (ungefärbt). Vergr. 82fach.

*plasma* hergestellt. In Reagenzgläser mit je 2 ccm Blut bzw. Plasma kamen kleine Stückchen Mumiengewebe und blieben 48 Stunden im Brutschrank bei 38°. Die aus der Blut- bzw. Plasmakultur entnommenen Stückchen sahen in der Tat etwas anders aus als ein frisches Stückchen

Mumiengewebe vor dem Einbringen in die Blut- und Plasmakulturen. In den frischen Stückchen ist nur eine Längsstruktur (Muskelfaserrichtung) und eine quer dazu verlaufende, unregelmäßige Schichtung zu erkennen (bedingt durch die Schrumpfung des Gewebes). Die Stückchen aus der Blut- und Plasmakultur (Abb. 11 und 12 erschienen aufgelockert und sind mit „Granula“ bedeckt, die auf den ersten Blick aussiehen, wie die von *Busse-Gravitz* beschriebenen „Chromatingranulationen, die sich stellenweise zu Kernen verdichten“. Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 13) zeigt sich aber, daß die fraglichen Stellen die Punkte einer wellig

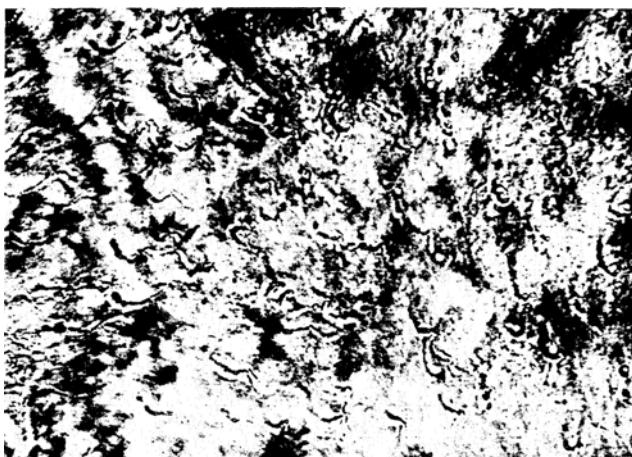


Abb. 13. Mumiengewebe, Stückchen aus 48stündiger Blutkultur (ungefärbt). Vergr. 470fach.

verlaufenden Längsstruktur sind, die gerade als ein *Punkt* in der optischen Ebene scharf eingestellt sind. Am Rande der Photographie sieht man deutlich den Übergang von den höchsten Punkten solcher Wellenlinien zu einigen parallel verlaufenden Längslinien.

(Über die Aufklärung dieser Strukturen später!)

Jedenfalls handelt es sich hier weder um ganze Kerne noch um zerfallene, erst recht nicht um wieder aufgebaute Kerne und nicht um Kernbestandteile = Chromatingranula.

Um auch den „Reaktionen“, „Lebensäußerungen“ und „Vorgängen“ auf die Spur zu kommen, die sich, wenn nicht an der Oberfläche des Stückchens, so doch vielleicht im Innern abgespielt hatten, haben wir von den Mumienstückchen nach 48ständigem Aufenthalt in der Plasma- bzw. Blutkultur noch Schnitte angefertigt. Die Abb. 14 und 15 (mit Hämatoxylin-Eosin besonders *lang* gefärbte Schnitte) lassen wohl keinen Zweifel darüber, daß sich auch nirgends eine Andeutung von Chromatin-schollen oder -bröckel entdecken läßt. Wenn man diese beiden Schnitte

noch einmal vergleicht mit dem Schnitt des Originalgewebes (Abb. 8), so läßt sich *nirgends* — ich habe eine große Anzahl von Schnitten durchmustert — ein Auftreten von Chromatinbestandteilen wahrnehmen,



Abb. 14. Mumien Gewebe, Stückchen aus 48stündiger Blutkultur, Schnitt (Hämatoxylin-Eosin). Vergr. 200fach.

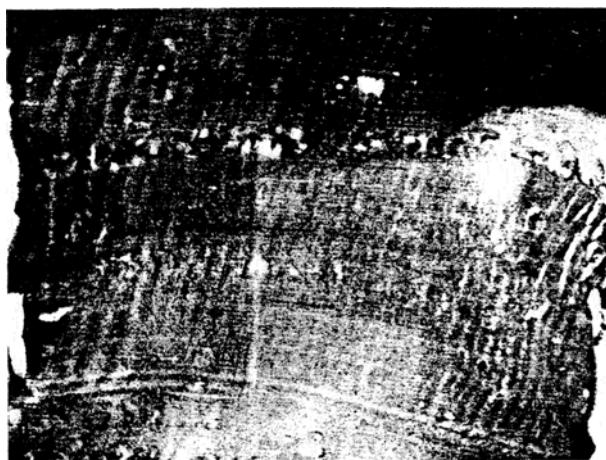


Abb. 15. Mumien Gewebe, Stückchen aus 48stündiger Plasmakultur, Schnitt (Hämatoxylin-Eosin). Vergr. 200fach.

überhaupt war das Aussehen der Plasma- und Blutkultur-Stückchen in keiner Weise gegenüber dem Originalgewebe verändert. (Es war nicht möglich, von den Mumienstückchen aus der Blut- und Plasmakultur *ebenso dünne* Schnitte zu bekommen wie von dem Originalgewebe. In

die Kultur kamen nur kleine Stückchen, die, infolge ihres mürben Ge-  
fäßes, besonders schwer zu schneiden waren.)

Um den Stückchen, für die kein Grund zur Annahme einer „Re-  
aktion“ im Sinne eines Zell-Lebens vorlag, noch weiterhin die Mög-  
lichkeit zu einer Entwicklung in diesem Sinne zu geben, wurden die Frag-  
mente aus der Blut- und Plasmakultur als Gewebekulturen angelegt  
und längere Zeit beobachtet. Nach einer Kultivierung bis zu 8 Wochen  
mit mehrmaligem Umsetzen in neues Medium (sowohl Citratplasma wie

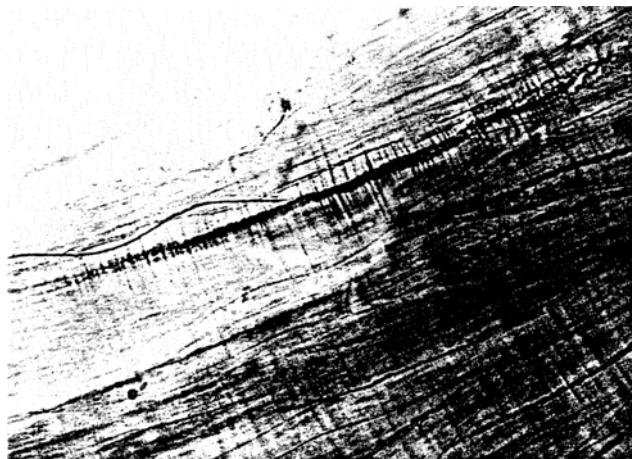


Abb. 16. Mumiengewebe, frisch mit Methylenblau 1:1000 gefärbt. Vergr. 400fach.

Heparinplasma) zeigte keines der Mumienstückchen irgendeine Lebens-  
äußerung wie „Zelligwerden“ (Busse-Gravitz) oder gar Ausspröllung  
von neuen Zellen.

7. *Pilze*. Die photographische Aufnahme (Abb. 16) eines frischen  
Zupfpräparates des Mumiengewebes, das mit einer Methylenblaulösung  
1:1000 angefärbt war, überraschte zunächst durch seine Ähnlichkeit mit  
der von Busse-Gravitz veröffentlichten Aufnahme einer in „beginnender  
und fortgeschritten Differenzierung“ begriffenen Mumiensehne<sup>1</sup>. Ich  
dachte auf den ersten Blick, es handelte sich auch hier um „feine, oft  
kaum sichtbare Chromatinstraßen“. Bei stärkerer Vergrößerung dieser  
fraglichen Gebilde klärte sich der Charakter dieser Gebilde aber sofort  
auf. Bei 800facher (Abb. 17) und dann bei 1640facher Vergrößerung  
(Abb. 18) sieht man deutlich ein in der Längsrichtung verlaufendes Ge-  
flecht von *Pilzfäden*, die sich aus Einzelteilen, die wie Kettenglieder in-  
einander greifen, zusammensetzen.

Der Pilz hatte sich in den Stückchen, die als *Gewebekulturen* angelegt  
waren, bei Brutschranktemperatur nur langsam entwickelt, in manchen  
anderen Kulturen fanden sich auch noch andere Formen, die dann auf

Spezialnährböden (*Sabouraud*) ein üppiges Wachstum, zum Teil mit Farbstoffbildung, zeigten.

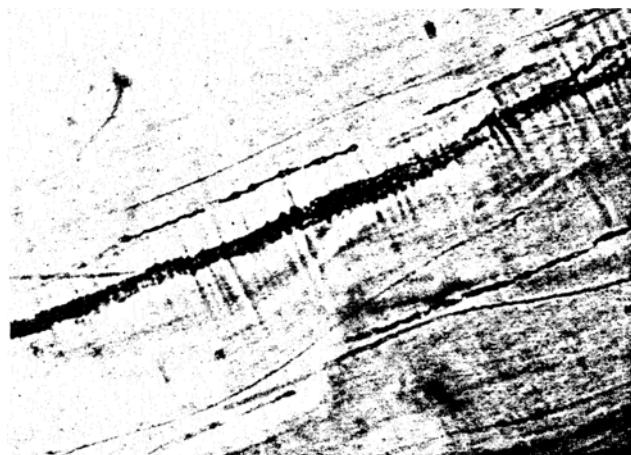


Abb. 17. Mumiengewebe, frisch mit Methylenblau 1:1000 gefärbt. Vergr. 800fach.

Namentlich 2 Formen traten regelmäßig auf: ein wollig wachsender Pilz und ein solcher mit hefeartigem Charakter, die von verschiedenen



Abb. 18. Mumiengewebe, frisch mit Methylenblau 1:1000 gefärbt. Vergr. 1640fach.

Sachverständigen begutachtet wurden. Von Herrn Prof. *Laibach* vom Botanischen Institut der Universität Frankfurt a. M. wurden sie als *Absidia* bzw. *Phoma* bestimmt.

*VII. Blut- und Plasmakulturen von anderen Geweben.*

Um die von *Busse-Gräwitz* angegebenen Vorzüge der Blut- und Plasmakultur zu ermitteln, habe ich die Methode — außer am Mumien-gewebe — noch an verschiedenen anderen Geweben geprüft. Wenn mit dieser Methode nach seinen Angaben schwer geschädigtes Gewebe zur Reaktion gebracht werden kann, so war zu erwarten, daß für *nicht* ge-schädigtes Gewebe die Blut- und Plasmakultur weit bessere Bedin-gungen bietet als die übliche Gewebekultur.

*A. Frisches Gewebe.*

*1. Muskel vom Huhn-Embryo.* Kleine Stückchen vom Oberschenkel-muskel des Huhn-Embryo — also Gewebe mit guter Wachstumsten-denz — wurden in Citratplasma und Citratblut 48 Stunden bebrütet.



Abb. 19. Muskel, menschlicher Fetus. 48stündige Blutkultur, als Gewebekultur weitergeführt, nach 8 Tagen.

Die dann herausgenommenen Stückchen zeigten beim Mikroskopieren sämtlich keinerlei Wachstum. Um zu prüfen, ob während der Kulti-vierung in der Blut- oder Plasmakultur eine Wachstumsbereitschaft stärker angeregt worden ist, wurden die Stückchen dann noch als *Ge-webekulturen* angelegt.

Verglichen mit den Kontroll-Gewebekulturen, die erst nach 48stün-digem Aufenthalt des gleichen Ausgangsmaterials im Eisschrank an-gelegt wurden, ist der Unterschied allerdings außerordentlich, aber *zuungunsten* der Blut- und Plasmakultur! Während die Präparate der direkt als Gewebekulturen angelegten Serie nach 4 Tagen üppiges Wach-stum zeigten, war nach der gleichen Zeit bei den aus der Blut- und Plasma-kultur stammenden Kulturen nur ein ganz spärliches Wachstum vor-

handen. Bei stark verzögertem Angehen der Kulturen blieb das Wachstum auch weiterhin hinter dem der Kontrollen zurück. Die Zellen waren stark fettig infiltriert, zum Teil abgerundet.

2. *Skelettmuskel vom erwachsenen Huhn* (der in der üblichen Gewebekultur geringere Wachstumstendenz besitzt als embryonaler Muskel), wächst in der Blut- und Plasmakultur nicht etwa besser, sondern überhaupt nicht!

3. Auch von *menschlichem embryonalen Skelettmuskel* zeigten unter den gleichen Bedingungen die aus den Plasmakulturen stammenden



Abb. 20. Muskel, menschlicher Fetus. Kontrolle. Gewebekultur, nach 6 Tagen.

Gewebekulturen überhaupt kein Wachstum, die aus der Blutkultur nur sehr geringes Wachstum, wie Abb. 19 und 20 deutlich erkennen lassen.

#### *B. Gekochtes Gewebe.*

Ein Stückchen Hornhaut, das nach *Busse-Gravitz* durch 1 Min. langes Kochen nicht geschädigt werden soll, habe ich in mehreren Versuchen in der Blut- und Plasmakultur zur „Reaktion“ zu bringen versucht. Weder an der Oberfläche des Gewebestückchens, noch an den freien Rändern war irgendeine Veränderung wahrzunehmen, so daß man sich wirklich an Hand der Blut- und Plasmakulturen nicht davon überzeugen kann, daß das Kochen für das Gewebe *keine* Schädigung bedeuten soll. Ich habe auch hier mich nicht mit dem negativen Ergebnis der Blut- und Plasmakultur begnügt, sondern habe die Hornhautstückchen *nach* dem 48stündigen Aufenthalt in den Blut- und Plasmaröhrchen noch als Gewebekulturen angelegt, schon, um etwaige Veränderungen durch wiederholte mikroskopische Beobachtungen fest-

halten zu können, was ja bei der Blut- und Plasmakultur nicht möglich ist.



Abb. 21. Hornhaut, Kaninchen, 1 Min. gekocht. Plasmakultur, dann Gewebekultur.

Ein Stückchen Cornea, das nach 1 Min. langem Kochen zunächst 48 Stunden als Plasmakultur und dann als Gewebekultur gehalten

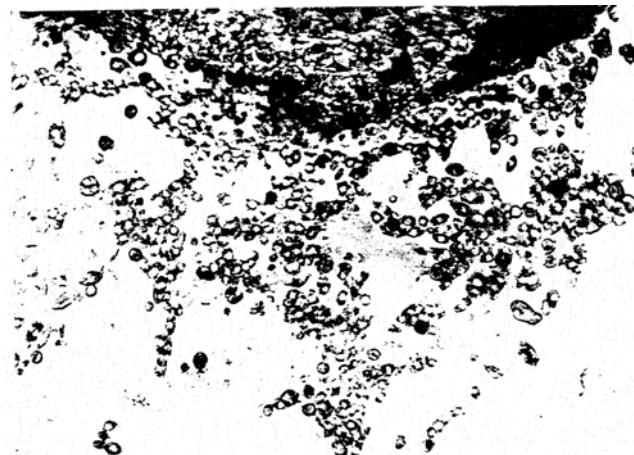


Abb. 22. Hornhaut, Kaninchen, frisch, Plasmakultur, dann Gewebekultur.

wurde, zeigte 6 Tage nach der Explantation im hängenden Tropfen das Aussehen, wie es die Abb. 21 wiedergibt. Der Vergleich mit einem ebenso behandelten, *frischen*, also nicht gekochten, Stückchen Cornea (Abb. 22)

zeigt deutlich den Unterschied zwischen der lebenden und der nicht lebenden Kultur. Den Unterschied zwischen der *Plasmakultur* und



Abb. 23. Hornhaut, Kaninchen, frisch, Gewebekultur.

*Gewebekultur* zeigt weiterhin der Vergleich mit Abb. 23: eine gleich alte *Gewebekultur* von einem frischen Stück Cornea.



Abb. 24. Hornhaut, Kaninchen, 1 Min. gekocht. Schnitt. Vergr. 200fach.

Von den Corneastückchen — frisch und gekocht — wurden nach dem 48stündigen Verweilen in der *Plasmakultur* Schnitte angefertigt,

um die von *Busse-Gravitz* angegebenen „Reaktionen“ verfolgen zu können.

Abb. 25 zeigt eine 1 Min. lang gekochte Hornhaut nach 48stündiger Plasmakultur im Schnitt. Abb. 24 zeigt die gekochte Hornhaut als Originalgewebe (also nicht in der Plasmakultur). Das Gewebe zeigt keinerlei Veränderungen, die auf „Lebensvorgänge“ in der gekochten Hornhaut schließen lassen könnten, nicht einmal die „Reaktionen“, die *Busse-Gravitz* als Beweis für die Widerstandsfähigkeit des Gewebes anführt.



Abb. 25. Hornhaut, Kaninchen, 1 Min. gekocht, 48stündige Plasmakultur. Schnitt. Vergr. 200fach.

Die Hornhautkörper sind in der Plasmakultur nicht größer, auch nicht zahlreicher geworden; im Gegenteil, sie sind kleiner und stellenweise so undeutlich, daß man sie als solche überhaupt schwer erkennen kann.

In der Arbeit von *Busse-Gravitz* über „Die Kultur von normaler und gekochter Hornhaut in Citratblut und Citratplasma“<sup>12</sup> sind leider keine Abbildungen der gekochten, *nicht* in Citratplasma kultivierten Hornhaut wiedergegeben, so daß ein Vergleich mit der Hornhaut *nach* der Plasmakultur nicht möglich ist.

#### Zusammenfassung.

Auf Grund der von *Busse-Gravitz* mitgeteilten Befunde, wonach das Gewebe gegenüber einer Reihe von Schädigungen eine unbegrenzte Widerstandsfähigkeit besitzen soll, wurde zunächst mit der Methode der Gewebekultur diese Widerstandsfähigkeit geprüft. Es ergab sich,

daß das Gewebe durch Vorbehandlung mit Formol, Sublimat, Alkohol in kürzester Zeit (einige Minuten) soweit geschädigt wird, daß die Explantate dieser Gewebe kein Wachstum mehr zeigen.

Kochen von 1 Min. Dauer zerstört die Wachstumsfähigkeit des Gewebes vollkommen.

Weiterhin wurde die vom *Busse-Granitz* angegebene „Reaktionsfähigkeit“ des Gewebes nach verschiedenen Schädigungen, die im Auftreten von Chromatinenschollen ihren Ausdruck finden soll, in der Plasma- und Blutkultur nachgeprüft, konnte aber nicht bestätigt werden.

Die Definition des „Lebens“ wird allerdings enger gefaßt und nicht auf das Vorhandensein von Chromatinbestandteilen beschränkt, sondern wird abhängig gemacht von den 3 Hauptkriterien der lebendigen Zelle: der Fähigkeit zur Gestaltung, Vermehrung und Funktion, und zwar der Zelle als *Einheit*, also nicht nur ihrer Einzelbestandteile.

---

#### Literatur.

<sup>1</sup> *Busse-Granitz*: Dtsch. med. Wschr. 1940 II, 857. — <sup>2</sup> *Busse-Granitz*: Arch. exper. Zellforsch. 24, 45, 122 (1940). — <sup>3</sup> *Krickeberg*: Bernatziksche Völkerkunde, 1938. — <sup>4</sup> *Tello*: Antiguo Peru. Editado por la Comision Organisadora del Segundo Congreso Sudamericano de Turismo. Lima 1929.

Photographische Aufnahmen: *H. Maas*.

---

---