

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
[Direktor: Geheimrat Prof. Dr. *Max Borst*].)

Leukocytenwanderung in vitro.

Von

Dozent Dr. J. Höra und Dr. med. H. Wohlgemuth.

Mit 17 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 7. Juli 1942.)

In experimentellen Arbeiten hat Höra ausführlich Stellung genommen zu den zahlreichen Bemühungen *Busse-Grawitz'*, der Schlummerzellentheorie des früheren Greifswalder Pathologen *Paul Grawitz* zu neuem Leben zu verhelfen. Es konnte die Behauptung widerlegt werden, daß in implantierten Hornhautstückchen, auch nach Umhüllung dieser Stückchen mit Kollodium, durch den „überernährenden Reiz“ der Lymphe des Wirtstieres Leukocyten sich aus Hornhautkörpern und -fasern entwickeln. *Busse-Grawitz'* (in folgendem *BGr.*) Ansichten erwiesen sich bei kritischer Betrachtung seiner Versuche als irrtümliche Deutung¹. Das ergibt sich vor allem, wenn man die zu untersuchenden Hornhäute mit einer Membran von bekannter Porengröße umhüllt, die durch ihre Struktur eine Einwanderung von Leukocyten aus der Umgebung sicher ausschließt (*Höra*).

Einen weiteren Beweis für die Einwanderung der in implantierten Hornhäuten auftretenden Zellen ergab die heterologe Implantation. Höra konnte in einer großen Versuchsreihe zeigen, daß z. B. in Mäusehornhäuten, die Kaninchen implantiert wurden, stets Kaninchenleukocyten auftraten, nie aber Mäuseleukocyten, wie man sie erwarten müßte, wenn sich die vorgefundenen Leukocyten in der Mäusehornhaut selbst bilden würden. Die auftretenden Zellen entsprechen also der Tierart des Wirtstieres, nicht der Tierart der zur Implantation verwendeten Hornhaut.

Die Folgerungen aus *BGr.*s Theorie vom zelligen Abbau beziehen sich auf die Lehre von der Herkunft der Entzündungszellen. Es wird behauptet, daß die bei entzündlichen Prozessen auftretende leukocytaire Infiltration nicht durch die Emigration dieser Zellen aus dem strömenden Blut zustande komme, sondern daß auch diese Leukocyten sich durch Überernährung im Gewebe entwickeln. *BGr.* bestreitet auf Grund seiner Versuche die Leukocytenwanderung überhaupt und sagt, daß eine Einwanderung von Leukocyten z. B. in die Hornhaut auch bei Anwesenheit von reichlich Leukocyten in der Umgebung nicht erfolgt. Zellen,

¹ Anmerkung bei der Korrektur: *R. Heinemann* lehnt auf Grund von Kontrollversuchen ebenfalls die Deutungen *BGr.*s ab [Beitr. path. Anat. 106 (1942)].

die z. B. bei der Implantation ganzer Augen in der Umgebung einer oberflächlichen Schnittwunde der Hornhaut auftreten, sollen dementsprechend keine eingewanderten Leukocyten sein, sondern sich aus Hornhautkörpern oder Fasersubstanz entwickelt haben. Es sind dies also die gleichen Behauptungen, die wir schon bei *Paul Grawitz* finden: die bekannten Spießfiguren, die in implantierten Hornhäuten auftreten, sollen nicht etwa eingewanderte Leukocyten sein, sondern nach *Paul Grawitz* soll zu sehen sein, wie die in der Hornhaut entstandenen Leukocyten aus der Hornhaut heraus in die zunächst leukocytenfreie Umgebung auswandern.

Bekanntlich will *BGr.* den „zelligen Abbau“ nicht nur in lebensfrisch entnommenen Geweben gefunden, sondern auch in erhitzten oder konservierten Geweben und in Mumiengeweben nachgewiesen haben (s. oben). Einer gründlichen Kritik halten solche Ansichten nicht stand, wie sich bei genauem Studium der *BGr.*schen Befunde zeigen läßt.

Neben der Implantationsmethode soll auch die Gewebeskultur geeignet sein, die Entstehung von Leukocyten aus Kernen und Grundsubstanzen der Hornhaut zu beweisen. *BGr.* glaubt die gleichen „Reaktionen“ auch dann gefunden zu haben, wenn er Hornhäute in Citratplasma kultivierte.

Die Methode der Citratplasmakultur wurde bereits von *H. Vollmar* nachgeprüft. *Vollmar* konnte die *BGr.*schen „Reaktionen“ (Entwicklung von Leukocyten aus Zellen und Grundsubstanzen der kultivierten Hornhäute) nicht erzielen. Die erhitzten, formfixierten usw. Hornhäute zeigten keine Lebenserscheinungen, ebensowenig wie vermittels der Carrelkultur Lebensvorgänge in solchen geschädigten oder abgetöteten Geweben nachgewiesen werden konnten.

Das Verhalten der Leukocyten *in vitro* ist wiederholt studiert worden (s. das Referat *Herzogs* in der Deutschen Pathologischen Gesellschaft München 1931). Die Arbeiten *Carrels*, *Maximows*, sowie spätere von *Walbach*, *Pires Soarez* u. a. behandeln aber vor allem Probleme wie Phagocytose, Weiterentwicklung der Leukocyten zu Monocyten und Fibroblasten. Weniger ist das Verhalten der Leukocyten zu Fremdkörpern oder anderen Geweben *in vitro* untersucht worden.

Bei unseren neuesten Versuchen kam es einmal darauf an, die von *BGr.* beschriebenen „Reaktionen“ in der Citratplasmakultur zu reproduzieren. Hier mußte das angegebene Verfahren möglichst genau wiederholt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, wie weit die Reaktionen *BGr.*s überhaupt von der Anwesenheit einer Nährflüssigkeit abhängig sind. Es lag also nahe, Parallelversuche anzustellen mit einer Lösung, bei der das Plasma durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt wurde.

In seiner Arbeit über die Citratplasmakultur behauptet *BGr.*, daß seine Reaktionen nur auftreten, wenn als Kulturflüssigkeit Citratplasma, also eine blutkörperchenfreie Flüssigkeit verwendet wird. Bei Kultur in Citratblut sollen die Reaktionen ausbleiben. Im Zusammenhang hiermit

behauptet *BGr.*, daß in solchen Kulturen niemals Leukocyten in die kultivierte Hornhaut einwandern. Wir stellten uns also die Aufgabe, auch die Verhältnisse bei der Kultur in ungerinnbar gemachtem Blut (z. B. Citratblut) systematisch zu untersuchen.

Gerade die bereits erwähnte Behauptung *BGr.s*: „Wenn man in vitro normale und geschädigte Gewebe zusammen mit Leukocyten bebrütet, wandern die Blutzellen niemals in die Gewebe ein“¹, müßte im Fall ihrer Bestätigung weittragende Bedeutung für unsere heutige Entzündungslehre haben. Andererseits wäre aber ein neuer wichtiger Beweis für die Herkunft der Entzündungszellen beigebracht, wenn sich die Wanderung der Leukocyten und vor allem ihr Eindringen in Gewebe in vitro zeigen ließe.

In vivo ist die Herkunft der Entzündungsleukocyten durch zahlreiche Experimente untersucht worden. Wir verweisen hier nur auf die umfangreichen Arbeiten *Fischer-Wasels'* und seiner Schüler oder die Untersuchungen *Löhleins* zur Ceratitisfrage. Das Hornhautgewebe ist infolge seiner Gefäßlosigkeit für Entzündungsversuche besonders geeignet. Es gibt bei der Implantation infolge seines übersichtlichen Baues sehr klare Resultate. Ebenso lassen sich die *in vitro* auftretenden Veränderungen an der menschlichen und tierischen Hornhaut besonders gut übersehen.

Als wir — im Gegensatz zu *BGr.* — das Einwandern von Leukocyten *in vitro* beobachten konnten, bemühten wir uns, die Bedingungen zu untersuchen, unter denen eine Einwanderung in die kultivierte Hornhaut erfolgt bzw. unterbleibt. Wir konnten nachweisen, daß physikalische Ursachen für den verschiedenen Ausfall der Versuche und auch für das Fehlen einer Einwanderung in den Citratblutkulturen *BGr.s* verantwortlich gemacht werden müssen.

Wir verwendeten zu unseren Versuchen formolfixierte Hornhäute. Nach *BGr.* töten ja unsere gebräuchlichen Fixierungsmittel (Formol, Alkohol, Sublimat, Hitze usw.) die Gewebe nicht ab, so daß auch in fixierten Geweben „Reaktionen“ zu erhalten sein sollen. Nach *BGr.* sollen die Hornhautkörper im geschädigten Gewebe einen „abortiven Abbau“ liefern, d. h. die Hornhautkörper wandeln sich nur teilweise zu fertigen Leukocyten um, „die Fasern bilden nicht überall Rundzellen, sondern kleinste kreisrunde Chromatinkugeln“². Wenn *BGr.s* Behauptungen zutreffen, dann müßte bei unseren Versuchen mit formolfixiertem Material diese „abortive Reaktion“ zu erhalten sein.

Wir untersuchten 101 Kulturen mit über 2000 histologischen Schnittpreparaten. Davon wurden 39 Kulturen (ungefähr 500 Schnitte) nach dem von *BGr.* hauptsächlich angewandten Citratplasmaverfahren durchgeführt. Die folgende Übersicht bringt eine gekürzte Zusammenstellung, der unsere ausführlichen Versuchsprotokolle zugrunde liegen.

¹ *Busse-Grawitz*: Z. exper. Med. 108, 249 (1940); dasselbe behauptet *BGr.* in der Schweiz. med. Wschr. 1942 I, 413.

² *Busse-Grawitz*: Z. exper. Med. 108, 257 (1940).

A. Citratplasmakultur nach Busse-Grawitz und Kontrollen.

1. Kaninchenhornhäute in menschlichem Citratplasma.
2. Kaninchenhornhäute in physiologischer NaCl-Lösung.
3. Kaninchenhornhäute in Citratkochsalzlösung.

Die Hornhäute eines an Phosphorvergiftung verendeten Kaninchens wurden 25 Tage in Formol fixiert, dann am Limbus von der Sklera getrennt und in 18 kleine Sektoren mit einer Bogenlänge von 1—2 mm und einen restlichen größeren zur Kontrolle zerschnitten.

Diese Hornhäute kamen 24 Stunden in sterile physiologische Kochsalzlösung, um das Formol auszuwaschen.

1. Von einem gesunden Menschen wurden 20 ccm Blut zu 4 ccm Natr. citr. acid.¹ entnommen und ständig unter sterilen Bedingungen $1\frac{1}{2}$ Stunden mit 3000 U zentrifugiert. Das völlig klare Plasma wurde vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und davon wurden je 2 ccm in 6 sterile Reagensgläser gefüllt. (Mehrere Ausstriche des restlichen Citratplasmas wurden gefärbt und enthielten keinerlei Zellen.) Jedes der Reagensgläser wurde mit je einem der oben beschriebenen Hornhautstreifen beschickt und wurde mit sterilen Mulltupfern verschlossen in den Brutschrank gestellt.

2. 6 weitere Reagensgläser enthielten als Kontrollversuch je einen Hornhautstreifen in steriler physiologischer NaCl-Lösung.

3. 6 andere Reagensgläser enthielten je einen Hornhautstreifen in 2 ccm einer Citratkochsalzlösung (entsprechend dem Citratblutversuch: zu 20 ccm steriler physiologischer NaCl-Lösung 4 ccm 3,8%iges Natr. citr. acid.).

Die Temperatur des Brutschranks war bei diesen Versuchsreihen nicht konstant zu halten; sie schwankte zwischen 24 und 42 Grad.

Die Hornhautstreifen blieben 1—6 Tage in den Kulturen. Von jedem Hornhautstreifen wurden nach erneuter Formolfixierung und Paraffineinbettung mehrere Schnitte in Längsrichtung angefertigt und mit H.-E. und nach *van Gieson* gefärbt.

Ergebnis. In einigen Schnitten sind die Hornhautkörper etwas größer und blasser, dann aber in gleicher Weise in der Mitte und am Rand der Hornhaut und unabhängig vom Medium, also im Kochsalzbad wie im Zitratplasma. Eine „Reaktion“ der Hornhaut, d. h. eine Entstehung von Zellen ist nicht nachzuweisen. Ein Unterschied im Verhalten der in Nährflüssigkeit (Zitratplasma) und der ohne Nährflüssigkeit (in physiologischer NaCl-Lösung bzw. in NaCl-Zitratlösung) kultivierten Hornhäute findet sich nicht.

B. Citratplasmakulturen und Blutkulturen.

a) Versuche mit menschlichem Blut usw.

1. Kaninchenhornhaut in menschlichem Citratplasma.
2. Kaninchenhornhaut in menschlichem Citratblut.
3. Kaninchenhornhaut in defibriniertem menschlichem Blut.

Kaninchenhornhaut, die 6 Tage in 10%igem Formol gelegen hat, wird einige Millimeter vom Limbus entfernt abgetrennt, um sie frei von Skleragewebe zu erhalten, und wird wie bei A in 18 kleine Sektoren und einen größeren Restsektor zerschnitten. Nach 2stündigem NaCl-Bad zur Beseitigung des Formols werden die Stückchen auf 18 sterile Reagensgläser verteilt.

¹ Die Citronensäure bildet 2 Natriumsalze. Wir verwendeten zunächst das saure Citrat. In den späteren Versuchen benützten wir dann auch das neutrale Salz, das in vorliegender Arbeit ausdrücklich als Natr. citr. neutrale bezeichnet ist.

1. Wie bei A werden zu 4 cem 3.8%igen Natr. citr. acid. 20 cem Blut steril von gesunden Menschen entnommen und mit 3000 U $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert. Das klare Citratplasma wird vorsichtig mit der Pipette abgesogen und auf 6 obiger Reagensgläser mit Hornhautstreifen verteilt.

2. 10 cem menschliches Blut werden zu 2 cem Natr. citr. acid. steril entnommen und gut geschüttelt ebenfalls auf 6 Reagensgläser mit Hornhautstreifen verteilt.

3. 10 cem Blut werden steril von gesundem Menschen entnommen und etwa 10 Min. in einem 50-cem-Erlenmeyerkolben mit Glasperlen kräftig geschüttelt. Die Glasperlen werden schnell von Fibrinmassen umgeben und bilden einen großen



Abb. 1. Ausgangsmaterial zur Versuchsreihe B. Formolfixierte Kaniichenhornhaut. Hornhautkörperchen, Fasern, Epithelüberzug sind deutlich dargestellt.

Klumpen. Das defibrinierte Blut wird mit einer Pipette auf die restlichen 6 Reagensgläser verteilt. Mit sterilen Tupfern verschlossen kommen die 18 Reagenzgläser 1—6 Tage in den Brutschrank mit konstanter Temperatur von 37 Grad.

Von jedem Hornhautstreifen werden dann 10—30 Paraffinschnitte senkrecht zum Radius angefertigt und mit H.-E. und nach *van Gieson* gefärbt.

Ergebnis. 1. Das Hornhautgewebe aus den Zitratplasmakulturen zeigt vom 1.—6. Tag keine Veränderungen im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Abb. 1). In einigen Schnitten sind die Hornhautkörper kleiner und stärker gefärbt und manchmal an einer Seite von den umgebenden Hornhautlamellen gelöst, so daß sie geschrumpft aussehen. Dies findet sich aber dann im ganzen Schnitt gleichmäßig, am Schnitttrand und in der Mitte. Formveränderungen, die als Umbildung der Hornhautkörper zu Leukocyten zu deuten wären, sind nicht nachweisbar.

2. Die Hornhautstreifen im Citratblut zeigen nach eintägiger Kultur an jedem Schnitt vereinzelte deutlich als Leukocyten erkennbare gelappt-kernige Zellen, die besonders an den Schnittträgern des Hornhaut-

streifens haften. Einige Leukocyten liegen bereits in den klaffenden Spalten zwischen den Lamellen.

Das Hornhautgewebe ist unverändert.

Nach 2tägiger Kultur liegen mehrere Leukocyten am Rand und in Spalträumen der Hornhaut (Abb. 2). Die meisten sind deutlich gelappt-kernig, stark gefärbt, einige zerfallen. Das Hornhautgewebe sieht genau so wie in den Kontrollschnitten aus.

Nach 3tägiger Kultur: Einige Hornhautbezirke, die stark aufgelockerte und klaffende Spalträume zwischen den Lamellen zeigen, enthalten in

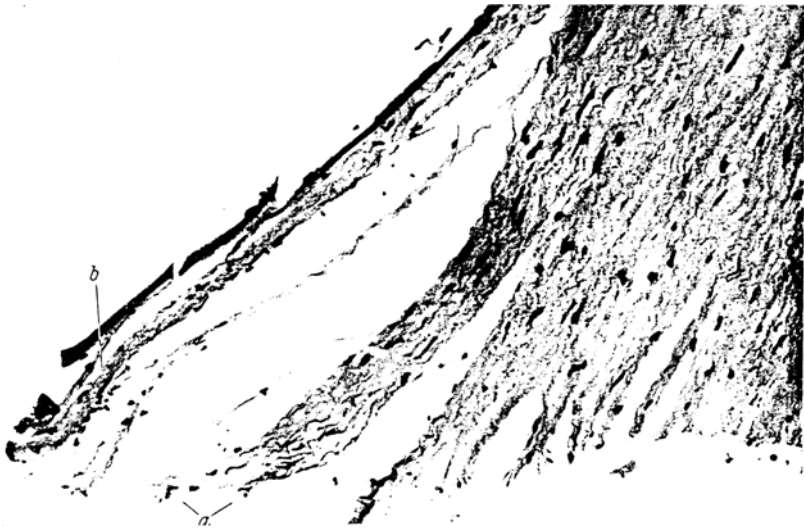


Abb. 2. Versuchsreihe B. Hornhaut nach 2tägiger Citratblutkultur. *a* einzelne Leukocyten am Schnitttrand. *b* kleiner Leukocytenspieß.

diesen bis tief in die Hornhaut hinein zahlreiche ganz deutlich erkennbare Leukocyten, meist an den Lamellen haftend, aber auch frei in den Spalten liegend. Die Hornhautkörper wie die Lamellen zeigen außer der Auflockerung keinerlei Veränderungen.

Nach 4tägiger Kultur (Abb. 3): Noch ausgeprägteres Bild wie in den vorigen Schnitten: Viele stark mit kleinen pyknotischen Zellen angefüllte „Spieße“, vom Schnitttrand in die Hornhaut eindringend und unter dem sich ablösenden Epithel. Diese Zellen sind aber immer noch deutlich als Leukocyten zu erkennen, wie auch nach 5- und 6tägiger Kultur (Abb. 4).

Auffällig war bei allen Präparaten, daß die Hornhautstückchen nur an einigen Stellen diese Einwanderung und Anhäufung von Leukocyten am Rand zeigten, während andere Schnitte gar keine oder nur ganz spärliche aufwiesen. Wahrscheinlich ist die später auch genauer untersuchte Schichtung des Blutes (s. S. 694) in den Kulturröhrchen hier

verantwortlich zu machen, so daß Teile der Hornhaut in leukocytenreicher, andere in leukocytenfreier Flüssigkeit zu liegen kommen.

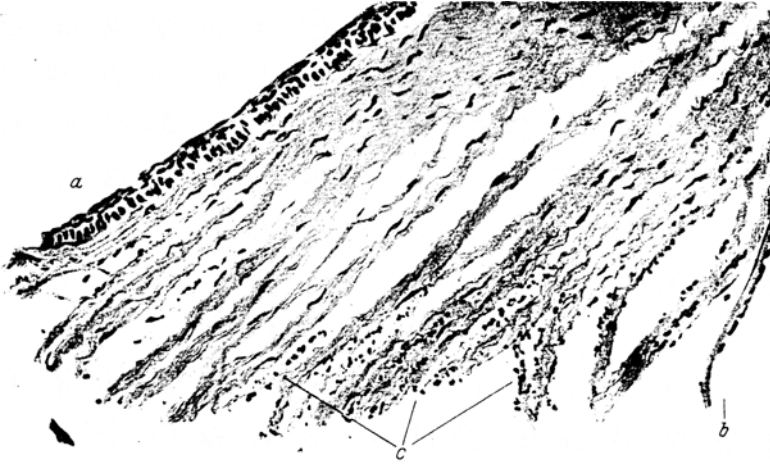


Abb. 3. Versuchsreihe B. Hornhaut nach 4tägiger Citratblutkultur. *a* vorderes Hornhautepithel und *Bowmansche* Membran. *b* *Descemetische* Membran und Kammerepithel. *c* zahlreiche Leukocytenspieße.

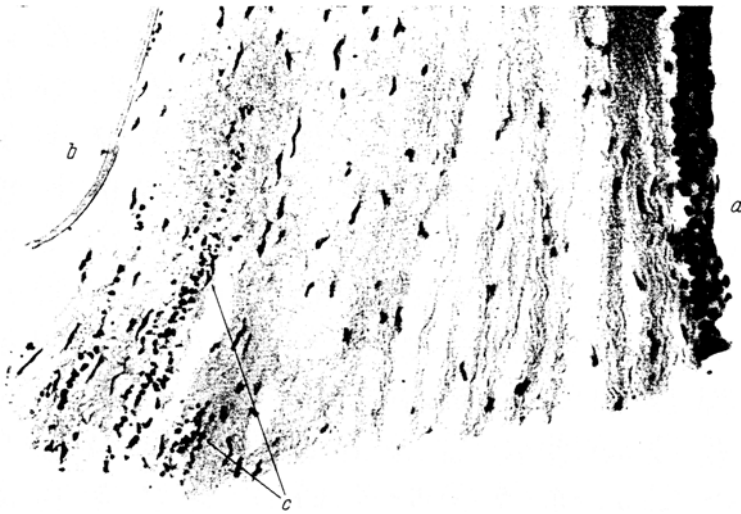


Abb. 4. Versuchsreihe B. Hornhaut nach 6tägiger Citratblutkultur. Bezeichnungen s. Abb. 3.

3. Kaninchenhornhäute in defibriniertem Menschenblut: Nach 1- und 2tägiger Kultur sind ganz vereinzelte Leukocyten am Rand der Hornhaut zu sehen.

Am 3. Tag erscheint die Hornhaut in vielen Schnitten völlig unberührt, in einigen haftet hier und da ein Leukocyt am Rand. Am 4. Tag keinerlei Zellen an oder in der völlig normalen Hornhaut.

Am 5. und 6. Tag liegen große geronnene Erythrocytenklumpen mit wenigen Leukocyten um den Hornhautstreifen. Das Hornhautgewebe sieht dem Ausgangsmaterial völlig gleich aus.

Dieser Unterschied zwischen den Ergebnissen der Versuchsreihen 2 und 3 veranlaßte uns, die Leukocyten in normalem, defibriniertem und Citratblut nach verschiedenen Zeiten zu zählen. Es ergaben sich folgende Zahlen:

	kurz nach der Entnahme	nach 42 St.	nach 66 St.
normales Blut:	9866		
Citratblut:	9150	9641	9050
defibrin. Blut:	3483	3313	2815

(Die Zahlen sind jeweils das Mittel von 3 bzw. 6 Zählungen.)

Nach 3 Tagen waren die Leukocyten in der Zählkammer nur sehr schwach zu sehen und nicht mehr zählbar. Das Blut wurde vor dem Zählen immer kräftig geschüttelt, um Zellen und Plasma gleichmäßig zu vermischen.

Das Fehlen von über 6000 Leukocyten/cmm im defibrinierten Blut klärten Schnitte vom Fibringerinnsel aus dem Erlenmeyerkolben, der zum Defibrinieren benutzt wurde, auf: Zwischen den Fibrinfäden befinden sich massenhaft Leukocyten neben den ebenfalls eingeschlossenen Erythrocyten. Es können daher im defibrinierten Blut kaum solche Anhäufungen und Einwanderungen von Leukocyten in Hornhaut wie im Citratblut beobachtet werden.

Diese Versuchsreihe erbrachte den Beweis, daß im Citratblut, entgegen der Meinung BGr.s, Leukocyten innerhalb der Hornhaut auftreten. Dabei konnten „Übergänge“ zwischen Hornhautkörpern und Leukocyten nicht beobachtet werden, so daß sich für eine Entstehung der Leukocyten aus der Hornhautsubstanz kein Anhalt ergibt. Die Zunahme der in den Hornhäuten vorhandenen Leukocyten bei längerer Kultur und die Beobachtung, daß zunächst immer nur reife, später schrumpfende Leukocyten auftreten, sprechen für Einwanderung der Leukocyten aus dem Kulturmedium, nicht aber für eine Neuentstehung aus der Hornhautsubstanz.

b) Versuche mit Kaninchenblut.

Schon die Versuchsreihe Ba 2 zeigte, daß Leukocyten, und zwar menschliche, aktiv in eine Kaninchenhornhaut eindringen. Es lag nahe, gewissermaßen die Versuchsanordnung umzukehren, d. h. als Kulturflüssigkeit Kaninchen Citratblut zu wählen und in diesem die Hornhaut des Menschen zu kultivieren. Da die polymorphkernigen Leukocyten des Menschen und des Kaninchens bekanntlich sich durch ihre Granulation unterscheiden lassen, war zu hoffen, daß in einem solchen „umgekehrten“ Versuch nunmehr in menschlicher Hornhaut Kaninchenleukocyten auftreten müßten. Bei heterologen Hornhautimplantationen war ja bereits der Beweis erbracht worden, daß die in implantierten Hornhäuten auftretenden Leukocyten immer der Tierart des Wirtstieres entsprechen, ganz unabhängig von der für die Implantate verwendeten Tierart (Höra).

Es wurde daher menschliche Hornhaut, die 72 Stunden in Formol fixiert und 1 Stunde in steriler Kochsalzlösung gelegen hatte, in 7 schmale Sektoren zerschnitten und auf 7 sterile Reagensgläser verteilt.

Das Kaninchenblut gerinnt viel leichter als Menschenblut. Es fordert mehr Citrat und oft tritt auch dann noch Gerinnung ein.

Zu dieser Versuchsreihe wurden 9 ccm Kaninchenblut mit 1 ccm 3,8%igem Natr. citr. acid. versetzt und gut geschüttelt auf die 7 Reagensgläser zu den Hornhäuten verteilt. Der Brutschrank war ständig 37 Grad warm. Die Reagensgläser wurden täglich mehrmals geschüttelt.

Ergebnis. In mehreren Röhrchen trat Gerinnung nach 1—2 Tagen ein.

Die $\frac{1}{2}$ tägige Kultur zeigt ganz vereinzelte Leukocyten am Rand der Hornhaut.

Die 1tägige Kultur zeigt ebenfalls besonders an den Schnittträgern vereinzelt Leukocyten.

Am 2. Tag ist die Hornhaut von Erythrocytenhaufen umgeben, an oder in der Hornhaut sind keine fremden Zellen oder Veränderungen des Gewebes zu sehen.

Am 3. Tag haften ganz spärlich Leukocyten am Rand.

Am 4., 5. und 6. Tag sind die Hornhäute wieder von geronnenen Blutklumpen umgeben, in denen die Leukocyten keinerlei Affinität zu der Hornhaut zeigen.

Allerdings ist in keinem Präparat eine eosinophile Granulation der Leukocyten festzustellen. Da die eosinophilen Granula der Kaninchenleukocyten aber sonst in formolfixiertem Gewebe gut als solche zu erkennen sind, muß angenommen werden, daß die Citratbehandlung die Färbbarkeit der Granula beeinflußt. Diese Kulturen sagten somit über das Verhalten der Leukocyten gar nichts aus, zeigten aber auch *keine Reaktionen* des Hornhautgewebes. Veränderungen an den Hornhautkörpern im Sinne *B.G.r.s* haben wir also nicht nachweisen können.

C. Tägliche Erneuerung des Kulturmediums.

Sämtliche Kulturen wurden bisher ohne Erneuerung des Plasma- bzw. Blutbades ausgeführt. Da nun ein ständig frisches Medium für Gewebereaktionen günstiger zu sein versprach, wurden neue Versuche mit Citratplasma angesetzt: *Kaninchenhornhaut in täglich erneuertem Citratplasma.*

Die Kaninchenhornhaut wurde wie bisher behandelt. Je ein Streifen kam in zellfreies menschliches Citratplasma (2 ccm Natr. citr. acid. zu 9 ccm Blut, $1\frac{1}{2}$ Stunden mit 3000 U zentrifugiert). Die Brutschranktemperatur betrug 37—38 Grad. Alle 48 Stunden wurde das Citratplasma durch frisches ersetzt. Nach $\frac{1}{2}$, 3, 4, 5, 6 und 11 Tagen Kultur wurden je eine Hornhaut in Paraffin gebettet und 10—15 H.-E.-Schnitte hergestellt.

Ergebnis. Sämtliche Schnitte vom $\frac{1}{2}$ —6. Tag zeigen weder an den Schnittträgern, noch an aufgelockerten und ausgefransten Stellen, noch in der Mitte irgendein anderes Bild als die Kontrollschnitte vom Ausgangsmaterial, also wiederum keine „Reaktion“ (Abb. 5 u. 6). Am 11. Tag sind die Hornhautkörper in allen Schnitten stark verblaßt, aber noch gut als solche erkennbar.

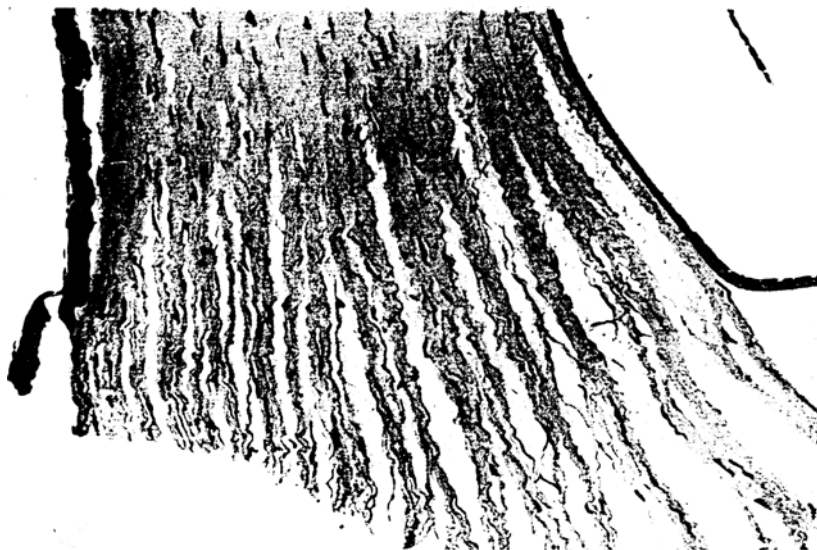


Abb. 5. Ausgangsmaterial zur Reihe C. Formolfixierte Kaninehnhornhaut.



Abb. 6. Versuchsreihe C. Hornhaut nach 3tägiger Citratplasmakultur (Methode Busse-Gravitz). Keine „Reaktion“ an den Hornhautkörpern nachweisbar, die als Umwandlung (abortiver Abbau) zu deuten wäre.

D. Ergänzung zur Reihe B.

$\frac{1}{2}$ tägige Citratplasma- und Citratblutkulturen.

Um keine Veränderungen zu übersehen, die vielleicht nur bei kurzfristigen Kulturen auftreten, wurden Hornhautstreifen (Kaninchen), die genau wie in den

bisherigen Kulturen vorbehandelt waren, nach 12stündiger Verweilzeit in menschlicher Citratplasma-, Citratblut- und fibrinfreier Blutkultur untersucht.

Ergebnis. 1. Die $\frac{1}{2}$ tägige Citratplasmakultur hat das Hornhautgewebe nicht verändert.

2. Die Hornhaut im defibrinierten Blut ist von Erythrocytenmassen umgeben, aber nicht verändert.

3. Die Citratblutkultur ergab ebenfalls Erythrocytenklumpen mit Leukocyten um die Hornhaut. An einigen Stellen jedoch einige Leukocyten am Schnitttrand haftend.

E. und F. Verhalten von Hornhautgewebe in arteigener Kulturflüssigkeit.

1. Menschliche Hornhaut in menschlichem Citratplasma.

2. Menschliche Hornhaut in menschlichem Citratblut.

3. Kaninchenhornhaut in Kaninchencitratplasma.

4. Kaninchenhornhaut in Kaninchencitratblut.

Die menschliche Hornhaut zu den Versuchsreihen 1 und 2 stammte von einem 12 Wochen alten Kind. Sie wurde wie in den bisherigen Versuchen behandelt.

Auch zu den Versuchsreihen 3 und 4 wurden die Kaninchenhornhäute wie in den bisherigen Versuchen behandelt.

Das Kaninchenblut wurde diesmal im Verhältnis 3 : 7 mit Natr. citr. acid. versetzt.

Von den 4 Reihen wurden $\frac{1}{2}$ —7tägige Kulturen untersucht. Paraffineinbettung und H.-E.-Färbungen.

Ergebnis. 1. *Menschliche Hornhaut in menschlichem Citratplasma.* Die Säuglingshornhaut zeigt im Ausgangsmaterial neben den schmalen dunkelgefärbten, spitz auslaufenden Hornhautkörperchen gewöhnlicher Hornhäute verschiedene, gleichmäßig über das ganze Bild verteilte Hornhautkörperchen, die größer, oval bis bandförmig, blasser gefärbt sind und eine feinkörnige Struktur aufweisen. Es sind aber zweifellos Hornhautkörper. Das völlig gleiche Bild zeigen die Kulturen von $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 5 und 6 Tagen.

In der Hornhaut aus der 3tägigen Plasmakultur sind sämtliche Hornhautkörperchen oval bis bandartig verbreitert, blasser gefärbt und zeigen eine ganz feine dunkle Körnelung.

2. *Alle menschlichen Hornhäute in menschlichem Citratblut* zeigen keine Veränderungen der Hornhautkörper im Vergleich zum Ausgangsmaterial.

Nach 1tägiger Kultur haften ganz vereinzelt Leukocyten am Rand der Hornhäute neben Erythrocyten.

Nach 2 Tagen liegen an manchen aufgelockerten Stellen wenige, aber deutlich erkennbare Leukocyten in den Spalten der Hornhaut und am Rand, während kaum Erythrocyten vorhanden sind.

Nach 3 Tagen enthält die Hornhaut in den Spalten viele deutliche gelapptkernige Leukocyten, während am Rand nur spärlich Erythrocyten liegen, so daß das Vorhandensein der Leukocyten nicht durch Einspülen erklärt werden kann.

Nach 4 Tagen sind die Hornhautkörper wieder, ganz gleichmäßig über den Schnitt verteilt, verbreitert und verblaßt. Am Rande undeutliche Leukocyten.

Am 5. und 6. Tag nur wenige, nicht sehr deutliche Leukocyten am Rand. Das Gewebe ist nicht verändert.

3. Sämtliche Präparate von $\frac{1}{2}$ —6tägiger Kultur der *Kaninchenhornhaut in Kaninchencitratplasma* zeigen das normale Bild einer Hornhaut mit unveränderten Lamellen und Hornhautkörpern.

4. Die *Kaninchencitratblutkulturen* der *Kaninchenhornhaut* gerannen wieder nach wenigen Tagen, so daß die Hornhautstreifen beim Herausnehmen von einer roten Schicht umgeben waren. Das Gewebe ist bei allen Hornhäuten unverändert.

Nach 3 Tagen haften in einigen Schnitten vereinzelte Leukocyten am Rand.

Nach 5 und 6 Tagen sind in dem geronnenen Blut um die Hornhäute gar keine Zellformen mehr erkennbar.

In den Kaninchencitratblutkulturen trat die Gerinnung vor allem in unmittelbarer Nachbarschaft der eingelegten Hornhaut auf. Das suchten wir zu vermeiden, indem wir in den folgenden Versuchen die Hornhautstreifen noch mit dem Citrat bzw. anderen gerinnungshemmenden Mitteln durchtränkten.

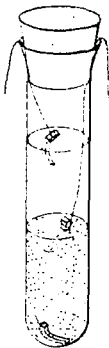


Abb. 7. Versuchsreihe G. Schematische Darstellung der Hornhautkultur in verschiedenen Schichten des Citratblutes.

G. Versuche mit verschiedenen gerinnungshemmenden Mitteln, Kultur in verschiedenen Schichten der Kulturflüssigkeit.

Die ergebnislosen Versuche mit dem Kaninchencitratblut und die nicht in jedem Versuch eindeutig erfolgte Einwanderung von Leukocyten aus menschlichem Blut erforderten neue Versuche.

a) Es mußte die Gerinnung des Kaninchenblutes verhindert werden.

b) Nach den bisherigen Ergebnissen war daran zu denken, daß sich die Leukocyten bei längerem Stehen des Citratblutes ihrem spezifischen Gewicht entsprechend an einem bestimmten Ort ansammeln, der für weitere Versuche festzustellen war. Wir brachten daher die Hornhautstückchen in verschiedene Schichten der Kulturflüssigkeit, indem wir sie mittels eines Fadens aufhängten (Abb. 7).

1. Menschliche Hornhaut in Kaninchencitratblut. a) Die Hornhaut hängt an einem Faden in der obersten Schicht. b) Die Hornhaut liegt am Boden des Reagensglases.

2. Menschliche Hornhaut in menschlichem Citratblut. a) Die Hornhaut hängt wie bei 1a in der obersten Schicht. b) Die Hornhaut liegt wie bei 1b am Boden des Glases.

3. Menschliche Hornhaut in Kaninchen-*Heparin*-Blut. a) Die Hornhaut hängt an einem Faden in der Trennungsschicht zwischen den Blutzellen und dem Plasma. b) Die Hornhaut liegt am Boden des Glases.

4. Kaninchenhornhaut in menschlichem *Heparin*-Blut. a) Die Hornhaut hängt wie bei 3a in der Trennungsschicht zwischen den Blutzellen und dem Plasma. b) Die Hornhaut liegt am Boden des Glases.

Die Hornhäute zu den Versuchen 1a, 1b, 2a, 2b wurden mehrere Tage in Formol fixiert, 18 Stunden in steriler Kochsalzlösung gespült und dann 24 Stunden in sterilem 3,8%igem *neutralen* Natr. citr. aufbewahrt, um auch die Hornhäute möglichst gerinnungshemmend zu machen. Ebenso wurden die menschlichen Hornhautstreifen in den Versuchen G 3a, 3b, 4a, 4b 24 Stunden in steriler Heparinlösung (20 Hemmungseinheiten/ccm) aufbewahrt. Vor dem Einbringen der Hornhäute in die Kulturen wurden sie noch einmal kurz in NaCl-Lösung gespült, um überschüssiges Citrat oder Heparin zu beseitigen.

Das Blut zu den Versuchsreihen 1 und 2 wurde wie bisher steril entnommen, jedoch mit neutralem Natr. citr. versetzt: zu 7 ccm Kaninchenblut, 3,5 ccm neutrales Citrat.

Das Blut zu den Versuchsreihen 3 und 4 wurde mit 20 Hemmungseinheiten pro Kubikzentimeter *Liquemin* (Heparin) Roche versetzt (1 ccm physiologische NaCl-Lösung mit 200 H.-E. zu 9 ccm menschlichem bzw. Kaninchenblut). Das menschliche Blut genau daraufhin nicht, das Kaninchenblut dagegen wieder nach wenigen Tagen.

Es wurden 1, 4 und 6tägige Kulturen untersucht.

Um bessere Blutfärbungen zu erhalten, wurden die Hornhautstreifen nach der Kultur in *Orthscher* Flüssigkeit fixiert.

Ergebnis. 1a und 2a. Die Hornhautstreifen aus den oberen Schichten zeigten am 1., 4. und 6. Tag keinerlei Veränderungen. Weder neue Gebilde noch veränderte Hornhautkörperchen finden sich in den von jeder Hornhaut hergestellten 30 Schnitten. Da die oberste Schicht auch bei Citratblutkultur nur aus Citratplasma besteht, entspricht also auch das Ergebnis dieses Versuches ganz dem einer Citratplasmakultur.

2b. Die Hornhäute aus der Bodenschicht des menschlichen Citratblutes zeigen nur ganz selten einen Leukocyten am Rand haften. Hornhautkörper und Lamellen zeigen keinerlei Reaktionen.

1b. Die 1tägige Kultur am Boden des Kaninchencitratblutes (Abb. 8) zeigt in einem Stück getroffener Sklera ganz deutlich mehrere Leukocyten mit eosinophilen Granula hintereinander in dem lockeren Gewebe liegen, während Vergleichsschnitte (Abb. 9) aus Plasmakulturen mit dem gleichen Skleragewebe völlig frei von eosinophilen Zellen sind. Nach 4 und 6 Tagen enthalten die Hornhäute keine fremden Zellen und zeigen selbst auch keine Reaktionen.

3a. Die Hornhäute, die in der Trennungsschicht zwischen Plasma und roten Blutzellen des Kaninchen-Heparinblutes hingen, sind am 1. und 6. Tag von zahlreichen Leukocyten umgeben. Daneben liegen geronnene Erythrocytenmassen, die ebenfalls zahlreiche Leukocyten einschließen. Die 4tägige Kultur war durch Verunreinigung faul geworden.

4a. Die Kaninchenhornhäute in der Trennungsschicht zwischen Erythrocyten und Plasma des menschlichen Heparinblutes (Abb. 10) zeigen nach 1tägiger Kultur massenhaft deutlich erkennbare Leukocyten an der Hornhaut und vom Schnitttrand her in Spalten eindringend, so daß typische Spießfiguren entstehen. Der 4. und 6. Tag zeigt dagegen kaum Ansammlungen von Leukocyten. Vermutlich sind bei diesen Hornhäuten nur Teile in den Schnitten getroffen worden, die entweder in das



Abb. 8. Versuchsreihe G. 8tägige Kaninchenserumkultur eines Gewebstückes vom Limbus corneae (Mensch). Im Gewebe mehrere eosinophile (Kaninchen-) Leukocyten.
a Hornhaut, b Skleustreifen, c Leukocyten.

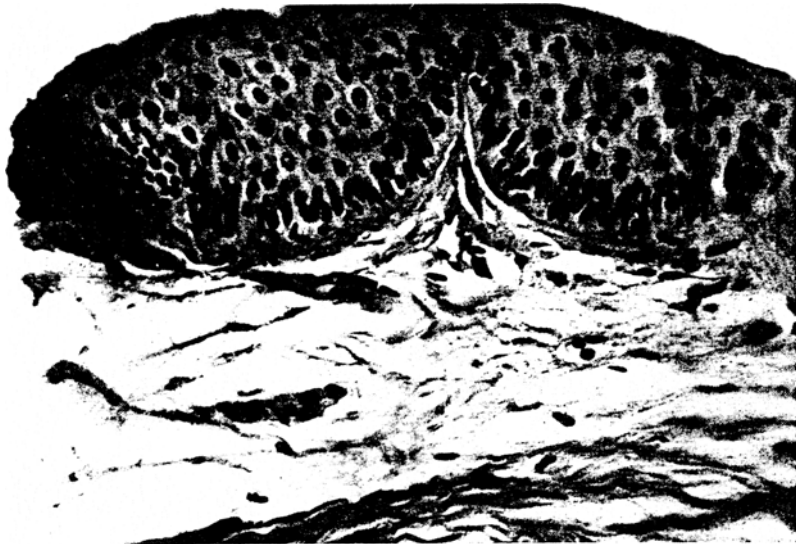


Abb. 9. Versuchsreihe G. Zum Vergleich mit Abb. 8: Das gleiche Hornhautmaterial nach mehrtägiger Citratplasmakultur. Keine Reaktion der Hornhautkörper. Auch die Sklera ist frei von Leukocyten.

zellfreie Plasma oder in die Erythrocyten am Boden des Reagensglases hineingeragt haben.

3b und 4b. Sämtliche Schnitte der Hornhäute aus der Bodenschicht der menschlichen und Kaninchen-Heparinblutkulturen zeigen außer ganz seltenen am Rand haftenden Leukocyten auch keinerlei andere Reaktionen der Hornhäute.

Aus der Versuchsreihe G geht hervor, daß eine Einwanderung von Leukocyten vor allem dann erfolgt, wenn das Hornhautstückchen in der Trennungsschicht von Plasma und Blutkörperchen liegt. Damit ergab sich die Forderung, die einzelnen Schichten des Kulturmediums nochmals auf ihren Leukocytengehalt zu untersuchen (s. Versuchsreihe J).

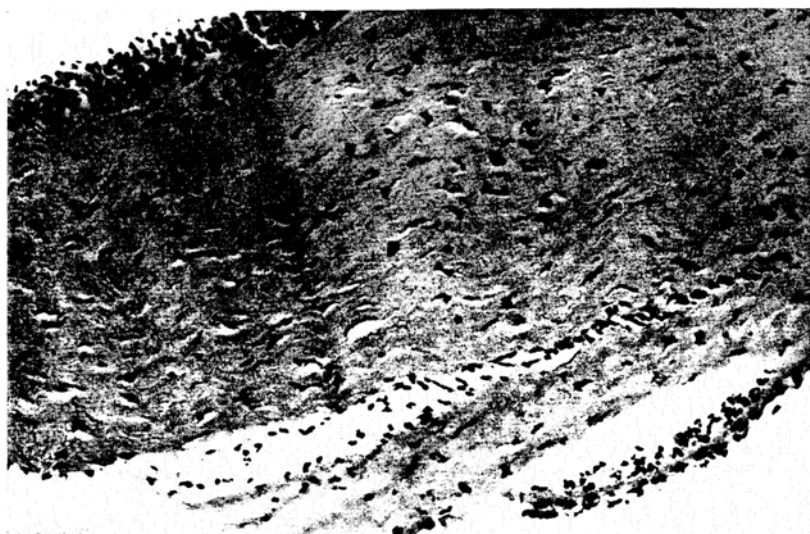


Abb. 10. Versuchsreihe G. Kaninchenhornhaut in menschlichem Heparinblut nach 1 Tag. Deutliche Leukocytenspieße.

H. Versuche mit vorbehandelter menschlicher Hornhaut.

Wir versuchten noch Kaninchencitratblutkulturen, nachdem die Hornhautstreifen 24 Stunden bzw. einen kurzen Moment in Terpentinöl gelegen hatten¹. Da die Hornhäute auch in diesen Versuchen meist am Boden des Reagenzglases lagen, wo sich gar keine Leukocyten befinden, erhielten wir nur 2 Zufallsergebnisse in den 1tägigen Kulturen.

Hier (Abb. 11) sind an einigen Stellen ganz deutliche eosinophile Leukocyten hintereinander in Hornhautspalten eingedrungen. Die übrigen Kulturen waren in bezug auf Leukocytenwanderung und auf zellige Reaktionen des Hornhautgewebes völlig ergebnislos.

J. Leukocytengehalt aus einzelnen Schichten des Kulturmediums.

Bei kalter Witterung gelang es, zentrifugiertes Citratblut im Reagenzglas zu gefrieren und mit Gefriermikrotom und gefrorenem Messer Längs-

¹ Die leukocytenanlockende Wirkung des Terpentins ist ja allgemein bekannt.

schnitte durch die Blutsäule herzustellen, ohne daß die dünnen Eisschnitte sofort in der Luft zerflossen. Dadurch konnte festgestellt werden,



Abb. 11. Versuchsreihe H. Mit Terpentin vorbehandelte menschliche Hornhaut nach eintägiger Kultur in Kaninchencitratblut. Einzelne Leukocyten (a) sind in Spalten eingedrungen.

daß sich die Leukocyten infolge Schichtbildung als dünnes Häutchen zwischen den am Boden liegenden Erythrocyten und dem darüber stehenden Plasma ansammeln (Abb. 12).

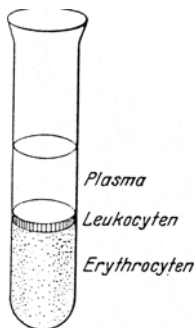


Abb. 12. Versuchsreihe J. Schichtung der Blutbestandteile in den Citratblutkulturen.

Mit dem Nachweis einer Leukocyten-schicht im Citratblut fanden die bisherigen unsicheren Ergebnisse der Blutkulturen mit teilweise ganz eindeutiger Leukocyten-einwanderung und teilweise völlig fehlenden Leukocyten ihre Erklärung. Um diese Schichtbildung zu begünstigen, wurden in weiteren Versuchen die Kulturröhrchen zentrifugiert.

K. Kultur mit Verwendung großer Mengen neutralen Natriumcitrats.

Menschliche Hornhaut in Kaninchencitratblut am Seidenfaden in der Leukocyten-schicht.

14 ccm Kaninchenblut und 6 ccm Natr. citr. neutr. 20 Min. 3500 U; 2 und 3 Tage Brutschrankkultur.

Ergebnis. Die Präparate zeigen weder Einwanderung von Blutzellen noch aus dem Gewebe entstehende Gebilde. Vielleicht ist der Mißerfolg so zu erklären, daß die großen Mengen von neutralem Natriumcitrat eine Schädigung der Kaninchenleukocyten bedingen.

L. Wiederholung des Versuches mit menschlicher Hornhaut in menschlichem Citratblut und Kanincheneitratblut.

Wir gewannen bei Versuchen mit menschlicher Hornhaut den Eindruck, daß durch die vorherige Formolfixierung das Gewebe stark schrumpft. Somit bestand die Möglichkeit, daß die zu nahe beieinanderliegenden Hornhautlamellen den Leukocyten gar keinen Raum zum Einwandern freilassen konnten. Um dies zu umgehen, suchten wir nunmehr die gewaschenen Hornhäute durch Zupfen mittels einer Nadel etwas aufzulockern.

Die Hornhaut wurde vor dem Fixieren in Formol zum Quellen in Wasser gelegt, dann in die üblichen Sektoren zerschnitten, vorsichtig gezupft und 24 Stunden in Natr. citr. neutr. gelegt.



Abb. 13. Versuchsreihe L. Menschliche Hornhaut in menschlichem Citratblut (3tägige Kultur). Zahlreiche einwandernde Leukocyten.

1. 4 cem Natr. citr. neutr. auf 16 cem menschliches Blut, gut geschüttelt und 20 Min. bei 3000 U zentrifugiert.

2. 6 cem Natr. citr. neutr. auf 14 cem Kaninchenblut, 20 Min. bei 3000 U zentrifugiert.

Hornhaut an Seidenfaden in Leukocyten-schicht.

1. und 2. je 3 Tage im Brutschrank.

Ergebnis. 1. Menschliche Hornhaut in menschlichem Citratblut: Die Schnitte zeigen massenhaft deutliche, gut gefärbte Leukocyten in den Spalten der sehr aufgelockerten Hornhaut. Stellenweise finden sich aber auch Erythrocyten, so daß das Bild nicht ganz eindeutig ist. In mehreren Präparaten sind jedoch massenhaft Leukocyten-spieße bis tief in die Hornhaut hinein in schmalen Spalten nachzuweisen, die deutlich eingewandert und nicht eingespült sind (Abb. 13).

2. Offenbar infolge des sehr großen Citratgehaltes trat Hämolyse ein. Keine Einwanderung von Zellen, aber auch keine Umwandlung der Hornhautkörper.

M. Kaninchenoxalatblutkultur, menschliche Hornhaut.

Da das Kaninchencitratblut meistens gerann, während das menschliche Citratblut befriedigende Ergebnisse brachte, versuchten wir die Gerinnung zu unterdrücken durch Na-Oxalat: Die menschliche Hornhaut (Abb. 14) wurde wie bisher vorbehandelt und gezupft, nur statt in Natr. citr. diesmal in Natriumoxalat (1,34%)

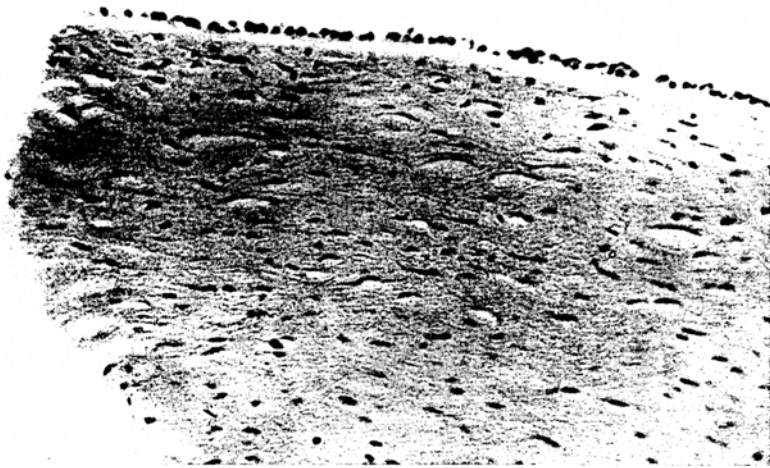


Abb. 14. Versuchsreihe M. Ausgangsmaterial.

gelegt, um eine Gerinnung des Blutes um die Hornhaut herum zu vermeiden. Dann wurden zweimal je 10 ccm Kaninchenblut mit 0,5 ccm 1,34%igem Natriumoxalat gut vermischt und in Spitzgläsern diesmal nur mit wenigen Umdrehungen und nur 5 Min. lang zentrifugiert. Hornhaut an Seidenfaden in Leukocytschicht.

Ergebnis. Kultur 1 (2 Tage [Abb. 15]) und Kultur 2 (3 Tage im Brutschrank [Abb. 16 u. 17]) ergaben massenhaft deutliche Leukocyten in allen Spalten der Hornhaut bis tief ins Innere hinein, während das Ausgangsmaterial völlig zellfrei ist. Mit diesem Versuch ist also nachgewiesen, daß auch die Kaninchenleukocyten ein formolfixiertes Hornhautstück zu infiltrieren vermögen.

In dieser Versuchsreihe — wie auch in früheren — bemühten wir uns, die Granulation der Leukocyten genauer darzustellen. Leider gelang das nicht in befriedigender Weise. Die für Blutdarstellung üblichen Spezialmethoden ergaben keine besseren Resultate. Schon bei Verwendung kleinerer Citratmengen, wie sie für menschliches Blut ausreichen, sind die Granula der Leukocyten schlecht zu erkennen. Lediglich in einem Versuch (G 1 b) fanden wir in der versehentlich der Hornhaut anhaftenden

Sklera Eosinophilie der Leukocytengranula. Bei allen Versuchen, die mit größeren Zitratmengen (Kaninchenblut) angesetzt waren, zeigten

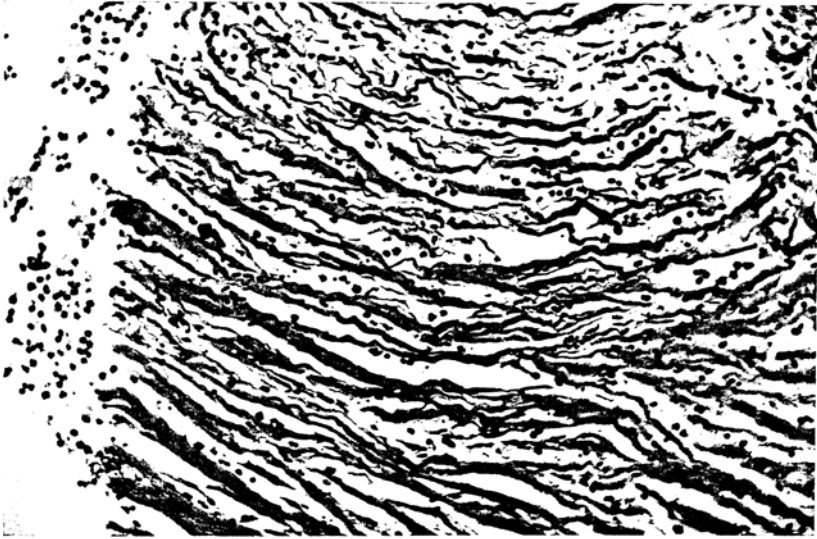


Abb. 15. Versuchsreihe M. Menschliche Hornhaut in Kaninchenoxalatblut (2 Tage). Massenhafte in die Hornhautspalten eindringende Leukocyten.



Abb. 16. Versuchsreihe M. Menschliche Hornhaut 3 Tage in Kaninchenoxalatblut kultiviert. Lange Leukocytenspieße.

die außerhalb der Hornhaut gelegenen, also der Kulturflüssigkeit angehörenden Leukocyten keine Eosinophilie, obwohl im Kaninchenblut ja

eosinophile Spezialleukocyten weitaus die häufigste Form der dort vorkommenden Granulocyten darstellen. Auch im Kaninchenoxalatblut ist die Eosinophilie der Granulocyten nicht mehr nachweisbar. Man könnte auf Grund dieser Tatsache bestreiten, daß die in den Hornhäuten vorhandenen Leukocyten dem Kaninchenoxalatblut entstammen. Wenn man aber bei Immersionsvergrößerung die Leukocyten unter starker Abblendung genau betrachtet, so hat man den Eindruck, daß die dann erkennbaren Granula in den Kaninchenleukocyten viel größer sind

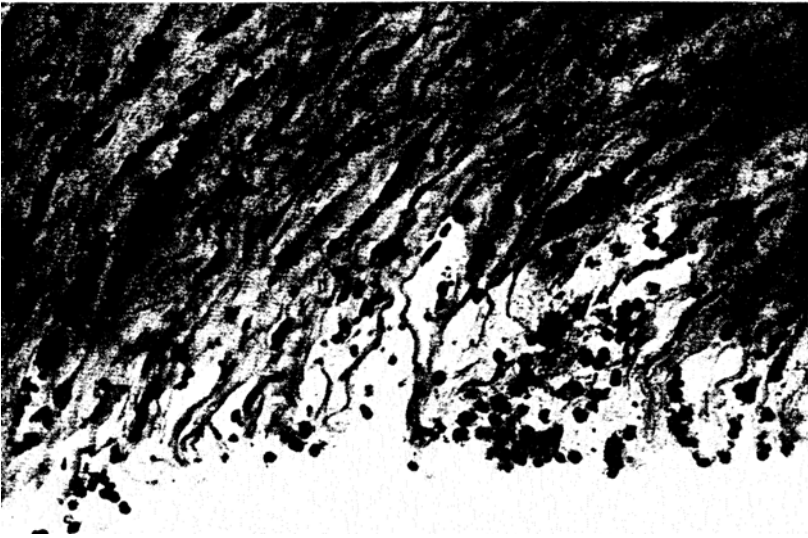


Abb. 17. Versuchsreihe M. Stärkere Vergrößerung der Abb. 16. Die gelappten Kerne der Leukocyten sind deutlich erkennbar.

als in vergleichsweise untersuchten Menschenleukocyten. Der beträchtliche Größenunterschied zwischen den Granula der Menschen- und Kaninchenspezialleukocyten ist aber aus der vergleichenden Hämatologie wohl bekannt (*Klieneberger*).

Übersicht.

In unseren Versuchsreihen konnte also gezeigt werden, daß bei sog. Citratplasmakultur eine Entstehung von Leukocyten oder ihrer Vorstufen aus Hornhautgewebe nicht stattfindet. In Citratplasma kultivierte Hornhäute verhalten sich genau so wie Hornhäute, die in Kochsalzlösung oder in Citratkochsalzlösung eingelegt werden.

Bei Kultur von Kaninchenhornhäuten in menschlichem Citratblut waren die Ergebnisse nicht immer eindeutig. Es fanden sich in einem Teil der Versuche Leukocyten innerhalb der Hornhäute. Wir konnten

aber zeigen, daß das unterschiedliche Ergebnis dieser Versuche davon abhing, in welche der sich im Citratblut bildenden Schichten die Hornhaut eingelegt wurde. Im Reagensglas senken sich die Erythrocyten des Citratblutes zu Boden (analog der Blutsenkungsreaktion). Über dieser Erythrocytenschicht findet sich ein feines Häutchen, das die Leukocyten enthält. Endlich ist die Leukocytenschicht überlagert von zellfreiem Citratplasma. Aus dieser Dreischichtung ergibt sich, daß einwandernde Leukocyten nur dann zu erwarten sind, wenn die Hornhaut in der leukocytenhaltigen mittleren Schicht der Kulturflüssigkeit liegt. Wir konnten dies in zahlreichen Versuchen zeigen und ebenso nach Belieben leukocytenfreie Hornhäute erzeugen, wenn wir die Hornhaut auf den Boden des Reagensglases oder in die oberste Schicht brachten. Schon durch diese willkürliche Beeinflußbarkeit des Versuches ist gezeigt, daß von einer Entstehung der Leukocyten in der Hornhaut keine Rede sein kann. Auch bestanden die in den Hornhäuten auftretenden Entzündungsspieße immer aus reifen Leukocyten, nicht aus den bekannten Vorstufen oder Gebilden, die man als sich entwickelnde Leukocyten hätte deuten können. Die Schichtbildung im Kulturmedium konnten wir auch histologisch sehr klar zeigen, als wir den Inhalt eines Kulturröhrchens zu einem Eisblock gefrieren ließen und als Ganzes auf dem Gefriermikrotom schnitten.

Es gelang ziemlich leicht, auf diese Weise menschliche Leukocyten in tierische und menschliche Hornhäute einwandern zu lassen. Unsere Versuche, Kaninchenleukocyten zum Einwandern zu bringen, schlugen zunächst fehl, weil Kaninchenblut mit der üblichen Menge von Natriumcitrat sich nicht ungerinnbar machen läßt. Erst als wir zur Gerinnungshemmung Natriumoxalat verwendeten, wanderten auch die Kaninchenleukocyten in die Hornhäute ein. Leider verändern die gerinnungshemmenden Substanzen die Leukocyten so stark, daß eine Granulafärbung nur unvollkommen gelingt. Eine Bestimmung der Tierart, von der die Leukocyten stammen, ist unter den angewendeten Versuchsbedingungen kaum möglich. Sie erübrigt sich aber, da das positive Ergebnis bei Einlegung in die Leukocytenschicht des Kulturmediums, negativer Ausfall bei Kultur in den leukocytenfreien Schichten ja schon eindeutig gegen eine Entstehung der Leukocyten aus der Hornhaut sprechen. Ebenso wenig wie bei Hornhautimplantation handelt es sich bei der Citratplasmakultur um ein Verfahren „reine Gewebsreaktionen“ zu erzeugen. Die in den implantierten Hornhäuten auftretenden Zellen stammen (*Hörs*) aus dem Wirtstier, und in den Citratblutkulturen werden die Infiltratzellen von der Kulturflüssigkeit geliefert.

Zusammenfassung.

Die Citratplasmakulturen von *Busse-Grawitz* sind kein Beweis für die Entstehung der Entzündungsleukocyten aus dem entzündeten Gewebe.

Unsere Citratplasmakulturen führten nie zur Entstehung von Leukocyten aus der eingelegten Hornhaut.

Wenn man Hornhäute aber in die durch Sedimentierung entstandene Leukocyten-schicht einer Citratblutkultur bringt, so bilden einwandernde Leukocyten innerhalb der Hornhaut die gleichen „Spießfiguren“, wie sie bei Implantationsversuchen und bei der experimentellen Keratitis so leicht zu erhalten sind. Kaninchenhornhaut, kultiviert in menschlichem Blut, und Menschenhornhaut, kultiviert in Kaninchenblut, geben bei Verwendung geeigneter gerinnungshemmender Substanzen völlig gleichartige Resultate.

Die Mikrophotogramme wurden mit der Contax aufgenommen. Frl. *Liesel Woernle* leistete uns bei den photographischen Arbeiten fachmännische Hilfe. Herrn Dr. *Marx* (chemische Abteilung des Pathologischen Instituts, Leiter Prof. *Dyckerhoff*) sind wir für seine Ratschläge zur Verhinderung der störenden Blutgerinnung zu Dank verpflichtet.

Anmerkung bei der Korrektur: Vorliegende Befunde wurden bei Verwendung formolfixierter Hornhäute erhoben. An unserem Institut hat *Kirschenhofer* die gleichen Kulturversuche mit frischem menschlichem und Kaninchenmaterial durchgeführt. Die Ergebnisse waren die gleichen, insbesondere waren auch hier keine Veränderungen an Zellen oder Fasern zu beobachten, die als Neubildung von Leukocyten gedeutet werden können. (*W. Kirschenhofer*: Diss. München, erscheint 1943.)

Literatur.

Busse-Gravitz, P.: Z. exper. Med. 108 (1940). — Arch. exper. Zellforsch. 24 (1940); 24 (1942). — Graefes Arch. 142 (1941). — Schweiz. med. Wschr. 1942. — *Fischer-Wasels, B.*: Klin. Wschr. 1928. — *Herzog*: Verh. dtsch. Ges. Path. 26 (1931). — *Höra, J.*: Z. Krebsforsch. 51 (1941). — Z. exper. Med. 108 (1941); 111 (1942). — *Löhlein, W.*: Arch. Augenheilk. 96 (1925). — *Pires Soares, J. M.*: Ref. Zbl. Path. 71 (1938). — *Vollmar, H.*: Virchows Arch. 307 (1941). — *Walbach, G.*: Ref. Zbl. Path. 71 (1938).
