

## Untersuchungen über Kälteeinwirkung auf explantiertes Gewebe.

Von

FR. BOEMKE, Dortmund und K. GAERTNER †.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Dezember 1944.)

Systematische Untersuchungen über die Einwirkung von tiefen Temperaturen auf explantiertes Gewebe liegen bisher nicht vor. Bei Durchsicht des Schrifttums finden sich nur einzelne Arbeiten, die zum Teil von besonderen Gesichtspunkten aus sich mit dem Verhalten bestimmter Gewebsarten bei niedrigen Temperaturen befassen. Nur explantiertes Geschwulstgewebe wurde in zahlreichen Arbeiten auf seine Kälteresistenz untersucht (KLINKE, CRAMER, KOOSE-LOMMEL, RÖSSLÉ, HÖRNER, HÖFER, MORIMOTO, AULER-KÖNIGER-SCHLOTTMANN-BYLINA-SCHMIDT, BREEDIS-FURTH, K. HERZOG).

Diese Untersuchungen wurden durch KLINKE zum Teil bei ungewöhnlich tiefen Temperaturen mittels flüssigen Stickstoffs ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) und flüssigen Wasserstoffs ( $-252^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt. Dabei wurde auch die Überlebensfähigkeit ausgereiften Normalgewebes berücksichtigt und festgestellt, daß auch nach ausgedehnter Einfrierung bis zu mehreren Tagen noch ein Auswachsen von Fibroplasten zustande kam. Mit ähnlichen Untersuchungen haben sich LAMBERT und HANES, NASU und BUCCIANTE befaßt. VERNE und ODIEUETTE stellten erstmals systematische Untersuchungen über die Frage der Wachstumsfähigkeit von Geweben an, die einige Zeit im Eisschrank in RINGER- oder Tyrodelösung aufgehoben waren und teilten mit, daß die Dauer des Überlebens bei Temperaturen zwischen 0 und  $1^{\circ}\text{C}$  von der Art des Gewebes abhängig ist.

TANNENBERG führte Untersuchungen über die Entwicklungspotenzen von Fibroplasten im Explantat durch. Fibroplasten-Reinkulturen wurden von ihm nach 1—2tägiger Bebrütung Zimmer- und Eisschranktemperaturen ausgesetzt und zeigten danach eine starke Verfettung, in späteren Stadien eine Auflösung in Einzelzellen. ALBERT FISCHER konnte zeigen, daß Kulturen von Warmblütergewebe bei Zimmertemperatur um  $20^{\circ}\text{C}$  über lange Zeit ohne Beeinträchtigung der Wachstumspotenzen aufgehoben werden können.

Wir stellten uns die Aufgabe, das Verhalten explantierten Gewebes von 8 und 16 Tage alten Hühnerembryonen und jungen Kaninchen systematisch unter Berücksichtigung der einzelnen Gewebsarten auf seine Kälteresistenz zu untersuchen. Dabei wurden die Kulturen unmittelbar einer Eisschranktemperatur ausgesetzt, die sich durch auto-

matische Regulierung konstant erhalten ließ. Eine Versuchsreihe wurde einer Temperatur von +1 bis +2° C, eine weitere Versuchsreihe einer Temperatur von —2° C ausgesetzt. Diese Temperaturen wirkten auf die Kulturen von 24—96 Stunden ein. Zur Explantation kamen folgende Gewebsarten: Herzmuskulatur von 8 Tage alten Hühnerembryonen, Skeletmuskulatur von 16 Tage alten Hühnerembryonen und Cornea von Kaninchen, um auch die Kälteresistenz reinen epithelialen Gewebes zu prüfen. Die von normalen Hühnerembryonen gewonnenen Kulturen wurden zunächst, um die ersten Wachstums-hemmungen in der Kultur auszuschalten und um möglichst reine Formen einzelner Gewebe im Explantat zu erhalten, mehr-mals umgesetzt. Die Versuche wurden an Geweben durchgeführt, die sich in der 3., 6., 7., 11., 15., 20., 21. und 25. Passage befanden. Bei Epithel von der Kaninchen-hornhaut wurde die 1. und 2. Passage benutzt, da dieses Gewebe von vornehmerein ein ausgesprochen epitheliales Wachstum zeigt. Zwischen den einzelnen Passagen bestand der übliche Zeitraum von 2 bis 4 Tagen.

Die ersten Untersuchungen befassen sich mit der Einwirkung von Gefrierschranktemperaturen auf Herzfibroplas-ten von einem 8 Tage alten Hühnerembryo. Die Untersuchungsergebnisse liegen in zahlreichen angestellten Versuchen gleich oder ähnlich, so daß die Beschreibung einzelner Kulturen als Beispiel für alle gelten kann. Für alle Untersuchungen wurden vom gleichen Ausgangsmaterial durch Teilung des Mutterstückes bei gleicher Bebrütungsdauer Kontrollkulturen angelegt, um Vergleichsmaterial für die Untersuchungsergebnisse zur Verfügung zu haben. Eine Kontrollkultur (515/1) von embryonalem Hühnerherzmuskel zeigt ein ausgesprochenes Fibroblastenwachs-tum, das in gleichmäßigen Verbänden vom Mutterstück in das Nähr-medium vorgedrungen ist. An der Peripherie zeigen die verflochtenen Zellverbände eine Auflockerung, einzelne Zellen wachsen hier spießförmig oder verästelt in das Nährmedium vor. Ihr Protoplasma zeigt gelegent-lich eine beginnende Verfettung. Auch Mitosen sind nachweisbar. Das

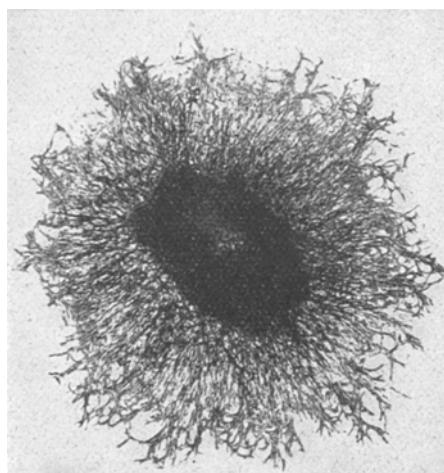


Abb. 1. 515/1. Kontrollkultur. Herzfibroblasten eines 8tägigen HE. 15. Passage, fortlaufend 96 Stunden bebrütet. Vergr. 1:10. Färbung nach MINCK.

Mutterstück zeigt im Zentrum eine beginnende Auflockerung, die Randzone in der unmittelbaren Umgebung des Mutterstückes ist noch dicht, ihr schließen sich konzentrisch geschichtete Fibroplasten an (s. Abb. 1).

Eine gleich alte vom gleichen Mutterstück stammende Kultur wurde nach dem Umsetzen zunächst 24 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet und anschließend für 12 Stunden einer Temperatur von  $+1$  bis  $+2^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt, dann 12 Stunden bei Zimmertemperatur (etwa  $18^{\circ}\text{C}$ ) aufgehoben, und schließlich erneut 42 Stunden bebrütet. Anschließend erfolgte die Fixierung und Färbung der gesamten Kultur mit MINCKSchem Hämatoxylin (515/2).

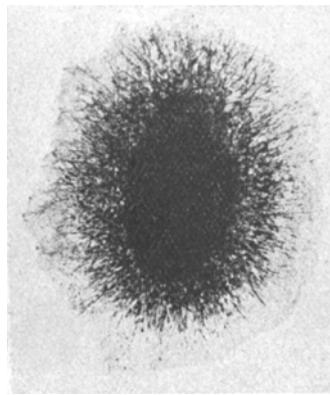


Abb. 2. 515/2. Kultur aus gleichem Mutterstück wie 515/1, wurde nach 24stündiger Bebrütung für 12 Stunden einer Temperatur von  $+1$  bis  $+2^{\circ}\text{C}$  und 12 Stunden einer solchen von  $+18^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt, anschließend wieder 42 Stunden bebrütet. Vergr.

1:10. Färbung nach MINCK.

Im Vergleich zu der eben beschriebenen fortlaufend bebrüteten Kultur findet sich eine deutliche Wachstums-hemmung. Es ist zwar ein gleichmäßiger Hof auswachsender Fibroplasten vorhanden, der jedoch nicht so breit ist wie im Kontrollpräparat. Das Mutterstück zeigt noch keine Aufhellung und nur an einer Seite eine beginnende konzentrische Schichtung der Fibroplasten. Im Wachstumshof fallen reichlich Mitosen auf. Das Zellprotoplasma ist noch nicht so stark verfettet wie in der Kontrollkultur, an den Zellen selbst lassen sich jedoch gegenüber der Kontrollkultur keine Veränderungen feststellen (siehe Abb. 2).

Man darf in solchen Bildern wohl nicht den Ausdruck der Kälte-wirkung an sich sehen, sondern muß vielmehr annehmen, daß, wie es durch die obengenannten Arbeiten bereits bekannt ist, bei Wegfall der Brutschranktemperatur überhaupt eine Einschränkung des Wachstums stattfindet. Damit tritt auch ein geringerer Verbrauch des Nähr-mediums ein, bzw. eine Hemmung des Fettstoffwechsels, so daß schließlich auch die Verfettung der Zellen hintangehalten wird. Die größere Anzahl der Mitosen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß das während der Kälteeinwirkung unterbrochene Wachstum bei der Bebrütung aufgeholt wird.

Auf ähnliche Befunde hat SPEAR hingewiesen, der Kulturen für 4 Stunden einer Temperatur von  $0,5^{\circ}\text{C}$  aussetzte und sie anschließend in den Brutschrank brachte. Dabei ergab eine Prüfung nach 6 Stunden zunehmend eine größere Mitosenzahl, wodurch nach der Annahme des Verfassers die zunächst gegenüber den Kontrollkulturen beobachtete Wachstumseinschränkung aufgeholt wird.

In gleicher Weise wurde Skelettmuskulatur von einem 16 Tage alten Hühnerembryo behandelt. Die Kulturen wurden bis zur 3. Passage in der üblichen Form umgesetzt und normal bebrütet (545/1 und 545/2). Die Kontrollkultur zeigt auch hier wiederum einen breiten Wachstumshof von Muskelfibroblasten von kleinerer Form mit starker Verflechtung. Das Mutterstück zeigt eine beginnende leichte Auflockerung und eine geschichtete Randzone. Die ausgewachsenen Zellen sind nur wenig verfettet, auch Mitosen finden sich nur relativ spärlich. In der Temperatur von +1 bis +2° C ausgesetzten Kultur fällt wiederum eine leichte Wachstumshemmung auf. Der Wachstumshof ist gegenüber der Kontrollkultur verschmäler. Auch hat noch keine deutliche konzentrische Schichtung der auswachsenden Fibroblasten um das Mutterstück eingesetzt. Ebenso ist noch keine deutliche Aufhellung des Mutterstückes erkennbar. Die ausgewachsenen Zellen sind noch dichter verflochten als in der Kontrolle, eine Verfettung der Zellen ist nicht nachweisbar. Dagegen finden sich in der äußersten Peripherie offenbar absterbende Zellen mit sehr breitem regellos begrenzten Protoplasma und plumpen, verklumpten Kernen.

In einem weiteren Versuch mit Gewebe von Skelettmuskulatur eines 16 Tage alten Hühnerembryos wurde so vorgegangen, daß mehrere Kulturen dann für 24 Stunden einer Temperatur von +1 bis +2° C ausgesetzt wurden (652/1, 652/2, 653/1, 653/2). Anschließend wurden diese Kulturen 96 Stunden bebrütet, dann fixiert und gefärbt. Die Kontrollen wurden durchgehend bebrütet.

Im Vergleich zu den Kontrollkulturen ergab sich zunächst ein völliger Stillstand des Wachstums, im weiteren Verlauf, bis etwa 48 Stunden nach der Bebrütung, noch eine erhebliche Wachstumshemmung, die jedoch dann nahezu aufgeholt wurde. Die Kontrollkulturen zeigen ein aufgehelltes Mutterstück mit dichter konzentrischer Schichtung der ausgewachsenen Fibroblasten unmittelbar am Rande des Mutterstückes und einer verflochtenen gleichmäßig breiten Wachstumszone mit einzelnen in Mitose befindlichen Zellen und ziemlich starker Verfettung der ausgewachsenen Fibroblasten. In mit Hämatoxylin-Scharlachrot gefärbten Kontrollkulturen tritt die starke Verfettung sehr schön hervor. Auffällig ist dabei, daß die Verfettung nach der Peripherie hin zunimmt, während das stark aufgehellte Mutterstück nur eine ganz feine Bestäubung der Zellen mit Fetttröpfchen erkennen läßt.

In den Versuchskulturen ist der Wachstumshof gegenüber der Kontrolle noch gering verschmäler. Im übrigen findet sich ein ähnliches Bild wie in der Kontrolle. Ein Unterschied ist lediglich am Mutterstück erkennbar, das noch nicht eine so deutliche Aufhellung und in seiner Umgebung auch noch keine deutliche konzentrische Schichtung der

ausgewachsenen Fibroplasten erkennen läßt. Auch die Verfettung ist etwas geringer und beschränkt sich auf die peripheren Anteile der Kultur.

Weiterhin wurden Kulturen von Skelettmuskulatur eines 8 Tage alten Hühnerembryo zunächst bis zur 6. Passage ohne Kälteeinwirkung behandelt. Nach der 6. Passage wurden die Versuchskulturen, nachdem sie in frisches Nährmedium umgesetzt waren, 1 Stunde bebrütet und dann für 48 Stunden der Eisschranktemperatur ausgesetzt (654/1, 654/2, 656/1, 656/2). Die Kontrollen wurden fortlaufend bebrütet. Bei den einer Temperatur von +1 bis +2° C ausgesetzten Kulturen trat ebenso wie bei den bisherigen Versuchen in der Kälte kein Wachstum ein. Auch nach dem Aufenthalt im Eisschrank war das Wachstum gegenüber den Kontrollkulturen im Vergleich zu den entsprechenden Zeiträumen zunächst gehemmt. Es bestand nach 48 Stunden Brutschranktemperatur ein Wachstumshof wie bei der Kontrollkultur nach 24stündiger Bebrütung. Dann erfolgte jedoch ein rasches Aufholen, allerdings blieb der Wachstumshof gegenüber den Vergleichskulturen immer etwas zurück. Die Kontrollkultur zeigt das oben schon wiederholt beschriebene Bild der zentralen Aufhellung des Mutterstückes mit konzentrischer Schichtung der dem Mutterstück unmittelbar anliegenden ausgewachsenen Fibroplasten, sowie einen Wachstumshof von vielfach verzweigten, stellenweise sehr dicht gelagerten Fibroplasten, die nach der Peripherie zunehmend Verfettung des Protoplasmas zeigen. Mitosen sind nur spärlich nachweisbar. In der Versuchskultur ist der Wachstumshof nur mehr unwesentlich kleiner. Die Aufhellung des Mutterstückes ist auch im Gange, aber noch nicht so weit vorgeschritten. Die Verfettung der peripheren Fibroplasten ist nicht so stark ausgebildet, auch hier fallen wieder reichlichere Mitosen auf. Im Untergang befindliche Zellformen oder sonstige auf eine besondere Schädigung der Kultur hinweisende Veränderungen sind nicht erkennbar. In den mit Hämatoxylin-Scharlachrot gefärbten Präparaten der gleichen Versuchsreihe ist die Verfettung der peripheren Zone in der Kontrollkultur sehr viel stärker vorhanden als in der Versuchskultur, die eine wesentlich feintropfigere und geringere Verfettung erkennen läßt. Die hochgradige Verfettung in der Kontrollkultur erklärt sich wohl daraus, daß bei gleichzeitiger Bebrütung 5 Tage — bis zur Beendigung des Versuches — nicht umgesetzt wurde.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden in der 21. Passage befindliche Herzmuskelkulturen von einem 8 Tage alten Hühnerembryo 96 Stunden einer Temperatur von +1 bis +2° C ausgesetzt, nachdem sie zunächst unmittelbar nach dem Umsetzen 1 Stunde bebrütet worden waren. Nach diesen 4 Tagen wurden die Kulturen in den Brutschrank gebracht und zeigten nach 24 und 48 Stunden keinerlei Zellwachstum mehr. Die Kontrollkulturen weisen das übliche wiederholt beschriebene

Bild auf: Aufhellung des Mutterstückes, konzentrische Fibroplastenschicht, breite Fibroplastenwachstumszone mit nach außen zunehmender stellenweise starker Verfettung der Zellen. Im Versuchspräparat sind keinerlei ausgewachsene Zellen erkennbar. Man sieht nur im Mutterstück einzelne feintropfig verfettete Zellen, zum Teil mit runden Kernen, Zellgrenzen sind in dem relativ dicken Mutterstück nur vereinzelt auszumachen, und zwar bei Zellen, die mehr einen spießförmigen Fibroblastentyp erkennen lassen. Stellenweise sieht es so aus, als ob sich im Mutterstück lymphocytäre Zellformen finden, ohne daß es sich natürlich um solche handelt. Offenbar ist im Mutter-



Abb. 3.

Abb. 3. 745/1. Kultur von Herzfibroplasten eines 8tägigen H.E. 21. Passage, wurde nach Umsetzen 1 Stunde bebrütet, anschließend 96 Stunden einer Temperatur von +1 bis +2°C ausgesetzt. Nach darauffolgender Bebrütung erfolgte kein Wachstum mehr. Vergr. 1:10. Färbung mit Hämatoxylin-Scharlachrot.

Abb. 4. 744/2. Kontrollkultur von gleicher Herkunft wie 745/1, wurde nach Umsetzen 120 Stunden fortlaufend bebrütet. Starke Verfettung der Zellen der Peripherie. Vergr. 1:10. Färbung mit Hämatoxylin-Scharlachrot.

stück eine Auflösung in Einzelzellen vor sich gegangen (745/1, 744/2, s. Abb. 3 und 4).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Kulturen von Herzfibroplasten von Hühnerembryonen in der 25. Passage nach dem Umsetzen zunächst 24 Stunden bebrütet (892/1, 892/2, 893/1, 893/2). Die Kontrollkulturen wurden auch weiterhin im Brutschrank belassen, die übrigen Kulturen dagegen für 24 Stunden in den Eisschrank (+1 bis +2°C) gebracht und dann erneut der Brutschranktemperatur ausgesetzt. Eine Wachstumshemmung bestand lediglich für die ersten 24 Stunden nach dem Aufenthalt im Gefrierschrank, danach holten die Gefrierkulturen die Kontrollkulturen im Hinblick auf die Ausdehnung der

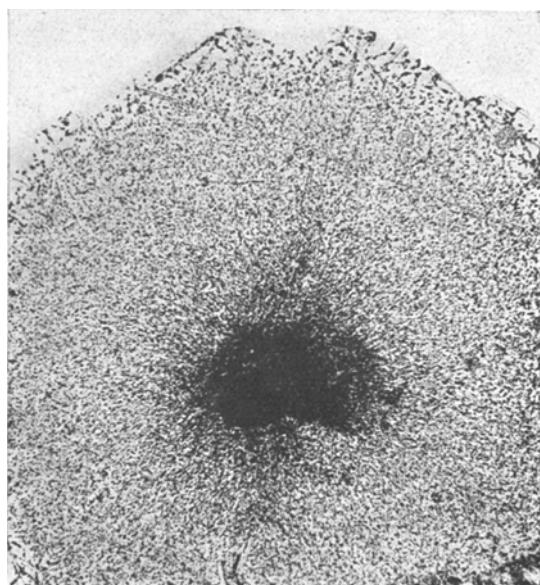


Abb. 4.

Wachstumszonen durchaus ein. Auch sonst sind gegenüber den Kontrollkulturen keine auffälligen Unterschiede nachweisbar. Die Verfettung der Zellen entspricht sich auch im wesentlichen. Lediglich die in Mitose befindlichen Fibroplasten scheinen in der Gefrierschrankkultur gegenüber der Kontrollkultur wiederum leicht vermehrt, aber nicht so auffällig wie bei den obenbeschriebenen Versuchen.

Bei Kulturen von Herzfibroplasten eines 8 Tage alten Hühnerembryos, die sich in der 25. Passage befanden, erfolgte nach dem Umsetzen eine 24stündige Bebrütung. Danach wurden die Kulturen 48 Stunden einer Temperatur von +1 bis +2° C ausgesetzt und dann 96 Stunden lang erneut bebrütet. Die Kontrollkulturen zeigen das übliche Bild des zum Teil aufgehellten Mutterstückes mit einem dichten, dem Mutterstück unmittelbar anliegenden Fibroplastenfilz und einem gleichmäßig breiten, sich nach der Peripherie hin auflöckernden Wachstumshof von Fibroplasten. Die einzelnen Zellen zeigen nach der Peripherie zunehmend eine starke Verfettung (895/2). Die im Eisschrank behandelten Kulturen blieben zunächst nach der Einwirkung der niederen Temperatur im Wachstum leicht zurück, holten jedoch im weiteren Verlauf die Kontrollkultur, was die Ausdehnung des Wachstumshofes angeht, durchaus ein. Besondere Zellschädigungen sind ebenso wie in den bisher besprochenen Kulturen nicht feststellbar. Auch die Zahl der Mitosen erscheint nicht übermäßig reichlich. Diese Tatsache findet vielleicht ihre Begründung darin, daß nach der Einwirkung der niedrigen Temperatur noch genügend lange die Brutschranktemperatur einwirkte, so daß im Vergleich zur Kontrolle ein gewisser Ausgleich im Wachstum erfolgen konnte.

Eine gleichartig behandelte Kultur dieser Versuchsreihe zeigte allerdings schwerste regressive Veränderungen an den ausgewachsenen Fibroplasten (894/1). Die ausgewachsenen Zellen sind vielfach abgerundet, die Kerne pyknotisch, das Protoplasma erscheint schollig. Nur vereinzelt sind noch ausgesprochene Fibroplastenformen nachweisbar, die jedoch auch degenerative Vorgänge erkennen lassen, zum Teil sind sie aufgeblättert und zeigen einen verklumpten Kern. Vielfach finden sich auch Kerntrümmer im Wachstumshof. Der Zellverband als solcher ist zerstört. Die Gründe, die für das unterschiedliche Verhalten gleichartig behandelter Kulturen gegenüber der Kälteeinwirkung maßgebend waren, lassen sich nicht übersehen.

Weitere Kulturen von Herzfibroplasten eines 8tägigen Hühnerembryos wurden genau so behandelt, nur konnte die Temperatur von +1 bis +2° C statt 48, 96 Stunden einwirken. Bei dauernder Kontrolle dieser Kulturen wurde festgestellt, daß nach 48 Stunden das Wachstum wie üblich sistierte. Ein Zelluntergang war aber noch nicht festzustellen. Erst nach weiteren 24 Stunden sah man in der Peripherie

des Wachstumshofes eine Auflösung in Einzelzellen, welche vielfach plump und feingranuliert waren. Nach 96 Stunden wurden die Kulturen wieder wie die vorangegangenen in den Brutschrank gebracht und 48 Stunden dort belassen. Die Kontrollen wurden fortlaufend bebrütet (896/1, 896/2, 897/1, 897/2). Nach der Bebrütung trat jedoch nunmehr kein Wachstum in der Kultur ein. Die Kulturen waren also bereits abgestorben. Neben noch erkennbaren Fibroblastenzügen finden sich überall absterbende Zellformen, die stellenweise noch in Verbänden zusammenliegen und dann vor allem in der Peripherie zum Teil geradezu epithelartig aussehen. Die Zellen sind groß, unregelmäßig geformt, zum Teil rundlich, zum Teil polygonal, zeigen vielfach dicke chromatophile verklumpte Kerne, vielfach ist auch nur noch schattenhaft ein Kern nachweisbar. Manche Zellen sind besonders groß und offenbar im Zerfall begriffen. Häufig sieht man auch Kerntrümmer isoliert im Wachstumshof. Im Hämatoxylin-Scharlachrot-Präparat sind einzelne mit Fetttröpfchen beladene Zellen nachweisbar. Vor allem die noch erhaltenen Fibroplasten in der Peripherie zeigen in ihrem Protoplasma Ablagerungen von feinen Fetttröpfchen, aber auch im Protoplasma bereits untergegangener abgerundeter Zellen sind Fetttröpfchen vorhanden. Die Kontrollkulturen zeigen das übliche Bild ohne besondere Auffälligkeiten mit einem breiten Wachstumshof, verfetteten Zellen und Auflockerung des Mutterstückes.

Die gleiche Versuchsanordnung wurde bei Kulturen von Herzfibroblasten der 9. Passage getroffen (298/1, 298/2, 299/1, 299/2). Auch hier war nach 72 Stunden eine beginnende Auflösung des Fibroplastenkranzes in Einzelzellen zu beobachten, die in den nächsten 24 Stunden weiter fortschritt. Nach anschließender Bebrütung erfolgte gleichfalls kein Wachstum mehr. Die fixierten und gefärbten Kulturen zeigen die beschriebenen Bilder, schwere Zellschädigungen, die den besprochenen durchaus gleichen. Solche Bilder stimmen mit den Untersuchungsergebnissen von TANNENBERG überein. Es handelt sich bei den geschädigten Zellen zweifellos um Fibroplasten, die eine gewisse Ähnlichkeit mit Makrophagen haben.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden, wie bereits oben kurz erwähnt, die Kulturen jeweils einer konstanten Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt.

Herzmuskulatur von einem 8 Tage alten Hühnerembryo wurde nach der 6. Passage 24 Stunden bebrütet und dann 24 Stunden der Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt. Danach wurde eine Kultur (2653/1) unmittelbar fixiert, zwei weitere wurden anschließend je 48 Stunden bebrütet. Die unmittelbar nach der Entnahme aus dem Eisschrank fixierte Kultur zeigt einen ausgedehnten Untergang der ausgewachsenen Fibroplasten mit Abrundung der Zellen und Pyknose der Kerne. Die

Zellen haben sich aus ihrem Verband vielfach gelöst, sind aber alle noch gut kernfärbbar. In der unmittelbaren Umgebung des Mutterstückes finden sich neben abgestorbenen Zellformen jedoch auch noch zahlreiche gut erhaltene Fibroplastenzüge. Die fortlaufend bebrütete Kontrollkultur (2653/2) zeigt eine breite, normal entwickelte Fibroplastenzone, die in der unmittelbaren Umgebung des Mutterstückes besonders dicht ist und nach der Peripherie hin sich zunehmend auflockert. Die nach dem Einwirken der Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  erneut 48 Stunden

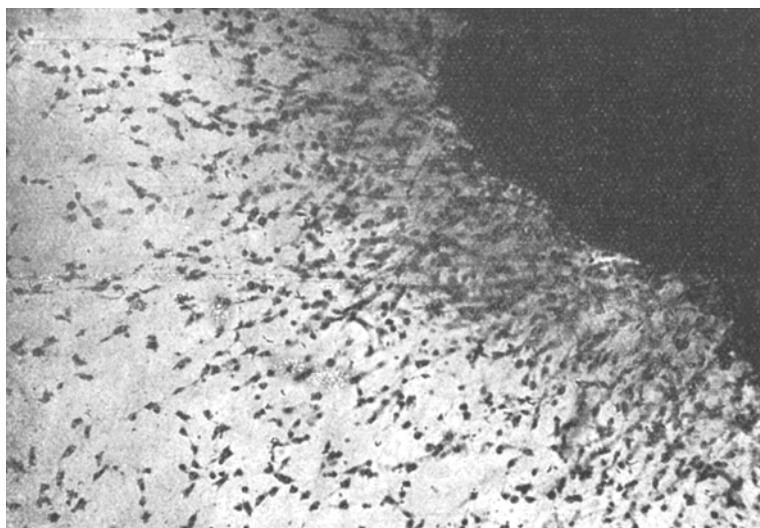


Abb. 5. 2650/1. Ausschnitt aus Kultur von Herzfibroplasten eines 8tägigen HE., 11. Passage. Kultur wurde nach 24stündiger Bebrütung einer Temperatur von  $-1^{\circ}$  bis  $-2^{\circ}\text{C}$  48 Stunden ausgesetzt, anschließend 24 Stunden erneut bebrütet. Es erfolgte kein Wachstum mehr, Auflösung des Zellverbandes mit Zelluntergang. Vergr. 1: 98. Färbung nach MINCK.

bebrüteten Kulturen (2654/1, 2655/1) zeigten nach 24 Stunden noch keinerlei Wachstum. Nach 48 Stunden trat jedoch eine Erholung der Kulturen und ein neues Auswachsen von Fibroblasten ein. Im Wachstumshof finden sich aber neben den neu ausgewachsenen Fibroplastenzügen zahlreiche Degenerationsformen von Fibroblasten, abgerundeten Zellen mit pyknotischen und vacuolisierten Kernen, sowie Kernrümmer. Die neugebildeten Fibroblasten zeigen relativ zahlreiche Mitosen und nach der Peripherie hin zunehmend eine starke Verfettung. Die Kontrollkulturen, die fortlaufend 48 Stunden bebrütet wurden, lassen, abgesehen von einer Verfettung der Zellen, keine auffälligen Besonderheiten erkennen.

Eine weitere Serie von Kulturen des gleichen Ausgangsgewebes durchlief vor den Versuchen zum Teil 6, zum Teil 11 Passagen und

wurde wie folgt behandelt: Die Kulturen wurden nach dem Umsetzen 24 Stunden bebrütet, dann der Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  48 Stunden ausgesetzt, anschließend wurde eine der Kulturen fixiert, die übrigen wieder 48 Stunden in den Brutschrank gebracht. Der Wachstumshof der unmittelbar nach der Kälteeinwirkung fixierten Kultur besteht fast nur noch aus schwer geschädigten Fibroblasten, die sich aus dem Gewebsverband gelöst haben (2649/1). Die Kontrollkultur, die 48 Stunden bebrütet wurde, zeigt bei weitgehender Auflockerung des Mutter-

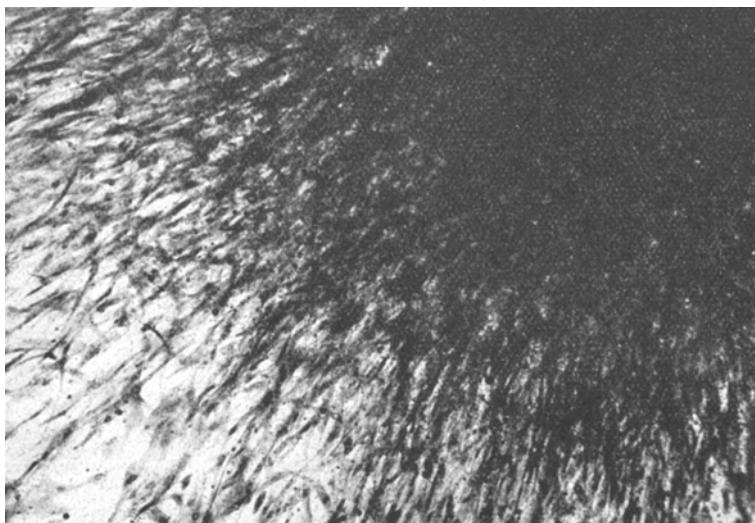


Abb. 6. 2650/2. Ausschnitt aus Kontrollkultur zu 2650/1, die fortlaufend 48 Stunden bebrütet wurde. Vergr. 1:98. Färbung nach MINCK.

stückes einen breiten, vielfach verzweigten Wachstumshof von Fibroblasten (2649/2). Bei den erneut bebrüteten Kulturen trat ein Wachstum nicht mehr ein, die Zellen haben sich nunmehr weitgehend aus dem Gewebsverband gelöst und erinnern überhaupt nicht mehr an Fibroblasten, sondern vielfach an lymphocytäre Zellformen, zum Teil auch an Makrophagen, ohne daß es sich natürlich um solche handelt (2650/1, s. Abb. 5). Die Kontrollkulturen, die 48 Stunden bebrütet wurden, zeigen das übliche, normale Bild (2650/2, s. Abb. 6).

Das gleiche Ergebnis wurde in einer Serie erzielt, in der mehrere Kulturen von Herzmuskelfibroblasten von einem 8 Tage alten Hühnerembryo nach der 6. Passage in vier gleiche Stücke aufgeteilt worden waren. Diese Stücke wurden zunächst 24 Stunden bebrütet und zeigten durchweg ein normales Fibroblastenwachstum, das sich bei allen 4 Stücken entsprach (1960/1—4, 1961/1—4, 1962/1—4, 1963/1—4). Nach der Bebrütung wurde Teilkultur 1 48 Stunden, die Teilkulturen 2 und 3 je

72 Stunden einer Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt. Nach Entnahme aus dem Eisschrank wurde die Teilkultur 1 sofort fixiert, ebenso die Teilkultur 2, während die Teilkultur 3 48 Stunden erneut bebrütet wurde. Die Teilkultur 1 zeigt bei der Untersuchung eine Auflösung der ausgewachsenen Fibroplasten in Einzelzellen mit Abrundung und Verklumpung der Kerne. Vielfach haben sich die Zellen völlig aus ihrem Wachstumsverband losgelöst. Das Mutterstück ist aufgehellt und zeigt

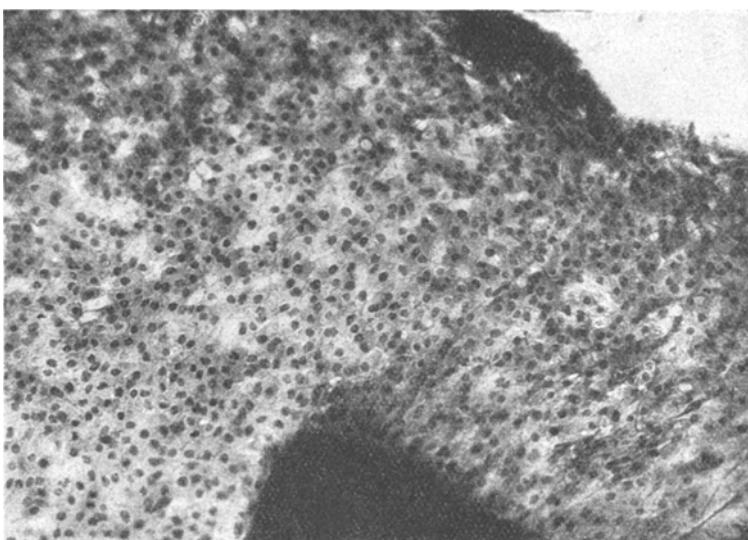


Abb. 7. 2115. Ausschnitt aus Kultur von Cornea eines jungen Kaninchens. Normales Epithelwachstum in geschlossener Membran. Vergr. 1:98. Färbung nach MINCK.

einen aufgelockerten Filz von Fibroplasten am Rand. Im mit Hämatoxylin-Scharlachrot gefärbten Schnitt ist eine leichte Verfettung der Zellen auch im Mutterstück erkennbar, die jedoch nicht besonders hochgradig ist. Die Teilkultur 2 lässt eine starke Auflockerung des Wachstumsverbandes und vorgesetzte regressive Veränderungen an den Zellen erkennen. Die Kernfärbbarkeit der Zellen ist zum Teil bereits erheblich beeinträchtigt, vielfach finden sich nur noch schattenhaft erkennbare Konturen untergegangener Fibroplasten. Die Verfettung entspricht dem Grade der Teilkultur 1. In der Teilkultur 3, die nach 72stündiger Kälteeinwirkung nochmal 48 Stunden bebrütet wurde, ist gegenüber der Teilkultur 2 ein weiter fortgeschritten Untergang der Fibroplasten erkennbar. Offenbar ist es durch die Kälteeinwirkung zum völligen Zelltod gekommen. Im Mutterstück erkennt man deutlich zahlreiche abgerundete große Zellformen mit pyknotischem Kern, offenbar untergegangene Fibroplasten. Die Teilkultur 4, die als Kontrolle fortlaufend 96 Stunden bebrütet wurde, zeigt bei fast völliger

Auflockerung des Mutterstückes einen breiten Wachstumshof von Fibroplasten, die sich nach der Peripherie hin vielfach auflockern und verzweigen und vor allem in den peripheren Bezirken eine sehr starke Verfettung erkennen lassen. Ein Vergleich dieser Kultur mit den der Kälte ausgesetzten Kulturen zeigt besonders deutlich, wie weitgehend in den Kältekulturen die Fibroplasten geschädigt und zugrunde gegangen sind.

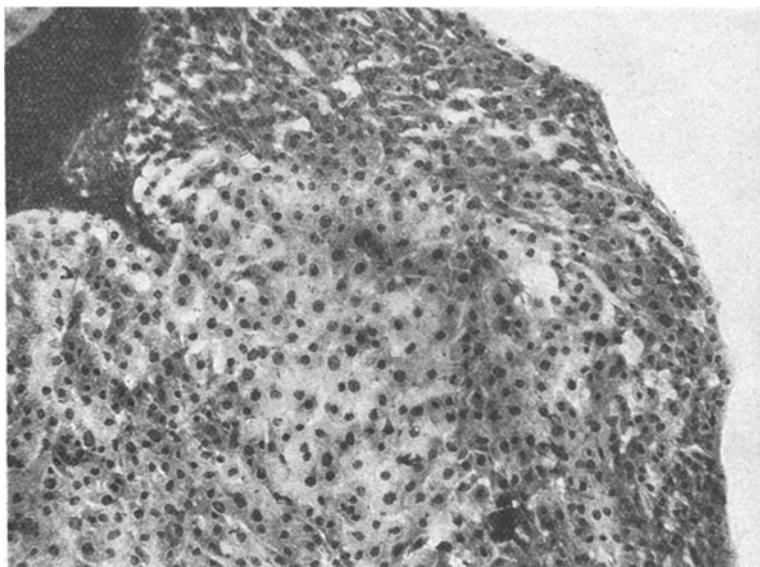


Abb. 8. 1846. Ausschnitt aus Kultur von Cornea eines jungen Kaninchens. 2. Passage. Kultur wurde unmittelbar nach 24ständigem Aufenthalt im Eisschrank bei  $-1$  bis  $-2^{\circ}\text{C}$  fixiert. Keine erkennbare Zellschädigung. Vergr. 1:98. Färbung nach MINCK.

Um den Einfluß tiefer Temperaturen auch am epithelialen Gewebe zu untersuchen, wurde Cornea von jungen Kaninchen explantiert und Temperaturen von  $-2^{\circ}\text{C}$  von verschiedener Dauer ausgesetzt. An einer Kultur von Corneaepithel eines jungen Kaninchens in der 2. Passage (1844, 1846) fanden sich nach 24ständigem Einwirken einer Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  bei unmittelbar anschließender Fixierung im Vergleich zu Kontrollkulturen keine wesentlichen Veränderungen. Unter Verflüssigung des Nährmediums ist es zum Auswachsen breiter epithelialer Verbände gekommen, die eine gute Kernfärbbarkeit und eine völlig normale Zellstruktur erkennen lassen. In mehreren ähnlichen Versuchen fand sich stets das gleiche Ergebnis (s. Abb. 8). Wenn dagegen im Anschluß an das Einwirken der Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  eine erneute Bebrütung einsetzte, traten schwere Veränderungen an den ausgewachsenen Zellen ein. Mehrere Kulturen (2061, 2063), die 36 Stunden nach

erfolgter Explantation ein gutes epitheliales Wachstum gezeigt hatten, wurden anschließend 24 Stunden in den Eisschrank bei  $-2^{\circ}\text{C}$  gebracht. Nach der Entnahme aus dem Eisschrank sahen die Kulturen völlig unverändert aus. Nunmehr wurde eine Bebrütung von 24 Stunden angeschlossen, dabei kam es zu einer völligen Auflösung der ausgewachsenen epithelialen Zellverbände. Es finden sich in der Umgebung der Mutterstücke zahlreiche kleine rundliche Zellen mit großem chromatophilem Kern und schmalen Protoplasmasaum. Auffällig ist die aus-

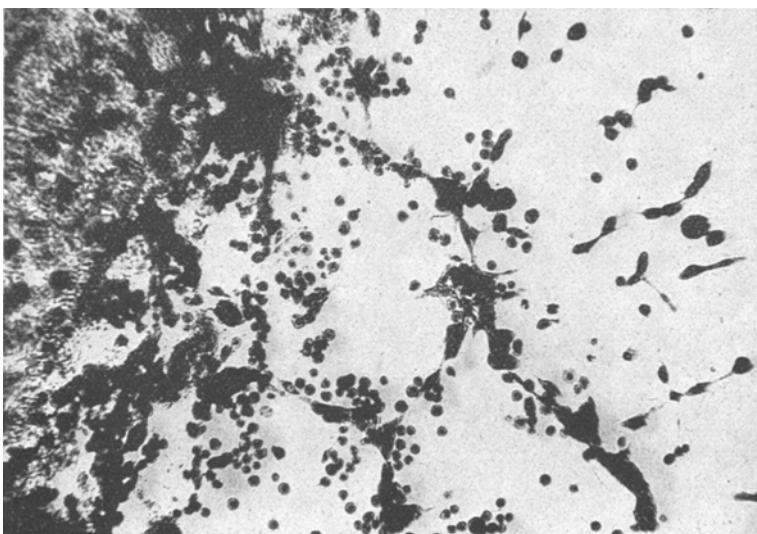


Abb. 9. 2063. Ausschnitt aus Kultur von Cornea eines jungen Kaninchens. 1. Passage Kultur wurde nach 36stündiger Bebrütung 24 Stunden einer Temperatur von  $-1$  bis  $-2^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt und anschließend erneut 24 Stunden bebrütet. Völlige Auflösung des Zellverbandes. Vergr. 1:98, Färbung mit Hämatoxylin-Scharlachrot.

gesprochene Abrundung der losgelösten epithelialen Zellen. Ganz vereinzelt finden sich noch zusammenhängende, aber offenbar auch zusammengeschnürte Zellverbände, die mit schmalen Protoplasma-brücken mit den benachbarten Zellkomplexen zusammenhängen (s. Abb. 9). In solchen Verbänden ist bei Färbung mit Hämatoxylin-Scharlachrot eine Verfettung des Protoplasmas nachweisbar, während die losgelösten Zellen keine Verfettung erkennen lassen. Im Mutterstück finden sich gleichfalls zahlreiche abgerundete Zellformen sowie eine feine Bestäubung mit Fetttröpfchen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Kulturen von Kaninchenhornhaut nach 36stündiger Bebrütung, die ein gutes epitheliales Wachstum bewirkte, so behandelt, daß nach 48ständigem Einwirken einer Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  eine Kultur unmittelbar danach fixiert wurde

(2067), während zwei weitere (2065, 2068) erneut 24 Stunden bebrütet wurden. Die nicht bebrütete Kultur zeigt einen noch gut erhaltenen Epithelsaum ohne wesentliche erkennbare Zellschädigung. Die beiden bebrüteten Kulturen dagegen zeigen das gleiche Bild, wie es bereits beschrieben wurde: Auflösung des ausgewachsenen Epithels, bzw. Ablösung vom Mutterstück mit Untergang und Abrundung der epithelialen Zellen, Pyknose der Kerne und zusammengeschrumpften Zellverbänden. Ein Wachstum wurde auch bei Abwandlung der Versuche nach länger dauernder Kälteeinwirkung an Kulturen von Corneaepithel in keinem Falle beobachtet. Anders dagegen verhalten sich Kulturen von Corneaepithel, die unmittelbar nach dem Umsetzen, wenn also noch keine epithelialen Zellverbände ausgewachsen sind, der Kälte ausgesetzt werden. Es wurden folgende Versuche angestellt: Corneakulturen (2115 bis 2121) wurden unmittelbar nach dem Ansetzen 1 Stunde bebrütet und dann auf 24 Stunden einer Temperatur von  $-2^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt. Danach erfolgte eine erneute Bebrütung von 39 Stunden. In diesen Kulturen fand sich ein ausgesprochen gutes epitheliales Wachstum, das gegenüber nicht kältebehandelten Kontrollkulturen nur sehr wenig verzögert war. In solchen Kulturen hat sich nach allen Seiten ein breiter Epithelsaum vom Mutterstück vorgeschoben. Die epithelialen Zellen weisen ziemlich zahlreiche Mitosen auf.

Daraus läßt sich der Rückschuß ziehen, daß bei Kälteeinwirkung das Mutterstück zunächst keine wesentliche Schädigung erleidet, wenn noch kein Wachstum von epithelialen Zellen eingetreten ist.

#### Zusammenfassung.

Die Einwirkung von Temperaturen zwischen  $+2$  und  $-2^{\circ}\text{C}$  auf Herzmuskelfibroblasten, Skeletmuskelfibroblasten und Corneaepithel wurde systematisch untersucht. Dabei fand sich bei nicht zu langer Einwirkung der Kälte nach anfänglichem Sistieren des Wachstums, das als Folge des Stillstandes der Stoffwechselvorgänge in der Kälte angesehen wird, nach erneuter Bebrütung ein besonders gutes Wachstum. Die Kälte wird als Wachstumsreiz angesehen. Bei langer dauernder Kälteeinwirkung kommt es zum Untergang der ausgewachsenen Zellen. Der Zellverband löst sich in zahlreiche Einzelzellen auf. Das Mutterstück kann auch bei längerem Einwirken von Temperaturen zwischen  $+2$  und  $-2^{\circ}\text{C}$  seine Wachstumspotenzen behalten. Diese Wachstumspotenzen kommen dann nicht mehr zur Auswirkung, wenn die Kälte auf eine Kultur einwirkt, die bereits ausgewachsen ist. Bei epithelialen Kulturen wirkt eine Bebrütung nach Kältebehandlung besonders schädigend auf den ausgewachsenen Zellverband.

Literatur.

AULER, KÖNIGER, SCHLOTTMANN, BYLINA, SCHMIDT: Z. Krebsforsch. 47, 371 (1938). — BREEDIS u. FURTH: Science (N. Y.) 1938 II, 531. Ref. Z. Krebsforsch. 49, 281 (1940). — BUCCIANTE: Arch. exper. Zellforsch. 11, 397 (1931). — CRAMER: Imp. Cancer Res. Fund. 9, 21 (1930). Zit. KLINKE: Arch. exper. Zellforsch. 22, 372 (1939). — FISCHER, A.: Arch. exper. Zellforsch. 2, 303 (1926). — HERZOG, K.: Z. Krebsforsch. 50, 412 (1940); 51, 416 (1941). — HÖFER: Naturw. 1939, 275. — HÖRNER: Z. Krebsforsch. 51, 365 (1941). — KLINKE: Z. Krebsforsch. 48, 400 (1939). — Arch. exper. Zellforsch. 22, 372 (1939). — Growth 3, 169 (1939). Ref. Z. Krebsforsch. 50, 174 (1940). — KOOSSE u. LEMMEL: Bruns' Beitr. 141, 498 (1927). — LAMBERT u. HANES: Virchows Arch. 211, 89 (1913). — MORIMOTO: Acta derm. (Jap.) 22, 98 (1933). Ref. Z. Krebsforsch. 41, 67 (1935). — NASU: Virchows Arch. 243, 388 (1923). — RÖSSLE: S.ber. preuß. Akad., Wiss., Berl., Physik.-math. Kl. 1936 III. — SPEAR: Arch. exper. Zellforsch. 7, 484 (1928/29). — TANNENBERG: Arch. exper. Zellforsch. 9, 402 (1930). — VERNE et ODIETTE: Ann. Anat. path. med.-chir. 8, 681 (1931). Ref. Z. Path. 53, 323 (1931/32).