

# Die Züchtung von Zellen und Geweben ausserhalb des Körpers

Autor(en): **Bucher, Otto**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =  
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **41 (1951)**

PDF erstellt am: **18.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308306>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Die Züchtung von Zellen und Geweben außerhalb des Körpers

VON OTTO BUCHER

Auch der medizinische Laie weiß heute, daß Bakterien, jene mikroskopisch kleinen Erreger so vieler Krankheiten, auf künstlichen Nährböden gezüchtet werden können. Viel weniger bekannt ist indessen die Tatsache, daß auch tierische und menschliche Gewebe, aus ihrer natürlichen Umgebung herausgeschnitten, in einem geeigneten Kulturmedium außerhalb des Körpers nicht nur am Leben erhalten, sondern in vielen Fällen über Jahre und sogar Jahrzehnte weitergezüchtet werden können. So gelang es im Rockefeller Institut, den gleichen Bindegewebestamm während 27 Jahren *in vitro* wachsen zu lassen.

Die Gewebezüchtung geht auf ein Experiment von R. G. HARRISON (1907) zurück, der ein Stückchen Medullarrohr eines Froschembryos in einem Tropfen Lymphe auf ein steriles Deckgläschen brachte, dieses nach dem Gerinnen des Tropfens über einem hohlgeschliffenen Objektträger befestigte und dann beobachten konnte, wie aus den sich differenzierenden Nervenzellen die Nervenfasern auswuchsen. Das Prinzip dieses embryologischen Experimentes zugrundeliegend, haben dann vor allem A. CARREL und seine Mitarbeiter die Methode der Gewebezüchtung *in vitro* weiter ausgebaut.

Zur *Gewebezüchtung* wird ein etwa  $\frac{1}{2}$  mm<sup>3</sup> großes lebendes Gewebestückchen aus dem Gesamtorganismus herausgelöst und — im Gegensatz zur Transplantation, wo die Überpflanzung eines Gewebes oder eines Organes auf eine andere Körperstelle desselben Lebewesens oder auf ein anderes lebendes Individuum erfolgt — in ein totes Kulturmedium eingepflanzt, dessen einzelne Komponenten sich experimentell variieren lassen. Dieses *Kulturmedium* setzt sich im allgemeinen aus den folgenden zwei Bestandteilen zusammen : Blutplasma

und Gewebeextrakt. Das nach Anlegen der Kultur gerinnende Plasma liefert außer Nährstoffen ein aus Fibrinfäserchen bestehendes feinstes schwammiges Gerüstwerk, an dem die Zellen entlang wachsen können. Da dem Blutplasma aber wachstumsfördernde Stoffe fehlen, wird dem Milieu noch Gewebeextrakt zugesetzt, der infolge seines Thrombokinase-Gehaltes zudem die Gerinnung des Plasmas veranlaßt.

Wenn das Medium durch Fibrinolyse verflüssigt wird — eine der Schwierigkeiten der Tumorzüchtung —, so verlieren die Zellen ihren Halt; sie runden sich ab und wachsen im allgemeinen nicht mehr.

Selbstverständlich muß bei der Gewebezüchtung unter *aseptischen Bedingungen* gearbeitet werden, da die Kultur in vitro nicht über die Abwehreinrichtungen des Gesamtorganismus verfügt und infolgedessen einer Infektion schutzlos ausgeliefert wäre: alle Instrumente, Glaswaren und Lösungen müssen deshalb sorgfältig sterilisiert, die Bestandteile des Kulturmediums und das Gewebe dem Tier steril entnommen werden. Allerdings kann heute durch Zusatz von Antibiotika (Penicillin etc.) die Auswirkung einer möglichen Infektion stark herabgesetzt werden.

Von den drei wichtigsten Züchtungsmethoden, der Methode der Deckglaskultur, der Uhrglas- und der Flaschenkultur, möchte ich

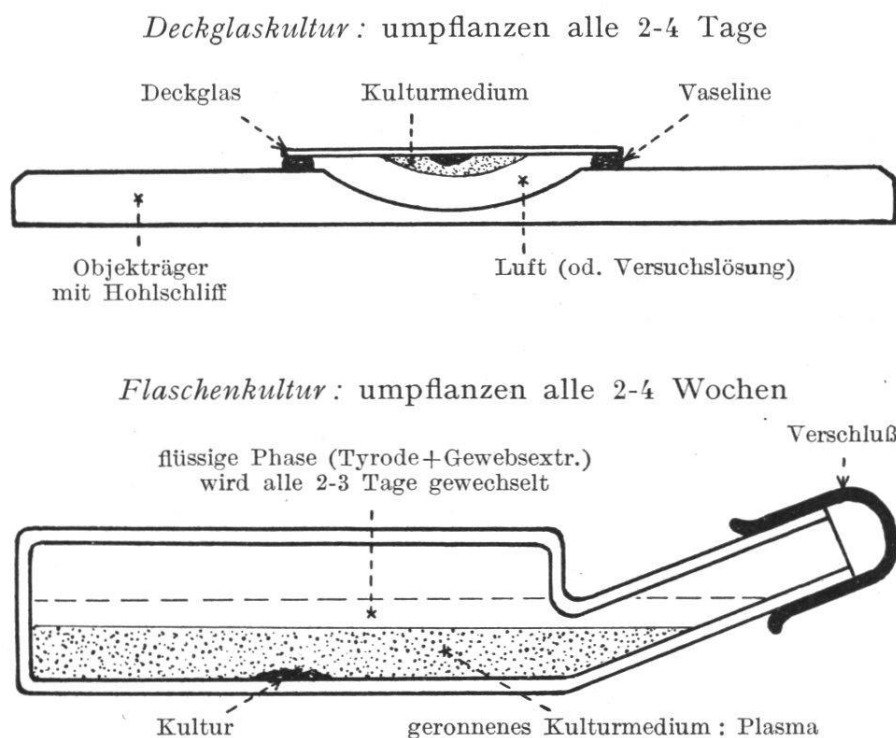


Abb. 1. Methodik der *Deckglaskultur* und der *Flaschenkultur*.

wiederum nur das Prinzip hervorheben. Bei der *Deckglaskultur* befinden sich Kultur und Medium — nach Art des «hängenden Tropfens» — an der Unterseite eines Deckgläschens, welches über der Höhlung eines hohlgeschliffenen Objektträgers befestigt ist (Abb.1). Bei der *Uhrglaskultur* bringt man das Medium auf ein Uhrgläschen und dieses selbst in eine Petri-Schale, deren Boden mit feuchter Watte belegt ist und somit eine feuchte Kammer darstellt. Zur *Flaschenkultur* verwendet man besonders gebaute platte Fläschchen (mit einem oder zwei seitlichen Hälsen), in denen das die Kultur enthaltende feste Medium noch mit einer flüssigen Phase überschichtet wird (Abb. 1). Eine besondere Variante der Kultur in Flaschen ist die *Kultur in «roller tubes»*: Gewebe und Milieu, welches sich auch wieder aus einer festen und einer flüssigen Phase zusammensetzt, befinden sich in Glasröhrchen; diese werden in eine Vorrichtung gebracht, wo sie langsam rotiert werden in der Absicht, das Gewebe abwechselnd in der flüssigen Phase gelösten Nährstoffen und dem Sauerstoff zu exponieren. Bei allen Methoden müssen die Kulturen, wenn wir mit Geweben von Warmblütern arbeiten, in den auf Körpertemperatur eingestellten Brutschrank gebracht werden.

Da die im Medium vorhandenen Nährstoffe allmählich verbraucht und dafür Stoffwechselprodukte angereichert werden, die das Gewebe schließlich schädigen würden, müssen die Kulturen in bestimmten Zeitabständen in ein frisches Medium *umgepflanzt* werden. Das wird bei den Deckglaskulturen alle 2 - 4 Tage, bei den Uhrglaskulturen alle 2 - 6 Tage, bei den Flaschen- und «roller tubes»-Kulturen, wo die flüssige Phase alle paar Tage gewechselt werden kann, nur alle 2 - 4 Wochen notwendig sein.

Nach der gewählten Technik sowie der Art und dem Differenzierungsgrad des explantierten Gewebes können wir *zwei grundsätzlich verschiedene Resultate* bekommen. Im einen Fall, auf den wir zunächst etwas näher eintreten wollen, verhält sich das Explantat mehr oder weniger gleich, wie wenn es als Bestandteil des Gesamtorganismus in situ wachsen würde. Es entstehen somit die spezifischen *Differenzierungen*, die wir nach der Herkunft des Explantates erwarten: Osteoblasten bilden Knochen; in der ausgepflanzten embryonalen Haut entstehen Drüsen und Haare; Epithelien aus endokrinen Drüsen bilden dann auch in vitro organotypische Strukturen (z. B. Follikel, wenn Schilddrüsenepithelien ausgepflanzt wurden) und liefern in

günstigen Fällen selbst Hormone. Für derartige Untersuchungen ist die Methode der Uhrglaskultur und der Flaschenkultur besonders geeignet.

Es sei uns gestattet, hier kurz auf Versuche mit differenzierten Geweben hinzuweisen, die wir in den letzten Jahren in unserem Laboratorium durchgeführt haben (angeregt durch die Arbeiten von FELL und ROBISON 1929, NIVEN 1931). Von durchschnittlich 12-14 Tage lang bebrüteten Hühnerembryonen haben wir über 200 lange Röhrenknochen, insbesondere Femur und Tibia, steril aus den umgebenden Weichteilen herauspräpariert und in der bereits in periostalem Knochen ausgebildeten Diaphyse eine durch die Hälfte bis zwei Drittel des Skelettstückes durchgehende Fraktur gesetzt. Dann wurden die Knöchelchen auf das Kulturmedium gebracht und nach der Uhrglasmethode gezüchtet.

Nach verschieden langer Zeit (1 Tag bis 3 Wochen) wurden die Kulturen fixiert und histologisch verarbeitet. Nun ergaben sich zwei Fragestellungen: einmal interessierten uns die Vorgänge bei der *Frakturheilung in vitro* (Abb. 2) und der Vergleich der Bruchheilung

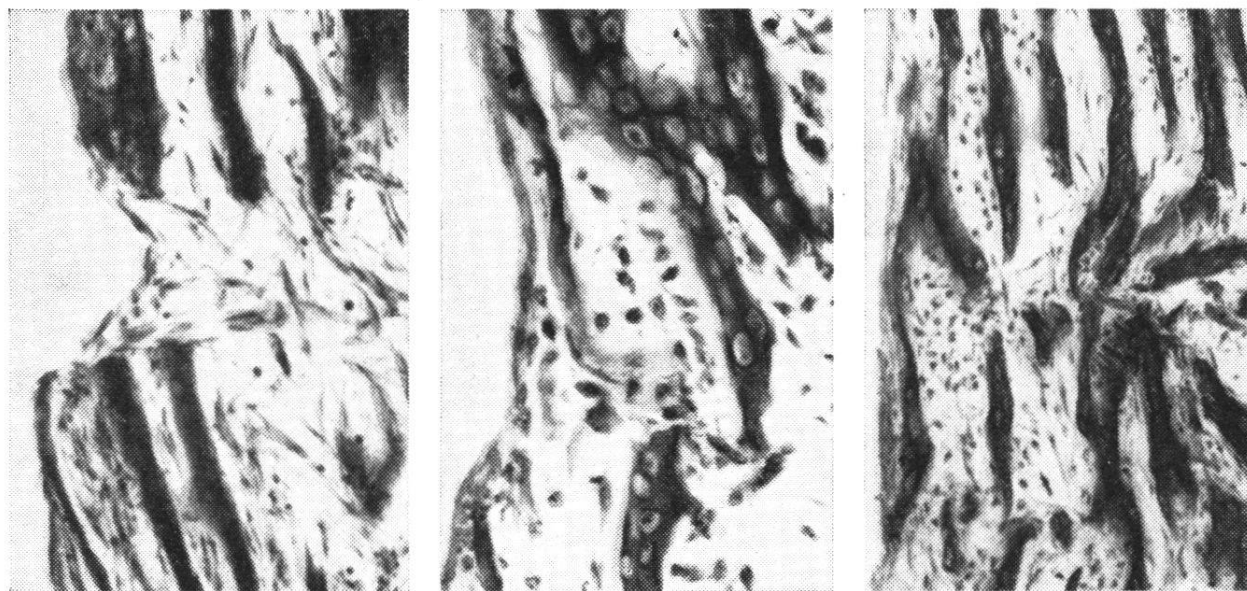


Abb. 2. *Frakturheilung in vitro* (Tibiae von 14tägigen Hühnerembryonen):

- Links: 3 Tage nach Auspflanzen und Fraktursetzung; im Bruchspalt erkennt man ein lockeres Zellnetz.  
Mitte: Nach 7tägiger Züchtung; beginnende Bildung von noch unverkalkter Knochensubstanz (Osteoid).  
Rechts: Nach 10tägiger Züchtung (bei etwas schwächerer Vergrößerung photographiert); die Kontinuität zwischen den beiden Bruchfragmenten ist wieder hergestellt.



in vitro mit der in vivo, und zweitens die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung der Heilungsvorgänge. Was die erste Frage betrifft, so ist zu sagen, daß, wenn wir von der fehlenden Vaskularisierung absehen, die Frakturheilung in vitro morphologisch grundsätzlich gleich verläuft wie in vivo (O. BUCHER 1952). Es kommt zunächst zur Bildung eines bindegewebigen Kallus und später — beginnend etwa zwischen dem 6.-8. Tag — durch die Knochenbildungszellen (Osteoblasten), die auch in der Kultur ihre spezifische Funktion beibehalten, zur Bildung von Osteoid und durch dessen Verkalkung später wohl auch von Knochen. Eine restitutio ad integrum haben wir allerdings nie erreicht.

Was nun den *Vergleich zwischen unbehandelten und pharmakologisch beeinflussten Kulturen* betrifft, so sind wir so vorgegangen, daß wir Extremitätenknochen der einen Körperseite in einem Medium gezüchtet haben, dem zusätzlich das Pharmakon (im speziellen Fall das Knochenextraktpräparat Ossopan) zugesetzt worden war. Die entsprechenden Knochen der gegengleichen Extremität wurden im gleichen Milieu — jedoch ohne das erwähnte Medikament — und unter genau gleichen Bedingungen gezüchtet. Tatsächlich zeigten die behandelten Kulturen, besonders in der ersten Hälfte des Heilungsvorganges, im Vergleich mit den unbeeinflussten Kulturen eine gewisse Förderung der Regenerationsprozesse, auf die wir hier jedoch nicht näher eingehen wollen (BUCHER und WEIL 1951, J.-TH. WEIL 1951).

Zweifellos wird sich jedem Leser die Frage aufgedrängt haben, inwieweit solche in vitro erhaltenen Resultate auf die Verhältnisse im Gesamtorganismus übertragen werden dürfen. Diese Frage muß bei allen derartigen Versuchen immer wieder mit größter Gewissenhaftigkeit und Selbstkritik erörtert werden. Da es sich im eben geschilderten Beispiel um Differenzierungsvorgänge handelt, die in vitro trotz der vereinfachten Versuchsbedingungen (Wegfall der Blutzirkulation und der nervösen Regulation) morphologisch in prinzipiell gleicher Weise ablaufen wie im Körper, glaube ich, daß man hier aus den im Kulturexperiment erhaltenen Resultaten auch etwas über die Verhältnisse in vivo aussagen darf.

Auch *Herzmuskelgewebe*, das wir von Mäuse- und Hühnerembryonen auspflanzen, kann unter geeigneten Züchtungsbedingungen in vitro wochenlang seine morphologische Differenzierung und seine spezifische Leistung beibehalten: so sehen wir häufig in solchen

Kulturen rhythmische Kontraktionen<sup>1</sup>. Wenn sich das explantierte Fragment zufällig aus einem Stückchen Kammer- und einem Stückchen Vorhofmuskulatur zusammensetzt (die beiden Muskelsyncytien sind morphologisch voneinander getrennt), erkennt man in der Kultur den Vorhof an seinem rascheren, die Kammer an ihrem langsameren Schlagrhythmus. Es ist sogar möglich, von solchen in vitro pulsierenden Herzfragmenten ein Elektrokardiogramm aufzunehmen (Arbeiten von O. OLIVO). Sehr schön ist die Wirkung von direkt am Herzmuskel angreifenden Pharmaka (wie z. B. der Digitalisgruppe) an Herzmuskelkulturen zu studieren.

Ein weiteres sehr schönes Beispiel zum Studium von Bewegungsvorgängen in vitro liefern uns die weißen Blutkörperchen (*Leukocyten*), wobei uns die Mikrokinematographie mit ihrer Möglichkeit der Zeitraffung ausgezeichnete Dienste leistet<sup>2</sup>. Mit dieser Methode kann der Einfluß aller möglicher experimenteller Einwirkungen auf die amöboide Beweglichkeit sowie auf die Phagocytose-tätigkeit in eleganter Weise studiert werden, worüber bereits eine größere Zahl Arbeiten, auf die wir hier nicht näher eintreten können, besteht. In analoger Weise kann man anstelle der Leukocyten auch mit anderen beweglichen Zellen (Histiocyten) arbeiten.

Wir haben oben erwähnt, daß wir bei der Gewebezüchtung mit zwei verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten zu rechnen haben. Während nun bei den bisher beschriebenen Experimenten Gewebe und Zellen auch im Explantat die ihrer Differenzierung entsprechenden spezifischen Leistungen offenbaren, treten diese in den folgenden Fällen ganz zurück: es werden nun keine organotypischen Strukturen mehr gebildet, im Gegenteil, bei der Explantation eventuell bereits vorhandene histologische Differenzierungen werden oft wieder vollständig verwischt. Bei solchen Kulturen stehen *Zellteilung und Wachstum* im Vordergrund. Wir arbeiten nun vorzugsweise mit Deckglaskulturen, da wir darin am leichtesten die Mitosen an den lebenden Zellen direkt verfolgen oder mit der gewünschten Zeitraffung filmen und die Filme nachher qualitativ oder auch quantitativ auswerten können. Wir haben indessen darauf zu achten, daß sich die Kulturen

---

<sup>1</sup> Filmdemonstration eines wochenlang in vitro pulsierenden Herzfragmentes, das von einem Mäuseembryo ausgepflanzt worden ist.

<sup>2</sup> Demonstration einiger Filmszenen von im Phasenkontrastmikroskop aufgenommenen menschlichen Leukocyten (für Technik vgl. O. BUCHER 1946).

nicht abkühlen, weshalb wir mit einem geheizten Objektisch arbeiten, und daß die Gewebe im Laufe der Filmaufnahme nicht durch übermäßig starke Lichtintensitäten geschädigt werden.

Streifen wir kurz die Frage, wie das *Anlegen einer Deckglaskultur* vor sich geht. Dazu werden ein Tropfen Blutplasma und ein Tropfen Extrakt mit einem etwa kleinstecknadelkopfgroßen Gewebestückchen auf ein steriles Deckgläschen gebracht, die beiden Flüssigkeitstropfen vermischt und das Medium, welches normalerweise kurze Zeit darauf gerinnt, etwas ausgebreitet. Dann wird das Deckgläschen, wie schon erwähnt, umgekehrt auf einen hohlgeschliffenen Objektträger gelegt, der Rand ringsherum mit Vaseline oder Paraffin abgedichtet und die Kultur alsbald in den Wärmeschrank gebracht. Beim *Umpflanzen* wird die Kultur mit einem scharfen Starmesserchen aus dem alten Milieu ausgeschnitten, zur Entfernung von Stoffwechselprodukten in körperwarmer Ringer- oder Tyrodelösung gebadet und nachher in genau gleicher Weise wie bei der Explantation wieder in ein frisches Medium eingesetzt.

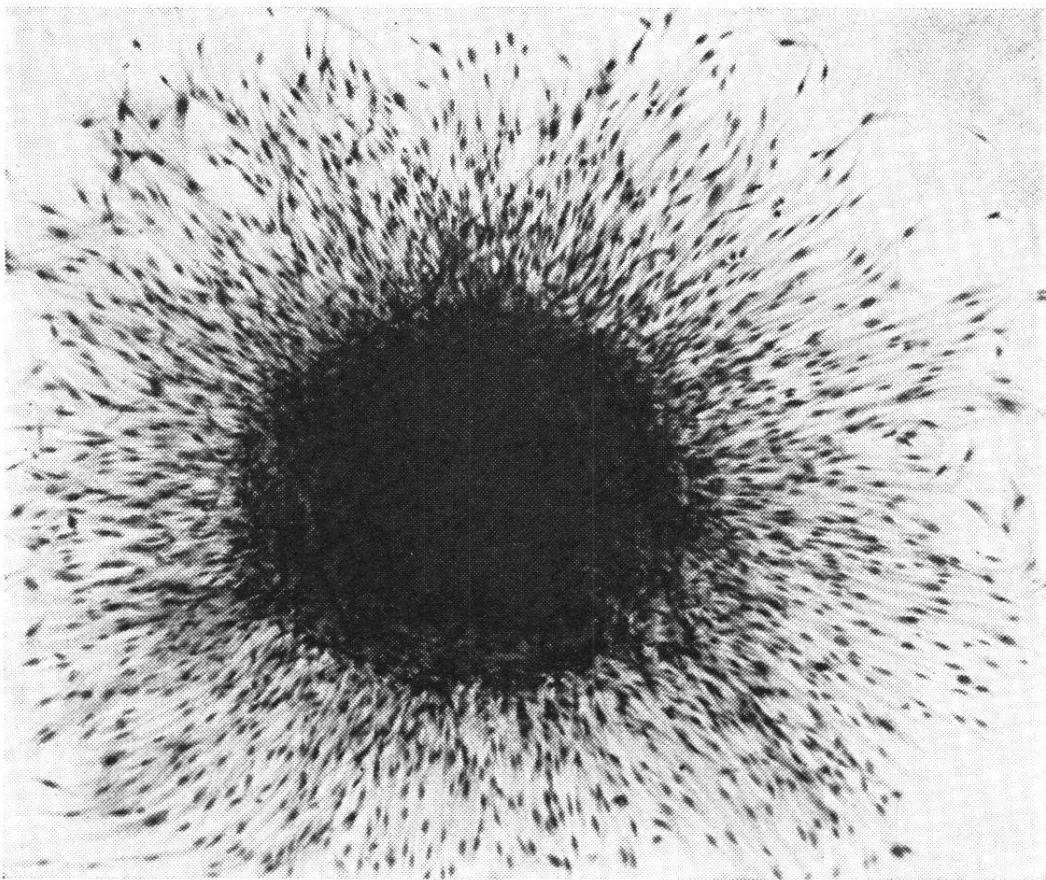


Abb. 3. Übersichtsaufnahme einer *Deckglaskultur von Bindegewebe* (am 2. Tag nach dem Umpflanzen). Man erkennt deutlich das dunkel gefärbte Mutterstück und den es umgebenden lockeren Randschleier.



Betrachten wir nun eine gut gelungene Kultur zwei Tage nach dem Auspflanzen aus dem Tier oder nach dem Umpflanzen, so erkennen wir (Abb. 3), wie das übertragene, relativ dicke Gewebsfragment, das man als *Mutterstück* bezeichnet, von einem mehr oder weniger breiten zarten Zellschleier, dem sog. *Randschleier*, umgeben ist. Dieser Randschleier besteht allergrößtenteils aus in vitro neugebildeten Zellen, und so finden wir in einer gut wachsenden Kultur hier denn auch ohne Schwierigkeiten eine größere Anzahl von Zellteilungen (Mitosen).

Es sei an dieser Stelle auf einige Untersuchungen hingedeutet, die *zellteilungshemmenden* (antimitotischen) *Stoffen* gewidmet sind, also Stoffen wie Colchicin, Trypaflavin, Arsenik, Urethan, Nitrogen Mustard und andern, die zum Teil eine praktisch-medizinische Bedeutung für die Behandlung der Leukaemie erhalten haben. Wie verschieden der Wirkungsmechanismus dieser Stoffe, die bei geeigneter Dosierung alle eine Verminderung der Zellteilungstätigkeit bewirken, ist und an wie verschiedenen Stellen sie in das Teilungsgeschehen eingreifen, das ging bei der therapeutischen Anwendung am Menschen wie auch aus den angestellten Tierversuchen nur andeutungsweise hervor, ließ sich aber durch Untersuchungen an Gewebekulturen schön zeigen.

Da die Zellteilung auch die Grundlage für das krankhafte, überbordende Wachstum der *Geschwülste* ist, besteht die Hoffnung, in Zusammenarbeit mit den Chemikern schließlich zu Pharmaka zu gelangen, die, ohne in der notwendigen Dosierung den Gesamtorganismus zu schädigen, eine elektiv hemmende Wirkung auf das Geschwulstwachstum haben. Da die bösartigen Tumorzellen einen etwas anderen Stoffwechsel aufweisen als die gesunden Zellen, ist diese Möglichkeit durchaus gegeben. Auch die Strahlentherapie hat zuerst lernen müssen, die Strahlen so zu wählen und zu dosieren, daß nur das krankhafte Gewebe zerstört wird. Beim Suchen nach wachstumshemmenden Substanzen und der Analyse ihrer Wirkung ist die Gewebezüchtung geradezu unentbehrlich geworden und hat damit eine eminente praktische Bedeutung erlangt.

Wir wollen nun kurz zeigen, wie wir bei der *Analyse der Wirkung eines antimitotischen Stoffes* in unserem Laboratorium vorgehen (vgl. auch O. BUCHER 1951). Alle im folgenden erwähnten Versuche sind an Kaninchen-Bindegewebekulturen (Deckglaskulturen) durchgeführt

worden, wobei wir das Gift gewöhnlich so zugesetzt haben, daß wir den Hohlschliff des Objektträgers mit der Versuchslösung ausfüllten.

Einen ersten Eindruck von der Wirkung des zugesetzten Mitosegiftes erhalten wir, indem wir in bestimmten Zeitabständen die im Randschleier der lebenden Kulturen sichtbaren Mitosen zählen und die Resultate mit denen aus den parallel dazu geführten Kontrollkulturen vergleichen. Bei der graphischen Darstellung haben wir auf der Ordinate die Mitosenzahlen in Prozenten (am Versuchsbeginn festgestellte Mitosenzahl = 100 %), auf der Abszisse die Versuchsdauer aufgetragen; die so erhaltenen Kurven nennen wir *Mitosenzahlenkurven*. Ich will Ihnen das am Beispiel von Versuchen mit Colchicin und Trypaflavin (O. BUCHER 1939) zeigen. Zunächst fällt uns auf (Abb. 4), daß auch die Mitosenzahlen aus den verschiedenen Serien von Kontrollversuchen infolge ihrer individuellen Vitalitätsunterschiede eine gewisse Streuung aufweisen (physiologischer Streuungsband). Betrachten wir nun aber die Mitosenzahlenkurve aus den mit Colchicin 1 : 40 Millionen durchgeführten Versuchen, so sehen wir, daß sie nach einer gewissen Latenzzeit stark ansteigt, während die Mitosenzahlenkurve aus den Versuchen mit Trypaflavin 1 : 900 000 stark abfällt. Beide Kurven treten eindeutig aus dem physiologischen Streuungsband heraus, sodaß wir schon aus diesen einfachen Zählversuchen mit Sicherheit schließen können, daß die beiden Pharmaka die Zellteilung beeinflussen, und dies in verschiedener Art und Weise.

Wie ist nun eine solche Zunahme der Zellteilungsfiguren, wie sie in den Colchicinversuchen zu beobachten ist, zu deuten? Es gibt dafür zwei Möglichkeiten. Die Beobachtung wäre einmal durch eine Steigerung der mitotischen Aktivität zu erklären; es würden dann in einer bestimmten Zeit mehr Zellen eine Mitose beginnen. Die Zunahme der sichtbaren Teilungsfiguren könnte aber auch darauf zurückzuführen sein, daß die Teilung erschwert wird, länger dauert und die Zellen infolgedessen längere Zeit im Stadium der Zellteilung verharren. Wir haben also eine Gleichung mit zwei Unbekannten: dem mitotischen Koeffizienten (als Maß für die Teilungsaktivität) und der Teilungsdauer. Mit der Mitosenzählung allein, sei es in Gewebekulturen oder in histologischen Schnittpräparaten von Tierversuchen oder Biopsien, können wir die gestellte Frage nicht lösen. Wir ziehen deshalb als zweite Auswertungsmethode die *Filmanalyse* heran.

Wir benützen dazu (Abb. 5) eine 16 mm Siemens-Kamera in Ver-

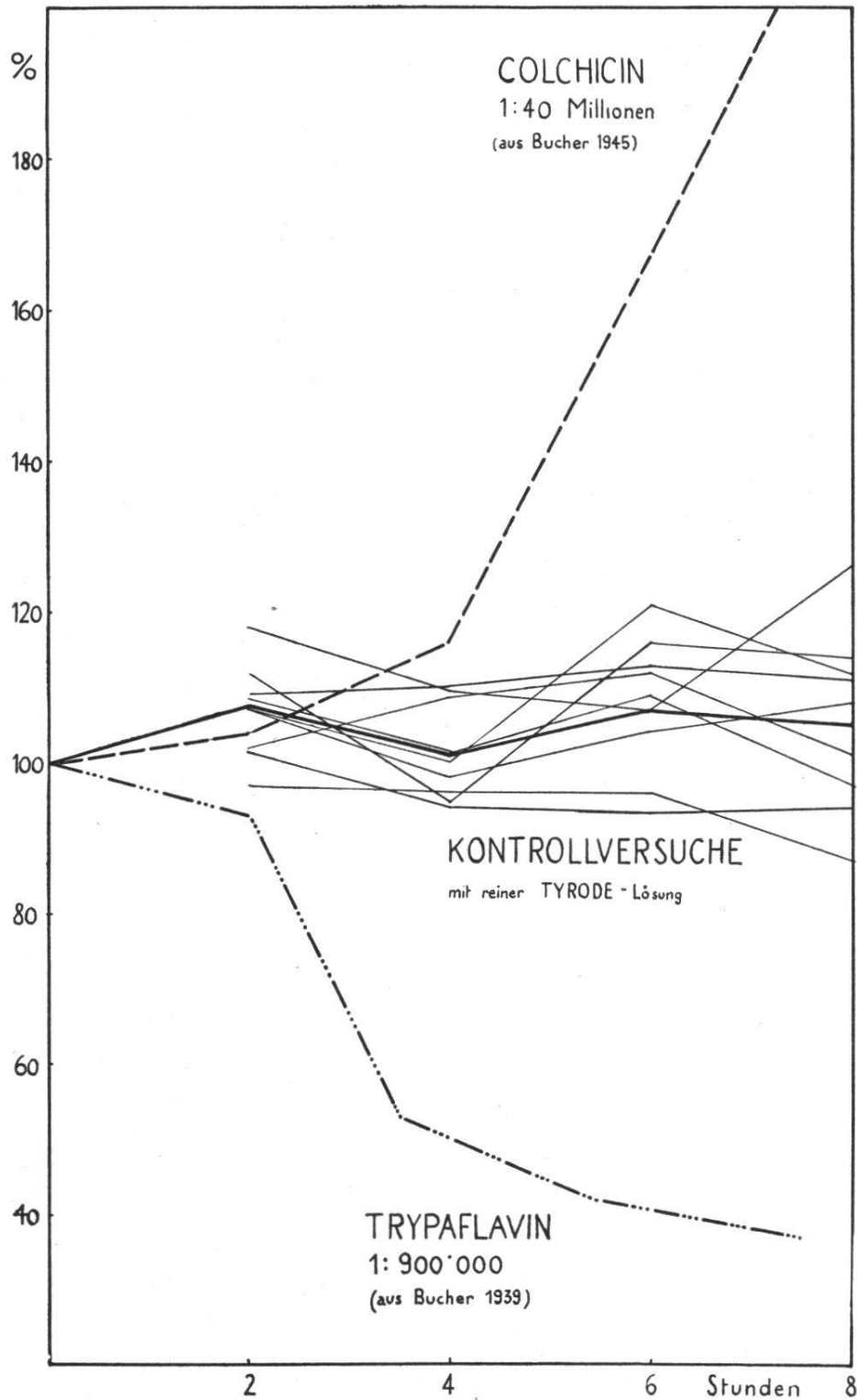


Abb. 4. Mitosenzahlenkurven, ermittelt durch Zählen der sichtbaren Mitosen in Abständen von je etwa 2 Stunden (Zählresultate umgerechnet auf Prozente der vor Versuchsbeginn bestimmten Mitosenzahlen). Bei den Kontrollversuchen weichen die Resultate infolge der verschiedenen Vitalität der Kulturen auch etwas voneinander ab (physiologisches Streuungsband). Man beachte indessen das grundsätzlich andere Verhalten der Mitosenzahlenkurven aus den Versuchen mit Colchicin 1 : 40 Millionen und mit Trypaflavin 1 : 900 000. (Aus O. BUCHER 1947.)

bindung mit dem Panphot, der mit einem geheizten Objektisch und einer Phasenkontrast-Einrichtung ausgerüstet ist und auf einer frei federnden Unterlage steht (Schwingtisch). Die Bildauslösung geschieht mittels eines an einer separaten Stativsäule montierten Elektromagneten, der — wie auch die Lichtquelle (Niedervolt-Glühlampe) — in gewünschten Zeitabständen Impulse von der eingestellten Dauer von der links im Bild sichtbaren Zeitraffereinrichtung erhält. Die Kraft des Auslösungsmagneten regulieren wir durch einen dazwischen geschalteten Stromwiderstand ; zwischen das Lichtnetz und das Impulsgerät (Zeitraffer) haben wir noch einen Stromstabilisator eingeschoben. Als Film benützen wir den panchromatischen Kodak Super-X (Umkehrfilm). Die Belichtungszeit liegt je nach Vergrößerung zwischen 1 und 2 Sekunden bei 4 - 6,5 Ampère Lampenbelastung.

Solche Mitosefilme lassen sich quantitativ auswerten, indem wir bei der Projektion die einer jeden Mitose oder bestimmten Mitosestadien zugehörige Bildzahl bestimmen und unter Berücksichtigung der Zeitraffung (Bildabstand z. B. 30 sec.) die zugehörigen Zeiten berechnen und das ganze Teilungsgeschehen schließlich graphisch darstellen (Abb. 6 und 7). Jeder Strich bedeutet eine Mitose, die Caesur den Moment der vollendeten Zelldurchschnürung. Die Länge des Striches repräsentiert die Mitosendauer ; die Steilheit der die Mitosen-

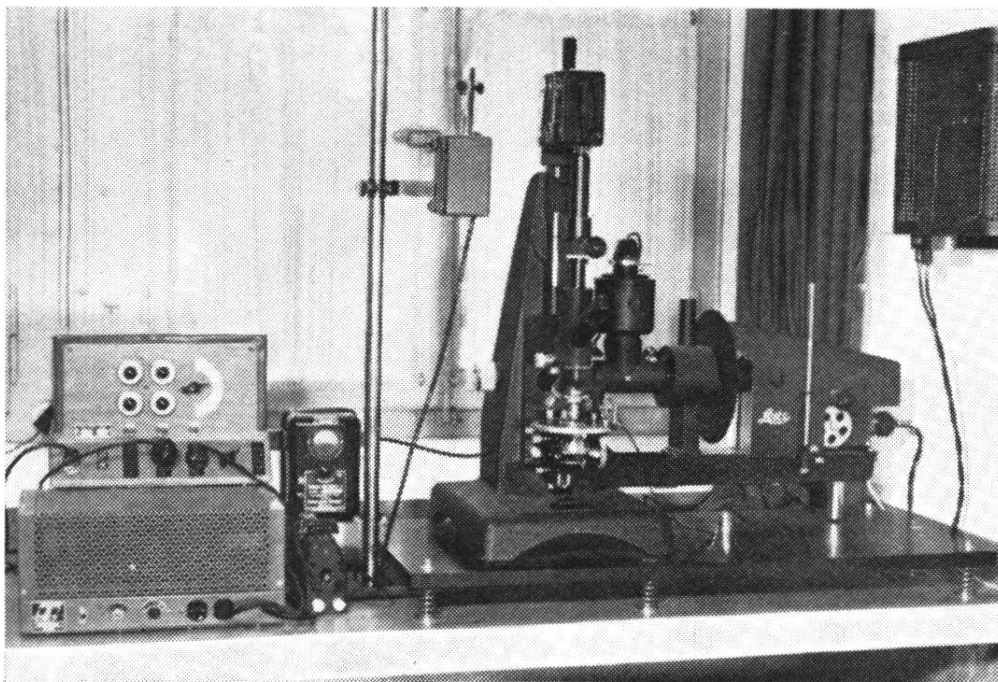


Abb. 5. Mikrokineatographische Einrichtung mit Zeitraffer (Histolog.-Embryolog. Institut Lausanne). Beschreibung siehe Text.



anfänge verbindenden Kurve vermittelt uns einen Eindruck von der Größe des mitotischen Koeffizienten (die Kurve wird steiler, wenn pro Stunde mehr Zellen eine Mitose anfangen, d. h. der mitotische Koeffizient erhöht ist).

Betrachten wir nun das Auswertungsergebnis eines unter dem Einfluß von *Colchicin* in einer Konzentration von 1 : 20 Millionen aufgenommenen Mitosefilmes (Abb. 6). Schon von der zweiten Stunde des Versuches an nimmt die Teilungsdauer immer mehr zu, und etwa von der 6. Stunde an wird die überwiegende Mehrzahl der Mitosen überhaupt nicht mehr zu Ende geführt. Wir erhalten infolgedessen im Zeitquerschnitt eine immer größere Zahl von Zellteilungsfiguren, indem immer mehr Zellen in den Zustand der Zellteilung hinein marschieren und dann in diesem Zustand (genauer gesagt im Stadium der frühen Metaphase) blockiert werden. Die schon in den Mitosezahlenkurven festgestellte starke Zunahme der sichtbaren Teilungsfiguren ist somit nicht etwa durch eine Anregung der Teilungstätigkeit — die Filmanalyse zeigt, daß der mitotische Koeffizient keineswegs erhöht ist — bedingt, sondern eindeutig auf die Verlängerung der Teilungsdauer zurückzuführen.

Bei den Versuchen mit *Trypaflavin* (Konzentration 1 : 800 000) ergibt die Filmanauswertung, verglichen mit den Colchicinversuchen, geradezu das umgekehrte Resultat (Abb. 7). Das Trypaflavin bewirkt

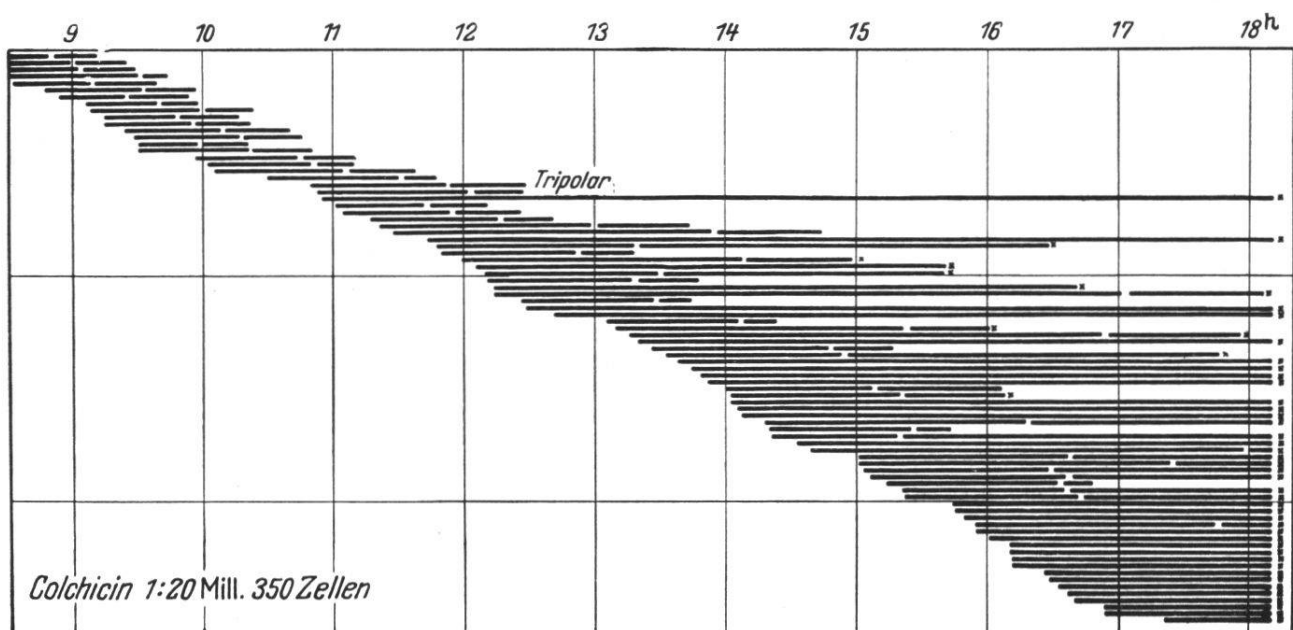


Abb. 6. Graphische Darstellung des Teilungsgeschehens, erhalten durch quantitative Auswertung eines nach Zusatz von *Colchicin* 1 : 20 Millionen mit Zeitraffung aufgenommenen Filmes. (Aus O. BUCHER 1939.)

eine schon bald einsetzende Erschwerung und mit fortschreitender Versuchsdauer zeitweise sogar vollständige Sistierung des Mitosebeginnes. Jetzt steht die starke Verminderung des mitotischen Koeffizienten im Vordergrund, während die wenigen gelegentlich noch auftretenden Mitosen in mehr oder weniger normaler Zeitdauer ablaufen. In diesem Fall ist die Mitosenzahlenkurve also wirklich ein Abbild der mitotischen Aktivität, da wir die zweite Unbekannte der Gleichung, nämlich die Teilungsdauer, praktisch als konstant annehmen dürfen.

So verschieden die beiden Mitosegifte in den Teilungsvorgang eingreifen, ist doch der Endeffekt in bezug auf das numerische Wachstum der Zellen der gleiche, nämlich Hemmung des Gewebswachstums: im Falle der Colchicineinwirkung, weil die begonnenen Teilungen in der Metaphase blockiert und somit nicht zu Ende geführt werden können, im Falle der Trypaflavineinwirkung, weil bei genügender Dosierung überhaupt keine neuen Teilungen mehr beginnen.

Die Behandlung von Gewebekulturen mit *Arsenik* ergibt in dynamischer Hinsicht ähnliche Resultate wie die Behandlung mit Colchicin, nur daß etwa 50 mal stärkere Konzentrationen notwendig sind (O. BUCHER 1940, 1950).

Die komplizierter zu deutende Wirkung von URETHAN erinnert an den geschilderten Trypaflavineffekt (O. BUCHER 1947, 1949, 1950). Es sind hier indessen wesentlich höhere Giftkonzentrationen notwendig (z. B. Urethan 1 : 200).

Wir kommen nun noch auf eine weitere, sehr sensible Auswertungsmethode zu sprechen, die jedoch nicht mehr — wie die bisher

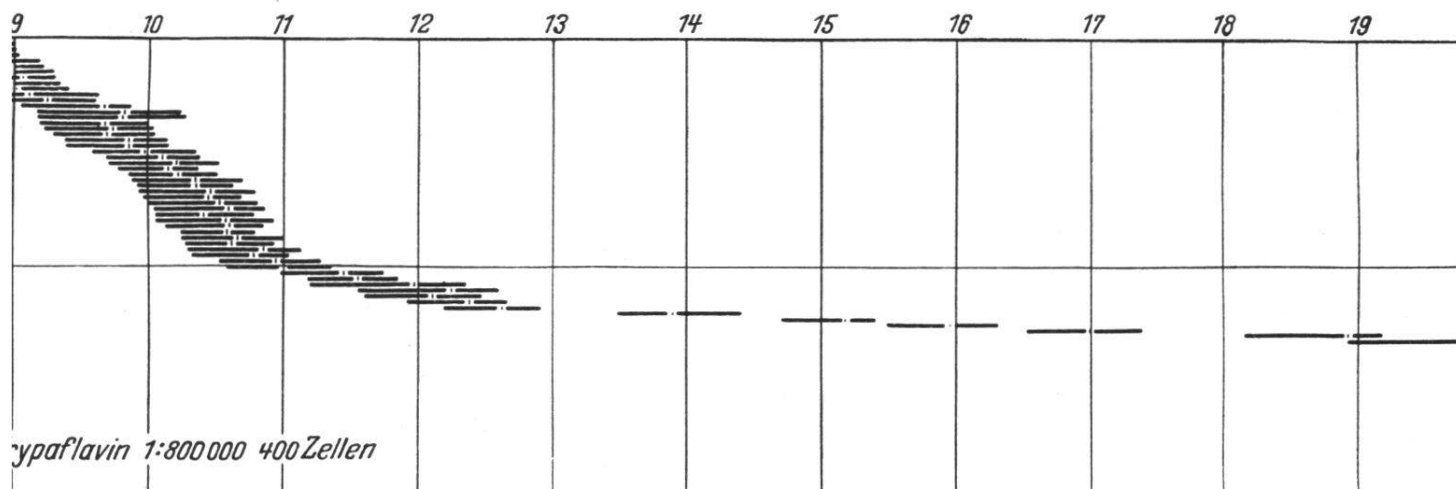


Abb. 7. Graphische Darstellung des Teilungsgeschehens, erhalten durch quantitative Auswertung eines nach Zusatz von Trypaflavin 1 : 800 000 mit Zeitraffung aufgenommenen Filmes. (Aus O. BUCHER 1939.)

beschriebenen Methoden — auf der Untersuchung von lebenden Zellen basiert, sondern mit nach einer bestimmten Versuchsdauer fixierten und gefärbten Präparaten arbeitet. Wir zählen in diesen Präparaten die verschiedenen Mitosephasen und berechnen ihren prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der Zellteilungen. Wir gehen also in bezug auf die verschiedenen Mitosestadien prinzipiell gleich vor wie der Arzt, der sich für das Blutbild interessiert, in bezug auf die verschiedenen Arten der weißen Blutkörperchen. In Analogie zum Blutbild sprechen wir von einem *Mitosephasenbild*.

Ich möchte hier nicht auf die Beschreibung der verschiedenen Mitosestadien — Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Rekonstruktionsphase — eingehen, die Ihnen bekannt sein werden. In unbeeinflussten Bindegewebeekulturen befindet sich etwa die Hälfte der Mitosen im Stadium der Prophase und der Metaphase, die andere Hälfte verteilt sich auf Anaphasen, Telophasen und Rekonstruktionsphasen (für Einzelheiten vgl. O. BUCHER, Lehrbuch der Histologie, 1948). Wir können nun durch geeignete experimentelle Einflüsse in jede Phase der Zellteilung eingreifen, am leichtesten in die Metaphase, wie ich Ihnen nochmals am Beispiel des Colchicins, mit dessen Wirkungen Sie nun schon etwas vertraut geworden sind, zeigen möchte.

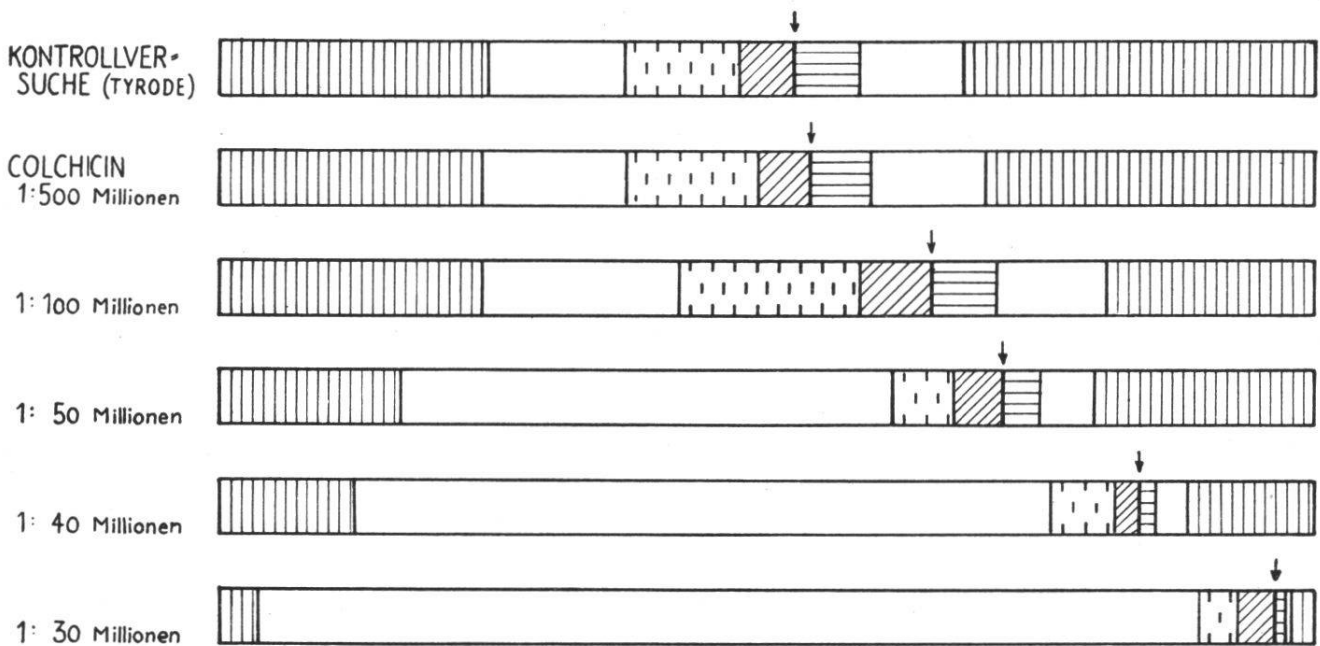


Abb. 8. Darstellung der Verschiebung der Phasenprozentanteile nach 10stündiger Einwirkung von Colchicin. Man beachte die mit steigender Konzentration des Giftes zunehmende Rechtsverschiebung der schräg schraffierten Anaphasen, deren Ende durch einen Pfeil markiert ist. (Aus O. BUCHER 1947.)

Da das Colchicin die Bildung der Teilungsspindel und infolgedessen auch die Einordnung der Chromosomen in die Aequatorialplatte stört, kommt es zu einer Blockierung der Mitosen im Stadium der frühen Metaphase. Im Mitosephasenbild erkennen wir nun, daß schon eine Colchicinkonzentration von 1 : 100 Millionen nach neunstündiger Einwirkung eine relative Zunahme der Metaphasen bewirkt und die in der graphischen Darstellung (Abb. 8) schräg schraffierte Anaphase infolgedessen bereits etwas nach rechts verschoben ist. Wir können, um nochmals die hämatologische Terminologie anzuwenden, von einer Rechtsverschiebung der Anaphase sprechen. Mit zunehmender Konzentration des Giftes wird diese Rechtsverschiebung immer ausgeprägter (nach Einwirkung von Colchicin 1 : 30 Millionen sind rund 86 % aller Mitosen pathologische Metaphasen).

Wir können nun die *Analyse des Teilungsgeschehens* und besonders die Beeinflussung des Mitosenbildes auch *als Test für die cytotoxische Wirkung eines Pharmakons* verwenden. Als Beispiele solcher Fragestellungen erwähnen wir Untersuchungen der gewebsschädigenden Wirkungen lokal applizierter Stoffe wie Antiseptika, Lokalanaesthetica etc., sowie die Prüfung des Reinheitsgrades eines Pharmakons (z. B. Penicillin, O. BUCHER 1946/47, Streptomycin, O. BUCHER 1948).

Wie sich solche Untersuchungen z. B. durchführen lassen, möchte ich anhand des *Penicillins* zeigen. Wir haben schon mit den ersten, 1945/46 in der Schweiz zur Verfügung stehenden Präparaten Versuche

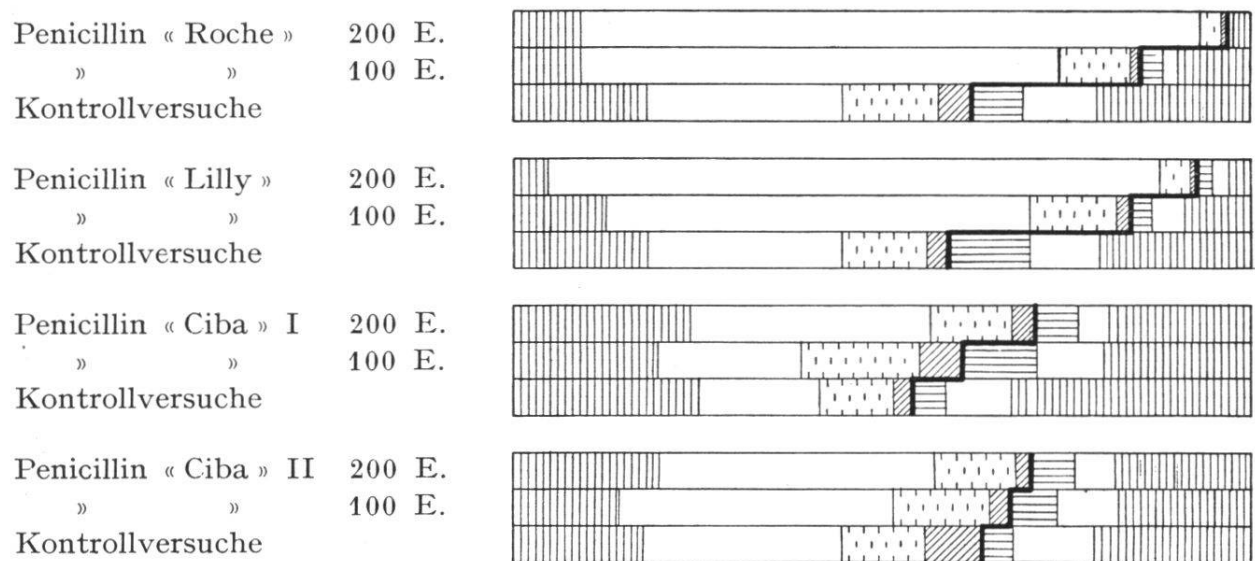


Abb. 9. Vergleichende cytotoxische Untersuchungen mit verschiedenen 1945/46 im Handel befindlichen Präparaten von *Penicillin*. Phasenbild mit Schädigungsstufen. Für Einzelheiten siehe Text. (Aus O. BUCHER 1947.)



an Gewebekulturen angestellt und sind dabei zu dem überraschenden Resultat gelangt, daß verschiedene Penicillinpräparate, welche auf ihre antibakterielle Wirkung getestet und in dieser Hinsicht somit gleichwertig waren, cytotoxisch verschieden wirkten. Das kommt am Mitosenphasenbild recht anschaulich zur Geltung (Abb. 9). Für jedes Penicillinpräparat wurde das nach 9-10stündiger Einwirkung von 100 und 200 Einheiten pro  $\text{cm}^3$  Tyrodelösung erhaltene Phasenbild zu demjenigen der parallel geführten Kontrollversuche in Beziehung gesetzt und die Rechtsverschiebung der Anaphase in der graphischen Darstellung besonders hervorgehoben; damit haben wir den Begriff der Schädigungsstufen eingeführt (O. BUCHER 1947). Die Tiefe dieser Schädigungsstufen ist ein augenfälliges Maß für die mitosenschädigende und — da uns die schädigende Beeinflussung des Teilungsgeschehens hier nur als Kriterium für die Gewebsschädigung dient — cytotoxische Wirkung des Medikamentes. Interessant ist, daß bei den Versuchen mit reinem Penicillin G bei der genannten Konzentration von Schädigungsstufen praktisch nicht mehr gesprochen werden kann. Hier brauchte es Konzentrationen von  $10^4$  Einheiten pro  $\text{cm}^3$  zur Beeinträchtigung des Teilungsgeschehens. Das zeigte, daß die starke cytotoxische Wirkung jener ersten Präparate nicht dem therapeutisch aktiven Stoff, sondern den dem Präparat noch anhaftenden Verunreinigungen zuzuschreiben war.

Zu gleichen Schlußfolgerungen kamen wir schon, bevor wir über das reine kristallisierte Penicillin G verfügten, durch die Untersuchung von frischen und alten Lösungen verschiedener Penicillinfabrikate. Es zeigte sich nämlich, daß mit dem Altern der Lösungen die antibakterielle Wirkung ab-, die cytotoxische Wirkung indessen zunahm. Diese Dissoziation im Verhalten der bakteriostatischen und der gewebsschädigenden Wirkung tritt bei den heute vorliegenden reinen Penicillinpräparaten nicht mehr auf.

Die Gewebekultur erwies sich als ausgezeichnetes Testobjekt zur Prüfung des Reinheitsgrades der Penicillinpräparate.

Man hat sich außerordentlich viel mit dem Teilungsgeschehen in der Gewebekultur und dessen experimentellen Beeinflussung befaßt. Es wurde jedoch lange Zeit nicht daran gedacht, die Kerngrößenverhältnisse der nicht in Teilung befindlichen Zellen zu studieren, obschon in den letzten 25 Jahren eine ausgedehnte Literatur über *karyometrische Untersuchungen* entstanden ist.

Auf die für solche Untersuchungen an Gewebekulturen in vitro von uns ausgearbeitete Methodik kann hier natürlich nicht näher eingetreten werden ; sie ist in unseren schon früher publizierten Arbeiten nachzulesen (O. BUCHER 1950, O. BUCHER und B. HORISBERGER 1950, O. BUCHER und R. GATTIKER 1950, 1952).

Es hat sich nun gezeigt, daß in der Bindegewebe-Deckglaskultur in bezug auf die Kernvolumenverhältnisse zwei Zelltypen vorliegen, wobei die Kerne der sogenannten Außenzone im Prinzip doppelt so groß sind wie die der an das Mutterstück angrenzenden Innenzone. Für jede dieser beiden Zonen, zwischen welchen ein fließender Übergang besteht, erhält man bei variationsstatistischer Auswertung der

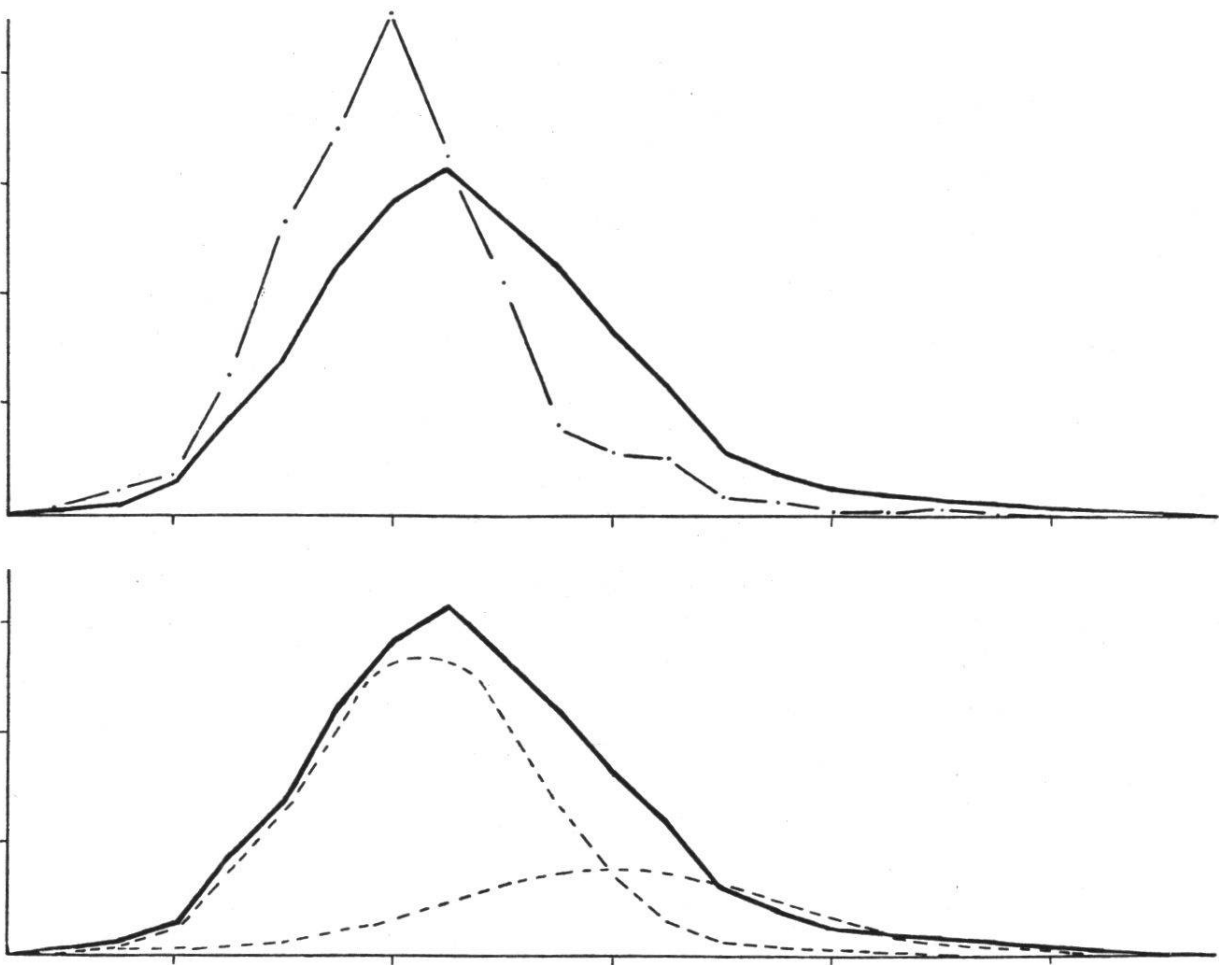


Abb. 10.

Oberes Koordinatensystem : *Kerngrößen-Frequenzkurven* aus Kaninchen-Fibrocytenkulturen (Außenzone). Ausgezogene Kurve aus Kulturen, die mit Colchicin vorbehandelt worden sind ; unterbrochene Kurve aus den parallel geführten Kontrollversuchen.

Unteres Koordinatensystem : Ausgezogene Kurve : aus Colchicin-Vorbehandlungsversuchen ; gestrichelte Kurven : Teilkurven (Normalverteilungen), erhalten durch Zerlegen der dick ausgezogenen Kurve, deren asymmetrische Form durch Superposition zu erklären ist.

Meßresultate eine eingipflige Kerngrößen-Frequenzkurve. Die Kerngrößenverhältnisse der Innenzone stimmen grundsätzlich mit denen des gleichen Gewebes in vivo überein, während die Kerne der in bezug auf das Wachstum aktiveren Außenzone auf das doppelte Volumen herangewachsen sind.

Alle diese Kurven aus unbehandelten Bindegewebe-kulturen sind bei Auswertung eines genügend großen Kernmateriales mehr oder weniger symmetrisch und gleichen bis zu einem gewissen Grade einer Glockenkurve. Nach *Vorbehandlung mit Colchicin* haben wir nun aus der Außenzone, die allein wir hier näher untersucht haben, eine asymmetrische, stark nach rechts ausgezogene Kurve erhalten (Abb. 10). Diese Kurve ist, wie wir zeigen konnten, durch Superposition zweier eingipfliger Kurven mit den Maxima in den sogenannten Regelklassen  $K_2$  (wie in den unbehandelten Kulturen) und  $K_4$  (= verdoppeltes Kernvolumen) entstanden. Unter der Annahme, daß es sich bei den Teilkurven um Normalverteilungen handelt, können wir die zusammengesetzte Kurve zerlegen, indem wir aus Kurventeilen, die als unvermischt anzusehen sind, die Teilkurven berechnen (O. BUCHER 1952). Durch die Colchicinbehandlung ist somit ein weiterer Zelltyp mit doppelt so großen Kernen entstanden, was durch *Polyplloidisierung* erklärt werden kann.

Ich habe im Vorstehenden versucht, einige wenige Fragestellungen, zu deren Lösung Untersuchungen an Gewebekulturen in vitro beigetragen haben, zu skizzieren. Die Auswahl ist natürlich ganz unvollständig, indem ich mir gestattete, besonders solche Probleme heranzuziehen, die uns selbst schon beschäftigten. So habe ich z. B. nicht über das große Gebiet der Züchtung von Geschwulstgeweben — das die Gewebezüchter schon mehr als 40 Jahre lang beschäftigt — gesprochen sowie über die hochinteressanten Versuche der Umwandlung gezüchteter normaler Bindegewebe- und Epithelzellen in Sarkom- bzw. Krebszellen, so z. B. vermitteltst Einwirkung carcinogener Kohlenwasserstoffe. Sie sehen jedoch schon aus den wenigen aus dem ganzen Problemkreis herausgegriffenen Andeutungen, daß experimentelle Untersuchungen an Gewebekulturen, die man als mikroskopisch kleine Laboratoriumstierchen betrachten könnte, aus der modernen Grundlagenforschung nicht mehr wegzudenken sind. Die experimentelle Biologie und Medizin hat durch die Methode der Gewebezüchtung in vitro eine nicht zu unterschätzende Bereicherung erfahren.

### Literaturverzeichnis

- BUCHER O., Z. Zellforsch. 29, 283-322, 1939 (Colchicin und Trypaflavin).  
— — Z. Zellforsch. 30, 438-462, 1940 (Arsenik).  
— — Ciba Zeitschrift 74, 2529-2568, 1940 (Gewebezüchtung).  
— — Schweiz. Med. Wschr. 75, 715-718, 1945 (Colchicin).  
— — Schweiz. Med. Wschr. 76, 290-293, 1946 ; 76, 375-378, 1946 ; 77, 171-173, 1947 ; 77, 849-852, 1947 (Penicillin).  
— — Experientia II, 461-463, 1946 (Leukocyten in vitro).  
— — Schweiz. Med. Wschr. 77, 1229-1230, 1947 (Urethan).  
— — Vierteljahresschr. nat.forsch. Ges. Zürich 92, 221-238, 1947 (Cytopharmakologische Untersuchungen an Kulturen).  
— — In Streptomycin und Tuberkulose (herausgegeben von Fanconi und Löffler), Basel 1948.  
— — Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, mit Berücksichtigung der Histophysiologie und der mikroskopischen Diagnostik. Verlag H. Huber, Bern 1948.  
— — Helv. Physiol. Acta 7, 37-54, 1949 (Urethan).  
— — Le Sang 21, 382-389, 1950 (Mitosegifte).  
— — Mikroskopie 5, 124-131, 1950 (Kernmessung, Methodik).  
— — Rev. Méd. Suisse Romande 70, 670-677, 1950 (Vie cellulaire hors de l'organisme).  
— — Archiv Julius Klaus 26, 177-186, 1951 (Kernmessungen nach Colchicinbeeinflussung).  
— — Verh. Anat. Ges. 1951, 86-92 (Kernmessung).  
— — Mém. Soc. Vaud. Sc. Nat. 10, 245-270, 1951 (Poisons de la mitose).  
— — Acta Anat. 14, 98-107, 1952 (Frakturheilung in vitro).  
— — Experientia, 8, 201-204, 1952 (Zur Analyse von Kerngrößen-Frequenzkurven).  
— — und GATTIKER R., Acta Anat. 10, 430-460, 1950 (Kernmessung).  
— — — — Rev. Suisse Zool. 57, 769-788, 1950 (Kernmessung).  
— — — — Z. Zellforsch. 37, 56-88, 1952 (Methodik der Kernmessung und statist. Verarbeitung der Resultate).  
— — und HORISBERGER B., Acta Anat. 9, 258-278, 1950 (Kernmessung).  
— — und WEIL J.-TH., Experientia 7, 38-40, 1951 (Frakturheilung).  
CAMERON G., Tissue Culture Technique. New-York 1950.  
FELL H. B. und ROBISON R., Biochem. J. 23, 767, 1929 ; 24, 1905-1921, 1930.  
FISCHER A., Gewebezüchtung, München 1930.  
HARRISON R. G., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 4, 140-143, 1907.  
NIVEN J. S. F., Arch. Exp. Zellforsch. 11, 253-258, 1931.  
— — Journ. Path. a. Bact. 34, 307-324, 1931.  
OLIVO O. M., Monitore Zool. Ital., Suppl. vol. LVI, 132-141, 1947.  
— — C. R. Assoc. Anat. 1949, 573-580.  
— — Memorie Accad. Scienze Istituto Bologna, Serie X, Tomo VI, 1949.  
PARKER R. C., Methods of Tissue Culture. New-York 1950.  
STRANGEWAYS T. S. P., The Technique of Tissue Culture « in vitro ». Cambridge 1924.  
WEIL J.-TH., Thèse, Lausanne 1950. Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakteriolog. 14,