

XIX.**Zur Histogenese der Knochenregeneration.**

Experimentelle Studien aus dem pathol. Institut in Zürich.

Von Dr. A. Bonome aus Genua.

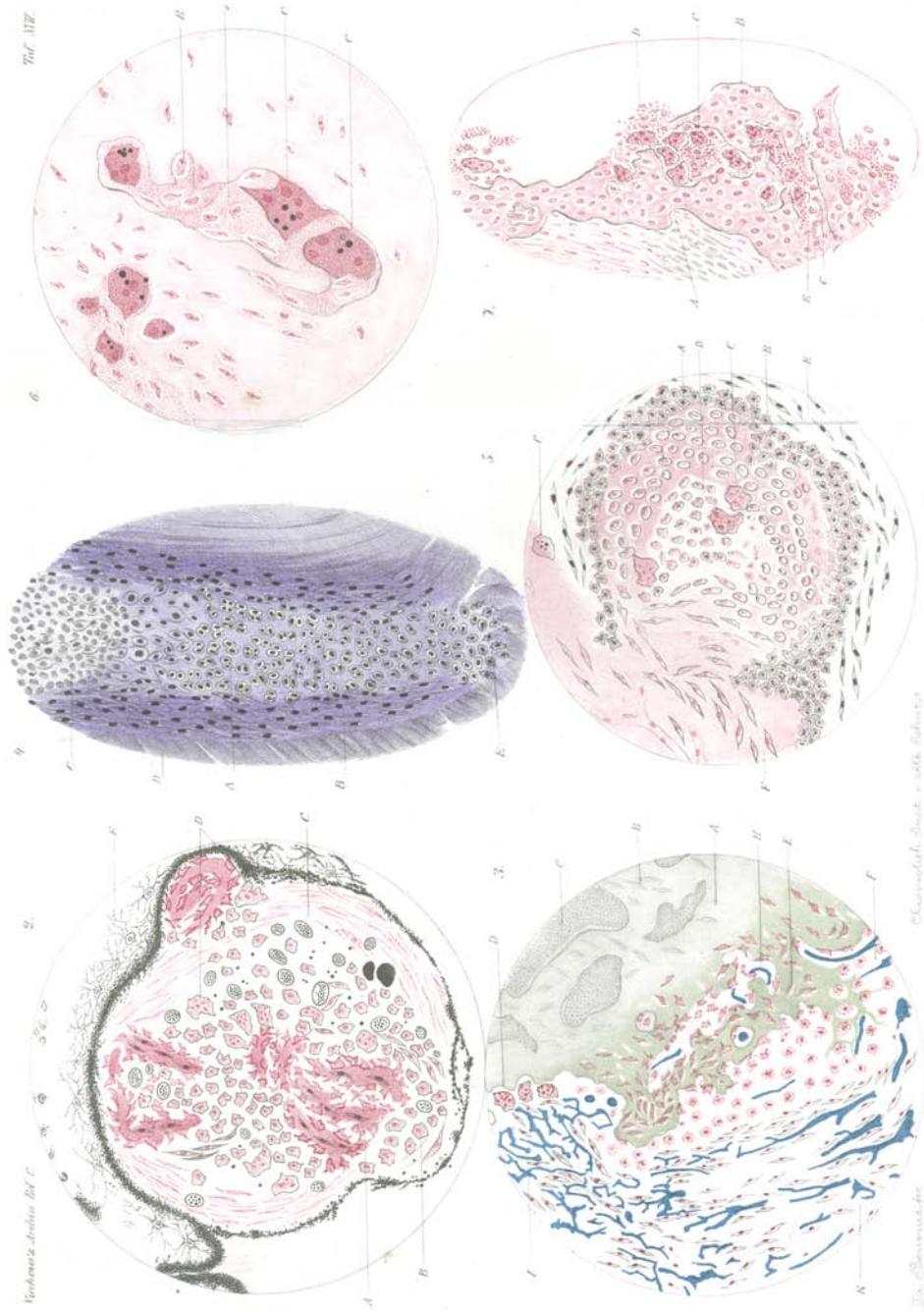
(Hierzu Taf. XVI—XVIII.)

Die enge Beziehung zwischen den meisten pathologisch-anatomischen Veränderungen des Knochengewebes und dem Regenerationsprozess erklärt das grosse wissenschaftliche Interesse, welches die Entwicklungsvorgänge dieses Gewebes erwecken. Wenn man bedenkt, dass weder alle die zahlreichen, bis jetzt auf dem Gebiete der Histogenese der Knochen erschienenen Arbeiten zu einem übereinstimmenden Resultate geführt haben, noch überhaupt völlige Klarheit in das Wesen der Knochenneubildung gebracht worden ist, so begreift man leicht die vielfachen, gemachten Anstrengungen, um zu positiven Resultaten zu gelangen, auf einem Gebiete, welches nicht nur das Interesse der Wissenschaft in hohem Maasse beansprucht, sondern dem auch überdies noch eine praktische Seite zukommt. Haben ja nicht die mannichfachen anatomisch-pathologischen Erscheinungen, die für den Chirurgen zu Indicationen für die Resection werden, um eine mehr oder weniger vollkommene functionelle Leistungsfähigkeit wieder zu erhalten, ihre solide Basis in der Kenntniss der Regenerationsvorgänge? Wie die anatomisch-pathologischen Vorgänge der Knochen während ihrer Entwicklung ein vorzügliches Material für die Kenntniss des normalen Entwicklungsganges der Knochen überhaupt liefern, so sind uns anatomisch-pathologische Veränderungen schon vollkommener oder nahezu entwickelter Knochen ein ausgezeichnetes Hülfsmittel für das Studium deren Neubildung. Hieraus ergiebt sich unmittelbar die Nothwendigkeit der experimentellen Untersuchungen. Das mit schon vollständig entwickelten Knochen angestellte Experiment, abgesehen von dem genetischen und topographischen Werthe

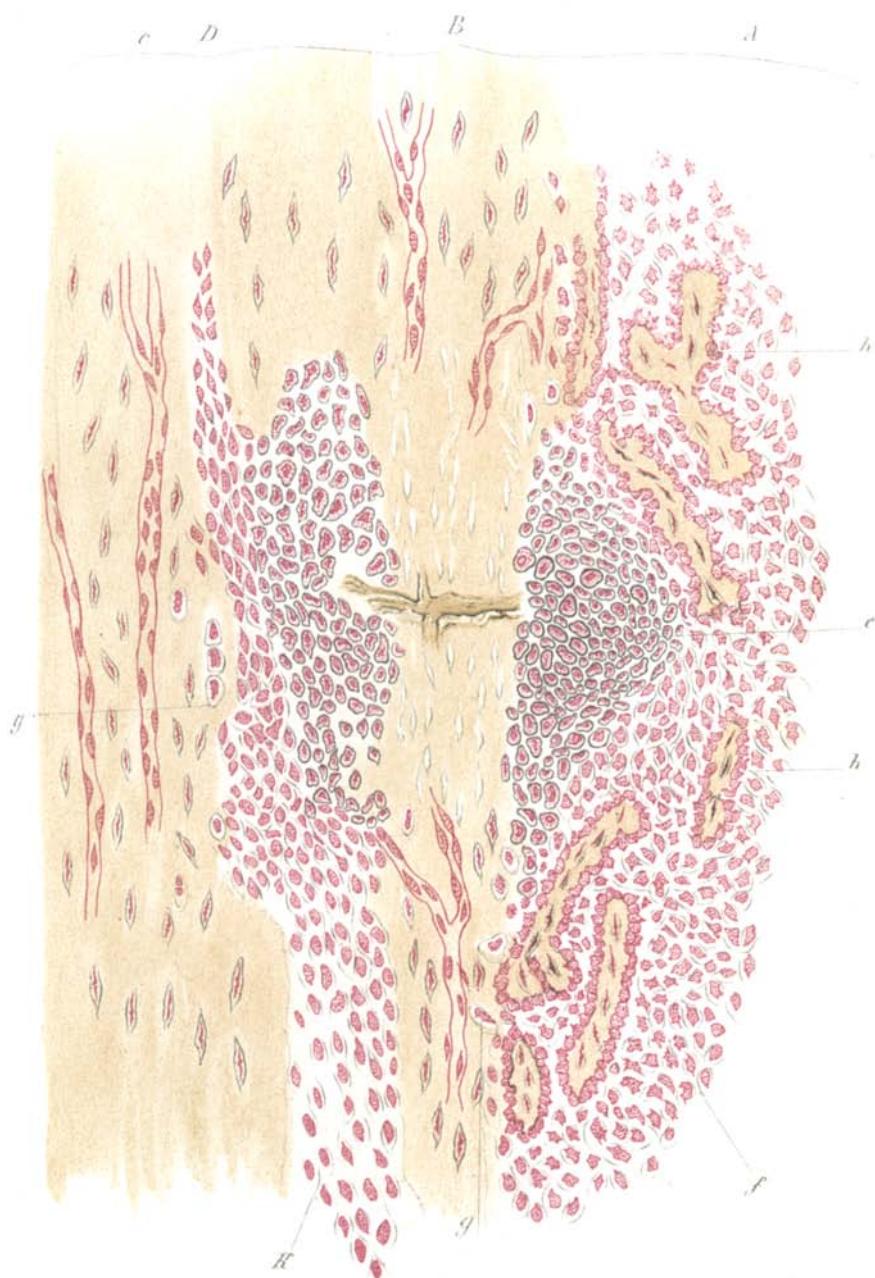


Dr. Bonnus's Coll.

Chromolith. Druck v. H. Schmitz.



S.



2.



dasselben, bietet uns Gelegenheit zur Besprechung einiger fundamentaler Thatsachen, welche nicht nur für Knochen im Entwicklungsstadium, sondern auch unter pathologischen Umständen für schon völlig entwickelte Knochen Bedeutung haben, so z. B. die Phänomene der Neubildung durch Apposition oder die Resorptionsprozesse. Diese Erscheinungen sind so innig an die Veränderungen des Knochengewebes selbst gebunden, dass daraus die Unmöglichkeit resultiert, sich mit den Regenerationsvorgängen zu beschäftigen, ohne auch diese selbst zu berücksichtigen, Vorgänge, über deren Erklärung heutzutage noch nicht das letzte Wort gesprochen ist.

Damit nicht der Knochenneubildungsprozess von den Vorgängen der normalen Entwicklung gestört wird, ist es nothwendig, zum Studium der elementaren Prozesse, welche die Knochenneubildung, unabhängig von ihrer normalen Entwicklung, charakterisiren, nur schon ausgewachsene Thiere herbeizuziehen. Ebenso unerlässlich ist es, dass derartige Untersuchungen auch an *in situ* gelassenen Knochen ausgeführt werden, insofern nehmlich die Neubildung bei künstlich erzeugten Substanzverlusten, Resectionen oder Fracturen studirt werden soll. In einem solchen Falle jedoch gelingt es nur ziemlich schwer, zu erkennen, was für eine Rolle jeder einzelne Knochenbestandtheil bei der Regeneration spielt, da diese alle gleichzeitig mehr oder weniger gereizt werden; was eine stärkere reactive Entzündung mit serohämorrhagischen Infiltraten und mit partiellen Nekrosen zur Folge hat, Erscheinungen, die alle dem Studium der elementären Neubildungsprozesse hemmend entgegentreten. Man ist daher gezwungen, die verschiedenen Knochenbestandtheile isolirt in ihrem Verhalten im Regenerationsmechanismus zu prüfen und da geben uns partielle Läsionen sowie totale und partielle Transplantationen ein vorzügliches Mittel an die Hand. Die Transplantationen führen bisweilen Nachtheile mit sich, welche die Beobachtung sehr erschweren, ja selbst unmöglich machen können. Als solche erwähnen wir die Nekrose auf den transplantirten Theilen in Folge von mangelhafter Vascularisation oder starke Entzündungen, welche in der Nachbarschaft des transplantirten Stückes entstehen können, mitunter genügend, um die Eiterung desselben nach sich zu ziehen. Diese Methode partieller Transplantationen

wurde schon von Ollier¹⁾ und Maas²⁾ benutzt. Ihre Experimente aber beschränkten sich auf die makroskopische Prüfung der Regenerationsvorgänge. Es lassen sich mit dieser Methode und bei vorsichtiger Anwendung derselben selbst die verschiedenen Phasen der heterotopischen Knochenentwicklung sehr schön verfolgen. Ollier ist es nur bei wenigen Transplantationsversuchen von Periost gelungen³⁾, Knorpelsubstanz, die Vorläuferin des Knochengewebes, zu erhalten, was Ollier aus der Kleinheit des transplantirten Stückes, der schlechten Anpassungsfähigkeit des Gewebes, in das die Transplantation gemacht wurde und aus der Verschiedenheit der Versuchsthiere zu erklären sich bemühte. Dieser Misserfolg mag indess vielmehr in der Reizungsstärke und in dem Einfluss der Vascularisation seine Erklärung finden, Bedingungen, welche direct die physiologische Aufgabe der transplantirten Elemente zu alteriren im Stande sind. Auch Ollier giebt an, dass gereiztes Periost Knorpelsubstanz zu erzeugen vermag. Ist es daher nicht denkbar, dass verschiedene Reizungsgrade auch verschiedene Wirkungen nach sich ziehen und dass, anstatt Knorpel zu erzeugen, eine mässige Reizung der Kambiumschicht blos eine elementäre Hyperplasie zur Folge hat? Wir werden mit Hülfe von Experimenten und mit Demonstration mikroskopischer Objecte des weiteren kennen lernen, welche Bedeutung diesen Phänomenen beizumessen ist, welche nicht nur in den Transplantationen zu Tage tritt, sondern auch bei der Callusbildung sich wiederholt. Und in der That beggnen wir dem Knorpel überall da, wo die stärkste Reizung stattgefunden hatte, und je weiter man sich z. B. von dem Sitze einer Fractur entfernt, desto mehr sieht man beträchtliche Hyperplasie der osteogenetischen Schicht mit directen Uebergängen der Zellen derselben in wirkliche Osteoblasten an dessen Stelle treten. Für jetzt beschränke ich mich darauf, zu bestätigen, dass der Grad der Intensität des Reizes, der auf das Regenerationsgewebe ausgeübt wird, wie auch eine mehr oder weniger

¹⁾ Traité experimental et clinique de la régénération des os etc. 1867.

²⁾ Ueber das Wachsthum und die Regeneration der Röhrenknochen, mit besonderer Berücksichtigung der Callusbildung. Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie. Bd. XX. Hft. 4.

³⁾ Gelang auch R. Buchholz. Bd. 26. S. 78.

grosse Neigung zur Vascularisation auf die Differenzirung der physiologischen Function der Elemente des genannten Gewebes von bedeutendem Einflusse sind. Die meisten Autoren, welche mit der Neubildung der Knochen sich beschäftigt haben, haben das Versuchsmaterial vorzugsweise von Fracturen, von Substanzverlusten, von Amputationsstumpfen und von pathologisch-anatomischen Objecten, wie Nekrosen, Caries etc. hergenommen. Die Bedeutung einiger regressiven Phänomene, welche in inniger Beziehung zu der Neubildung stehen, hat sich fast ausschliesslich bei der directen Untersuchung pathologischer Objecte herausgestellt, während Arbeiten auf experimenteller Seite blos nach einzelnen Richtungen zu befriedigenden Resultaten geführt haben. So z. B. wurde die Resorptionstheorie, welche zu so vielen Controversen unter den Autoren Anlass gegeben hat, experimentell nur auf Knochen von mit Krapp gefütterten Thieren und bei Einkeilung von Silberstiften studirt. Die Methode partieller Transplantationen bietet Gelegenheit, sowohl die regenerativen als die regressiven Prozesse zu prüfen. Ich nur habe mir zur Aufgabe gemacht, den Knochenneubildungsvorgang speciell durch Transplantation einzelner Knochenbestandtheile, sei es in homologes, sei es in heterologes Gewebe, zu studiren, um hernach die erlangten Resultate mit denjenigen von Fracturen, Substanzverlusten, einfachen Reizungen und von anatomisch-pathologischen Prozessen in Vergleich setzen zu können. Aus früher angedeuteten Gründen habe ich den Vörzug der partiellen Transplantationen gegeben. Sie allein gestattet, alle Details des Prozesses zu verfolgen, sowohl die, welche auf das transplantirte Stück, als auch diejenigen, welche auf das Grundgewebe und die Gefässe Bezug haben. Der Ort der Transplantation war meistens das Muskelgewebe, mitunter die vordere Augenkammer, wobei die Durchsichtigkeit der Cornea mit Vortheil zu benutzen ist, um makroskopisch am lebendigen Thiere die Veränderung der transplantirten Stücke verfolgen zu können. Um auch direct die Veränderungen, welche den Regenerationsprozess charakterisiren, genau mikroskopisch zu beobachten, habe ich nach dem Rathe des Herrn Prof. Klebs eine Reihe von Periosttransplantationen auf Nährgelatine, bald mit Humor aqueus, bald mit Blutserum bereitet, in sterilisirte Glaszellen, wie sie

zum Studium der Mikroorganismen gebraucht werden, gebracht und darin zweckmässig untersucht. Diese Untersuchung, damit überhaupt gute Resultate erhofft werden konnten, musste so eingerichtet werden, dass man das transplantirte Stück in einer Temperatur, ungefähr gleich der Körperwärme fortwährend beobachten konnte. Zu diesem Zwecke wurde das Mikroskop mit der diesbezüglichen Glaszelle in ein doppelrandiges Zinkkästchen gestellt, welches man mit Wasser auf 35° erwärmt. Alle 2—3 Stunden wurden Beobachtungen gemacht, was bequem geschehen konnte, da die vordere Wand des Kästchens aus Glas bestand und somit das Licht zu dem Spiegel des Mikroskops hinreichend Zutritt hatte. Ausserdem benutzte ich als Untersuchungsmaterial zum Studium der Regenerationsprozesse Fracturen, Substanzverluste und verschiedene mechanische Reizungen, wie auch eine Reihe pathologischer Objecte, die mir von Herrn Prof. Klebs gefälligst zur Verfügung gestellt worden waren. Ich nehme bei dieser Gelegenheit Anlass, Herrn Prof. Klebs für seine Freundlichkeit meinen besten Dank öffentlich auszusprechen.

Als Versuchsthiere dienten mir hauptsächlich weisse Ratten, Kaninchen und Tauben, meistentheils ausgewachsene Exemplare. Alle verwendeten Stücke wurden, sobald das Thier mit Chloroform getötet worden war, mit Berlinerblaumasse injicirt und zur Fixirung der Elemente isolirt für einige Tage in Flemming'sche Flüssigkeit gebracht. Zur Entkalkung benutzte ich eine 1—2 procentige Chromsäurelösung. Mitunter kamen einzelne Stücke, wie z. B. das Periost frisch zur Untersuchung, nachdem das Cambium ausgebreitet und mit Flemming'scher Flüssigkeit behandelt worden war. Diese Methode bietet den Vortheil einer schnelleren Fixation der Elemente speciell der Kerne, wie Flemming¹⁾ und Krafft²⁾ gezeigt haben. Die Fixation der Elemente indessen kann auch mittelst parenchymatöser oder endovasculärer Injectionen von Flemming'scher Flüssigkeit erreicht werden. Zur Färbung bin ich im Falle, ausser dem von Krafft u. A. sehr gerühmten Hämatoxylin auch Saffranin in starker Lösung zu empfehlen und ziehe dieses dem Hämatoxylin und dem Pikro-

¹⁾ Zellsubstanz, Kern- und Zelltheilung. Leipzig 1882.

²⁾ Zur Histogenese des periostalen Callus. Beiträge zur path. Anatomie u. Physiologie, herausgeg. von Ziegler. Jena 1884.

carmin entschieden vor, indem von demselben die Kerne und die Knorpelsubstanz sehr gut gefärbt werden und es gestattet die Zwischensubstanz und das Bindegewebe mit anderen, passenden Substanzen zu färben. So z. B. habe ich sehr gute und beweisende Präparate bekommen durch Vereinigung von Saffranin mit Benzolderivaten, welche zufolge ihrer sauren Reaction die Grundsubstanz färben.

Sehr in die Augen springend ist der Vortheil der Saffraninfärbung vor allen anderen für die Knochen. Meine Methode ist des näheren folgende: Zuerst bringe ich die Schnitte etwa 15 Minuten lang in Wasser, dem etwas Kalilauge zugesetzt ist, um ihnen die von der Entkalkung her eigene saure Reaction zu nehmen. Ein nun folgendes Färben mit Saffranin (1 : 30 Wasser) während ca. 15 Minuten genügt, um eine dauerhafte Färbung zu erzielen. Nach Waschung mit Wasser und Alkohol mache ich mit einer starken Lösung von Säuregrün (ca. 15 Minuten) die Nachfärbung und wasche wieder in gleicher Weise. Das Saffranin lässt sich übrigens auch ganz gut allein verwenden.

Experimentelle Untersuchungen.

I. Das Periost und seine Bedeutung im Regenerationsprozesse.

Summarium: Structur des Periosts. — Moderne Ansichten über die regenerative Function des Periosts. — Resultate der Transplantation.

A. Transplantation des Periosts allein zwischen die Muskeln, unter die Haut und in die vordere Augenkammer. — Veränderungen im Periost und in dem Gewebe, in das die Transplantation gemacht wurde. — Gefäßverbindungen. — Transplantation auf die Nährgelatine. — Resultate der localen Periostirritationen. — Einfache mechanische Irritation ohne Fractur. — Substanzverluste. — Chemische Reizungen. —

B. Transplantation des Knochens ohne Periost. — Erfolge auf der Oberfläche des Knochens und auf dem Nachbargewebe.

Das Periost im normalen Ruhezustande besteht aus zwei morphologisch gut unterschiedenen Schichten, einer äusseren feinen, von fibrillärem Aussehen, die mit ihrer Hauptaxe der

Axe des Knochens parallel eingelagerte Spindelzellen enthalten und einer inneren dickeren, aus grossen, polygonalen Zellen mit nur einem centralen Kerne und Kernkörperchen zusammengesetzten; letztere Zellen sind dicht aufeinandergehäuft und bilden das wesentliche Element des Periosts. Die Intercellularsubstanz ist spärlich. Diese Theilung des Periosts in zwei Schichten kommt schon im primitiven Perichondrium zu Stande, sobald in dem noch knorpeligen Knochen die ersten Spuren der Ossification zu Tage treten. (Ossificationspunkt.) Das Erscheinen des Ossificationspunktes in den Röhrenknochen ist gekennzeichnet durch eine Segmentirung des primitiven Knorpels in zwei Theile, welche die beiden Enden des embryonalen Knochens repräsentiren. Letztere erscheinen so von einer bereits mit Kalksalzen imprägnirten Zone eingeschnürt. Zu der Zeit kann man die Theilung des Perichondriums in die genannten Schichten nur in denjenigen Punkten des Perichondriums beobachten, welche schon über ossificirte Knorpelsubstanz gelagert sind. In den weiteren Entwicklungsstadien, wo die ganze Knochenoberfläche ihr knorpeliges Aussehen verloren hat, tritt diese Theilung des Perichondriums deutlicher hervor, indem man das Erscheinen eines Gefäßsystems beobachten kann, welches dem primitiven Perichondrium fehlt. Die periostalen Gefässe sind sehr gross und verlaufen zuerst in der äusseren Schicht, parallel der Oberfläche des Knochens, von Zeit zu Zeit knäulförmige Netze bildend, wie dies in von mir mit Berlinerblau injicirten Präparaten von Kaninchen sehr deutlich ersichtlich ist. Diese knäulförmigen Gefässschlingen traten in die osteoblastische Schicht des Periosts ein, indem sie in die Gefässe der äusseren Schicht übergehen. Bisweilen werden die periostalen Gefässe so zahlreich und gross, dass bei der Injection sich die periostale Schicht der Beobachtung völlig entzieht und der Knochen von einem dichten Blutgefäßsystem bekleidet erscheint. Die Vascularisation der darunter sich befindenden compacten Knochensubstanz geht fast ausschliesslich vom Periost aus. Es ist mit Leichtigkeit zu beobachten, dass von den in longitudinaler Richtung verlaufenden grossen Gefässen andere kleinere Gefässe in spitzem Winkel sich abzweigen, die sich gegen die Knochensubstanz richten, in sie eindringen und aus einer zarten Schicht endothelialer Zellen

bestehen. Viele dieser Gefässe, sobald sie in die Knochensubstanz eingedrungen sind, verästeln sich in derselben, viele treten in schräger Richtung in den Markkanal ein, wo sie sich mit dem ansehnlichen Gefäßnetz der Peripherie der Medulla verbinden. Auf der äusseren Schicht des Periosts können auch Lymphbahnen und Lymphräume wahrgenommen werden.

Bis jetzt gehen die Ansichten der verschiedenen Autoren in Betreff der Bedeutung des Periosts gegenüber den anderen Knochenbestandtheilen im Neubildungsprozesse sehr auseinander. Ein Theil derselben, Rokitansky¹⁾, Scarpa²⁾, J. Müller³⁾, Lossen⁴⁾ und Hofmockl⁵⁾, indem sie dem Periost eine gewisse Wichtigkeit zuschreiben, wollen auch das Knochengewebe betheiligt wissen; Hofmockl und Lossen erwähnen auch bereits einige Veränderungen, die sie in den Knochenzellen beobachtet haben. Andere theilen die Hauptbedeutung dem Perioste, der Medulla und den anliegenden Weichtheilen zu, so Virchow⁶⁾, Förster⁷⁾, Gurlt⁸⁾, O. Weber⁹⁾, Ollier¹⁰⁾, Hueter¹¹⁾, Volkmann¹²⁾, Billroth¹³⁾, R. Hein¹⁴⁾, Hiltz¹⁵⁾.

Eine dritte Gruppe [Floureens¹⁶⁾, Lebert¹⁷⁾, Voetsch¹⁸⁾,

¹⁾ Wiener Zeitschrift, April 1848 u. Lehrbuch der path. Anatom. 1856.

²⁾ Conf. Rust, Magazin 1831. Bd. 33.

³⁾ Ueber die Entwicklung der Knochensubstanz. Leipzig 1856.

⁴⁾ Ueber Rückbildung des Callus. Dieses Archiv Bd. 55.

⁵⁾ Ueber Callusbildung. Stricker's Jahrbücher 1874.

⁶⁾ Cellularpathologie. Berlin 1858.

⁷⁾ Handb. der spec. path. Anatomie. 1863.

⁸⁾ Knochenbrücke. Berlin 1861.

⁹⁾ Dieses Archiv Bd. 15. Hft. 5 u. 6. 1859.

¹⁰⁾ Loc. cit.

¹¹⁾ Grundrisse der Chirurgie.

¹²⁾ In Pitha-Billroth's Chirurgie.

¹³⁾ Allg. Chirurgische Pathologie und Therapie. Billroth, Joung und Menzel, Ueber die Regeneration des Knochens vom Periost.

¹⁴⁾ Ueber Regeneration gebrochener und resecirter Knochen.

¹⁵⁾ Der innere Callus, sein Entstehen und Bedeutung. Henle u. Pflüger's Zeitschrift. III. 2. 1853.

¹⁶⁾ Recherches sur le developpement des os et des dents. Paris 1842. et Theorie experimental de la formation des os. Paris 1843.

¹⁷⁾ Annales de la Chirurg. franç. et étrang. T. X. 1844. et Physiologie pathol. Paris 1845.

¹⁸⁾ Die Heilung d. Knochenbrüche per primam intentionem. Heidelberg 1843

Alquie¹⁾] betrachtet das Periost allein als den Hauptfactor der Knochenregeneration.

Wie aus diesen Angaben hervorgeht, wird dem Periost bald eine grössere, bald eine kleinere Bedeutung für den Knochenneubildungsprozess zuerkannt. Eine Reihe bedeutender Kliniker geben an, dass die anliegenden Weichtheile sich aktiv an der Knochenneubildung betheiligen, indem sie den ganzen Vorgang als Entzündung auffassen. So ist nach Billroth der Callus nichts anderes als ein Entzündungsproduct, d. h. eine entzündliche Neoplasie, welche von einer zelligen Infiltration im Periost und den Havers'schen Kanälchen gebildet wird, wie auch von einer Infiltration im Knochenmark und in den umliegenden Weichtheilen. Billroth schreibt dem Periost keine ausschliessliche, osteoplastische Bedeutung zu, aber betrachtet diese Membran als zur Bindesubstanz zugehörig, fähig unter einem entzündlichen Reize zu proliferiren. Wir ersehen hieraus klar, dass Billroth die ganze regenerative Bedeutung den weissen Blutzellen zuerkennt, die zwischen die Bruchflächen infiltrirt den Callus zu formiren im Stande sind. Es handelt sich also um einen ähnlichen Vorgang, wie bei der Narbenbildung. Wenn diese Ansicht theilweise durch die Versuche von Maas²⁾ und Anderen auf dem Wege subcutaner Zinnoberinjectionen, aus welchen hervorgeht, dass nach einer Zeit von fünf Wochen im Periost und im Callusgewebe noch Zinnoberkörnchen nachweisbar sind, unterstützt wird, so wird derselben von den Versuchen von Ollier³⁾ und auch Maas wiederum widersprochen, welche den Beweis liefern, dass ohne Beteiligung der inneren Schicht des Periosts keine Knochenneubildung möglich ist. Und in der That hat Ollier durch eine Reihe vergleichender Experimente dargethan, dass, wenn man durch Abkratzen oder durch Cauterisation mit schwacher Silbernitratlösung die innere Schicht des Periosts zerstört, keine Knochenneubildung mehr erzielt werden kann. Es bewahrheiten sich diese vergleichenden Experimente selbst auf einem und demselben Lappen ausgeführt. Nach der Ansicht Billroth's ist von der Zerstörung eines Theiles des

¹⁾ Clinique médicale de Montpellier, Mai 1844,

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O.

Periosts, wodurch eine stärkere Reizung und bedeutendere Leukozyteninfiltration hervorgebracht wird, eine stärkere regenerative Reaction zu erwarten; es tritt aber gerade das Gegentheil ein. Dem Periost kommt also nach Ollier eine specifische Bedeutung im Regenerationsprozesse zu. Auch Virchow¹⁾ unterstützt diese Ansicht, indem er die Knochenneubildung von einer Proliferation der inneren Schicht des Periosts abhängig glaubt, die theilweise zuerst in Knorpelsubstanz, theilweise direct in Knochengewebe übergeht. Neuerdings beobachtete ferner Bajardi²⁾ im Callus ein Proliferationsstadium der Periostzellen in den ersten 52 Stunden nach dem Trauma, welchem bald die Differenzirung der zelligen Elemente von der Grundsubstanz der osteogenetischen Zone folgt. Diese Differenzirung ist durch die Bildung von rudimentären osteoiden Balken charakterisiert, welche von der Oberfläche des Knochens herkommend und dem Laufe der Gefäße folgend, in die osteoplastische Schicht des Periosts eindringen; die fibröse, äussere Schicht des Periosts, von einer Leukozyteninfiltration abgesehen, erleidet keine bemerkenswerthe Veränderung. Vor Kurzem ist noch Krafft³⁾ durch eine Reihe von Beobachtungen im jungen Callus zu dem Schlusse gelangt, dass niemals eine Wanderzelle sich in Osteoblasten umwandelt. Er führt dies theilweise auf die morphologischen Unterschiede, theilweise auf die Kerntheilungsfiguren der Periostzellen zurück. Der Regenerationsprozess hat nach Krafft seinen Grund ausschliesslich in der Proliferation der Zellen der osteogenetischen Periostschicht, welche Wucherung durch die Kariokinese der Kerne charakterisiert ist. Der grösste Theil der Wanderzellen geht zu Grunde und liefert damit vielleicht den nun proliferirenden Zellen ihr Baumaterial, ein anderer Theil nimmt die Zerfallsproducte des zertrümmerten Gewebes, wie auch des hervorgequollenen Blutes in sich auf und vergrössert somit sein Volumen, ein weiterer Theil nimmt ebenfalls an Volumen zu, erhält bläschenförmige Kerne und kommt wahrscheinlich für die Bildung des Bindegewebes zur Verwendung. Krafft betrachtet den

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Ueber die Bildung und Rückbildung des Callus etc. Moleschott's Untersuchungen. XII. 3. u. 4. Hft.

³⁾ a. a. O.

Knochenneubildungsprozess als völlig unabhängig von der reaktiven Entzündung, welche an den Fracturstellen aufzutreten pflegt.

Nach diesen neuen Ansichten wird der Regenerationsprozess in den ersten Tagen seines Auftretens von einer reaktiven Entzündung begleitet, weshalb es von Wichtigkeit ist, zu entscheiden, in welchem Verhältnisse diese beiden Prozesse zu einander stehen und welches ihre Bedeutung ist. Bei dieser Frage nun haben wir folgende Seiten des Näheren zu berücksichtigen:

- 1) Auf welche Weise verwandeln sich die proliferierenden Zellen der osteogenetischen Schicht in Knochensubstanz?
- 2) Ist es möglich, dass sich die Periostzellen direct in Osteoblasten umbilden, ohne vorerst in Elemente des Knorpels überzugehen?
- 3) Wie geht die Bildung der Knochengrundsubstanz vor sich und woher stammen die Markzellen, welche die primitiven Markräume ausfüllen?
- 4) Welche Bedeutung ist den Leucocyten beizumessen, welche in das Gewebe infiltriren, in dem die Neubildung zu Stande kommen soll?

Um zu einer entsprechenden Beantwortung dieser Fragen zu gelangen, versuchte ich in erster Linie die Periosttransplantationen, indem ich mich dabei bemühte, eine möglichst geringe Reizung zu erzeugen und die osteogenetische Schicht speciell zu erhalten.

Gehen wir nun zu den erzielten Resultaten über!

A. Periosttransplantationen zwischen Muskeln.

Diese Versuchsreihe wurde fast ausschliesslich auf weissen Ratten ausgeführt. Ein Perioststück wurde sorgfältig von dem Femur oder der Tibia einer ausgewachsenen, lebendigen Ratte losgelöst und sofort zwischen die Rückenmuskeln anderer Ratten eingehetzt. Mit Zuhilfenahme der antiseptischen Cautelen erzielte ich stets Heilung per primam. In verschiedenen Zeiträumen wurden alsdann die Thiere mit Chloroform getötet und die betreffenden Theile sofort mit Flemming'scher Flüssigkeit fixirt.

In Präparaten nun von vier Tagen beobachtet man an der Stelle der kleinen Operation eine weissgelbliche Substanz von

fibrinösem makroskopischem Aussehen, härterer Consistenz als die umliegende Muskelsubstanz und von doppelt bis dreifach so grossem Volumen wie das ursprünglich transplantirte Stück. Das umliegende Muskelgewebe scheint keine bemerkenswerthe Veränderungen erlitten zu haben, abgesehen von etwas grösserer Blässe und homogenerem Aussehen wie normal.

In mikroskopischen Präparaten erweist sich der Regenerationsprozess auch schon zu dieser Zeit ziemlich ausgeprägt. An der transplantirten Stelle lassen sich die beiden Schichten des Periosts nicht mehr erkennen. Inmitten der bedeutend proliferirten Zellen der osteogenetischen Schicht bemerkt man eine Masse von dicht aneinander gedrängten Knorpelzellen mit spärlicher Zwischensubstanz. An der Peripherie zeigen sich diese Zellen meistens rund oder oval, haben ein feinkörniges, reichliches Protoplasma und ein oder zwei centrale Kerne. Die Zellmembran erscheint sehr scharf contouirt. Die Intercellularsubstanz hat hyalines Aussehen und färbt sich stark mit Hämatoxylin und Saffranin. Gegen die Peripherie zu streben diese Zellen ein ziemlich regelmässiges, sich zwischen die Muskelsubstanz einkielendes Kreissegment zu bilden, welches von einer Schicht neugebildeter Bindegewebszellen bedeckt ist. Je näher die Knorpelzellen dem Centrum der Knorpelsubstanz zu gelegen sind, desto grössere Veränderungen weisen sie auf: die Kerne werden bedeutend kleiner und sehr häufig erblickt man nur einen einzigen in jeder Zelle, der sehr stark auf Saffranin reagirt; das Zellprotoplasma nimmt ein so homogenes Aussehen an, dass es fast nicht mehr von der Intercellularsubstanz abgegrenzt zu werden vermöchte, wenn nicht die Kapsel sehr deutlich ausgeprägt wäre. Die so veränderten Zellen häufen sich zu kleinen Gruppen von vier bis sechs, ihre Kapseln treten allmählich zurück und die Kerne kommen frei in Hohlräume der Zwischensubstanz zu liegen, die ihr homogenes Aussehen beibehält. Diese Hohlräume sind der Ausgang der primitiven Markräume. Durch Zusammenstossen mehrerer solcher Räume bilden sich grössere Höhlen, die durch ein System von Balken getrennt sind, bestehend aus Grundsubstanz, die bereits eine osteoide Structur angenommen hat, wie aus den da und dort hervortretenden Kernen hervorgeht. Solche Kerne sind nichts Anderes als Derivate eines

Theiles der alten Knorpelzellen, die sich in Osteoblasten umwandeln. Ein anderer Theil der Knorpelzellenderivate, in den primitiven Markräumen verbleibend, bildet die Markzellen, von denen viele einen epithelialen Belag längs der Wandungen der Räume darstellen. Hieraus erhellt, dass die in den primitiven Markräumen eingeschlossenen Zellen schon ihre physiologische Bedeutung angenommen haben. In dem Gewebe, in dem die Transplantation vorgenommen wurde, bemerkt man um die Knorpelsubstanz eine Neubildung von spindelförmigen Bindegewebszellen, die bald in starker Schichtung, bald zerstreut längs den Maschen des Bindegewebes der einzelnen Muskelfasern. Die Gefässverbindungen sind in diesem Stadium noch nicht nachweisbar.

In Präparaten einer sechstägigen Transplantation sind die Hohlräume besser ausgeprägt und die Balken, welche sie umgrenzen, sind durch ein osteoideres Aussehen charakterisiert, indem nehmlich jetzt die Osteoblasten leicht zu erkennen sind.

In Präparaten von achttägiger Transplantation hat der Neubildungsprozess schon wesentliche Fortschritte gemacht. Die Knorpelzellen verhalten sich hier ganz wie bei der Bildung des normalen embryonalen Knochens. Nach innen zu platten sie sich ab, um sich in verticale Säulen zu ordnen (Fig. 1 B). Diese Anordnung ist indess nicht so regelmässig, wie dies beim primitiven Knorpel der Fall ist, welcher der normalen Entwicklung des Röhrenknochens vorausgeht, wo man nach Strelzoff¹⁾ zwei verschiedene Arten von Säulen unterscheiden kann. In dem sich regenerirenden Knorpel erblickt man nur die Rudimente dieser Bildung, wie aus unserer Figur deutlich hervorgeht. Die Basis dieser Säulen steht mit den centralen Markräumen in Verbindung, die die Markzellen einschliessen. Die Entstehung obiger Räume wurde oben betrachtet. An der Peripherie sind die Knorpelzellen rund oder oval und an den Seiten werden sie kleiner, ihr Protoplasma körniger, die Grundsubstanz spärlicher und die Zellen erhalten das Aussehen der Osteoblasten. Auch in den feinsten Schnitten ist nicht mit Sicherheit zu bestimmen, wo die Knorpelzellen aufhören und die Osteoblasten anfangen.

¹⁾ Ueber die Histogenese der Knochen. Untersuchungen aus dem pathol. Institute in Zürich. 1873.

Ein Theil der Osteoblasten verschwindet, um die osteoiden Balken zu bilden, welche unter einander anastomosiren, die secundären Markräume des neugebildeten Knochens umgrenzen. Die jungen Balken osteoider Substanz sind sehr schmal. Die äussersten laufen parallel mit den äussersten Schichten der Osteoblasten, welche die Fortsetzung der seitlichen Entfaltung der primitiven Knorpelzellen darstellen, die anderen gehen in ein Netz über, in dessen grossen Maschen die Markzellen eingebettet sind.

Die Osteoblasten gehen meistentheils in der Bildung der Grundsubstanz der osteoiden Balken auf, wie schon Strelzoff u. A. nachgewiesen haben. Ich bin aber der Ansicht, dass bei der Bildung der Grundsubstanz dieser Balken auch die Knorpelzellen betheiligt sind, was ich aus dem Verhalten der centralen Knorpelzellen erschliesse, welche die Basis der sich in die primitiven centralen Markräume eröffnenden Knorpelsäulen bilden. Diese Zellen nehmlich platten sich ab, ihre Kerne verkleinern sich und nehmen eine längliche, unregelmässige Gestalt an und nach und nach geht das ganze Element in der Grundsubstanz auf. Dieser Vorgang hat grosse Aehnlichkeit mit der endochondralen Entwicklung. Wir haben somit die ersten Anfänge eines rudimentären Knochens vor uns, entstanden nach den Gesetzen der normalen Knochenentwicklung. In der That, wenn wir die histologischen Veränderungen in Betracht ziehen, welche die Knorpelsubstanz in ihrem Ossificationsprozesse erlitten hat, so können wir bei deren Entwicklungsgange dieselben vier Zonen oder Schichten unterscheiden, in welche Strelzoff den normalen Epiphysenknorpel bei dessen Bildung theilt. Wir erkennen auch mit Leichtigkeit in der Fig. 1 (achtägige Periosttransplantation) eine erste peripherische Zone mit runden oder ovalen Zellen, eine zweite, in der sich die Knorpelzellen in Säulen anordnen, eine dritte, wo die Bildung der osteoiden Balken beginnt auf Kosten der zu Grunde gehenden Knorpelzellen und die Imprägnation mit Kalksalzen ihren Anfang nimmt und eine vierte, wo die Kapseln der Knorpelzellen sich eröffnend die primären Markräume entstehen lassen. Woher die kleinen, die Markräume erfüllenden Zellen stammen, eine Frage, welche von Strelzoff¹⁾,

¹⁾ a. a. O.

Waldeyer¹⁾, Neumann²⁾, Rollet³⁾ und Rutschin⁴⁾ aufgeworfen wurde, kann nach meiner Ansicht übereinstimmend mit Strelzoff, jedoch blos für die peripherischen Markräume, wo man die directe Umwandlung der Knorpelzellen in Osteoblasten verfolgen kann, entschieden werden (Fig. 1 D); Strelzoff nehmlich nimmt an, dass diese Zellen directe Abkömmlinge der Osteoblasten sind. Was die centralen Markräume betrifft, diejenigen nehmlich, welche zuerst in der Grundsubstanz des Knorpels in Folge des Verschwindens der Kapseln erscheinen, wie dies bereits in den viertägigen Transplantationspräparaten deutlich gesehen werden kann, so gelingt es nicht, den Beweis zu erbringen, dass sie von Osteoblasten herstammen. Denn in der That treffen wir einerseits zu dieser Zeit noch keine Osteoblasten, die im Stande wären, die primitiven Markräume auszufüllen, andererseits gelingt es sehr leicht, zu beobachten, wie nach der Zerstörung der Knorpelkapseln die Kerne und der nicht zu Grunde gegangene Theil des Protoplasmas in den entstandenen Hohlräumen zurückbleiben. Meine Ansicht geht dahin, dass die Zerfallselemente der Knorpelzellen und die daselbst eingedrunnenen Blutkörperchen die Markzellen entstehen lassen, welche die primitiven Markräume erfüllen. Somit also stimme ich theilweise mit H. Müller überein, nach welchem die Markzellen aus den Knorpelzellen hervorgegangen sind.

In Präparaten von 25tägiger Periotransplantation bemerkte man nun aber, dass die Entwicklung des heterotopischen Knochens nicht in dem Maasse fortgeschritten ist, wie nach dem Beginne sich erwarten liess. In diesen Präparaten, die zum Zwecke des Studiums der Bildung der Gefässe mit Berlinerblau injicirt worden waren, lässt sich des ferneren beobachten, dass einzelne Gruppen von Knorpelzellen nicht in Knochensubstanz übergegangen sind. Dieselben erscheinen vielmehr von einer Schicht neugebildeter bindegewebiger Spindelzellen umhüllt, die wie die Wand einer Cyste aussieht. An einzelnen Punkten be-

¹⁾ Archiv für mikroskopische Anatomie. Bd. I. 1865. S. 361.

²⁾ Archiv der Heilkunde. XI. S. 423.

³⁾ Stricker's Handbuch der Lehre von den Geweben. Leipzig 1868. S. 98.

⁴⁾ Zur Entwicklung des Knochengewebes. Untersuchungen aus dem Institute für Physiologie und Histologie in Gratz. 1870,

steht zwar eine Eröffnung der Knorpelkapseln in primitive Markräume, die Imprägnation der Grundsubstanz mit Kalksalzen aber ist eine sehr mangelhafte. An anderen Stellen wiederum lässt sich die Bildung vollständig entwickelter Knochenbalken erkennen, die gut gebildete Markräume umschließen, in denen ein reichliches Gefäßnetz nachweisbar ist. In den Maschen dieses Netzes finden sich zahlreiche Markzellen, sowie auch vereinzelte Fettzellen. Die Gefäße der Medullarräume gehen in diejenigen der Knochenbalken über. Von einem einzigen centralen Gefäßstamme, der der Hauptaxe der Ossificationszone folgt, zweigen sich hier kleinere Gefäße ab, welche gegen die die Markhöhlen umschliessenden Knochenbalken sich wenden und mit den Gefäßen der secundären peripherischen Markräume in Beziehung treten. Wir haben also gleichsam Gefässschlingen um die Knochenbalken herum. Auch in dem Bindegewebe, das in der Umgebung der Ossificationszone mässig entwickelt ist, finden sich grosse und zahlreiche Gefäße.

B. Periosttransplantationen in die vordere Augenkammer.

Diese Versuchsreihe wurde an Kaninchen verschiedenen Alters gemacht. Die jüngeren waren noch nicht drei Monate alt. Ein der Tibia oder dem Femur entnommenes Stück Periost wurde sofort vermittelst einer Gräfe'schen Kataraktlanzette etwa 3 mm nach innen vom Rande der Cornea in die vordere Augenkammer desselben Thieres hineingebracht. Der Humor aqueus blieb grössttentheils erhalten. Entzündliche Complicationen als Folge dieser Operation traten nie auf. Die erlangten Resultate sind folgende:

Nach 36 Stunden gelingt es noch nicht, positive Resultate nachzuweisen. Meistentheils lag das transplantirte Stück der etwas geschwollenen und leicht von Leucocyten infiltrirten Iris an.

In Präparaten von 3tägiger Transplantation ist meistens der transplantirte Lappen mit der Iris zur Adhäsion gelangt. In der Umgebung zeigt sich die Iris verdickt und mit Leucocyten infiltrirt, von denen einige in ihrem Innern Pigmentkörnchen enthalten. In dem transplantirten Stücke bemerkt man zahlreiche, grosse, protoplasmareiche Zellen von meist rundlicher Gestalt und mit einem einzigen centralen Kerne. Morphologisch gleichen

diese Zellen den Knorpelzellen, entbehren aber deren ausgeprägte, scharfe Erscheinung. Diese Zellen, die den transplantirten Lappen in seiner ganzen Ausdehnung erfüllen, fehlen auf der Iris vollständig. Sehr wahrscheinlich repräsentiren diese Zellen ein Uebergangsstadium von den Elementen der osteogenetischen Schicht des Periosts zu denjenigen der Knorpelsubstanz.

In Präparaten 10tägiger Transplantation ist die Adhärentz mit der Iris eine ausgesprochene. Das transplantirte Stück erscheint als ein rundliches, unregelmässiges, weisses Körperchen von 1—2 mm Durchmesser, das in die vordere Fläche der Iris gleichsam eingekleilt ist. Die Cornea verändert ihre durchsichtige Gestalt nie. In mikroskopischen Schnitten bemerkt man, dass die Knochenbildung, wenn auch nicht ganz gleichförmig und regelmässig, doch in der ganzen Ausdehnung dieses Tumors vor sich gegangen ist. Sie erscheint vielmehr in der Gestalt vereinzelter, auseinanderliegender Ossificationspunkte. Fig. II A. Es erinnert diese histologische Structur an den Bau gewisser Tumoren, in denen spontane Knochenbildung aufgetreten ist. Knorpellemente sind nicht nachweisbar, aus denen der Knochen hätte hervorgehen können. Die Knochenbalken sind ziemlich schmal, unregelmässig angeordnet und man vermisst bei denselben die Tendenz, Anastomosen unter sich zu bilden, wodurch Markräume zu entstehen vermöchten, wie wir dies bei den Präparaten mit intramusculärer Transplantation beobachtet haben. Die Interstitien aber zwischen den einzelnen Knochenbalken sind mit grossen, polygonalen Osteoblasten mit feinkörnigem Protoplasma und stark entwickeltem Kerne ausgefüllt. Fig. II B. Viele Osteoblasten, zwischen benachbarten Balken gelegen, streben diese durch ihre Enden zu vereinigen, andere sind um die Balken herum angeordnet. An einigen Stellen bemerkt man noch den Osteoblasten ähnliche Zellen, die aber schwarzes Pigment enthalten. Fig. II C. Auf der Oberfläche einiger Balken finden sich zerstreut einzelne Riesenzellen. Im Innern der Knochenbalken ist die Zahl der Knochenzellen sehr beschränkt; diese sind kernhaltig und arm an Ausläufern, erscheinen aber in ihrem Volumen etwas vorgrössert. Der ganzen Knochenneubildung ist schwarzes Pigment aufgelagert.

Die Unregelmässigkeit der Entwicklung heterotopischen

Knochengewebes in der Iris, sowie das Auftreten von Riesen-zellen auf der Oberfläche der Balken, die auf eine beginnende Resorption hindeuten, beweisen, dass die Iris der Knochenent-wicklung nicht günstig ist.

C. Periosttransplantationen in Nährgelatine.

Diese Versuchsreihe wurde ebenfalls an Kaninchen gemacht, da das Periost dieser Thiere den Vorzug grosser Zartheit und Anpassungsfähigkeit besitzt. Manchmal kam 2 pCt. Gelatine, mit ganz frischem Humor aqueus desselben Versuchsthiere oder mit Blutserum oder mit Fleischpeptons gemischt, manchmal allein 5 pCt. Gelatine zur Verwendung. Ich habe meine Ver-suche mit den verschiedenartigsten Glaszellen vorgenommen und bin dabei zur Ueberzeugung gelangt, dass deren Grösse und Form für das Gelingen des Experimentes ohne Bedeutung ist. So konnte ich in einer ganz kleinen Zelle, die von der Flüssig-keit fast ganz angefüllt wurde, wiederholt während längerer Zeit die Veränderungen der Periostzellen verfolgen. Der Feuchtig-keitsgrad darf nicht zu hoch sein, weil sonst in Folge der Ver-dunstung die Gelatine an der untern Fläche des Deckglases zer-stört wird. Eine fast unüberwindliche Schwierigkeit bei diesen Versuchen besteht immer in der natürlichen Dicke der Periost-stücke, die eine Vergrösserung mit starken Objectiven nicht ge-stattet. Der Versuch, blos die osteogenetische Schicht durch Abkratzen zu erhalten und allein zu cultiviren, gelingt nur sehr mangelhaft, wahrscheinlich weil durch diese Operation die Zellen zerstört werden. Bevor die Transplantation gemacht wurde, unterwarf ich die Gelatine einer ein bis zweitägigen genauen Beobachtung, um mich von deren vollkommener Reinheit zu überzeugen. Nach der Transplantation nun wurde die ganze Zelle auf dem Objecttische des Mikroskops fixirt und mit dem-selben in einem Zinkkästchen mit doppelter Wandung in einer Temperatur von 30° gehalten. Am besten konnte die Beobach-tung immer am Rande des transplantirten Perioststückes vorge-nommen werden, wegen der daselbst grössten Feinheit der Substanz.

Nach 2 oder 3 Stunden trat gewöhnlich die Zersetzung der zufällig mit hineingekommenen Blutkörperchen auf. Das Häm-

globin löst sich nehmlich in dem Leime auf, der in einer Temperatur von 25—30° immer flüssig ist. Die spärlichen Leucocyten haben keine Veränderung erlitten. Nach 6—10 Stunden erscheinen die Zellen der osteogenetischen Schicht vergrössert; der Kern aber zeigt noch keine Veränderungen. Sein Durchmesser beträgt im Mittel 6 μ . Die Zwischensubstanz ist an vielen Orten feinkörnig. Auch nach 24 Stunden und mehr lässt der Kern keine Veränderungen in seinem Durchmesser entdecken, wohl aber bricht derselbe das Licht nicht mehr so verschieden vom Protoplasma. Nach 36 Stunden erscheinen viele Zellen körnig und trüb in ihrer ganzen Ausdehnung und repräsentieren somit die Erscheinungen der Coagulationsnekrose. Es giebt aber auch Zellen, welche sich länger, bis 3 Tage erhalten. In keiner aber lässt sich Kernheilung oder Proliferation nachweisen. Auch in Perioststücken, die seit 2 oder 3 Tagen transplantirt waren, und eine unbedeutende Volumzunahme erkennen liessen, konnten nach Fixirung in Flemming'scher Flüssigkeit, Zerzupfung und Untersuchung in Glycerin keine Proliferationserscheinungen constatirt werden.

Ferner habe ich unter das Periost von Hunden und Kaninchen abgeplattete Capillarröhrchen von Glas geschoben, die an beiden Extremitäten geöffnet und mit 5 pCt. Gelatine gefüllt waren. Der Zweck dieses Versuches war das Studium der Periostzellen, die eventuell durch Capillarität in das Röhrchen aufgenommen werden könnten. Nach 3 Tagen wurden diese Röhrchen in Gelatine transplantirt und unter einer Temperatur von 30° mit starker Vergrösserung beobachtet. In ihrem Innern waren viele Leucocyten sichtbar, dagegen waren nur einzelne Zellen der osteogenetischen Schicht an den Enden des Röhrchens hängen geblieben, keine aber war in das Röhrchen selbst eingedrungen. Auch mit dieser Art von Transplantationen ist es mir nicht gelungen, Proliferationen zu erzielen.

Man könnte hieraus folgende Schlüsse ziehen, die freilich noch mancher weiterer Bestätigung bedürfen, doch vielleicht als Zielpunkte für weitere Untersuchungen Bedeutung haben:

1. Die osteogenetischen Zellen des Periosts entbehren, aus dem Körper entfernt, unter möglichst passenden Bedingungen untersucht, der Fähigkeit, Theilungsvorgänge, sei es indirect, sei

es direct einzugehen. Es scheinen demnach zum Zustandekommen dieser Vorgänge im Organismus bestimmte Einwirkungen der letzteren nothwendig zu sein, welche diesem Versuche fehlen.

2. Die osteogenetischen Zellen besitzen nicht die Fähigkeit der Wanderung, wie die Leucocyten, ein Grund mehr, beide Arten von Zellen für wesentlich different zu halten.

D. Locale Irritationen des Periosts.

Bis jetzt haben wir uns mit den funktionellen Eigenschaften des aus seinen normalen Verhältnissen im Knochen herausgerissenen Periosts beschäftigt. Es bleibt uns nun noch übrig, zu untersuchen, wie sich diese Membran zu verschiedenen, nicht von Knochenläsionen begleiteten Reizen verhält und in welcher Weise sie in ihr erzeugte Substanzverluste wieder zu ersetzen vermag. Der Zweck dieser Versuche besteht darin, zu erforschen, ob das Periost auf verschiedene Reize nach Art eines Bindegewebes reagirt, oder ob dasselbe ein besonderes Verhalten von grösserem Interesse zeigt. Diese Reize waren theils mechanische, theils chemische, sowohl von momentaner als auch von langer Dauer. In Präparaten, bei denen das Periost durch einen aseptischen Seidenfaden direct über dem Knochen fest zusammengeschnürt worden war, konnte man nach 24—36 Stunden die Wahrnehmung machen, dass an der Schnürstelle die Elemente der osteogenetischen Schicht in Nekrose übergegangen waren und an der Oberfläche des Fadens eine mässige Infiltration von sehr geschwollenen Leucocyten stattgefunden hatte. Die weit herum stattgehabte Periostablösung war jedenfalls eine Folge der mechanischen Insulte. Stellenweise war eine Proliferation der Cambiumschicht mit Bildung kleiner osteoider Balken aufgetreten. Kerntheilungsfiguren konnte ich hier nicht constatiren. Ebenfalls war starke Proliferation der Cambiumschicht das Resultat 36—48stündiger chemischer Irritation, wie z. B. mit sehr verdünnter Salpetersäure. Hierzu genügte schon die blosse Beührung mit einem in diese Flüssigkeit getauchte Glasstäbe.

Die Einschiebung eines ganz kleinen Platinbleches zwischen Cambiumschicht und Knochenoberfläche bewirkt einen andauernden Reiz, der von einer sehr starken Prolifera-

tion gefolgt ist. So fand ich bei einem ausgewachsenen Hunde einen Monat nach der Operation an der betreffenden Stelle eine taubeneigrosse Knochenneubildung über dem blos einen halben Quadratcentimeter grossen Platinblech.

Bei einer sorgfältigen Herausschneidung eines kleinen Stückes Periost, so dass keine Spur der Cambiumschicht auf der Knochenoberfläche zurückbleibt, beobachtet man nach 2—3 Tagen die Ränder des Defectes sehr geschwollen, erweicht und blassroth gefärbt. Mikroskopisch sieht man viele grosse, granulirte Zellen mit einem centralen Kern und eine Infiltration zahlreicher, regel- und bläschenförmiger Leucocyten, analog denjenigen, die Arnold¹⁾ als im Knochenmark von jungen Kaninchen und Meerschweinchen vorkommend beschrieben hat. Die Kerne obiger grossen, protoplasmareichen Zellen, die von der Proliferation der Cambiumschicht herrühren, färben sich intensiv mit Saffranin und mit Hämatoxylin. Theilungsfiguren konnte ich nie in denselben nachweisen. Die Knochenoberfläche an der Stelle des Defectes erscheint glatt und die Zellen der Knochensubstanz können kaum erkannt werden, weil deren Kerne die Färbungsfähigkeit verloren haben (Nekrose der Zellen). Ebenfalls sind die Blutgefässer der Knochensubstanz theils granulirt und enthalten in ihrem Innern Ueberreste von Blut, theils haben wir für deren Existenz keine andere Anhaltspunkte als eine Reihe von mit Osmiumsäure stark braun gefärbten Fettkörnchen. Dann kann auch in der ganzen Umgebung des Defectes eine Neubildung von Gefässen auf dem Boden der Knochensubstanz wahrgenommen werden. Diese Veränderung in dem Knochen stehen mit einer Reihe von Phänomenen, welche die Resorption charakterisiren, im Zusammenhang, wie wir des weiteren sehen werden.

E. Transplantation von Knochen ohne Periost.

Das Studium der regenerativen Eigenschaften des Periosts kann noch durch die Untersuchung derjenigen Vorgänge vervollständigt werden, welche der totalen Entfernung des Periosts folgen. Da handelt es sich nur darum, zu erforschen, ob das

¹⁾ Beobachtung über Kern- und Zelltheilung etc. Dieses Archiv Bd. 93. Hft. 1. Weitere Beobachtungen über die Theilungsvorgänge und weissen Blutkörperchen. Dieses Archiv Bd. 97. Hft. 1.

total entfernte Periost durch das umliegende Bindegewebe oder aber durch die Knochensubstanz wieder restituirt werden kann. Die diesbezüglichen Versuche bieten auch Gelegenheit, die Resorptionsphänomene zu studiren, die die normale und pathologische Knochenneubildung so interessant macht. In dieser Reihe von Transplantationen werden wir indess nur das auf das Periost Bezügliche berücksichtigen und auf das andere später zurückkommen. Zu den Versuchen wurden Ratten verwendet. Bald wurden ganze Knochen (Humerus, Femur) bald Fragmente den noch lebenden Thieren entnommen und nach Abschabung des Periosts in die Rückenmuskeln anderer Thiere transplantirt. In 2 Wochen alten Präparaten, in denen ein ganzer Femur transplantirt worden war, zeigte sich dieser Knochen in seinem Volumen sehr reducirt, die Epiphysenenden hatten ihre typischen Unebenheiten verloren und eine runde Gestalt gewonnen; auch die Wanddicke hatte bedeutend abgenommen. Die Oberfläche des Knochens war rauh und von einem leicht blutenden Granulationsgewebe bedeckt. Makroskopisch erschien das Medullarrohr von einer grauen Masse erfüllt, die nicht mehr die normalen Charaktere des Knochenmarkes besass. Mikroskopische Längs- und Querschnitte zeigen, dass die ganze Knochenmasse ein homogenes Aussehen angenommen hat. Sie färbt sich diffus und es ist nicht mehr möglich, in derselben Knochenzellen zu erkennen. In den Epiphysenenden sind die Markräume erweitert und die sie umschliessenden Balken schmäler und der Zellen beraubt. Auf der Oberfläche dieser Balken begegnet man hie und da Gruppen von Riesenzellen. In diesen Markräumen findet sich ein körniger Detritus (Fig. 3 C), der auf Färbesubstanzen sehr schwach reagirt, Fett- und Riesenzellen. Die Oberfläche des ganzen transplantirten Knochens ist sehr unregelmässig und zeigt hin und wieder Furchen, in denen ein junges, spindelzeliges, gefäßreiches Bindegewebe von der Umgebung her sich entwickelt hat. In vielen Präparaten findet man an der Knochenoberfläche vereinzelte Punkte, wo der Untergang der zelligen Elemente ausgeblieben ist und die Kerne noch stark auf Saffranin reagiren. An diesen Stellen ist es auch leicht nachzuweisen, dass normal entwickelte Gefässe vorhanden sind, welche in die Knochensubstanz eindringen (Fig. 3 H); im Gegensatz der

umliegenden nekrotischen Partien, wo die Gefässse verschwunden sind. Von diesen Punkten aus breitet sich auch ein System osteoider Balken aus, die von grossen Zellen erfüllt sind (Fig. 3 E). Auf der Oberfläche der Balken und in den von ihnen eingeschlossenen Räumen, wie auch an der Knochenoberfläche bemerkt man zahlreiche Osteoblasten (Fig. 3 F). In diesen Räumen findet sich eine Masse von Gefässschlingen vor, welche sich durch die starken Schichten der Osteoblasten Bahn brechen (Fig. 3 H.). Woher diese jungen Balken stammen, lässt sich mit Leichtigkeit beweisen, indem sie das directe Product der Osteoblasten sind. Ein Theil derselben schmilzt zur Bildung der Grundsubstanz zusammen, ein anderer bleibt als Knochenzellen zurück. Mit dieser starken Schichtung von Osteoblasten an der Oberfläche eines seines Periosts entblössten Knochens hat sich meines Wissens kein Autor beschäftigt. Ollier¹⁾ spricht von Phänomenen, welche in einem des Periosts verlustigen Knochen vorgehen können und behauptet, dass die Knochenhaut in *toto* sich zu regeneriren vermöge. Er erklärt aber diese Regeneration aus kleinen Ueberbleibseln der osteogenetischen Schicht, die auch bei sorgfältiger Präparation nicht umgangen werden können. Diese Regeneration in *toto* habe ich bei genauer Abschabung des Periosts nie beobachtet. Meine Ansicht geht dahin, dass diese Osteoblasten und die Bildung der Knochenbalken von den jungen in den oberflächlichsten Knochenlamellen unmittelbar unter dem Periost befindlichen Knochenzellen herstammen. Diese Zellen in der That bieten in meinen Präparaten bemerkenswerthe Veränderungen. Der Kern ist vergrössert, seine Gestalt ist unregelmässig geworden. Der Raum, in dem die Knochenzellen enthalten sind, vergrössert sich allmählich, indem die Grundsubstanz zurücktritt, weshalb die Zellen von einem grossen, hellen Saume umgeben erscheinen. Nach und nach bleiben die Knochenzellen, die schon das Aussehen der Osteoblasten angenommen haben, frei an der Knochenoberfläche durch Verschwinden der Grundsubstanz und ein Theil derselben betheiligt sich alsbald an der Bildung der osteoiden Balken, analog der Callusbildung. An der Stelle einer Periostneubildung haben wir also

¹⁾ *Traité experimental de la régénération des os.* Paris 1867.

eine wirkliche Knochenneubildung. An einigen Punkten sind diese jungen Knochenbalken noch mit der alten schon in Nekrose übergegangenen Knochensubstanz in Verbindung und die Grenze zwischen diesen beiden Zonen ist durch die verschiedene Art der Färbung und durch die Gegenwart zahlreicher Riesenzellen an der Oberfläche des nekrotischen Knochens hinlänglich charakterisiert (Fig. 3 D). Wir haben somit eine Verschiedenheit der chemischen Constitution, wie auch die Merkmale einer beginnenden Resorption zu constatiren. In andern Präparaten ist diese neugebildete Knochenzone von den alten Knochen schon vollständig isolirt und in innigen Zusammenhang mit dem benachbarten, gefäßreichen Bindegewebe getreten. Die mit dem alten Knochen in Verbindung gewesene Fläche weist zahlreiche Riesenzellen auf. Kurz können wir also die Phänomene, die in einem des Periosts entblößten Knochen sich folgen, folgendermaassen zusammenfassen:

1. Nichtauftreten der Periostregeneration.
2. Nekrose und Resorption des grössten Theiles des Knochens.
3. Bedeutende Osteoblastenentwicklung, ausgehend von den Zellen der oberflächlichsten Lamellen des Knochens in jenen Punkten, wo die Circulation erhalten ist, im Zusammenhang mit einer schnellen Gefässentwicklung in dem peripherischen Bindegewebe.
4. Organisation dieser Osteoblasten in ein System osteoider Balken.
5. Ablösung der neugebildeten Knochenzone, die selbständig weiter lebt.

II. Regenerative Bedeutung der Knochensubstanz und des Markes.

Summarium: Resultate der Transplantation von Knochenfragmenten ohne Beteiligung von Periost oder Mark. — Marktransplantationen. — Transplantation von Knochen ohne Mark. — Resorptionstheorie und Bedeutung der Riesenzellen im Resorptionprozess.

A. Transplantationen von Knochensplittern ohne Periost
und ohne Mark.

Die Experimente wurden an Ratten und an Kaninchen gemacht. Die Knochen lieferten jeweilen die Thiere derselben Art und meistentheils kam der Femur zur Verwendung, der, dem lebendigen Thiere entnommen, alsbald fracturirt und des Periosts und Markes beraubt wurde. Die interessantesten Präparate erhielt ich von einer Ratte, die 11 Tage nach der Operation getötet wurde und bei der die Wunde per primam geheilt war. Einige Fragmente waren sehr verkleinert, andere sehr in ihrer Gestalt verändert und zeigten an der Periostoberfläche hirsekorn grosse osteophytische Wucherungen. An vielen Stellen hatte die Dicke der Knochenwand sehr abgenommen und die Ränder erschienen abgerundet. Mikroskopische Präparate, die durch Flemming'sche Flüssigkeit vor der Entkalkung fixirt worden waren, weisen eine vollständige Nekrose der kleineren Fragmente auf; die Kerne der Knochenzellen haben die Färbungsfähigkeit mit Saffranin und Hämatoxylin eingebüsst und die Knochensubstanz besitzt ein homogenes Aussehen und lässt keine Gefässe mehr erkennen. Bei anderen Fragmenten erstreckt sich die Nekrose blos über die centralen Theile und die Peripherie, sowohl gegen die periostale wie gegen die medullare Fläche hin, erscheint von normaler Beschaffenheit. Von einzelnen Stellen der Peripherie gehen vollständig entwickelte Knochenbalken ab, welche sich in ein Gewebe von Osteoblasten auflösen. Diese Massen von Osteoblasten stehen an der Peripherie mit dem perimusculären Bindegewebe in unmittelbarem Verkehr. In einigen Punkten ist die Oberfläche des transplantirten Fragmentes von starken Lagen von Osteoblasten bedeckt und die darunter befindliche Knochensubstanz hat normales Aussehen. Da jedoch, wo keine solche Osteoblastenschichten sich finden, erscheint eine ausgedehnte Zellennekrose. Ebenfalls zeigen sich hier die Gefässe homogen und färben sich ziemlich stark mit Saffranin. In deren Innern erblickt man mit Oelimmersion ($\frac{1}{2}$ Zeiss) zahlreiche Bacillen, welche die genannte Saffraninfärbung bedingen. Ferner beobachtet man in diesen nekrotischen Stellen an der Oberfläche Riesenzenellen, sowie mit Osmiumsäure stark sich färbende Fettkörnchen. An den Punkten, wo die Knochenbalken

sich abzweigen, werden die oberflächlichen Knochenzellen allmählich grösser und gewinnen das Aussehen von Osteoblasten. Diese neuen Balken folgen der Richtung der Gefäße, welche von der Knochensubstanz aus in die starken Schichten der Osteoblasten ziehen. Diese Präparate beweisen, dass nicht alle Fragmente eines des Periosts und des Markes entblössten Knochens in Nekrose übergehen und dass an der Oberfläche der Fragmente die Bildung einer Masse von Osteoblasten möglich ist, welche die Fähigkeit sich in wirkliche Knochenbalken zu organisiren besitzen. Es ist dies eine Thatsache von grosser Wichtigkeit, indem daraus folgt, dass auch die eigentliche Knochensubstanz aktiv sich am Regenerationsprozesse zu betheiligen vermag und dass also nicht, wie Ollier¹⁾ behauptete, das Periost in toto wieder ersetzt wird, ausgehend von allfällig zurückgebliebenen Resten der osteogenetischen Schicht oder der nach ihm benannten unterperiostalen Schicht. Es scheint somit, dass eine sorgfältige Reinigung des Knochens mit dem Raspatorium ausreicht, um eine Wiederbildung des Periosts zu verhindern. An vielen Stellen hatte ich selbst die oberflächlichsten Knochenlamellen entfernt. Ich muss also annehmen, dass die Knochenzellen unter Umständen die äusseren Osteoblasten bilden. Den Vorgang dieser Umbildung zeigen einzelne meiner Präparate des Näheren. An einzelnen Stellen vergrössern sich die Knochenzellen, der Raum, in dem sie eingebettet liegen erweitert sich, so dass sie von einem hellen Saume, Product des Schwundes der Grundsubstanz, umgeben erscheinen. Diese erweiterten Räume spitzen sich den polaren Enden der Zellen gegenüber ausläuferartig zu und man kann vielfach beobachten, dass sich die Spitzen dieser Säume kettenartig aneinanderreihen, wodurch also möglicherweise eine Communication verschiedener solcher Hohlräume untereinander geschaffen wird. Aehnliche Ketten von Knochenzellen sind auch von Hofmockl²⁾ beschrieben, der jedoch nicht auf das stattfindende Zurücktreten und Höhlenbilden der Grundsubstanz aufmerksam macht. Diese jeweilen nur eine Zelle enthaltenden Hohlräume erweitern sich gegen die Knochenoberfläche hin mehr und mehr und bilden daselbst freie

¹⁾ a. a. O.

²⁾ a. a. O.

Einbuchtungen, in welchen sich diese Zellen haufenweise vorfinden, die aber bereits das Aussehen von Osteoblasten gewonnen haben, d. h. einen grösseren, von viel Protoplasma umgebenen Kern erhalten haben und einer Zellmembran entbehren. Nicht alle Zellen an der Oberfläche dieser transplantirten Fragmente wandeln sich in Osteoblasten um; ein Theil derselben wird nekrotisch. Mit grosser Wahrscheinlichkeit ist dieses zweifache Verhalten eine Folge irgend welcher Einflüsse des Gefässsystems. Die Erscheinungen bei der Transplantation eines des Periosts und Markes entbehrenden Knochens lassen sich kurz folgendermaassen zusammenfassen:

1. Nekrose aller centralen Zellen.
2. Bildung von Osteoblasten und Knochenbalken, ausgehend von den Knochenzellen der oberflächlichsten Lamellen des Knochens.
3. Nekrose eines Theiles der peripherischen Zellen.

Die Knochenneubildung vollzieht sich in denjenigen Punkten, wo Gefässverbindungen mit dem umliegenden Granulationsgewebe aufgetreten sind. Ein Theil der Osteoblasten, die aus den Knochenzellen hervorgegangen sind, bleibt an der Knochenoberfläche, ein Theil bildet die Knochenbalken, analog der Callusbildung. Die Osteoblasten verkleinern sich und der peripherische Theil ihres Protoplasmas geht in der Bildung der osteoiden Grundsubstanz auf, die nachher sich mit Kalksalzen imprägnirt. In Betreff der Entstehung der Grundsubstanz stimmt meine Ansicht mit der von Strelzoff¹⁾ überein. Unter Umständen können also die jungen, oberflächlichen Knochenzellen wieder die Eigenschaften der Osteoblasten übernehmen. Hierin besteht also die regenerative Bedeutung der Knochensubstanz. Wenn man bedenkt, dass die Osteoblasten blos ein weniger vollkommenes Uebergangsproduct im Entwicklungsgange der Knochenzellen, repräsentiren, so ist es vollständig klar, dass die regenerative Bedeutung der Knochensubstanz in einem regressiven Prozess der zelligen Elemente und der Grundsubstanz ihren Ursprung nehmen muss.

¹⁾ Ueber die Histogenese der Knochen. Untersuchungen aus dem path. Institute in Zürich. 1873.

Verschiedene Marktransplantationen, sei es in das Muskelgewebe, sei es in einzelne gefässreiche Drüsen wie die Thymus, geben keine positive Resultate. Nie erhielt ich Knochenbildung. Im Gegentheil hiezu ergaben Transplantationen von Knochen ohne Mark Resultate, welche volle Berücksichtigung verdienen.

B. Transplantationen von Knochen ohne Mark.

Für diese Versuchsreihe wurden Ratten und Kaninchen verwendet. Ich benutzte sowohl Fragmente als ganze Knochen, in welche das Mark vermittelst eines glühenden Platindrahtes zerstört worden war, immer lebenden Thieren entnommen. Die besten Resultate ergab die Transplantation von Fragmenten, weil bei denselben die Entfernung und Zerstörung des Markes leichter und sicherer sich bewerkstelligen lässt. In mikroskopischen Präparaten von 24 Tagen sind die kleineren Fragmente in der Resorption schon bedeutend fortgeschritten und die zelligen Elemente der Knochensubstanz völlig in Nekrose übergegangen. Keine Spur von Gefässen lässt sich mehr in der Dicke des Fragmentes nachweisen, während man in der ganzen Umgebung desselben ein gefässreiches Bindegewebe zu beobachten Gelegenheit hat. In dem Fragmente selbst aber bemerken wir zahlreiche Riesenzellen und Howship'sche Lacunen.

Andere Fragmente erscheinen erweicht und von knorpeligem Aussehen. In der Fig. 4 haben wir einen Längsschnitt eines solchen Fragmentes nach 24 Tagen. Dasselbe ist fast vollständig von einer Masse von Knorpelzellen, die dicht in einander gedrängt sind, ersetzt. Es ist nicht wahrscheinlich, dass diese Knorpelmasse von dem Periost herstammt, welches seine embryonalen Eigenschaften wieder aufgenommen hat, nachdem das ganze Knochenstück zuvor resorbiert worden war, weil in einer Ecke des Präparates noch einige Knochenzellen (Fig. 4 E), die sich also noch nicht in Knorpelzellen verwandelt hätten, aufgefunden werden konnten. Nach der einen Seite der Figur öffnet sich diese Knorpelsubstanz in Markräume, als Andeutung, dass der gebildete Knorpel neuerdings in Knochensubstanz übergeht. Mit Bezug aber auf das ganze Fragment befinden sich diese Markräume (Fig. 4 C) mehr central. Was die Knorpelzellen anbetrifft, so sind die peripherischen kleiner, oval oder spindel-

förmig (Fig. 4 A) und besitzen blos einen Kern, mehr nach innen zu vergrössern sie sich und zeigen zwei und mehr Kerne. (Hyperplastische Schicht von Strelzoff.) Gegen das Centrum zu erleiden diese Zellen noch weitere Veränderungen; sie werden dichter, erhalten homogeneres Protoplasma, das wie die Grundsubstanz auf Hämatoxylin reagirt. Die Kapseln verschwinden allmählich und die Kerne, sehr verkleinert, bleiben frei in den entstandenen Höhlen des Fragmentes, welche mit den oben erwähnten centralen Markräumen identisch sind. In den durch den mittleren Theil des Fragmentes geführten Längsschnitten erscheinen diese Markräume als eine grosse multiloculäre Höhle, deren einzelne Ausbuchtungen durch osteoide Balken getrennt sind. Es ergiebt sich also hier derselbe Befund wie bei der Knochenneubildung bei Periosttransplantationen zwischen die Muskeln.

In grösseren Fragmenten beobachtet man, dass die centralen Theile und die Markoberfläche nekrotisch geworden sind und sich in einem schon vorgeschriftenen Resorptionszustande befinden, der durch die Anwesenheit zahlreicher Riesenzellen und Howship'scher Lacunen documentirt ist, während die der periostalen Oberfläche genäherten Knochenpartien keine bemerkenswerthe Veränderungen erlitten haben. Die zelligen Elemente reagiren gut auf Farbstoffe und die Gefässe zeigen ihr normales Verhalten. Die periostale Oberfläche weist bedeutende Proliferation der osteogenetischen Schicht mit Bildung vieler osteoider Balken auf. In demselben Fragment vereinigen sich also Resorptions- und Regenerationsprozess. In einigen Präparaten sehen wir auch zerstreute Riesenzellen an der periostalen Oberfläche, namentlich in der Gegend derjenigen Punkte, wo stärkere Neubildung aufgetreten ist. Auf manchen neugebildeten Knochenbalken erblickt man neben den jungen Knochenzellen, die noch protoplasmareich sind und die Charaktere der Osteoblasten an sich tragen, Häufchen von Knorpelzellen mit sehr umgestaltetem Kern, der karyokinetische Figuren vortäuscht (Fig. 5 A). In diesen Präparaten kann man auch sehr gut die Umwandlung der jungen Knochenzellen in Knorpelzellen beobachten. Die Zwischensubstanz reagirt auf Farbstoffe, wie die osteoide Substanz. Wir haben also hier die sog. chondroide Modification

der osteoiden Substanz nach Kassowitz¹⁾). Die von ihm mitgetheilte Beobachtung, dass die Zellhöhlen unter einander communiciren, habe ich aber nicht bestätigen können. Die Anwesenheit dieser grossen Knorpelzellen beschränkt sich jedoch auf diejenigen Balken, welche mit Medullarräumen im Zusammenhang stehen, in welchen Riesenzellen sich vorfinden (Fig. 5C). Es beweist dieser Umstand, dass auch die jungen Knochenbalken von der Resorption beeinflusst werden können, indem ihre morphologische Beschaffenheit in der Art verändert wird, dass die osteoide Substanz in chondroide übergeht. — Wo die Knochensubstanz nekrotisch geworden ist, sind beinahe alle Gefässe verschwunden. Einzelne derselben haben ein feinkörniges Aussehen und färben sich diffus mit Saffranin, von anderen ist keine Spur mehr vorhanden als wenige fettige Granulationen, Zerfallsprodukte.

Sehr deutlich tritt die Bildung von Bindegewebe und von Gefässen auf der Markoberfläche der transplantirten Fragmente zu Tage, wo zahlreiche Riesenzellen zerstreut sich vorfinden. Dieses neugebildete Bindegewebe erstreckt sich gegen die durch Resorption entstandenen Höhlen, was diesen Fragmenten eine sehr unregelmässige Gestalt verleiht. In diesen Ausbuchtungen sind die Riesenzellen eingebettet, doch nicht überall, und zwar bald in Reihen längs der Resorptionsoberfläche, bald haufenweise, bald ganz vereinzelt. Doch finden sich Riesenzellen nicht blos in Excavationen auf der Resorptionsoberfläche, sondern auch in der Grundsubstanz des Knochens. Ihre Form ist unregelmässig, meist ihrer Umgebung angepasst, das Protoplasma feinkörnig und die Zahl der Kerne grösser in denjenigen Zellen, welche in der Tiefe des Knochens gelegen sind, d. h. in den jüngeren. Diese Kerne reagiren sehr stark auf Saffranin. Dass die Zellen in der Tiefe die jüngeren sind, erhellt daraus, dass der Resorptionsprozess von der Peripherie nach dem Centrum fortschreitet und dass die zuerst gebildeten Riesenzellen da bleiben, wo zuerst auch die Knochensubstanz zerstört wurde. Je weiter die Zerstörung um sich greift, um so mehr Riesenzellen treten auf. Viele derselben enthalten in ihrem Protoplasma Fettkörnchen, die aus dem Zerfall der Blutgefässe und der

¹⁾ Die normale Ossification etc. Wien 1881.

Knochenzellen hervorgegangen sind. Die Vertheilung der Riesen-zellen in den Resorptionsterritorien hält sich an die Anordnung der Gefässe. Im Allgemeinen zeigen sich da, wo noch Gefässe sich vorfinden und wo die Lebensfähigkeit der Knochenzellen noch nicht ganz aufgehört hat, die Riesen-zellen. Diese enge Be-ziehung zwischen Gefässen und Riesen-zellen ist auch für die jüngsten gewahrt, die immer in unmittelbarster Nähe von Ge-fässen erscheinen. Mit einigen Präparaten kann auch dargethan werden, dass Blutgefässe in Hohlräume eintreten, welche Riesen-zellen einschliessen. In der Tiefe des Knochens füllen die Riesen-zellen die sie einschliessenden, durch Schwund der Grund-substanz entstandenen Höhlen vollständig aus. Ihr Baumaterial fliest ihnen von der chemisch veränderten Grundsubstanz zu, sowie auch von den Knochenzellen, welche modifizirt in ihrer Gestalt ganz wie Kerne in die neue Zelle aufgenommen werden. Diese Pseudokerne verschwinden später, indem sie in dem Proto-plasma aufgehen, woraus es sich erklärt, dass man in älteren Riesen-zellen nicht mehr so viele Kerne findet wie in den jün-geren. Die Riesen-zellen enthalten des fernern in ihrem Proto-plasma mannichfache Zerfallsproducte. In diesem Sinne sind sie als Resorptionsorgane aufzufassen. Die chemischen Veränderun-gen der Grundsubstanz sind die Bedingungen der Resorption und die Erscheinung der Riesen-zellen ist blos ein die Resorption be-gleitendes Phänomen.

Die Transplantationsversuche der einzelnen Knochenbestand-theile bieten Gelegenheit, die Resorption direct nachzuweisen und in ihren Erscheinungen zu verfolgen, die Resorption, die bei dem normalen Wachsthum der Knochen eine so grosse Rolle spielt, indem die Formveränderungen der äusseren Knochenober-fläche, wie die Abrundungen der Epiphysen, die Condylen- und Cristenbildung z. B. ihr Resultat ist.

Seit John Hunter (1772) bis Kölliker (1873) hat sich eine grosse Reihe von Forschern bemüht, den Sitz und den Vor-gang der Resorption kennen zu lernen. Und in der That ist es sehr interessant, zu erfahren, auf welche Weise ein Knochen, der blos durch Apposition an der Peripherie wächst, zu seiner specifischen Configuration gelangt. Zu dieser Gestaltveränderung ist eine Vereinigung der Apposition mit der Resorption noth-

wendig. Das Versuchsfeld war fast immer auf die Krappfütterung und auf das Einschlagen von Metallstiften in verschiedene Punkte der Knochenoberfläche beschränkt. Wenn diese Versuche genügten, um zu beweisen, dass für das Wachsthum der Knochen der Appositionsprozess, nicht aber das interstitielle Wachsthum in Betracht kommen, so sind sie keineswegs hinreichend, um direct die Resorption zu verfolgen. Floureens¹⁾ allein machte den Versuch, dieses Feld weiter zu bearbeiten und zeigte, dass Mark und Periost dieselbe functionelle Bedeutung besitzen. Bei der Zerstörung des einen übernimmt das andere dessen regenerative Eigenschaften. Periost und Mark sind nach ihm dieselben Organe. Er hatte bereits beobachtet, dass bei Krappfütterung an der Peripherie des Knochens sich neue Schichten ablagern, dass der Knochen also in seine Dicke wächst, während gleichzeitig auf der Markoberfläche eine Resorption stattthat, eine Thatsache, die später durch Brullé und Hugueny²⁾ bestätigt wurde, trotz der vorhergegangenen Versuche von Serres und Doyère³⁾. Letztere hatten nehmlich gezeigt, dass bei der Kraftfütterung die äussersten Knochenschichten in directem Zusammenhang mit dem Periost sich nicht färben, von denen sich doch das Gegentheil erwarten liess. Brullé und Hugueny fanden aber auch noch, dass auch eine Resorption an der periostalen Oberfläche auftreten kann. So erklären sich die Formveränderungen des Knochens während des Wachthums (modellirende Resorption). Man hätte somit eine Vereinigung der sich widerstrebenden Ansichten von Serres, Doyère und Floureens. Diesen experimentellen Studien über die Knochenentwicklung folgten die directen mikroskopischen Beobachtungen von Hassall⁴⁾, Tomes und De Morgan⁵⁾. Hassall wies darauf hin, dass in der endochondralen Entwicklung die Dilata-

¹⁾ Annales des sciences naturelles 1840. 2. Serie. T. XIII. 1841. 2. Serie. T. XV. 1845. 3. Serie. T. IV. — Comptes rendus 1840. T. X. 1842.

T. XV. — Recherches sur le developpement des os et des dents. Paris 1842. — Traité experimental de la formation des os. Paris 1847.

²⁾ Annales des sciences naturelles. 1845. 3. Serie. T. IV.

³⁾ Comptes rendus. 1842. T. XIV. — Annales des sciences naturelles. 1842. T. XVII.

⁴⁾ The microscope anatomy of the human body. London 1849.

⁵⁾ Philosophical transactions of the royal society. London 1853. Vol. 143.

tion der Markräume, d. h. das Uebergehen der primitiven Markräume in secundäre durch Resorption der Balken der Grundsubstanz sich vollzieht. Ein anderer Beweis des Resorptionsprozesses wurde von Tomes und De Morgan geliefert, welche in den sich entwickelnden Knochen, abgesehen von den Havers'schen Kanälchen, noch andere Markräume fanden, welche durch das Zurücktreten der Wandungen der Havers'schen Kanälchen entstehen (Havers'sche Räume). Neuerdings ist Kölliker¹⁾ durch Untersuchungen der Wurzeln von Milchzähnen zu dem Schlusse gelangt, dass die modellirende Resorption ihre solide diagnostische Basis in den Howship'schen Lacunen und in den Riesenzellen findet, die er als Resorptionsorgane betrachtet (Osteoklasten). Kölliker fasst seine Ansichten über die Knochenentwicklung in folgende Sätze zusammen: Die Knochenentwicklung und die typische Form derselben ist das Product einer Knochenneubildung, welche unter bestimmten Gesetzen durch die Osteoblasten sich vollzieht und einer Dissolution desselben Gewebes durch die Osteoklasten. Nach meiner Ansicht repräsentiren die Untersuchungen über die Transplantation verschiedenartiger Knochenbestandtheile ein wichtiges Moment zu Gunsten der modellirenden Resorption. — Der Resorptionsprozess geht sowohl an der Mark- als an der Periostoberfläche vor sich. Die periostale Resorptionsoberfläche aber tritt in den erwachsenen Knochen nicht mehr hervor, ausgenommen bei bestimmten Umständen, wie z. B. bei Callusbildung, Osteitis mit Nekrosen, etc. In der That sind auf der periostalen Oberfläche schon normal entwickelter Knochen keine Riesenzellen mehr nachweisbar. Der Resorptionsprozess tritt an solchen Stellen in den Vordergrund, welche im Zusammenhang mit der Gefässvertheilung stehen und besteht seinem Wesen nach in einer Rarefaction der Knochengrundsubstanz, bedingt durch chemische Veränderungen, deren Product der Verlust der Kalksalze ist. Es entstehen auf die Weise Räume, in welche sich die Riesenzellen einbetten. Wenn auch das Auftreten dieser Zellen in directem Zusammenhang mit dem Resorptionsprozesse steht, so kann doch nicht absolut behauptet werden, dass diese Zellen die Ursachen desselben sind.

¹⁾ Verbreitung und Bedeutung der vielkernigen Zellen der Knochen und Zähne. Verh. der Würzburger phys.-med. Gesellsch. N. F. Bd. II. 1872.

Die Riesenzellen für sich wären nicht im Stande, den Schwund der Knochensubstanz herbeizuführen, wenn nicht chemische Veränderungen, die durch verschiedene Färbungsfähigkeit dokumentirt sind, die Grundsubstanz für die Rarefaction vorbereitet hätten.

Wie die Bildung der Riesenzellen in den Territorien des Knochens während der Resorption vor sich geht, lässt sich in einigen meiner Präparate verfolgen. An einzelnen Stellen beginnt die Grundsubstanz ein feinkörniges Aussehen anzunehmen und bleibt gegen saure Farbstoffe indifferent, welche sonst intensiv färben (Fig. 6 A). Die Knochenzellen, welche in dieser fein granulirten Zone eingebettet sind, vergrössern sich stark durch Apposition neuer protoplasmatischer Substanz und nähern sich sehr, kleine Häufchen bildend mitten in dieser feinkörnigen Grundsubstanz (Fig. 6 B). Später verschwindet der grösste Theil dieser Grundsubstanz, indem blos ein kleiner Rest um die schon modifirten Häufchen der alten Knochenzellen herum bestehen bleibt, welcher das Protoplasma der Riesenzellen repräsentirt. So entsteht eine Howship'sche Lacune mit einer oder mehreren Riesenzellen (Fig. 6 C).

III. Callusbildung.

Dieser complicirte Vorgang ist so interessant in seiner Erscheinung, dass es nicht möglich ist, von der Knochenregeneration zu sprechen, ohne auch einen Moment bei demselben stehen zu bleiben, und dies um so eher als man Gelegenheit hat, die Resultate der Transplantationsversuche mit den directen histologischen Untersuchungen über den Callus zu vergleichen.

Indem ich über die historische Seite hinweggehe, bemerke ich blos, dass die modernen Ansichten über diesen Gegenstand sich in zwei Gruppen theilen,

a) solche, welche dem Periost ausschliesslich jede regenerative Eigenschaft zuzuschreiben sich bemühen,

b) solche, welche auch den anderen Knochenbestandtheilen, Mark und Knochensubstanz, wie auch den umliegenden Weichtheilen eine Bedeutung zugetheilt wissen wollen.

Auch in Betreff der Natur des Neubildungsprozesses gehen die Ansichten auseinander: Die einen sprechen von einer ent-

zündlichen Neoplasie und glauben daher, dass die Leucocyten sowohl in der osteogenetischen Schicht, als in dem extra-periostalen Gewebe eine wichtige Rolle spielen, die anderen blos von einer einfachen Hyperplasie der fixen Zellen, ohne etwelche Beteiligung der Leucocyten. Diese letztere Meinung wurde neuerdings durch Untersuchungen von Krafft unterstützt, auf Grund der kariokinetischen Kerntheilung.

Unter dem Namen der Callusbildung fasst man verschiedene Prozesse zusammen, die Structurveränderungen in den Knochenbestandtheilen, bei denen eine Continuitätstrennung stattgefunden hat, und auch in der Nachbarschaft erzeugen. Diese Veränderungen sind nicht blos in der ersten Zeit vorhanden (Neubildung), sondern auch später noch, wo eine zu starke Regeneration eine Knochendeformation an der Bruchstelle zur Folge gehabt hat (Rückbildung). Durch diese Erscheinungen, welche die Evolution eines einzigen Prozesses charakterisiren, wurde der Glaube erweckt, dass es sich um verschiedene Vorgänge handle.

Die Röhrenknochen sind zum Studium der Callusbildung am geeignetsten, und einfache Fracturen ohne bedeutende Schädigung des Periosts, wie auch Infractionen lassen sich zur genauen histologischen Untersuchung am besten verwenden, indem man durch sie die sämmtlichen verschiedenen Phasen der Neubildung leicht verfolgen kann, welche hier nicht von entzündlichen Erscheinungen gestört werden. So lässt sich ohne Schwierigkeit das Verhalten der Knochenbestandtheile beider Fragmente beobachten. Um die Reizung auf einen möglichst geringen Grad herabzusetzen, habe ich in die Wandung der Röhrenknochen vermittelst feiner Bohrer kleine Löcher gebohrt, in die ich verschiedene Substanzen brachte, denen die physikalische Eigenschaft, die neuen an der Stelle der Läsion aufgetretenen Zellen in sich aufzunehmen zukommt. Da diese Substanzen, wie Agar-Agar, Hölundermark, Schwammstücke, meistens fester Natur waren, so mussten die zelligen Elemente an der Stelle fixirt werden, wo sie aufraten, woraus natürlich ein Schluss auf den Ort ihres Entstehens gestattet ist. Um die Bedeutung, welche dem Periost und dem Mark als solches bei der Callusbildung zukommt, kennen zu lernen, wurde dieses Experiment noch ver-

vollständigt, indem ich die in die durch die ganze Knochenwand gebohrten Löcher gebrachte Substanz durch ein feines dazwischen geschobenes Platinblech gleichsam in 2 Pfröpfe theilte. Der innere Pfropf hatte die Bestimmung, die Markzellen, der äussere die Periostzellen aufzufangen. Damit nicht eine mechanische Zerstörung des Markes herbeigeführt wird, darf der innere Pfropf nicht über die innere Knochenoberfläche hinaus vorgeschoben werden. —

Die ersten Erscheinungen nach einer Fractur sind ausschliesslich mechanischer Natur, theilweise durch die plötzliche Continuitätstrennung theilweise durch die Dislocation der Fragmente hervorgerufen. Sie bestehen in einer Zerreissung und mehr oder weniger ausgedehnten Ablösung des Periosts, in einer Ruptur der Periost- und Knochengefässen, begleitet von hämorrhagischen Infiltrationen, in einem Heraustreten des Markes und mitunter in einer Zerreissung von Muskelfasern durch eingekielte Fragmente, bedingt durch Wirkung der Muskelcontraction auf die fracturirten Theile. Weiter folgt eine réactive Entzündung, die im Stande ist, in der ersten Zeit den Neubildungsprozess zu verdecken. Dann kommen auch bei den an der Fracturstelle ange-sammelten Producten als Blut, Lymphe und Marksubstanz, Veränderungen vor.

In Längsschnitten von 24 stündigen Fracturen sind die Fragmente sowohl im Dicken als im Längsdurchmesser dislocirt und in die Muskelfasern eingekieilt, die das Markrohr verschliessen. Zwischen den Knochenfragmenten und den Muskelfasern, in welche erstere eingedrungen, findet sich eine Masse von rothen Blutkörperchen von sehr veränderter Gestalt und bereits grössten-theils in Detritus übergegangen vor. Hie und da sieht man fibrinöse Massen, die Netze bilden, in deren Maschen Leucocyten eingeschlossen sind. Viele Leucocyten zeigen in ihrem Innern Detrituskörnchen, wahrscheinlich das Product rother Blutkörperchen. Da und dort sind auch aus dem Mark herstammende Fettzellen. In dem Stadium hat das Periost noch keine wesentliche Veränderung erfahren, abgesehen von einer Leucocytene-invasion in seine beiden Schichten, die in dem extraperiostalen Bindegewebe grösser ist.

In Fracturen von 48 Stunden sind die entzündlichen Phänomene

mehr oder weniger stark, je nach den begleitenden Complicationen (communitive Fractur, ausgedehnte Periostablösungen) und je nach der Reizung durch die fortdauernde Verschiebung der Fragmente. An vielen Stellen erblickt man kleine, leucocytenreiche Exsudate, sowohl zwischen den Periotschichten als in dem extraperiostalen Gewebe. Neben dieser Infiltration beginnt zu dieser Zeit in der osteogenetischen Schicht des Periots eine Proliferation der fixen Zellen, welche an einzelnen Stellen, besonders in der Nähe der Bruchstelle intensiver ist. Diese gegen die Extremitäten der Fragmente hin allmählich zunehmende Proliferation bildet an der Fracturstelle eine Schicht, welche das Medullarrohr verschliesst. Die abgelösten Periosttheile weisen noch keine zellige Wucherung auf. Karyokinetische Figuren zu constatiren, gelang mir in Präparaten von dem Alter noch nicht, wohl aber konnte ich sehr deformirte Kerne beobachten, die einen halbmondförmig, die anderen dreieckig mit sehr spitzen Winkeln und wieder andere sehr in die Länge gezogen.

Ein Phänomen, welches später immer deutlicher zu Tage tritt, ist bereits in dieser Periode an den Extremitäten der Knochenfragmente erschienen. Fast alle Knochenzellen in der Nähe der Bruchstelle werden nekrotisch. Die Kerne reagiren nicht mehr auf die Färbesubstanzen. Die Knochensubstanz nimmt ein der Länge nach feingestreiftes Aussehen an und zeigt kein Gefäss mehr. Diese Thatsache, auf welche noch niemand aufmerksam gemacht hat, und die ich in allen meinen Präparaten constatiren kann, tritt am klarsten an einfachen Infractionen zu Tage, in denen von starken Contusionen mit Gewebszerträummerung keine Rede sein kann. In Fig. 8 ist dieses deutlich repräsentirt. Es handelt daselbst sich um eine einfache Infraction der Tibia eines Kaninchens nach 5 Tagen. Die Fractur erstreckt sich blos auf die innersten Knochenlamellen und hat eine quere Richtung. Auf der Markseite ist ein dichter Haufen von Knorpelzellen (Fig. 8e) sichtbar, welcher die inneren Ränder des Risses gleichsam verkittet. Um diesen Haufen herum erblickt man zahlreiche Osteoblasten, sowie eine Bildung junger osteoider Balken, welche den sog. inneren Callus liefern (Fig. 8hh). Auf der äusseren Seite des Knochenrisses begegnet

man eine Trennung der Knochenlamellen in longitudinaler Richtung und zwischen denselben zahlreichen Osteoblasten (Fig. 8 k).

Die Knochenzellennekrose ist auch in den Präparaten von 48 Stunden nachweisbar, und dies am besten, wenn eine partielle Quetschung der Fragmentenden stattgefunden hat. Auch in dem Markrohr sind zu der Zeit Veränderungen zu beobachten, besonders in denjenigen Theilen, die mit der inneren Fläche des Knochenfragmentes im Zusammenhang geblieben sind. Die Markzellen sind sehr verlängert und aufeinander geschichtet, fast fortlauende Stränge bildend, welche das Medullarrohr zu verschliessen streben, indem sie sich dabei mit den proliferirten Periostzellen in Verbindung setzen, die über der äusseren Seite des Fragmentendes sich angehäuft haben.

In Fracturpräparaten von 3 Tagen sind die Entzündungserscheinungen wenig umfangreich. Viele Leucocyten, von manchfacher Gestalt, die zwei und mehr Kerne einschliessen, welche das eine Mal kreuzförmig, das andere Mal in Kranzform zusammentreten, finden sich vor.

In Präparaten von 3—4 Tagen bemerkt man im Allgemeinen, dass die Entzündungsscheinungen, wenn keine Complicationen hinzukamen, abnehmen und dass neben diesen bedeutende Veränderungen auftreten, welche den schnellen Fortgang der Neubildung kennzeichnen. Hierzu gehört die periostale Callusbildung und das Erscheinen von osteoiden Balken und von Kerntheilungsfiguren in der osteogenetischen Schicht. In der Tiefe der Zellmasse der periostalen Keimschicht beginnt man eine Differenzirung der Grundsubstanz wahrzunehmen, welche sich durch eine stärkere Affinität zu Farbstoffen auszeichnet. Da wo die Grundsubstanz chemische Veränderungen erlitten hat, erscheinen die Osteoblasten oder Chondroblasten in ihrer Zahl verminderd, wie auch in ihrer Gestalt modifizirt. Fast das ganze Protoplasma ist verschwunden und der Kern sehr unregelmässig geworden. Das Protoplasma der Bildungszellen ist somit in der Grundsubstanz aufgegangen, welche gegen Farbstoffe fast wie Knorpel sich verhält. Ich habe diese Erscheinung bereits bei den Periosttransplantationen demonstriert und meine Resultate stimmen mit denen von Strelzoff¹⁾ überein, d. h. die Knochengrundsub-

¹⁾ a. a. O.

stanz wird auf Kosten des Protoplasmas der Osteoblasten gebildet. Während ein Theil der Osteoblasten dieses Verhalten zeigt, geht ein anderer Theil in diejenigen Zellen über, welche man im Innern der osteoiden Substanz findet. Die Differenzirung der Grundsubstanz in Balken in der Tiefe der periostalen Keimschicht ist in Längsschnitten von 4—5 Tagen sehr deutlich ausgesprochen. In diesen Präparaten sieht man Netze osteoider Balken, in deren Maschen zahlreiche Osteoblasten und viele deformirte Kerne, die denjenigen Osteoblasten angehörten, deren Protoplasma in der Grundsubstanz aufgegangen ist, sich beobachten lassen. In Präparaten von 6—7 Tagen sind diese Netze junger Balken vollkommener und die zelligen Elemente in der Dicke der einzelnen Balken erhalten schon das Aussehen von Knochenzellen. Während in der Nähe der Fractur solche Veränderungen der periostalen Keimschicht aufgetreten sind, erblickt man genau an der Stelle der Fractur ein halbmondförmiges Häufchen grosser Knorpelzellen, dass die beiden Enden der Fractur umfasst (Fig. 9). Andere kleinere Knorpelhäufchen kann man bisweilen in der Nähe der Bruchstelle auffinden (Fig. 9d). Solche Häufchen liegen stets in der osteogenetischen Schicht eingebettet. Die grössten derselben habe ich bei Humerusfracturen an Tauben beobachtet. In den Maschen, die durch Anastomosen der osteoiden Balken entstanden sind, befinden sich viele Blutgefäße, nachweisbar durch Injectionen von Berlinerblau.

Ausser diesen Modificationen sehen wir in der periostalen Keimschicht Haufen von Zellen, in welch letzteren manchfache Veränderungen der Kerngestalt, die an karyokinetischen Vorgängen erinnern, unsere Aufmerksamkeit auf sich ziehen. In Fracturpräparaten von 5 Tagen habe ich viele solcher Kernfiguren wahrnehmen können, sowohl von Stern-, wie Knäuelform. Dann kamen auch halbmondförmige, dreieckige und andere Bildungen vor. Diese Kerne haben manchmal eine etwas bräunliche Farbe, ganz abgesehen von der künstlichen Färbung, was sich nach Flemming durch einen reichlichen Chromatingehalt der Kernsubstanz erklärt. Sämmtliche Kerntheilungsfiguren, die Krafft in seinem Schema dargestellt hat, habe ich nicht nachzuweisen vermocht, so nicht die Umwandlung der Sternform in Fassform und Diaster. Wahrscheinlich gehen diese Metamorphosen sehr

rasch vor sich und sind bald von der Trennung der Tochterzellen gefolgt. Ich schliesse das aus der Beobachtung vieler grossen Zellen mit bipolaren Kernen. Ohne Zweifel handelt es sich um endogene Proliferation während der Abtrennung der Tochterzellen. Einige andere Zellen der periostalen Keimschicht zeigen in ihrem Protoplasma eine Vacuole, meist sehr entfernt von dem Kerne.

Die Häufchen von Knorpelzellen in der periostalen Keimschicht treffen wir meistens in der Nähe derjenigen Punkte, wo die Reizung grösser war, d. h. in unmittelbarer Nachbarschaft der Fractur. Hier sind die Gefässe spärlich und die osteoiden Balken fehlen beinahe, indem die Zellen der osteogenetischen Schicht in Chondroblasten umgewandelt sind. Hieraus folgt, dass die Stärke der Reizung die Function der Elemente der osteogenetischen Schicht modifizirt. Denselben Gesetzen begegnen wir wieder bei den Periosttransplantationen. Das Auftreten dieser Knorpelinseln in der osteogenetischen Schicht ist sehr deutlich bei den Vögeln ausgesprochen, obwohl die periostale Neubildung dieser Thiere im Vergleich zu der ausgedehnten endostalen sehr beschränkt ist. Von den Leucocyten, die so zahlreich die extra- und intraperiostalen Territorien infiltriren, verschwindet der grösste Theil nach vorausgegangenen bedeutenden morphologischen Veränderungen in der Gruppierung ihrer Kerne. Die einen also verschwinden, die anderen organisiren sich zu Spindelzellen in dem interfasciculären Bindegewebe der Muskeln. Die directe Umwandlung der Leucocyten in Osteoblasten oder Chondroblasten ist nicht nachweisbar.

Um die Veränderungen der Leucocyten bei der Callusbildung besser verfolgen zu können, habe ich an Kaninchen von Maas u. A. schon angestellte Versuche wiederholt, indem ich feingepulverten Zinnober direct in die Jugularis injicirte und zwar an Thieren, bei denen vor 1 oder 2 Stunden eine Fractur erzeugt war. In frisch untersuchten Präparaten von 2 Tagen, die mit Flemming'scher Flüssigkeit behandelt worden waren, konnte ich nicht im Innern der Zellen der osteogenetischen Schicht, welche bereits im Proliferationszustande sich befanden, eine Spur von Zinnoberkörnchen constatiren, wohl aber hin und wieder in Leucocyten. Wenn man in Betracht zieht, dass Pigmentkörper der Iris, welche neben Knochenneubildungen in der Iris in Folge von Periosttransplantation in die vordere Augen-

kammer angetroffen wurden, niemals in Osteoblasten, dagegen aber in Leucocyten gefunden werden konnten, so muss man annehmen, dass sich Leucocyten niemals in Osteoblasten oder Chondroblasten verwandeln können. Ich schliesse mich Krafft an und glaube, dass ein Theil der Leucocyten verloren geht, ein Theil aber sich im umstehenden Bindegewebe in Fibroblasten umgestaltet. Zu anderen Beweisen, die für die Wichtigkeit der fixen Zellen des Periosts in der Callusbildung sprechen, bin ich durch eine Reihe von Versuchen über einfache Substanzverluste der Knochenwand gelangt, bei denen letztere durch Substanzen, welche die physikalischen Eigenschaften, Zellen in sich aufzunehmen, besessen (Agar-Agar $1\frac{1}{2}$ pCt.), wieder ersetzt wurden. Am dritten Tage konnten auf der ganzen Oberfläche des Agar-Agar eine Menge von Zellen der osteogenetischen Schicht beobachtet werden, von denen einige selbst in den Agar-Agar einzudringen angefangen hatten. Nur wenige Leucocyten dagegen blieben an der Peripherie.

Interessante Veränderungen erscheinen in den ersten Tagen einer Fractur auch in dem Markrohr und in der eigentlichen Knochensubstanz (innerer Callus). An der Bruchstelle ist die Marksubstanz überall in das umliegende Gewebe herausgetreten. Der peripherische Theil derselben kann jedoch mit der inneren Knochenfläche im Zusammenhang bleiben. Nach 48 Stunden haben die Markzellen ein spindelförmiges Aussehen angenommen, sich zu Schichten geordnet und streben das Markrohr zu verschliessen. In Präparaten von 4—5 Tagen sind sie zahlreicher vorhanden; einige zeichnen sich durch ihre Grösse aus, andere durch die Vielgestaltigkeit ihrer Formen, bald dreieckig, bald polygonal und mit Ausläufern versehen, die in der Grundsubstanz verschwinden, welcher ein fibrilläres Aussehen eigen ist. Die Zahl der Fettzellen ist bedeutend reducirt. Die Marksubstanz bietet somit die Erscheinungen einer leichten Sclerose. In der Nachbarschaft der Bruchstelle sind die Markzellen protoplasmareicher, von dem Aussehen der Osteoblasten und nehmen gelegentlich Theil an der Bildung der osteoiden Balken. In den Fracturpräparaten, in denen die Marksubstanz nicht völlig ruinirt wurde, vollzieht sich die Bildung der Balken schneller, da den Markzellen die Eigenschaft zukommt, osteoblastenartige

Zellen zu liefern, welche an der inneren Callusbildung ebenfalls participiren.

Während diese Veränderungen der Marksubstanz zukommen, begegnen wir auf den innersten, die Markhöhle umschliessenden Lamellen folgende Erscheinungen. Diese Markoberfläche der Knochen ist durch eine Menge kleiner Ausbuchtungen, die massenhaft Osteoblasten enthalten, sehr unregelmässig gestaltet. Bald füllen die Osteoblasten diese Räume ganz aus, bald kommen sie nur einzeln vor. Gefässe, die aus dem Knochen herstammen, strahlen in diese Ausbuchtungen aus. Die Herkunft dieser grossen Osteoblasten erklärt sich leicht bei der Zerstörung der Marksubstanz. In einigen Präparaten von 5—6 Tagen sieht man viele Knochenzellen der innersten Lamellen von einem grossen hellen Saume umgeben, welcher wiederum eine Rarefaction der Grundsubstanz repräsentirt (Fig. 9 gg). Die eigentlichen Zellen vergrössern sich immer mehr durch Auflagerung neuer protoplasmatischer Substanz, während andererseits die Grundsubstanz immer weiter zurücktritt, bis endlich die zelligen Elemente frei auf die Markfläche zu liegen kommen. Es lässt sich dies am besten in der Nähe der Bruchstelle beobachten (Fig. 9 g) und zwar rings um jene Zone herum, wo die Knochenzellen nekrotisch geworden sind. Die Erscheinung dieser Masse von Osteoblasten an dieser Stelle deutet auch darauf hin, wie die Nekrose wieder reparirt wird. Die nekrotische Substanz verschwindet nehmlich und an ihren Platz tritt die von den Osteoblasten neugebildete Masse. Aus den hier freigewordenen Osteoblasten nimmt ein System von Balken seinen Ursprung, welches durch allseitige Anastomosen ein Netz darstellt, in dessen Maschen zahlreiche Gefässe und Osteoblasten nachweisbar sind. Letztere bilden einen epithelartigen Belag auf den einzelnen Balken. Inseln hyalinen Knorpels stehen da und dort mit der inneren Knochenoberfläche, vorzugsweise an der Bruchstelle in Verbindung. Um sie herum wuchern die Knochenbalken, welche den essentiellen Theil des inneren Callus repräsentiren. Die neuen Gefässe des gebildeten inneren Callus sind durch pinsel-förmige Ausstrahlung, ausgehend von den Knochengefässen im Grunde obiger Ausbuchtungen, und durch eine einfache endotheiale Wandung charakterisiert. —

Es kann das Studium der Callusbildung durch die Untersuchung derjenigen Erscheinungen vervollständigt werden, die bei der Complication der Fractur durch Zerstörung irgend eines Knochenbestandtheiles auftreten, wie das von Seiten des Periosts oder Marks sehr leicht der Fall sein kann.

In Präparaten, bei denen die Fractur von einer ausgedehnten Periostablösung begleitet war, oder vorher künstlich diese erzeugt wurde, waren am vierten Tage sehr vorgeschrittene lacunäre Resorptionsprozesse in der Nähe der Bruchstelle zu beobachten, während die Extremitäten der Fragmente in Nekrose übergegangen waren. Der schnelle Verlauf der Resorption in diesen Präparaten ist nicht von der vorausgegangenen Nekrose begleitet. Auf Querschnitten eines Kaninchenfemurs, bei dem unmittelbar nach Ablösung des Periosts eine Fractur erzeugt worden war, sieht man in der Nähe der Bruchstelle die Knochenwand stellenweise sehr verdünnt, stellenweise zahlreiche Howship'sche Lacunen bildend, welche Riesenzellen, wie auch markförmige Granulationen und zahlreiche Gefäße enthalten. Die periostale Oberfläche entbehrt vollständiger Lacunen und Riesenzellen. Bloß kleine Einbuchtungen, durch Rarefaction der Grundsubstanz entstanden und in welche das in der Umgebung neu gebildete Bindegewebe vordringt, lassen sich wahrnehmen. Diese Einbuchtungen kommen dadurch zu Stande, dass die in Form von Säumen um die sehr in ihrer Gestalt modifizirten Knochenzellen herum gebildeten kleinen Hohlräume allmählich gegen die Peripherie vorrücken. Die freigewordenen Reste der Knochenzellen verschwinden und lassen das von aussen hineinwuchernde Bindegewebe an ihre Stelle treten. An der Markfläche zeigt sich die Resorption sehr lebhaft. Zahlreiche, grosse Gefäße, von vielen Markzellen umgeben, breiten sich daselbst aus und dringen in die Ausbuchtungen und die Howship'schen Lacunen ein. Ein Querschnitt dieses Femur in der Nähe der Fractur ist durch die Fig. 7 repräsentirt.

In Präparaten, in denen vor der Fractur das Mark zerstört worden war, eine Operation, die am leichtesten im Humerus von Tauben gelingt, sieht man die Callusbildung durch einen schnellverlaufenden Resorptionsprozess zerstört werden, welcher nicht nur an der Markfläche da, wo das Mark gänzlich abgelöst war,

sondern auch an vielen Punkten der Periostoberfläche zur Seite der Neubildungserscheinungen beobachtet werden kann. Am fünften Tage der Operation ist der grösste Theil des Markrohrs von einer feinkörnigen Masse erfüllt, welche mit basischen Farbstoffen, wie Saffranin, sich färbt. Wo das Mark völlig entfernt war, finden sich zu der Zeit zahlreiche, unregelmässige Höhlen, die Riesenzellen und Gefäße von markförmigen Granulationen umgeben, aufgenommen haben. Stellenweise sieht man nicht blos oberflächliche offene, sondern auch in der Tiefe der Knochensubstanz befindliche, geschlossene Lacunen und Hohlräume, welche von einem capillären Gefäßssystem durchzogen und von Riesenzellen ausgekleidet sind. An manchen Stellen, wo die Marksubstanz nicht völlig entfernt war, zeigt sich dieselbe etwas sclerosirt. Die Fettzellen sind beinahe verschwunden und viele Markzellen haben das Aussehen von Osteoblasten angenommen, während andere spindelförmig geworden sind und Auläufer erkennen lassen. Ebendaselbst kann man zu der Zeit die Entwicklung von Knochenbalken durch Osteoblasten wahrnehmen, welche zum Theil aus Knochenzellen, zum geringeren Theil aus Markzellen stammen. Diese Knochenzellen gehören den innersten Knochenschichten an. Es kann auch vorkommen, dass an Stellen der Markfläche, wo das ganze Mark zerstört war, keine Resorption auftritt. Daselbst sind alle zelligen Elemente nekrosirt, wahrscheinlich wegen dem Mangel der Entwicklung von Knochengefäßen.

Die Bildung des inneren Callus in vom Mark befreiten Knochen ist durch drei Phänomene charakterisiert:

- a) Auftreten von Zonen lacunärer Resorption mit reichlicher Gefässentwicklung.
- b) Bildung von Knochenbalken mit Sclerosirung des Marks.
- c) Erscheinen nekrotischer Zonen.

Auf der periostalen Oberfläche treten gegenüber den Resorptionserscheinungen die Neubildungsphänomene in den Vordergrund. In Längsschnitten von fünftägigen Präparaten beobachtet man, dass die Bildung osteoider Balken aus der Keimschicht des Periots schon ziemlich vorgeschritten, und dass ein System neuer Gefäße in der Nähe der neugebildeten Zone, deren Entwicklung in der Umgebung der Bruchstelle sich stärker erweist,

entstanden ist. Nicht selten kann man die Wahrnehmung machen, dass, während an der periostalen Oberfläche eine lebhafte Entwicklung von Knochenbalken stattfindet, auf der medullären Fläche eine grosse Resorptionszone, durch Howship'sche Lacunen und Riesenzellen charakterisiert, erschienen ist. Auf der periostalen Oberfläche aber hat man neben der Neubildungszone eine Resorptionszone. Es beweist dieses, dass die Resorption gleichzeitig an verschiedenen Stellen desselben Knochens auftreten kann und dass dieselbe mechanischen Gesetzen folgt, indem sie von der Stärke des Reizes abhängig ist (modellirende Resorption). Da wo die stärkste Reizung stattfand, deren Folge in einer reichlicheren Blutzufuhr besteht, so dass die zelligen Elemente der osteogenetischen Schicht modifiziert wurden, tritt an die Stelle der Proliferation die Resorption. Und hieraus folgt, dass die Resorption unter bestimmten Reizzuständen nicht nur an verschiedenen Stellen desselben Knochens auftreten, sondern auch mit dem Neubildungsprozesse durch Apposition coexistiren kann. So muss man die modellirende Resorption in der normalen Knochenentwicklung auffassen.

Schlussbemerkung.

Es bleibt uns noch übrig, die gewonnenen Resultate in Kürze zusammenzufassen:

I. Das zwischen die Muskeln transplantirte Periost äussert sehr bald lebhafte regenerative Eigenschaften, bestehend in einer Proliferation der fixen Zellen der osteogenetischen Schicht und in dem Auftreten knorpeliger Inseln in letzterer. Das Resultat dieser Erscheinungen sind die osteoide Substanz und die primitiven Markräume.

II. Der directe Uebergang der Zellen der osteogenetischen Schicht in Osteoblasten, ohne vorherige Umwandlung in Chondroblasten, lässt sich nachweisen.

III. Die Entwicklung des heterotopischen Knochens folgt denselben Gesetzen, wie der normale Knochen.

IV. An der Bildung der osteoiden Grundsubstanz nehmen nicht nur die Osteoblasten sondern auch die Knorpelzellen Theil, welch letztere durch die Basis der Säulen zu den primitiven Markräumen in Beziehung treten.

V. Die primitiven Markräume entstehen durch das Zugehen der Knorpelzellen, deren Kapseln sich öffnen und deren Protoplasma in der Grundsubstanz aufgeht. Die diese Räume erfüllenden Markgranulationen stammen zum Theil von den alten Knorpelzellen, zum Theil von den Osteoblasten her.

VI. Die regenerative Thätigkeit des Periosts äussert sich auch in heterologen Geweben, wie z. B. in der vorderen Augenkammer und der Iris, nicht aber in Nährgelatine.

VII. Schwache Reize reichen schon hin, um starke Proliferationen in der osteogenetischen Schicht des Periosts hervorzubringen.

VIII. Bei totaler Ablösung des Periosts ist keine Regeneration desselben erhältlich; der grösste Theil der Knochensubstanz wird nekrotisch, mit Ausnahme der Stellen, die durch ein rasch sich entwickelndes Gefäßssystem mit dem umliegenden Bindegewebe in Beziehung getreten sind. An solchen Stellen tritt die Grundsubstanz der oberflächlichsten Knochenschichten allmählich zurück und die Knochenzellen gehen in Osteoblasten über, aus welchen nachher neue Knochenbalken sich bilden.

IX. Die eigentliche Knochensubstanz, isolirt von Mark und Periost, ist fähig, osteoide Balken zu bilden durch die Osteoblasten, welche aus den oberflächlichen Schichten stammen, wie es auch bei dem des Periosts entblößten Knochen der Fall ist. Die regenerative Bedeutung der eigentlichen Knochensubstanz liegt somit in den Knochenzellen der oberflächlichsten Lamellen, bestehend in einer directen Umwandlung dieser Zellen in Osteoblasten. Wahrscheinlich liefert die Grundsubstanz durch ihre Rarefaction das Material für die Vergrösserung der protoplasmatischen Substanz.

X. Die Marktransplantationen geben negative Resultate. — Bei den Transplantationen von Knochen ohne Mark zeigt sich Resorption an der medullaren und Neubildung an der periostalen Knochenoberfläche. — Doch auch neben den Zonen, in denen die Neubildung am stärksten auftritt, finden sich kleine Resorptionszonen. — Die jungen, osteoiden in der Nachbarschaft der Resorptionszonen liegenden Balken modifizieren sich in chondroide Substanz.

XI. Der Resorptionsprozess wird durch chemische Verände-

rungen der Knochengrundsubstanz vorbereitet. Die Riesenzellen haben die Bestimmung, die Zerfallsproducte der Knochenzellen und Gefäße in sich aufzunehmen. Sie bilden sich auf Kosten der Grundsubstanz und der Knochenzellen.

XII. Die reactive Entzündung, welche einer Continuitäts-trennung der Knochen folgt, spielt im Regenerationsprozess keine active Rolle. — Die Entzündungsproducte erleiden regressive Metamorphosen.

XIII. Fast alle Knochenzellen in der Nachbarschaft der Bruchstelle werden nekrotisch. Die Kerne reagiren nicht mehr auf Farbstoffe. — Solche nekrotischen Zonen werden durch die Neubildung reparirt, welche aus den zahlreichen an der Knochenoberfläche in Folge von Rarefaction der Grundsubstanz frei gewordenen Osteoblasten hervorgeht.

XIV. Auf Seite des Periosts beginnt der Regenerationsprozess schon nach 36 Stunden, eingeleitet durch Proliferation der Zellen der osteogenetischen Schicht, in welcher die Differenzirung der Grundsubstanz in osteoide Balken erscheint. Eine solche Differenzirung erfolgt auch auf der medullaren Fläche des Knochens inmitten der zahlreichen Osteoblasten, welche grösstentheils den Knochenzellen der innersten Lamellen entstammen, zu einem kleinen Theil aber auch aus den Markzellen hervorgehen.

Erklärung der Abbildungen.

Taf. XVI—XVIII.

Fig. 1. Regenerationsbefund eines Stückes Periost einer Ratte, 8 Tage post transplantationem zwischen die Rückenmuskeln einer anderen Ratte. Längsschnitt. 5tägige Fixation in Flemming'scher Flüssigkeit. Hämatoxylinfärbung. Leitz Syst. VII, Oc. I. A Peripherische Zone neugebildeten Knorpelgewebes. B Säulenförmige Anordnung der Knorpelzellen. C Spindelförmige Knorpelzellen, Stränge bildend, welche nach Art eines Perichondriums zur Seite des neugebildeten Knochens sich ausbreiten. D Umwandlung der Knorpelzellen in Osteoblasten. E Bildung der primitiven Markräume durch Zugrundegehen der Knorpelzellen. F F Junge Knochenbalken. G G Primitive mit Markgranulationen erfüllte Markräume.

Fig. 2. Knochenneubildung auf der Iris eines Kaninchens 10 Tage post transplantationem eines kleinen Periostlappens in die vordere Augenkammer. 3tägige Fixation in Flemming'scher Flüssigkeit, Saffranin-

färbung. Leitz VII, Oc. II. A Neugebildete Knochenbalken. B Osteoblasten, um die Balken herum liegend. C Pigmenthaltige Zellen. D Riesenzellen. E Irisgewebe mit Pigmentzellen und ganz frei von leukocytärer Infiltration.

- Fig. 3. Transplantation von Knochen ohne Periost. Regenerationszone in der unteren Partie eines Rattenfemur, ohne Periost transplantirt. 2 Wochen post transplantationem. Injicirt mit Berlinerblau. Saffraninfärbung. Nachfärbung mit Säuregrün. Hartnack VIII, Oc. III. A. Nekrotische Knochensubstanz. B Knochenzellen, deren Kerne nicht mehr mit Saffranin gefärbt sind. C Detritus enthaltende Markräume. D Riesenzellen, an der Oberfläche der Resorptionszone. E Neugebildete Knochenbalken. F Osteoblasten, welche um die neu gebildete Zone herumstehen. H In die durch die Balken gebildeten Räume eindringenden Gefässe. J Starke Gefässentwicklung im Zusammenhang mit der Resorptionszone. K Junges gefäßreiches Bindegewebe.
- Fig. 4. Transplantation eines markfreien Femursplitters einer Ratte zwischen die Rückenmuskeln 24 Tage post transpl. Völlige Umwandlung des ganzen Splitters in Knorpel. Längsschnitt. Hämatoxylinfärbung. 3tägige Fixation in Flemming'scher Flüssigkeit. Hartnack V, Oc. III. A Knorpelzellen mit 1 oder 2 Kernen. B Peripherische Knorpelzellen, die spindelförmiges Aussehen angenommen haben. C Bildung eines Markraumes. D Muskelfasern. E Noch nicht in Knorpel umgewandelte Knochenzellen.
- Fig. 5. Transplantation eines marklosen Rattenfemurs zwischen die Rückenmuskeln, 24 Tage post transplant. Neubildung an der Periostoberfläche. Resorption in der Gegend eines neugebildeten Balkens. Bildung von Knorpelsubstanz. 5tägige Fixation in Flemming'scher Flüssigkeit. Saffraninfärbung. Hartnack VII, Oc. III. A Knorpelsubstanz, die fast die neugebildeten Balken ersetzt hat. B Osteoblastenstratification rings um den Balken herum. C Riesenzellen. D Osteoblasten. E Umliegendes Bindegewebe. F Knochenoberfläche.
- Fig. 6. Bildung der Riesenzellen in einem von der Resorption ergriffenen Knochenstück. 6tägige Fixation mit Flemming'scher Flüssigkeit. Saffraninfärbung. Leitz VII, Oc. III. A Zone, wo die Grundsubstanz ein feinkörniges Aussehen angenommen hat. B Vergrösserte und feinkörnig gewordene Knochenzellen, die im Begriffe sind, Riesenzellen zu bilden. C Schon gebildete Riesenzellen, Fettkörnchen enthaltend.
- Fig. 7. Querschnitt durch einen Kaninchenskelet, in Resorption begriffen, 4 Tage post fracturam mit Periostablösung. 8tägige Fixation in Flemming'scher Flüssigkeit. Saffraninfärbung. Hartnack VII, Oc. III. A Periostale Oberfläche. B Unregelmässige Markoberfläche des Knochens. C Howship'sche Lacunen. D Riesenzellen. E Neugebildete Blutgefäße.

Fig. 8. Structurbild einer Kaninchentibia, 5 Tage post infractionem. Bruchstelle quer, sich fast über die innere Hälfte der innersten Knochenlamellen erstreckend. Längsschnitt. 8tägige Fixirung in Flemmingscher Flüssigkeit. Entkalkung mit 1prozentiger Chromsäure. Saffraninfärbung unter Beimischung von Säuregelb. Hartnack V, Oc. IV. A Markoberfläche des Knochens. B Querfractur der innersten Knochenlamellen. C Aeusserster Theil der Knochenwand. D Diastase zwischen den inneren und äusseren Theilen der Knochenwand. e Häufchen von Knorpelzellen am inneren Ende der Fracturlinie. f Grosse Menge von Osteoblasten, auf der Knochenoberfläche frei geworden, aus Knochenzellen stammend. g g g Knochenzellen, welche während ihrer Umwandlung in Osteoblasten angetroffen werden. Der helle Saum repräsentirt die Rarefaction der Grundsubstanz, die zur Befreiung der neuen Zellen führt. h h Neugebildete Knochenbalken, die den inneren Callus bilden. i i Nekrosirte Knochenzellen in der Nähe der Bruchstelle. k Osteoblasten, die den diastatischen Theil erfüllen.

Fig. 9. Vollständige Fractur einer Kaninchentibia am 6. Tage. Längsschnitt. 5tägige Fixation in Flemming'scher Lösung. Saffraninfärbung. Nachfärbung mit Säuregrün. Hartnack V, Oc. IV. A Periostoberfläche. B Markoberfläche. c Differenzirung der Grundsubstanz in osteoide Balken in der Cambiumschicht. d Gruppen von Periostzellen, welche durch Kernumgestaltung an Kariokynese erinnern. e Knorpelzellen am äusseren Ende der Fracturlinie. f Junge Knochenbalken, von Osteoblasten gebildet, welche aus den Knochenzellen der innersten Schichten und zum geringsten Theil aus den Markzellen stammen. g Rarefactionszone um die sich in Osteoblasten umwandelnden Knochenzellen herum.