

(Aus dem Institut für Histologie und Embryologie an der Medizinischen Militär-Akademie zu St. Petersburg [Direktor: Professor Dr. A. Maximow, z. Zt. University of Chicago, U. S. A.] )

## Vergleichende Untersuchungen über Explantation und Transplantation von Knochen, Periost und Endost.

Von

Dr. A. O. Wjereszinski,

Assistent der chirurgischen Klinik von Prof. S. S. Gergoloff.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Januar 1924.)

### 1. Einleitung.

Die Veränderungen eines Stückes Knochengewebe bei Auto- und Homotransplantation bieten ein hohes theoretisches und praktisches Interesse dar. Es besteht darüber bereits eine große Literatur, und es sind bestimmte Regeln für die Anwendung dieser Methode in der chirurgischen Praxis bei Ausfüllung von Knochenlücken, bei Verheilung von Pseudarthrosen usw. ausgearbeitet worden. Mit der Frage der freien Knochentransplantation ist immer auch das Schicksal des eventuell zusammen transplantierten Periosts verbunden.

Heutzutage neigen die meisten Forscher der Ansicht zu, daß die Zellen des transplantierten Knochens fast alle absterben [Barth<sup>5</sup>), Schmitt<sup>23</sup>), Möller<sup>18</sup>), Fischöder<sup>10</sup>), Simon<sup>24-26</sup>), Policard<sup>21</sup>) u. a.]. Nur in Fällen, wo der transplantierte Knochen an seiner Oberfläche mit intaktem Periost versehen ist, bleibt eine dünne Schicht Knochengewebe unter dem Periost erhalten [Simon<sup>24-26</sup>), Policard<sup>21</sup>)]. Der transplantierte Knochen wird allmählich durch körpereigene Knochenbildung ersetzt [Grekow<sup>12</sup>) u. a.]. Auf die wichtige Rolle des Periosts und Endosts bei der Ausheilung von Knochendefekten haben besonders Axhausen<sup>1, 2, 3</sup>) und Mayer und Wehner<sup>17</sup>) hingewiesen; die Bildung des jungen Knochens soll zum Teil von diesem Gewebe ausgehen. Daß aber für die Knochenregeneration das den transplantierten Knochen umhüllende lockere Bindegewebe des Wirtes von ausschlaggebender Bedeutung ist, ist als sicher anzunehmen [Petrow<sup>20</sup>), Simon<sup>24-26</sup>), Policard<sup>21</sup>) u. a.].

Bei der Knochenüberpflanzung in Knochendefekte wird der Prozeß der Einheilung durch die Veränderungen des umgebenden Knochengewebes des Wirtes verwickelt und verdunkelt. Einfacher und klarer

gestalten sich die Verhältnisse bei freier Transplantation des Knochens in weiches Bindegewebe, unter die Haut oder zwischen Muskeln, wie es von mehreren Autoren, z. B. von *Petrow*<sup>20)</sup>, *Baschkirtzew* und *Petrow*<sup>8)</sup>, *Nemilow*<sup>19)</sup>, *Simon*<sup>24–26)</sup>, *Policard*<sup>21)</sup> und anderen gemacht wurde.

Die Schicksale eines auto- oder homoiotransplantierten Gewebes hängen erstens von den prospektiven Entwicklungspotenzen des Transplantats und zweitens von der von ihm in den Geweben des Wirtes hervorgerufenen Reaktion, die für die transplantierten Elemente bestimmte Existenzbedingungen schafft, ab. So verhält es sich auch mit der Knochentransplantation. Manches ist hier noch nicht ganz klar und neue Untersuchungen könnten hier eventuell, außer der Lösung rein wissenschaftlicher Probleme, auch praktische Bedeutung haben, insofern sie für neue zweckmäßige Methoden der Knochentransplantation beim Menschen nützliche Fingerzeige ergeben könnten. Dies war der Grund, warum ich die weiter unten beschriebenen Experimente mit Knochentransplantation unternommen habe.

Die prospektive Entwicklungspotenz eines Gewebes kann am besten in dem Fall hervortreten, wenn dem Gewebe, bei reichlicher Nahrungszufuhr, vollkommene Freiheit der Entwicklung unter Ausschaltung aller störender Einflüsse seitens anderer Gewebe gesichert wird. Diese Bedingungen können heutzutage in recht hohem Grade durch die Methode der Gewebszüchtung verwirklicht werden. Deswegen habe ich es unternommen, Gewebskulturen vom Periost und vom Knochengewebe anzufertigen.

In der Literatur über Gewebskulturen gibt es nur kurze Angaben über das Periost; es wurde nur gelegentlich, bei Untersuchungen, die anderen Geweben gewidmet waren, gezüchtet, so z. B. von *Foot*<sup>11)</sup>, der sich speziell für das Knochenmark, und von *Dobrowolsky*<sup>9)</sup>, die sich für das Knochengewebe interessierte. Nach der letzteren Autorin zeigt dies letztere Gewebe entweder gar kein Wachstum oder ein nur sehr schwaches. Übrigens wurden von ihr keine eingehenden histologischen Untersuchungen gemacht.

Gleichlaufend mit der Züchtung von Periost und Knochengewebe habe ich dieselben Gewebe, in Form kleiner, meistens mit Periost versehener Knochenaspäne, in das ungeformte lockere Bindegewebe zwischen den Muskeln des Abdomens anderen Tieren derselben Spezies transplantiert.

## 2. Material und Methoden.

Meine Versuche wurden an erwachsenen Kaninchen angestellt. Sofort nach Tötung des Tieres wurde das Femur mit seiner Periosthülle extirpiert, wobei das Periost überall vorsichtig vom Muskelgewebe abgetrennt wurde. Zur Verhütung des Austrocknens des periostalen

Gewebe wurde es dabei fortwährend aus einer Pipette mit keimfreier warmer Ringerscher Lösung benetzt. Sodann wurden entweder kleine Stückchen reinen Periosts mittels eines Skalpells von der Oberfläche des Knochens abgeschabt, oder es wurden mit demselben Instrument dünne Knochenspäne zusammen mit dem Periost abgehobelt. Alle diese Gewebstücke kamen sofort in sterile warme Ringersche Lösung und wurden darin für Explantierzwecke in noch feinere Stückchen zerschnitten.

Die für die Transplantation bestimmten Knochenspäne waren stets größer als die für die Kulturen *in vitro* bestimmten.

In ähnlicher Weise, wie mit dem Periost, wurde nach Eröffnung der Markhöhle mit dem Endost verfahren.

Die Methodik der Gewebskulturen, wie sie in Professor A. Maximows Laboratorium gebraucht wird, weist einige Abweichungen von dem gewöhnlichen Verfahren auf [vgl. Maximow<sup>15, 16</sup>]. Das Gewebstück in dem koagulierten Blutplasmotropfen befindet sich nicht direkt auf dem großen, quadratischen Deckglas, welches die Höhle auf dem Objektträger bedeckt, sondern auf einem kleinen runden Deckglas, welches am großen, quadratischen, mittels eines Tropfens Ringerscher Lösung haftet. Dies ermöglicht eine sehr bequeme und rasche weitere Transplantation der Kultur in ein neues Medium, sobald das alte erschöpft ist, und verhindert die mechanische Schädigung des wachsenden Gewebes; man braucht das letztere nicht zu zerschneiden und vom Deckglas abzuheben, sondern es genügt, das runde Deckglas vom großen abzuheben, auszuwaschen, auf ein neues quadratisches Deckglas zu tun und mit ein paar neuen Plasmotropfen zu beschicken. Auf diese Weise läßt sich das Gewebe sehr lange kultivieren. Der Nachteil, daß die Fibrinschicht allmählich an Dicke zunimmt, so daß das Gewebe schließlich erstickt wird, fällt nicht sehr schwer in die Wage, weil die meisten histogenetischen Fragen, die zu entscheiden die Gewebskulturmethode berufen ist, einen so langen Zeitraum gar nicht benötigen. Außerdem ist das kleine aber wichtige Detail zu notieren, daß die feuchte Kammer mit der Gewebskultur, nach der Anfertigung der letzteren, stets umgedreht werden muß, so daß der „hängende Tropfen“ in einen „liegenden“ verwandelt wird. Dies verhindert das sonst, besonders bei Kultivierung von Geweben, die das Fibrin verflüssigen, fast regelmäßig eintretende Abfließen der sich an der Oberfläche der Kultur ansammelnden Flüssigkeit.

Das Blutplasma wurde stets aus der Carotis junger Kaninchen gewonnen, mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 2 : 1 verdünnt und nach der Verdünnung, im Moment des Explantierens, in demselben Mengenverhältnis mit Knochenmarksextrakt vermischt. Dieses Extrakt zeichnet sich nach Maximow<sup>16</sup>) durch eine sehr ausgesprochene wachstumsfördernde Wirkung aus. In einigen Fällen wurde zum Nährmedium noch eine geringe Menge Lithiumcarmin als vitaler Farbstoff hinzugesetzt.

Im ganzen verfüge ich über 44 gelungene Kulturen vom Periost und über 12 Kulturen vom Endost. Die längste Dauer des Lebens *in vitro* war für das Periost 23 Tage bei 4 maligem Wechsel des Nährbodens und für das Endost 18 Tage bei 3 maligem Wechsel.

Die Gewebskulturen wurden, nach gründlicher Untersuchung in lebendem Zustande, im gewünschten Augenblick mit Zenker-Formol fixiert und nach Maximows Methode<sup>15, 16</sup>) weiterbehandelt, d. h. vom Glas abge-

hoben, in Celloidin eingebettet und in Serienschnitte zerlegt. Zur Färbung wurde die *Maximowsche*<sup>14)</sup> Eosin-Azurmischung benutzt. In einigen Fällen wurden die Kulturen mit Carnoys Gemisch fixiert und mit Delafieldschem Hämatoxylin durch gefärbt und in Dammarlack eingeschlossen. Solche Präparate geben einen sehr schönen Gesamtüberblick, gestatten aber nicht die histogenetischen Einzelheiten aufzuklären.

Parallel mit der Anfertigung der Gewebskulturen von Periost und Periost mit Knochen wurden die größeren, in der oben beschriebenen Weise gewonnenen Knochen- und Knochenperiostspäne in das lockere intermuskuläre Bindegewebe der Bauchwand von erwachsenen Kaninchen transplantiert. Die kleinen Hautwunden wurden mit Seide zugenäht und heilten stets per primam. In verschiedenen Zeiträumen — nach 4, 9 und 17 Tagen — wurden dann die betreffenden Tiere getötet und die die Transplantate enthaltenden Stücke der Bauchwand, nach Abpräparierung der Haut, auf passenden Korkrahmen mittels Kaktusnadeln ausgespannt und in Zenker-Formol fixiert. Weiter folgte Einbettung in Celloidin und Decalcinierung; die Serienschnitte wurden der Oberfläche parallel geführt und in Dammarlack eingeschlossen.

### 3. Über den Bau des Periosts und Endosts.

Das Periost des Femurs beim Kaninchen ist kein besonders günstiges Gewebe für Auspflanzungsversuche. Es stellt ein sehr dünnes bindegewebiges Häutchen vor, und es ist keineswegs eine Leichtigkeit, dasselbe in vollkommen reinem, von Muskelgewebe freiem Zustande herauszupräparieren. Beim Versuch, es vom Knochen loszulösen, wird es gewöhnlich stark beschädigt und kann, wenn nicht besondere Vorsichtsmaßregeln getroffen werden, rasch eintrocknen. Am leichtesten ist es, kleine Perioststücke zusammen mit einer dünnen Knochenschicht durch Abhobeln von Knochenspänen in der oben angegebenen Weise zu gewinnen.

Was den histologischen Bau des Periosts betrifft, so besteht es bekanntlich aus einer oberflächlichen dichteren Lage mit dicken, dicht gelagerten Kollagenfasern, spärlichen elastischen Fasern und zwischen den Fasern liegenden Bindegewebszellen. Die innere, dem Knochen unmittelbar anliegende Lage hat ein lockereres Gefüge und enthält zahlreiche elastische Fasern und Bindegewebszellen. Normalerweise sind Osteoblasten nicht vorhanden. Die kollagenen Fasern dieser Schicht dringen bekanntlich in die Knochensubstanz in Form von Sharpey'schen Fasern ein. An den Stellen, wo die Sehnen am Knochen haften, verflechten sich die Fasern derselben aufs innigste mit den Fasern des Periosts, und hier sieht man die Ranvierschen Sehnenzellen allmählich in die Bindegewebszellen des Periosts übergehen.

Der Struktur des Endosts ist eine spezielle im Jahre 1913 erschienene Arbeit von *Samoilenko*<sup>22)</sup> gewidmet. Es ist eine dünne Bindegewebs-

membran, die die Oberfläche der knöchernen Markhöhlenwand auskleidet und mit latenten Potenzen sowohl für die Neubildung, als auch für die Aufsaugung von Knochengewebe ausgestattet ist. Es steht in innigster Beziehung zum Knochenmark und stellt eigentlich nur die periphere, verdichtete Schicht des faserigen retikulären Stromas

desselben vor. Während aber die zelligen Elemente des Endosts, bei passenden Bedingungen, wie gesagt, eine knochenbildende Tätigkeit entfalten können, ist das erwachsene Knochenmark an und für sich einer osteoblastischen Leistung nicht fähig und scheint bloß durch seine Gegenwart die Tätigkeit des Endosts anzuregen.

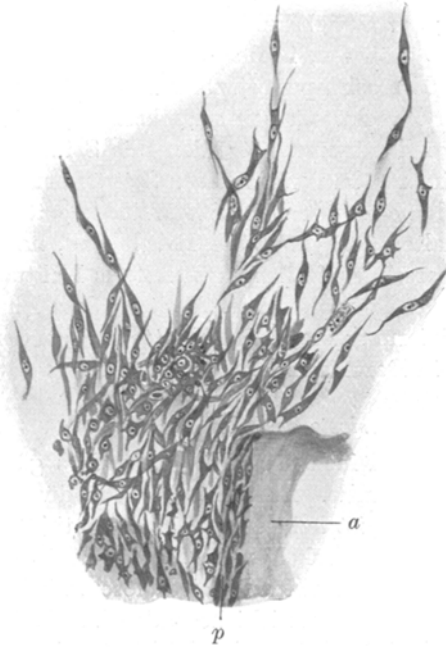


Abb. 1. Randzone einer Kultur vom Periost eines erwachsenen Kaninchens; 8 Tage in vitro (1. Transplantation). In *a* tote Knochensubstanz ohne sichtbare Zellen, in *p* Periost; vom letzteren geht eine üppige Gewebsneubildung aus mit ins Plasma ausstrahlenden spindelförmigen Fibroblasten. Obj. Leitz 3, Komp. Ok. Zeiss 12.

#### 4. Gewebskulturen vom Periost.

In den Fällen, wo nackte, vom Periost entblößte Knochensplittchen ins Nährmedium gelangten, waren nur minimale Anzeichen einer Lebenstätigkeit von Zellen in vitro zu bemerken. Immerhin konnte ich manchmal, nach einigen Tagen, in der nächsten Umgebung der scharf gezackten Bruchflächen der Knochensubstanz einzelne

sternförmige oder spindelförmige Zellen erblicken. Es mag sein, daß dies aus der harten Zwischensubstanz losgelöste, freigewordene Knochenzellen waren. Ihrer äußeren Form nach glichen sie gewöhnlichen Fibroblasten.

Das Periostgewebe gibt stets einer reichlichen Gewebswucherung Ursprung. Nach 1–2 Tagen fangen vom Rande des Explantats spitze, faden- oder spießförmige protoplasmatische Auswüchse hervorzuwachsen an. Im folgenden erschienen immer zahlreichere, lange, spießförmige, zu meist radial gerichtete Zellen, die ins Plasma ausstrahlten, und das Explantat umgab sich mit einem Hof von typischen, lose angeordneten, wuchernden, stern- oder spindelförmigen Fibroblasten (Abb. 1). Was den inneren Bau dieser Elemente betrifft, so entspricht sie vollkommen

der so oft für die *in vitro* wachsenden Fibroblasten beschrieben. Das Protoplasma ist homogen und leicht basophil, besonders typisch ist aber der große ovale Kern mit seinen großen, nach Eosin-Azur tiefblauen Nucleolen (Abb. 2). Sowohl in den ins Plasma ausgewanderten als auch in den im explantierten Gewebe verbliebenen Zellen fand ich zahlreiche Mitosen. Die draußen gelegenen Elemente unterschieden sich von den im ausgepflanzten Stückchen gebliebenen vor allem durch ihre viel bedeutendere Größe.

Amöboide Zellen kommen in den Periostkulturen nur selten vor. Dies steht im Einklang mit den Angaben von *Macklin*<sup>13)</sup>, der bei Verheilung von Knochenfrakturen die farbstoffspeichernden Polyblasten hauptsächlich aus hämatogenen Lymphocyten entstehen sah, während

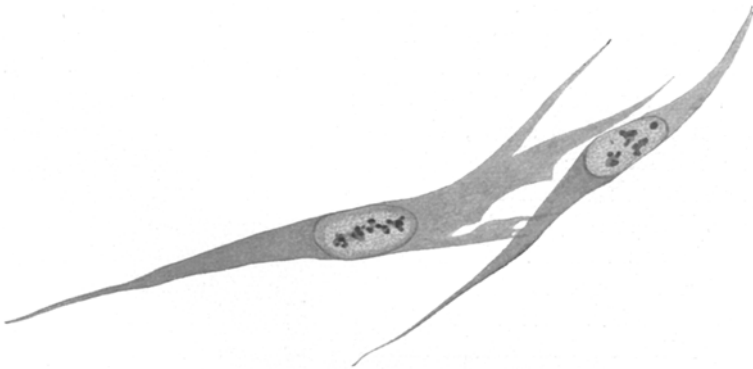


Abb. 2. Zwei typische Fibroblasten aus einer ähnlichen Kultur unter starker Vergrößerung. Obj. Leitz Hom. Imm.  $\frac{1}{12}$ , Ok. 4.

die Zahl der amöboiden Elemente lokalen Ursprungs gering war. In den Periostkulturen kommt nur die letztere Quelle in Betracht und dementsprechend sind die Wanderzellen spärlich.

In den Zellen des Periosts habe ich Degenerationserscheinungen nur äußerst selten, nur in ganz vereinzelten Fällen gefunden. Auch in dieser Beziehung verhalten sie sich wie gewöhnliche Fibroblasten. Demgegenüber sind in den Knochenzellen der explantierten Knochenstücke Absterbeerscheinungen sehr verbreitet. Besonders in den tieferen Abschnitten und in den älteren Kulturen färbte sich das Knochengewebe mit EAz. anders als im normalen, lebenden Zustande — es erhielt einen schmutzigrotvioletten Ton und die Kerne der Knochenzellen nahmen in diesen Bezirken keine Färbung an.

Die Knochengrundsubstanz scheint in den Kulturen in beschränktem Maße aufgesaugt zu werden. Wenigstens habe ich in den älteren Kulturen die scharfen gezackten Ränder der Knochensplitter sich allmählich glätten und abrunden sehen. Dabei war keine Spur von Osteoklasten-

bildung zu bemerken. Es ist wohl möglich, daß die wuchernden Fibroblasten selbst bis zu einem gewissen Grade die Fähigkeit besitzen, die harte Grundsubstanz aufzulösen. Dies braucht uns nicht zu verwundern, da ja bekanntlich die fixen Bindegewebszellen des vorrückenden embryonalen Knochenmarkes bei endochondraler Knochenbildung diese Fähigkeit ebenfalls aufs deutlichste offenbaren.

Was die späteren von mir beobachteten Stufen der Periostentwicklung in vitro anbelangt, so nimmt das wachsende Gewebe nach einigen Transplantationen stets das Aussehen eines gewöhnlichen Bindegewebes an, das seinen Ursprung aus dem dichtfaserigen Periost durch nichts mehr verrät und durchaus dem Gewebe gleicht, welches in den Kulturen überhaupt aus allen möglichen Bindegewebsarten gezüchtet werden kann. Es besteht aus dichter oder lockerer angeordneten und netzartig verflochtenen typischen Fibroblasten von sehr verschiedener Größe (Abb. 1). Die Bildung einer faserigen Zwischensubstanz, wie sie von *Baitsell*<sup>4)</sup> und auch von *Maximow*<sup>16)</sup> in Gewebeskulturen beschrieben wurde, habe ich nicht beobachtet. Dies ist jedoch wahrscheinlich nur der beschränkten Beobachtungsdauer in meinen Experimenten mit den Periostkulturen zuzuschreiben.

Das Endost zeigt in allen Fällen ein weniger üppiges Wachstum in vitro als das Periost. Auch qualitativ bot es einige Unterschiede. Die Fibroblasten waren im allgemeinen größer und schienen zu einem lockereren Netz vereinigt zu sein; ferner waren zwischen ihnen stets Wanderzellen in bedeutenden Mengen vorhanden; sie entstammten wahrscheinlich den mobilisierten vorgebildeten ruhenden Wanderzellen im explantierten Gewebe.

Neubildung von Knochensubstanz in Kulturen habe ich nicht beobachtet. Die Fibroblasten vermehrten sich, ohne sich in andere Zellarten zu verwandeln.

##### 5. *Transplantation von Knochen und Periost.*

Die von mir bei der Transplantation von Knochenspänen in das intermuskuläre Bindegewebe der Bauchwand beim Kaninchen gefundenen Ergebnisse laufen auf das Folgende hinaus.

In frühen Stadien (3—4 Tage) sieht man in der Umgebung des Transplantats alle Anzeichen einer entzündlichen Reaktion, Extravasate, größere oder kleinere Ansammlungen spezialgekörnter Leukocyten, amöboide Polyblasten in verschiedenen Entwicklungsstadien usw. Im transplantierten Gewebsstück sah man allmähliche Degeneration der Knochenzellen; an den Rändern des Stückchens und besonders im Bereich einer dünnen Schicht unter dem Periost sind sie noch wohl-erhalten, überall in der Tiefe nehmen sie aber die Färbung nicht mehr an und sind trübe und mit kaum sichtbaren Knochenkanälchen versehen (Abb. 3 u. 4, a).

Sehr bald beginnt auch die Aufsaugung des transplantierten Knochens. In einigen Fällen sieht man dabei an der Oberfläche des toten Knochens typische große vielkernige Osteoklasten auftreten. Dies ist jedoch keineswegs eine regelmäßige

Erscheinung, und auch hier, wie in den Kulturen, scheinen die gewöhnlichen Fibroblasten selbst das Auflösungsgeschäft besorgen zu können.

Die Elemente des mit dem Knochen transplantierten Periosts bleiben hingegen stets und überall lebendig und ihren körnigen Zerfall, wie er von einigen Autoren [*Baschkirtzew* und *Petrow*<sup>8)</sup>] unter ähnlichen Bedingungen vermerkt wurde, konnte ich nicht feststellen. Im Gegenteil, an einigen Stellen vergrößern sich die Periostzellen, wohl infolge der Befreiung von dem unter normalen Verhältnissen herrschenden Druck, gleich nach der Transplantation und fangen an sich zu bewegen, zu wachsen und zu wuchern. Sie vermischen sich mit den Fibroblasten des Wirtes. Auch in den späteren Stadien habe ich Degenerationserscheinungen an diesen Zellen nicht beobachten können.

Schon vom 4. Tage an tritt nun auch Neubildung von jungem Knochengewebe in der nächsten Umgebung des Transplantats ein. Sie geht von den das letztere

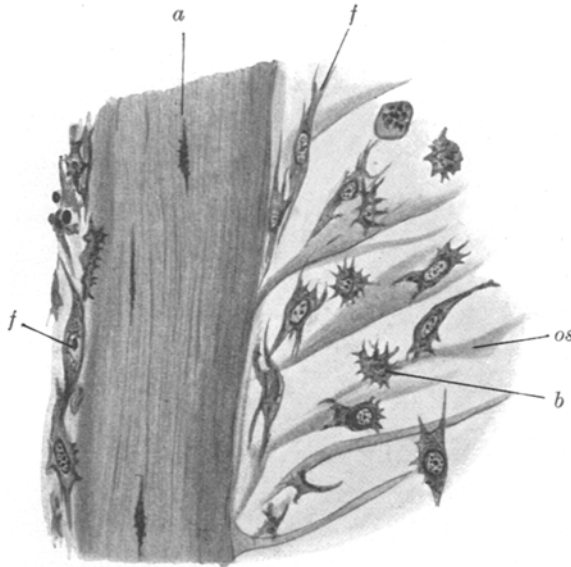


Abb. 3. Teil eines in das intermuskuläre Gewebe eines erwachsenen Kaninchens homotransplantierten eingerollten Knochenspanns; 4 Tage; *a* = toter Knochen; *f* = spindelige Fibroblasten, die sich auf der konvexen Seite des Knochenspanns in Knochenzellen (*b*) verwandeln und homogene Knochen-zwischensubstanz (*os*) ausarbeiten. Obj. Leitz, Hom. Imm.  $\frac{1}{12}$ , Ok. 4.

umgebenden Bindegewebszellen, hauptsächlich den Fibroblasten des Wirtes, wohl auch von den transplantierten Periostzellen aus und ist in den Fällen und an den Stellen, wo zusammen mit dem Knochen auch das Periostgewebe transplantiert wurde, reichlicher und tüppiger als bei alleiniger Anwesenheit von Knochengewebe.

Die transplantierten Knochenspäne sind fast stets mehr oder weniger eingerollt. Die Knochenneubildung verläuft auf etwas verschiedene Weise an der konvexen und an der konkaven Seite derselben. Der Prozeß der Knochenbildung selbst entspricht zweifellos dem embryonalen Entwicklungstypus, wobei die Knochensubstanz direkt aus Bindegewebe hervorgeht.

An der konkaven, von äußeren mechanischen Einflüssen am besten geschützten Seite sieht man während des 4. Tages ein sehr lockeres Netz von Fibroblasten entstehen, die sich mittels ihrer Ausläufer verflechten (Abb. 3, *f*). Zwischen ihnen tauchen bald zarte, halb durchsichtige, nach EAz. blaßrosafarbene Streifen einer



homogenen Substanz auf (Abb. 3, *os*). Dies ist das junge osteoide Gewebe. Es bildet allmählich größere und kompaktere Herde, die sich stärker färben und mit Kalksalzen durchtränken. Sie entstehen zuerst ohne jegliche direkte Verbindung mit dem alten transplantierten Knochen. Später können sie an vielen Stellen mit dem letzteren in Zusammenhang treten.

Die zu gleicher Zeit in den Fibroblasten eintretenden Veränderungen können leicht schon unter schwacher Vergrößerung bemerkt werden — sie nehmen allmählich das typische Aussehen von echten Knochenzellen an. Zuerst kontrahieren und runden sie sich etwas ab, ohne ihre mit den Nachbarzellen verbundenen Ausläufer einzubüßen. Dann nehmen sie die kompakte eckige Gestalt von typischen Osteoblasten an und bleiben endlich in der zwischen ihnen und ihren Ausläufern

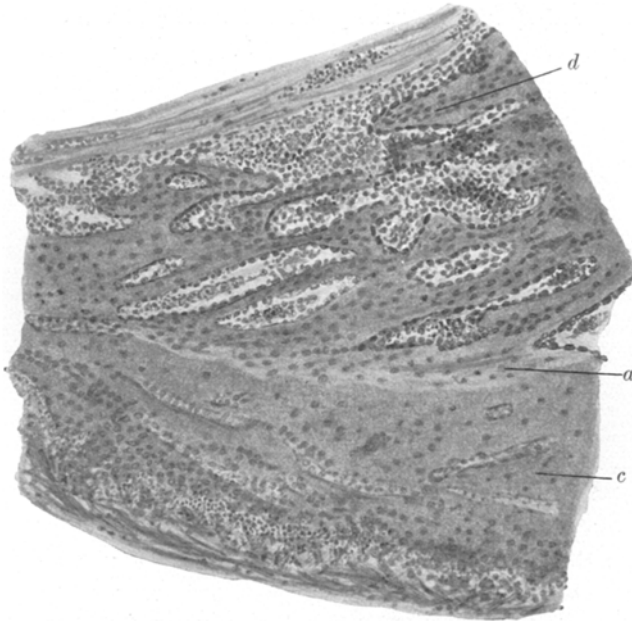


Abb. 4. Teil eines in das intermuskuläre Gewebe eines erwachsenen Kaninchens homotransplantierten, eingerollten, mit Periost in Zusammenhang gebliebenen Knochenspanes; 9 Tage; *a* = toter Knochen; in *d* (konkave Seite) neugebildeter spongiöser Knochen mit Osteoblasten; in *c* neugebildeter kompakter Knochen mit anliegender Schicht von Granulationsosteoblasten. Obj. Leitz 3, Ok. 2.

ausgeschiedenen Zwischensubstanz als typische spinnenförmige Knochenzellen eingeschlossen liegen (Abb. 3, *b*). Im folgenden entstehen auf der Oberfläche solcher junger Knochenherde neue Osteoblasten durch entsprechende Verwandlung und Angliederung neuer Fibroblasten und auf diese Weise vergrößern sich die Knochenherde und verwandeln sich in typischen spongiösen Knochen mit gerüstartig miteinander verbundenen Bälkchen. Auf Abb. 3 sind diese Anfangsstadien der metaplastischen Knochenentwicklung aus dem lockeren Granulationsgewebe an der konkaven Seite eines transplantierten Knochenspanes mit der Verwandlung der Fibroblasten in Knochenelemente abgebildet (*b*).

An der konvexen Oberfläche der transplantierten Knochenspäne bietet der beschriebene Prozeß der Knochenbildung ein etwas anderes Aussehen in der Beziehung, daß die Fibroblasten, die, wie gesagt, zum Teil aus dem transplantierten

Periost, zum Teil aus dem Bindegewebe des Wirtes stammen, hier in Form einer sehr dichten, filzartigen Hülle an der Oberfläche des Transplantats angeordnet erscheinen und ein besonders dunkles basophiles Protoplasma aufweisen. In der nächsten Nachbarschaft des transplantierten Knochens entstehen auch hier, in diesem dichten Bindegewebe, neue Knocheninseln.

Nach 9 Tagen erscheint der transplantierte Knochensplitter überall von energisch wachsenden, manchmal keulenförmigen, von einer dichten, regelmäßigen

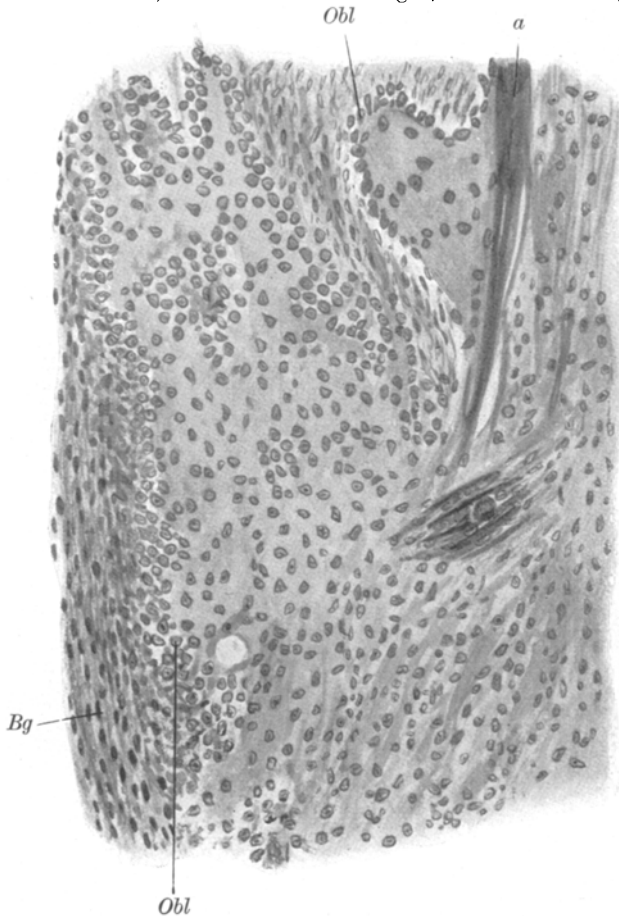


Abb. 5. Ausgedehnte Knochenmetaplasie des Bindegewebes in der Umgebung eines schmalen transplantierten Knochensplitters; 9 Tage; a = alter, transplantierte Knochen; Obl = Osteoblasten; Bg = Bindegewebe. Obj. Leitz 3, Komp. Ok. Zeiss 12.

Osteoblastenschicht umhüllten, spongiösen, miteinander und mit dem alten Knochen verbundenen Knochenbälkchen umringt (Abb. 4). Die Ausdehnung des neugebildeten Knochens ist besonders bedeutend in den Fällen, wo außer dem Knochen auch das Periost mit transplantiert wurde. Sie kann den Umfang des alten Knochens um ein Vielfaches übertreffen und mitunter trifft man sogar in weiterer Entfernung vom Transplantat einzelne junge Knochenherde, die mit dem letzteren gar nicht verbunden erscheinen (Abb. 5).

Auch in meinen spätesten Fällen (17 Tage) bot der neugebildete Knochen meistens deutliche Verschiedenheiten dar an der konkaven und an der konvexen Oberfläche des transplantierten Knochenstückchens. Im ersten Bezirk sah man formlosen, spongiösen Knochen; im zweiten ein viel dichteres Knochengewebe mit geschichteten Knochenlamellen.

### 6. Schluß.

Die geschilderten, mit der Methode der Gewebeskulturen und mit der Methode der Transplantation gewonnenen Befunde laufen auf das Folgende hinaus.

Bei Ex- und Transplantation von Knochenfragmenten gehen weit-aus die meisten Knochenzellen zugrunde. Bloß die in einer dünnen Oberflächenschicht gelegenen bleiben am Leben. Im Explantat können einige von den Zellen, falls ihre Knochenhöhlen bei der Excision eröffnet wurden, ins Nährmedium gelangen und dort ein schwaches Wachstum zeigen. Im Transplantat kann diese oberflächlichste dünne Knochenschicht wohl dauernd am Leben bleiben.

Die transplantierte Knochensubstanz wirkt als ein spezifischer Reiz auf das umgebende Bindegewebe und veranlaßt im letzteren die Neubildung eines Granulationsgewebes, welches durch Metaplasie neues Knochengewebe erzeugt. Je größer dabei die Berührungsfläche des jungen Granulationsgewebes mit den transplantierten Knochenteilchen ist, d. h. je feiner und zahlreicher die Knochenspäne sind, desto energischer verläuft die Knochenbildung. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dabei die Degenerationsprodukte des Transplantats nicht nur die Fähigkeit der umgebenden Fibroblasten, sich in Osteoblasten zu verwandeln, anregen, sondern daß sie auch die Ausarbeitung der Knochenzwischen-substanz durch die Fibroblasten begünstigen.

Infolgedessen scheint mir die Ausfüllung von Knochendefekten mit feinen Knochenspänen im lebenden Körper die besten Vorbedingungen für einen möglichst erfolgreichen Stoffaustausch zwischen den transplantierten Knochenteilchen und dem Granulationsgewebe des Wirtes zu schaffen. Je vollkommener dieser Stoffaustausch sich gestaltet, desto vollkommener sind die Ergebnisse der Knochenbildung.

Eine sehr wichtige Rolle spielt bekanntlich bei Knochentransplantationen das Periost. Bei Transplantation von Knochen mitsamt dem Periost erhält man eine viel ergiebigere Knochenneubildung. Wie die experimentellen Untersuchungen von *Petrow*<sup>20)</sup>, *Baschkirtzew* und *Petrow*<sup>8)</sup>, *Nemilow*<sup>19)</sup> und anderen gezeigt haben, wird bei Transplantation von Knochen mit Periost eine viel reichlichere und schnellere Gefäßversorgung des Transplantats erreicht.

Das Schicksal des ex- oder transplantierten Periostgewebes trat in meinen Versuchen stets klar hervor. Weder in vitro noch im Transplantat konnten in seinen Zellen Degenerationserscheinungen

gefunden werden. Die ursprüngliche, mehr oder weniger regelmäßige Anordnung derselben geht natürlich verloren, aber die Zellen offenbaren eine sehr hohe Lebenskraft, wuchern und verwandeln sich unter passenden Bedingungen, d. h. im Körper des Wirts, in Osteoblasten. In der Kultur wird Knochengewebe nicht erzeugt, und das Periostgewebe gibt bloß energisch wuchernden Kulturen von gewöhnlichen Fibroblasten Ursprung.

#### 7. Zusammenfassung.

1. Bei freier Transplantation und bei Züchtung außerhalb des Körpers geht das Knochengewebe zum größten Teil zugrunde. Die Zellen bleiben bei der Transplantation nur in einer dünnen Außenschicht am Leben. In explantierten Knochenspänen kann dies nur von einzelnen hart an der Oberfläche gelegenen Zellen gesagt werden, deren Knochenhöhlen bei der Präparation geöffnet wurden und die ins Nährmedium auswandern und schwaches Wachstum zeigen. Die Zwischensubstanz des Transplantats wird aufgesaugt, wobei die Anwesenheit von Osteoklasten nicht nötig ist. In vitro scheint die Zwischensubstanz in sehr geringem Grade von den Fibroblasten auch aufgelöst zu werden.

2. Die regelmäßige Anordnung der Zellen im Periost geht bei Homöotransplantation und Explantation verloren, die Zellen bleiben aber am Leben und zeigen eine starke mitotische Wucherung. Sie können sich im Transplantat in Osteoblasten verwandeln.

3. Die Hauptquelle der Knochenneubildung bei Knochentransplantation ist jedoch nicht das transplantierte Periost, sondern das das Transplantat umgebende Granulationsgewebe des Wirtes. Wie beim Embryo bei Bildung von Bindegewebsknochen, verwandelt es sich zuerst durch Metaplasie in Knochengewebe, worauf dann später Apposition weiterer Knochen-schichten vor sich geht. Auf diese Weise wird ein kleiner transplan- tierter Knochenspan von einer breiten Zone neugebildeten Knochens umgeben. Letzterer kann auch in einiger Entfernung vom Transplantat auftreten.

4. Der Charakter des neugebildeten Knochens ist verschieden, je nach den lokalen mechanischen Bedingungen im Transplantat. An der äußeren, konvexen Oberfläche der Knochenspäne bilden sich aus den Zellen des Granulationsgewebes und des transplantierten Periosts Osteoblasten, die dichten, lamellär gebauten Knochen erzeugen. An der konkaven, inneren Oberfläche der Knochenspäne ist das Gewebe viel lockerer, und hier entsteht spongiöser Knochen.

5. In vitro wird vom Periost kein Knochen erzeugt; es wuchert nur als gewöhnliches Bindegewebe und seine Zellen erzeugen typische Fibroblastenkolonien.

6. Da die transplantierten Knochenspäne von einem reichlichen gefäßreichen Bindegewebe umhüllt werden, welches besonders an der konkaven Oberfläche sehr rasch Knochengewebe erzeugt, scheint

es besonders zweckmäßig zu sein, bei Ausfüllung von Knochenlücken möglichst zahlreiche und feine Knochenspäne, am besten mit Periost, anzuwenden. Dies Verfahren wäre besonders in den Fällen angezeigt, wo keine sofortige Knochenstütze notwendig erscheint, so z. B. bei Pseudarthrosen, Knochenhöhlen usw.

### Literaturverzeichnis.

- <sup>1)</sup> *Axhausen*, Histologische Untersuchungen über Knochentransplantation am Menschen. Dtsch. Zeitschr. f. Chirurg. **91**. 1907. — <sup>2)</sup> *Axhausen*, Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der Lehre von der freien Knochentransplantation beim Menschen und beim Tier. Med. Klinik 1908, II. Beiheft. — <sup>3)</sup> *Axhausen*, Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik auf Grund von Tierversuchen. Arch. f. klin. Chirurg. **88**. 1908. — <sup>4)</sup> *Baitsell*, The origin and structure of a fibrous tissue, which appears in living cultures of adult frog tissues. Journ. of exp. med. **21**. 1915. — <sup>5)</sup> *Barth*, Zur Frage der Vitalität replantierter Knochenstücke. Berl. klin. Wochenschr. 1894, Nr. 14. — <sup>6)</sup> *Barth*, Über Osteoplastik in histologischer Beziehung. Arch. f. klin. Chirurg. **48**. 1894. — <sup>7)</sup> *Barth*, Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen. Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **17**. 1895. — <sup>8)</sup> *Baschkirtzew* und *Petrow*, Beiträge zur freien Knochenüberpflanzung. Dtsch. Zeitschr. f. Chirurg. **113**. 1912. — <sup>9)</sup> *Dobrowolsky*, Über Knochenregeneration in Verbindung mit Knochenexplantation. Russki Wratsch 1916. (Russisch.) — <sup>10)</sup> *Fischöder*, Das Schicksal replantierter Knochenstücke vom histologischen Gesichtspunkt aus betrachtet. Arch. f. klin. Chirurg. **56**. 1899. — <sup>11)</sup> *Foot, N. C.*, Über das Wachstum von Knochenmark in vitro usw. Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **53**. 1912. — <sup>12)</sup> *Grekow*, Über Knochendefekte und ihre Behandlung. Inaug.-Diss. St. Petersburg 1901. (Russisch). — <sup>13)</sup> *Macklin, C. C.*, The development and function of macrophages in the repair of experimental bone-wounds in rats vitally stained with Trypan-blue. Contributions to Embryology, Carnegie Institution of Washington **9**, Nr. 27. 1919. — <sup>14)</sup> *Maximow, A.*, Über zweckmäßige Methoden für cytologische und histogenetische Untersuchungen usw. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie **26**. 1909. — <sup>15)</sup> *Maximow, A.*, The cultivation of connective tissue of adult mammals in vitro. Arch. Russes d'Anatomie, d'histologie et d'embryologie **1**. 1916. — <sup>16)</sup> *Maximow, A.*, Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. VII. Über „in vitro“-Kulturen von lymphoidem Gewebe des erwachsenen Säugetierorganismus. Arch. f. mikroskop. Anat. **96**. 1922. — <sup>17)</sup> *Mayer* und *Wehner*, Neue Versuche zur Frage der Bedeutung der einzelnen Komponenten des Knochengewebes bei der Regeneration und Transplantation von Knochen. Arch. f. klin. Chirurg. **103**, H. 3. — <sup>18)</sup> *Möller*, Über histologische Vorgänge bei Knochenimplantation. Inaug.-Diss. Halle 1895. — <sup>19)</sup> *Nemilow*, Die freie Knochentransplantation. Chirurgitscheskij Arch. 1912. (Russisch.) — <sup>20)</sup> *Petrow, N.*, Die freie Knochenplastik. Chirurgitscheskij Arch. 1917. (Russisch.) — <sup>21)</sup> *Policard*, Les phénomènes biologiques généraux de l'évolution des transplants osseux. Lyon chirurg. 1922. — <sup>22)</sup> *Samoilenko*, Über das Endost. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **211**. 1913. — <sup>23)</sup> *Schmitt*, Arch. f. klin. Chirurg. **45**. 1893. — <sup>24)</sup> *Simon*, Recherches sur la destinée des transplants osseux chez la souris. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 1377. 1922. — <sup>25)</sup> *Simon, R.*, Conditions de la survie des greffons d'os adulte dans les parties molles. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **88**, 442. 1923. — <sup>26)</sup> *Simon, R.*, Conditions et sources de la régénération des greffons d'os adulte dans les parties molles. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **88**, 443. 1923.