

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin (Leiter: Prof. Dr. W. SCHWARZ), aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Städtischen Krankenhauses Berlin-Moabit (Prof. Dr. H. BARTELHEIMER) und aus der Physiologischen Anstalt der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. M. H. FISCHER)

Über histologisch und mikrodensometrisch nachweisbare postmortale Veränderungen der Knochengrundsubstanz

Von

NORBERT DETTMER, JOACHIM MAXIMILIAN SCHMITT-ROHDE
und FRANZ-JOSEPH HABERICH

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Oktober 1955)

Einleitung

Postmortale Veränderungen sind überall dort groß, wo bereits während des Lebens Stoffwechsel- und Fermentaktivität hoch sind. Mit ihnen wird daher seit langer Zeit zum Beispiel bei parenchymatösen Organen gerechnet, was grundsätzlich bei der Auswertung von Sektionsmaterial auch berücksichtigt wird. Man denke nur an die vorsichtige Bewertung von Befunden, die am Magen-Darmsystem gewonnen wurden und bei denen die autolytischen Erscheinungen besonders in den Vordergrund treten. Daß die stoffwechselärmeren Gewebsanteile in den Zerfallsvorgang mit einbezogen werden, liegt zwar auf der Hand, es ist aber oft nicht leicht, dies auch im histologischen Präparat zu erfassen. Das gilt insbesondere für festgefügte Intercellularsubstanzen wie die des Knorpels oder Knochens, von denen man weiß, daß sie am Stoffwechsel nur einen geringen Anteil haben. Sie sind daher bei der Betrachtung postmortaler Veränderungen oft ein wenig zu kurz gekommen.

Bei unseren Untersuchungen an der Intercellularsubstanz des Knochens gingen wir von folgenden Erwägungen aus: BARTELHEIMER entwickelte eine Punktionsnadel, mit der auf seine Anregung SCHMITT-ROHDE Knochenpunktionen an Lebenden und Verstorbenen durchführte. Eine solche Methode hat nur dann einen Sinn, wenn das gewonnene Material histologisch ausgewertet werden kann, wobei auch feinste Veränderungen der Intercellularsubstanz erfaßt werden müssen. Die Untersuchung der postmortalen Veränderungen scheint uns ein Wertmesser für die von uns angewendete Methodik. Gleichzeitig sollte sie eine Basis für die nutzbringende Auswertung pathologischer Knochenanteile schaffen.

Erfolgversprechend wurde dieser methodische Weg zur Beurteilung normalen und pathologischen Knochens erst durch die in den letzten

Jahren gewonnenen Erkenntnisse über den Aufbau der Intercellularsubstanzen, die wir auch zum Verständnis der postmortalen Veränderungen werden heranziehen müssen.

Diese Erkenntnisse sind einmal der makromolekularen Chemie zu verdanken, zum anderen der Elektronenmikroskopie, die es erlaubt, nun auch im submikroskopischen Bereich zu konkreten morphologischen Aussagen zu kommen. K. MEYER u. a. haben mit chemischen Methoden einen bis dahin vernachlässigten Bestandteil der Intercellularsubstanzen erfaßt und analysiert: die Polysaccharide. Seitdem hat sich immer wieder gezeigt, welche wichtige Rolle diese Substanzen in den Geweben spielen, es sei hier nur an die vielfältigen Wirkungen der Hyaluronidase erinnert. Es war und ist Aufgabe der Elektronenmikroskopie, auch im morphologischen Bereich die chemischen Erkenntnisse der letzten Zeit zu erfassen und auszuwerten. Oft erlauben elektronenmikroskopische Ergebnisse sozusagen eine Rückprojektion auf die Histologie und können den Ausfall dieser oder jener Färbung erklären, deren Resultat sonst schwierig zu deuten wäre.

Nach elektronenoptischen Untersuchungen besteht eine Intercellularsubstanz des Binde- und Stützgewebes, also auch die des Knochens, immer aus Fibrillen und einer zwischen ihnen liegenden amorphen oder feingranulierten Matrix oder Kittsubstanz. Lichtmikroskopisch sichtbare Fasern setzen sich ebenfalls aus Fibrillen und Kittsubstanz zusammen, gleichgültig, ob es sich dabei um reticuläres, kollagenes oder Stützsubstanzgewebe handelt. Beim Knochen sind die Kollagenfibrillen in eine dichtgepackte amorphe Matrix eingelagert. In dieser Kittsubstanz befindet sich der Kalk in Form kleiner Apatiteinheiten, die Fibrillen selbst lagern keinen Kalk ein (ROBINSON, SCHWARZ und PAHLKE). Die zwischen den Fibrillen liegende Matrix ist aber auch der Träger des Polysaccharidanteils des Knochens, von dem neuere Untersuchungen ergeben haben, daß er für die Kalkfängereigenschaft der Intercellularsubstanz von großer Bedeutung ist (HOWARD).

Wenn wir nun an Hand histologischer Befunde zu Aussagen über Beschaffenheit und Veränderungen der Knochenintercellularsubstanz gelangen wollen, ist es daher am aussichtsreichsten, die Polysaccharidkomponente des Knochens möglichst weitgehend zu erfassen. Wir haben uns deshalb in der vorliegenden Arbeit in der Hauptsache solcher *Kohlenhydratnachweismethoden* bedient, um zu Rückschlüssen nicht nur für die Veränderungen *nach dem Tode*, sondern auch für *pathologisch* veränderten Knochen zu gelangen.

Material und Methoden

Mit der Punktionsmethode (Technik siehe bei SCHMITT-ROHDE) wurden Knochenzylinder aus dem Beckenkamm von Patienten und Verstorbenen ausgestanzt. Auch gelang es in einigen Fällen, Material von Verstorbenen kurz nach ihrem

Tode zu gewinnen, die bereits während ihres Lebens punktiert waren, so daß Knochenzylinder ein und desselben Patienten vor und nach seinem Tode zur Verfügung standen. Außerdem wurde durch Amputation gewonnener Tibiaknochen sofort nach der Amputation und dann in kurzen Abständen bis zu einer Zeit von 25 Std nach der Amputation punktiert.

Die so gewonnenen Knochenzylinder wurden sofort nach der Entnahme in Formalin fixiert, mit Ameisensäure oder elektrolytisch entkalkt, in Paraffin eingebettet und etwa 8μ geschnitten. Die entparaffinierten Schnitte wurden wie folgt gefärbt: Hämatoxylin-Eosin, Azan, Perjodsäure-Leukofuchsin-Technik nach HOTCHKISS, Perjodsäure-Versilberung nach DETTMER und SCHWARZ, und mit verdünntem Toluidinblau.

Die zum Vergleich herangezogenen Präparate wurden jeweils in einem Arbeitsgang mitgefärbt, um technische Unsicherheitsfaktoren auszuschließen.

Außerdem wurde eine optische Methode zur Messung der Ultrastrukturdichte eines Objektes herangezogen, deren Technik und apparativer Aufbau an anderer Stelle genau beschrieben sind (HABERICH, DETTMER und SCHMITT-ROHDE). Sie beruht auf einer Absorptionsmessung gefärbter Strukturen, wobei die Geschwindigkeit der Farbstoffeinlagerung als Kriterium für die Beschaffenheit der intermicellaren Räume dient. Die Messung erfolgte mit einem Sekundärelektronen-Vervielfacher.

Befunde

Bei der Entwicklung der Punktionsmethode wurden seinerzeit auch Punktionen an der Leiche durchgeführt, um für die einleitenden histologischen Untersuchungen Material zu gewinnen. Dabei fiel auf, daß ganz allgemein eine Knochenpunktion am Lebenden viel leichter durchzuführen ist als an der Leiche. Während nämlich der lebende Knochen eine gewisse Elastizität besitzt, die das Eindringen der Punktionskanüle erleichtert, ist der Knochen bei der Leiche spröde, glashart und ohne Elastizität. Es kam sogar vor, daß bei der Punktion an der Leiche die Kanüle brach, was bei der Lebendpunktion praktisch gar nicht denkbar ist. Dieser Konsistenzunterschied des Knochens macht sich bereits eine Stunde nach dem Tode bei der Punktion bemerkbar.

Wir gingen nun der Frage nach, ob und inwieweit diese postmortale Veränderung des Knochens mit den histologischen Methoden nachweisbar ist, die wir zur Diagnose von Osteopathien mit heranzuziehen gedachten. Dabei ergab sich folgendes:

Die Färbung des ante und post mortem gewonnenen Knochens ergab keinen Unterschied bei der *Hämatoxylin*-Eosinfärbung.

Anders das Ergebnis der *Azan*färbung. Hier färben sich die Corticalis und die Bälkchen des lebend punktierten Knochens gleichmäßig rot, während das Periost und die kollagenen Anteile zwischen den Bälkchen blauen Farbstoff einlagern. Die osteoiden Säume färben sich ebenfalls blau. Dies Verhalten war bei allen unseren Objekten festzustellen, auch bei den Amputationspräparaten, bei denen der direkt nach der Amputation entnommene Knochen das gleiche Bild zeigt wie der lebend punktierte Knochen (Abb. 1). Nach dem Tode ändert der

Knochen sein färberisches Verhalten bei Anwendung der Azantechnik. Mit steigender Zeit nach dem Tode findet man mehr und mehr blau gefärbte Regionen in der Knochengrundsubstanz, die Rotfärbung blaßt ab, die Bälkchen gewinnen mehr und mehr ein fleckiges Aussehen. Die Tendenz der Grundsubstanz, fleckenweise statt des roten Farbstoffes den blauen anzunehmen, ist bei manchen Präparaten schon eine Stunde nach dem Tode wahrnehmbar, einige Stunden nach dem Tode ist sie deutlich ausgeprägt (Abb. 2).

Zum Verständnis dieser Befunde haben wir die Ergebnisse von SEKI und Mitarbeitern herangezogen, die den Mechanismus der Azan-



Abb. 1. Tibiaknochen, sofort nach der Amputation fixiert. Azanfärbung. Phasenkontrast. 75:1¹

färbung betreffen. Danach wird zunächst mit einem Farbstoff (Azocarmin) gefärbt, der eine kleine Teilchengröße besitzt und daher auch in relativ kleine intermicellare Räume hineindiffundiert (siehe auch die Arbeiten von OHKURA). Bei der für die Azanfärbung vorgeschriebenen „Differenzierung“ in Alkohol wird dieser rote Farbstoff aus dem Präparat wieder herausgezogen, was um so schneller geschieht, je größer die intermicellaren Räume der angefärbten Struktur sind. In den kleineren wird er am besten festgehalten. Nach der „Differenzierung“ färbt man nun mit Anilinblau, dessen Teilchen wesentlich größer sind als die des Azocarmins. Dieser Farbstoff dringt nun in die größeren Intermicellarräume ein und färbt die Regionen mit lockerem Gefüge blau. Der Unterschied in der Größe der intermicellaren Räume wird von SEKI mit dem Begriff der *Ultrastrukturdichte* erfaßt. Sie ist um so geringer, je größer die intermicellaren Räume sind.

¹ Sämtliche Abbildungen stammen von einem Amputationspräparat. Ante und post mortem gewonnene Knochenpräparate knochengesunder Patienten zeigen das gleiche färberische Verhalten.

Wenn nun unsere Knochenpräparate, die am Lebenden gewonnen wurden, eine gleichmäßig starke Rotfärbung zeigen, läßt dies auf eine relativ hohe Dichte der Knochengrundsubstanz schließen. Da nach dem Tode die Tendenz des Knochens, sich blau zu färben, größer wird, und schließlich die meisten Anteile eines Bälkchens und auch der Corticalis blau erscheinen, müssen wir annehmen, daß die Ultrastrukturdichte des Knochens nach dem Tode abnimmt, ein Vorgang, der schon eine Stunde nach dem Tode zu verzeichnen ist.

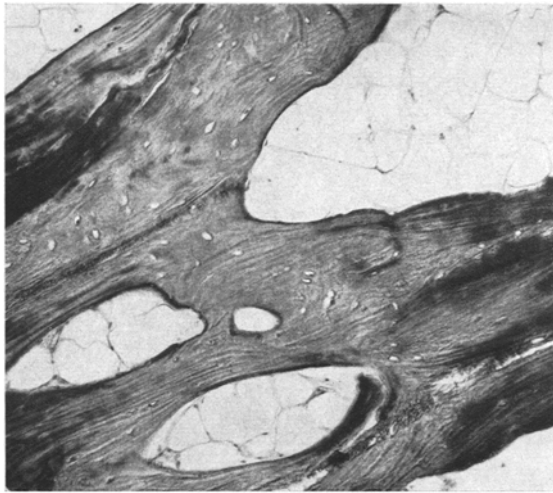


Abb. 2. Tibiaknochen, 4 Std nach der Amputation fixiert, Azanfärbung, Phasenkontrast, 75:1. Man beachte die Aufhellungen im Knochenbälkchen, die im Präparat blau gefärbt sind

Die Blaufärbung der osteoiden Säume auch beim lebend punktierten Knochen würde bedeuten, daß hier die Dichte nicht so hoch ist wie in der fertigen Knochengrundsubstanz, ein Befund, der sich mit anderen über das Osteoid bekannten Tatsachen deckt.

An dieser Stelle müssen wir eine Schwierigkeit bei der Bewertung der Azanbefunde am Knochen anführen. Es gelingt kaum, vollkommen gleichmäßig dicke Schnitte durch einen Knochenzylinder anzufertigen, da innerhalb des Zylinders ja erhebliche Konsistenzunterschiede zwischen Bälkchen und Markräumen auftreten, die das Messer überwinden muß. Bei Knochenbälkchen, die keilförmig angeschnitten waren, stellten sich die dünneren Partien blau dar, auch wenn sonst das Bälkchen eine gleichmäßig rote Farbe zeigt. Dieser Befund ist leicht zu erklären, wenn man bedenkt, daß aus den dünneren Anteilen der Struktur während der „Differenzierung“ der Farbstoff schneller herausdiffundiert.

Durch die „Differenzierung“ kommt also eine gewisse subjektive Komponente in die Azanfärbung. Man kann aber derartige Stellen leicht erkennen und aus der Betrachtung ausschließen.

Trotzdem haben wir nach einer Methode gesucht, die einen Dichteverlust registriert, ohne daß die Dicke der Objekte eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wendeten wir die oben angegebene Lichtmeßmethode an. Dabei gingen wir von der Voraussetzung aus, daß die Diffusionsbedingungen für einen Farbstoff mit kleiner Teilchengröße in ein histologisches Präparat hinein um so günstiger sind, je größer die intermicellaren Räume des betreffenden Objektes sind. Wenn man die Farbstoffeinlagerung an einem Objektpunkt unter dem Mikroskop in

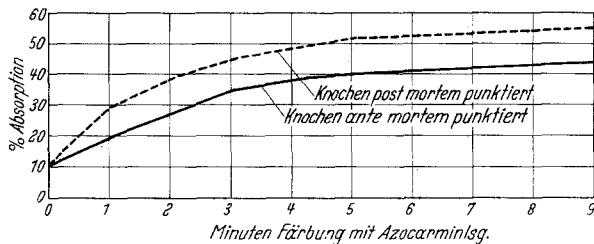


Abb. 3. Mikrodensometrische Kurve von ante und post mortem am selben Patienten gewonnenen Knochen. Auf der Abszisse aufgetragen die Zeit in Minuten, während der eine Azocarminlösung einwirkt, auf der Ordinate die Lichtabsorption in Prozenten. Beachte die Zunahme des Kurvenanstiegs nach dem Tode

Abhängigkeit von der Zeit mißt, wird ein größerer Anstieg der Lichtabsorptionswerte bei dem Präparat mit der geringeren Dichte zu verzeichnen sein, denn hier ist der Farbstoff in größerer Menge eindiffundiert und absorbiert mehr Licht, als es in der gleichen Zeit bei einem Objektpunkt mit kleineren Intermicellarräumen der Fall wäre. Mit anderen Worten ist der Anstieg der Absorptionswerte in der Zeit ein Maß für die Ultrastrukturdicke eines Objektes, beides ist umgekehrt proportional. Die Anwendung dieser Methode an unserem Material ergibt Resultate, die nicht nur mit den bei Azanfärbung gewonnenen übereinstimmen, sondern darüber hinaus noch eine wesentlich genauere Bestimmung des Dichteverlustes toten Knochens zulassen. Dieser nimmt im Laufe der ersten eineinhalb Stunden nach dem Tode erheblich zu, um sich dann langsam einem Grenzwert zu nähern. Der Unterschied zwischen ante und post mortem gewonnenem Knochen ist in der Abb. 3 dargestellt.

Sowohl mit der Azanfärbung als auch mit der mikrodensometrischen Methode ist also ein Dichteverlust des Knochens nach dem Tode feststellbar. Es war jetzt die Frage zu klären, ob es histologisch möglich ist, Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, worauf dieser Dichteverlust

beruht. Es lag nahe, ihn mit einer Alteration der Glykoproteid- bzw. Mucopolysaccharidkomponente in Zusammenhang zu bringen, die für den Knochen eine bedeutende Rolle spielt. Wir haben daher unsere Präparate nach der von HOTCHKISS angegebenen Technik gefärbt. Sie gibt in gewisser Weise Aufschluß über die Beschaffenheit der Kohlenhydratkomponente innerhalb der organischen Intercellularsubstanz des Knochens. Durch Perjodsäure werden dabei zunächst 1,2-Glykolgruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxydiert und diese dann mit SCHIFFSchem Reagens (fuchsin-schwefliger Säure) erfaßt (nähere Angaben siehe bei GEDIGK). Das Vorhandensein aktiver Gruppen im Gewebe macht sich durch eine mehr oder weniger ausgeprägte Rosafärbung bemerkbar. Der Ausfall dieser Reaktion ist aber nicht nur von der Menge der vorhandenen Polysaccharide abhängig, sondern auch von deren Polymerisationsgrad. Mit einer einsetzenden Depolymerisation der Kohlenhydrate nimmt nach LILLIE die Färbung zu, da dann mehr Gruppen frei werden, die in die Aldehydstufe überführt und erfaßt werden können.

Am Knochen kann man nach dem Tode zum Teil eine schwache Zunahme der Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion feststellen, die aber nur flüchtig ist und dann in eine langsame Abnahme im Vergleich zu lebend punktiertem Knochen übergeht. Dieser Befund läßt auf eine Depolymerisation des Polysaccharidanteils im Knochen schließen, die bald nach dem Tode einsetzt. Offenbar geht dieser Abbau wenigstens zum Teil bis zur Bildung löslicher Moleküle vor sich, die dann entweder schon vor der Entnahme oder während der histologischen Aufarbeitung aus dem Knochen hinausdiffundieren, was die Abnahme der Rosafärbung erklären würde.

Eine zweite Methode erlaubt es, diese Annahme zu festigen. Nach HOLMGREN und WILANDER färben sich nämlich mit verdünntem Toluidinblau hochpolymere, mit Schwefelsäure veresterte Polysaccharide metachromatisch rot an. Diese Metachromasie geht bei einer Depolymerisation der Kohlenhydratanteile verloren. Der vor dem Tode entnommene Knochen färbt sich mit Toluidinblau kräftig metachromatisch, bald nach dem Tode verschwindet aber die Metachromasie. Auch hieraus geht hervor, daß ein wesentlicher Bestandteil der Intercellularsubstanz des Knochens, nämlich die Polysaccharide bzw. deren Verbindungen mit Eiweiß, bald nach dem Tode erheblichen, histologisch faßbaren Veränderungen unterliegt.

Von DETTMER und SCHWARZ wurde eine Kombination von Perjodsäureoxydation und anschließender Silberreduktion durch die neu gebildeten Aldehydgruppen angegeben. Bei dieser Methode ist also das SCHIFFSche Reagens durch eine Silberlösung ersetzt. Mit ihr gelang

die elektronenmikroskopische Erfassung perjodsäureaktiver Substanzen, bei der Leukofuchsin nicht in Frage kommt. Darüber hinaus ist aber der mehr oder weniger kräftige, von gelb über braun bis schwarz variierende

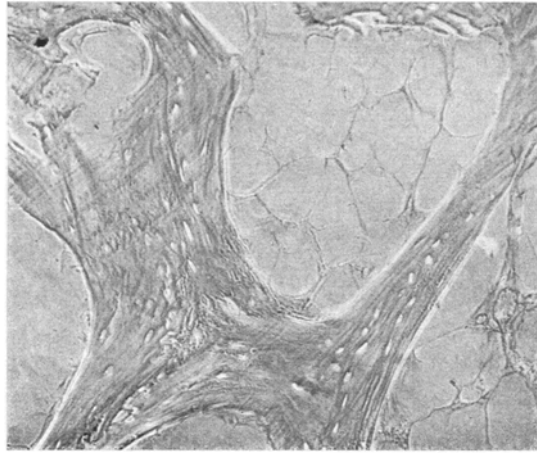


Abb. 4. Tibiaknochen, sofort nach der Amputation fixiert. Versilbert. Phasenkontrast, 75:1

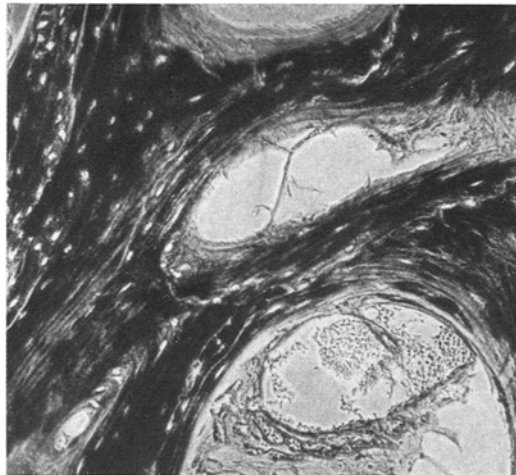


Abb. 5. Tibiaknochen, 22 Std nach der Amputation fixiert. Versilbert. Phasenkontrast. 75:1

Farbton bei Anwendung dieser Methode mikrophotographisch leichter darstellbar als feine Abstufungen des Farbtones rosa. Wir haben daher diese Technik für die Auswertung unserer Befunde mit herangezogen.

Während ante mortem oder 10 min nach der Amputation gewonnener Knochen nur eine äußerst schwache, kaum wahrnehmbare Reaktion zeigt (Abb. 4), nimmt der Silbergehalt mit steigender Zeit nach dem Tode bzw. nach der Amputation stark zu. Das Präparat eines Knochens, der 25 Std nach Amputation entnommen wurde, zeigt eine überaus kräftige Braunfärbung der Bälkchen und der Corticalis. Diese Färbung ist nicht gleichmäßig über die gesamte Knochengrundsubstanz verteilt, sondern fleckig, ähnlich wie bei der Azanfärbung (Abb. 5).

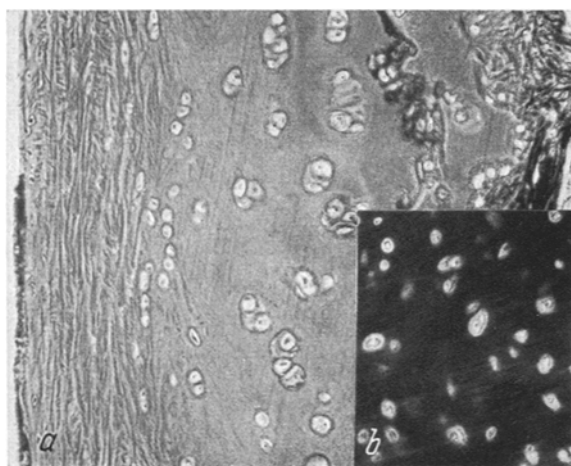


Abb. 6a u. b. a Gelenkknorpel, Kniegelenk, 25,5 Std nach der Amputation. b Derselbe Knorpel, sofort nach der Amputation fixiert. Azanfärbung. Phasenkontrast. 75:1

Der Unterschied zwischen Abb. 4 und Abb. 5 ist sehr ausgeprägt, größer als der Ausfall der anderen Färbungen an den gleichen Präparaten vermuten ließ. Das liegt unseres Erachtens nicht nur an der vergleichsweise kräftigeren Tönung des Präparates durch das Silber, sondern auch noch daran, daß sich mit abnehmender Dichte des Präparates die Diffusionsbedingungen für die eindringende Silberlösung verbessern. Dadurch ist ein größeres Anwachsen der gebildeten Silberkeime möglich, als es in einer Struktur mit größerer Dichte in gleicher Zeit der Fall wäre. Der durch die Vermehrung der aktiven Gruppen bedingte Unterschied zwischen ante und post mortem gewonnenen Knochen wird bei dieser Färbung also noch dadurch etwas vergrößert, daß zugleich eine Abnahme der Dichte nach dem Tode stattfindet, die schon als solche die Versilberung verstärkt. Auf diesen Umstand, der gerade bei Hartsubstanzen eine Rolle spielt, hat schon HOFMANN hingewiesen, der am Dentin ähnliche Beobachtungen machte.

Eine wertvolle Ergänzung unserer am Knochen gewonnenen Befunde ergab sich bei der Untersuchung zufällig mitpunktierten Gelenkknorpels bei unseren Amputationspräparaten. Die für den Knochen beschriebenen Veränderungen nach dem Tode bzw. Amputation treten hier ebenfalls auf. Sie sind beim Knorpel vielleicht noch ausgeprägter, auch tritt die Veränderung nicht in fleckigen Regionen auf, sondern ist gleichmäßig über den ganzen Knorpel verteilt.

So ist der Gelenkknorpel (Kniegelenk) direkt nach der Amputation mit Azan rot gefärbt, nach 25 Std zeigt er eine klare Blaufärbung (Abb. 6a und b). Die Metachromasie nach Toluidinblaufärbung, die für den Knorpel sonst so charakteristisch ist, verschwindet kurze Zeit nach der Amputation völlig, nach Versilberung zeigt der Knorpel zunächst einen gelbbraunen Ton, der dann allmählich in schwarz übergeht.

Die Abb. 6a und b lassen darüber hinaus erkennen, daß die licht-optisch homogene hyaline Substanz zwischen den Knorpelzellen nach dem Tode eine faserige Struktur zeigt, was besonders nach Phasenkontrastphotographie ins Auge fällt. Auch hier ist also ein Teil der die Fibrillen und Fasern im Knorpel maskierenden amorphen Kittsubstanz verschwunden, auch hier ist nach dem Ausfall der verschiedenen Färbungen festzustellen, daß es sich dabei mindestens zum Teil um die Polysaccharidkomponente der Kittsubstanz handeln muß, die beim Knorpel aus Chondroitinsulfat besteht (K. MEYER).

Diskussion

Alle von uns angewendeten Methoden lassen eins klar erkennen: Sowohl beim Knochen als auch beim Knorpel ist kurz nach dem Tode eine erhebliche Veränderung der Polysaccharidkomponente festzustellen. Während die Azanfärbung und die mikrodensometrische Methode nur einen Verlust der Ultrastrukturdichte registrieren können, gelingt mit den anderen Methoden der Nachweis, daß der Verlust organischer Matrix nach dem Tode mindestens zum Teil auf Depolymerisation bzw. Abtransport der Kohlenhydratkomponente zurückzuführen ist. Sie liegt normalerweise in beiden Geweben in hochpolymerer Form vor, was die Metachromasie nach Toluidinblaufärbung sowie den positiven Ausfall der Leukofuchsinreaktion erklärt. Ob das Verschwinden der Metachromasie kurz nach dem Tode bzw. der Amputation *allein* auf eine Depolymerisation der Polysaccharide zurückgeführt werden kann, ist eine noch offene Frage. Nach den Ergebnissen von WALTON und RICKETTS spielt für den Ausfall der Metachromasie neben dem Polymerisationsgrad noch die Konzentration der Polysaccharide, die Anzahl saurer Gruppen und die Bindung des Substrates an Protein eine Rolle. Obwohl die Dichteabnahme in unseren Präparaten im Verein mit dem

Ausfall der Polysaccharidnachweismethoden im wesentlichen für eine Depolymerisation des Polysaccharidanteils zu sprechen scheinen, sind Untersuchungen im Gange, die klären sollen, ob lediglich die Aufschlagung der Polysaccharid-Proteinbindung zu einem von uns konstatierten Dichteverlust führen kann. Da die Moleküllänge der in Frage kommenden Polysaccharide mit etwa 5000 AE angegeben wird (BLIX), ist es aber unwahrscheinlich, daß lediglich durch Aufschlagen der Proteinbindung die Polysaccharide aus einem festgefügtten Micellarverband der Kittsubstanzen hinausdiffundieren können.

Schwierig ist die Frage nach dem Grund des Verschwindens der Kohlenhydratkomponente so kurze Zeit nach dem Tode zu erklären. Vielleicht ist er in der hydrolytischen Wirkung zu suchen, die von der nach dem Tode schnell einsetzenden Übersäuerung der Gewebe ausgeübt wird. Diese Hydrolyse könnte eine Spaltung der Polysaccharide bis zu löslichen Formen bedingen. Dieser Ansicht steht allerdings die Tatsache entgegen, daß ja nach der Entnahme die Zylinder durch Säure entkalkt werden. Diese Säurewirkung, die noch dazu über 24 Std andauert, müßte größer sein als die Übersäuerung während zweier Stunden nach dem Tode. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß SZURAU an Zahnmaterial einen Artefakt der Entkalkung festgestellt hat, der sich nur auf die Randbezirke des — übrigens wesentlich länger entkalkten — Materials bezieht. Sie stellte fest, daß der Randbezirk ihrer Objekte nach der Entkalkung infolge der Säurewirkung einen Dichteverlust und eine Depolymerisation des Polysaccharidanteils aufweist. Dieser sog. „Randeffekt“ kann aber zur Erklärung unserer Befunde nicht herangezogen werden, weil die von uns festgestellten Veränderungen sich auf die *gesamte* Intercellularsubstanz und nicht nur auf deren Ränder bezieht. Zudem kann ein *Unterschied* nur dann auftreten, wenn er schon vor der Entkalkung zumindest präformiert war, gleiche Oberflächenbedingungen für die Säurewirkung vorausgesetzt (siehe auch HOFMANN). Das Verschwinden des Polysaccharidanteils im toten Knochen dürfte also nicht auf die Entkalkung zurückzuführen sein — im lebend punktierten und anschließend entkalkten Knochen verschwindet er ja auch nicht. Die Übersäuerung nach dem Tode allein dürfte aber auch nicht entscheidend sein, da sie ohne Zweifel viel schwächer ist als die bei der Entkalkung einwirkende Säure. Vielleicht kann man annehmen, daß nach dem Tode die Aktivität gewisser Fermente vom Typ der Hyaluronidase gesteigert wird, unter Umständen begünstigt durch die postmortale Gewebsübersäuerung.

Wenn wir auch weit davon entfernt sind, die Gründe für einen Verlust der Polysaccharidkomponente in der Intercellularsubstanz des Knochens und Knorpels so kurze Zeit nach dem Tode definieren zu

können, stimmt doch eins sehr nachdenklich: Wenn der Ausfall einer so häufig angewendeten Färbung wie der Azanfärbung sich schon innerhalb von 2 Std nach dem Tode ändert, welchen Rückschluß auf das lebende Gewebe oder auch nur auf die Intercellularsubstanz in ihrer Beschaffenheit während des Lebens läßt dann ein azangefärbtes Präparat zu, das erst 24 Std nach dem Tode entnommen worden ist? Gewiß, man erhält ein Äquivalentbild, das mit ähnlich gewonnenen Präparaten vergleichbar ist. Man kann die Form der Bälkchen und Form und Menge der osteoiden Säume beurteilen. Eine feinere Beurteilung der Beschaffenheit der Intercellularsubstanzen ist an solchen Präparaten nach unseren Befunden aber nicht möglich, da der gesunde, lebend punktierte Knochen sich von einem nur wenige Stunden post mortem gewonnenen Knochen wesentlich unterscheidet. Sektionsmaterial dürfte also als vergleichende Basis für die durch Punktion am Lebenden gewonnenen Knochenzylinder nicht herangezogen werden können. Dies beweisen auch Beispiele pathologisch veränderter Knochen. Bei manchen Formen der Osteopathien ist nämlich bereits am lebend punktierten Knochen eine Verminderung bzw. Alteration der Kohlenhydratkomponente festzustellen. Wenn man nun aber das Material erst 24 Std nach dem Tode entnimmt, ist nicht zu entscheiden, ob die betreffenden Veränderungen in der Beschaffenheit der Intercellularsubstanz schon während des Lebens bestanden haben oder eine Folge postmortaler Vorgänge sind. Die Klinik wird also darauf angewiesen sein, ihr Vergleichsmaterial ebenfalls durch die Punktionsmethode zu gewinnen (siehe auch SCHMITT-ROHDE, DETTMER und HABERICH).

Zusammenfassung

Mit Hilfe verschiedener Färbemethoden und einer mikrodensometrischen Methode wird nachgewiesen, daß die Intercellularsubstanz von Knorpel und Knochen nach dem Tode einen Dichteverlust erfährt, der auf die Depolymerisation des Polysaccharidanteils in beiden Geweben zurückgeführt wird. Während der ersten $1\frac{1}{2}$ Std nach dem Tode ist die Abnahme der Dichte am größten und nähert sich dann einem Grenzwert. Für die Beurteilung der Knochenintercellularsubstanz von Präparaten, die am Patienten gewonnen werden, wird daher Sektionsmaterial als Vergleichsobjekt abgelehnt.

Literatur

BLIX, G.: Acta physiol. scand. (Stockh.) 1, 29 (1940). — DETTMER, N., u. W. SCHWARZ: Z. Mikrosk. 61, 423 (1953). — GEDIGK, P.: Klin. Wschr. 1952, 1057. — HABERICH, F. J., N. DETTMER u. J. M. SCHMITT-ROHDE: (Im Druck.) — HOFMANN, M.: Z. Zellforsch. 43, 82—96 (1955). — HOLMGREN, H., u. O. WILANDER:

Z. mikrosk.-anat. Forsch. **42**, 242 (1937). — HOTCHKISS, R. D.: Arch. of Biochem. **16**, 131 (1948). — HOWARD, J. E.: Bull. New York Acad. Med. **27**, 24 (1951). — LILLIE, R. D.: Stain Technol. **26**, 123 (1951). — MEYER, K.: Beitr. in: „Connective Tissue in Health and Disease“ Herausgeg. von ASBOE-HANSEN. Copenhagen: Munksgaard 1954. — OHKURA, T.: Arch. Hist. Jap. **4**, 281 (1952). — OHKURA, T., and Y. KOYAMA: Arch. Hist. Jap. **1**, 379 (1950). — ROBINSON, R. A.: J. Bone Surg. **34A**, 389 (1952). — SCHMITT-ROHDE, J. M.: Ver. dtsh. Ges. inn. Med. **1954**, 929. — SCHMITT-ROHDE, J. M., N. DETTMER u. F. J. HABERICH: Ärztl. Wschr. (im Druck). — SCHWARZ, W., u. G. PAHLKE: Z. Zellforsch. **38**, 475 (1953). — SEKI, M.: Z. Zellforsch. **29**, 553 (1939). — SZURAU, J.: Über eine neue Schnittmethode für Zahnpräparate nebst einigen Bemerkungen über Entkalkungsartefakte. Med. Diss. Freie Univ. Berlin 1955. — WALTON, K. W., and C. R. RICKETTS: Brit. J. Exper. Path. **35**, 227 (1954).

Dr. N. DETTMER, Berlin-Dahlem,
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität
