

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend (Direktor: Prof. Dr. med. H. BARTELHEIMER)

Färberische und mikrodensometrische Untersuchungen über die Ultrastrukturdichte der Knochengrundsubstanz

Von

KLAUS LORENTZ

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. September 1957)

Aus den Arbeiten von SCHMITT-ROHDE¹⁷ sowie von DETTMER, SCHMITT-ROHDE und HABERICH⁵ geht hervor, daß der Knochen postmortal insbesondere in seinem anorganischen Anteil verändert wird. Die Biopsie ist daher für die Beurteilung der Ultrastrukturen dem postmortal entnommenen Knochenmaterial überlegen. Die nachstehende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung sich hierbei ergebender Probleme leisten.

Material und Methoden. Es wurden von 23 Personen intravital und 15—20 Std post mortem Punktionen des Beckenkammes nach der Methode von BARTELHEIMER³ vorgenommen, so daß man von jedem Individuum zwei Knochenzylinder erhielt.

Es handelte sich um Patienten in verschiedenen Altersstufen, die in altersgemäßem gesundheitlichen Zustand an Unfällen, Infarkten, Apoplexien und Suiciden starben, ohne daß zuvor eine längere Krankheit vorausgegangen war. Carcinomträger, Diabetiker, chronisch Kranke usw. wurden ausgeschlossen, da mir daran lag, normalen Knochen zu untersuchen.

Die Verarbeitung des Materials erfolgte gemäß den Angaben von DETTMER, SCHMITT-ROHDE und HABERICH⁵ nach ROMEIS¹⁶:

Fixierung: Formalin 1:9, 4—6 Tage

Entkalkung: 5%ige Salpetersäure, 48 Std Vakuum

Wässerung: fließendes Wasser, 12 Std, 5%iges Lithiumsulfat, 16 Std

Entwässerung: reines Pyridin, 3 Std, reines Benzol, 3 Std

Einbettung: weiches Paraffin, 2 Std, mittelhartes Paraffin, 2 Std, hartes Paraffin, unbegrenzt

Schneiden: Mikrotom, Schnittdicke 8 μ

Die Massendichtebestimmungen wurden mit der *mikrodensometrischen Methode* nach HABERICH, DETTMER und SCHMITT-ROHDE⁷ angestellt. Hierbei wurden Lösungen von Azocarmin (Konzentration 0,1 $\frac{0}{00}$, p_H 3,32—3,53 bei 18° C, gemessen mit der Kalomel-Platinkette und Chinhydron) und Anilinblau (0,167 $\frac{0}{00}$, p_H 3,10 bis 3,25 bei 18° C, gleiche Meßmethode) verwendet. Das entparaffinierte Präparat wurde mit ihnen nacheinander 1, 2, 3, 5, 10 und 20 min gefärbt. Die zunehmende Färbung des Schnittes wurde durch die steigende Absorption eines Lichtstrahles quantitativ gemessen. Die Temperatur der Lösungen, die Helligkeit des Lichtstrahles, der durch die eingestellte Fläche des Präparates trat, und der Meßstrom der registrierenden Apparatur blieben konstant. Die gemessenen Felder konnten durch Verwendung von Blenden und verschiedenen Vergrößerungen von 1 μ^2

(Punkt) auf $16 \mu^2$ und $160 \mu^2$ Fläche verändert werden. Es ergibt sich so die Möglichkeit, Summenmessungen ($160 \mu^2$ Areal) durchzuführen, wenn benachbarte Punkte große Lichtabsorptionsdifferenzen ergeben, wie bei Anwendung von Anilinblau oder Kalialaun-Säurefuchsin (Konzentration 2%, Färbung 15 sec, 30 sec, 1 min, 2 min, 5 min fortlaufend).

Die mikrodensometrische Methode beruht auf der Vorstellung, daß ein Gewebe um so mehr Farbteilchen einlagert, je größer die Summe seiner dazu verfügbaren Hohlräume ist. Diese Hohlräume entsprechen in der Grundsubstanz des Knochens praktisch den intermicellaren Räumen. Da ihre Ausdehnung das lichtmikroskopische Auflösungsvermögen unterschreitet, gehören sie zu den *Ultrastrukturen*. Die Dichte dieser Ultrastruktur wird also durch die Zahl und Größe der intermicellaren Räume bestimmt, die in nachstehenden Versuchen mit Farbstoffteilchen dargestellt wurden. Sie ist umgekehrt proportional der Zahl und Größe der intermicellaren Räume. Nach elektronenoptischen Arbeiten von OKURA und KOYAMA¹³ kennt man die Größe verschiedener Farbstoffteilchen.

Sie müssen den intermicellaren Räumen der Grundsubstanz entsprechen, um zu färben. Sind sie größer, können sie nicht in das Gewebe eindringen, sind sie erheblich kleiner, werden sie bei der Differenzierung (Entfärbung) rasch entfernt. Ihre Aufnahme durch den Knochen gibt uns daher einen Anhalt für die ungefähre Größe seiner intermicellaren Räume und seiner Ultrastrukturdichte.

Da die absolute Farbstoffeinlagerung nicht allein von der Dichte, sondern auch von der Dicke des Präparates abhängt, genügt es nicht, die Farbsättigungswerte des Knochens zu bestimmen. Die mit dem Mikrotom angefertigten Schnitte haben nie konstante Dicke, und wechselnde Massen haben eine unterschiedliche Anzahl intermicellarer Räume. Es ist daher nötig, zuerst die Lichtabsorption des ungefärbten Knochens (Fußpunkt der Färbungskurve) zu messen, da sie nur von der Dicke abhängt. Weiter ist der *Anstieg* der Farbintensität mit der Zeit zu bestimmen. Es entstehen bei gleicher Dichte und unterschiedlicher Dicke parallel verlaufende Kurven mit unterschiedlichen absoluten Werten, da die Zahl der intermicellaren Räume mit steigender Dicke zunimmt. Umgekehrt treten bei gleicher Dicke und verschiedener Dichte divergierende Kurven mit gleichem Fußpunkt auf. Hier ergeben die Sättigungswerte den wahren Umfang der intermicellaren Räume.

Färberische Untersuchungen erfolgten mit Hilfe der Azanfärbung (s. ROMERIS¹⁴), der Versilberung ohne und mit Perjodsäure nach DETMER und SCHWARZ, der „umgekehrten“ Azanfärbung, der Säurefuchsin-Kalialaunfärbung ehemals verkalkter Stellen nach ERÖS (modifiziert) sowie heterodispersen Farbstoffgemischen. Dazu dienten Azocarmin-Anilinblaulösung (Verhältnis 1:1, Verdünnung und Acidität wie bei den mikrodensometrischen Versuchen) oder Mischungen aus Azocarmin, Methylenblau und Pikrinsäure. Es wurde erst fortlaufend gefärbt (progressive Färbung) und anschließend mit Wasser oder Alkohol entfärbt (regressive Färbung oder Differenzierung). Zur modifizierten Färbung nach ERÖS wurde 15 sec mit einer 2%igen Kalialaun-Säurefuchsin-Lösung gefärbt, bei der „umgekehrten“ Azanfärbung zuerst 8 min mit Anilinblau-Goldorange, dann, nach kurzem Abspülen mit Wasser, die gleiche Zeit mit Azocarmin. Dazu wurden unverdünnte Stammlösungen benutzt.

Tabelle 1. Größe der Farbstoffteilchen in reinem Wasser nach OKURA, prozentuale Verteilung

Teilchengröße in $m\mu$	10—20	21—30	31—40
Pikrinsäure	76%	20%	4%
Azocarmin B	15%	85%	
Säurefuchsin		75%	25%
Anilinblau		47%	53%

Befunde

1. Färbung mit heterodispersen Farbstoffgemischen

Für die Anfärbung einer Struktur ist nach VON MÖLLENDORFF außer ihrer eigenen Dichte die Zerteilung (Dispersion) des Farbstoffes ausschlaggebend. So gelingt es weder mit Pikrinsäure noch mit Azocarmin, den feinsten von mir benutzten Farbstoffen (s. Tabelle 1), Plexiglas (Polymetaacrylsäureester) zu färben, da dessen Dichte zu hoch ist. Wie VON MÖLLENDORFF und KREBS¹² am quergestreiften Muskel nachwiesen, gelingt es mit heterodispersen Farbstoffgemischen, Dichteunterschiede im untersuchten Stoff festzustellen, unter der Voraussetzung, daß man Diffusionsfarbstoffe verwendet, die keine feste Adsorption durch das Substrat erleiden. Diesen Bedingungen werden Azocarmin, Methylenblau und Esbachs Reagens (Pikrinsäure als färbender Bestandteil) gerecht, wie ich in vielen Färbeversuchen am Knochen feststellen konnte. So ist es möglich, mit diesen Diffusionsfarbstoffen eine fortlaufende Färbung und Entfärbung vorzunehmen. Allerdings gelingt beim Azocarmin die Entfärbung mit Wasser nicht ganz vollständig, gut und schnell dagegen mit Alkohol. Anilinblau dagegen ist ungeeignet, da es mit dem Substrat eine feste Bindung chemischer oder adsorptiver Natur eingeht, wie durch die Anilinblau-Azocarmin-Mischfärbung nachzuweisen ist. Sie ergibt folgendes: Das Präparat färbt sich blauviolett mit besonderer Betonung der Generallamellen. Weiterhin bemerkt man, daß die Mehrzahl der längsgetroffenen Fasern zuerst heller und mehr rötlich erscheint, nach 30 min jedoch dunkler als die quergeschnittenen und in gleichem blauvioletten Farbton. Wird sodann mit Alkohol differenziert, so entsteht ein rein blau gefärbtes Präparat mit hellen, blassen Quer- und dunkleren Längsfasern.

Es handelt sich hier nur teilweise um eine heterodisperse Färbung, bei der die kleineren Farbstoffteilchen (Azocarmin) den größeren *zunächst* voraneilen und in Medien mit schlechteren Diffusionsbedingungen, z. B. in den längsgeschnittenen Fasern, ein relatives Übergewicht erlangen: roter Farbton. Wie der Vergleich von gefärbten und polarisierten Präparaten ergibt, bewirkt Anilinblau eine besonders starke Färbung der längsverlaufenden Faserbündel. Daher wird nach 30 min die rote Tönung dieser Bündel durch die intensive Farbe des Anilinblaus überdeckt, während die steil angeordneten Fasern, vom Anilinblau nicht so tingiert, heller erscheinen. Durch die folgende Differenzierung wird Azocarmin gänzlich herausgelöst, Anilinblau aber nur in ganz geringem Maße, da es stärker an den Fasern haftet, besonders an den längsgeschnittenen. Um mit einwandfreien Diffusionsfarbstoffen Dichteunterschiede im Knochen zu ermitteln, wurden einerseits Farbstoffgemische aus Methylenblau, Pikrinsäure und Azocarmin und andererseits reine Lösungen der einzelnen Komponenten verwandt. Zur Bestimmung

der relativen Teilchengröße und damit der Dispersion wurden Filtrierpapierstreifen mit einem Ende in die Farbstoffmischung eingetaucht und das Emporwandern der einzelnen Farbstofffraktionen registriert. Bei einer Azocarmin-Esbachlösung zeigte sich folgende Farbverteilung (von der Lösung aus): rot—orange—gelb, d. h. die gelbe Pikrinsäure war am weitesten diffundiert. Bei einer Methylenblau-Azocarminlösung war die Reihenfolge: blau—violett—rosa, bei einer stabilisierten Methylenblau-Esbachlösung: blau—grün—gelb. Die Zwischenfarben erklären sich durch gleichzeitige Anwesenheit beider Komponenten. Die Diffusionsgeschwindigkeit zeigt also folgende Reihenfolge: Pikrinsäure > Azocarmin > Methylenblau und die Teilchengröße Pikrinsäure < Azocarmin < Methylenblau, da die kleinsten Teilchen am schnellsten diffundieren. Bei einer Azocarmin-Anilinblaumischung zeigte sich die Anordnung blau—rötlich, d. h. die Azocarminteilchen sind die kleineren. Damit konnten auch OKURAs elektronenoptische Ergebnisse über die Reihenfolge der Teilchengrößen bestätigt werden (S. 73).

Bei Anwendung einer stabilen alkalischen Mischung von Esbachs Reagens und Methylenblau, die dunkelgrüne Farbe besitzt, beobachtet man unter dem Mikroskop folgende Einwirkung auf den Schnitt: Das helle Präparat wird gelbgrün und dann dunkelgrün, weil vor dem Methylenblau die höherdisperse Pikrinsäure hineindiffundiert. Entfärbt man mit destilliertem Wasser, so folgen einander diese Stadien: dunkelgrün—grünblau—bläulich—hell, d. h., die Pikrinsäure diffundiert auch schneller hinaus, weshalb gegen Ende der Differenzierung das gröber disperse Methylenblau dominiert.

Innerhalb des Knochens beobachtet man indessen eine besondere Verteilung der Farbstoffe: Die Randsäume und die quergetroffenen Fasern erscheinen bei progressiver Färbung dunkler als die Längsfasern, die zentrale Compacta und die zentralen Achsen der Spongiosabälkchen, die mehr gelblich tingiert sind. Wenn man den Farbstoff wieder herauslöst (regressive Färbung), zeigt sich beinahe eine Umkehr dieser Erscheinungen. Die längsgetroffenen Fasern und die zentralen Anteile der Compacta und Spongiosa werden dunkler, erhalten einen blauen Farbton und treten mehr hervor. Mit Hilfe von Polarisationsuntersuchungen kann festgestellt werden, daß es sich tatsächlich um Längsfasern handelt. Natürlich treten auch hier quantitative Unterschiede auf, die durch den wechselnden Steigungswinkel der Lamellen bedingt sind.

Prinzipiell gleiche Verhältnisse bemerkt man auch bei einer Pikrinsäure-Azocarminmischung und besonders deutlich bei Azocarmin-Methylenblaulösungen.

Diese Erscheinungen sieht man an Knochen von Lebenden und Toten in gleichem Umfang. Sie sind nur so zu verstehen, daß die Farbteilchen in den peripheren Anteilen des Knochens (Generallamellen) und

in den quergeschnittenen Fasern *leichtere* Diffusionsbedingungen vorfinden, so daß sich dort Färbung und Entfärbung schneller abspielen. Das bedeutet aber nichts anderes als eine geringere Strukturdichte.

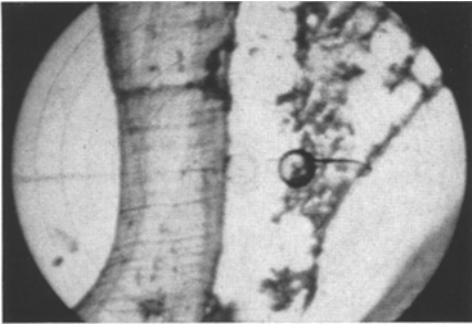


Abb. 1. Spongiosa des Beckenkammes auf dem Schirm der registrierenden Apparatur. Die waagerechte Linie gibt den registrierten Durchmesser an. Der Meßpunkt ist gerade rechts vom Trabekel sichtbar. 28jähriger Mann. Vergrößerung 1:256

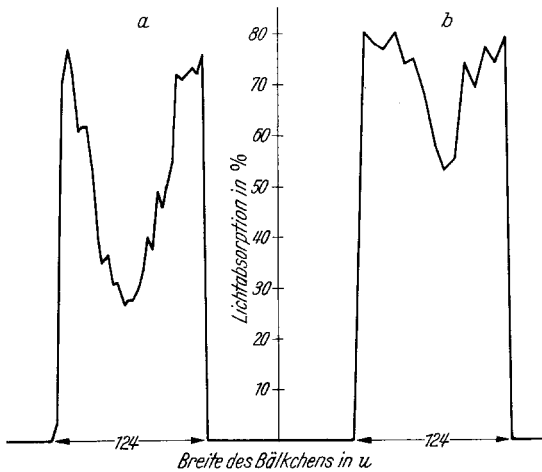


Abb. 2. Lichtabsorption eines vital gewonnenen Knochenpräparates. Spongiosatrabekel des Beckenkammes im Durchmesser. Vergrößerung 1:256. Größe der Meßpunkte 16 μ . Färbung mit Azocarmin 0,1‰. a: 5 min, b: 10 min

Da sich die neugebildete Knochensubstanz außen apponiert, entsprechen die sich langsamer färbenden und entfärbenden *dichteren* zentralen Bezirke von Compacta und Spongiosa *älteren* Strukturen des Knochens.

2. Mikrodensometrische Untersuchungen

Bestimmt man die Farbsättigung eines Knochen-trabekels im Durchmesser (Abb. 1), so ergeben sich folgende typische Kurven (Abb. 2). Aus den Diagrammen der Abb. 2 läßt sich ablesen, daß die Farbsättigung ihre Spitzenwerte in den Osteoidsäumen und den äußersten General-lamellen des Bälkchens erreicht und zu dessen Achse hin kontinuierlich abfällt. Man kann also auch mikrodensometrisch den *Anstieg der Dichte mit zunehmendem Alter der Struktur* nachweisen. Weiter ist aus dem Diagramm zu entnehmen, daß die Färbung der peripheren Lamellen schnell erfolgt — unter

den angegebenen Bedingungen in 5 min —, während die Zentren sich zunächst langsamer färben, aber letztlich gleich hohe Werte erreichen wie die Ränder. Das wird im zweiten Diagramm — nach 10 min — deutlich.

Diese Dichtekurven der Spongiosa, die bei allen Altersstufen des Menschen gleich verlaufen, sind in ihren absoluten Werten abhängig von

der Breite des Bälkchens. So färbt sich ein schmaler Trabekel schneller als ein breiter, da er nur wenige zentrale Lamellen besitzt.

In orientierenden Messungen wurde dann die zunehmende Färbung des Präparates in Minuten festgestellt. Hierbei zeigte es sich, daß in allen untersuchten Fällen, bei intra vitam und post mortem entnommenen Knochen, die Farbintensität der Spongiosabälkchen erheblich höher als

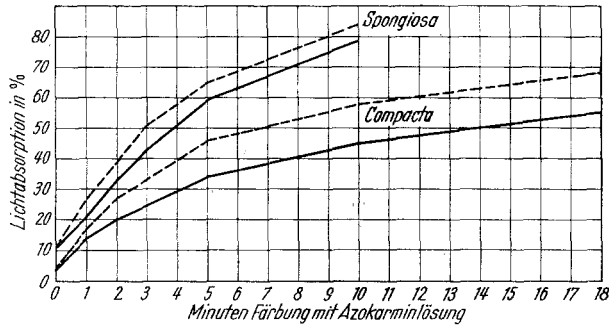


Abb. 3. Vergleich der Lichtabsorption von Spongiosa und Compacta. Obere Kurven Spongiosa, untere Compacta; Knochen vom Lebenden: ausgezogene Linien, Knochen vom Toten: unterbrochene Linien. Meßfläche $160 \mu^2$. Auf der Abszisse eingetragen die Zeit, während der eine Azocarminlösung einwirkt; auf der Ordinate die Lichtabsorption in Prozenten. 74jährige Frau

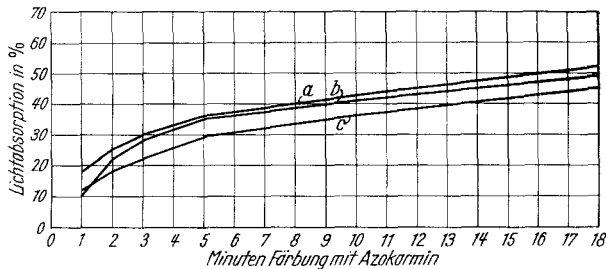


Abb. 4. Mikrodensometrische Kurven von ante mortem gewonnenem Knochen. a: 28jähriger Mann, b: 29jährige Frau, c: 19jähriger Mann

die der Compacta im gleichen Präparat ist. Das wird besonders deutlich, wenn man die Lichtabsorption von $160 \mu^2$ großen Knochenflächen aufzeichnet, tritt aber schon bei $16 \mu^2$ in Erscheinung.

Daraus ergibt sich also, wie zu erwarten war, daß die Compacta *dichter* als die Spongiosa ist.

Die erhaltenen Diagramme aus Zeit und Lichtabsorption ergeben e-Funktionskurven, die in unendlicher Zeit der Abszisse parallel verlaufen.

Aufschlußreicher ist die Messung zentraler Balkenteile an korrespondierenden Punkten desselben Falles vor und nach dem Tode sowie

an solchen verschiedener Individuen zum Vergleich. Unter korrespondierenden Stellen verstehen wir die Achsen gleichbreiter Spongiosabälkchen.

Dabei ergab sich, daß die von DETTMER, SCHMITT-ROHDE und HABERICH mitgeteilte Dichteabnahme der Knochengrundsubstanz nach dem Tode bestätigt werden konnte. Der postmortal erhaltene Knochen zeigt höhere Farbintensität als der während des Lebens punktierte (Abb. 3).

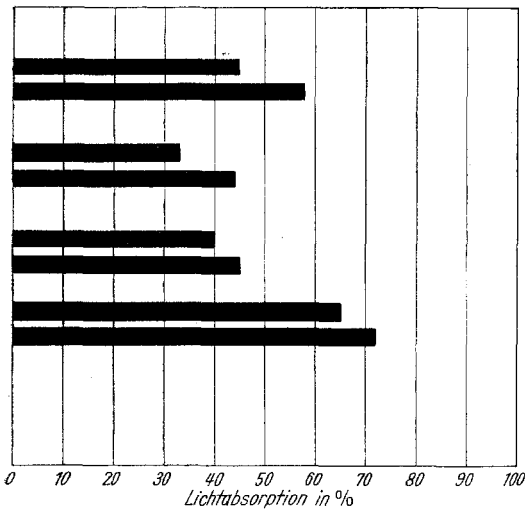


Abb. 5. Vergleich der Lichtabsorption längs- und quergetroffener Fasern bei verschiedenen Farbstoffen. Quergetroffene Fasern: kurze Säulen; längsgetroffene Fasern: lange Säulen. Anilinentianaviolett 1‰ig 15 sec, Anilinblau 0,167‰ig 20 min, Azocarmin 0,1‰ig 5 min, Azocarmin 0,1‰ig 20 min (von oben nach unten)

Da bei jungen gesunden Menschen die Lichtabsorptionskurven flach verlaufen (Abb. 4), ist eine erhebliche Dichte dieser Knochengrundsubstanz anzunehmen. Der Knochen älterer Individuen zeigt dagegen so unterschiedliche Kurven, daß es unmöglich ist, aus der Spongiosadichte auf das Lebensalter des Menschen zu schließen. Ihre Dichte dürfte nur vom Alter der betreffenden Lamellen abhängen.

Da Azocarmin sehr fein verteilt ist (Tabelle 1), treten bei seiner

Anwendung Differenzen der Farbsättigung zwischen längs- und quergetroffenen Fasern *nicht* so deutlich hervor, wie bei Anilinblau- oder Gentianaviolett färbung (Abb. 5). Dies gilt für Knochen von Lebenden und Toten. Bei den geringen lamellären Lichtabsorptionsunterschieden für Azocarmin handelt es sich im wesentlichen um Lichtbrechungseffekte, die auch schon am ungefärbten Präparat nachzuweisen sind und dann etwa 50% der Azocarminindifferenzen betragen. Sie schwanken je nach Quellung des Schnittes und führen zu den bedeutsamsten Fehlern bei Messungen der Lichtabsorption (MEYER-ARENDT¹⁰).

Bei Anwendung von *Anilinblau* ergeben sich starke Unterschiede in der Lichtabsorption dicht benachbarter Stellen, die das Ergebnis einer chemisch oder elektrostatisch bedingten Färbung darstellen dürften, die elektiv die längsverlaufenden Fasern bevorzugt (S. 74). Sie zeigen daher eine höhere Lichtabsorption (Abb. 5). Bei dieser deutlichen

Inhomogenität eines mit Anilinblau gefärbten Präparates ergeben nur Summenmessungen verwertbare Bilder, da sich die Einzelfehler zu einem gewissen Mittelwert aufheben. Zwar treten auch Unterschiede der Farbintensität zwischen Compacta und Spongiosa wie bei Azocarmin auf, dagegen sind meist *keine* deutlichen Differenzen zwischen ante und post mortem punktiertem Knochen festzustellen (Abb. 6).

Bei Benutzung einer *Anilingentianaviolett*lösung tritt die unterschiedliche Lichtabsorption von Fasern verschiedenen Steigungswinkels noch stärker in Erscheinung, da eine intensive Färbung der längs-

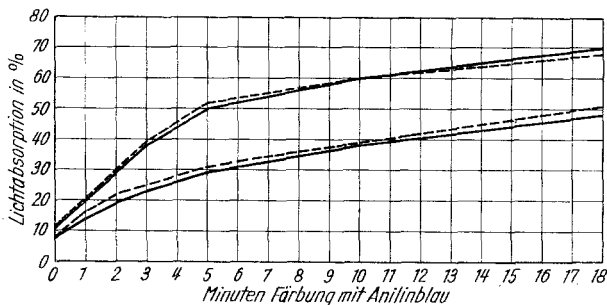


Abb. 6. Mikrodensometrische Kurven von ante und post mortem gewonnenem Knochen. Auf der Abszisse aufgetragen die Zeit, während der eine Anilinblaulösung einwirkt, auf der Ordinate die Lichtabsorption in Prozenten. Knochen vom Lebenden: ausgezogene Linien, Knochen vom Toten: unterbrochene Linien. Die obere Kurve gibt die Verhältnisse bei einer 50jährigen Frau, die untere bei einer 78jährigen Frau wieder.

geschnittenen Fasern erfolgt (Abb. 5). Es gelingt jedoch niemals, durch Nachfärbung mit Gentianaviolett, die Differenzen der Lichtabsorption zwischen Fasern verschiedenen Verlaufes in einem Anilinblaupräparat zu verstärken. Ebensowenig kann Anilinblau den durch Gentianaviolett geschaffenen Kontrast verstärken.

Zuletzt wurde noch die Mikrodensometrie mit *Kalialaun-Säurefuchsin* durchgeführt. Die dabei erhaltenen Dichtekurven der Spongiosazentren zeigen ebenfalls die e-Funktion der Farbzunahme und kongruente Kurven für ante und post mortem entnommenes Material (Abb. 7).

Vergleicht man die mit den verschiedenen Farbstoffen erhaltenen Ergebnisse miteinander, so zeigt es sich, daß von den angewandten Färbungen allein die mit *Azocarmin* verwertbare Aussagen über die Dichteverhältnisse der Grundsubstanz im entkalkten Knochen liefert. Bei ihr liegt im Gegensatz zu den anderen genannten Farbstoffen eine reine Diffusionswirkung vor. Anilinblau und Gentianaviolett zeigen durch die unterschiedliche Anfärbung verschieden angeschnittener Fasern eine starke Streuung der Meßwerte, so daß genauere Aussagen nicht möglich

sind. Durch Kalialaun-Säurefuchsin soll eine besonders kräftige Färbung ehemals verkalkter Stellen des Knochens erreicht werden. Es färben sich jedoch auch kollagene Fasern bevorzugt an.

Entsprechend den Beobachtungen von SCHMITT-ROHDE¹⁷ wurden vergleichende Untersuchungen zwischen Ultrastrukturdichte und Widerstand des Knochens bei der Entnahme mit der Nadel durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß zwischen der *Härte* des Knochens bei der Punktion und seiner mikrodensometrisch ermittelten *Dichte* keine Beziehungen bestehen. Anscheinend ist die Härte des Knochens weit-

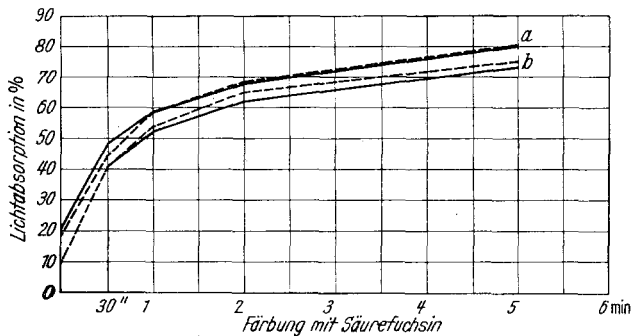


Abb. 7 Mikrodensometrische Kurven von ante und post mortem erhaltenem Knochen. Auf der Abszisse eingetragen die Zeit, während der eine Säurefuchsinlösung einwirkt, auf der Ordinate die Lichtabsorption in Prozenten. Knochen vom Lebenden: ausgezogene Linien, Knochen vom Toten: unterbrochene Linien. a: 28jähriger Mann, b: 67jähriger Mann

gehend von seinem Kalkgehalt abhängig. Da man aber bei jungen Knochen eine hohe Ultrastrukturdichte antrifft, dürfte letztere mit der *Elastizität* und *Festigkeit* der Knochen übereinstimmen.

3. Färberische Untersuchungen

Bei der *Azanfärbung* bemerkt man sowohl am intra vitam wie post mortem entnommenen Knochen folgende Erscheinungen:

1. Die längsgeschnittenen Fasern des lamellären Knochens werden, homogen rot angefärbt, die zwischen ihnen liegenden quergetroffenen Faserbündel dagegen schollig, körnig hellblau bis blau.

2. Alle unverkalkten Fasern, die periostalen Bindegewebsfasern und die Osteocyten mit ihrem Hof und den anschließenden Knochenkanälchen erscheinen blau.

3. Die zentralen Bezirke der Spongiosa sowie die gesamte Compacta sind rot, die Osteoidsäume aber leuchtend blau gefärbt.

4. Die äußerste Generallamelle und die innerste Osteonlamelle — die jüngsten Appositionszonen also — sind rot.

Die rot-blau-Grenzen sind nie scharf, eine Ausnahme machen nur die Osteoidsäume. Der rote Farbton ist bei geringer Intensität pastellartig diffus ausgebreitet. Alle beschriebenen Bilder ergeben sich bei gut differenzierten 8μ starken Schnitten. Dünnere Stellen sind immer mehr blau, dickere mehr rot gefärbt. Dabei ist zu bedenken, daß der nach dem Tode entnommene Knochen, auf Grund seiner geringeren Dichte, bei gleicher Färbezeit primär mehr Azocarmin aufnimmt als der vom Lebenden. Durch die Anilin-Alkoholdifferenzierung, im Verlaufe der Azanfärbung, wird aus ihm aber auch mehr Azocarmin herausgelöst, so daß der postmortal erhaltene Knochen beim Abschluß der Färbung weniger Azocarmin enthält.

Neben der Azanfärbung führte ich die „umgekehrte“ Azanfärbung durch. Der Knochen erscheint dabei einheitlich braun, und zwar an den Rändern dunkler als in der zentralen Compacta und Spongiosa. Er zeigt leuchtend blauviolette Säume, längs- und quergeschnittene Fasern weisen keine Farbunterschiede auf. Differenziert man nunmehr mit Wasser, Alkohol oder Salzsäure-Alkohol, bekommt der Knochenschnitt eine rein blaue Farbe, die trotz weiterer Differenzierung bleibt. Gleichzeitig treten die längsgetroffenen Fasern durch stärkere blaue Tönung hervor. Offenbar sind also Goldorange und Azocarmin bei der Differenzierung herausdiffundiert und Anilinblau allein zurückgeblieben.

Außer der Azanfärbung wurden am ante und post mortem punktierten Knochen die Versilberung mit und ohne Perjodsäure (DETTMER und SCHWARZ) und die Färbung verkalkten Knochengewebes nach ERÖS (modifiziert) angewendet. Bei der Versilberung konnten die von DETTMER, SCHMITT-ROHDE und HABERICH⁵ beschriebenen Erscheinungen am vorliegenden Material bestätigt werden. Vor allem fällt hierbei die intensive Schwärzung der peripher gelegenen längsgeschnittenen Fasern auf.

Im Gegensatz zur Azanfärbung und Versilberung läßt die Färbung mit Säurefuchsin nach ERÖS keine postmortale Veränderung des Knochengewebes erkennen. Im einzelnen sehen wir, daß die längsgetroffenen Fasern und besonders die peripher liegenden stärker als die quergeschnittenen Bündel gefärbt sind. Neben dieser Analogie zur Versilberung mit Perjodsäure und zur Anilinblaufärbung zeigt Säurefuchsin auch gegensätzliche Eigenschaften: Es färbt die Knochenkapseln (Zellhöfe) mit ihrer faserigen Struktur (WEIDENREICH nach Handb.¹¹) fast gar nicht, die faserfreien Kittflächen (V. EBNER nach Handb.¹¹) dagegen *intensiv*. Zusammenfassend kann hier gesagt werden, daß eine stärkere Färbung längsgeschnittener Fasern mit Bevorzugung junger Elemente (äußere Generallamellen, innere Osteonlamellen am Gefäßkanal) auftritt.

Polarisationsoptische Untersuchungen ergaben die bekannten, durch Anwesenheit kollagener Fibrillen bedingten Bilder. Eine meßbare

Veränderung der Kollagenfibrillen im Knochen nach dem Tode wurde nicht beobachtet. Die Helligkeit der äußersten Generallamelle blieb bei verschiedener Stellung des Analysators konstant, in den anderen Lamellen wechselte sie.

Diskussion

Wie schon erwähnt, wird die Grundsubstanz (Matrix) aus Kittsubstanz und kollagenen Fibrillen gebildet. Die Fibrillen, als Elemente der Ultrastruktur im Lichtmikroskop nicht sichtbar, sind größtenteils gebündelt und durch interfibrilläre Kittsubstanz zu Fasern vereinigt. Da die interfibrilläre Kittsubstanz mit der übrigen Kittsubstanz im Knochen identisch sein dürfte, sind die Eigenschaften der sichtbaren Fasern im Knochen auf die in ihnen enthaltenen Kollagenfibrillen zu beziehen. In diesem Sinne kann man Fasern und Fibrillen gleichsetzen, wie etwa WEIDENREICH, unter dessen „Fibrillen“ eigentlich Fasern zu verstehen sind, da die Existenz kollagener Fibrillen erst später elektronenoptisch festgestellt wurde.

Unter dieser Voraussetzung ist die feste Bindung zwischen Anilinblau und Faser, wie sie in der Azocarmin-Anilinblau-Mischfärbung und der „umgekehrten“ Azanfärbung sichtbar wurde, durch die Fibrillen und nicht durch die Kittsubstanz verursacht. Diese feste Bindung könnte durch aktive Seitenketten der Kollagenfibrille (s. GRASSMANN⁶) bedingt sein. Es ist denkbar, daß Anilinblau (Triphenylfuchsinchlorhydrat), entsprechend den allgemeinen Färbeprinzipien (s. KARRER⁸), von einer basischen Seitenkette gebunden würde. Da die Summe der Fibrillenschnittflächen eine größere Oberfläche und damit mehr reaktionsfähige Seitenketten als die der Querschnitte aufweist, müßten nach dieser These die längsverlaufenden Fasern mehr Farbstoff binden als die quergetroffenen. Das ist tatsächlich der Fall (Abb. 5). Somit wird auch verständlich, daß Gentianaviolett, wie oben angeführt, die Anilinblaufärbung nicht zu steigern vermag, da die aktiven Gruppen bereits vom zuvor einwirkenden Anilinblau besetzt sind. Anilinblau, Gentianaviolett und in geringerem Maße Säurefuchsin dürften demnach Fibrillenfarbstoffe sein.

Da bei ihrer Verwendung keine Unterschiede zwischen ante und post mortem entnommenem Knochen auftreten, können die Fibrillen *nicht* an den postmortalen Veränderungen des Knochens teilnehmen. Das wird bestätigt durch polarisationsoptische Untersuchungen.

Im Gegensatz zu den erwähnten Farbstoffen ist Azocarmin nach den Ergebnissen der progressiven und regressiven Färbungen als Diffusionsfarbstoff anzusehen. Die stärkere Azocarminlagerung in den postmortal entnommenen Knochen soll nach DETTMER, SCHMITT-ROHDE und HABERICH⁵ durch postmortale Dichteabnahme der Ultrastruktur

bedingt sein. So könnte durch Erweiterung der intermicellaren Lücken innerhalb der Grundsubstanz mit dem Tode eine größere Aufnahmefähigkeit für die Azocarminteilchen geschaffen werden. Da die Fibrillen nach den mitgeteilten Beobachtungen nicht an den postmortalen Veränderungen des Knochens teilnehmen, können diese nur durch Vorgänge in der Kittsubstanz bedingt sein.

Dafür spricht auch das Resultat der Azanfärbung. Sie stellt eine Synthese zwischen Diffusionsfärbung (Azocarmin) und chemischer oder adsorptiver Bindung an das Substrat (Anilinblau) dar. DETTMER u. Mitarb.⁵ nahmen an, daß Azocarmin nach SEKI *alle* intermicellaren Räume des Knochens, Anilinblau mit seinen größeren Teilchen jedoch nur die größeren Räume, wie sie durch den postmortalen Abbau entstehen, erfüllen kann. Durch die Differenzierung der mit Azocarmin gefärbten Präparate sollten nach dieser Ansicht bei der Azanfärbung die größeren Räume für Anilinblau frei werden. Die Mikrodensometrie mit diesem Farbstoff müßte dann aber größere Differenzen zwischen Knochen von Lebenden und Toten ergeben, als sie von mir gemessen wurden (Abb. 6). Meines Erachtens haben jedoch die postmortal entstehenden größeren Lücken der Kittsubstanz, die nach der Anilin-Alkoholdifferenzierung azocarminfrei sind, weitere Teile der kollagenen Fibrillen dem Anilinblau zugänglich gemacht, während im Knochen vor dem Tode die Fasern weitgehend von dichter azocarminhaltiger Kittsubstanz blockiert sind. Durch die feste Bindung an die kollagenen Fibrillen entsteht so die gesteigerte Blaufärbung des Knochens nach dem Tode, die sich durch abschließende Differenzierung nicht aufheben läßt. Anilinblau zeigt also ein ganz anderes Verhalten, als man bei einer Diffusionsfärbung mit größeren Teilchen (DETTMER u. Mitarb.) erwarten müßte.

Diese Hypothese wird noch durch die „umgekehrte“ Azanfärbung unterstrichen. Da hier Anilinblau *vor* dem Azocarmin einwirkt, können die Fibrillen nicht von azocarminhaltiger Kittsubstanz blockiert werden und sind dem Anilinblau zugänglich. Die längsgeschnittenen Fasern müßten dann nach der abschließenden Differenzierung kräftig blau gefärbt sein. Das trifft auch in allen Fällen zu.

Das gleiche gilt für die Azocarmin-Anilinblau-Mischfärbung, bei der eine *gleichzeitige* Einwirkung beider Farbstoffe stattfindet. Sie führt zur Blaufärbung der längsgeschnittenen Fasern, die weder durch Wasser- noch durch Alkoholdifferenzierung aufzuheben ist.

Bei der normalen Azanfärbung erscheinen die längsgetroffenen Fasern jedoch rötlich. Sie haben also das Azocarmin kaum abgegeben und müssen daher schlechtere Diffusionsbedingungen und somit höhere Dichte aufweisen als die quergetroffenen Bündel, in denen blaue Tönung vorherrscht.

Auch die Färbung mit heterodispersen Farbstoffen zeigt, daß in Faserrichtung ein Diffusionsmaximum, senkrecht dazu ein Minimum besteht. Als Ursachen dieser Ausrichtung können die Lagerung der Hydroxylapatitkristalle in der Grundsubstanz, die Struktur der kollagenen Fibrillen oder der Aufbau der Kittsubstanz selbst angesehen werden. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von ROBINSON¹⁴ sowie ROBINSON und WATSON¹⁵ liegen die tafelförmigen Apatitkristalle des Knochens mit ihrer Längsachse der Fibrillenachse parallel an der Fibrilloberfläche. Nach der Entkalkung würden sie deshalb Diffusionskanäle in der Faserrichtung hinterlassen. — Innerhalb der Fibrille sind, nach Beobachtungen von KENNEDY, die axialen Anteile von geringerer Dichte als die randständigen, so daß man von einer Röhrenstruktur sprechen könnte, die ebenfalls in der Längsachse gute Diffusionsbedingungen liefern könnte.

Die Grundsubstanz zeigt mit zunehmendem Alter höhere Dichte (Abb. 2). Je jünger der Knochen, desto größer ist seine Farbsättigung. Daher zeigen die Osteoidsäume die stärkste Einlagerung (Azocarmin, Anilinblau, Silberkeime) von allen Knochenbezirken. Sie nehmen bei heterodispersen Gemischen auch Teilchen des größten Farbstoffes auf. Bei der Azanfärbung erscheinen sie leuchtend blau, da Anilinblau die feinsten Fasern (WEIDENREICH n. Handb.¹¹) intensiv färbt, nachdem durch Differenzierung das Azocarmin leicht aus den großen Lücken des Osteoids herausdiffundiert ist. Nach POMMER (Handb. d. m. A.¹¹) soll die Färbung des Osteoids mit Anilinblau durch körnige Kalkeinlagerung bedingt sein. ROBINSON und WATSON¹⁵ haben durch elektronenoptische Untersuchungen aber festgestellt, daß mit zunehmender Reifung des Knochengewebes sowohl die Apatitkristalle wie die Kollagenfibrillen an Größe zunehmen, so daß im neugebildeten Osteoid nur kleine anorganische Ablagerungen anzutreffen sind. Körnige Einlagerungen sind allerdings nie festzustellen. Da viele unverkalkte Bindegewebe sich gut mit Anilinblau färben, galt das dunkelblau tingierte Knochengewebe bei der Azanfärbung als unverkalkt, das rot gefärbte als diffus verkalkt (WATT n. Handbuch¹¹). Andererseits färben sich auch Parenchyme, wie Knochenmark im selben Präparat, mit Azan rot, so daß die Definition rot = verkalkt, blau = unverkalkt auch beim Knochen nicht haltbar ist. Die dunkelblaue Anfärbung von Knochengewebe bei der Azanfärbung kommt nur dann zustande, wenn die Dichte der Grundsubstanz so gering ist, daß sie eine leichte Abgabe des Azocarmins in der vorgeschriebenen Differenzierungszeit der Azanfärbung zuläßt und damit die Fibrillen dem Anilinblau zugänglich macht.

Besondere Verhältnisse lassen die jüngsten Anteile des Knochens erkennen: die äußersten General- und die innersten Osteonlamellen.

Obwohl sie nur geringe Dichte aufweisen, sind sie nach der Azanfärbung meist leuchtend rot anzutreffen. Da für Anilinblau hier offenbar kein Substrat zur Bindung vorhanden ist und nur Azocarmin und Goldorange nachweisbar einwirken, müssen diese Lamellen *faserfrei* oder faserarm sein. In diesem Sinne sprechen auch Polarisationsversuche, die konstante Helligkeit bei wechselnder Stellung des Analysators ergeben. Mit Säurefuchsin werden diese Lamellen ebenso intensiv wie die faserfreien Kittflächen gefärbt. Daraus läßt sich ebenfalls die These ableiten, daß diese jüngsten Lamellen temporär faserfreie Appositionskittflächen darstellen, in die möglicherweise vom Osteoid aus Filamente (Vorstufen der Fibrillen) eingelagert werden.

Ähnliche Bilder hatte schon ACHARD¹ mit anderen Farbstoffen erhalten. Er führte die färberischen Unterschiede zwischen verschiedenen Knochenstrukturen auf verschiedene elektrostatische Ladungen des angefärbten Substrats zurück. So erhielt er mit verschiedenen geladenen Lösungen eines sauren (Ponceau) und eines basischen (Methylenblau) Farbstoffes eine unterschiedlich intensive Anfärbung des Knochens. Nach KEDROWSKY⁹ tritt jedoch mit Veränderung der elektrostatischen Ladung (durch p_H -Verschiebung) eine Änderung der Teilchengröße in der Farblösung auf, da mit Zunahme gleicher Ladung die abstoßenden Kräfte in Aggregaten von Farbstoffmolekülen wachsen. Daher sind ACHARDS Bilder, die er, nach LIESEGANG⁴, als Folge verschiedener Ladung bestimmter Knochenstrukturen ansah, das Ergebnis einer heterodispersen Reihenfärbung.

Zusammenfassung

In verschiedenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Dichte der Knochengrundsubstanz mit dem Tode abnimmt. Diese Abnahme der Ultrastrukturdichte ist auf Veränderungen der Kittsubstanz zurückzuführen. Die Grundsubstanz besitzt, dem Knochenalter entsprechend, unterschiedliche Dichte. Mit zunehmendem Alter der Struktur steigt ihre Dichte. Sie besitzt eine räumliche Anordnung, welche die Diffusion in Richtung der Faserbündel begünstigt. Die unter dem Osteoidsaum liegende Grundsubstanz ist nach den angestellten Untersuchungen zumeist faserfrei wie die Kittflächen und weist erst in späteren Stadien Fasern auf.

Ein Zusammenhang zwischen der Ultrastrukturdichte der Grundsubstanz und der Festigkeit des Knochens (bei der Punktion nach BARTELHEIMER) ist an den Knochen junger gesunder Individuen festzustellen. Bei älteren Menschen wurden keine Beziehungen gefunden.

Es wurde das Prinzip der Azanfärbung am entkalkten Knochen untersucht.

Literatur

- ¹ ACHARD, J.: Physikochemische Untersuchungen am lamellären Knochen. *Z. Zellforsch.* **23**, 573 (1936). — ² BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Bd. I: Zellen- und Gewebelehre. Stuttgart: Georg Thieme 1948. — ³ BARTELHEIMER, H., u. J. M. SCHMITT-ROHDE: Osteoporose als Krankheitsgeschehen. In *Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde*, Bd. 7. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — ⁴ BUCHER, R., u. H. LIESEGANG: In *Medizinische Kolloidlehre*, herausgeg. v. LICHTWITZ, LIESEGANG und SPIRO. Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopff 1935. — ⁵ DETTMER, N., J. M. SCHMITT-ROHDE u. F. J. HABERICH: Über histologisch und mikrodensometrisch nachweisbare postmortale Veränderungen der Knochengrundsubstanz. *Virchows Arch.* **328**, 324—336 (1956). — ⁶ GRASSMANN, W.: Unsere heutige Kenntnis des Kollagens. *Leder* **6**, 241—258 (1955). — ⁷ HABERICH, F. J., N. DETTMER u. J. M. SCHMITT-ROHDE: Arbeit in Vorbereitung. — ⁸ KARREER, P.: Lehrbuch der organischen Chemie. Leipzig: Georg Thieme 1950. — ⁹ KEDROWSKY, B.: Anwendung von heterodispersen Eosin zur Färbung histologischer Präparate. *Z. wiss. Mikrosk.* **47**, 433 (1930). — ¹⁰ MEYER-ARENDT, J.: Möglichkeiten und Grenzen der Histo-physik. *Acta histochem.* **1**, 1—4 (1954). — ¹¹ MÖLLENDORFF, W. v.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. II, Teil 2. Berlin: Springer 1930. — ¹² MÖLLENDORFF, W. v.: Untersuchungen zur Theorie der Färbung fixierter Präparate, I. H. A. KREBS, Über die Färbbarkeit des Skelettmuskels. *Arch. mikrosk. Anat.* **97**, 554 (1923). — ¹³ OKURA, T., u. Y. Koyama: Elektronenmikroskopie von Farbstoffen, die zur Messung der Strukturdichte der Gewebsteile verwandt werden. *Arch. hist. jap.* **1**, 379 (1950). — ¹⁴ ROBINSON, R. A.: An electron-microscopic study of the crystalline inorganic compound of bone and its relationship to the organic matrix. *J. Bone Surg. A* **34**, 389—435 (1952). — ¹⁵ ROBINSON, R. A., and M. L. WATSON: Crystal-collagen relationships in bone as observed in the electron microscope. III. Crystal and collagen morphology as a function of age. *Ann. New York Acad. Sci.* **60**, 596—628 (1955). — ¹⁶ ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948. — ¹⁷ SCHMITT-ROHDE, J. M.: Die Knochenpunktion zur Erkennung stoffwechselbedingter Veränderungen am Knochen. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **1954**, 929—931.

Dr. KLAUS LORENTZ, Berlin SW 29, Kottbusser Damm 90