

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Genf
(Direktor: Prof. Dr. ERWIN RUTISHAUSER)

Über Veränderungen am Skelet des Kaninchens bei Vergiftung mit Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure*

Von

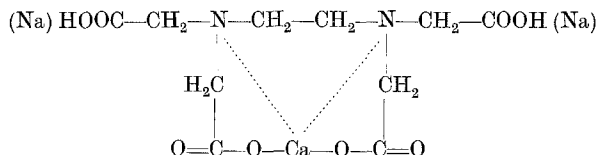
W. REMAGEN

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. November 1958)

A. Einleitung

Die Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure (EDTA) bildet mit zwei- und dreiwertigen Metallen äußerst stabile Komplexe (FOREMAN 1953, RIEDERS, SPENCER u. a. 1952), welche wasserlöslich und praktisch nicht dissoziiert sind (SREEBNY u. a.). Sie bindet z. B. Calcium nach der Formel:



Der Komplex hat für die verschiedenen Schwermetallionen wechselnde Stabilitätskonstanten, welche unter anderem vom p_H der Lösung abhängig sind (DELVAUX).

Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigt sich mit den Auswirkungen der EDTA beim Menschen und beim Tier. Auch in vivo kommt es zur Bildung des Komplexes, gleichgültig, ob die EDTA intravenös, intramuskulär, subcutan oder peroral gegeben wird. Selbst durch die Haut wird sie resorbiert. Schnell intravenös injiziert bewirkt sie eine Senkung des Blut-Ca-Spiegels, welche zum Tod im tetanischen Anfall führt, bei Kaninchen z. B. bei 100 mg/kg (CLARKE u. a.; POPOVICI u. a.; SPENCER u. a. 1956). Bei Dauertropfinfusion oder sonstiger Applikation kann der Ca-Spiegel, abhängig von der Resorptionsgeschwindigkeit, unverändert bleiben, jedoch ist eine signifikante Senkung des systolischen Blutdrucks beobachtet worden (SPENCER u. a. 1952). Die Ca-Ausscheidung im Urin steigt bis zum 10fachen an (BELLIN u. a.). Die EDTA bindet wohl das ionisierte Blut-Ca, welches dann aus den Ca-Reservoirs des Körpers ersetzt wird. Es ist interessant, daß bei niedriger Dosierung Ratten im Dauerversuch über 2 Jahre keine wesentlichen Abnormitäten im Cu-, Al- und Zn-Stoffwechsel aufwiesen, obwohl EDTA zu diesen Metallen bei physiologischem p_H in vitro eine stärkere Affinität als zu Calcium hat (REIFENSTEIN). Der Komplex wird durch die Nieren ausgeschieden, und zwar in 6½ Std zu rund 75%, in 16 praktisch zu 100% (BERSIN u. a.; FOREMAN u. a. 1954). Die Toxizität der EDTA ist relativ gering; trotzdem sind Sektionsbefunde bei Patienten beschrieben worden, welche wegen hypercalcämischer Zustände bei Knochenerkrankungen verschiedener Art mit EDTA behandelt worden waren. Es handelt sich um Veränderungen in den Nieren — im Sinne einer mäßigen bis mittelgradigen Nephrose — und im reticulo-endothelialen System, wo sich makrophagenähnliche Zellen mit eosinophilen Granula fanden (DUDLEY u. a.; SPENCER u. a. 1952). Die Autoren nehmen an, daß es sich um Folgen der EDTA-Medikation handelt, weisen aber darauf hin, daß im Tierversuch auch die Kontrolltiere ähnliche Veränderungen aufweisen (HOLLAND u. a.).

* Herrn Prof. Dr. ERNST LEUPOLD zum 75. Geburtstag gewidmet.

Es erschien uns interessant, Kaninchen die Säure in größeren Dosen beizubringen, die morphologischen Auswirkungen einer solchen Behandlung auf das Skelet zu untersuchen und mittels einer Calciumbilanz und blutchemischer Untersuchungen zu kontrollieren.

B. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methode. Wir verwendeten als Versuchstiere 24 Kaninchen, unterteilt in 8 Gruppen. Jede Gruppe bestand aus drei männlichen Tieren desselben Wurfs. Alle Gruppen waren etwa 4—5 Monate alt, befanden sich also noch im Wachstum. Zwei Tiere jeder Gruppe dienten als Versuchstiere (VT) und wurden mit EDTA behandelt, das dritte wurde als Kontrolltier (KT) unbehandelt gelassen. Alle Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten und mit einer an Calcium armen Diät aus Karotten, trockenem Weißbrot und gekochten Kartoffeln ernährt (RANDOIN u. a.). Da Vorversuche gezeigt hatten, daß die Freßlust der VT bei der Behandlung mit EDTA stark nachließ und sie erheblich abmagerten, reduzierten wir die Nahrungsmengen der KT nach folgendem Prinzip: Für jedes VT wurde die an einem Tage aufgenommene Futtermenge in Prozent des entsprechenden, täglich kontrollierten Körpergewichts berechnet und das arithmetische Mittel aus den Werten der beiden VT einer Gruppe errechnet. Diese diente dann, als Prozentsatz auf das Körpergewicht des KT bezogen, zur Ermittlung von dessen Futtermenge.

Zur Bereitung der Injektionslösung wurde kristallinische EDTA¹ zu 10% in Aqua dest. gelöst, mit NaOH auf ein p_H von 7,3 eingestellt und im Autoclav sterilisiert.

Wir injizierten den VT der Gruppen I—IV, VII und VIII 150 mg/kg, den Gruppen V und VI 200 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich abwechselnd unter die Haut der beiden Flanken. Dabei gingen wir von folgenden Überlegungen aus: 200 mg/kg waren uns als intramuskulär glatt vertragene Einzeldosis mitgeteilt worden (BERSIN). Wir hatten in den Vorversuchen mit dieser Dosis, zweimal täglich subcutan injiziert, 3 VT innerhalb der ersten 14 Tage verloren; um eine gewisse Sicherheit zu haben, reduzierten wir sie deshalb bei den Gruppen, welche länger im Versuch bleiben sollten, auf 150 mg/kg.

Zur röntgenologischen Kontrolle der Calcium-Verluste des Skelets wurden zu Beginn und Ende der Versuchsreihen Aufnahmen unter Anwendung der vergleichenden Methode nach ENGSTRÖM gemacht (ENGSTRÖM u. a. 1948, 1949; MAINLAND).

Zur Erprobung der Versuchsbedingungen wurde zuerst Gruppe I injiziert, ohne daß wir Laboratoriumsuntersuchungen durchführten. Am 17. Tag starb ein VT unmittelbar nach der Abend-Injektion in einem heftigen klonischen Krampf. Darauf wurden das andere VT und das KT mit „Kemithal“ intravenös getötet. Während des Versuchs hatten die VT das gleiche Verhalten wie die Tiere der Vorversuche gezeigt — geringe Futteraufnahme bei zunehmender Apathie — und stark abgenommen, während das KT nur wenig an Gewicht verloren hatte.

Darauf wurde der Versuch mit den Gruppen II, III und IV über 14 Tage durchgeführt. Zu Beginn des Versuchs und am Ende der ersten sowie der 2. Woche kontrollierten wir folgende blutchemische Werte: a) das p_H , b) das freie und das totale CO_2 , c) das Calcium und den Phosphor und d) die alkalische Phosphatase; außerdem stellten wir eine Gesamt-Calcium-Bilanz für die Zeit des Versuchs auf.

Die Futteraufnahme war bei allen VT in den ersten Tagen sehr schlecht, vom 4. Tag an nahm sie zu. Am selben Tag lag ein VT der Gruppe IV morgens tot im Stall; die Sektion ergab keine Besonderheiten.

Da der Befund bei dem VT der Gruppe IV, welches am 4. Tag gestorben war, darauf hinwies, daß sich die wesentlichen Veränderungen am Knochen in den ersten Tagen abspielten, wurde von den Gruppen V—VIII jeweils eine am 3., 5., 7. und 9. Tag getötet, nachdem an denselben Tagen vorher die alkalische Phosphatase und das Calcium im Serum, sowie das p_H des Blutes bestimmt worden waren. Die Futteraufnahme war mäßig; alle VT waren zunehmend apathisch.

Die Sektion der Gruppen I—IV ergab allgemein eine starke Abmagerung und mäßige Anämie; bei den Gruppen V—VIII nahm sie mit der Versuchszeit zu. Unter den Injektions-

¹ Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure Dinatriumsalz purum, M. 336,22, der Fluka AG, Chemische Fabrik Buchs (St. Gallen).

stellen an den Flanken waren Subcutis und Panniculus carnosus ausgedehnt blutig verfärbt, miteinander verwachsen und, bei den 2 Wochen im Versuch gewesenen Gruppen, nekrotisiert und verhärtet. Sonst fanden sich keine Besonderheiten.

Von jedem Tier wurden Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, die Thyreoidea, sowie ein Stück des Quadriceps femoris, der Unterkiefer, 2 Lendenwirbel, beide Humeri, Femora und Tibiae und 2 Rippen mit Knorpel in neutralem Formalin 10%ig fixiert. Die Knochen wurden mit einer Schnellentkalkungsmethode (PLANK u. a.) entkalkt, alle Organe in Paraffin eingebettet und mit H. E. und nach VAN GIESON gefärbt, die Knochen auch mit Toluidinblau und mit der Versilberungsmethode nach GOMORY behandelt.

In den erwähnten Vorversuchen hatten wir uns einen ganz allgemeinen Eindruck von der Wirkung zu verschaffen gesucht, welche hohe Dosen von EDTA, über lange Zeit gegeben, auf den Organismus haben. Wir benutzten 6 Kaninchen von etwa gleichem Gewicht (etwa 2500 g) und injizierten fünf von ihnen die gleiche Lösung von EDTA wie im Hauptversuch; das sechste diente als Kontrolle. Als Dosis wählten wir, aus den schon erwähnten Überlegungen, $2 \times$ täglich 200 mg/kg. Die Tiere erhielten normales Futter, sonst entsprachen die Bedingungen denen des Hauptversuchs.

Zur Entkalkung benutzten wir für die Knochen der Tiere des Vorversuchs eine 0,5 M Lösung von EDTA, welche mit NaOH auf ein pH von 7,5 eingestellt und mit einem Veronal-Acetat-Puffer stabilisiert war. Bei der Entkalkung werden größere Mengen H-Ionen frei und das pH sinkt deshalb ohne Puffer schnell ab (NIKIFORUK u. a.). Die Knochen wurden hoch in eine Flüssigkeitssäule von etwa 20 cm gehängt und bei 37° C gehalten. Die Lösung wurde alle 2 Tage gewechselt. Unter diesen Bedingungen dauerte die Entkalkung 10 Wochen und 5 Tage (HUNTER u. a.; SREBNY u. a.).

2. Ergebnisse. Am Skelet finden sich wesentliche Veränderungen im Bereich des Epiphysenknorpels und der anschließenden Zone der enchondralen Verknöcherung.

I. Epiphysenknorpel

1. Kontrolltiere. Der Epiphysenknorpel der KT besteht aus einer schmalen Ruhezone zunächst der Epiphyse, einer Wucherungszone mit typischer Säulenbildung und einer anschließenden Hypertrophie- und Eröffnungszone. Die Zahl der Zellen in der Wucherungszone schwankt zwischen 30—45 pro Säule, in der Hypertrophie-Zone liegt sie in den ersten 4 Tagen zwischen 5 und 6, vom 7. bis zum 9. Tag zwischen 7 und 10, um am 15. und 17. wieder zu den Ausgangswerten zurückzukehren. Diese Zahlen gelten für die schnellwachsenden Epiphysen um das Kniegelenk; an den langsam wachsenden sind keine genauen Abgrenzungen möglich. Die Zellkerne sind klein, chromatinreich und stark basophil. Die Grundsubstanz ist in der Ruhezone blaß-blau oder -rot gefärbt, im Bereich des Säulenknorpels kräftig blau (H.-E.). Ihre Metachromasie ist überall gleich stark oder nimmt von der Hypertrophie- zur Wucherungszone geringfügig ab. Eine deutlich abgegrenzte Verkalkungszone fehlt. Zwischen den Zellsäulen ist die Grundsubstanz an vielen Stellen in der Längsrichtung fein aufgefaserter (Abb. 1).

2. Versuchstiere. Die Struktur des Epiphysenknorpels ist bei den VT dieselbe, Unterschiede bestehen nur bezüglich der Zahl der Zellen. Die Wucherungszone ist kürzer, und zwar am 3. Tag bis zu 14 Zellen, an den folgenden 4—8 Zellen durchschnittlich. Die Hypertrophiezone ist am 3., 5., 15. und 17. Tag 2—3 Zellen länger, am 7. und 9. sind keine Unterschiede vorhanden.

Bei dem VT A 261 finden sich in einem Tibia-Plateau darüber hinausgehende Veränderungen (Abb. 2). Der dorsale Teil des Epiphysenknorpels weist schwerste degenerative Veränderungen auf. Ein großer Teil der Zellen ist abgestorben. Es haben sich Spalten gebildet. Ein ganzes Stück, in einer Breite von 25 Zellsäulen, ist völlig abgetrennt worden. In der weiten Lücke liegen verstreute rote Blutkörperchen und Plasma. Der Knorpel ist hier nur ganz blaß-blau gefärbt. Er hat fast völlig seine Metachromasie verloren. Ein zellreiches Bindegewebe

ist durch das abgelöste Knorpelstück, welches sich umgedreht hat, leicht zusammengedrückt worden. Im ventralen Teil des Epiphysenknorpels findet sich, mit ziemlicher scharfer Abgrenzung, eine beträchtliche Verminderung der Metachromasie im Bereich der Wucherungszone.

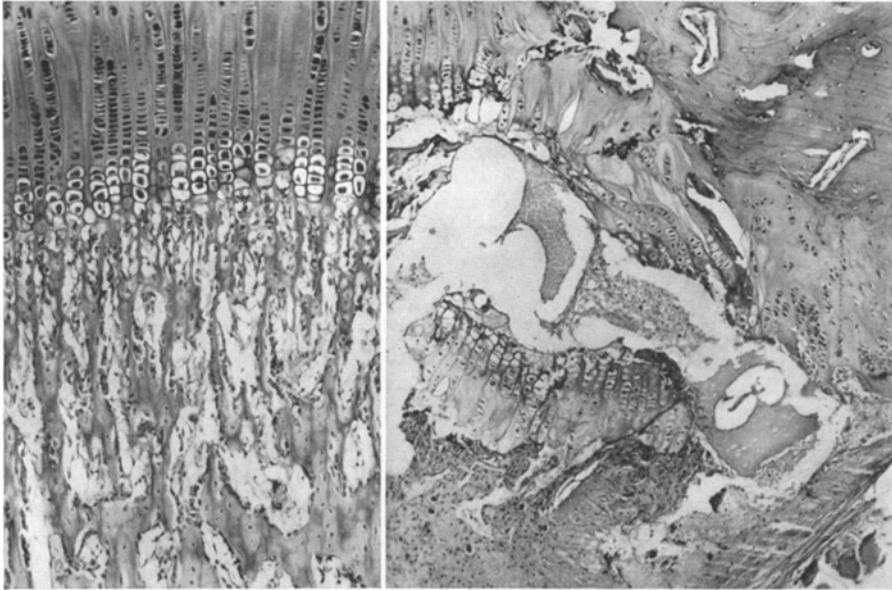


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Frontaler Schnitt durch die distale Femur-Epiphyse. (KT C 253) *KT vom 3. Tag. H. E.*
Normaler Epiphysenknorpel mit regelrechter enchondraler Verknöcherung

Abb. 2. Sagittaler Schnitt durch die proximale Tibia-Epiphyse. (VT A 261) *VT vom 5. Tag. H. E.*
Schwerste, degenerative Veränderungen des Epiphysenknorpels: Nekrosen von Chondrocyten, Spaltbildungen (Mitte oben). Ein Stück des Knorpels, in einer Breite von 25 Zellsäulen, ist abgetrennt (Mitte). In der weiten Lücke liegen verstreute Blutkörperchen und Plasma. Am Knorpel zahlreiche Chondroclasten. (Das freie Knorpelstück hat sich, vermutlich bei der Präparation, umgedreht)

II. Zone der enchondralen Verknöcherung

1. *Kontrolltiere.* Die normale enchondrale Verknöcherung geht in folgender Weise vor sich: An den Epiphysenknorpel schließen die dicht und regelmäßig angeordneten primären Knochenbälkchen an. Sie bestehen aus der knorpeligen Achse und aus einem knöchernen Mantel, welcher am Ursprung dünn ist und diaphysenwärts an Dicke zunimmt, so daß es vielfach zur Verschmelzung mehrerer Knochenbälkchen (2—4) kommt. Sie sind dicht mit Osteoblasten besetzt, teilweise in doppelter Schicht. Die Osteoblasten sind größtenteils kubisch und enthalten einen großen, hellen, blasigen Kern. An den Spitzen der Bälkchen sitzen sie gehäuft. Zwischen den Bälkchen ziehen prall mit roten Blutkörperchen gefüllte Capillaren bis zum Epiphysenknorpel, wo sie in der zuletzt eröffneten Knorpelkapsel eine ektatische Schlinge bilden. Diese Capillaren finden sich fast in jedem Zwischenraum.

Die mehr metaphysenwärts liegenden Knochenbälkchen zeigen den typischen Aufbau: wellenförmig gekerbte Reste des Epiphysenknorpels, umgeben von verschiedenen Schichten neugebildeten Knochens, dessen Knochenkörperchen sehr häufig in einer Kerbe des Knorpels liegen. Die Knochenbälkchen sind alle dicht mit Osteoblasten besetzt, welche denen der primären Knochenbälkchen gleichen. Besonders epiphysenwärts sitzen sie sehr dicht, in Kehlungen in regelrechten Nestern; diaphysenwärts sitzen einige kleine bis mittelgroße Osteoclasten in flachen Lacunen. Das umgebende Reticulum ist locker, nur um einzelne Bälkchen und in der Umgebung von Osteoclasten etwas verdichtet. Recht zahlreiche Capillaren und Sinus sind dicht mit roten Blutkörperchen gefüllt. Nahe den primären Knochen-

bälkchen sind einige blutbildende Zellen locker in das Reticulum eingestreut; diaphysenwärts nehmen sie dann zu und liegen um die am weitesten vorgeschobenen Bälkchen recht dicht, ohne jegliche Fettzellen. In den corticalen Verschmälerungszonen sind die Osteoclasten etwas zahlreicher, klein bis mittelgroß, und sitzen in seichten Lacunen. Nach außen geht das Reticulum in das dichtere, kollagene Fasern enthaltende Periost über.

Bei dem KT, welches am 5. Tag getötet wurde, sind die Osteoblasten und die Capillaren zwischen den primären Knochenbälkchen etwas vermindert. Bei dem KT des 7. Tages ist

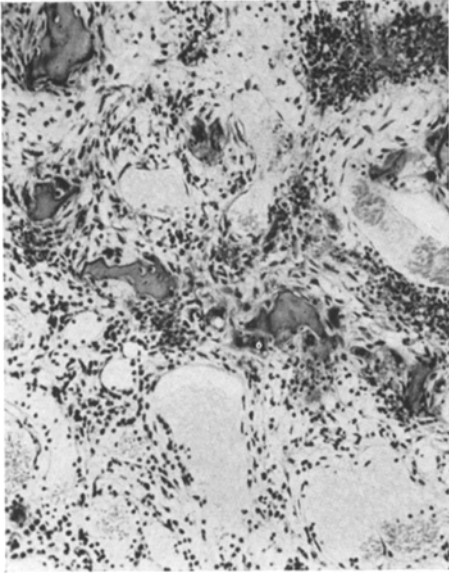


Abb. 3

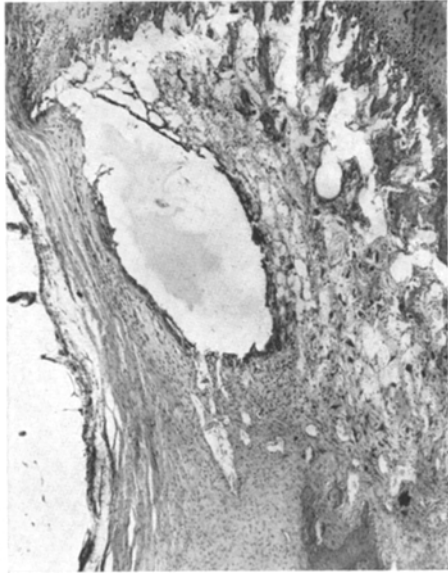


Abb. 4

Abb. 3. Sagittaler Schnitt durch die distale Femur-Epiphyse. (VT A 251) VT vom 3. Tag. H. E. An der Grenze zwischen Meta- und Diaphyse werden Reste von Knochenbälkchen von zahlreichen Osteoclasten resorbiert. Im Mark enorm erweiterte Sinus, welche einige Blutkörperchen und etwas Plasma enthalten. Ein großer (oben rechts) und mehrere kleine (Mitte) Nekroseherde

Abb. 4. Frontaler Schnitt durch die distale Femur-Epiphyse. (VT A 251) VT vom 3. Tag. H. E. Resorptionscyste, welche oben an den Epiphysenknorpel, links an das Periost grenzt. In der Umgebung und zwischen den primären Knochenbälkchen zahlreiche, erweiterte Sinus. Dazwischen Osteoclasten (dunkle Punkte)

darüber hinaus die Füllung der Capillaren etwas geringer. Bei dem KT des 9. Tages tritt zu dem gleichen Befund wie bei den vorhergehenden nun stellenweise eine vermehrte Osteoklasie. Bei den KT, welche am 15. Tag getötet wurden, sind wieder mehr Capillaren vorhanden, welche gut gefüllt sind. Die Osteoclasten sind recht zahlreich. Das KT des 17. Tages weist den gleichen Befund auf.

2. Versuchstiere. Bei den VT der Gruppe, welche am 3. Tag getötet wurde, kann man folgenden Befund erheben: Die primären Knochenbälkchen erscheinen nicht verändert, jedoch besteht ihr Endost nur noch zum geringen Teil aus kubischen Osteoblasten; es überwiegen spindelförmige Zellen mit kleinen, dunklen Kernen. Vielfach finden sich kleinste Herde mit pyknotischen Kernen und karyorrhektischen Trümmern. Die Capillaren sind gering an Zahl und nur spärlich gefüllt.

Die metaphysären Bälkchen liegen in einem ziemlich dichten Reticulum. Osteoblasten fehlen hier fast vollkommen. Zahlreiche Osteoclasten resorbieren den Knochen (Abb. 3). Besonders an der Grenze zwischen Meta- und Diaphyse,

aber auch mehr epiphysenwärts, finden sich Nekroseherde verschiedenster Größe; sie bestehen zumeist aus einer eosinophilen Masse, wabig oder faserig-bröckelig verteilt, darin Kerne in allen Stadien der Pyknose und Karyorrhesis. Vielfach liegen am Rande dieser Herde Riesenzellen vom Typ der Osteoclasten. Sie gehen teilweise aus Capillarendothelien hervor. Das Protoplasma aller dieser Riesenzellen enthält meist große Vacuolen, die Ränder sind oft unscharf und zerfließlich, ihre Kerne jedoch durchweg unverändert. An einzelnen Stellen

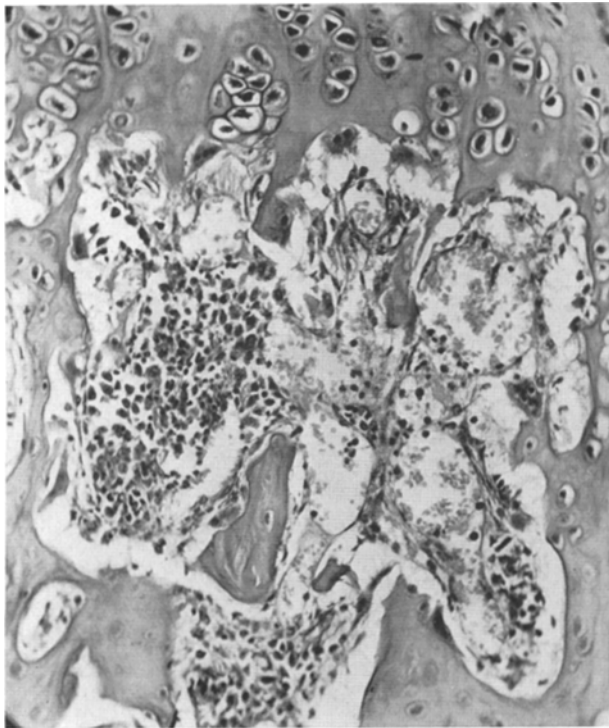


Abb. 5. Frontaler Schnitt durch die Knorpel-Knochengrenze einer Rippe. (VT A 261) VT vom 5. Tag. H. E. Die primären Knochenbälkchen sind größtenteils abgetragen. Im Mark zahlreiche, stark dilatierte Sinus, welche im Verein mit Osteo- bzw. Chondroelasten Knochen und Knorpel resorbieren. Dazwischen eingestreute Blutbildungsherde

schließen diese Osteoclasten noch kleine Reste von Knochen-substanz ein. Kleine Nekroseherde können nur aus eosinophiler Masse und vereinzelten Kernbruchstücken bestehen, andere wieder nur aus pyknotischen Kernen und Kernbruchstücken. Bei dem einen VT sind die Herde zahlreich und ausgedehnt, bei dem anderen sind sie nur klein und spärlich. In der Metaphyse und besonders an der Grenze zur Diaphyse, sowie in den corticalen Verschmälerungszonen, sind die Sinus sehr zahlreich und enorm erweitert; sie enthalten teilweise rote Blutkörperchen und Plasma. In den Verschmälerungszonen sind sie leer. Blutbildende Zellen fin-

den sich erst weiter diaphysenwärts. Alle diese Veränderungen finden sich nur in den schnellwachsenden Epiphysen um das Knie, angedeutet im Schenkelkopf. An einem Femurkondyl wird die eine corticale Verschmälerungszone größtenteils von einer längsovalen, etwa 0,8 mm langen Resorptionscyste eingenommen (Abb. 4), welche von einigen zirkulären Zügen dichterem, reticulären Gewebes abgegrenzt ist. Sie berührt den Epiphysenknorpel und dehnt sich entlang dem Corticalisperiost diaphysenwärts aus, umgeben von zahlreichen Riesenzellen vom Osteoclastentyp. Das Reticulum enthält hier erweiterte Sinus in dichter Anordnung. Die Epiphysen der *Wirbelkörper* und die Knorpel-Knochengrenzen der *Rippen* sowie die Unterkiefer sind ohne faßbare Veränderung.

Bei den VT der Gruppe, welche am 5. Tag getötet wurde, bestehen größere Unterschiede im Charakter und Ausmaß der Veränderungen. Bei VT A sind die primären Knochenbälkchen bis auf einzelne Stummel völlig abgetragen (Abb. 5). Der Epiphysenknorpel ist an seiner Unterseite unregelmäßig ausgebuchtet und gezackt. Er wird von erweiterten Sinus gesäumt, welche mit Plasma und darin verstreuten, roten Blutkörperchen gefüllt sind und welche, im Verein mit sehr zahlreichen Chondroklasten, den Knorpel resorbieren. Im dorsalen Teil des Tibia-Plateaus mit der beschriebenen Epiphysiolyse finden sich an Stelle der Sinus große

Resorptionscysten (Abb. 6). Die metaphysären Bälkchen weisen erhebliche Resorptionserscheinungen auf. Sie sind von Zügen verdichteten Reticulums umgeben, welches sie mittels zahlreicher Osteoclasten und enorm erweiterter, jetzt größtenteils leerer Sinus abbaut. Vielfach sind die Sinus zu größeren Hohlräumen zusammengefloßen. Zwischen ihnen liegen im Reticulum locker eingestreute, blutbildende Zellen, welche vielfach herdförmig nekrotisiert sind. Mehr diaphysen-

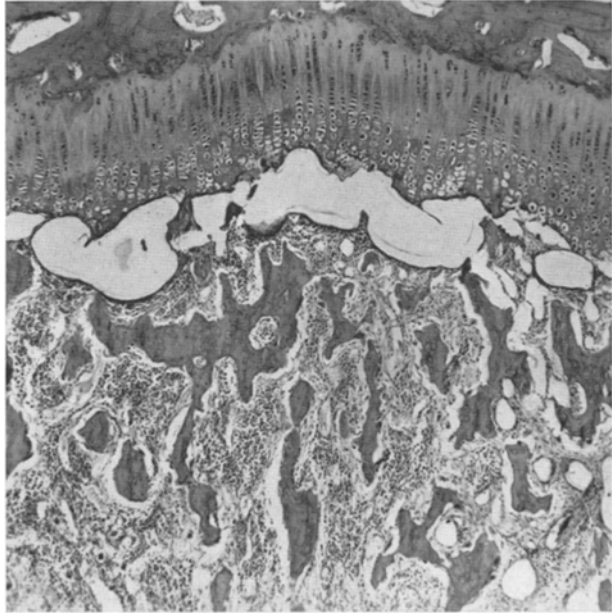


Abb. 6. Sagittaler Schnitt durch die proximale Tibia-Epiphyse. (VT A 261) VT vom 5. Tag. H. E. Der Epiphysenknorpel ist durch Resorptionsvorgänge unregelmäßig gebuchtet. Die leeren Räume sind Resorptionscysten. Die metaphysären Knochenbälkchen werden von einem reticulären Bindegewebe mit zahlreichen Osteoclasten und erweiterten Sinus (besonders rechts) abgebaut. Dazwischen locker eingestreut blutbildende Zellen

wärts sind die Sinus mit Plasma und roten Blutkörperchen gefüllt. Diese Veränderungen finden sich durchgehend an allen untersuchten Epiphysen. An den Unterkiefern lassen sich keine Unterschiede zum KT feststellen.

Bei VT B sind die Veränderungen weniger weitgehend. Die primären Knochenbälkchen sind, besonders zentral, zu einem beträchtlichen Teil verkürzt oder vollständig abgetragen. Häufig findet sich an ihrer Stelle ein schmaler, neugebildeter Knochensaum; daneben werden Knochenreste und Knorpel von dem reticulären Mark und gelegentlich von Osteo- bzw. Chondroclasten abgebaut. Die Osteoblasten sind nur zum kleineren Teil kubisch, die wenigen Capillaren spärlich mit Erythrocyten gefüllt. Unmittelbar unter den primären Knochenbälkchen beginnt das blutbildende Mark. Die metaphysären Bälkchen sind kaum verändert, ihr Endost ist wenig aktiv. Vereinzelt finden sich kleinste Nekroseherde, welche aus einigen pyknotischen Kernen und Kerntrümmern bestehen.

Im *Schenkelkopf* weisen die primären Knochenbälkchen und ihr Endost die gleichen Veränderungen auf wie die der schnellwachsenden Epiphysen, während die Metaphyse praktisch keine Unterschiede zum KT bietet. Auch die Epiphysen der *Wirbelkörper* und die Knorpel-Knochengrenzen der *Rippen* lassen, außer einem etwas weniger aktiven Endost, keine Unterschiede zu den entsprechenden des KT erkennen. Die Unterkiefer der VT sind gegenüber dem KT nicht verändert.

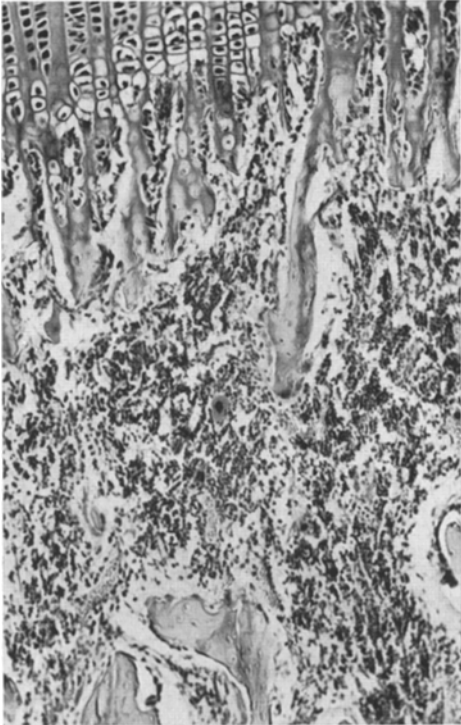


Abb. 7. Sagittaler Schnitt durch die distale Femur-Epiphyse. (VT A 281) VT vom 7. Tag. H. E. Primäre Knochenbälkchen verkürzt. Osteoblasten in mäßiger Menge, einige Osteoclasten, praktisch keine Capillaren. Zwischen primären und metaphysären Bälkchen findet sich eine Lücke, die „knochenarme Markzone“, welche durch die voraufgegangene Knochenresorption entstanden ist. Das Mark ist ausschließlich blutbildend. Die metaphysären Bälkchen sind porotisch, ihr Endost wenig aktiv

Bei den VT der Gruppe, welche am 7. Tag getötet wurde, sind die primären Knochenbälkchen vorwiegend verkürzt und lückenhaft, sie können stellenweise aber auch normal erscheinen (Abb. 7). Osteoblasten sind ziemlich häufig, Osteoclasten im allgemeinen zahlreich. Capillaren sind spärlich oder kaum vorhanden. Besonders charakteristisch ist die Atrophie der metaphysären Bälkchen, welche teilweise hochgradig sein kann. Ihre Schicht ist oft verschmälert und es findet sich eine Lücke zwischen ihnen und den primären Bälkchen. Sie sind von Zügen verdichteten Reticulums umgeben, welches zahlreiche Osteoclasten enthält, sowohl an den Bälkchen, wie auch frei im Mark. Osteoblasten sind hier nur spärlich vorhanden. In den corticalen Verschmälernungszonen sind die Trabekel fast immer atrophisch, das reticuläre Mark enthält viele Osteoclasten; Capillaren und Sinus sind in wechselnder Menge vorhanden, überwiegend mit Plasma gefüllt. In der Metaphyse ist das blutbildende

Mark wechselnd, bald locker, bald dicht angeordnet, kann aber auch fehlen. An diesen Stellen sind die Reticulocyten vermehrt. Die Stase ist geringer als bei der vorigen Gruppe; bei einem VT sind die Endothelzellen stellenweise geschwollen. Gelegentlich findet sich eine Dilatation der Sinus an der Grenze zwischen Meta- und Diaphyse.

Der Befund am *Schenkelkopf* ist der gleiche wie an den schnellwachsenden Epiphysen. An den *Wirbelkörper-epiphysen* sind die primären Knochenbälkchen zum größten Teil völlig abgetragen. Der Knorpel liegt entweder frei, oder es ist eine feine Leiste neuen Knochens entlang der Platte angebaut worden. Osteoblasten sind nur in mäßiger Zahl vorhanden, Osteoclasten ziemlich viele. An den *Rippen* erscheinen die primären Knochenbälkchen etwas kürzer und stehen

nicht ganz regelmäßig. Das Endost ist normal. An den *Unterkiefern* wiederum kein vom KT abweichender Befund.

Bei den VT der Gruppe, welche am 9. Tag getötet wurde, sind die primären Knochenbälkchen durchweg verkürzt. Die Osteoblasten sind meist ziemlich zahlreich, Osteoclasten finden sich mäßig viele. Die Zahl der Capillaren ist sehr wechselnd, sie sind jedoch immer nur wenig gefüllt. Die Schicht der metaphysären Bälkchen ist durchweg porotisch, viele Bälkchen zeigen noch Spuren einer lacunären Resorption. Auch hier findet sich wieder die Lückenbildung zwischen den primären und den metaphysären Knochenbälkchen. Um die letzteren liegen Züge verdichteten Reticulums mit recht zahlreichen Osteoclasten und im allgemeinen wenig Osteoblasten. Blutbildendes Mark beginnt erst weit unterhalb der primären Bälkchen, abgesehen von einzelnen Stellen, wo solche Zellen locker eingestreut im Reticulum liegen. Die corticalen Versmälnerungszonen sind durchweg erheblich porotisch; ihr Mark ist reticulär, mit zahlreichen Osteoclasten und wenig Osteoblasten. Die Stase der Sinus ist nur noch gering, praktisch von der beim KT nicht zu unterscheiden.

Am *Schenkelkopf* sind, vor allem zwischen Kopf und Trochanter, recht viele Bälkchen

abgetragen; vor den Stummeln kann quer ein Chondroclast liegen. Die Osteoblasten und die Capillaren sind im Bereich des eigentlichen Schenkelkopfes noch am häufigsten. Die metaphysären Bälkchen weisen noch vereinzelt Spuren einer voraufgegangenen lacunären Resorption auf, im allgemeinen erscheinen sie aber normal. Das Endost ist wenig aktiv. Das Mark besteht aus mäßig bis ziemlich viel blutbildenden Zellen. An den *Wirbelkörper-epiphysen* fehlen die primären Knochenbälkchen fast vollständig. An ihrer Stelle findet sich eine dünne Leiste neugebildeten Knochens entlang dem Knorpel. Osteoblasten, vor allem aber Osteoclasten sind recht häufig. Die großen Stützbalken weisen gelegentlich Spuren einer voraufgegangenen, lacunären Resorption auf. An den Knorpel-Knochengrenzen der *Rippen* sind die primären Knochenbälkchen verkürzt, die metaphysären sind hochgradig atrophisch, fehlen voll-

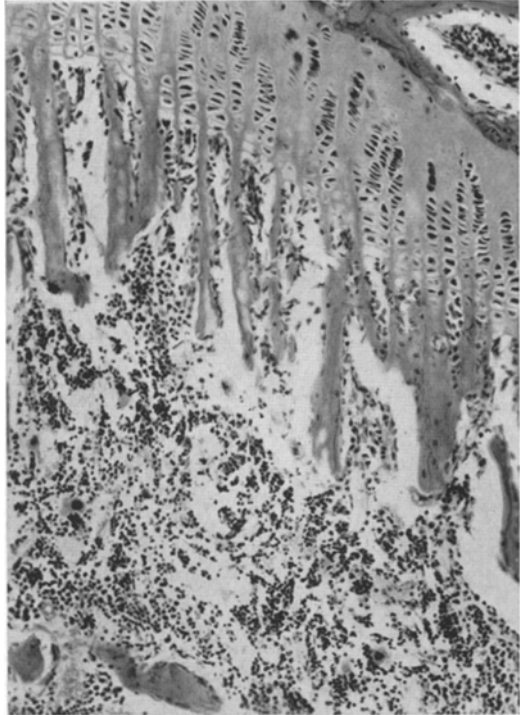


Abb. 8. Sagittaler Schnitt durch die proximale Tibia-Epiphyse. (VT A 4) VT vom 15. Tag. H. E. Lückenhafte, verkürzte primäre Knochenbälkchen; Osteoblasten in geringer Menge, einige Osteoclasten, praktisch keine Capillaren. Auch hier findet sich wieder die „knochenarme Markzone“ zwischen primären und metaphysären Bälkchen. Das Mark besteht aus blutbildenden Zellen. Die metaphysären Bälkchen sind hochgradig porotisch.

ständig oder weisen Spuren lacunärer Resorption auf. Osteoblasten und Capillaren sind gegenüber dem KT etwas vermindert, Osteoclasten sind etwa in normaler Zahl vorhanden. Das Mark besteht aus locker bis dicht liegenden, blutbildenden Zellen. An den Unterkiefern wieder keine faßbaren Unterschiede zum KT.

Bei den VT der Gruppen, welche am 15. Tag getötet wurden, sind die primären Knochenbälkchen lückenhaft. Sie tragen stellenweise Spuren einer vorausgegangenen, lacunären Resorption. Sie sind kürzer und ihr Endost ist weniger aktiv, d. h. die Osteoblasten sind geringer an Zahl und vielfach flach. Osteoclasten sind in wechselnder Menge vorhanden. Capillaren sind selten und ihre Füllung ist gering. Die metaphysären Knochenbälkchen sind hochgradig porotisch (Abb. 8); zwischen ihnen und den primären findet sich wieder die Lücke, in wechselnder Breite, aber immer deutlich ausgeprägt. Sie erstreckt sich, in wechselnden Abständen von Trabekeln unterbrochen, welche die primären Knochenbälkchen mit den metaphysären verbinden, parallel zum Epiphysenknorpel. Das Endost der metaphysären Bälkchen besteht aus großenteils flachen Osteoblasten und einer wechselnden Zahl Osteoclasten. Das Mark besteht ausschließlich aus locker liegenden, blutbildenden Zellen; dazwischen wenige enge, spärlich gefüllte Capillaren. Die Bälkchen der corticalen Verschmälерungszonen sind hochgradig porotisch. Das Mark ist reticulär, Osteoblasten und -clasten finden sich in etwa normaler Verteilung.

An den langsam wachsenden Epiphysen des *Schenkelkopfes* und der *Wirbelkörper* säumt teilweise nur ein schmaler Streifen neugebildeter Knochenhöcker den Epiphysenknorpel. Im übrigen gleicht der Befund dem an den schnellwachsenden Epiphysen.

Bei dem VT, welches am 4. Tag gestorben ist, sind praktisch alle primären Knochenbälkchen abgetragen. Der Knorpel und die Knochenreste unterliegen einem außergewöhnlich starken, chondro- bzw. osteoclastischen Abbau. Unter dem Knorpel finden sich kleine Blutungen, welche teilweise schon resorbiert sind; es bleiben dann Cysten. Die metaphysären Bälkchen befinden sich ebenfalls in hochgradigem, osteoklastischem Abbau. Das Mark besteht ausschließlich aus blutbildenden Zellen mit mäßig vielen, gut gefüllten Capillaren und Sinus. Im Bereich der Corticalis-Dreiecke fehlen die blutbildenden Zellen und das Mark ist rein reticulär.

Auch bei dieser Gruppe finden sich keine deutlichen Veränderungen an den Unterkiefern.

Der Befund bei den VT des 17. Tages entspricht dem der vorhergehenden.

Von den Tieren des Vorversuchs haben nur 3 VT noch offene Epiphysenfugen, jedoch hat der Knorpel offensichtlich nicht mehr proliferiert, so daß eine sichere Beurteilung der Veränderungen der enchondralen Ossifikation nicht möglich ist. Immerhin haben diese Befunde den Anstoß zur Untersuchung im Wachstum befindlicher Tiere gegeben.

III. Muskulatur

Sowohl bei den VT des Vorversuchs, wie auch bei den Tieren, welche am 15. Tag getötet wurden, finden sich teilweise beträchtliche Veränderungen sowohl in der Herz- als auch in der Skelettmuskulatur im Sinne einer Atrophie. Bei den KT lassen sich weitgehend dieselben Befunde erheben.

IV. Nieren

Bei den Tieren des Vorversuchs wie bei den Gruppen, welche am 15. Tag getötet wurden, sieht man nur geringe Veränderungen, welche im wesentlichen in einer Schwellung von Epithelien der Tubuli bestehen. Wiederum sind auch bei den KT teilweise dieselben Befunde zu erheben.

V. Röntgenologische Untersuchung

Die Untersuchung der Tiere des Vorversuchs und der Gruppen, welche am 15. Tag getötet wurden, hat bei den VT keine faßbaren Unterschiede zu den KT ergeben.

VI. Laboratoriums-Untersuchungen

Über die Ergebnisse wird an anderer Stelle (REMAGEN u. a.) ausführlich berichtet werden. Hier seien nur kurz die wesentlichen Befunde mitgeteilt. Wir fanden:

1. eine signifikante Erniedrigung des Serum-Calciumsspiegels;
2. eine signifikante Erhöhung der Calciumausscheidung;
3. einen signifikanten Abfall der Aktivität der alkalischen Serum-Phosphatase und
4. bei den Gruppen II—IV, am 8. Tag signifikante Veränderungen des p_H des Blutes im Sinn einer Alkalose.

C. Diskussion

In der Entwicklung der histologischen Veränderungen an den *Epiphysenfugen* lassen sich deutlich zwei Phasen unterscheiden. Die erste umfaßt die ersten 4 Tage und ist durch folgende Veränderungen gekennzeichnet: teilweise massive und ausgedehnte Zirkulationsstörungen mit ihren Folgen und lebhaften Abbau von Knochengewebe. In der zweiten Phase werden die zirkulatorischen Störungen dann größtenteils ausgeglichen, der Knochenabbau läßt nach und macht einer Atrophie Platz. Beiden Phasen gemeinsam sind Veränderungen am Epiphysenknorpel, welche in einem verminderten Wachstum und einer verlangsamten Resorption bestehen.

Die Ernährung des Epiphysenknorpels erfolgt durch Diffusion von der Metaphyse her. Die verringerte Zahl und mangelhafte Füllung der Capillaren, welche zwischen den primären Knochenbälkchen aufsteigen, haben eine Abnahme dieses Diffusionsstroms in beiden Richtungen im Gefolge, wodurch die Voraussetzungen für ein normales Längenwachstum des Knorpels fehlen. Die Verlängerung der Hypertrophie- und Eröffnungszone ist ebenfalls auf die Verringerung der Capillaren und einen damit verbundenen langsameren Abbau zurückzuführen. Die Tatsache, daß bei den KT diese Zone, mit der abnehmenden Zahl und Füllung der Capillaren, gleichfalls an Länge zunimmt und am 15. und 17. Tag, wenn die Capillaren wieder zahlreich sind, zur alten zurückkehrt, ist eine weitere Stütze für unsere Ansicht. Es wäre auch denkbar, daß bei den VT eine mangelhafte Verkalkung des Epiphysenknorpels seinen regelrechten Abbau verzögert.

Die Zirkulationsstörungen der ersten Phase drücken sich in der enormen Dilatation und Stase der Sinus aus, welche zu den teilweise ausgedehnten Marknekrosen geführt haben. Diese Erscheinungen sind eng verzahnt mit dem Knochenabbau, da die Gefäße und das Reticulum mit seinen gehäuften Osteoclasten dabei zusammenwirken; dieser Prozeß erreicht seinen Höhepunkt ungefähr am 5. Tag. Es ist bezeichnend, daß vor allem die schnellwachsenden

Epiphysen um das Kniegelenk betroffen werden und nur bei schwersten Veränderungen, wie wir sie bei dem VT des 5. Tages fanden, auch die langsam wachsenden beteiligt sind. Wir vermuten, daß die normalerweise schon sehr lebhaften Stoffwechselvorgänge in den ersteren die Entwicklung der beobachteten Störungen begünstigen. Der Knochenanbau ist während dieser Zeit wohl als äußerst gering einzuschätzen, wenn nicht völlig stagnierend.

Trotz ihres Ausmaßes sind die Veränderungen, welche den ersten Abschnitt kennzeichnen, doch relativ flüchtig, denn schon am 7. Tag sind im wesentlichen nur noch ihre Spuren zu finden. Die Zirkulationsstörungen sind fast völlig verschwunden. Der Knochenabbau hat nachgelassen, wenn sich auch Osteoclasten noch vermehrt finden. Nekrosen oder Nekrobiosen von Osteocysten haben sich in keinem Fall gefunden. Der Knochenanbau wird hauptsächlich an den primären Knochenbälkchen wieder aufgenommen, während die metaphysären noch längere Zeit die Spuren der vorausgegangenen Resorption aufweisen. Besonders der Raum zwischen den primären und den metaphysären Bälkchen, welcher dem Bezirk stärkster Resorption entspricht, wird nicht wieder mit Knochen aufgefüllt, sondern bildet eine „knochenarme Markzone“, welche bei den VT des 15. und 17. Tages am deutlichsten erkennbar ist.

Der Knochenabbau ist wohl als Calcium-Mobilisation zum Ausgleich der Verluste infolge Komplexbildung und Ausscheidung aufzufassen.

Es ist erstaunlich, daß die Kiefer, welche sonst beim Kaninchen mit zu den zuerst und am stärksten betroffenen Knochen gehören, in diesen Experimenten von den pathologischen Veränderungen nicht berührt werden. Die Klärung der Ursache für die Zirkulationsstörungen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung

Vergiftung im Wachstum befindlicher Kaninchen mit großen Dosen des Komplexbildners Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure, wobei die Tiere am 3., 5., 7., 9., 15. und 17. Tag getötet wurden, führte zu folgenden Befunden am Skelet:

Veränderung des Epiphysenknorpels im Sinne einer Verlangsamung der Zellwucherung und der Knorpelresorption;

in den ersten 4 Tagen zu schweren Zirkulationsstörungen im Bereich der Metaphysen, besonders der langen Röhrenknochen, mit Entstehung teilweise ausgedehnter Marknekrosen; daneben zu einem intensiven Abbau von Knochen durch ein reticuläres Bindegewebe mit zahlreichen Osteoclasten und Gefäßen, bei fast völligem Stillstand des Knochenanbaus;

in den folgenden Tagen zu einem Ausgleich der Zirkulationsstörungen und einem Nachlassen des Knochenabbaus, geringer Wiederaufnahme des Knochenanbaus, vorwiegend an den primären Knochenbälkchen, bei fortbestehender Atrophie der metaphysären und Ausbildung einer „knochenarmen Markzone“ zwischen beiden.

Summary

Rabbits were given large doses of the chelator — EDTA — by subcutaneous injection during growth. The animals were sacrificed on the 3, 5, 7, 9, 15 and 17th days, and the following skeletal findings were made:

The changes in the epiphyseal cartilage were characterized by a delay in cell growth and in cartilage resorption. In the first 4 days severe circulatory

disturbances appeared in the region of the metaphysis, — especially those of the long bones, with the development of in part extensive marrow necroses. At the same time there was an intensive removal of bone by a reticular connective tissue rich in osteoclasts and blood vessels. An almost complete cessation of bone formation occurred.

In the subsequent days the circulatory disturbances equalized and the bone resorption diminished. There was a slight resumption of bone formation, principally of the primary bony trabeculae. Atrophy in the metaphyseal trabeculae continued, and a bone-poor medullary zone formed between the trabecular regions.

Literatur

- BELLIN, J., and D. LASZLO: Metabolism and removal of Ca^{45} in man. *Science* **117**, 331 (1953). — BERSIN, TH.: Persönliche Mitteilung 1956. — BERSIN, TH., u. H. SCHWARZ: Über die Ausscheidung des Ca-aethylendiamintetraessigsäuren Na im Harn. *Schweiz. med. Wschr.* **83**, 765 (1953). — CLARKE, N. E., C. H. CLARKE and R. E. MOSHER: The 'in vivo' dissolution of metastatic Calcium. An approach to atherosclerosis. *Amer. J. med. Sci.* **229**, 142 (1955). — DELVAUX, E. L.: Les Versènes. Une nouvelle série d'agents complexants organiques. *J. Pharm. Belg.* **7** (11—12), 505 (1952). — DUDLEY, H. R., A. C. RITCHIE, A. SCHILLING and W. H. BAKER: Pathological findings associated with the use of Na-EDTA in the treatment of hypercalcaemia. *New Engl. J. Med.* **252**, 331 (1955). — ENGSTRÖM, A., L. WEGSTEDT and S. WELIN: A simple portable densitometer. *Acta radiol. (Stockh.)* **30**, 440 (1948). — ENGSTRÖM, A., and S. WELIN: A method for the quantitative roentgenological determination of the amount of Calcium salts in bone tissue. *Acta radiol. (Stockh.)* **31**, 483 (1949). — FOREMAN, H.: The use of chelating agents for accelerating excretion of radioelements. *J. Amer. pharm. Ass.*, **42**, 629 (1953). — FOREMAN, H., and T. T. TRUJILLO: The metabolism of Ca^{14} labelled EDTA-Ca in human beings. *J. Lab. clin. Med.* **43**, 566 (1954). — HOLLAND, J. F., E. DANIELSON and A. SAHAGIAN-EDWARDS: Use of EDTA in hypercalcaemic patients. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **84**, 359 (1953). — HUNTER, H. A., and G. NIKIFORUK: Staining reactions following demineralization of hard tissues by chelating and other decalcifying agents. *J. dent. Res.* **33**, 136 (1954). — MAINLAND, D.: Measurement of bone density. *Ann. rheum. Dis.* **15**, 115 (1956). — NIKIFORUK, G., and L. SREEBNY: Demineralization of hard tissues by organic chelating agents at neutral pH. *J. dent. Res.* **32**, 859 (1953). — PLANK, J., und A. RYCHLO: Eine Schnellentkalkungsmethode. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **89**, 252 (1952/53). — POPOVICI, A., C. F. GESCHICKTER, A. REINOVSKY and M. RUBIN: Experimental control of serum Calcium levels in vivo. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **74**, 415 (1950). — RANDOIN, L., P. LE GALLIC et J. CAUSERET: Tables de composition des aliments. *J. Lanore*, éd., Paris. — REIFENSTEIN jr., E. C.: Josiah Macy jr. Foundation, 3.—5. Conference on metabolic interrelations, 1951—1953. **3**, 355 (1953). — REMAGEN, W., und M. C. SANZ: (im Druck). — RIEDERS, F.: Effect of oral Na_2Ca EDTA on urinary and fecal excretion of lead in rabbits. *Fed. Proc.* **13**, 397 (1954). — SPENCER, H., J. GREENBERG, E. BERGER, M. PERRONE and D. LASZLO: Studies of the effect of EDTA in hypercalcaemia. *J. Lab. clin. Med.* **47**, 29 (1956). — SPENCER, H., V. VANKINSCOTT, J. LEWIN and D. LASZLO: Removal of Calcium in man by EDTA. A metabolic study. *J. clin. Invest.* **31**, 1023 (1952). — SREEBNY, L. M., and G. NIKIFORUK: Demineralization of hard tissues by organic chelating agents. *Science* **113**, 560 (1951).

Dr. W. REMAGEN, Institut Pasteur, Laboratoire des Isotopes,
25, rue du Docteur Roux, Paris XV.