

Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 9 (1953)

Heft: 3-4: Zehn Jahre Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften : Herrn Prof. Dr. A. Gigon zum 70. Geburtstag

Artikel: Das periostäre Gewebe des normalen und frakturierten Knochens in der Gewebeskultur

Autor: Allgöwer, M. / Rosin, A.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-307138>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 11.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Arbeitsberichte¹
Comptes rendus sur les recherches scientifiques²

D. K. 617.71.001.5.018.9; 611.71.018.9

Aus der chirurgischen Universitätsklinik Basel

Vorsteher: Prof. Dr. O. M. Schürch †

**Das periostäre Gewebe des normalen und frakturierten
Knochens in der Gewebeskultur**

Von **M. Allgöwer** und **A. Rosin³**

Die Rolle des Periostes in der Frakturheilung ist bis in die neueste Zeit umstritten geblieben. Die Frage geht dahin, ob das ruhende Periost unter dem Verletzungsreiz aktiviert wird oder ob unter gewissen vom Knochen ausgehenden physikalisch-chemischen Einflüssen unspezifische Mesenchymzellen zu Osteoblasten werden können (*Policard, Leriche, Lacroix, Annersten, Levander* u. a.). Es ist für die operative Frakturbehandlung von großer Wichtigkeit, welche Bedeutung man dem Periostschlauch zuzuschreiben hat. Das Problem wurde in letzter Zeit von *Roth* ausführlich diskutiert, und wir verweisen auf diese Arbeit für eingehende Literaturhinweise.

Im Gesamtorganismus wirken bei jedem reparativen Aufbau eine Fülle von schwer übersehbaren Faktoren mit. Es hat darum nicht an Versuchen gefehlt, die Gewebekultur unter gut kontrollierbaren Bedingungen zur Abklärung des Ossifikationsvorganges herbeizuziehen.

Die ersten bekanntgewordenen Züchtungsversuche von Periost verschiedener, meist sehr junger Tiere ergaben lediglich Fibroblastenkulturen, ohne Bildung von Knochen (*Wjereszinski, Policard* und *Bocharlad*). *Doljanski* beobachtete in Kulturen des embryonalen Os frontale vom Huhn Zellen vom Osteoblastentypus. Später ist es *H. B. Fell* gelungen, in Periostkulturen von 6–10tägigen Hühnerembryonen und in «Endostkulturen» später Embryonalstadien sowie unmittelbar post-

¹ Über Forschungen, welche von der Schweiz. Akademie der medizinischen Wissenschaften finanziell unterstützt worden sind.

² Executées à l'aide de subventions de l'Académie suisse des sciences médicales.

³ Dept. Exp. Pathology, Hebrew University, Jerusalem.

embryonaler Stadien Ossifikationen im Bereich des Explantates zu erzielen. Auch *Gaillard* hat in embryonalen Rattenknochen in der Kultur enchondrale und perichondrale Ossifikation beobachtet, wenn er zur Züchtung Embryonalextrakte verwendete, die entsprechend dem zunehmenden Alter der Kultur von Embryonen späterer Stadien hergestellt waren.

Niven, und vor kurzem *Bucher*, haben in vitro die Heilung von Frakturen embryonaler Knochen beobachtet. Beide konnten den Neubau kleiner Knochenbälkchen erzielen, offenbar ausgehend von den die Knochenbälkchen unmittelbar umgebenden Zellen.

Das Material der bis jetzt publizierten positiven Versuche über Knochenbildung in vitro stammte von Embryonen oder von Tieren der ersten Tage des postembryonalen Lebens. Über das Verhalten des postembryonalen menschlichen Periostes in der Kultur besitzen wir bis jetzt keine Angaben. Wir haben deshalb versucht, durch Explantation von periostalem Gewebe verschiedener Art weitere Aufklärung über die zellulären und histo-chemischen Vorgänge bei der Knochenheilung zu gewinnen. Dabei haben wir folgende vom Menschen stammende Gewebe untersucht:

1. Ruhendes Periost.
2. «Fraktur-Periost», gewonnen zwischen 0 und 150 Tagen nach der Fraktur.
3. «Pseudarthrosenperiost.»
4. Gewebe in der Nähe von Osteosynthese-Metallen.

Zur Ergänzung der Versuche über die Wachstumspotenzen des menschlichen Frakturperiostes in vitro wurden Versuche an Tieren gemacht. Es wurde Ratten in Äthernarkose ein Unterschenkel gebrochen und die Ratten zu verschiedenen Zeiten nach der Fraktur getötet. Das periostäre Callusgewebe wurde dann teils explantiert und teils histologisch untersucht.

Über die Resultate dieser Untersuchungen mit menschlichem und tierischem Periost soll in der vorliegenden Arbeit berichtet werden.

Material und Technik

A. Material

1. Menschliches Gewebe

Ruhendes Periost. Die Entnahme erfolgte an der medialen Tibiakante bei Anlaß von Spanentnahmen, von der Vorderfläche der Rippen bei Thoraxoperationen oder von anderen Skeletteilen bei verschiedenen anderen Operationen. In einem Fall wurde eine Stunde post mortem Periost der Tibia und der Rippe entnommen. Es wurde streng

darauf geachtet, nur eindeutig weißliches Periost sorgfältig mit dem scharfen Raspatorium zu entnehmen und sichtbare Gefäßbezirke zu vermeiden. Besonders gut gelang dies an der medialen Tibiakante. Das Ausgangsmaterial wurde histologisch untersucht. Im ganzen wurden 22 verschiedene Entnahmen gemacht.

«*Frakturperiost.*» Dieses wurde gewonnen bei der operativen Versorgung von Frakturen verschiedener Knochen in ungleichen Zeitabständen nach dem Frakturereignis. Es wurde darauf geachtet, möglichst frakturnahes periostäres Callusgewebe zu entnehmen. Schon 8–10 Tage nach der Fraktur wurde dabei oft ein ziemlich dickes, gut schneidbares, rötliches Gewebe beobachtet. Das Ausgangsmaterial wurde histologisch untersucht. Ein typisches Beispiel ist in den Abb. 1 und 2 wiedergegeben. Im ganzen wurden 40 Frakturfälle untersucht.

«*Pseudarthrosenperiost.*» Es wurde analog dem «Frakturperiost» entnommen. Auch wurde darauf geachtet, nicht das Gewebe des Pseudarthrosenspaltens anzusetzen, sondern das unmittelbar daneben auf dem Knochen liegende periostäre Gewebe. Es erwies sich meist als verdickt und derb. Es wurden 18 Pseudarthrosenfälle untersucht.

Gewebe in der Nähe von Osteosynthesemetallen. Um das Metall herum fand sich in den 7 untersuchten Fällen stets ein intensiv rotes, ziemlich dickes Gewebe.

2. Rattengewebe

Verwendet wurden zu den Versuchen Albinoratten von ca. 200 g Körpergewicht: Es wurde ihnen in Äthernarkose der linke Unterschenkel gebrochen. Je zwei Ratten wurden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 13 Tage nach der Fraktur getötet und das periostäre Callusgewebe unter sterilen Kautelen herauspräpariert. Ein Teil des herauspräparierten Gewebes wurde in Kulturen angesetzt, der andere Teil wurde histologisch untersucht. Im ganzen wurden Versuche an 50 Ratten gemacht.

B. Gewebeskulturen

1. Züchtungsmethodik

Wir züchteten fast ausschließlich in Normal-Carrelflaschen. Dabei wurden zwei Züchtungsverfahren angewendet:

a) *Züchtung mit Embryonalextrakt* in der sogenannten Trockenflasche. Diese wies folgende Zusammensetzung auf: Hühnerplasma 0,4 cm³ und Menschenserum-Embryonalextraktmischung 0,8 cm³ pro Flasche. (Menschenserum-Extraktmischung hatte folgende Zusammensetzung: Hühnerembryonalextrakt ein Teil, Menschenserum zwei Teile und Tyrode drei Teile). Diese Flaschen wurden alle drei Tage eine Stunde mit Tyrode gewaschen und mit 2 Tropfen Menschenserum-Embryonalextrakt-Mischung und 1 Tropfen Hühnerplasma überschichtet. Bei den Versuchen mit Rattengewebe wurde an Stelle des Menschenserums Rattenserum verwendet.

b) *Züchtung mit Serum-Tyrode-Mischung*, wobei die Kulturen bis zum kräftigen Auswachsen wie unter a) behandelt, dann aber nur noch alle drei Tage gewaschen und danach mit 1 cm³ 33%igem Serum in Tyrode überschichtet wurden.

Einige besonders aktiv wachsende menschliche Gewebe wurden auf Deckglas im hängenden Tropfen gezüchtet. Dieser Tropfen enthielt einen Teil Hühnerplasma und einen Teil Menschenserum-Embryonalextrakt-Mischung.

Einige Kulturen von periostärem Callusgewebe der Ratten wurden folgenden speziellen Bedingungen unterworfen:

Zu 11 Kulturen wurde Knochenextrakt zugesetzt. Der Knochenextrakt wurde nach Svante Annersten, Methode 2, dargestellt.

Zu 19 Kulturen wurde Ossopan (Robapharm) in Substanz zugefügt.

11 Kulturen wurden mit steril entnommenen Knochenmarkstückchen derselben Ratte in der Carrelflasche affrontiert.

2. Wachstumsmessung

In unseren Versuchen sind sehr deutliche Wachstumsunterschiede zutage getreten. Bei der großen Anzahl Kulturen schien es deshalb am zweckmäßigsten, das folgende Beurteilungsschema zur Anwendung zu bringen:

1. Prozentsatz der angegangenen Kulturen. (In den Tabellen aus der Größe der Flächen ersichtlich.)

2. Latenzzeit bis zum Einsetzen des Wachstums.

3. Wachstumsintensität, beurteilt nach:

a) keinem Wachstum;

b) spärlichem Wachstum (Kulturen nicht konzentrisch);

c) gutem Wachstum (konzentrische Kulturen bis ca. 1 mm Wachstumssaum);

d) reichlichem Wachstum (konzentrische Kulturen über 1 mm Wachstumssaum).

Die Grade b), c), d) sind aus verschiedenen Intensitäten der Schraffierungen der Tabellen zu ersehen.

Ein Planimetrieren der nahezu 2000 Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten wäre technisch nicht durchführbar gewesen.

C. Histologische Technik

Das Ausgangsmaterial sowie 215 Kulturen wurden histologisch untersucht.

Die Mehrzahl der Kulturen wurde in Zenker-Eisessig fixiert, in Alkohol von steigender Konzentration dehydriert und nach Aufhellen in Methylbenzoat-Celloidin und Benzol in Paraffin eingebettet. An 5–7,5 μ dicken Schnitten wurden Routinefärbungen mit Hämatoxylin-Eosin gemacht. Die bindegewebigen und knöchernen Strukturen wurden mit der Heidenhainschen Azan-Methode dargestellt. Cytoplasmatische basophile Substanzen (Ribosenucleinsäure) wurden mit Pyronin nach der Pappenheimschen Methylgrün-Pyronin-Methode in der Modifikation von Berg gefärbt.

Ein Teil der Kulturen wurde zum histologischen Phosphatasenachweis nach Gömöri benutzt. Diese Kulturen wurden im Eisschrank 24 Stunden in 80%igem Alkohol fixiert, in 96%igem und absolutem Alkohol dehydriert, 2 Stunden in Benzol aufgehellt und dann für 2 Stunden in Paraffin vom Schmelzpunkt 55° gebracht und eingebettet. In Schnitten von 5–7,5 μ Dicke wurde der Phosphatasenachweis nach Gömöri ausgeführt. Als Substrat diente β -glycero-phosphorsaures Natrium mit Veronalpuffer bei pH 9,2. Andere Schnitte wurden zum Vergleich mit Hämatoxylin-Eosin, Azan und Methylgrünpyronin gefärbt.

Resultate

Menschliches Gewebe

1. Ruhendes Periost

Histologie des Ausgangsmaterials. Das vom normalen Knochen entnommene, makroskopisch weißliche und zähe Material war mikroskopisch stets ein sehr faserreiches, zellarmes Bindegewebe. In keinem Falle konnte bei 22 Entnahmen eine sogenannte «Cambiumschicht» von Osteoblasten festgestellt werden.

Nº	Versuch	Geschlecht	Alter	Entnahme - Stelle	Anzahl der Kulturen	Wachstum nach:				
						24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h	(paler)
1	8	♀	50	Tí	13					
2	12	♂	17	Tí	12					
3	13	♂	55	Tí	11					
4	17	♂	42	Tí	20					
5	67	♂	37	Tí	8					
6	20	♂	40	Tí	26					
7	31	♂	58	Rí	16					
8	32	♀	27	Rí	12					
9	33	♀	53	Rí	10					
10	34	♂	62	Rí	12					
11	23	♂	45	Fe	12					
12	54	♂	54	Me	12					
13	28	♂	21	Fe	22					
14	2	♂	43	Tí	4					
15	21	♀	37	Me	10					
16	5	♂	62	Me	15					
17	15	♂	52	Tí	12					
18	16	♀	41	Tí	18					
19	25	♂	34	Rí	24					
20	29	♀	56	Rí Tí	30					
21	71	♂	48	Tí	12					
22	72	♂	18	Fe	10					

Tabelle 1. Normales Periost

Fe = Femur, Me = Metatarsale,
Ri = Rippe Ti = Tibia

Spärliches Wachstum ☐

Gutes Wachstum ☐

Reichliches Wachstum ☐

100% der Kulturen gewachsen ☐

75% der Kulturen gewachsen ☐

50% der Kulturen gewachsen ☐

25% der Kulturen gewachsen ☐

Verhalten der Kultur. Tabelle 1 illustriert die sehr geringe Wachstumsneigung des mit unserer Methode gewonnenen ruhenden Periostes. Wir haben im ganzen 321 Carrelflaschen-Kulturen angelegt und erhielten dabei nur 4 einigermaßen kräftige Kulturen, die einen rein fibrocytären Wachstumscharakter aufwiesen. *Histologische Untersuchungen an diesen 4 Kulturen* wurden nicht gemacht.

2. «Frakturperiost» (periostäres Callusgewebe)

Histologie des Ausgangsmaterials. Typisches Ausgangsmaterial ist in den Abb. 1/2 wiedergegeben. Es handelt sich hier um junges Callusgewebe 12 Tage nach Claviculafraktur. In der H.-E.-Färbung sind die Knochenbälkchen mit den Osteoblastensäumen deutlich zu erkennen. Die für Ribosenucleinsäure charakteristische Pyroninfärbung gibt eine intensiv rote Färbung der Osteoblasten und in geringerem Maße auch einzelner Zellen histiocytären Charakters im angrenzenden Granulationsgewebe. Die ersten Knochenbälkchen wurden in unserem Material nach 8 Tagen beobachtet. Für eingehendere histologische und cytochemische Untersuchungen des Callusgewebes verweisen wir auf die Untersuchungen an systematisch gesetzten Frakturen der Ratte. Der Ablauf des Geschehens beim Menschen ist gleichartig, aber langsamer.

Verhalten in der Kultur

a) *Beobachtung an der lebenden Kultur.* Wie sich aus Tabelle 2 ergibt, haben wir 736 Carrelflaschen-Kulturen bei Frakturen ganz verschiedenen Alters gemacht. Dabei variierten Alter und Geschlecht der Patienten

Nº	Versuch	Geschlecht	Alter	Fraktur - Diagnose	Alter der Fraktur (Tage)	Anzahl der Kulturen	Wachstum nach:				
							24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h	Später
1	93	♀	62	Fe	0	8					
2	36	♂	44	Tí	1	14					
3	26	♀	20	Tí	2	20					
4	14	♀	42	Tí	2	12					
5	80	♂	27	Tí	2	10					
6	30	♂	24	Tí	3	14					
7	81	♂	32	Tí	4	24					
8	82	♂	15	Cl	4	24					
9	79	♂	25	Tí	4	10					
10	50	♂	48	Ra	5	20					
11	74	♂	29	Tí	5	10					
12	35	♂	30	Tí	7	12					
13	78	♀	54	Ma	7	14					
14	95	♂	23	Cl	7	18					
15	40	♂	5	Fe	8	20					
16	43	♂	77	Hu	8	18					
17	44	♂	51	Pa	8	20					
18	3	♀	63	Ma	10	16					
19	98	♀	84	Ul Ra	11	16					
20	84	♂	50	Ul Ra	12	50					
21	87	♂	29	Fe	12	12					
22	96	♂	55	Cl	12	12					
23	55	♂	15	Cl	12	50					
24	57	♂	37	Cl	14	24					
25	1	♂	24	Cl	15	12					
26	18	♀	14	Tí	15	24					
27	22	♀	43	Tí	16	14					
28	6	♀	14	Ra	19	16					
29	85	♂	22	Tí	19	24					
30	49	♀	6	Fe	21	14					
31	39	♂	13	Tí	23	30					
32	90	♀	33	Tí	23	29					
33	59	♂	53	Fe	28	14					
34	37	♀	30	Tí	28	30					
35	76	♀	76	Fe	29	16					
36	9	♂	16	Hu	34	10					
37	58	♂	34	Cl	101	18					
38	86	♀	47	Hu	112	16					
39	68	♂	25	Cl	120	11					
40	69	♀	64	Fe	150	10					

Tabelle 2 (Legende nebenstehend).




ten völlig zufällig. Kulturen, die vom 7. Frakturtag oder später abstammen, haben in über 50% der angesetzten Kulturen kräftiges Wachstum ergeben. Dies steht in einem deutlichen Gegensatz zu den Befunden mit normalem Periost. Die obere Grenze dieser erhöhten Wachstumsintensität in bezug auf das Frakturalter läßt sich aus unseren Versuchen nicht mit Sicherheit ableiten. Immerhin war in dem explantierten Gewebe der 3 älteren untersuchten Frakturen (102. bis 150. Frakturtag) die Wachstumsneigung eine sehr geringe.





Die gegenüber normalem Periost erhöhte Wachstumsneigung des periostären Callusgewebes in vitro manifestierte sich nicht nur im Angehen eines hohen Prozentsatzes der Kulturen, sondern auch in der geringen Latenzzeit bis zum Angehen der Kulturen und im kräftigeren Wachstum (siehe dazu ebenfalls Tabelle 2). Wir haben mehrere dieser aktiv wachsenden Gewebe in Passagen gezüchtet, d. h. verschiedene Male ausgeschnitten und umgepflanzt. Dabei haben wir festgestellt, daß bis zur 8. Passage diese kurze Latenzzeit und die gute Wachstumstendenz die gleichen bleiben. Länger dauernde Versuche haben wir nicht durchgeführt. Dieses Gewebe ließ sich auf Deckglas im hängenden Tropfen züchten, was für menschliches Bindegewebe die Ausnahme darstellt. Dabei konnten wir mit Zeitrafferfilm eine vollständige Mitose verfolgen, deren Ablauf 90 Minuten in Anspruch nahm.

Abb. 3 gibt eine dreitägige lebende Kultur wieder, wobei das Gewebe von der Ulnafraktur einer 84jährigen Patientin stammte, die am 12. Frakturtag operiert wurde. Die Kulturen zeigen regelmäßiges Wachstum. Abb. 4 gibt die Kultur nach weiteren 4 Tagen wieder und zeigt in der Nähe des Mutterstückes eigenartige Makrophagenformen, wie wir sie oft bei besonders aktiv wachsenden periostären Callusgeweben beobachtet haben. Nach 10 Tagen gelangt man oft zu sehr großen, stark verfilzten Kulturen von 10 mm Ø, die bei Anlegen von Doppelkulturen miteinander verschmelzen (Abb. 5).

Tabelle 2. «Frakturperiost.»

Cl = Clavicula, Fe = Femur, Hu = Humerus
Ma = Malleolus, Pa = Patella, Ra = Radius
Ti = Tibia, Ul = Ulna

Spärliches Wachstum 
Gutes Wachstum 
Reichliches Wachstum 

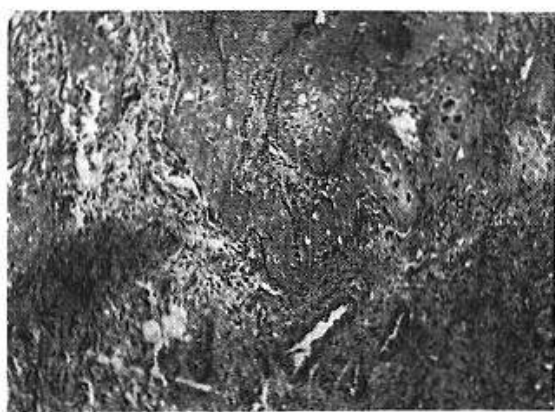
100% der Kulturen gewachsen 
75% der Kulturen gewachsen 
50% der Kulturen gewachsen 
25% der Kulturen gewachsen 

Der Aspekt, der mit Zusatz von verdünntem Embryonalextrakt gezüchteten periostären Callusgewebe ist rein fibrocytär. Angeregt durch die Arbeiten von *Gaillard* gingen wir dazu über, die Kulturen nur kurze Zeit mit Embryonalextrakt wachsen zu lassen und sie hernach nur noch mit Serum (33 %) zu überschichten. Wir konnten dadurch in dem Zellschleier der Wachstumszone Phänomene beobachten, die wir noch nicht sicher zu deuten vermögen. Einerseits bestehen diese Veränderungen im Dichterwerden der Kultur und in einer starken Vermehrung von sternförmigen und hirschgeweihähnlichen Zellen (siehe dazu Abb. 6). In einem Fall gelangten wir nach 21tägiger Überschichtung mit Serum zu den eigenartigen, an Osteozyten erinnernden Zellformen der Abb. 7. Es ist uns aber bis jetzt nicht wieder gelungen, solche Bildungen zu reproduzieren.

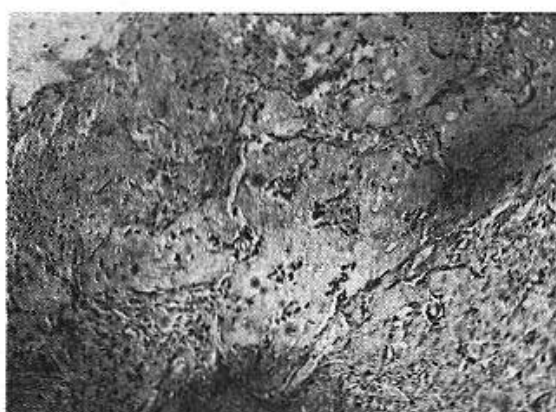
b) *Histologische Untersuchungen an den Kulturen.* Im Vordergrund stand die Frage, ob in den Kulturen Knochenbildung erfolgt oder nicht. Von den 736 angefertigten Kulturen wurden die 102 aussichtsreichsten eingebettet und in Schnitten untersucht.

Im Mutterstück (Abb. 8, 9, 10) findet sich sehr oft typischer Faserknochen. Er bietet aber den Anblick eines sehr inaktiven Knochens. Eigentliche Osteoblastensäume finden sich schon nach wenigen Tagen keine mehr. Hier und da sind noch einzelne abgeplattete Zellen an der Oberfläche der Bälkchen nachzuweisen. Die Knochenhöhlen sind meist nur zum Teil bewohnt. Das Zwischengewebe zwischen den Knochenbälkchen entspricht einem sehr lockeren, einförmig fibrocytären Zellennetz. Meist setzt sich das Mutterstück sehr scharf gegen die Wachstumszone ab, auch dort, wo die letztere sehr dicht ist. Besonders deutlich wird das bei der Azanfärbung. Im Mutterstück finden sich tiefblaue, massive Faserbündel, währenddem in der Kultur die Fasern hellblau und zart sind. Sichere Knochenbildung am Rande des Mutterstückes konnte in keiner der Kulturen nachgewiesen werden. Auch mit der Züchtung ohne Embryonalextrakt hat sich das histologische Ergebnis nicht wesentlich verändert. Auffällig war, daß die für Ribosenucleinsäure typische Pyroninfärbung schon nach wenigen Tagen negativ wurde, auch wenn sie im Ausgangsmaterial sehr stark positiv ausgefallen war.

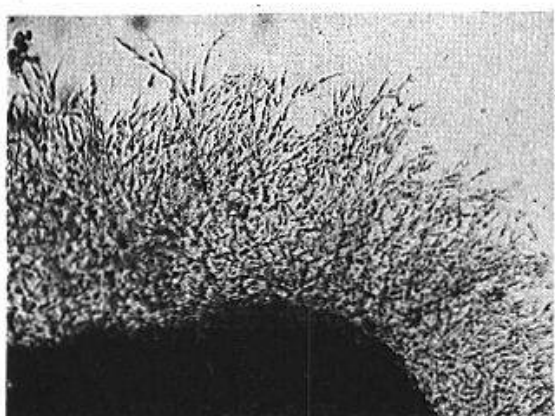
Einige Beobachtungen lassen jedoch vermuten, daß die Scheidungslinie zwischen Mutterstück und Wachstumszone keine absolute ist und daß gewisse Differenzierungsvorgänge auch *in vitro* erfolgen. In Abb. 8 ist der Übergang der Knochenbälkchen an einem Ende des Mutterstückes in die entsprechende Auswachszone auf einer Seite allmählich. Abb. 11 zeigt den ausnahmsweise beobachteten kontinuierlichen Übergang von Fasern des Mutterstückes in solche der Wachstumszone.



1



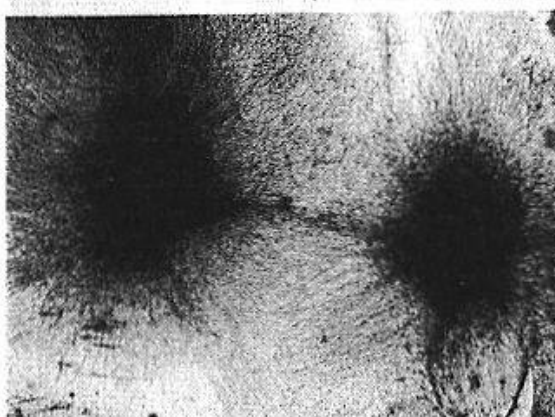
2



3



4



5



6

Abb. 1-13: Menschliches Gewebe.

Abb. 1. Typisches Ausgangsmaterial mit beginnenden Knochenbälkchen: Periostäres Callusgewebe, Claviculafraktur, Entnahme am 12. Frakturtag. Vergr. 175fach.

Hämalaun-Eosin. Fr. P. 2 (Tab. 2, Nr. 22).

Abb. 2. Gleiches Material wie in Abb. 1. Die Osteoblastensäume sind deutlich pyronin-positiv. Vergr. 175fach. Pyronin nach Berg. Fr. P. 22 (Tab. 2, Nr. 22).

Abb. 3. Periostäres Callusgewebe 72 Stunden in Kultur. Entnahme 11 Tage nach Ulnafraktur bei 84j. Patientin. Vergr. 112fach. Nativ. Fr. P. 19 (Tab. 2, Nr. 19).

Abb. 4. Makrophagenbildung in Kultur von Abb. 3, 11 Tage nach Ansetzen der Kultur.

Abb. 5. 10 Tage alte Doppelkultur, 3. Passage. Gewebsentnahme am 23. Frakturtag bei Tibiafraktur. Vergr. Lupe. Nativ. Fr. P. 31 (Tab. 2, Nr. 31).

Abb. 6. Detailaufnahme einer 15tägigen Kultur von periostärem Callusgewebe (Tibia), entnommen am 23. Frakturtag, 6 Tage mit Serum überschichtet. Stark verzweigte Zellen der Randzone. Vergr. 280fach. Nativ. Fr. P. 32 (Tab. 2, Nr. 32).

Schwierig ist uns die Deutung der Abb. 12 und 13. Dort findet sich ein eindeutig in der Wachstumszone gelegenes bälkchenartiges Gebilde, das bewohnte Höhlen aufweist. Seine Orientierung ist eine ganz andere als die der Knochenbälkchen im Mutterstück, so daß es nicht gleichzeitig mit diesen entstanden sein kann. In der Azanfärbung hat jedoch dieses Gebilde eine schmutzig-blaue Farbe angenommen, und in seiner Umgebung fanden sich wenig Fasern. Leider standen uns zur weiteren färberischen Abklärung keine weiteren Schnitte zur Verfügung, da es sich um eine relativ dünne Partie der horizontal geschnittenen Kultur handelt. Trotz des auf den ersten Blick typischen Aussehens dieses «Bälkchens» wagen wir es nicht sicher als Knochenbälkchen zu bezeichnen.

Auf die Frage der Veränderungen im Mutterstück soll beim Tiermaterial eingegangen werden.

3. «Pseudarthrosenperiost»

Histologie des Ausgangsmaterials. Histologisch stellten wir ein faserreiches Bindegewebe fest, untermischt mit geringen chronischen Rundzelleninfiltraten.

Verhalten in der Kultur. Dieses ergibt sich aus der Tabelle 3. Wir haben 281 Carrelkulturen angelegt. Die Wachstumstendenz war gegenüber dem normalen Periost in einzelnen Fällen leicht vermehrt, aber viel geringer als beim periostären Callusgewebe. Diese geringere Aktivität betraf sowohl die Latenzzeit wie den Prozentsatz der angehenden Kulturen. Das Wachstum war immer rein fibrocytär. Eingehende histologische Untersuchungen der Kulturen haben wir nicht durchgeführt.

4. Gewebe in der Nähe von Osteosynthesen-Metallen

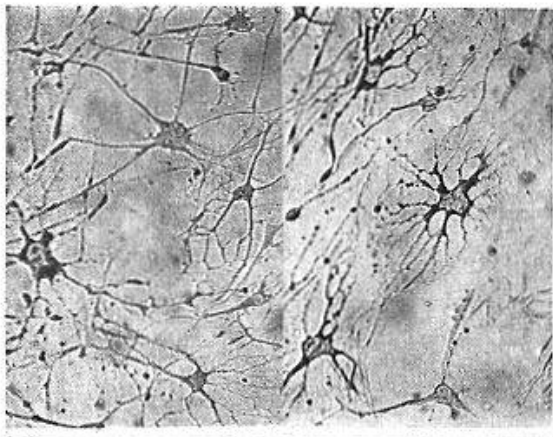
Histologie des Ausgangsmaterials. Gefäßreiches Granulationsgewebe, das von zahlreichen Rundzellen und wenigen polynucleären Zellen durch-

Abb. 7. Eigenartige Zellformen in Kultur von periostärem Callusgewebe, die 13 Tage mit verdünntem Embryonalextrakt und weitere 25 Tage mit verdünntem Serum ernährt wurde. Entnahme am 5. Frakturtag. Vergr. 300fach. Hämalaun-Eosin.

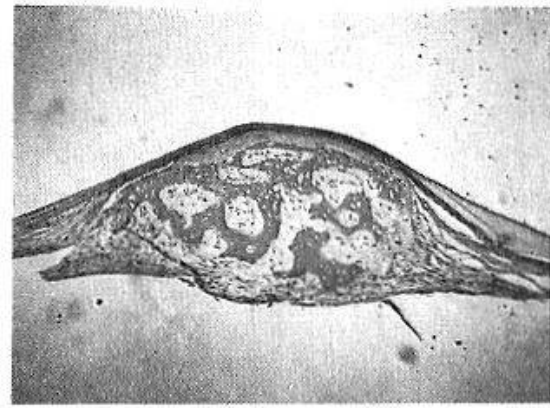
Fr. P. 10 (Tab. 2, Nr. 10).

Abb. 8. Vertikalschnitt einer Kultur von periostärem Callusgewebe. Entnahme am 29. Frakturtag, 11 Tage mit verdünntem Embryonalextrakt und 6 Tage mit verdünntem Serum ernährt. Vergr. 50fach. Hämalaun-Eosin. Fr. P. 35 (Tab. 2, Nr. 35).

Abb. 9. Horizontaler Schnitt einer 23tägigen Kultur, die 9 Tage mit verdünntem Extrakt und 14 Tage mit verdünntem Serum ernährt wurde. Entnahme am 23. Frakturtag. Der Schnitt zeigt den Übergang vom Ausgangsstück in die Kultur, das Knochenbälkchen liegt unmittelbar am Rand des Ausgangsstücks und ragt weit in die Kultur hinein. Vergr. 200fach. Hämalaun-Eosin. Fr. P. 32 (Tab. 2, Nr. 32).



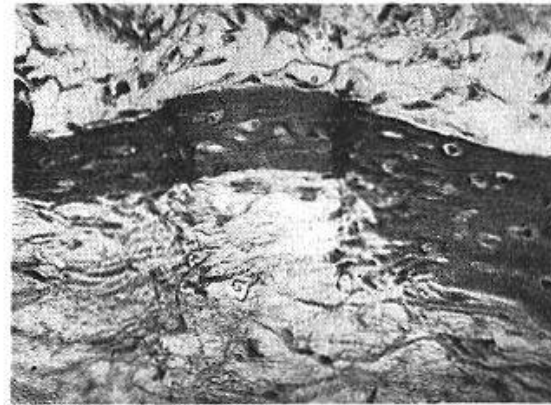
7



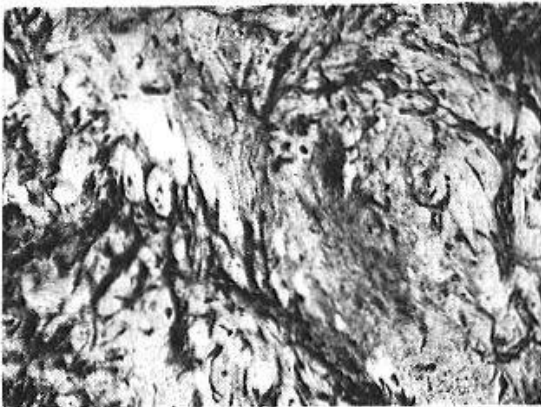
8



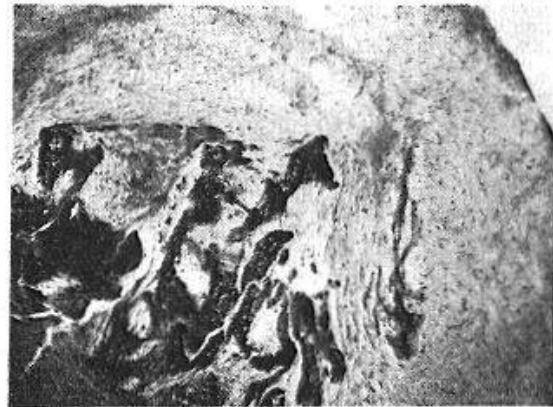
9



10



11



12

Abb. 10. Detail aus Abb. 9. Knochenbälkchen am Rande des Ausgangsstücks. Vergr. 800fach. Hämalaun-Eosin. Fr. P. 32 (Tab. 2, Nr. 32).

Abb. 11. Gleiches Ausgangsmaterial wie bei Abb. 1. Übergang der Fasern des Ausgangsstücks in die Fasern der Wachstumszone. Vergr. 300fach. Azan. Fr. P. 22 (Tab. 2, Nr. 22).

Abb. 12. Horizontalschnitt einer Kultur der zweiten Passage von periostärem Callusgewebe 12 Tage nach Fraktur. Erste Passage: 9 Tage in Kultur mit verdünntem Embryonalextrakt. Zweite Passage: 7 Tage in Kultur mit verdünntem Embryonalextrakt, 12 Tage mit verdünntem Serum, dann fixiert. Balkenförmige Struktur in der Wachstumszone. Vergr. 200fach. Hämalaun-Eosin. Fr. P. 23 (Tab. 2, Nr. 23).

Nr.	Versuch	Geschlecht	Alter	Fraktur - Diagnose	Alter der Fraktur (Tage)	Anzahl der Kulturen	Wachstum nach				
							24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h	Später
1	56	♂	41	Fe	98	20					
2	27	♂	61	Ra	114	10					
3	45	♂	64	Ul	131	16					
4	92	♂	37	Ti	180	20					
5	91	♂	47	Ti	210	16					
6	75	♂	41	Ti	240	10					
7	63	♀	27	Ma	256	12					
8	7	♂	22	Hu	260	12					
9	2	♂	43	Ti	365	8					
10	38	♀	46	Ti	365	26					
11	82	♂	61	Ra Ul	365	22					
12	64	♀	80	Fe	365	12					
13	10	♂	40	Ul	365	17					
14	73	♂	30	Ma	365	24					
15	97	♀	64	Fe	365	12					
16	16	♀	11	Ti	638	14					
17	53	♂	50	Ti	730	20					
18	83	♂	30	Ra Ul	1095	10					

Tabelle 3. Pseudarthrosenperiost.

Fe = Femur, Hu = Humerus, Ma = Malleolus,
Ra = Radius, Ti = Tibia, Ul = Ulna

Spärliches Wachstum ☐
Gutes Wachstum ☐
Reichliches Wachstum ☐

100% der Kulturen gewachsen ☐
75% der Kulturen gewachsen ☐
50% der Kulturen gewachsen ☐
25% der Kulturen gewachsen ☐

setzt ist. Das Grundgerüst wird durch ein weitmaschiges Netz von jungen Fibroblasten und Histiocyten gebildet.

Verhalten in der Kultur. Tabelle 4 unterrichtet über die mit 112 Carrelkulturen gemachten Erfahrungen. Soweit die relativ geringe Zahl der Versuche ein Urteil erlaubt, zeigt dieses Gewebe eine gegenüber dem Ruheperiost deutlich vermehrte Wachstumstendenz in der Kultur und eine stark verkürzte Latenzzeit bis zum Angehen der Kulturen.

Die Versuche mit verschiedenen Arten menschlichen Periostes haben interessante Hinweise ergeben über die Veränderungen der Wachstumsintensität dieses Gewebes in Abhängigkeit vom funktionellen Zustand. Wenig Sicheres konnte dagegen in Erfahrung gebracht werden über die

No	Versuch	Geschlecht	Alter	Diagnose	Zeit seit Unfall (Tage)	Anzahl der Kulturen	Wachstum nach:				
							24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h	Später
1	66	♂	33	Ti Dr	234	14					
2	52	♀	29	Ti Dr	270	18					
3	24	♂	56	Fe Ma	323	10					
4	51	♀	79	Fe Ma	360	20					
5	2	♂	43	Ti La	360	8					
6	13	♂	55	Ul Ma	720	24					
7	83	♂	30	Hu Dr	1080	18					

Tabelle 4. Gewebe in Nähe von lange liegenden osteosynthetischen Metallen

Fe = Femur, Ul = Ulna, Hu = Humerus, Ti = Tibia,
Dr = Draht, La = Lane-Platte, Ma = Marknagel

Spärliches Wachstum ☐
Gutes Wachstum ☐
Reichliches Wachstum ☐

100% der Kulturen gewachsen ☐
75% der Kulturen gewachsen ☐
50% der Kulturen gewachsen ☐
25% der Kulturen gewachsen ☐

Möglichkeit, Knochenbildung des Callusgewebes in vitro weiter zu verfolgen. Um diese Versuche mit reproduzierbarem Ausgangsmaterial zu wiederholen, wurden experimentelle Frakturen an der Rattentibia gesetzt und das Material histologisch und mit der Kultur untersucht.

Rattengewebe

Histologischer Befund des Ausgangsmaterials. Das Ausgangsmaterial bestand aus periostärem Callusgewebe, das 2–13 Tage nach der Fraktur entnommen worden war.

Das 2 Tage nach der Fraktur entnommene Gewebe besteht in der Hauptsache aus Fibrin und jungem Granulationsgewebe. In den Fibrinmaschen kann man neben Leukocyten und Lymphocyten alle Arten von Rund- und Spindelzellen finden, daneben polygonale Zellen vom Typus der Polyblasten und Makrophagen, die manchmal gelbes Pigment enthalten (Abb. 14).

Drei Tage nach der Fraktur zeigt das Gewebe schon einen mehr bindegewebigen Charakter (Abb. 15). Spindelzellen beherrschen das Bild.

Diese Zellen werden an manchen Stellen voluminöser und enthalten reichlichere Mengen pyroninophiler Substanz in ihrem Cytoplasma. Häufig finden sie sich in Mitose. Sie zeigen manchmal zwischen dem 3. und 4. Tag nach der Fraktur positive Phosphatase-Reaktion. Am 4. Tag sieht man bereits junge Knorpelzellen, Osteoblasten und beginnende Bildung von Knochenbälkchen im periossären Callusgewebe. Am 5. Tag kann man staubartige Niederschläge von Kalk in der Grundsubstanz der Knochenbälkchen und in der Matrix des hypertrophischen Knorpels beobachten. Von nun an geht die Knochenbildung stetig weiter. Teils bildet sich der Knochen direkt aus dem faserigen Bindegewebe unter Mitwirkung von Osteoblasten, teils geht die Knochenbildung über die Zwischenstufe der Knorpelbildung. Von diesem Zeitpunkt an kann man damit rechnen, in dem zur Explantation verwendeten Ausgangsmaterial schon typische Knochenherde zu haben (Abb. 16, 17).

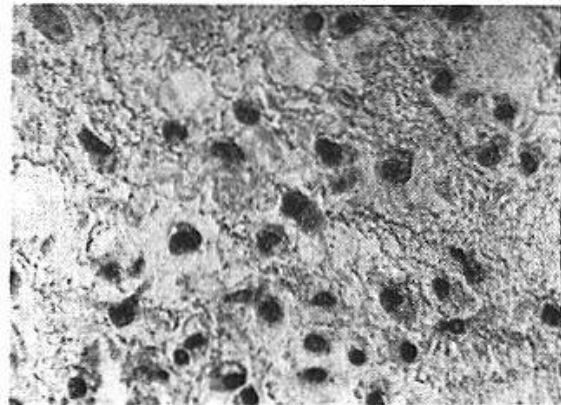
Die Phosphatasereaktion ist in dem osteogenen Gewebe des Callus vom 4. Tag an stark positiv (wie an anderem Ort berichtet wird, *Rosin*). Osteoblasten zeigen starke Reaktion in Kern und Cytoplasma, ebenso Knorpelzellen, außer im jüngsten Stadium, wo sie negativ reagieren. Osteogenes Bindegewebe reagiert positiv. Dabei findet sich die Phosphatase sowohl in den Zellen als auch in den Bindegewebsfasern, also sowohl intra- als auch extracellulär. Die Knorpelgrundsubstanz wird erst im hypertrophischen Stadium des Knorpels positiv. Die Grundsubstanz der neugebildeten Knochenbälkchen reagiert zuerst positiv, dann negativ.

An Schnitten, die mit Methylgrün-Pyronin gefärbt sind, zeigt es sich, daß die Osteoblasten im Cytoplasma große Mengen leuchtend roter Substanz enthalten (Abb. 18). Auch die Knorpelzellen sind stark pyroninophil (Abb. 19). Die Knorpelgrundsubstanz des hypertrophischen Knorpels färbt sich häufig ganz oder teilweise orangegelb (Abb. 18). Diese letztere Färbung entspricht wahrscheinlich der Polychromasie mit Toluidinblau. Die Knochenbälkchen sind farblos, nur etwaige Kalkniederschläge färben sich mit Pyronin rot.

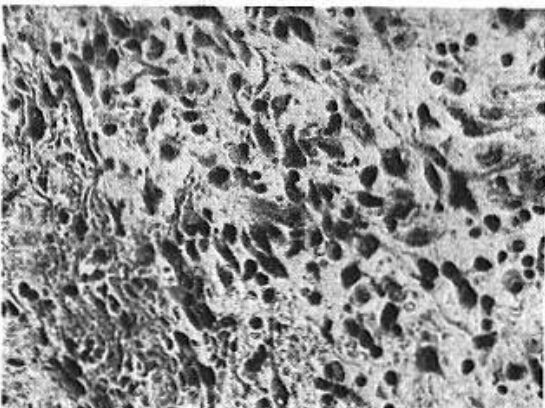
Verhalten des Fraktur-«Periostes» der Ratte in der Kultur. Beim menschlichen Periost war die Aktivierung des periossären Gewebes im Verlauf der ersten Frakturwoche sehr deutlich nachzuweisen. Bei der Ratte war es nicht möglich, ruhendes Periost in genügender Menge und Homogenität zu erhalten, um ähnliche Versuche anzustellen. Zudem war das Hauptinteresse hier auf die morphologischen Fragen gerichtet. Immerhin kann zur Frage der Aktivität des periossären Callusgewebes bei der gebrochenen Rattentibia gesagt werden, daß schon 48 Stunden nach der Fraktur mit diesem Gewebe regelmäßig kräftige Kulturen



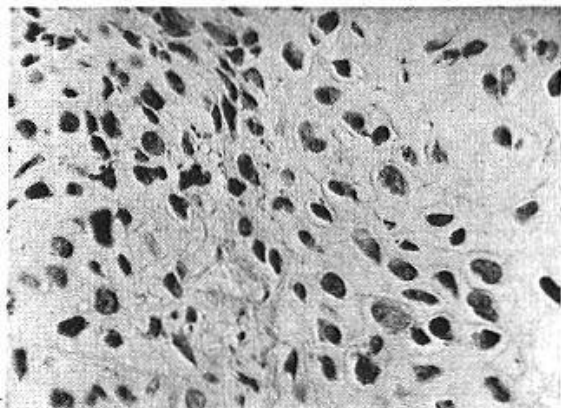
13



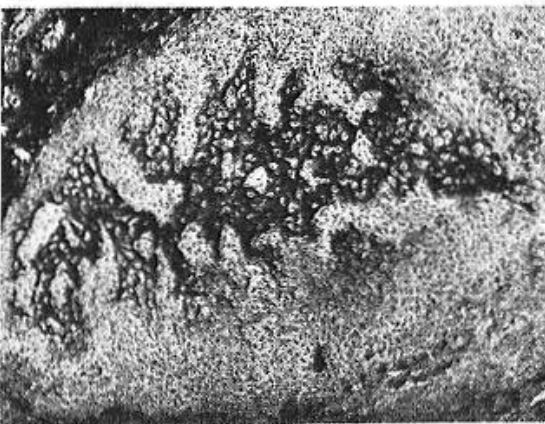
14



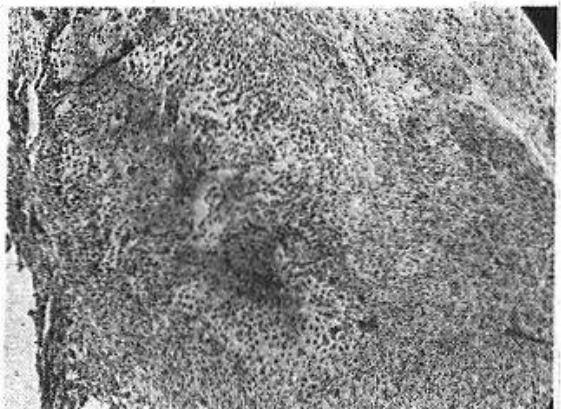
15



16



17



18

Abb. 14–31: Rattengewebe.

Abb. 13. Detail aus Abb. 12. «Bälkchenbildung» in der Wachstumszone. Vergr. 300fach. Hämalun-Eosin. Fr. P. 23 (Tab. 2, Nr. 23).

Abb. 14. Periostäres Callusgewebe der Ratte, 2 Tage nach Fraktur. Fibrin, sehr junges Granulationsgewebe. Vergr. 1620fach. Hämalun-Eosin. RP Ph2 R2.

Abb. 15. Periostäres Callusgewebe der Ratte, 3 Tage nach Fraktur. Zunehmend bindegewebig, hauptsächlich Spindeln mit pyroninophiler Substanz im Cytoplasma. Vergr. 810fach. Hämalun-Eosin. RP IV R1.

Abb. 16. Periostäres Callusgewebe der Ratte, 5 Tage nach Fraktur. Auftreten junger Knorpelzellen in gewissen Partien. Vergr. 810fach. Hämalun-Eosin. RP IV R3.

Abb. 17. Periostäres Callusgewebe der Ratte, 6 Tage nach Fraktur. Bildung von Knochenbälkchen. Vergr. 180fach. Azan. RP V R7.

Abb. 18. Periostäres Callusgewebe der Ratte, 6 Tage nach Fraktur. Das Cytoplasma der Osteoblasten sowie die Knorpelgrundsubstanz des hypertrophischen Knorpels sind pyroninophil. Vergr. 200fach. Pyronin nach Berg. RP V R7.

erzielt werden, die nur eine Latenzzeit von 24 Stunden haben, was beim Menschen erst ungefähr eine Woche nach der Fraktur der Fall war.

Die Art des Wachstums der Kulturen war verschieden, je nach der Zeit, die zwischen Fraktur und Entnahme des Materials für die Explantation vergangen war. Kulturen, die von Gewebe stammten, das 2 bis 3 Tage nach der Fraktur entnommen worden war, zeigten gewöhnlich ein Auswachsen stark gemischter Zellrassen. Neben typischen langgestreckten Fibroblasten waren Rundzellen sowie polygonale Zellen des Makrophagentypus zahlreich (Abb. 20). Die Fibroblasten selbst zeigten manchmal nicht das typische grasartige Wachstum, sondern bildeten mehr epithelartig aussehende Zellverbände. In Kulturen, die von Gewebe stammten, das länger, z. B. 5 Tage und mehr, nach der Fraktur entnommen wurde, war das Wachstum meistens einheitlicher fibroblastisch.

Zu 11 Kulturen wurde Knochenextrakt zugesetzt, und zwar immer zu einem Zeitpunkt, an dem die Kulturen schon kräftiges Wachstum zeigten. Zwei Kulturen standen 5 Tage, eine Kultur 4 Tage, sieben Kulturen 3 Tage und eine Kultur 2 Tage unter dem Einfluß des Knochenextraktes. Die Kulturen wurden nach einer Wachstumsperiode von 7 bis 10 Tagen fixiert. In allen Kulturen konnte man feststellen, daß unter dem Einfluß des Knochenextraktes die auswachsenden Zellen stark granuliert wurden und sich am Rande ablösten (Abb. 21).

Es wurde dann statt Knochenextrakt das von der Firma Robapharm hergestellte Ossopan angewendet. Eine kleine Menge des Trockenpulvers wurde an einer Stelle neben der Kultur deponiert. Im ganzen wurden 19 Kulturen mit Ossopan behandelt. Von diesen wurden 11 wegen schlechten Wachstums ausgeschaltet. Die übrigen zeigten alle nur an der dem Ossopan abgekehrten Seite Wachstum, während in der Nähe des Ossopan-Depots kein Wachstum zu beobachten war. Die Zellen der Wachstumszone waren oft vakuolisiert.

11 Kulturen von periossärem Callusgewebe wurden mit Stückchen von Knochenmark derselben Ratte affrontiert. Alle so behandelten Kulturen zeigten sehr gutes, üppiges Wachstum. Nachdem am Anfang der Kulturperiode die hämatogenen Zellen aus dem Knochenmark zwischen die Fibroblasten des perifrakturären Gewebes ausgewandert waren, sah man in späteren Stadien die Fibroblasten des periossären Callusgewebes mit den aus dem Knochenmark stammenden sich vermischen. Oft entstanden dichte Filze. Die Kulturen wurden von 7–17 Tagen gezüchtet und waren in sehr gutem Zustand. Irgendwelche wesentlichen Unterschiede im Charakter der auswachsenden Zellen gegenüber den allein gezüchteten Kulturen wurden jedoch nicht beobachtet.

Histologische Untersuchung der Kulturen. Dabei soll unterschieden werden zwischen Kulturen, bei denen sich im Mutterstück noch kein typisches Knochengewebe vorfand, und solchen, bei denen das Mutterstück bereits Knorpel und Knochenbildung aufwies.

Das in früheren Zeitpunkten (2–5 Tage nach der Fraktur) entnommene und explantierte Gewebe zeigt in der Kultur oft die Struktur eines Fibringerinnsels mit zahlreichen hämatogenen Zellen sowie Polyblasten und Makrophagen, dazwischen Fibroblasten und histiocytäre Elemente. In der Wachstumszone sah man in diesen Fällen Fibroblasten meist untermischt mit Makrophagen. Die Fibroblasten wuchsen meist typisch grasartig radiär (Abb. 22), manchmal zeigten sie aber auch ein Wachstum, das epithelialen Verbänden glich. Die Makrophagen waren an ihrer polygonalen Gestalt, ihrem meist exzentrisch gelagerten Kern mit gekräuselter Kernmembran und ihrem vakuolisierten Cytoplasma erkenntlich. Unmittelbar um das Mutterstück herum war oft eine Verflüssigungszone zu sehen. Andere Kulturen zeigten Mutterstücke, die teils bindegewebig waren, teils Fettgewebe und Reste von Muskelfasern enthielten. In den Fragmenten der Muskelfasern waren oft regenerative Prozesse zu sehen. Zahlreiche Kerne lagen in Gruppen zusammen, das Cytoplasma war leicht basophil, mit Pyronin rotgefärbt. Das Fragment bot das Bild einer Muskelknospe dar. In zwei Kulturen waren mit dem periostären Callusgewebe kleine Knochensplitter herausgenommen worden, die nur mikroskopisch sichtbar waren. Beide stammten von Gewebe, das 3 Tage nach der Fraktur entnommen war. Der eine war 1 Tag, der andere 5 Tage in Kultur, sie waren also 4 bis 8 Tage alt. Beide Knochensplitter waren nekrotisch und zeigten leere Knochenhöhlen. Das Wachstum aller dieser Kulturen war fibroblastisch.

Das Wachstum der Kulturen der zweiten Kategorie, die im Mutterstück schon neugebildeten Knorpel oder Knochengewebe oder beides enthielten, war einheitlicher. Hier waren in der Wachstumszone meist nur Fibroblasten zu sehen. Die Wachstumsarea zeigte in den meisten Fällen eine charakteristische Zweiteilung, nämlich eine dem Mutterstück direkt anliegende zirkuläre Zone und eine sich peripherwärts ausbreitende radiäre Zone (Abb. 23). Die zirkuläre Zone bildete eine Kapsel um das Mutterstück. In ihr konnte man mit der Azanfärbung junge Bindegewebefasern nachweisen. In einzelnen Kulturen konnte man zwischen diesen Fasern und den Fasern der in Bildung begriffenen Knochengrundsubstanz im Mutterstück eine Kontinuität feststellen (Abb. 24). Die Zellen der zirkulären Zone glichen morphologisch den Fibroblasten. Sie enthielten manchmal pyroninophile Granula, gaben aber immer negative Phosphatasereaktion, wogegen die im Mutterstück

vorhandenen Osteoblasten selbst nach längeren Zuchtungsperioden positiv reagierten (Abb. 25). An die oft ziemlich breite zirkuläre Zone schloß sich oft eine üppige, radiäre Zone von typischen Fibroblasten an, die häufig Mitosen zeigten (Abb. 26). In älteren Kulturen zeigten die Zellen dieser Zone häufig Vakuolisierung. Das war in besonderem Maße der Fall bei Kulturen, denen Knochenextrakt oder Ossopan zugesetzt worden waren.

Das Wachstum der bindegewebigen Teile solcher Mutterstücke war gewöhnlich üppig, jenes der knorpeligen oder knöchernen Anteile dagegen spärlich oder negativ.

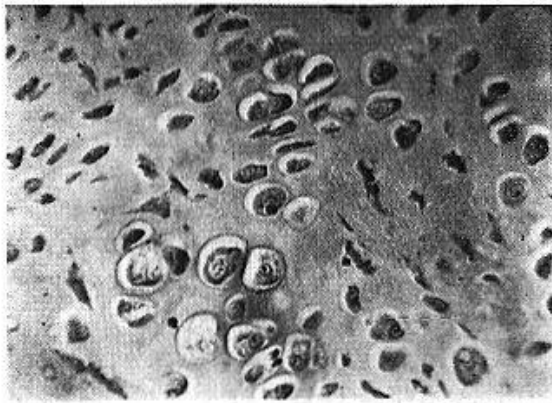
Im Mutterstück selbst blieb Knorpel oder Knochen mehrere Tage erhalten. Wir haben Kulturen bis zu 19 Tagen gezüchtet. In einigen Kulturen von 17 Tagen waren im Mutterstück Spongiosabälkchen sowie Knorpel, aus dem sie entstanden, vorhanden (Abb. 27). An einem Ende des Mutterstückes befand sich Knorpelgewebe, am anderen Knochenbälkchen. Die Knochenbälkchen waren in der unmittelbaren Nähe des Knorpels noch gut erhalten und enthielten normal färbbare Osteozyten (Abb. 28). Je weiter die Bälkchen aber vom Knorpel entfernt waren, desto schlechter war ihre Erhaltung. Am entferntesten Punkt waren sie nekrotisch und die Knochenhöhlen leer (Abb. 29). In Kulturen von kürzerer Zuchtungsdauer (5–7 Tage) war der Erhaltungsgrad der Knochenbälkchen noch besser, doch zeigten die Knochenbälkchen und der hypertrophische Knorpel auch hier beginnende Nekrobiose. In allen Fällen aber waren die zwischen den Knochenbälkchen liegenden Zellen gut erhalten und zeigten 7 Tage nach Explantation noch positive Phosphatasereaktion, im Gegensatz zu den ausgewachsenen Zellen. In allen untersuchten Kulturen, die Knorpel- und Knochengewebe im Mutterstück enthielten, war die Phosphatasereaktion in den Osteoblasten und Knorpelzellen positiv.

Das histologische Bild der Kulturen, die mit Knochenextrakt und Ossopan behandelt worden waren, bot keine Besonderheiten dar. In einer 12 Tage alten Kultur, die drei Tage unter dem Einfluß von Knochenextrakt gestanden hatte, waren im Mutterstück Spongiosabälkchen vor-

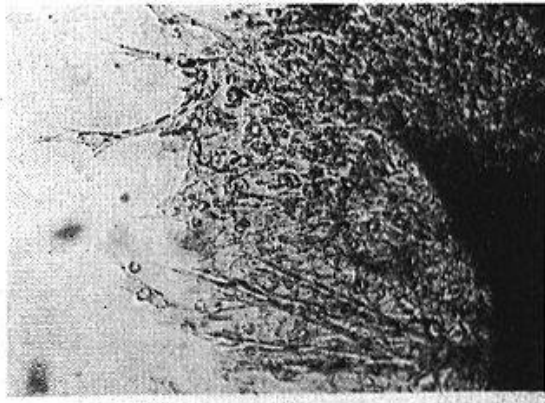
Abb. 19. Perioßäres Callusgewebe der Ratte, 9 Tage nach Fraktur. Pyroninophile Knorpelzellen. Vergr. 855fach. Pyronin nach Berg. RP Phl R10.

Abb. 20. Perioßäres Callusgewebe 2 Tage in Kultur. Entnahme 3 Tage nach Fraktur. Zellgemisch von Fibroblasten, Rundzellen und Makrophagen. Vergr. 112fach. Nativ. RP I R2–14.

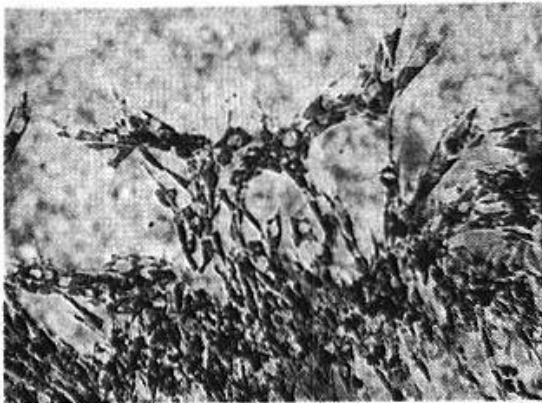
Abb. 21. Perioßäres Callusgewebe 7 Tage in Kultur. Entnahme 8 Tage nach Fraktur. 2 Tage unter Einfluß von Knochenextrakt, starke Vakuolisierung. Vergr. 280fach. Nativ. RP III R9–5.



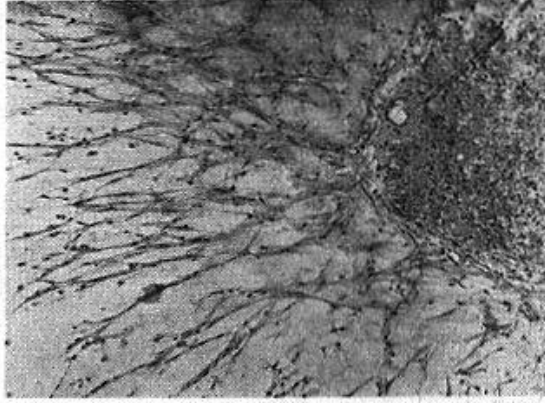
19



20



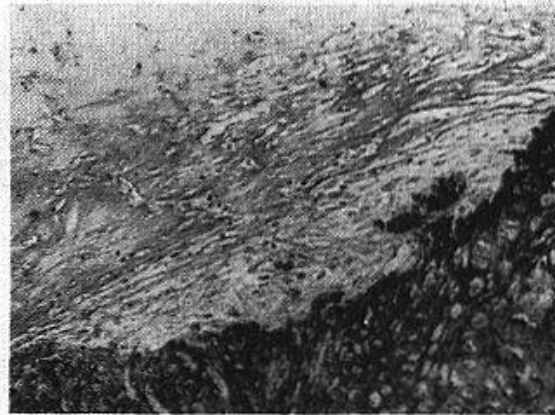
21



22



23



24

Abb. 22. Horizontalschnitt einer 10tägigen Kultur. «Grasartiges» fibrocytäres Wachstum. Gewebseentnahme am 3. Frakturtag. Vergr. 190fach. Hämalan-Eosin.
RP IV R3-7.

Abb. 23. Horizontalschnitt einer 6tägigen Kultur. Gewebseentnahme am 8. Frakturtag. Das Ausgangsstück enthielt bei der Explantation schon Knorpel- und Knochengewebe. Regelmäßige Wachstumszone mit Arkadenbildung. Um das Ausgangsstück herum zirkuläre Zone, in welcher mit Azan junge Bindegewebsfasern nachweisbar sind. Oft Kontinuität zwischen diesen Fasern und den Fasern der im Ausgangsstück in Bildung begriffenen Knochengrundsubstanz. Vergr. 140fach. Azan. RP III R9-5.

Abb. 24. Horizontalschnitt einer 5tägigen Kultur. Gewebseentnahme am 8. Frakturtag. Die Grundsubstanz setzt sich in die Fasern der Wachstumszone fort. Vergr. 630fach. Azan. RP III R9-4.

handen, die sich in Auflösung befanden. Hier waren Osteoklasten zu sehen (Abb. 30). Es war das einzige Mal, daß diese Zellen im Ausgangsmaterial oder Explantat beobachtet werden konnten.

Vier Kulturen, die zusammen mit Knochenmark explantiert worden waren, wurden histologisch untersucht. In einer 17 Tage alten Kultur, in der das Knochenmark dem Knorpel des explantierten perifrakturären Gewebes direkt anlag, war der Knorpel etwas «arrodiert» (Abb. 31). Zwischen den Knorpelzellen fanden sich Fibroblasten. Spezifische Knochenmarkszellen waren nicht mehr vorhanden, das explantierte Knochenmark bestand nur noch aus dem Gerüst und zahlreichen Makrophagen, die mit Eosin-rot-färbendem, wahrscheinlich hämoglobinhaltigem Material beladen waren. Sonst waren keine Unterschiede in den mit Knochenmark affrontierten Kulturen gegenüber den allein explantierten Kulturen zu sehen.

Diskussion

Fell hat gezeigt, daß es möglich ist, in vitro Knochenbildung zu erzielen. Sie ging dabei vom Periost 6–10 Tage alter Hühnerembryonen oder vom «Endost» unmittelbar postembryonaler Tiere aus. Periost von älteren Embryonen oder von neugeborenen Hühnchen ergab keine Knochenbildung in vitro. *Fell* erklärt diese Erscheinungen damit, daß älteres Periost entweder keine Cambiumschicht mehr habe oder diese bei der Entfernung des Periostes vom Knochen abgerissen werde. Alle Ossi-

Abb. 25. Horizontalschnitt einer 6tägigen Kultur. Gewebsentnahme 6 Tage nach Fraktur. Im Ausgangsstück ist die Phosphatasereaktion im Gegensatz zu den Zellen der zirkulären Wachstumszone positiv. Vergr. 140fach. Phosphatase. RP V R7–1.

Abb. 26. Horizontalschnitt einer 6tägigen Kultur. Gewebsentnahme am 8. Frakturtag. Zirkuläre und radiäre Fibroblastenzone mit Mitosen. Vergr. 855fach. Hämalan-Eosin. RP III R9–2.

Abb. 27. Horizontalschnitt einer 7tägigen Kultur. Gewebsentnahme 9 Tage nach Fraktur. Erhaltener Knorpel und daraus entstandene Spongiosabälkchen. Vergr. 175fach. Azan. RP IV R7–9.

Abb. 28. Detail aus Abb. 27. Knochenbälkchen in unmittelbarer Nähe des Knorpels mit färbbaren Osteocyten. Vergr. 855fach. Azan. RP IV R7–9.

Abb. 29. Detail aus Abb. 27. Die vom Knorpel am weitesten entfernten Knochenbälkchen sind nekrotisch und zeigen leere Knochenhöhlen. Vergr. 855fach. Azan. RP IV R7–9.

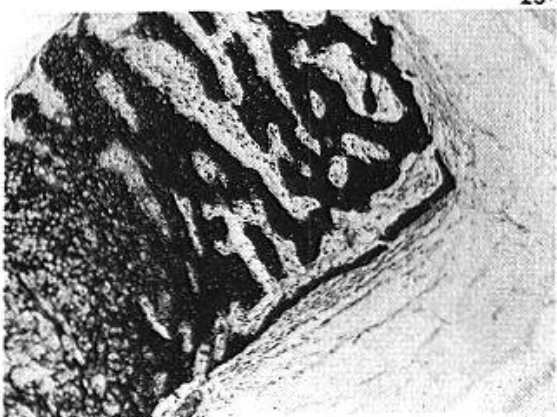
Abb. 30. Horizontalschnitt einer 12tägigen Kultur. Gewebsentnahme 9 Tage nach Fraktur. 3 Tage unter Einfluß von Knochenextrakt. Spongiosabälkchen in Auflösung. Osteoklasten. Vergr. 855fach. Hämalan-Eosin. RP IV R7–4.



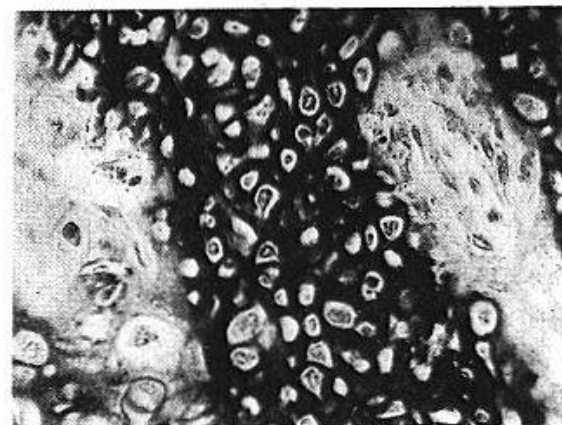
25



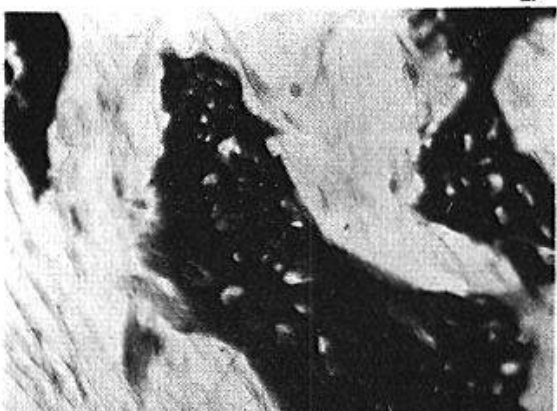
26



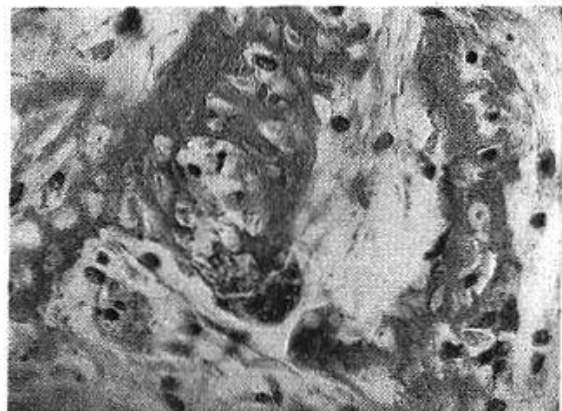
27



28



29



30



31

Abb. 31. Horizontalschnitt einer 17tägigen Kultur. Gewebseentnahme 11 Tage nach Fraktur. Zugabe von Knochenmark zum Explantat. In Nähe des Knochenmarkes ist der Knorpel des Explantates «arrodirt».

fikationsvorgänge, die *Fell* beobachtet hat, spielten sich im sogenannten Mutterstück, d. h. im Bereich des explantierten Gewebes ab, nicht aber in der in vitro entstandenen Wachstumszone. Auch die anderen Autoren, die Ossifikationen in vitro beobachtet haben, wie *Niven*, *Gaillard* oder *Bucher*, arbeiteten mit embryonalem Material.

Es erhob sich nun die Frage, wie sich das normale menschliche Periost in vitro verhält und wie es sich durch die Fraktur verändert. Wird das sogenannte «Frakturperiost» durch die Fraktur aktiviert und erhält es seine embryonalen Potenzen zurück?

Das Hauptinteresse unserer Versuche liegt, entgegen unserer ursprünglichen Absicht, nicht hauptsächlich in den Ergebnissen zur Frage der Osteoblastenherkunft und der Knochenbildung in vitro, sondern in dem objektiven Erfassen verschiedener Wachstumsaktivität im Bereich einer Fraktur in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Fraktur. Periostales Gewebe des ruhenden Knochens oder des verletzten Knochens bis etwa 4 Tage nach dem Unfallereignis zeigt keine oder geringe Wachstumsneigung. Ruhendes Periost wächst somit wesentlich schlechter als ruhendes mesenchymales Gewebe, gewonnen aus Lymphknoten, Bruchsack, Ovar oder Testis (*Meier*, *Weizmann*). Es fragt sich, ob unsere Technik der Periostentnahme genügend war, oder ob vielleicht die sogenannte Cambiumschicht auf dem Knochen belassen wurde. Histologisch läßt sich aber eine solche periostale Cambiumschicht beim ausgebildeten Knochen nicht finden. Es darf deshalb angenommen werden, daß wir den ganzen Periostmantel mit unseren Kulturversuchen erfaßten. Das normale Periost stellt somit ein Gewebe dar, das wenig zur Reproduktion in vitro fähige Zellen enthält.

Völlig verschieden sind die Resultate, die sich mit dem periostären Callusgewebe erhalten lassen. Es wächst in der Kultur rasch und reichlich. Aktivste Zellproliferation haben wir mit periostärem Callusgewebe erhalten, das ca. 10 Tage nach der Fraktur entnommen wurde, wobei bis zum 30. Tag nach der Fraktur keine wesentliche Abnahme der Aktivität festzustellen ist. Zwischen dem 30. und 100. Tag besitzen wir keine Fälle. 100 Tage nach der Fraktur ist die Wachstumstendenz wiederum zurückgegangen. Das Alter des Patienten, sein Geschlecht sowie auch die Lokalisation der Fraktur scheinen von wesentlich geringerer Bedeutung zu sein als das Alter der Fraktur. Eines der aktivsten Gewebe stammte von einer 84jährigen Frau in mäßigem Allgemeinzustand und war am 12. Frakturtag entnommen.

Gewebe in der Nähe von Osteosynthesemetallen zeigt noch ein Jahr nach der Fremdkörpereinpflanzung in der Umgebung des Metalls ein gefäßreiches Granulationsgewebe, das in vitro rasches und reiches

Wachstum ergibt. Periossäres Gewebe von Pseudarthrosen ergibt in vitro geringes Wachstum, das deutlich hinter dem einer Fraktur vom 8. bis 30. Tage zurücksteht. Es wäre denkbar, daß diese Verminderung der Wachstumsfähigkeit, die sich in vitro manifestiert, einen Faktor bei der Pseudarthrosenentstehung darstellt.

Was die Frage der Knochenbildung in vitro anbetrifft, so muß zwischen den Vorgängen in der Wachstumszone und denen im ursprünglichen Explantat unterschieden werden. Sichere Knochenbildung haben wir in der Wachstumszone menschlicher Periostkulturen nicht feststellen können. Immerhin zeigen eigenartige Veränderungen an Kulturen aus menschlichem periossärem Callusgewebe, die längere Zeit ohne Embryonal-extrakt gezüchtet sind, sowie die Kultur der Abb. 12, 13, daß diese Bildung in vitro vielleicht doch erfolgen kann. Das periossäre Callusgewebe der Ratte ergab immer nur fibroblastisches Wachstum. In der das Mutterstück umgebenden Wachstumszone kann zwar die Bildung von kollagenen Bindegewebsfasern, aber keine Knochenbildung beobachtet werden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob im explantierten Gewebe schon Knorpel- oder Knochengewebe vorhanden ist oder nicht.

Die auswachsenden Zellen geben in allen untersuchten Fällen eine negative Phosphatasereaktion, während in der gleichen Kultur die im Mutterstück vorhandenen Osteoblasten oder Knorpelzellen positive Phosphatasereaktion zeigen. Es muß also angenommen werden, daß beim Auswachsen in der Kultur eine Dedifferenzierung stattfindet. Möglicherweise steht das Ausbleiben der Ossifikation in der Wachstumszone mit diesem Fermentmangel im Zusammenhang. Versuche, die Knochenbildung durch Knochenextrakte oder durch Konfrontierung der Kulturen des Callusgewebes mit Knochenmarkskulturen anzuregen, führten zu keinem Erfolg. Wahrscheinlich spielen bei dem negativen Ergebnis die geringe Zelldichte sowie das Fehlen mechanischer Kräfte ebenfalls eine Rolle.

Im Gegensatz zur Wachstumszone scheinen im Explantat unter gewissen Bedingungen die Ossifikationsvorgänge weiterzugehen. Diese Vorgänge sind aber nicht leicht zu beurteilen. Die Schwierigkeit besteht darin, daß wir den Zustand des Gewebes zur Zeit der Explantation nicht genau kennen. Wir haben zwar immer eine Hälfte des Gewebstückchens histologisch untersucht und eine Hälfte explantiert. Aber da es sich um ganz inhomogenes Gewebe handelt, gibt uns diese Methode nur einen unsicheren Anhaltspunkt.

Wir haben die Beobachtung gemacht, daß in einigen Kulturen, deren Mutterstück Knorpel enthielt, welcher in Spongiosabälkchen überging, die vom Knorpel weit entfernten Knochenbälkchen nekrotisch waren,

während die an den Knorpel angrenzenden Bälkchen normale Struktur zeigten. Dazwischen waren in den 13 Tage alten Kulturen alle Stadien von Nekrobiose zu sehen. Dieser Befund kann bedeuten, daß junge Knochenbälkchen aus verschiedenen Entstehungsstadien in der Kultur verschieden lang überleben, es kann aber auch sein, daß noch während der Kulturperiode neue Knochenbälkchen aus dem vorhandenen Knorpel entstanden sind. Für die zweite Auslegung spricht die Beobachtung, daß explantierte Knochensplitter, die am 3. Tag nach der Fraktur mit dem perifrakturen Gewebe explantiert wurden, nach 1- und 5-tägiger Züchtung vollständig nekrotisch sind. Es scheint also fertiger Knochen in der Kultur sehr kurz zu überleben.

Die zweite Beobachtung, die dafür spricht, daß im Mutterstück Ossifikationsvorgänge noch einige Zeit weitergehen, ist die, daß die am Rande eines knorperligen Mutterstückes vorhandene, schalenartige Knochensubstanz sich in die kollagenen Fasern, die in der Wachstumszone entstanden sind und das Mutterstück zirkulär umgeben, fortsetzt.

Unsere Beobachtungen geben also Anhaltspunkte für die Annahme, daß im Mutterstück bei der Explantation schon im Gange befindliche Ossifikationsprozesse noch einige Zeit weiterlaufen. Interessant ist, daß es das knorpelige Vorstadium ist, das sich *in vitro* weiterentwickelt. – Durch die Tatsache, daß im Explantat Ossifikationsvorgänge auftreten, stellen sich die Resultate in eine gewisse Übereinstimmung mit den am embryonalen Knochen erzielten Ergebnissen (*Fell, Roulet*).

Damit ist aber nicht gesagt, daß es das ruhende Periost ist, das durch irgendeine Aktivierung wiederum embryonale Potenzen erhält. Vielmehr muß festgestellt werden, daß sich das ruhende Periost in unseren Versuchen als ein außerordentlich träges Gewebe erwiesen hat, das auf den Reiz von Serum plus Embryonalextrakt nicht reagiert. Wie die entsprechenden Versuche mit jungem Callusgewebe sowie Versuche anderer Autoren mit verschiedenen Bindegewebszellen des Menschen zeigen, sind diese Medien geeignet, *in vitro* reichliches Wachstum hervorzurufen, wenn die zur Antwort fähigen Zellen im explantierten Gewebe enthalten sind. Dies ist beim ruhenden Periost nicht der Fall. Unsere Versuche mit der Gewebekultur ergeben also keine Möglichkeit, die rasche Entstehung des zellreichen periostären Callusgewebes durch eine Aktivierung des ruhenden Periostes zu erklären.

Zusammenfassung

Es wurde menschliches periostäres Gewebe verschiedener Funktionszustände explantiert. Normales Periost ergab *in vitro* in jedem

Fälle sehr schlechtes Wachstum. Demgegenüber zeigte «Frakturperiost», d. h. periossäres Callusgewebe, das 8–30 Tage nach der Fraktur entnommen wurde, sehr kräftiges Wachstum *in vitro*. Alter und Geschlecht des Patienten schienen nicht von ausschlaggebender Bedeutung bei dieser Aktivierung. Die Trägheit des ruhenden Periostes spricht gegen seine überwiegende Bedeutung im Aufbau des wenige Tage nach der Fraktur vorhandenen periossären Callusgewebes. – Pseudarthrosenperiost sowie Gewebe in der Nähe von Osteosynthesenmetallen sind ebenfalls gegenüber dem ruhenden Periost in ihrer Wachstumsintensität gesteigert, stehen aber weit hinter dem «Frakturperiost» zurück.

Zum weiteren Studium der Vorgänge im Explantat (Mutterstück) und in der Wachstumszone wurde «Frakturperiost» der Rattentibia explantiert. In allen Kulturen wurde fibroblastisches Wachstum ohne Knochenbildung in der Wachstumszone der Kulturen beobachtet. Einige Beobachtungen sprechen aber dafür, daß im Mutterstück die bei der Gewebsentnahme im Gange befindlichen Knochenbildungsvorgänge einige Zeit weiterlaufen. Bei der histochemischen Untersuchung zeigte sich, daß in den auswachsenden Zellen mit der Methode von Gömöri keine Phosphatase nachgewiesen werden kann. Im Ausgangsstück sind dagegen die vorhandenen Knorpelzellen oder Osteoblasten selbst nach längerer Kulturdauer noch phosphatase-positiv. Es scheint also in der Wachstumszone zu einer Dedifferenzierung der osteogenen Zellen zu kommen. Knochenextrakt nach Annersten oder Knochenpulver «Ossopan» zeigte in unseren Versuchen keinen nachweisbar fördernden Einfluß auf die Wachstumsvorgänge *in vitro*. Konfrontierung der Kulturen mit Knochenmark ergab kräftige Kulturen des periossären Callusgewebes, aber keine vermehrte Knochenbildung.

Résumé

Les auteurs ont étudié le comportement de tissu périosseux humain, prélevé au cours de différents états fonctionnels. Le périoste normal montra une croissance très limitée *in vitro*. Par contre, le «périoste de fracture», c'est-à-dire, un périoste de cal, prélevé 8–30 jours après la fracture, se développa très activement *in vitro*. L'âge et le sexe des fracturés ne semblèrent pas jouer de rôle dans cette activation tissulaire, l'inertie du périoste au repos est un argument contre son importance dans l'élaboration du tissu périosseux du cal, que l'on trouve quelques jours après une fracture. Le périoste des pseudarthroses, ainsi que le tissu avoisinant une ostéosynthèse métallique, sont aussi un peu activés

par rapport au périoste au repos, toutefois beaucoup moins actifs que le «périoste de fracture».

Au cours de l'étude des phénomènes se passant dans l'explantat (fragment original) et dans la zone de croissance, on prit du «périoste de fracture» du tibia de rat. Dans toutes les cultures, on constata une abondante prolifération fibroblastique, sans formation osseuse. Toutefois, certaines observations semblent montrer que les formations osseuses, en train de se faire au moment du prélèvement, continuent leur évolution pendant un certain temps encore *in vitro*. L'examen histochimique montra que, dans la zone de croissance, on ne peut pas mettre de phosphatase en évidence par la méthode de Gömöri. Par contre, dans l'explantat, les cellules cartilagineuses ou les ostéoblastes sont encore phosphatase-positifs, même après une certaine durée de culture. Il semble donc que dans la zone de croissance se fait une certaine différenciation des cellules ostéogènes. L'extrait osseux, selon Annersten, ou la poudre d'os «Ossopan» ne montrèrent, dans nos expériences *in vitro*, aucune action activatrice sur la prolifération cellulaire.

Si l'on met en présence nos cultures et de la moelle osseuse, il y a une forte activation du tissu calleux périosses, mais sans augmentation de formations osseuses.

Riassunto

Gli Aa. descrivono gli esperimenti eseguiti *in vitro* con tessuto periostale umano nelle diverse fasi di attività. Il tessuto periostale normale *in vitro* prolifera molto debolmente, mentre il tessuto periostale del callo periossale prelevato 8-30 giorni dopo la frattura ossea mostra una proliferazione molto intensa. Né l'età né il sesso sembrano aver importanza per l'attivazione della proliferazione periostale. La debole attività del periosto normale non parla in favore di una sua grande importanza nella formazione del callo periossale, che si forma già pochi giorni dopo la frattura. Il tessuto periostale della pseudartrosi come pure quello in prossimità dei corpi metallici delle osteosintesi hanno *in vitro* un'attività proliferativa più intensa del tessuto normale, inferiore però all'attività del periosto da frattura.

Ricerche sperimentali sul comportamento del tessuto periostale nella zona proliferativa furono eseguite dagli Aa. con periosto da frattura della tibia del topo. In tutte le culture la proliferazione fibroblastica fu intensa, però senza dar luogo a formazione di tessuto osseo. Certe osservazioni sembrano indicare che i processi osteo-formativi già in atto nel tessuto

madre prima del prelevamento continuino per qualche tempo anche in vitro. All'esame istochimico delle cellule proliferanti non si rilevò traccia alcuna di fosfatasi alcalina con il metodo di Gömöri. Nel tessuto periostale originale, tessuto madre, invece le cellule cartilaginee e gli osteoblasti rimangono fosfatasi-positivi per parecchio tempo anche nelle culture. Queste osservazioni parlano per un processo di dedifferenziamento della cellula osteogena nella zona proliferativa. Nè l'estratto osseo di Annersten nè la polvere ossea «Ossopan» mostrarono in vitro alcuna azione favorevole sui processi proliferativi; con midollo osseo fu invece evidente una vivace proliferazione del tessuto calloso periostale senza formazione di tessuto osseo.

Summary

Human periosteal tissue of different functional conditions was explanted. Normal periosteum showed very poor growth in vitro in each case, while "fracture periosteum", i.e. periostal callus tissue taken 8-30 days after the fracture, showed very vigorous growth in vitro. The age and sex of the patient did not seem to be of significance in this activation. The inertia of the resting periosteum does not support the conception of its predominant significance in the building up of the periostal callus tissue found a few days after the fracture. The intensity of growth of periosteum taken in non-united fractures and tissue in the proximity of osteo-synthesis metals is increased in comparison with the resting periosteum, but is much less than the "fracture periosteum".

For further study of the processes in the explant and in the growth zone, pieces of "fracture periosteum" of the rat's tibia were explanted. In all cultures, a fibroblastic growth was observed without bone formation in the growth zone of the cultures. A few observations seem to indicate that in the explant the processes of bone formation which are found with tissue removal continue for some time in vitro. In histochemical investigations, no phosphatase could be shown in the zone of outgrowth by the Gömöri method. In the explant, the cartilage cells or osteoblasts are phosphatase-positive even after long periods of culture. There therefore seems to be a de-differentiation of the osteogenic cells in the growth zone. Bone extract according to Annersten or bone powder "Ossopan" showed no demonstrable stimulating influence on the growth processes in vitro in our experiments. Confronting cultures with bone marrow gave vigorous cultures of periostal callus tissue but no bone formation.

Annersten, S.: Chirurg **13**, 76 (1941). – *Bucher, O.*: Acta anat. **14**, Fasc. 1/2 (1952). – *Bucher, O.*, und *Weil, J. Th.*: Experientia **1951**, 7/1, 38. – *Doljanski, L.*: Z. Zellforsch. usw. **8**, 789 (1929). – *Enneking, W. F.*: Anat. Rec. (Am.) **101**, 515 (1948). – *Fell, H. B.*: Arch. exper. Zellforsch. **11**, 245 (1931). – *Gaillard, P. J.*: Hormones regulating Growth and Differentiation in Embryonic Explants. Hermann & Cie, Paris 1942). – *Krull, G.*: Arch. Orthop. usw. **37**, 131 (1937). – *Lacroix*: L'Organisation des Os. Masson & Cie. Paris 1949. – *Leriche, R.*: Physiologie et Pathologie du Tissu Osseux. Masson & Cie., Paris 1939. – *Levander, G.*: Acta chir. scand. (Schwd.) **83**, 1 (1939). – *Meier, R.*, *Posern, E.*, und *Weitzmann, G.*: Virchows Arch. **299**, 316 (1937). – *Niven, J. S.*: J. Path. a. Bacter. **34**, 307 (1931). – *Policard, A.*, und *Boucharlat, M.*: Arch. exper. Zellforsch. **2**, 223 (1926). – *Rosin, A.*: Acta anat., im Druck. – *Roth, H.*: Die Konservierung von Knochengewebe zu Transplantationszwecken. Springer. Wien 1952. – *Roulet, F.*: Arch. exper. Zellforsch. **17**, 1 (1935). – *Wjereszinski, A. O.*: Virchows Arch. **251**, 268 (1924).