

Notizen über die Bildung des Knochengewebes.

Von M. Gardner,

Priv.-Doc. an der Universität Moskau.

Die klassischen Arbeiten v. Ebner's, Gegenbaur's, Ranvier's, Kölliker's u. a. hervorragender Anatomiker und Histologen haben den allgemeinen Plan des Vorgangs, als dessen Endresultat das definitive Knochengestüst des tierischen Organismus erhalten wird, soweit aufgeklärt, dass der heutige Forscher auf diesem Gebiete kaum hoffen kann etwas wesentlich Neues in die schon vorhandenen Beschreibungen einzutragen. Die in der Wissenschaft seit lange herrschende Meinungsverschiedenheit über die Quelle und den Ursprung des Knochengewebes, wobei einerseits der neoplastische, andererseits der metaplastische Typus der Verknöcherung (Lieberkühn, Strelzoff, Kastschenko, Kassowitz u. a.) angenommen wird, verliert auf Grund anderer, genauerer Beobachtungen (H. Müller, Stieda, v. Brunn, Lilienberg u. a.) mehr und mehr an Schärfe. Möglichkeit directer Metaplasie wird jetzt, und zwar mit grossem Vorbehalt, nur für wenige, in ausschliesslichen Bedingungen befindliche Stellen zugegeben, und dürfte wohl kaum noch jemand die Gesetzmässigkeit eines unmittelbaren Uebergangs des hyalinen Knorpels in das Knochengewebe, wenigstens in Bezug auf die normale, nicht rachitische, lamellöse Knochen-substanz der höheren Wirbeltiere vertreten. Wir könnten noch hinzufügen, dass sogar die bisher angenommene Einteilung des Ossificationsprocesses in einen enchodralen und einen perichondralen, s. periostalen, eher bequemi-lichkeitshalber beibehalten wird, als dass diese Einteilung auf das Wesen der dasselbst stattfindenden morphologischen Erscheinungen sich stützen würde. Alle complicirten Veränderungen des Knorpels führen schliesslich zu dessen Untergang, während der an dessen Stelle entstehende Knochen aus einer anderen Anlage sich entwickelt und zwar ganz auf dieselbe Weise, wie wir es an der osteogenen Schicht des Perichondriums oder des Periosteums sehen. Trotz des Kampfes der verschiedenen Meinungen unter einander, trotz der zahlreichen dieser Frage gewidmeten Arbeiten, die häufig zu widersprechenden Schlüssen geführt haben, oder, richtiger gesagt, auf Grund alles dessen, gesellen wir Histologen uns fast einstimmig dem schon vor langer Zeit von Sharpey ausgesprochenen Satze bei, dass überall, wo der Knochen durch ein Knorpelmodell vorgebildet ist, letzteres im Ossificationsprocess nur eine provisorische Bedeutung hat: dasselbe verschwindet, nachdem es seine leitende Rolle erfüllt hat. Infolgedessen ist die Aufmerksamkeit des heutigen Histologen, der die Ossification im engeren Sinne des Wortes studirt, alleinig auf die osteogene Schicht, und zwar auf die in derselben befindlichen Osteoblasten Gegenbaur's,



ФОТТИ П ПАВЛОВА

Prof. Setchenow



Fig. I.



Fig. II.

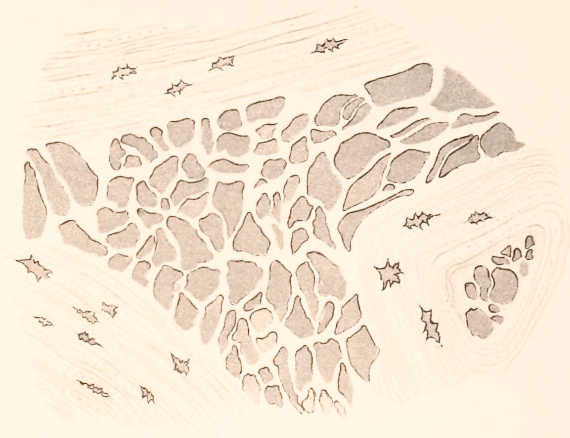


Fig. IV.



Fig. III.

a

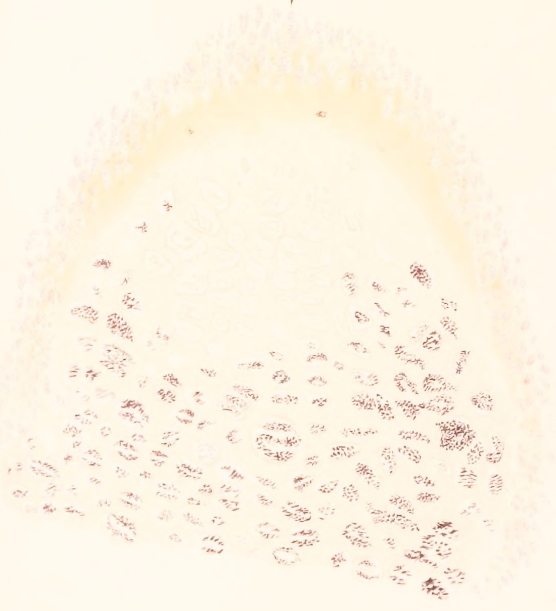
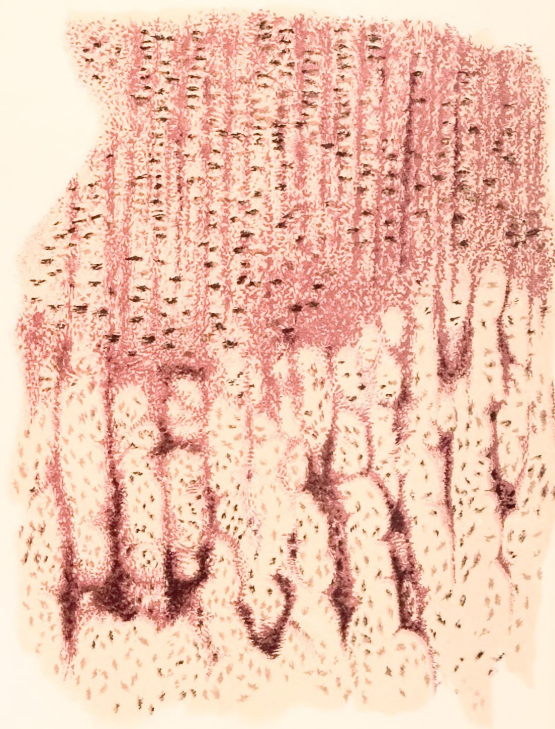


Fig. V.



„Le Physiologiste Russe“, vol. IV, №№ 68—74, p. 16. Gardner M. „Notizen über die Bildung des Knochengewebes“.

als auf die einzigen aufbauenden Elemente des hochdifferencirten Gewebes des definitiven Knochens, gerichtet.

Es müsste somit die Frage weit vereinfachter und bloß auf das Studium der Natur und der Lebensthätigkeit der Osteoblasten beschränkt erscheinen; es ist jedoch nicht zu leugnen, dass in dieser Beziehung noch gar zu wenig geleistet ist. Wenn der Ossificationsprocess bis jetzt für einen der verwickeltsten und dem Verständniss am schwersten zugänglichen gehalten wird, so liegt das meiner Ansicht nach daran, dass es an cytologischen Thatsachen mangelt, auf Grund deren wenn nicht Identität, so doch Analogie in der Genesis und Structur des Knochengewebes und denjenigen anderer Gewebe aus der Gruppe der Bindegewebssubstanz festgestellt werden könnte. Zwar ist in Bezug auf die Structur eine solche Identität in der Hauptsache schon anerkannt; in Betreff des Ursprungs der verschiedenen Elemente der Knochen giebt es aber noch viele offene Fragen, welche dem Knochengewebe einen besonderen, ausschliesslichen Platz anweisen. Wenn die Osteoblasten, die epithelartig fest aneinandergedrängt liegen, in Knochenzellen sich verwandeln, so fragt es sich, woraus die faserige Knochengrundsubstanz besteht, die so complicirt gebaut ist und ihrer Masse und Bedeutung nach in dem, wozu das Knochengewebe bestimmt ist, die Hauptrolle spielt? Woher stammt das Ossein, woher kommen die Mineralsalze? Was ist das weitere Schicksal der Osteoblasten, nachdem sie ihre Matrix verlassen haben und in ein ganz neues Medium gelangt sind. Wo entspringt und wie wächst die hochdifferencirte und deshalb in einem gewissen Grade inerte Knochensubstanz in der Periode, wenn das Knorpelmodell dem sich entwickelnden Knochen sich entzieht, dieser aber zugleich erhöhte knochenbildende Thätigkeit nicht bloß an der Peripherie durch Apposition sondern auch, um seine definitive Architektonik zu erreichen, in der compacten Substanz durch intersticielle Ablagerungen entfalten muss? Das sind unter vielen anderen die Hauptfragen, die beim Studium des Ossificationsprocesses sich uns aufdrängen und deren Beantwortung auch auf diesen bis jetzt noch unklaren Vorgang, der uns mehr dem allgemeinen Plan nach als seitens der daselbst stattfindenden cytologischen Erscheinungen bekannt ist, ein gewisses Licht werfen dürfte.

Im Laufe meiner Arbeiten über die Genesis des Knochengewebes begegnete ich einigen Thatsachen, die, wie mir dünkt, vom Standpunkte oben-erwähnter Fragen aus einige Aufmerksamkeit verdienen. Diese Thatsachen sind es, die ich mir erlaube hier in Kürze mitzuteilen, ohne darauf Anspruch zu machen eine systematische und volle Beschreibung des ganzen Ossificationsprocesses von Anfang bis zu Ende geben zu wollen. Ausserdem erlaubt mir die von mir gewählte Form dieser Abhandlung, als vorläufige Mitteilung, die einschlägige Literatur nicht anzuführen und deren Uebersicht sowie verschiedene Einzelheiten meiner Beobachtungen, die ich hier nicht aufgenommen, erst in der definitiven Arbeit zu geben.

Als Untersuchungsmaterial dienten mir Embryonen und junge Individuen von Axolotlen, Hunden, Katzen, Schafen, Schweinen, menschliche Embryonen, Knochen von Kälbern, Ochsen, Menschen, das Operculum des Kiemenapparats und Fischschuppen. Die Anschaffung des Materials, welches zum Studium der

Knochenbildung dienen sollte, geschah dergestalt, dass eine successive Reihe von Altersstufen und eine Längendifferenz der Embryonen und jungen Individuen von 2—3 ctm. sich ergeben sollte. Ein solches Material erwies sich zwar sehr wertvoll für das Studium der allmäligen Bildung des Knochens als Organ, war aber ganz überflüssig für die Erforschung der feineren morphologischen Veränderungen bei der Bildung der Knochensubstanz als Gewebe. Alle von mir weiter anzuführenden Thatsachen können ebenso gut an irgend einem Tier beobachtet werden, mit Ausnahme des Axolotl, bei dem einige Momente so zu sagen ausfallen; wenigstens ist es mir nicht gelungen sie bei diesem niederen Wirbeltier zu beobachten. Was die Altersstufen anbelangt, so kann man, ohne auf die Länge des Tieres zu achten, mit Knochen vom Moment der ersten Spur von Verknöcherung in der Knorpelanlage bis zur Bildung der primordialis Knochenmarkhöhle sich begnügen, da im Fall, dass ein Unterschied in den Erscheinungen im weiteren sich auch zeigen sollte, derselbe nur ein quantitativer nicht aber qualitativer sein kann. Eine Ausnahme bildet natürlich der Fall, wenn Beobachtungen an dem intersticiellen Wachstum eines schon ausgebildeten Knochens mit ganz gesonderten Kanalsystemen und Lamellen in dessen compacter Substanz angestellt werden. Hierzu eignen sich am besten Knochen junger Tiere in dem Lebensalter, wenn diese schon die Fähigkeit erlangt haben alle möglichen selbständigen Bewegungen auszuführen. Die Auswahl des Materials bietet somit keinerlei Schwierigkeiten. Viel wichtiger ist die Wahl einer zweckmässigen Behandlung desselben.

In Bezug auf die verschiedenen Behandlungsmethoden sei Folgendes erwähnt. Zum Fixiren benutzte ich Alkohol, Formalin, Osmiumsäure, Picrinsäure, Sublimat nach M. Heidenhein's Methode, Flemming'sche und Hermann'sche Flüssigkeit; zum Färben—verschiedene Combinationen von Alauncarmin, Safranin, Thionin, Picrinsäure, bleu de Lyon und das Caleja'sche Gemisch aus Picrinsäure und Indigocarmin. Zur Aufdeckung der feineren Structur der Knochen an decalcinirten Präparaten finde ich aber besonders geeignet die Entkalkung und Fixation mittels Picrinsäure nebst nachheriger Behandlung nach Wolters, Methode, die von ihm zur electiven Färbung des elastischen Gewebes vorgeschlagen wurde. Auf Grund vieljähriger Erfahrung darf ich wohl behaupten, dass diese Methode für den Zweck, den der Autor im Auge gehabt hatte, seine Erwartung zwar nicht gerechtfertigt hat, für die Erforschung des leimgebenden Gewebes, des Knorpels und des Knochens aber sehr schöne und genaue Bilder liefert, die lebhaft an gute, feine Stahlstiche erinnern. Da diese Methode auf der Bildung von Hämatoxylinlack mit Chlorvanadium sich gründet, so muss die nachfolgende Differencirung durch Eisensesquichlorid besonders aufmerksam unter der Controlle des Mikroscoops ausgeführt werden. Somit hängt das Gelingen oder Nichtgelingen des Präparats nicht mehr von der Methode sondern in jedem einzelnen Fall gänzlich von der Geschicklichkeit des Experimentators ab. Unter den andern Entkalkungsmethoden verdient Behandlung mit Salpetersäure und Floroglucin den Vorzug, da nach einer solchen alle combinirten Färbungen ausgezeichnete Resultate liefern, jedenfalls viel bessere als bei Benutzung anderer Lösungsmittel des Kalks.

Unzweifelhaft erfordert die Lösung vieler mit der Knochenbildung ver-

bundener Fragen Decalcination des Knochens; doch meine ich, dass die Experimentatoren zu derselben öfter greifen, als es der Zweck der jedesmaligen Untersuchung benötigt. Man darf nicht vergessen, dass bei der Entwicklung des Knochens die Bildung der weichen Grundsubstanz mit der Imprägnation derselben mit festen Substanzen Hand in Hand geht; deshalb dürften die volleren Bilder an unentkalkten Präparaten das kleine Opfer einiger verdorbener Rasirmesser wohl aufwiegen. An solchen unentkalkten Schnitten erhielt ich im Sinne optischer Differencirung der Gewebe die besten Resultate von der combinirten Färbung mit Safranin oder gutem Alauncarmin, ferner Thionin und endlich Picrinsäure; man gewahrt dabei einen deutlichen Unterschied in der Färbung des centralen Theils der von Kalk imprägnirten Knorpelgrundsubstanz, deren peripherischer Zone, wo Kalk sich noch nicht gebildet hat, der osteogenen Schicht und der derselben anliegenden weichen Anlage. Ausser dieser Färbungsmethode wandte ich auch noch mehrere andre Behandlungsmethoden an. Einiger davon werde ich im weiteren, soweit es für die Darlegung der in dieser vorläufigen Mitteilung beschriebenen Beobachtungen nötig sein wird, erwähnen.

Wenn wir einen dünnen Schnitt eines sich entwickelnden Knochens, der z. B. nach Wolters' oder irgend einer andern Methode behandelt worden ist, bei mittlerer Vergrößerung (Zeiss Obj. 4,0, Oc. 4) betrachten und unsere Aufmerksamkeit der osteogenen Schicht zuwenden, die einem Stück schon entwickelter grobfaseriger Knochensubstanz fest anliegt, so sehen wir ein wohlbekanntes Bild, welches sich, ohne Ausnahme, an jedem Präparat wiederholt, gleichviel ob es der Diaphyse eines vom Knorpel vorgebildeten Röhrenknochens oder dem Schädel, d. h. einem aus Bindegewebe, ohne Knorpelanlage sich entwickelnden Knochen entnommen ist. Wir sehen eine Reihe epithelähnlich dicht nebeneinander liegender Osteoblasten, zwischen denen wir selbst bei starken Systemen keine Zwischenräume gewahren. Man erhält den Eindruck, als habe man eine sehr grosse Menge der Zellenelemente vor sich, die, der allgemeinen Ansicht nach, entweder in ihrem Ganzen oder in ihrem centralen Teil zur Bildung der Knochenkörperchen dienen. Doch fällt hier sogleich die Unverhältnissmässigkeit zwischen der Menge der Osteoblasten in der osteogenen Schicht und der durch deren Verwandlung entstandenen Knochenzellen im jungen Knochen auf. Zwar sind die Knochenzellen im peripherischen Teil dieses letzteren, mit Ausnahme einer engen Randzone, recht zahlreich und liegen verhältnissmässig ziemlich eng aneinander gedrängt; dennoch aber sind sie durch dünne Zwischenschichten scheinbar homogener intersticieller Substanz getrennt und stehen an Zahl den Osteoblasten der osteogenen Schicht bedeutend nach. Ferner nimmt die Anzahl der Zellen noch mehr in den centralen, auf Grund des Appositionscharakters der Aufschichtungen, älteren Theilen des neugebildeten Knochens ab, und die Grundsubstanz, die die Zellen auf ziemlich grosse Entfernungen auseinanderrückt, tritt in den Vordergrund. Es ist klar, dass bei weitem nicht alle Osteoblasten zur Bildung von Knochenkörperchen aufgebraucht werden; dass die grösste Anzahl derselben behufs irgend einer anderen Thätigkeit vor unsern Augen verschwindet und dass auch diejenigen, welche schon in charakteristische und scheinbar constante Formen von Kno-

chenzellenelementen sich verwandelt haben, in Wirklichkeit wenig beständig sind, ihrerseits verschwinden und dadurch der Grundsubstanz mehr Raum geben, welche letztere in gegebenen Momenten vom Organismus als Stützgewebe am meisten gefordert wird. Wo bleibt also die grösste Anzahl der Osteoblasten und was ist ihr weiteres Schicksal in dem neugebildeten Knochen?

Eine befriedigende Antwort auf diese Fragen giebt das Studium sehr dünner Schnitte eines mittels Picrinsäure decalcinirten, dann nach Wolters' Methode behandelten Knochens, wenn die Differencirung gut ausgefallen ist. Dabei ist es vorteilhafter vergleichungsweise in Wasser und in Canadabalsam eingeschlossene Präparate zu beobachten, um gleichzeitig den Vorteil, den die am meisten aufgehellten Objecte der im Balsam eingeschlossenen Präparate, und denjenigen, den die scharfen Umrisse der im schwach lichtbrechenden Medium befindlichen bieten, auszunutzen. Eine derartige Anordnung der Beobachtung gestattet bei Betrachtung solcher Stellen der osteogenen Schicht, wo die Elemente nicht gar zu eng aneinander liegen, bei Oelimmersion sich zu überzeugen, dass die Osteoblasten, die bei flüchtigem Ueberblick ganz identisch scheinen, in Wirklichkeit sehr klar ausgedrückte morphologische Unterscheidungsmerkmale besitzen.

Die einen, und zwar die meisten, haben das Aussehen grosser cylindrischer Zellen, die mit der untenliegenden Substanz des jungen Knochens innig verwachsen sind und in dieselbe übergehen, ohne dass eine Grenze bemerkbar wäre. Die ziemlich grossen runden oder ovalen Kerne solcher Zellen befinden sich am distalen Ende der Protoplasmamasse, deren proximaler Teil in der Richtung der Knochengrundsubstanz sehr zarte feine Längsstreifung und äusserst kleine Körnchen zwischen den einzelnen Strichen zeigt. Angelungenen Präparaten können Stellen beobachtet werden, wo diese Streifung in Bündel feinsten Fibrillen zerfällt, welche gleichsam in die untenliegende Knochensubstanz hineinwachsen. Diese Erscheinung ist natürlich nur eine illusionnäre: die feinen, zarten Fibrillen können in die ziemlich feste Grundsubstanz nicht hineinwachsen; offenbar haben sie im Protoplasma dieser Zellen sich in situ entwickelt und werden nach und nach von dem osteogenen Process seitens der nächstfolgenden Reihe der Osteoblasten, die sich entwickeln sollen, ergriffen. Dass dem wirklich so ist, beweisen die nach Wolters hergestellten Präparate, an denen häufig die fibrilläre Structur der Grundsubstanz sehr deutlich zu erkennen ist, wobei die Fibrillen, die sich in den Zellen der osteogenen Schicht gebildet haben, nicht selten recht tief im neugebildeten Knochen verfolgt werden können.

Nicht alle Zellen dieses Typus haben ein solches Aussehen, wie eben beschrieben wurde; man begegnet einer nicht geringen Anzahl schmalerer Zellen mit langgezogenen central liegenden Kernen, wobei das Protoplasma nicht nur mit dem unten liegenden Knochen verwachsen erscheint, sondern auch in der distalen Richtung einen mehr oder weniger langen Fortsatz aussendet, der sich allmählig verjüngt und zwischen den hier in Menge vorhandenen Zellenelementen der inneren Schicht des Periosteums ausbreitet. Neben diesen Zellen begegnet man auch solchen, in welchen das Protoplasma gar nicht mehr zu unterscheiden ist. Der ganze schmale, langgezogene Körper einer

solchen Zelle besteht gleichsam nur aus Fibrillen, in deren Innerem ein sehr schmaler, dünner, spindelförmiger Kern mit sehr deutlich ausgedrückten Pico-seerscheinungen sich befindet. An vielen Zellen läst sich das weitere Schicksal solcher sich deformirender Kerne verfolgen, welches zu deren definitivem Verschwinden führt, so dass man daran nicht zweifeln kann, dass es im Interesse der Production deutoplasmatischer Gebilde sich hier um den Untergang von Zellen handelt. Da sämtliche beschriebene Zellen Fibrillen ausarbeiten, so könnte man sie alle mit vollem Recht in eine Gruppe unter dem Namen Fibroblasten schliessen.

Welches ist nun die Natur dieser Fibrillen? Haben wir die Gewissheit, dass die Grundsubstanz des Knochens aus leimgebenden Fibrillen gebildet ist, so ist es schwer, wenn man die Grundsubstanz in dem Moment überrascht, wo diese Fibrillen an deren Oberfläche entstehen, ihnen eine andere Natur als eine leimgebende zuzuschreiben. Dennoch können wir an dem erwähnten Object keine positiven Beweise dafür liefern. Der Grund davon ist, dass es uns noch an sichern Methoden electiver Färbung der leimgebenden Substanz im Moment ihrer Entstehung fehlt. Für das vollkommen ausgebildete, reife collagene Gewebe besitzen wir eine genügende Anzahl von Farbenreactionen, unter denen ich in Betreff der Sicherheit der Resultate und der Deutlichkeit der Bilder dem bleu de Lyon und Caleja's Gemisch die erste Stelle anweisen möchte. Um die leimgebende Natur der Fibrillen in der Periode, wenn sie noch im Innern der Bildungszellen sich befinden, darzuthun, fehlt es uns vorläufig noch an einem Verfahren von gleicher Beweiskraft. Somit bleibt uns nur die Methode der Ausschliessung übrig, nämlich der Beweis, dass die erwähnten Fibrillen nicht elastischer Natur sind, da es nicht möglich ist irgend welche andere Fibrillen sich hier vorzustellen. Die Erforschung des Anteils, den das elastische Gewebe an dem Knochenbildungsprocess nimmt, bildete einen Teil meiner Aufgabe, und behalte ich mir vor, die erhaltenen Thatsachen seinerzeit mitzuteilen. Hier will ich nur auf den allgemeinen Schluss mich beschränken, dass die Anwendung der zahlreichen Methoden electiver Färbung der elastischen Substanz, die uns heutzutage zu Gebote stehen, nur einen sehr mässigen Anteil derselben an jenem Prozesse aufgedeckt hat. Jedenfalls spielt es nur eine untergeordnete Rolle, was vollkommen der schwachen Verbreitung der elastischen Fasern in dem fertigen Knochengewebe entspricht. In der Entwicklungsperiode dieses letzteren beweisen electiv gefärbte Präparate, dass die äusserst feinen Fäden im Innern der Fibroblasten keinen elastischen Charakter aufweisen, so dass wir gezwungen sind denselben leimgebende Natur zuzuerkennen.

Einen directeren Beweis für denselben Satz finden wir in der Entwicklung derjenigen Knochen, die Prof. Kölliker «secundäre Knochen», und, in Bezug auf das Skelett des Schädels, auch «Deckknochen oder Belegknochen» genannt hat. Ein sehr interessantes Beispiel einer solchen Entwicklung fand ich in dem untern Teil der Extremität eines Schafföetus. In einem kleinen Raume zwischen den durch Knorpel vorgebildeten Knochen und der sich entwickelnden Hufe kann man hier einen in Entwicklung begriffenen grobfaserigen Knochen mit allen ihm eigentümlichen Attributen, d. h. einer homogenen oder, je nach der

Behandlung, faserigen Grundsubstanz und charakteristischen Knochenzellen, sehen. In frühen Entwicklungsstadien finden wir hier keine Spur von Periost, und die ganze Knochenanlage bildet sich auf Kosten des weichen Bindegewebes. Einige Zellen dieses Gewebes differenciren sich zu Fibroblasten, die in parallelen Reihen in zwei sich rechtwinklig kreuzenden Richtungen sich anordnen, so dass eine Art von Geflecht entsteht, welches sehr an das aus Kette und Schuss auf dem Webstuhl erhaltene Gewebe erinnert. Die Maschen dieses Gewebes umfassen Zellen anderer Art, die anfänglich einen ganz indifferenten embryonalen Charakter haben, in der Folge aber allmählig Fortsätze aussenden und zu typischen Knochenzellen werden. Imprägnation mit Kalksalzen wird in dieser Periode noch nicht beobachtet; die Grundsubstanz homogenisirt sich jedoch so weit, dass ohne spezifische Behandlung ihr fibrillärer Bau ganz verschwindet. Von einer solchen Anlage aus ziehen in regelmässigen parallelen Reihen die Enden der Kette und des Schusses noch allen Seiten hin, und alles dies wird, mit Ausnahme der Zellen, von bleu de Lyon intensiv blau, von Picrinsäure nebst Indigocarmin, nach Caleja, grün gefärbt. Nur in den centralen Theilen der Anlage ist die Intensität der Färbung eine etwas geringere. In dem vorliegenden Object sind die Fasern oder, richtiger, die daraus bestehenden Bündel gröber und in ihrer Entwicklung weiter vorgeschritten, ohne die Einwirkung der andern, der fertigen Knochensubstanz eigentümlichen, chemischen Ingredienzien noch erfahren zu haben; inloedessen reagiren sie charakteristisch auf die für leimgebende Fibrillen electiven Farben. Da aber der Unterschied zwischen der osteoiden grobfaserigen und der feinfaserigen Knochengrundsubstanz bei den höheren Wirbeltieren bloss in der Gruppierung der Fibrillenbündel, nicht aber in deren chemischer Natur besteht, so darf man wohl behaupten, dass auch die feinsten Fibrillen, die in der osteogenen Schicht der Beinhaut sich entwickeln, in dieser Hinsicht mit den ersteren identisch sind. Wenn sie trotzdem ihre electiven Eigenschaften den erwähnten Farbstoffen gegenüber nicht an den Tag legen, so geschieht das einmal, weil wir sie in der osteogenen Schicht in statu nascendi antreffen, zweitens weil sie in der Knochengrundsubstanz, wo sie ihre Eigenschaften eines reifen Gewebes schon offenbaren könnten, sofort von Substanzen einer anderen chemischen Natur imprägnirt werden, wovon die Rede weiter unten sein wird.

In Obigem sehen wir den ersten Typus von Zellen der osteogenen Schicht. Nicht an allen Stellen des Präparats gelingt es leicht, deren Schicksal im Sinne ihres Untergangs behufs Erzeugung von Fibrillen bis zu Ende zu verfolgen; bei weitem nicht alle besitzen einen distalen Fortsatz, dessen Anblick allein besondere Elemente in denselben vermuten lassen würde; im Gegentheil, in den allermeisten Fällen sind diese Zellen dem Aussehen nach den wirklichen Osteoblasten Gegenbaur's so ähnlich, dass es ganz verständlich erscheint, warum sie bei der Beobachtung ungenügend feiner Schnitte und wenig geeigneter Behandlungsmethode der Aufmerksamkeit entgehen und bis jetzt in den Lehrbüchern gewöhnlich als wirkliche Osteoblasten beschrieben werden. Diese letzteren, die den zweiten Typus der in der osteogenen Schicht befindlichen Zellen vorstellen, beginnen schon sehr früh ihre morphologischen Unterscheidungsmerkmale an den Tag zu legen. Vor allem werden sie etwas grösser

(die Fibroblasten werden kleiner) und erarbeiten in ihrem Innern eine Art Zellenorgan, auf welches im Jahre 1902 zuerst Askanazy (Centralbl. für allg. Pathol. Bd. XIII, № 10), Sacerdotti und Frattin (Sulla struttura degli osteoblasti, Anatomischer Anzeiger, Bd. XXII, № 1) hinwiesen und Vacuolen nannten. Sacerdotti und Frattin nennen es übrigen so mit dem Vorbehalt, dass dieses Gebilde eine wirkliche Vacuole nicht genannt werden könne, da sie das Vorhandensein einer Höhlung, die irgend eine andre Substanz enthält, nicht nachweisen konnten. Man könnte eher sagen, dass ein solches Gebilde seine Entstehung einer kugelförmigen Porzion des Cytoplasma verdanke, welche keine durch Hämatoxylin tingirbare oder überhaupt keine basophile Substanz enthält (In realtà però non possiamo dire che tratti di un vero vacuolo, perchè non abbiamo potuto dimostrare di essere di fronte ad una escavazione, contente una qualunque sostanza: piuttosto tal apparenza si può dire dovuta ad una porzione sferica di citoplasma, nella quale non esistono quelle sostanze che si colorana con l'ematosilina). Die Entdeckung der erwähnten Autoren ist vom biologischen Standpunkte aus eine sehr wertvolle. Dieselbe liefert ein neues Beispiel der sehr entwickelten Fähigkeit der Bindegewebszellen hochdifferencirte deutoplasmatische Einschliessungen zu architectonischen Zwecken in ihrem Innern auszuarbeiten, obgleich es weder den genannten Autoren noch mir leider bisher gelungen ist, die chemische Natur dieser rätselhaften Substanz zu ergründen. Auf Grund von Kossa's Methode mit Höllestein und Grandis' & Mainini's mit Purpurin geben Sacerdotti und Frattin das Vorhandensein von Kalksalzen in erwähnter Substanz nicht zu. Mir ist es auch nicht gelungen an Präparaten, die einer anderen Färbung unterworfen wurden, solche zu constatiren, obgleich dieses Verfahren, welches ich weiter unten beschreiben werde, sehr deutlich sogar minimale Quantitäten kalkhaltiger Substanzen in gewissen anderen Zellen desselben Präparats aufdeckt. Somit muss Production von Kalksalzen in den Vacuolen vorderhand abgeleugnet werden, wenn man von der Möglichkeit absieht, dass der Kalk mit der organischen Substanz in so enger chemischer Verbindung auftritt, dass unsre Färbungsmethoden denselben nicht aufzudecken vermögen.

Andererseits lässt die mikrochemische Reaction auf Phosphor nach Lillienfeld & Monti's Verfahren (Arch. italiennes de biologie, 1893), die sowohl in den Versuchen genannter Autoren als in den meinigen gleichfalls negative Resultate ergab, denken, dass die Vacuolen an dieser chemischen Thätigkeit keinen Anteil haben. Doch liess dieselbe Reaction die italienischen Forscher erkennen und gab mir Gelegenheit in meinen Versuchen zu beobachten, dass das basophile Cytoplasma der Osteoblasten ausserordentlich reich an Phosphor ist, und zwar im Vergleich zu den anderen am Aufbau des Knochengewebes teilnehmenden Elementen so reich, dass es kein grosser Irrtum sein dürfte, dasselbe für die Hauptquelle der Bildung dieser Substanz bei der Knochenproduction zu halten.

Zu der morphologischen Charakteristik der Vacuolen kann man noch hinzufügen, dass dieselben von dem sie umgebenden Cytoplasma meist nicht scharf abgegrenzt sind. Nicht selten begegnet man aber auch solchen, deren Peripherie durch eine feine, doch deutliche und glatte Linie gekennzeichnet

ist, so dass man den Eindruck, natürlich nur einen äusserlichen, eines zweiten Zellkerns erhält. Dieser Eindruck wird noch dadurch erhöht, dass im Centrum vieler, obgleich nicht aller Vacuolen die Basalfarben kleine runde Körperchen aufdecken, die sehr an die in den wirklichen Kernen der Osteoblasten befindlichen Nucleolen erinnern. Das Vorhandensein solcher, von einer ganz homogenen hellen Zone umgebener Körperchen leitete Sacerdotti und Frattin zu der Vermutung, dass man hier vielleicht Centrosome vor sich habe; doch hat eine specielle Behandlung der Präparate mit Eisenhämatoxylin keine sicheren Resultate geliefert (*senza sicuro risultato*). Bei meinen Untersuchungen setzte ich die Behandlung in dieser Richtung nicht fort, da das Centralkörperchen der Vacuole offenbar grösser als die Centrosome der Zellen der höheren Vertebrata ist, nur von Basalfarben gefärbt wird und in dem Teilungsprocess keine Rolle spielt. Die Vermutung, dass es eine Centrosome ist, liess ich um so leichter fallen, als es mir gelungen ist das Schicksal der Vacuolen etwas weiter zu verfolgen.

Wenn wir einen unentkalkten Schnitt eines in Entwicklung befindlichen Knochens nehmen und denselben so behandeln, dass die Kalkverbindungen sich färben, so gewinnen wir die Überzeugung, dass überall, wo eine solche Farbendifferencirung das gewünschte Resultat liefert, die centralen Teile der Knochensubstanz am intensivsten gefärbt sind; zur Peripherie hin wird die Färbung allmählig schwächer, und zuletzt sieht man eine mehr oder weniger breite an der osteogenen Schicht liegende Zone von Grundsubstanz, wo gar keine Färbung stattgefunden hat. In dieser Schicht erscheint die Grundsubstanz unter dem Mikroskop homogenisirt und auf diese Schicht ist die topographische Verbreitung der mit Vacuolen versehenen Osteoblasten, die hier schon zu Knochenzellen sich umgewandelt haben, beschränkt. Wenigstens ist es mir bis jetzt nicht gelungen Vacuolen in den Zellenelementen der Zone zu entdecken, wo Zellen mit deutlichen Farbenreactionen des Kalks in der Grundsubstanz angetroffen werden. In der Randzone dagegen kann man zahlreiche vacuolisirte Osteoblasten beobachten, und treten hier die Vacuolen gewöhnlich infolge ihres grösseren Lichtbrechungscoefficienten deutlich hervor. Nicht selten nimmt die Vacuole ohne irgend welche sichtbare Veränderung ihres Inhalts an Umfang ab, trübt sich und verschwindet allmählig, wobei auch die Zelle selbst nach und nach kleiner wird. Nicht selten aber werden dabei auch complicirtere Veränderungen beobachtet: die Vacuole nimmt eine Pseudowabenstructur an und zerfällt schliesslich in einen Haufen kleinerer Vacuolen, die einer Morula ähnlich dicht aneinandergedrängt liegen; dabei findet das optische Verschwinden der kleinen Bläschen von den am Rande befindlichen zu den centralen hin statt, bis die Vacuole endlich spurlos zergeht und durch basophiles Cytoplasma ersetzt wird. Da der Zellkörper dabei jedesmal kleiner wird, so entsteht unwillkürlich die Vermutung, dass der Vacuoleninhalt in die umliegende Grundsubstanz übergeht. Obgleich dies sehr wahrscheinlich ist, dürfte die Thatsache durch unmittelbare Beobachtung nicht zu beweisen sein.

Um die morphologische Charakteristik der Osteoblasten des beschriebenen Typus zu vervollständigen, können wir zu dem, was über die äussere Form, Grösse u. s. w. derselben schon bekannt ist, noch einige Einzelheiten über

den Kern hinzufügen. Der ziemlich grosse bläschenförmige, stets am distalen Ende der Zelle liegende Kern gehört zu der Kategorie der chromatinarmen Kerne. Im Centrum desselben befindet sich ein ziemlich grosses Körperchen, welches von Basalfarben stark gefärbt wird, und nur eine kleine Anzahl feiner Chromatinfäden durchfurcht stellenweise das Caryoplasma. Das erhaltene Bild gleicht dem, welches man an Eier- oder Nervenzellen sieht: der grösste Teil des Chromatins ist gleichsam in dem Nucleolus concentrirt und hat seine normale Paranucleinnatur gegen die ihm fremde Nucleinnatur vertauscht. Solche Osteoblasten liegen neben Fibroblasten, und man kann häufig beobachten, wie der proximale Fortsatz eines Fibroblasten den zunächst liegenden Osteoblasten umfängt und, unter dessen Basis sich fortschiebend, diese von der anliegenden Zone der Knochengrundsubstanz trennt, wobei der Fibroblast selbst, mit seinen feinsten Fibrillen in diese Substanz hineinwächst und optisch verschwindet. Es handelt sich hier natürlich nicht um eine Abtrennung des Osteoblasten, sondern um Anteilnahme desselben an dem Aufbau der Knochengrundsubstanz. Das Gewebe letzterer entsteht ebenso, wie wir es an dem grobfaserigen Gewebe in der Extremität des Schafembryo gesehen, und wie es unabänderlich bei der Entwicklung der Schädelknochen, bei der Ablagerung von Knochengrundsubstanz an der Oberfläche der Knorpelbalken in der primordialen Knochenmarkhöhle,—mit einem Worte überall dort stattfindet, wo, infolge normaler oder pathologischer Bedingungen, der Organismus die Bildung von Knochengewebe erfordert, nur mit dem Unterschiede, dass die gegenseitigen Beziehungen zwischen den Bauelementen nicht überall so deutlich wie in dem angeführten Beispiel ausgedrückt sind, was von der speciellen Anordnung derselben in jedem einzelnen Falle abhängt.

Sobald der Osteoblast von den die leimgebende Substanz ausarbeitenden Fibroblasten enger umfassen wird, beginnt an dessen Peripherie ein enger heller Saum, der offenbar auf Kosten des Ektoplasma des Osteoblasten entsteht, sich zu differenciren. Infolge der Imprägnirung mit Substanzen, die denselben Lichtbrechungscoefficienten besitzen, homogenisiren sich die Fibrillen, und das Entoplasma beginnt nach allen Seiten hin zuerst kurze, dann längere Fortsätze auszusenden, welche über die helle peripherische Zone hinausdringen, indem sie dieselbe möglicherweise in die umgebende Grundsubstanz hinausdehnen. Die allmälige Verlängerung der Fortsätze mit der Entfernung der Osteoblasten von der osteogenen Schicht infolge appositiver Aufschichtungen kann man sehr deutlich in der peripherischen Zone junger Knochen beobachten, in welcher, wie ich schon bemerkt, an unentkalkten Objecten es durch Farbenreaction nicht gelingt Kalkablagerungen nachzuweisen, wenigstens nicht im festen Aggregatzustande. Hier ist es nicht schwer zu bemerken, dass man die Osteoblasten der Zahl und Länge ihrer Fortsätze nach in zwei Gruppen teilen kann. Die Mehrzahl derselben hat verhältnissmässig wenig Fortsätze, welche zudem keine Neigung offenbaren, sich zu verästeln und von dem Zellkörper weit sich zu entfernen. Dies gilt von den meisten Zellen; daneben aber giebt es andere, reichlicher verzweigte Zellen, deren Fortsätze vom Zellkörper mit breiterer Basis abgehen und dann, allmähig sich verjüngend, tief in die Grundsubstanz eindringen. Bei diesen Zellen erlaube ich mir, etwas länger mich aufzuhalten.

Schon in der Periode, wenn die Differencirung der Zellen der osteogenen Schicht in Fibroblasten und Osteoblasten eben erst beginnt, können neben diesen Elementen Zellen angetroffen werden, die schon durch ihr Aeusseres sich so auszeichnen, dass man nicht umhin kann, sie aus der Masse der uns bekannten analogen typischen Zellen dieser Schicht in morphologischem Sinne in eine besondere Gruppe auszuscheiden. Dieselben sind etwas grösser, haben einen im centralen Teil des Protoplasma liegenden Kern und an der Peripherie kurze Fortsätze, die, von den diesen Zellen dicht umgebenden Elementen gedrängt, häufig an den Zellkörper angedrückt erscheinen. Dort, wo ein solcher Druck nicht stattfindet, sind die Fortsätze ihrer ganzen Länge nach deutlich sichtbar. Zum Unterschied von den wahren Osteoblasten beobachtet man in diesen Zellen keine Vacuolen. Bei der Behandlung der Präparate nach Wolters' Methode, die ich für das Studium solcher Gebilde lebhaft empfehlen möchte, bemerkt man im Cytoplasma Körnchen oder, richtiger, Tröpfchen, die intensiv schwarz gefärbt sind und die Intensität der Färbung auch dann nicht einbüssen, wenn die nachherige Behandlung mit Eisensesquichlorid länger gedauert hat, als zu guter Differencirung nötig ist, und der allgemeine Grundton des Präparat ein zu blasser wird. Die Körnchen haben in einem und demselben Protoplasma verschiedene Grösse; es giebt sehr kleine, nur im Oelsystem sichtbare, und grössere, die bei mässiger Vergrösserung zu unterscheiden sind; diese letzteren scheinen durch Wachsen ersterer zu entstehen, da Zwischenstufen beobachtet werden. Ueberall aber verleihen diese deutoplasmatischen Gebilde der Zelle ein grobkörniges Aussehen, sehr verschieden von der feinkörnigen Structur der wahren Osteoblasten, die nur bei den stärksten Vergrösserungen zu unterscheiden ist.

Nachdem solche Zellen in den Knochenbildungsprocess mit hineingezogen und durch die appositiven Aufschichtungen des Cambiums abgeschlossen waren, konnte ich an denselben den schmalen hellen Saum nicht so deutlich wie an den wahren Osteoblasten wahrnehmen. Diese letzteren schützen gleichsam die Integrität ihres Zellkörpers durch eine Hülle gegen die schädliche Einwirkung der ihrer chemischen Eigenschaften und ihrer Consistenz nach von ihnen ganz verschiedenen Grundsubstanz im Interesse irgend einer anderen, mit der Production dieser Substanz nicht unmittelbar verbundenen Thätigkeit; die grobkörnigen Zellen dagegen scheinen dessen nicht zu bedürfen sondern, im Gegenteil, sich zu bestreben mit der Grundsubstanz in engere Berührung zu kommen, ja vielleicht an deren Aufbau in einem gewissen Maasse unmittelbar teilzunehmen. Als Stütze einer solchen Vermutung dient das weitere Schicksal dieser grobkörnigen Zellen in der neugebildeten Knochensubstanz. An dem äusseren Rande derselben nehmen diese Zellen merklich an Grösse zu und entwickeln stark ihre protoplasmatischen Fortsätze. Ausserdem untergehen die Körnchen im Protoplasma gewisse Veränderungen. Sie scheinen anzuschwellen, ihre Färbung wird weniger intensiv, geht von schwarz zuerst in dunkelbraun, dann, unter allmäliger Entfärbung, in gelbbraun über, d. h. nimmt gerade die Färbung an wie die nach Wolters' Methode gefärbte Grundsubstanz des jungen Knochens an demselben Präparat. Dabei werden die Umrisse der Körnchen undeutlich, diese zerfliessen so, wie

man es an den Randkörnchen der Klasmatozyten oder Mastzellen, bei deren Umwandlung in Mucin oder in die mucinähnliche Substanz des faserigen Bindegewebes beobachtet. Es wirft sich von selbst die Frage auf, ob es nicht auch hier um Erarbeitung von Ossein oder einer ihm chemisch nahen Substanz sich handelt, welche die Bindegewebsfibrillen homogenisirt, da die soeben beschriebenen Erscheinungen an decalcinirten Präparaten beobachtet werden, wo von Kalk schon keine Rede mehr sein kann. Eine positive Antwort auf diese höchst wichtige Frage zu geben, ist es uns in Ermangelung entsprechender directer mikrochemischer Reactionem bisan noch nicht möglich.

In dem Maasse, wie die Ausarbeitung der Körner und deren weitere Umwandlung im Protoplasma fortschreitet, nimmt die Menge dieses letzteren ab, gleichsam als werde es bei dieser laboratorischen Thätigkeit verbraucht. Auch der Kern bleibt bei all diesen Veränderungen nicht unthätig, sondern weist Erscheinungen allmäliger Degeneration auf. Vor allem wird er etwas kleiner, compacter, und das Chromatin desselben verteilt sich diffus in dem ganzen Karyoplasma. Es tritt charakteristische Picnose ein, wobei an nach Wolters bereiteten Präparaten die Kerne als schwarze runde Scheiben oder Bläschen erscheinen. Im weiteren folgt Auflösung des Chromatins, die Kerne werden dunkel-, dann hellgrau, schliesslich ganz blass, indem sie als schwaches Anzeichen ihrer früheren Existenz kaum merkliche Umrisse hinterlassen, und verschwinden schliesslich ganz. Auch das Protoplasma verschwindet, und an Stelle der früheren verästelten Zelle bleibt eine enge verästelte Spalte nach, die bei der Schrumpfung des Präparats leicht zu entdecken ist. Studirt man die soeben beschriebenen degenerativen Veränderungen in der Randzone eines jungen Knochengewebes, so bemerkt man unschwer, dass auch einige andre wahre Knochenzellen dasselbe Schicksal unter denselben Erscheinungen erfahren haben; infolgedessen wird, im Hinblick auf den gleichzeitigen Untergang der Fibroblasten behufs Ausarbeitung der fibrillären Grundsubstanz, die geringe Anzahl der Knochenzellen in den centralen Teilen des neugebildeten Knochens, im Vergleich zu der allgemeinen Anzahl der bildenden Elemente der osteogenen Schicht, verständlich.

Man darf nicht erwarten den von mir in einen besonderen morphologischen Typus ausgeschiedene grobkörnigen Zellen an jeder Stelle des Präparats und bei jeder Behandlungsmethode zu begegnen. Im Innern des Cambiums können sie ganz deutlich nur bei der frühesten Anlage des Knochengewebes beobachtet werden, wenn die Elemente der osteogenen Schicht noch weniger eng aneinander liegen. Ich kann noch hinzufügen, dass andere Behandlungsmethoden, die ich erprobt, mir nicht so instructive Bilder wie die oben beschriebenen gegeben haben. Aber in einiger Entfernung von der osteogenen Schicht, im Innern der Randzone der jungen Knochensubstanz, ist es auch in spätern Formationen des Knochens nicht schwer, besagte Zellen zu unterscheiden und zwar auf Grund eines charakteristischen Merkmals: Reichhaltigkeit an Protoplasma, sollte in jedem einzelnen Fall die Körnchenbildung auch nicht deutlich ausgedrückt sein. Es sind am wenigsten differencirte Zellen, die ihren embryonalen Charakter am meisten beibehalten haben und schliesslich untergehen, um eine Substanz zu erzeugen, über deren Natur man gegenwärtig nur Vermutungen aussprechen kann.

Wenn das so ist, wenn die protoplasmareichen Zellen einen embryonalen Charakter haben, so ist es natürlich dieselben dort zu suchen, wo beim Wachsen des Tieres auch die Knochen wachsen, obgleich in allgemeinen Zügen die definitive Anordnung der Systeme derselben schon angedeutet ist. Nach einem factischen Beweis meiner Annahme forschend, nahm ich zu meiner Untersuchung die compacte Substanz der Diaphyse des Röhrenknochens eines Kalbes in dem Alter, wenn es schon selbstständig existiren kann. Die Wand eines solchen Knochens ist so dick, dass man auf ein gutes Resultat von Entkalkung mit Picrinsäure kaum rechnen kann, wenn die Behandlung nicht sehr lange fortgesetzt wird, was aber auf das junge zarte Gewebe nicht ohne Einfluss sein dürfte. Deshalb benutzte ich das rasche Verfahren mit Salpetersäure-Floroglucin, doch giebt Wolters' Methode nach dieser Behandlung leider keine guten Bilder, so dass neue Farbencombinationen nötig wurden. Unter diesen lieferten die besten Resultate im Sinne der Farbencontraste das Safranin und das Gemisch nach Caleja.

Da in diesem Falle der Knochen aus einer Wachstumsperiode stammte, wo dessen chemische und morphologische Zusammensetzung schon vollständig ausgeprägt war, so verhält sich der leimgebende Stoff in dieser Grundsubstanz Caleja's Gemisch gegenüber wie ein reifes Gewebe, und der ganze Grund des Bildes zeigt lebhaft grüne Färbung, wie Fig. I zeigt. Die Kerne der Knochenzellen sind rot gefärbt, während das Protoplasma die gelbe Farbe der Picrinsäure angenommen hat. Das allgemeine Bild des Präparats enthält alle Merkmale beendigter Entwicklung der compacten Substanz mit den äusseren und inneren Grundlamellen, den intersticiellen und Haversischen Lamellen und dem Kanalsystem, und es wäre schwer sie von dem definitiven Knochen zu unterscheiden, wenn die Abwesenheit Haversischer intersticieller Lamellen und grössere Entwicklung wirklicher intersticieller Lamellen nicht anzeigen würde, dass wir es hier mit einer jungen Form zu thun haben. Auf dem grünen Grunde des Präparats, wie wir es auf der Zeichnung sehen, ziehen in regelmässigen parallelen Reihen und in einiger Entfernung voneinander mehr oder weniger breite rote Streifen hin, welche bald in den äusseren Wänden des Haversischen Systems endigen, bald über denselben hinweggehen und nach beiden Seiten sich verbreiten, indem sie der Richtung der äusseren allgemeinen Lamellen folgen. Das sind nicht Ebner's «Kittlinien» und auch nicht Kölliker's «Grenzlinien» sondern dünne Schichten einer von dem allgemeinen Knochengewebe optisch abgesonderten Substanz, die in der Masse der intersticiellen Lamellen liegen. Betrachtet man solche dünne Schichten bei starker Vergrösserung, so gewinnt man vor allem die Ueberzeugung, dass deren Grundsubstanz die lebhaft grüne Färbung der fertigen leimgebenden Substanz nicht angenommen und eine gelbliche Nuance hat, welche allmählig nach beiden Seiten des Präparats hin und ohne scharfe Abgrenzung in die allgemeine Grundfarbe übergeht. Im Innern dieser gelben dünnen Schichten der Grundsubstanz treffen wir eine grosse Menge Zellenelemente an, die ziemlich eng aneinander liegen und von Safranin intensiv gefärbt werden. Infolge einer solchen Anordnung sowie des Umstandes, dass die Grundsubstanz von einer sehr grossen Anzahl von Zellenfortsätzen durchzogen ist, die sich von

Safranin ebenso scharf gefärbt haben, ist die rote Farbe in diesen Schichten vorherrschend. Das ist der Grund, weshalb bei kleinen oder mittleren Vergrößerungen das mikroskopische Bild so verschieden erscheint. Der morphologische Charakter der Zellen dieser intersticiellen Schicht ist nicht überall leicht zu erkennen, aber an gut ausgefallenen Stellen kann man sehen, dass nicht alle die gleiche Form haben. Es giebt unregelmässig polyedre Zellen ohne Fortsätze, diesen ähnliche Zellen mit wenigen kurzen Ausläufern, endlich reichlich verästelte Zellen. Diese letzteren verdienen meiner Ansicht nach besondere Aufmerksamkeit. Sie unterscheiden sich merklich von den gewöhnlichen, den Kürbissamen ähnlichen, reifen Knochenzellen. Ihr umfangreicherer Körper sendet nach allen Seiten hin lange Fortsätze aus, die eine etwas erweiterte Basis haben. Abgrenzung des Protoplasma in irgend einer Kapsel oder Höhlung ist nicht zu bemerken; das Protoplasma ist in seiner Gesamtheit stark rot gefärbt und zwar weit intensiver als die Kerne in den Zellen der grünen Zonen. Bei Oelimmersion zerfällt die einheitlich gefärbte Fläche in ein Häufchen grösserer oder kleinerer Körnchen, die electiv die Basalfarbe angenommen haben und sowohl im Protoplasma selbst als in den Fortsätzen bis an die Spitze sich dicht gedrängt verteilen.

An Präparaten, die nach der erwähnten Methode bereitet werden, gelingt es nicht, solche Zellen von ihrer Entstehung an und während ihrer allmäligen Veränderungen Schritt für Schritt zu verfolgen, was zum Teil von der Massenhaftigkeit der Elemente und vielleicht nicht weniger von der Unvollkommenheit der Behandlungsweise abhängt. Ich habe aber Gelegenheit gehabt unzweifelhaft zweikernige Zellen, degenerative Veränderungen in einzelnen Kernen und Abnahme der allgemeinen Masse des Zellkörpers zu beobachten. Die erste dieser Beobachtungen zeugt für die Möglichkeit eines Vermehrungsprocesses, die zwei andern dagegen nähern das Schicksal dieser Zellen demjenigen, welches wir unter günstigeren Untersuchungsbedingungen an den grobkörnigen Zellen des äusseren periostalen Cambiums studirt haben. Wird ein weiteres Studium dieser und jener Elemente die Analogie in volle Identität verwandeln, so werden wir berechtigt sein, von einem *inneren intersticiellen Cambium* zu reden, indem wir darunter die Zwischenschichten aus osteoidem Gewebe von embryonalem Typus zwischen den hochdifferencirten Schichten des lamellosen Knochens verstehen. Einige Begründung findet eine solche Hoffnung darin, dass in ebenso behandelten Knochen eines erwachsenen Ochsen, wo der Wachstumsprocess als beendet anzusehen ist, solche Zwischenschichten fast ganz verschwunden sind und basale grobkörnige Zellen zwar angetroffen werden, doch nur einzeln oder in kleinen Gruppen.

Als fernerer Beweis für die architectonische Bedeutung der hier verlaufenden Prozesse kann auch noch der Umstand dienen, dass auch im jungen Knochen, z. B. beim Kalbe, Bildung sog. perforirender Sharpey'scher Fasern beobachtet werden können, obgleich in dieser Periode noch in sehr geringer Menge. Offenbar sind dieselben mit dieser bildenden Schicht durch erweiterte Basen ihrer Bündel topographisch verbunden und gehen von dort aus, sich allmälig verjüngend, nach beiden Seiten auseinander, indem sie in die vollkommen entwickelten intersticiellen Lamellen hineindringen. Obgleich es mir

bisher noch nicht gelungen ist zu erforschen, unter was für cytologischen Erscheinungen das Entstehen und Wachstum der Sharpey'schen Fasern in der intersticiellen Zwischenschicht stattfindet, so habe ich doch an Präparaten von Knochen eines erwachsenen Ochsen, wo diese Fasern sehr zahlreich sind, Zellen von embryonalem Typus dagegen nur einzeln oder in kleinen Gruppen vorkommen, beobachtet, dass die Sharpey'schen Fasern aus derselben Schicht hervortreten. Solche gegenseitige Verhältnisse weisen auf eine nicht nur topographische sondern auch nähere, genetische, Beziehung zwischen den Zellenelementen und den faserigen Elementen des inneren Cambium hin.

Interessant ist noch die Thatsache, dass einzelne basale grobkörnige Zellen auch in solchem Material angetroffen werden können, welches jede Möglichkeit, dass irgend welche zartere Strukturen sich erhalten hätten, ausschliessen sollten; ich meine Schiffe von aus dem anatomischen Theater kommenden Knochen, wo sie bezwecks möglichst vollkommener Abtrennung der weichen Teile einer vom histologischen Standpunkte aus höchst rücksichtslosen Behandlung unterworfen werden. Es erweist sich jedoch, dass in Wirklichkeit die weichen Teile nur von der äusseren Oberfläche des Knochens und aus dem Knochenmarkkanal, vielleicht wohl auch noch aus den grösseren Kanälen der compacten Substanz entfernt werden; die kleineren Kanäle, besonders aber alle Knochenkörperchen halten ihren Inhalt ziemlich hartnäckig zurück. Unterwerfen wir den dünnen Schliff eines solchen Knochens der Behandlung, die wir an Schnitten eines entkalkten Knochens anwandten, und schliessen das Präparat in flüssigen Canadabalsam ein, damit alle dort befindlichen leeren Räume angefüllt und das Präparat aufgehellt werde, so sehen wir, dass die Grundsubstanz des Knochens gar keine Färbung angenommen hat, alle Knochenhöhlen aber voll Zellen sind. Zwar lässt sich bei all diesen Zellen schlechte Conservirung wahrnehmen,—das Protoplasma derselben färbt sich fast garnicht, auch die Kerne sind schwach gefärbt; dennoch aber ist es leicht das Vorhandensein des Zellkörpers und des Kerns in jeder Höhlung zu constatiren. Neben verschrunpften Zellen trifft man verhältnissmässig recht gut erhaltene an, unter diesen, hie und da, einzelne charakteristische basale grobkörnige Zellen. Die Bedeutung dieser Zellen in dem definitiven Knochen bleibt bisan rätselhaft und scheint in Anbetracht der im Vergleich mit den typischen Knochenkörperchen geringen Anzahl derselben keine besonders wichtige zu sein.

Das Vorhandensein einer Zelle in jeder Knochenhöhle ist sogar an schlecht macerirtem Material, falls sie nicht etwa zufällig beim Schleifen mechanisch entfernt wurde, ausser durch erwähnte Färbung auch mittels jeder andern leicht nachzuweisen; es muss der Schliff nur im weiteren der gewöhnlichen Procedur: Einschliessung in Canadabalsam, Entwässerung und Aufhellung unterworfen werden. Dieser Umstand erweckte in mir Zweifel an der Richtigkeit der allgemein üblichen Deutung des Bildes der Knochenschiffe, so dass ich mir erlaube einige Worte hierüber zu sagen. Zwar berührt diese Frage meine Beobachtungen über die Genesis des Knochengewebes nicht unmittelbar; dennoch aber steht sie zum Thema meiner Arbeit in indirecter Beziehung, wie weiter unten ersichtlich sein wird.

Die in allen Lehrbüchern vertretene Ansicht ist, dass die Knochenkörperchen und die Haversischen Kanäle an den Schliffen deshalb schwarz gefärbt erscheinen, weil durch Maceration die organischen Substanzen aus denselben entfernt sind und an deren Stelle Luft eingedrungen ist, die beim durchfallenden Lichte, infolge vollständiger innerer Zurückstrahlung, schwarz aussieht. Was die Knochenkörperchen anbelangt, so haben wir gesehen, dass dies nicht richtig ist. Zwar müssen die Zellen während des Trocknens der Knochen nach der Maceration, infolge des Wasserverlusts, verschrumpfen und kann die Luft in den Raum, welcher zwischen der verschrumpften Zelle und der Knochenhöhlenwand sich gebildet hat, eindringen; doch ist in diesem Fall volle Zurückstrahlung nicht möglich, da die dünne Luftschicht, welche ein Medium mit einem andern Lichtbrechungscoefficienten umgiebt und im allgemeinen die Form eines abgeplatteten Ellipsoïds, unter welche die Knochenhöhlen überhaupt gebracht werden können, vorstellt, die dazu nötigen optischen Bedingungen nicht bietet. Auch in dem Falle, wenn die Luft den ganzen Hohlraum einnähme, würden die Bedingungen zu jener Erscheinung fehlen. Um diese unsre Ansicht durch directe Beobachtungen zu stützen, leitete ich folgende Versuche ein. Ich liess mehrere Tage lang auf mechanische Weise von den weichen Teilen möglichst gut gereinigte Stücke von Röhrenknochen eines frischgetödteten Ochsen im Papin'schen Topf unter hohem Druck kochen. Das Wasser wurde so oft gewechselt, bis in der letzten Portion keine Spuren von Gallerte mehr auftraten, wonach die Knochen sorgfältig verbrannt wurden. Auf diese Weise war sämtliche organische Substanz wirklich entfernt, und es blieb ein Knochenmodell zurück, welches seiner Form nach vom normalen Knochen sich durch nichts unterschied, aber weit spröder war als das ohne vorhergehendes Auskochen durch blosses Verbrennen erhaltene. Aus einem solchen Knochen Schriffe herzustellen ist sehr schwierig, da er sogar bei unbedeutender Reibung in feines Pulver zerfällt. Mit Geduld und Ausdauer gelingt es aber dennoch, durch Schleifen zwischen zwei mattgeschliffenen Glasstücken kleine Stückchen zu erhalten, welche dünn genug sind, um das charakteristische Bild eines Knochenschliffs darzubieten. Wir sehen hier wirklich inhaltlose, d. h. mit Luft gefüllte Knochenhöhlen; diese bleiben aber ganz klar und zeigen keine Spur von der optischen Erscheinung, welche an Luftblasen bei vollständiger innerer Zurückstrahlung beobachtet werden. Deshalb muss das allbekannte Erscheinen schwarzer Knochenkörperchen bei der Beobachtung eines in keine Flüssigkeit eingebetteten Schliffs eine andre Deutung erhalten. Als wahrscheinlichste Ursache dieser Erscheinung dürfte wohl die Thatsache angesehen werden, dass die aus einer innigen Verbindung organischer und anorganischer Stoffe bestehende Grundsubstanz eines dünnen Knochenplättchens ebenso durchsichtig ist wie ein ebenfalls aus mineralischem Stoff bestehendes Glimmer- oder Gypsplättchen, während der Zelleninhalt der Knochenhöhlen einen andern Lichtbrechungscoefficienten besitzt und die Lichtstrahlen schlecht, oder, bei ungenügend dünnem Schliff, auch garnicht durchlässt. Daraus folgt, dass die Hohlräume solange schwarz scheinen, bis wir durch eine Flüssigkeit, die in dieselben eindringt, deren Inhalt bis auf den Lichtbrechungscoefficienten der Grundsubstanz bringen. In letzterem Falle

werden sie durchsichtig und auf Grund der Gesetze des Lichtbrechungsvermögens schwer unterscheidbar.

Als Beweis der Richtigkeit einer solchen Deutung dürfte der Umstand dienen, dass bei der Durchtränkung des Knochenschliffes mit einer Flüssigkeit wir keine Bildung von Luftbläschen in derselben bemerken, während doch aus den Hohlräumen verdrängte Luft im freien Zustande in Gestalt zahlreicher Bläschen sich offenbaren müsste. Dasselbe gilt auch von gewöhnlichen Knochenschliffen, die aber an sehr dünnen Stellen, wo die Elemente in *einer* Schicht liegen, in der Luft beobachtet werden: die infolge mechanischer Entfernung der Knochenzellen leer gebliebenen Hohlräume bleiben dort ebenfalls ganz durchsichtig.

Was die mittelgrossen und kleinen Haversischen Kanäle, in denen dieselbe Erscheinung beobachtet wird, anbelangt, so ist die Ursache derselben wieder nicht die Luft, sondern die innere Structur dieser Kanäle, die sich in der That in einem gewissen Maasse von der in den meisten Lehrbüchern beschriebenen unterscheidet. Dieser Beschreibung nach sind deren Wände entweder glatt oder mit kleinen in das Lumen des Kanals hineinragenden Vorsprüngen versehen. Es ist aber nicht schwer sich zu überzeugen, dass deren Bau ein viel complicirter ist. Bereitet man einen Schnitt aus einem im frischen Zustande genommenen und vorher fixirten entkalkten Knochen, wobei es besser ist den Schnitt ohne Paraffin- oder Celloidineinbettung auszuführen, und lässt ihn ausgebreitet auf dem Objectträger trocknen, indem man ihn ohne irgend eine Flüssigkeit oder ein Färbungsmittel mit dem Deckgläschen bedeckt, so gewahrt man Bilder, von denen eines auf Fig. II photographisch genau wiedergegeben ist.

Wir sehen hier einen Teil des Längsschnitts eines Haversischen Kanals, der sich in zwei Aeste theilt, die das Haversische System umfassen; in diesem System—einen anderen Kanal im Querschnitt. Bei einer gewissen Einstellung der Linse gewahrt man, dass von den Kanalwänden zahlreiche Knochenbalken von verschiedener Dicke abgehen, welche die Hohlräume in allen Richtungen durchziehen und durch ihre Kreuzungen ein dichtes Flechtwerk bilden, in welchem die hier nicht dargestellten Gewebe und Blutgefässe liegen. Wie schonungslos die Behandlung des Schliffs auch gewesen sei, ein Teil dieses Inhalts bleibt und bedingt durch seine Gegenwart optische Erscheinungen ähnlich denen, die wir an undurchsichtigen Knochenhöhlen, welche auf der durchsichtigen Grundsubstanz hervortraten, gesehen haben.

Nach dieser kleinen Abschweifung ins Gebiet der Structur des definitiven Knochens, kehre ich zu meinem Gegenstand zurück, um diejenigen Thatsachen anzuführen, die aus meinen Untersuchungen über den zweiten Hauptfactor in der Zusammensetzung des Knochengewebes, d. h. das Erscheinen der Mineralsalze, sich ergeben haben. Vor allem will ich mich hier bei den Vorgängen aufhalten, welche in den Ossificationspunkten in dem Knorpelmodell von staten gehen.

Es versteht sich von selbst, dass als Material zu solchen Untersuchungen unentkalkte und gut fixirte Objecte dienen müssen. Unter den von mir behufs bestmöglicher optischer Differencirung der verschiedenen Gewebe erprobten

Behandlungsmethoden erhielt ich die besten Resultate von der successiven Färbung zuerst mit Safranin (oder gutem Alauncarmin, falls das Fixierungsmittel keine Osmiumsäure enthielt), dann mit Thionin, endlich mit Picrinsäure. Dabei erscheinen die osteogene Schicht und die anliegenden Bindegewebszellen auf dem allgemeinen gelben Grunde rot, das neugebildete Knochengewebe sattgelb, die Knorpelgrundsubstanz hellblau und die Kerne der Knorpelzellen lebhaft blau gefärbt. Bemerkenswert ist, dass die Kalksalze, insofern sie im freien Zustande, sei es als winzige Krystalle oder als amorphes Pulver, sind, bei dieser Combination sich lebhaft rot färben und daher auf dem blauen Grunde infolge des Farbencontrasts sich scharf abheben, so dass man die Möglichkeit gewinnt, das Erscheinen der Salze vom ersten Moment ihres Entstehens an zu gewahren.

Fig. III stellt ein auf obige Weise behandeltes Präparat, nämlich einen tangentiell und etwas schief zu der Längsaxe eines in Entwicklung befindlichen Knochens geführten Schnitt, dar. Wir sehen hier alle drei in verschiedene abstechende Farben tingirte Zonen. Wenn der allgemeine Plan des Bildes von den Zeichnungen, die gewöhnlich in Lehrbüchern und Abhandlungen, welche die Entwicklung des Knochens besprechen, gegeben werden, etwas abweicht, so ist der Grund davon die, wie erwähnt, tangentielle Richtung des dargestellten Schnittes, während in den meisten Fällen durch die Mitte des Knochens geführte Längsschnitte abgebildet werden. Somit befinden wir uns hier ganz an der Oberfläche des Knochens, was für die Beobachtung einigen Vorteil bietet, da man gerade hier die Entwicklungsprocesse in ihrem Anfangsstadium antrifft, wo sie von den nachfolgenden Veränderungen der Bauelemente noch nicht verdunkelt sind.

In der osteogenen Schicht zeichnen sich durch ihre Grösse besonders die sternförmigen Zellen aus, die wir zu dem embryonalen Typus rechnen. Die Zeichnung zeigt sie nicht vollständig entwickelt, aber in *a*. ist eine Bindegewebszelle abgebildet, die alle übrigen an Grösse übertrifft. Das ist eines der Entwicklungsstadien der sternförmigen Zellen, und schon auf dieser Stufe gewahrt man deutlich das Erscheinen grober Körnchen in deren Protoplasma, welche sich lebhaft von Safranin färben, also basophil sind. Bei der Betrachtung verschiedener Stellen dieser Schicht, verfolgt man leicht alle Entwicklungsstadien sowohl dieser Granulation als auch der Zellen selbst. Letztere werden allmählig grösser und senden nach allen Seiten Ausläufer aus, von denen die meisten nach der sich neubildenden Knochensubstanz hinziehen. Weitere Erscheinungen im Sinne des Untergangs dieser Zellen während ihrer Teilnahme am Knobildungsprocess gelingt es hier weniger gut als an nach Wolters' Methode entkalkten Präparaten zu beobachten. Der Grund davon liegt, scheint es, in der Veränderung der Natur der Granulation selbst in dem Moment, wo dieselbe auf irgend eine Weise anfängt an dem Aufbau der Grundsubstanz teilzunehmen. Zu dieser Annahme leitet wenigstens der scharfe Farbenunterschied zwischen dieser Substanz und der osteogenen Schicht an gefärbten Präparaten. Jedoch, wie bekannt, ist das Wesen der bei der Färbung der Zellen und der Gewebe statthabenden Vorgänge bisan noch so wenig aufgehell't, die Mikrochemie im ganzen noch so wenig ausgearbeitet, dass

positive Erklärungen auf diesem Gebiete nicht möglich sind, und man mit dem blossen Constatiren morphologischer Thatsachen sich begnügen muss. Was die Osteoblasten mit Vacuolen und die Fibroblasten anbelangt, so lassen deren gegenseitige Beziehungen in der osteogenen Schicht an gelungenen Stellen auch an solchen Präparaten sich deutlich erkennen.

Die folgende Zone, d. h. die gelbe Zone der jungen Knochen substanz, bietet keine besonderen Einzelheiten der Structur oder der Bildung der Gewebe dar, weshalb wir uns bei derselben auch nicht aufhalten wollen. Weit grösseres Interesse stellt die innere Zone des Knorpels vor. Nach obiger Methode behandelt, lässt sie die hellblau gefärbte ganz structurlose, hyaline Grundsubstanz erkennen, auf deren Grunde gruppenweise oder einzeln typische Knorpelzellen zerstreut liegen, so dass das Präparat auf den ersten Blick von dem gewöhnlichen hyalinen sich durch nichts unterscheidet. Doch schon bei 300—400-maliger Vergrösserung werden in lebhaftes Rot gefärbte Granulationen in dem Protoplasma der meisten Zellen sichtbar. Eine homogene Immersion lässt an solchen Stellen ein Bild, wie es auf Fig. IV dargestellt ist, gewahren. Man sieht hier ganz deutlich grössere oder kleinere Körnchen oder Häufchen im Protoplasma, wobei ein Vergleich verschiedener Zellen uns zeigt, wie solche Einschliessungen anfänglich in Gestalt eines feinen Staubes erscheinen, dann allmählig grösser werden und manchmal die gewöhnlichen basalen Granulationen an Umfang bedeutend übertreffen. Der scharfe Farbcontrast würde auch dem winzigsten Körnchen nicht gestatten sich zu verbergen, so dass wir die Ueberzeugung gewinnen, dass in dieser Periode die Knorpelgrundsubstanz keine Spur solcher Körnchen enthält.

Um die weiteren Veränderungen zu sehen, muss man den etwas weiter unten liegenden Schichten des Knorpels sich zuwenden, die aber immer noch an der Peripherie liegen, da die centralen Teile auf einmal ein solches Bild liefern, welches ganz unverständlich wäre, wenn man den Process nicht Schritt für Schritt verfolgt hätte. Etwas tiefer als die beschriebene Schicht finden wir immer zunehmende Mengen roter Körnchen im Protoplasma; dabei erscheinen eben solche, sehr kleine Körnchen auch in den Knorpelkapseln, anfänglich in geringer Menge, dann in immer grösserer, bis endlich die ganze Kapsel durch die in derselben aneinander gereihten Körnchen ein rosenkranzartiges Aussehen gewinnt. In diesem Moment zeigt sich an dem Umkreise der Knorpelzellen, im Gebiete der secundären Kapseln, gleichsam ein rötliches Wölkchen, welches nur unter den bestmöglichen Versuchsbedingungen (homogene Immersion + vollständige schräge Beleuchtung mit einem Oeltropfen an der Frontlinse des Condensors) als aus kaum wahrnehmbaren Teilchen bestehend erscheint, welche im weitem umfangreicher werden, gleichsam zusammenfliessen und schliesslich eine solche Grösse erreichen, dass sie schon bei gewöhnlichen mittleren Vergrösserungen unter dem Mikroskop sichtbar werden. Ein solcher Verlauf dieses Processes leitet zu dem Gedanken, dass die Erarbeitung der roten Körnchen im Protoplasma der Knorpelzellen und auf dessen Kosten, nicht aber in der Grundsubstanz von statten geht. Nur die Zellen als Trägerinnen aller Lebensprozesse besitzen die Fähigkeit zu einer solchen laboratorischen Thätigkeit; die Grundsubstanz nimmt nur passiv daran teil, da

sie nur infolge ihrer physikalischen Eigenschaften mit den deutoplasmatischen Bildungen des Protoplasma sich durchtränkt.

Höchst wichtig erscheint nun die Lösung der Frage nach der Natur dieser Körnchen. Wenn wir das nach oben beschriebener Methode angefertigte Präparat im ganzen betrachten, so bleibt uns kein Zweifel übrig, dass es sich hier um Kalk handelt. In den centralen Teilen des Verknöcherungspunktes des Knorpelmodells, wo die topographische Verbreitung des Kalks uns längst und gut bekannt ist, nimmt er gerade diese charakteristische rote Färbung an und besteht aus eben solchen Häufchen oder Körnchen, deren Entstehen wir im Protoplasma gesehen haben; somit bestände der Unterschied zwischen den centralen und peripherischen Teilen nur in dem quantitativen Uebergewicht dieser Substanz. Dass diese Körnchen kalkiger Natur sind, beweist auch noch der Umstand, dass bei gleicher Behandlung in entkalkten Präparaten desselben Objects die Körnchen verschwunden sind.

Trotzdem ich zu dieser Ansicht neige, will ich nicht gesagt haben, dass wir hier ein reines Mineralsalz vor uns haben. Richtiger ist wahrscheinlich die Annahme, dass es irgend eine organische Kalkverbindung sei, die die Fähigkeit besitzt zu diffundiren, da es wohl schwer wäre, feste mineralische Teilchen sich vorzustellen, die durch die tierische Membran der Knorpelkapsel zu dringen vermöchten. Andererseits würde ein infolge physiologischer Thätigkeit entstandenes unlösliches Mineralsalz der Grundsubstanz gegenüber, mit der es infolge seiner Unlöslichkeit der chemischen Constitution nach nichts gemein hat, indifferent bleiben. Die Behandlung decalcinirter Präparate weist aber darauf hin, dass in den Stellen, wo früher der Kalk gewesen war, die Grundsubstanz sich etwas verändert hat. Indem sie die frühere hellblaue Färbung in den peripherischen Teilen, wo der Knorpel seine laboratorische Thätigkeit noch nicht begonnen hat, behält, nimmt er dort, wo diese Thätigkeit sich schon offenbart, eine gleichmässige schmutzig-violette Färbung an. Dies berechtigt uns zu der Annahme, dass neben der kalkigen Substanz in den Körnchen noch eine andre ausgearbeitet wird, die das Vermögen besitzt, in innigere Wechselwirkung mit der Grundsubstanz zu treten und zugleich den Mineralsalzen bei deren Eindringen in die ihrer chemischen Natur nach ganz verschiedene collagene Substanz gleichsam als Führerin dient.

Beachtenswert ist der Umstand, dass bei der Production der kalkhaltigen Körnchen wir derselben Erscheinung begegnen, die beinahe mit der Beständigkeit eines Gesetzes überall dort beobachtet wird, wo das Protoplasma die intensive Erarbeitung hochdifferencirter Substanzen, und zwar von Untergang von Zellen begleitet, auf sich nimmt. Verfolgt man Schritt für Schritt die allmähig zunehmende Bildung der Körnchen im Protoplasma, so gewinnt man leicht die Ueberzeugung, dass in den mehr central gelegenen Teilen des Knorpels, wo der Process früher als in den peripherischen begonnen hat und weiter gegangen ist, die Kerne unter Picnose- und Chromatolyseerscheinungen verschwinden, die Protoplasmanenge geringer, die Knorpelhöhle kleiner wird, so dass zuletzt an der Stelle, wo die Zelle war, nur ein Häufchen von Körnchen übrigbleibt. Dieser Massenuntergang von Zellen erklärt auch den scharfen Unterschied zwischen der Anzahl derselben in der Verknöcherungszone,

wo ihrer verhältnissmässig sehr wenige sind, besonders an den Stellen, wo die Knorpelbalken sich bilden, und der ungeheuren Menge dieser Zellen in der Wucherungszone.

Der in der Grundsubstanz erscheinende Kalk zeigt die Neigung, sich regelrecht und gesetzmässig zu verteilen. Macht man einen Schnitt durch den Verknochungspunkt in der Richtung der Längsaxe eines sich entwickelnden unentkalkten Knochens, aber nicht tangentiell, wie oben beschrieben sondern durch den centralen Teil der Knorpelanlage, und behandelt ihn mit Safranin, Thionin und Picrinsäure, so sieht man das in Fig. V dargestellte Bild. Dasselbe zeugt davon, dass die die Mineralsalze enthaltende Substanz sich sattrot färbt und in der Zone, wo die Knorpelbälkchen sich aufbauen, stellenweise sich verdichtet und in Gestalt mehr oder weniger dicker gerader Striche zwischen den Bälkchen hinzieht und deren Gebiet begrenzt. Es muss bemerkt werden, dass in diesen Verdichtungen neben amorphen Körnchen feste Körperchen schon in kristallinischer Form, in Gestalt in allen möglichen Richtungen übereinander liegender Nadeln, erscheinen. Ein Querschnitt durch eine passende Stelle weist auf eine etwas verschiedene Verteilung der Kalkablagerungen hin. Hier beobachtet man die Verdichtungen an der Peripherie der grösser gewordenen bläschenförmigen Knorpelzellen, so dass sie im ganzen gleichsam ein Netz mit unregelmässig polygonalen Maschen bilden, in denen die Zellen eingeschlossen sind. Diese zwei Bilder eines Längsschnitts und eines Querschnitts mit einander vergleichend, gelangen wir zu dem Schluss, dass die compactesten Ablagerungen der Mineralsalze gewissermaassen Röhren bilden, in welchen die Knorpelzellen wie in Futteralen liegen.

Indem man die allmähige Entwicklung des Skeletts bei Embryonen verschiedenen Alters verfolgt, sieht man auch, wie diese Röhren sich aufbauen. In einer sehr frühen Periode, wenn der zukünftige Röhrenknochen eben erst durch Bündel enger aneinanderliegender Elemente gewöhnlichen faserigen Bindegewebes angedeutet ist, gewahrt man, dass die Fasern dieses Gewebes sowohl als auch die Längsaxen der zwischen ihnen befindlichen Zellen ausschliesslich in der Richtung der Länge des zukünftigen Knochens hinziehen. Später, wenn der Knorpel auf dem Boden dieses Bindegewebes sich bildet, behalten die Fasern der Grundsubstanz dieselbe Richtung, was nicht schwer zu beweisen ist, wenn man die Fibrillen der homogenen Grundsubstanz durch passende Behandlung entwickelt. Wenn dann zum ersten Mal der Kalk erscheint, lagert er sich von allen Seiten um die Knorpelzellen herum, doch bieten die natürlichen Bahnen, welche durch die Längsrichtung der Fasern entstehen, günstigere Bedingungen für die Verbreitung der festen Stoffe gerade in diesen langen Bahnen; diesen Weg nehmen auch die parenchymatösen Säfte, da deren fortschreitende Bewegung hier auf geringeren Widerstand stösst. Es unterliegt keinem Zweifel, dass Kalk auch in der Querrichtung sich abgelagert, so dass eine jede Knorpelzelle oder eine kleine Gruppe derselben wie in eine Kapsel aus festen Ablagerungen eingeschlossen ist. Das ist auch an Längsschnitten zu sehen, wo kleine rote Streifen die Röhren stellenweise der Quere nach abscheuern; doch ist hier der Widerstand seitens der höher und tiefer gelegenen Zellen weit bedeutender, infolgedessen diese Streifen selbst, die eine Anhäufung

fester Körperchen vorstellen, in der Querrichtung schmaler, schwächer sind. Bei der ersten Anlage des künftigen Ossificationspunktes stossen wir gerade auf solche Verhältnisse. Wenn der Ossificationspunkt vollkommen angedeutet ist, was auch durch charakteristische perichondrale Veränderungen morphologisch sich kundgibt, so sind die Röhren schon entstanden; sie haben schon ziemlich grosse Festigkeit erreicht, haben ihrem Umfange nach sich geschlossen und Zellenreihen umschlossen. In diesem Moment treten zwei physikalische Bedingungen auf; einerseits Verringerung des Widerstands in der sich bildenden primordiales Knochenmarkhöhle, andererseits Vergrösserung des Drucks seitens der Zone der sich vermehrenden Knorpelzellen. In dieser letzteren Zone, in deren unterem Teil, wo der Kalk schon beginnt sich abzulagern, kann ebenfalls das Erscheinen breiterer Längsstreifen und schmalere Querstreifen dieses Kalks beobachtet werden; doch ist die Verteilung hier keine so regelmässige, da die jüngeren und nachgiebigeren Wände der Röhren infolge des seitlichen von den sich vermehrenden Elementen ausgeübten Drucks, von der Längsaxe etwas abweichen. Unter dem Einflusse des nach allen Seiten hin sich verbreitenden Drucks derselben Proliferationsschicht rücken die an dem Ossificationspunkt liegenden neugebildeten Zellen in der Richtung des geringsten Widerstands—im gegebenen Fall nach der primordiales Knochenmarkhöhle—hin, und geraten in ältere und daher festere Röhren, wo sie eine untergeordnete Verteilung in Gestalt von Säulchen annehmen müssen. Somit ist unter anderen Erklärungen des Aufbaus der Knorpelbälkchen meiner Ansicht nach am wahrscheinlichsten diejenige, dass hier rein physikalische Factoren unter den morphologischen und histogenetischen Bedingungen, die ich oben angeführt, im Spiele sind.

In der Beschreibung des Präparats des tangentiellen Schnitts durch einen in Entwicklung befindlichen Knochen auf Fig. III beschränkte ich mich auf die Bemerkung, dass die erwähnte Behandlungsmethode nichts Besonderes in der mittleren, gelben Schicht enthüllt, wo der neugebildete grobfaserige Knochen liegt. Führen wir aber den Schnitt durch die ganze Dicke des Knochens, so dass dessen centrale Teile an den Tag treten, so gewinnen wir die Ueberzeugung, dass die auf Fig. III abgebildete Zone der jungen Knochensubstanz auf dem Querschnitt nur deren zwei peripherischen Schichten entspricht. An Präparaten, die auf obige Weise bereitet wurden, sehen wir, in der That, die vollkommen homogene Grundsubstanz mit sehr wenigen Knochenhöhlen, in welchen charakteristische sternförmige Zellen mit kurzen Fortsätzen liegen, welche ausser einem roten Kern und gelblichem Protoplasma keine andern Einzelheiten ihrer Structur erkennen lassen. In den centralen Teilen desselben Knochens sieht man aber schon bei mittlerer Vergrösserung rötliche Färbung der Grundsubstanz, auf welcher zahlreiche in lebhaftes Rot gefärbte Zellen mit langen Ausläufern zerstreut liegen. Stärkere Vergrösserungen zeigen uns, dass der rötliche Ton der Grundsubstanz von den sie massenhaft durchziehenden stark verzweigten Ausläufern, die von Safranin sehr gut gefärbt werden, abhängt, obgleich die Grundsubstanz selbst, ihre frühere lebhaft gelbe Färbung beibehalten hat. Dieselben Vergrösserungen lassen jetzt sehr klar sehen, dass die lebhaft rote Färbung sowohl der Zellen selbst als auch der Ausläufer durch die

im Protoplasma in grosser Menge befindlichen Körnchen bedingt wird, die zum Safranin grosse Affinität besitzen. Betrachtet man eine Reihenfolge solcher Präparate, so sieht man, wie diese Körnchen in Gestalt eines feinen Staubes im Protoplasma erscheinen, wie sie dann grösser werden, gleichsam zusammenfliessen, sich in den Fortsätzen verbreiten, endlich in Gestalt ziemlich grosser unregelmässiger Häufchen das ganze Knochenkörperchen so anfüllen, dass weder der Kern noch das Protoplasma, welches diese Körnchen erzeugt hat, noch zu unterscheiden sind. Vergleicht man die Production dieser Körnchen in den Knorpelzellen mit den morphologischen Erscheinungen, welche man an gleichen oder sogar denselben Präparaten in den Zellen der inneren Zone des jungen Knochens beobachtet, so gelangt man unwillkürlich zu der Annahme, dass man analoge Prozesse vor Augen hat. Doch ist bloss Analogie für die Lösung cytologischer Fragen nicht genügend, und sind directere Beweisgründe erforderlich.

In der Zahl der verschiedenen von mir in dieser Richtung ausgeführten Versuche (z. B. Gypsirung der Präparate mittels Schwefelsäure, Untersuchung in polarisirtem und monochromatischem Lichte, Verbrennung u. s. w. (von verschiedenen Farbencombinationen nicht zu reden), erlaube ich mir eine Behandlungsmethode anzuführen, welche höchst instructive Bilder liefert und daher, dünkt mir, Beachtung verdient. Behandelt man den einfach mit Weingeist fixirten Schnitt eines sich entwickelnden unentkalkten Knochens 15—20 Minuten lang mit essigsaurem Kupfer als Beize, lässt dann eine wässrige Alizarinlösung unter Zugabe einer geringen Menge concentrirter Lithiumcarbonatlösung einwirken und schliesst das Präparat zuletzt in flüssigen Canadabalsam ein, so stellt sich bei mittlerer Vergrösserung und flüchtigem Ueberblick folgendes Bild dar. Alle Gewebe sind farblos geblieben mit Ausnahme der jungen Knochensubstanz, deren Grundstoff schwach blau gefärbt ist. Auf diesem blauen Grunde gewahrt man theils ganz farblose Zellen, daneben aber einzelne oder in Gruppen versammelte Zellen, die denselben Eindruck machen wie die Knochenkörperchen auf einem trocknen Schliif. Dieselben sind ganz schwarz und treten daher sehr scharf auf dem schwach oder gar nicht gefärbten allgemeinen Grunde hervor. Durch ihre Form, Grösse und dem Charakter ihrer Fortsätze unterscheiden sie sich in nichts von den soeben beschriebenen, safraninophile Körnchen ausarbeitenden Zellen; wie diese liegen sie ebenfalls in den centralen Theilen der Knochensubstanz. Bei starker Vergrösserung unterscheidet man hier zwei eigentümliche Erscheinungen: erstens hat die schwarze Farbe hier den Ton von unpolirtem Stahl, zweitens sieht die ganze im Innern der Knochenhöhle befindliche schwarze Masse wie geschliffen aus, da sie aus abgerundeten Kanten und Flächen besteht. Infolge der scharfen Farbencontraste ist es nicht schwer die Bildung dieses Stoffes in dem Protoplasma zu verfolgen; bei Betrachtung einer Reihe von Präparaten gewinnen wir die Ueberzeugung, dass die schwarze Masse im Protoplasma zuerst in Gestalt von Körnchen entsteht, welche dann zu grösseren abgerundeten Häufchen zusammenfliessen, diese zu noch grösseren u. s. w., bis schliesslich das ganze Knochenkörperchen und die davon abgehenden Kanälchen, resp. protoplasmatischen Ausläufer das oben beschriebene Bild liefern. Der Unterschied zwischen diesen

und den körnigen mit Safranin gefärbten Zellen besteht nur darin, dass bei dem allmählichen Zusammenfliessen der schwarzen Massen die Häufchen eine von den an Safraninpräparaten sichtbaren etwas verschiedene Form bekommen, was von der Behandlung selbst abhängen dürfte.

Bei dem Versuch, eine Lösung der Frage nach der Natur dieser schwarzen Häufchen und Massen zu finden, stösst man sogleich auf den Zweifel, ob man es hier nicht wirklich mit Luft oder Kohlensäure zu thun hat, welche letztere durch Einwirkung der freien Essigsäure der Beize auf das Lithiumcarbonat in der That sich bilden könnte. Fände hier aber eine solche Wechselwirkung statt, so würde sie ja am ganzen Präparat und nicht bloss an einzelnen Zellen oder bestimmten Gruppen solcher sich offenbaren. Dass Entwicklung freier Kohlensäure nicht statt hat, lässt sich durch directe Versuche feststellen, indem man 10%-ige Salzsäure zu Präparaten eines durch einen in Entwicklung begriffenen Knochen, geführten Schnittes, welcher keine Behandlung mit Farben erfahren hat, zusetzt: in den Zellen entstehen weder schwarze Bläschen noch Häufchen, die auf Dissociation des Carbonats hinweisen würden. Was die Gegenwart von Luft anbelangt, so habe ich schon Gelegenheit gehabt zu erwähnen, wie vorsichtig man dieser Erklärung gegenüber sich verhalten müsse; alles, was ich oben darüber gesagt, lässt sich auch auf den gegenwärtigen Fall anwenden, nur etwa mit dem Zusatz, dass hier von Verödung der Knochenhöhle nicht die Rede sein kann, da beim Beginn des Bildungsprocesses der schwarzen Häufchen das Protoplasma und der Zellkern vollkommen sichtbar sind.

Aus Obigem folgt, dass wir hier der Bildung einer ganz neuen Substanz beiwohnen, die wir bei einer und derselben Behandlungsmethode in keinem andern als dem Knochengewebe finden und welche daher für einen notwendigen Bestandteil bei dessen Entwicklung gehalten werden muss. Die Anwendung der Entkalkungsmethode an solchen Objecten, an welchen früher das Vorhandensein schwarzer Körnchen und Häufchen festgestellt worden war, wobei das ganze Bild verschwand, berechtigt mich diese Gebilde für Träger irgend welcher Kalkverbindungen anzusehen.—Die Thatsache, dass Kalk bei durchfallendem Lichte auch ohne jegliche chemische Behandlung schwarz aussieht, was übrigens nur für grössere Anhäufungen desselben richtig ist, ist nicht neu, und wenn ich die Alizarinmethode anführe, so geschieht dies nur, weil dieselbe gestattet dessen Gegenwart in statu nascendi, d. h. in der Periode zu beobachten, wenn er sich in fein zerteiltem Zustande befindet und die charakteristischen optischen Erscheinungen noch nicht an den Tag legt. Man braucht nur zwei aufeinander folgende Schnitte eines und desselben Stücks zu vergleichen, wobei der eine ohne jegliche Behandlung gelassen, der andre gebeizt und mit Alizarin behandelt wurde, um von der Richtigkeit des in Bezug auf die ersten Momente des Erscheinens dieses Stoffes Gesagten sich zu überzeugen. Dies entscheidet aber noch lange nicht die Frage nach der Identität der schwarzen Einschlüssungen und der basophilen Granulierung der Zellen der centralen Regionen des jungen Knochengewebes, da es sehr möglich ist, dass das eine Stadium nur der Vorgänger des andern ist. Vorläufig können wir bloss die morphologische Aehnlichkeit dieser Bildungen feststellen, da

weiter zu gehen jetzt nicht möglich ist; die wenigen von mir angeführten Thatsachen eigener Beobachtungen in dieser Richtung dürften vielleicht nur einen neuen Beweisgrund zu Gunsten der Ansicht derjenigen Autoren liefern, welche die Kalkproduction mit der laboratorischen Thätigkeit des Protoplasma verbinden, aber auch nicht mehr.

Indem ich hiemit diese kurzen vorläufigen Notizen über die Genesis der Knochensubstanz beschliesse, halte ich es für meine Pflicht hinzuzusetzen, dass in denselben auf solche Thatsachen hingewiesen wird, deren einzelne Autoren schon früher erwähnt hatten, und die ich nur mittels einer andern Untersuchungsmethode bestätigt, und auf solche, deren Erwähnung ich in der mir zugänglichen Literatur vergebens gesucht habe; diese beiden Categorien von Thatsachen stellen jedoch bisan nur rohes Material vor, welches zur Erforschung des zweiten Hauptmoments in dem Aufbau des Knochengewebes, d. h. des Erscheinens und der Verbreitung der Mineralsalze in demselben, noch bei weitem nicht genügt. Ein jeder, der längere Zeit den Ossificationsprocess studirt, in Bezug auf denselben experimentirt hat, zweifelt nicht daran, dass die Kalksalze in Gestalt complicirter, diffusionsfähiger Verbindungen entstehen; was für Verbindungen das aber sind, welches ihre chemische Structur im Moment ihres Entstehens ist und welche weiteren Veränderung sie durch Wechselwirkung mit den Elementen der Grundsubstanz erfahren, das alles sind noch offene Fragen, deren Lösung der Mikrochemie der Zukunft vorbehalten ist. Die Aufgabe der Morphologie beschränkt sich in dieser Beziehung auf die Auffindung im cytologischen Sinne sicherer Verfahrungsweisen, die verschiedenen organischen Verbindungen des Kalks in den Geweben zu bestimmen. Sogar in neuester Zeit dazu vorgeschlagene Methoden (z. B. Behandlung mit Silber-salzen, Purpurin u. s. w.) gestatten zwar die Gegenwart von Kalk in der organischen Substanz zu erkennen, erlauben aber nicht positiv zu entscheiden, was für eine Kalkverbindung man in jedem einzelnen Fall vor sich hat. Solange uns aber die Möglichkeit einer solchen Bestimmung fehlt, können wir der Lösung einer ganzen Reihe von Fragen, die mit der Genesis des Knochengewebes verbunden sind, um keinen Schritt näher rücken.

Die Ueberzeugung von der Zweckmässigkeit, sogar Notwendigkeit, bestimmtere morphologische Merkmale der Kalkverbindungen in den Geweben zu suchen, ist es, die mich bewogen hat diesen Weg der Forschung zu betreten; leider sind die bisan erhaltenen Resultate noch nicht sicher genug, um die Beachtung anderer Forscher, die auf dem Gebiete der Ossificationsfragen arbeiten, zu verdienen.

I/18, 1905. Moskau.

Das verspätete Erscheinen der Abhandlung des Herrn Gardner sowie derjenigen anderer Autoren ist verursacht durch die politischen Ereignisse in Russland und speciell durch die temporäre Einstellung der Arbeiten in den Druckereien.

Die Redaction.