Aus dem pathologischen Institut des Friedrichstädter Krankenhauses
zu Dresden.

Professor Dr. G. Schmorl.

Über die feinere Struktur des Knochengewebes.

Von

Dr. med. G. Fasoli.

Hierzu Tafel XXXIII.

Die von Schmorl¹⁾ zur Darstellung feiner Knochenstrukturen angegebenen Methoden, die unter den Vertretern der normalen Anatomie trotz der Empfehlung von Schaffer²⁾ noch wenig bekannt zu sein und infolgedessen auch wenig benutzt zu werden scheinen, sind die einzigen, welche es ermöglichen, auf verhältnismässig einfache Weise die Knochenkörperchen und ihre Ausläufer durch Färbung darzustellen. Da bei diesen Methoden Schnitte entkalkter Knochen zur Verwendung kommen, und da dabei auch andere Strukturelemente der Knochen gut erhalten bleiben und leicht sichtbar gemacht werden können, bedeuten sie gegenüber den früher gebräuchlichen Methoden, bei denen meist Knochenschliffe zur Verwendung kamen, oder bei denen man sich zwar ebenfalls der Schnitte entkalkten Knochens bediente, bei denen aber die übrigen Strukturelemente durch die Präparation mehr oder minder geschädigt wurden oder zum mindesten nur wenig deutlich hervortraten, einen nicht zu unterschätzenden Fortschritt.

Bei der ersten der von Schmorl angegebenen Methoden wird die Färbung der Schnitte mit Thioninlösung, die Differenzierung mit konzentrierter wässriger Pikrinsäure vorgenommen; die zweite Methode bedient sich ebenfalls der Thioninfärbung, wendet aber zur Differenzierung Phosphorwolfram- oder Phosphormolybdänsäure an.

¹⁾ Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Leipzig 1901. Darstellung von Knochenkörperchen und ihrer Ausläufer an entkalkten Schnitten. Verh. Deutsch. Pathol. Ges., München 1899.

²⁾ Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, herausg. v. Ehrlich-Krause-Rosin-Weigert usw. 1903.

Archiv f. mikrosk. Anat., Bd 66.

Während bei der ersten Methode die Knochenkörperchen und ihre Ausläufer dadurch sichtbar gemacht werden, dass durch die Einwirkung der Prikrinsäure auf die mit Thioninlösung gefärbten Schnitte ein sehr feinkörniger, schwarzbrauner Niederschlag in den Knochenhöhlen und Primitivröhrchen entsteht, handelt es sich bei der zweiten Methode um eine Färbung im eigentlichen Sinne.

So schön auch die Resultate sind, die man meist mit der Thionin-Prikrinsäuremethode erhält, so haften derselben doch mehrere Nachteile an, die sie für viele feinere Untersuchungen nicht recht geeignet erscheinen lassen. Abgesehen davon nämlich, dass sie, wie bereits Schaffer¹⁾ hervorgehoben hat, mitunter versagt, kommt es bei ihr nicht nur in den Knochenhöhlen und ihren Ausläufern zur Bildung von Niederschlägen, sondern auch an anderen Stellen der Präparate und zwar besonders im zellreichen Mark jugendlicher Knochen. Wenn es nun auch nach dem von Schmorl angegebenen Verfahren häufig gelingt, das Auftreten der Niederschläge an unrechten Orten etwas einzuschränken oder entstandene Niederschläge teilweise zu entfernen, so sind dieselben doch immerhin bei feineren Untersuchungen häufig recht störend. Es kann infolgedessen diese Methode im allgemeinen wohl für Demonstrationspräparate, z. B. in mikroskopischen Kursen, nicht aber für feinere histologische Studien empfohlen werden.

Hier ist die zweite Methode anzuwenden, die zwar etwas umständlicher ist, dafür aber auch ausserordentlich klare Präparate liefert, von denen der leider so früh verstorbene Weigert sagte, dass ihre Betrachtung einen ästhetischen Genuss bereite. Schmorl hatte dieser Methode in seiner ersten Mitteilung²⁾ nur einen beschränkten Anwendungsbereich zugesprochen, indem er angibt, dass dieselbe nur an kindlichen Knochen und bei Anwendung bestimmter Fixierungs- und Entkalkungsmethoden und auch da nicht konstant gelänge.

Wie Schaffer³⁾ bereits erwähnt hat, ist die von Schmorl gemachte Einschränkung nicht ganz zutreffend, da Schaffer auch bei Knochen erwachsener Personen gute Resultate erzielte. Herr Prof. Schmorl hielt es infolgedessen für angebracht, weitere

¹⁾ Schaffer l. c.

²⁾ Schmorl. Zentralbl. f. Allgem. Pathol. 1899.

³⁾ Schaffer l. c.

Untersuchungen über den Anwendungsbereich dieser Methode anzustellen, zugleich hielt er es für wünschenswert, festzustellen, welcher Teil der Knochenlakunen und ihrer Ausläufer bei der in Rede stehenden Methode gefärbt wird, da dieser Punkt noch nicht sicher festgestellt ist. Während von ihm nämlich angenommen wurde, dass dabei eine Färbung der Grenzscheiden einträte — eine Annahme, der sich Donati¹⁾ und von Recklinghausen²⁾ angeschlossen haben — hat Schaffer mit durchaus beachtlichen Gründen betont, dass dies nicht der Fall sei, sondern nur die innere Auskleidung der in Rede stehenden Gebilde die Färbung annehme.

Ich schicke die von Schmorl in seinen pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden gegebenen Vorschriften voraus:

1. Fixieren möglichst dünner und frischer Knochenscheiben in Formalin, längeres Nachhärten in Müllerscher Lösung 6—8 Wochen bei Zimmertemperatur oder 3—4 Wochen im Brutschrank.
2. Sofortiges Übertragen in die alkoholische Salzsäure-Kochsalzlösung zur vollständigen Entkalkung. Längeres Auswaschen in fließendem Wasser. Nachhärten in Alkohol.
3. Einbetten in Celloidin oder Paraffin.
4. Übertragen der möglichst dünnen Schnitte in Wasser auf 10 Minuten.
5. Färben der gut ausgebreiteten Schnitte in einer wässrigen Thioninlösung von folgender Zusammensetzung:
 Konz. Lösung von Thionin in 50proz. Alkohol 2 cc
 Aq. dest. 16 cc
 Liq. ammoni caustici 1—2 Tropfen
 3 Minuten.
6. Abspülen in Wasser.
7. Übertragen der Schnitte mit Glasnadeln in eine konzentrierte wässrige Lösung von Phosphorwolfram- oder Phosphormolybdänsäure auf beliebige Zeit. Die Differenzierung ist in wenigen Sekunden beendet.

¹⁾ Zentralblatt f. pathol. Anatomie u. allg. Pathologie. Bd. XXIV, 1903.

²⁾ Recklinghausen. Verh. der Deutsch. Path. Ges., IV. Tag, 1901.

8. Auswaschen der Schnitte in Wasser bis die Schnitte einen himmelblauen Farbenton angenommen haben (etwa 5—10 Minuten, längeres Auswaschen schadet nichts).
9. Fixierung der Färbung in einer verdünnten Lösung von Liq. Ammoni caustici 1:10, 3—5 Minuten.
10. Direktes Übertragen in 90proz. Alkohol, den man einmal wechselt.
11. Entwässern. Karbolxylol. Balsam

Bevor ich auf meine den Anwendungsbereich der Methode betreffenden Untersuchungen eingehe, möchte ich einige Bemerkungen, die die Handhabung der Methode betreffen und auf ihr Gelingen Bezug haben, vorausschicken.

Hier ist an erster Stelle zu erwähnen, dass die Methode nicht nur an eingebetteten Präparaten gelingt, sondern dass dazu auch Gefrierschnitte ganz ausgezeichnet geeignet sind, ferner, dass es, wenn auch für manche Fälle ganz zweckmässig, so doch nicht unbedingt notwendig ist, eine ammoniakalische wässrige Thioninlösung zu benutzen; man erhält vielmehr auch mit einer verdünnten wässrigen Lösung (2 cc konzentrierte wässrige Thioninlösung auf 10 cc Wasser)¹⁾ vorzügliche Resultate, nur darf man weder diese noch auch die ammoniakalische Lösung vor dem Gebrauch filtrieren, da dadurch die Färbekraft ganz ausserordentlich herabgesetzt wird. Zur Differenzierung ist nach meinen Erfahrungen die konzentrierte wässrige Phosphorwolframsäure mehr zu empfehlen als die Phosphormolybdänsäure, da bei Anwendung der letzteren, abgesehen von ihrem wesentlich höheren Preis, nicht selten nur sehr schwache Färbungen, ja mitunter sogar Misserfolge eintreten. Dieselben lassen sich teilweise durch Anwendung der von v. Recklinghausen angegebenen Lösung der Phosphormolybdänsäure in Glyzerin vermeiden. Zur Fixierung der Färbung ist von Schmorl empfohlen worden, die differenzierten Schnitte mit Ammoniakallösung zu behandeln und sie dann sofort in Alkohol zu übertragen. Wenngleich auch dieses Verfahren absolut sichere Resultate gewährleistet, so schien es doch, da dabei die Präparate mitunter einen unangenehmen fuchsigroten Farbenton annehmen, angezeigt, nach einem anderen

¹⁾ Übrigens lässt sich das Thionin auch durch Fuchsin, Gentianana- bzw. Methylviolett und andere basische Anilinfarben ersetzen, doch erhält man dabei häufig inkonstante und mangelhafte Resultate.

Verfahren der Fixierung zu suchen, wodurch dieser Übelstand vermieden wird. v. Recklinghausen hat dazu eine Nachbehandlung mit Alaun angegeben. Bei Nachprüfung dieser Modifikation hat sich nun in der Tat ergeben, dass, wenn man die mit Phosphorwolframsäure differenzierten und sehr gut in Wasser abgespülten Schnitte mehrere Stunden mit 5proz. Lösung von Kalialaun nachbehandelt und nach gründlichem Auswaschen in Wasser in Alkohol überträgt, eine Fixierung der Färbung erzielt wird, ohne dass dabei eine wesentliche Änderung des Farbtones eintritt; man muss dabei aber, worauf Schmohl schon hingewiesen hat, häufig den schwerwiegenden Übelstand mit in Kauf nehmen, dass mehr oder minder zahlreiche und häufig ganz ausserordentliche störende, rotgefärbte kristallinische Niederschläge auftreten. Ich möchte infolgedessen dieses Verfahren, wenn es sich nur um die Darstellung der Knochenkörperchen und ihrer Ausläufer handelt, nicht empfehlen, möchte es aber doch nicht, worauf ich später zurückkommen werde, für ganz entbehrlich erklären.

Mitunter kommt es, besonders bei Anwendung stärkerer Farbstofflösungen und bei manchen Fixierungen vor, dass die Grundsubstanz des Knochens zu dunkel gefärbt ist, wodurch die Färbung der Knochenkörperchen etwas verdeckt werden kann. In solchen Fällen kann man eine Entfärbung der Grundsubstanz dadurch erzielen, dass man die Schnitte nach der Fixierung der Färbung 5–10 Minuten mit Salzsäurealkohol nachbehandelt oder dadurch, dass man sie in 1% alkoholische Eosinlösung auf 5 bis 10 Minuten einlegt, in der der Farbstoff sich in blauen Wolken rasch ablöst. Bringt man dann die Schnitte auf eine Stunde in Wasser und dann in 90% Alkohol, so wird das überschüssige Eosin ausgezogen und man erhält eine rote Färbung der Knochengrundsubstanz, meist sind dabei freilich auch die Zellen des Knochenmarks mehr oder minder entfärbt; will man sie deutlich hervortreten lassen, so muss man mit Hämatoxylin nachfärben.

Von der von Morpurgo¹⁾ angegebenen Modifikation der Methode (Eintauchen der Schnitte vor der Färbung in eine konzentrierte Lösung von doppelkohlensaurem Natron und Fixierung

¹⁾ Atti dell' Accademia dei fisiocritici in Siena. 1902. No. 3, 4 S., p. 171.

der Färbung in derselben Lösung) habe ich keine wesentlichen Vorteile gesehen.

Wenn ich mich nunmehr der Besprechung des Anwendungsbereichs der in Rede stehenden Färbemethode zuwende, so möchte ich an erster Stelle erwähnen, dass dieselbe nicht nur wie Schmorl ursprünglich gefunden zu haben glaubte, bei kindlichen Knochen gelingt, sondern dass sie auch bei den Knochen Erwachsener ebenso wie an Tierknochen gute Resultate gibt, vorausgesetzt, dass sie bei der Entkalkung weder allzu starke Schrumpfungen noch auch allzu starke Quellungen erfahren haben. Ferner hat sich bei meinen Untersuchungen ergeben, dass auch mazerierte und verwitterte Knochen mitunter der Färbung zugänglich sind. Auch bei der Untersuchung von Zähnen lässt sich die Methode mit grossem Vorteil anwenden, indem dabei sowohl die Knochenkörperchen im Zement als auch die Zahnbeinröhrchen scharf und klar gefärbt werden (Fig. 7).

Die Art und Weise, wie das Material, welches mit der in Rede stehenden Methode behandelt werden soll, fixiert wird, ist für den Erfolg ziemlich gleichgültig. Ich habe die meisten der gebräuchlichsten Fixierungsmittel geprüft und vollständige Misserfolge eigentlich nie erhalten; am wenigsten geeignet scheint mir die Fixierung in Sublimatlösung und Osmiumsäure zu sein, da hier mitunter auf grössere Knochenstrecken keine oder nur eine andeutungsweise Färbung der Knochenkörperchen und ihrer Ausläufer zu erzielen ist. Die besten Resultate gibt nach meinen Erfahrungen die Fixierung in Formalin oder Müller-Formalin, besonders wenn man nach der Fixierung die Knochen noch auf 2—4 Wochen in Müllersche Lösung bei 37° bringt.

Von etwas grösserem Einfluss auf den Ausfall der Färbung ist die Art und Weise, wie die Entkalkung vorgenommen wird, insofern als, wie bereits oben erwähnt, die Entkalkungsmethoden, bei denen stärkere Schrumpfungen oder Quellungen eintreten, meist keine befriedigenden Resultate ergeben. Am besten hat sich mir bei kindlichen Knochen die in der ursprünglichen Vorschrift angegebene Entkalkung in alkoholischer Kochsalz-Salzsäurelösung (fälschlicherweise als alkoholisches Ebnersches Gemisch bezeichnet) oder in Müllerscher Lösung erwiesen; bei den Knochen Erwachsener hat sich die Entkalkung nach Schaffer (5—10% wässrige Salpetersäure bei Nachbehandlung mit 5%

Kalialaun- oder Lithium- bzw. Natriumsulfatlösung und 24stündiges Auswässern) oder die Entkalkung in 20 % Ameisensäure mit Zusatz von 10 % Formalin bewahrt. Unbedingt nötig ist, dass die zur Verwendung kommenden entkalkten Knochen durch längeres Auswaschen in fließendem Wasser von jeder Spur von Säure gründlich befreit sind. Sehr unbefriedigende Resultate erzielte ich mit der Phloroglucinsalpetersäureentkalkung. Übrigens ist Entkalkung garnicht notwendig, da, wie v. Recklinghausen bereits gezeigt hat, die Färbung auch an Schnitten unentkalkten Knochens vorzüglich gelingt.

Es fragt sich nun: was leistet die Methode, was wird mit ihr gefärbt? Betrachtet man ein gut gelungenes dünnes Präparat, das von einem in Müller-Formol fixierten und in alkoholischer Kochsalz-Salzsäurelösung entkalkten kindlichen Knochen gewonnen wurde, so erkennt man, dass die Knochenmarkzellen eine ziemlich diffuse blaugraue Färbung mit einem etwas dunkleren Kern aufweisen. Die Knochenbälkchen sind in ihrer Grundsubstanz farblos bis leicht bläulichrot gefärbt, in ihnen treten die Knochenkörperchen mit ihren Ausläufern als tiefdunkelblau bis schwarz gefärbte spinnenartige Gebilde deutlich hervor; in den Lakunen liegt die Knochenzelle als diffus blaugrau gefärbter Körper, der einen etwas dunkler gefärbten Kern erkennen lässt. Die Wand der Lakunen, d. h. ihre Umgrenzung ist schwarzblau gefärbt, die schwarzblaue Färbung beschränkt sich auf die Oberfläche und nimmt eine ganz schmale, nicht messbare Schicht ein, einen doppelten Kontur kann man wenigstens bei Anwendung der ursprünglichen Färbvorschrift nicht wahrnehmen. Ist die Lakune flach angeschnitten, derart, dass die untere Hälfte, die nur noch dünne Schichten von Protoplasma enthält, in die Schnittebene fällt, so bemerkt man an ihrer inneren Wand gewöhnlich mehrere intensiv gefärbte Punkte (s. Fig. 4) oder auch kleine von dunkler gefärbten Säumen umgebene Kreise, die, wie man sich an etwas dickeren Schnitten durch Heben und Senken des Mikroskops leicht überzeugen kann, die Abgangsstellen der Primitivröhrchen darstellen. Letztere erscheinen teils als homogene tiefschwarzblau gefärbte, gebogene und geknickt verlaufende Linien, teils aber als feinste Kanälchen, deren Wand von einem tiefblassschwarz gefärbten Saum gebildet wird, der ebenfalls, wenn nach der ursprünglicher Vorschrift gefärbt wurde, keine doppelten Konturen

aufweist. Durch Vergleich mit Präparaten, bei denen die Knochenkörperchen und ihre Ausläufer an entkalkten Knochen nach der Flemmingschen Methode durch Luftinjektion dargestellt sind, kann man sich leicht davon überzeugen, dass die Ausläufer durch die in Rede stehende Färbung bis in ihre feinsten Endverzweigungen gefärbt sind. An den Kanälchen weist der von dem zarten, tiefblau gefärbten Saum umschlossene Hohlraum eine blaugraue Färbung auf, einen als Protoplasmafortsatz der Knochenzellen zu deutenden Inhalt habe ich nicht nachweisen können.

An manchen Knochenbälkchen reichen die Ausläufer der der Oberfläche zunächstliegenden Knochenlakunen nicht bis an die Markräume heran, sie werden von ihnen durch einen ganz schmalen glänzenden Saum getrennt, der nicht selten eine ganz feine Strichelung erkennen lässt, derart, dass er von zahlreichen feinen, senkrecht zur Achse des Balkens verlaufenden und ganz schwach bläulich gefärbten Linien durchsetzt wird; besonders trifft man dieses Verhalten an solchen Bälkchen die mit Osteoblasten besetzt sind; man gewinnt den Eindruck, dass die feine Strichelung den eben erst angelegten Ausläufern der die neue Knochensubstanz bildenden Osteoblasten entspricht. Ob dabei die zwischen den einzelnen feinen Strichen (Ausläufern) gelegenen, glänzenden Massen einem Ausscheidungsprodukt der Osteoblasten oder einem umgewandelten Teil derselben entsprechen, wage ich nicht zu entscheiden.

Es erhebt sich nun die Frage, wo die Färbung, durch welche die Knochenkörperchen und ihre Ausläufer so ausserordentlich klar dargestellt werden, lokalisiert ist. Schmorl hatte, wie erwähnt, die Ansicht geäußert, dass es die Grenzscheide sein möchte, die gefärbt ist. Schaffer hat gegen diese Ansicht Bedenken erhoben und darauf hingewiesen, dass in embryonalen Knochen die Methode bei vorsichtiger Handhabung ebenso wie im Knochen des Neugeborenen gelingt, obgleich hier nach den Brösickeschen ¹⁾ Untersuchungen noch keine Grenzscheiden vorhanden sind, ferner, dass eine doppelte Kontur, wie sie den Grenzscheiden zukommt, an den durch Färbung sichtbar gemachten Lakunen und Primitivröhrchen nicht zu erkennen sei. Dem an erster Stelle erwähnten Einwand kann meines Erachtens eine

¹⁾ Brösicke. Archiv f. mikr. Anat. Bd. 21 u. 26.

durchschlagende Beweiskraft nicht zuerkannt werden, da es sehr wohl denkbar ist, dass die Grenzscheiden im embryonalen Knochen und in dem des Neugeborenen sehr zarte Gebilde sind, welche bei dem von Brösicke angewandten, ziemlich eingreifenden Darstellungsverfahren zugrunde gehen könnten. Viel schwerer wiegt der zweite Einwand und es scheint mir keineswegs möglich denselben zu entkräften. Selbst wenn man annehmen wollte, dass durch die den Färbungen vorausgehenden Manipulationen (Fixierung, Entkalkung etc.) und durch den Färbeprozess selbst die Grenzscheide sehr stark schrumpft und auf einen feinen Saum reduziert wird, so ist doch andererseits zu berücksichtigen, dass auch bei der Färbung frischen, nicht fixierten und entkalkten Knochens der feine, gefärbte Saum, der die Lakune und die Primitivröhrchen umgibt, nicht breiter als der im fixierten und entkalkten Knochen ist und jedenfalls auch nicht doppelt konturiert erscheint. Unter solchen Umständen ist es wohl am wahrscheinlichsten, dass durch die in Rede stehende Färbung nur die innere Auskleidung der Lakunen und Primitivröhrchen, ihre innere Wand, vielleicht die innerste Schicht der Grenzscheiden gefärbt wird. Ob es sich dabei um eine Ablagerung des Farbstoffes in diffuser Form, also um eine echte Färbung oder nur um die Bildung eines sehr feinkörnigen Farbstoffniederschlages handelt, ist nicht mit absoluter Sicherheit zu entscheiden. Da man selbst bei Anwendung stärkster Vergrößerungen an flach angeschnittenen Lakunen, bei denen man eine Wand gut übersehen kann, keine Farbstoffkörnchen erkennen kann, scheint es wahrscheinlicher, dass es sich um eine echte Färbung handelt.

Donati¹⁾ hat, wie oben erwähnt, die Ansicht, dass bei der in Rede stehenden Färbung, die Grenzscheiden gefärbt werden, durch den Hinweis zu stützen versucht, dass bei Einwirkung von Reagentien auf den Knochen, durch die die Grenzscheiden zerstört werden, auch die nachfolgende Färbung völlig versagt.

Brösicke hat bekanntlich nachgewiesen, dass die Grenzscheiden in ihrem chemischen und physiologischen Verhalten von der Grundsubstanz des Knochens verschieden sind; er zeigte, dass diese seiner Ansicht nach aus Keratinsubstanz bestehen-

¹⁾ Donati. Zentralblatt f. path. Anat. u. allg. Pathol. 1903, Bd. XXIV.

den Gebilde bei Pepsin- und Trypsinverdauung nicht gelöst werden, dass sie, wenn sie sich noch im Zusammenhang mit der Grundsubstanz befinden, durch die kaustischen Alkalien ebenso wie die letztere zerstört werden, dass sie aber im isolierten Zustand durch schwache Lösungen der Alkalien nicht zur Auflösung gelangen, dass sie ferner durch mittlere und starke Konzentrationen von Kalilauge zerstört werden, während sie durch Natronlauge keine Alteration erfahren.

Zur Nachprüfung der Donatischen Angaben verfuhr ich zur Isolierung der Grenzscheiden teils nach der von Brösicke angegebenen Methode, teils aber benutzte ich dazu Schnitte entkalkten Knochens, die ich mit dem Gefriermikrotom herstellte. Auf die Schnitte liess ich zunächst einige Zeit Osmiumsäurelösung einwirken und behandelte sie dann unter Erwärmen mit einer Mischung von Glycerin, Wasser und Essigsäure zu gleichen Teilen.

Es gelingt auf diese Weise, wenn man einige Übung erlangt hat, leicht, isolierte Grenzscheiden zu erhalten, die sich in Glycerin konservieren lassen. Ein anderes Verfahren zur Darstellung der Grenzscheiden, das ich in Anwendung brachte, ist das von Zachariae angegeben. Bei demselben werden die Schnitte mit Safraninlösung kurz gefärbt, darauf in Wasser abgespült, auf den Objektträger gebracht und mit Fliesspapier abgetrocknet. Nun behandelt man sie unter vorsichtigem Erwärmen mit einer konzentrierten Lösung von Kali- oder Natronlauge, bis sie anfangen zu schrumpfen, lässt dann die Lösung ablaufen, bringt einen Tropfen Glycerin darauf und deckt mit dem Deckglas ein. Bei dieser Methode, die einfacher und bequemer als die Brösickesche ist, sind die Grenzscheiden rosa gefärbt.

Unter Zugrundelegung der von Brösicke bezüglich des chemischen Verhaltens der Grenzscheiden festgestellten, oben erwähnten Tatsachen, die ich durch eigene Untersuchungen bestätigen konnte, habe ich nun die Behauptungen von Donati einer Prüfung unterzogen.

Ich stellte in dieser Hinsicht folgende Untersuchungen an:

1. Schnitte nach Belieben entkalkten Knochens brachte ich in Lösungen von Kali- oder Natronlauge verschiedener Konzentration, in der sie je nach der Stärke der angewendeten Lösung und der angewandten Temperatur,

früher oder später sich aufzulösen begannen, als der Auflösungsprozess eben anfang, entnahm ich sie der Lösung und tauchte sie, um das Fortschreiten der Auflösung zu verhindern, in Essigsäure ein, einen Teil der Schnitte benutzte ich nun zur Isolierung der Grenzscheiden, die übrigen wässerte ich nach der Behandlung mit Essigsäure gründlich in fließendem Wasser aus und unterwarf sie dann der Färbung mit Thionin-Phosphorwolframsäure.

Es zeigt sich nun, dass bei Anwendung schwacher Lösungen der kaustischen Alkalien eine Auflösung der Grenzscheiden nicht stattfindet, dass aber trotzdem die Färbung mit Thionin-Phosphorwolframsäure nicht mehr gelingt, selbst an Schnitten, die nur $\frac{1}{2}$ Minute in der alkalischen Lösung verweilt hatten.

2. wurden Schnitte der künstlichen Verdauung mit Pepsinsalzsäure und Trypsin unterworfen. Sobald sich die ersten Zeichen der Auflösung zeigten, wurden sie in Wasser ausgewässert. Auch hier gelang die Isolierung der Grenzscheiden gut, aber die Färbung mit Thionin-Phosphorwolframsäure versagte völlig.

Das gleiche Resultat erhielt ich, als ich die Schnitte der Behandlung mit konzentrierten organischen und Mineralsäuren unterwarf.

Es geht aus diesen Untersuchungen hervor, dass aus dem Umstand, dass nach Einwirkung von gewissen Reagentien die in Rede stehende Färbung nicht gelingt, nicht geschlossen werden kann, dass die Grenzscheiden zerstört sind, und dass umgekehrt der Schluss nicht gerechtfertigt ist, dass, weil nach der Einwirkung gewisser Reagentien die in Rede stehende Färbung versagt, die Grenzscheiden zerstört seien. Denn es lässt sich aus dem von Donati eingeschlagenen Wege ein Urteil über diejenigen Bestandteile, welche bei dem in Rede stehenden Färbeverfahren gefärbt werden, überhaupt nicht gewinnen.

Wie oben erwähnt, ist bei der Thionin-Phosphorwolframsäuremethode die Färbung an die innere Auskleidung der Lakunen und Primitivröhrchen, also an die innere Umgrenzung der Grenzscheide gebunden, die dabei als feine tiefblauschwarz gefärbte Linie sich scharf von dem Inhalt der Hohlräume als auch von

der umgebenden Knochengrundsubstanz abhebt. Häufig aber trifft man — in dem einen Präparate zahlreicher als in dem anderen — auf Knochenkörperchen, welche noch eine weitere Struktureigentümlichkeit erkennen lassen. Man kann nämlich feststellen, dass sich nach aussen an die tiefblauschwarz gefärbte Grenzlinie eine mehr oder minder breite, schwachgraublau gefärbte Schicht anschliesst, welche die Kanälchen wie eine Manschette, die Lakunen wie eine Scheide umgibt. Sie ist teils homogen, teils erscheint sie feinkörnig, da, wo die Kanälchen enden, umschliesst sie dieselben wie eine Kappe, auf Querschnitten umgibt sie als blass gefärbter, doppelt konturierter Ring die schwarzblau gefärbte Umgrenzung der Primitivröhrchen (Fig. 2 u. 6).

Die Annahme, dass hier nur ein optisches Phänomen vorliege, das durch die stark lichtbrechende Knochengrundsubstanz bedingt sei, ist nicht haltbar. Denn einerseits trifft man diese blass gefärbte Zone keineswegs bei allen Knochenkörperchen, andererseits treten diese Zonen nur bei stark gefärbten Präparaten hervor, während sie bei schwach gefärbten entweder garnicht oder nur andeutungsweise zu sehen sind und endlich gelingt es, dieselben mitunter — wenn auch nicht konstant — in einem anderen Farbenton als die die Kanälchen umschliessenden schwarzblauen Linien darzustellen. Behandelt man nämlich Schnittpräparate von in Müllerscher Lösung gehärtetem und in alkoholischer Kochsalzsäurelösung entkalktem Material nach der Thioninfärbung mit einer Lösung von Phosphorwolframsäure in Glyzerin und bringt die Schnitte nach Abspülen in Wasser in 5% Kalialaunlösung, in der sie etwa 1—2 Stunden verweilen müssen, so lässt sich bei Untersuchung der Präparate in Glyzerin feststellen, dass die von einer tiefblau gefärbten Linie umrandeten Lakunen und Primitivröhrchen ausserdem noch von einer hellrosa gefärbten schmalen Zone umgeben sind, die sich gegen die Knochengrundsubstanz scharf absetzt. Leider ist diese Färbung, die wie erwähnt, recht inkonstante Resultate gibt, nur kurze Zeit haltbar, da der Farbenunterschied zwischen den dunkelblau gefärbten Grenzlinien und den rosa gefärbten Zonen nach wenigen Stunden schwindet und einer gleichmässigen blauen oder roten Färbung Platz macht. Besonders häufig trifft man diese doppelt konturierten Zonen einzelner Knochenkörperchen in neu apponiertem Knochen, ferner bei Rachitis und Osteomalacie und zwar sowohl

in den kalklosen als auch den kalkhaltigen Partien. Bei Neugeborenen und Embryonen gelingt der Nachweis dieser Zone nur schwer, mitunter überhaupt nicht. Ebenso wie an den Knochenkörperchen lässt sich auch an den Dentinkanälchen nicht selten diese Zone nachweisen. Meines Erachtens handelt es sich bei diesen schwach gefärbten doppeltkonturierten Zonen höchstwahrscheinlich um die Brösickesche Grenzscheide, denn ihrer Lage und ihrem sonstigen morphologischen Verhalten nach entsprechen sie diesen Gebilden vollständig. Warum dieselben freilich nicht an allen Knochenpräparaten nachweisbar sind, und warum sie in manchen Präparaten reichlicher hervortreten als an anderen, vermag ich nicht zu sagen. Der Umstand, dass sie sich in neugebildetem Knochengewebe und bei Rachitis und Osteomalacie reichlicher finden, ist vielleicht auf den geringen Kalkgehalt des Knochens unter diesen Verhältnissen zurückzuführen.

Endlich möchte ich noch darauf hinweisen, dass man mit der in Rede stehenden Färbemethode auch die feine, faserige Struktur des Knochengewebes darzustellen imstande ist, und zwar besonders dann, wenn man in Müllerscher Lösung konserviertes Material verwendet, mit einer stark alkalischen Thioninlösung färbt, in Glycerinphosphormolybdänsäure differenziert und zur Fixierung der Färbung nicht Ammoniak sondern Alaunlösung benutzt und lange in Wasser auswässert. Man erkennt dann an der Knochengrundsubstanz eine eigentümliche rot (bei Glycerinkonservierung), bzw. blau (in Balsampräparaten) gefärbte Strichelung, die offenbar durch die Zusammensetzung der Knochengrundsubstanz aus feinen Fasern, die durch eine Kittsubstanz zusammengehalten werden, bedingt ist. Lange war ich im Zweifel, welcher Teil der Knochengrundsubstanz dabei die Färbung annimmt, ob die Fasern oder die Kittsubstanz. Durch die Untersuchung fötaler Knochen aber, sowie durch die an Sharpeyschen Fasern gemachten Beobachtungen, bin ich zur Überzeugung gelangt, dass die Färbung an der Kittsubstanz haftet, ferner spricht für diese Annahme der Umstand, dass die sogenannten Kittlinien, ebenso wie die feinen, die einzelnen Lamellen trennenden Linien die Färbung intensiv annehmen.

Unterwirft man Knochenschnitte, die mit schwachen Lösungen von Natron- oder Kalilauge vorbehandelt und dann ausgewässert sind, der in Rede stehenden Färbung, so erhält man ebenfalls

eine sehr distinkte Färbung der Kittsubstanz, welche die Fasern bzw. Lamellen miteinander verbindet, freilich ist es in solchen Präparaten, wie oben dargelegt, nicht mehr möglich die Knochenkörperchen und ihre Ausläufer zur Darstellung zu bringen (Fig. 8 u. 9).

Es geht aus diesen Darlegungen hervor, dass mit der Schmorl'schen Thionin-Phosphorwolframsäurefärbemethode am Knochengewebe auf relativ einfache Weise die verschiedensten Strukturen zur Darstellung gebracht werden können. Ob und inwieweit dieselbe zur Klarstellung der Histogenese des Knochen- und Zahngewebes, die ja noch in manchen Punkten der Aufklärung bedarf, verwendbar ist, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Am Schlusse dieser Untersuchungen angelangt, fühle ich das Bedürfnis, Herrn Obermedizinalrat Prof. G. Schmorl meinen wärmsten Dank auszusprechen für die Hilfe, welche er mir bei diesen Studien angedeihen liess, und die Freundlichkeit, mit welcher er mir das reiche Material des von ihm geleiteten Instituts zur Verfügung stellte.

Dresden, Oktober 1903.

Erklärung der Abbildungen auf Tafel XXXIII.

- Fig. 1. Knochenkompakta. Färbung mit Thionin-Pikrinsäure.
- Fig. 2. Schnitt von kompakter Knochensubstanz (Tibia von einem 30 Jahre alten Mann). Färbung nach Schmorl. Vergröss. 340. Reichert Obj. 7a., Okul. III.
- Fig. 3. Schnitt von spongiöser Substanz. Rippe von einem 20 Jahre alten Menschen. Färbung wie oben. Reichert Obj. 7a, Ok. III. Vergr. 340.
- Fig. 4. Schnitt von einer normalen Rippe bei einem 8 Jahre alten Kinde. Färbung nach Schmorl mit Thionin-Phosphorwolframsäure. Fixierung mit Kalialaun. Vergr. 500. Reichert Obj. 8a, Ok. 3.
- Fig. 5. Schnitt von einem 20 Jahre im entkalkten und trocknen Zustande aufbewahrten Knochen. Färbung mit Thionin-Phosphormolybdänsäure. Fixierung mit Liq. ammoni caustici. Vergr. 340. Reichert Obj. 7a, Ok. III.
- Fig. 6. Knochenlakunen mit Ausläufern und blassgefärbten Grenzscheiden bei normalem Knochen. Färbung wie bei Fig. 5. Homog. Immers. $\frac{1}{12}$. Ok. 4. Vergr. 1200.
- Fig. 7. Schweinszahn. Schnitt von der Wurzel mit Zehntein und Zement. Färbung wie bei Fig. 5.
- Fig. 8 u. 9. Knochenfaserung. Längs- und Querschnitt nach Behandlung mit Kalilauge.