

Aus der Versuchsabteilung der Robapharm A.G., Basel

Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von Calcium und einem Knochenvollpräparat auf das Regenerationsvermögen des Schwanzes bei Eidechsen*

Von

FRED. C. ROULET

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Januar 1959)

Will man die Wirkung eines Stoffes, der den Knochenaufbau fördert, experimentell auswerten, so kann man sich verschiedener Verfahren bedienen; es können zum Beispiel Differenzierungsprozesse des Knochens während der embryonalen Entwicklung, die Knochenregeneration nach künstlichen Frakturen oder noch die metaplastische Knochenbildung untersucht werden. Bis jetzt ist noch nie der Versuch unternommen worden, an einem Objekt zu arbeiten, bei welchem die Regeneration nach Knochenverlust in der Regel nur die Entwicklung von Knorpelgewebe erzeugt; ein derartiges Objekt ist der Eidechsen Schwanz.

Bekanntlich sind die meisten Eidechsen nicht nur imstande, einen größeren Teil ihres Schwanzes durch Autotomie zu verlieren, sondern das abhandengekommene Stück weitgehend — wenigstens äußerlich — zu regenerieren. Dieses Phänomen der Selbstverstümmelung mit nachfolgender Regeneration ist vor langer Zeit schon und zum Teil sehr genau untersucht worden**; eine besonders genaue und aufschlußreiche Analyse dieser Erscheinung verdankt man z. B. WOODLAND¹⁵ und SLOPOLSKY¹², die u. a. deutlich demonstrierten, daß die Regenerationszone sich über den ganzen Eidechsen Schwanz erstreckt und nicht mit der Autotomiezone nur zusammenfällt. Durch die anatomische Untersuchung ist klar erwiesen, daß die Autotomie im Bereich präformierter Bruchstellen erfolgt (wie sie schon ältere Autoren erkannten: LEYDIG, FRAISSE), welche bei *Lacerta muralis* z. B. vom 6. Schwanzwirbel an ziemlich konstant (nicht schon im 5. Schwanzwirbel) den Wirbelkörper fast vollständig durchsetzen. Die Ränder dieser Spalten werden durch Knorpelgewebe (wenigstens teilweise) umgeben, so daß „bei jeder Schwanzruptur Knorpel verletzt werden muß“. Nach relativ kurzer Latenzperiode, die großen individuellen Schwankungen unterworfen ist, erfolgt die Regeneration des Schwanzes aus einem Blastem, das sich im Wundbereich entwickelt. Als „Skelet“ des neuen Schwanzes wird lediglich ein *Knorpelrohr* gebildet; in der Regel bleibt er lange Zeit kalklos oder zumindest sehr kalkarm, läßt nie eine Umwandlung in Knochen erkennen und bleibt stets unsegmentiert. Darüber sind sich alle Untersucher einig, ob

* Herrn Professor Dr. TH. KOLLER zum 60. Geburtstag gewidmet.

** 1, 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15.

sie Eidechsen^{1, 5, 8, 10, 12, 14}, Geckos¹⁵ oder Chamäleons¹ verwendet haben. Es unterscheidet sich demnach diese Regenerationsart ganz wesentlich von der Regeneration bei den Anuren, bei denen bekanntlich vollwertige Extremitäten regeneriert werden können. Im Schwanzregenerat der Lacertilier enthält das Knorpelrohr ein Rückenmarksregenerat mit Zentralkanal; Bindegewebe und Muskulatur, z. T. mit Fettgewebe, umgeben das unsegmentierte knorpelige Skeletregenerat; diese äußeren Weichteile sind durch fibröse Septen segmental angeordnet, wie man es im normalen Schwanz findet. Eine Vascularisation ist frühzeitig gut entwickelt. Das Regenerat wird durch Haut bedeckt, welche von den Wundrändern aus neu gebildet wird und sehr bald eine Wirbelbildung erkennen läßt.

Die spärlichen, seit WOODLANDS und SLOTOPOLKYS sehr sorgfältigen Untersuchungen erschienenen Arbeiten auf diesem Gebiet^{1, 8, 11, 14} haben deren Befunde weitgehend bestätigt; es geht insbesondere einmal mehr daraus hervor, daß das Knorpelrohr des Regenerats sich nicht weiter differenziert, sich nie segmentiert und vor allem nie eine Knochenneubildung aufweist. Unter Umständen kann der Knorpel Kalkablagerungen an der Innenfläche des Rohres und seiner Außenfläche aufweisen¹⁵. Es war daher von einigem Interesse zu untersuchen, ob durch eine Behandlung mit einem Präparat, das alle Bestandteile des vitalen Knochens enthält, eine Neubildung von Knochen erzeugt werden kann.

Versuchsordnung

2 Versuchsserien wurden durchgeführt, die 1. im Spätsommer (36 Tiere), die 2. im Frühsommer (60 Tiere). Verwendet wurden Smaragdeidechsen (*Lacerta viridis*), bei denen der Schwanz möglichst an der gleichen Stelle, zwischen 5. und 7. Schwanzwirbel mit der Schere seitlich angeschnitten und sodann durch leichte Biegung abgetragen wurde. Die Tiere wurden in 3 Gruppen geteilt:

Gruppe 1: Kontrolle der normalen Regeneration.

Gruppe 2: Neben dem Normalfutter wurden täglich 18,5 mg Calciumcarbonat bzw. 70 mg Calciumlactat per os gegeben.

Gruppe 3: Neben dem Normalfutter wurden 50 mg Ossopan per os verabfolgt.

Die Tiere gewöhnten sich rasch an die Fütterung. Zwischenfälle sind nicht vorgekommen. Wöchentlich 1mal ist das Regenerat gemessen worden, und zwar bis zur 12. Woche; sodann wurden die Tiere mit Äther getötet und der Schwanz histologisch untersucht. Um auch Zwischenstadien untersuchen zu können, ist im 2. Versuch die Hälfte der Tiere nach 8 Wochen geopfert worden.

Ergebnisse

Aus den Wachstumskurven geht hervor, daß bis zur 8. Woche die Längenzunahme des Regenerates in den Gruppen 1 (Kontrollen) und 2 (Calcium) fast gleich verläuft, während bei den Tieren der Gruppe 3 (Ossopan) bereits nach der 4. Woche eine deutlich stärkere Längenzunahme beobachtet wird, die nach 7 Wochen besonders deutlich erscheint. Nach der 10. Woche verflacht die Kurve. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß Ossopan auf den Regenerationsprozeß offenbar fördernd wirkt.

Tabelle

	Wochen					
	1	2	3	4	5	6
	in mm					
Gruppe 1 (Kontrollen)	2,5	4,0 (+ 1,5)	5,5 (+ 1,5)	8,0 (+ 2,5)	12,5 (+ 4,5)	18,5 (+ 6,0)
Gruppe 2 (Calcium)	2,0	4,0 (+ 2,0)	5,5 (+ 1,5)	9,0 (+ 3,5)	13,0 (+ 4,0)	19,5 (+ 6,5)
Gruppe 3 (Ossopan)	3,0	5,5 (+ 2,5)	7,5 (+ 2,0)	12,0 (+ 4,5)	18,0 (+ 6,0)	25,5 (+ 7,5)

	Wochen				
	7	8	9	10	11
	in mm				
Gruppe 1 (Kontrollen)	22,5 (+ 4)	27,0 (+ 4,5)	31,5 (+ 4,5)	32,5 (+ 1,0)	33,0 (+ 0,5)
Gruppe 2 (Calcium)	22,5 (+ 3)	28,0 (+ 5,5)	29,0 (+ 1,0)	29,5 (+ 0,5)	30,5 (+ 1,0)
Gruppe 3 (Ossopan)	30,0 (4,5)	33,0 (+ 3,0)	35,5 (+ 2,5)	36,5 (+ 1,0)	37,5 (+ 1,0)

Zur *histologischen Bearbeitung* ist das Regenerat samt 2—3 Wirbeln oberhalb davon nach Fixierung in Bouinscher Lösung und Nachbehandlung mit Diaphanol (im Kühlschrank) in Paraffin eingebettet worden (Methylbenzoat-Celloidin nach PETERFI). Teils wurden Sagittal-, teils Horizontalschnitte ausgeführt. Im Verlauf dieser Untersuchung ist lediglich das Skelet des Regenerates sowie seine Verbindung mit den präformierten Wirbelteilen einer näheren Analyse unterworfen worden; es wurde von vornherein auf eine eingehende Beschreibung der übrigen Regenerationsvorgänge verzichtet, da diese zum größten Teil hinreichend bekannt sind. Es können ferner hier auch jeweils nur 2 Stadien berücksichtigt werden, nämlich 8 Wochen und 12 Wochen.

Gruppe 1: Kontrollen. 3. Woche. Ein Knorpelrohr ist bei allen Tieren zu finden; sein Lumen wird mit lockerem, gefäßhaltigem Bindegewebe ausgefüllt, welches das Rückenmarksregenerat einbettet. In Sagittalschnitten erkennt man deutlich die proximale Hälfte des 6. Schwanzwirbels, der an der üblichen Stelle (d. h. im Bereich der präformierten Querspalte) frakturiert ist. In diesem Stadium ist nicht mehr ersichtlich, ob die Entwicklung des Knorpelrohres irgendwie mit dem Knorpel der Querspalte zusammenhängt. Der neugebildete Knorpel setzt eigentlich die Kontinuität des Skeletes unmittelbar fort, und zwar sowohl im Bereich des Wirbelkörpers ventral als auch dorsal, wo ein dünnes Knochenplättchen die Basis des sekundären Querfortsatzes, evtl. auch des Wirbelbogens markiert (Abb. 1). Am spongiösen Knochen des Wirbelkörpers, der kuppenförmig gegen den neugebildeten Knorpel stößt, ist eine deutliche Atrophie der Gerüstbälkchen vorhanden, und nur sehr selten entwickelt sich hier am Kontakt zum Knorpel eine dünne Osteoidschicht. Eigentümlicherweise ist dieser letzte Befund vor allem dorsal im Bereich eines in allen

Präparaten auftretenden Knochenplättchens zu erheben; dieses Knochenstück stellt entweder den Wirbelbogenrest oder die craniale Zacke des Querfortsatzes dar. Hier bildet sich gelegentlich eine relativ breite Osteoidschicht mit Osteoblasten (Abb. 1b). In der großen Mehrzahl der Fälle unterscheidet sich das Knorpelgewebe

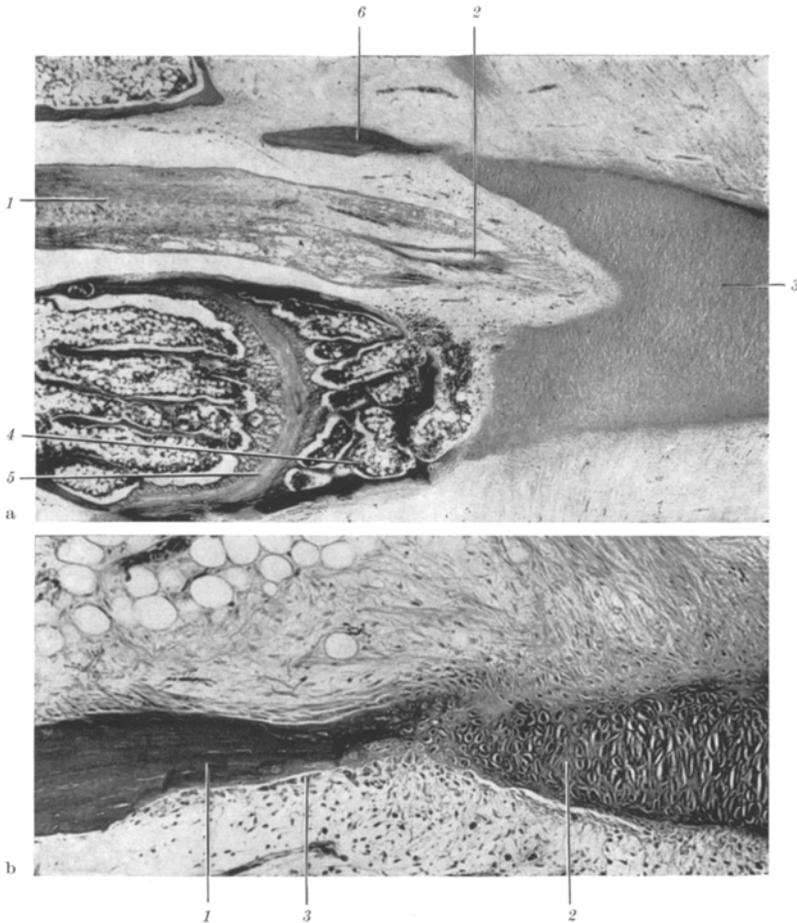


Abb. 1a u. b. Kontrolle, 8. Woche. a Übersicht eines Sagittalschnitts durch die Bruchstelle. Man erkennt bei 1 das Rückenmark mit Andeutung eines röhrenförmigen Regenerates (2). 3 Kranialer Teil des regenerierten Knorpelrohres (tangentialer Schnitt). 4 Kraniale Hälfte des frakturierten Wirbelkörpers. 5 Intervertebral-Synchondrose. 6 Bruchstück des Wirbelbogens (Vergr. 28 \times). b Detail aus Abb. 1a bei 6: Zusammenschluß vom Wirbelbogen (1) mit dem regenerierten Knorpel (2). Es ist nur spärliches Osteoid gebildet worden bei geringerer Osteoblastentätigkeit (3) (Vergr. 112 \times)

am Kontaktpunkt zum Knochen kaum vom Rest des Knorpelrohres; nur ausnahmsweise sind einige Zellen gebläht; eine Kalkablagerung in der Grundsubstanz liegt nie vor, die Dicke des Perichondriums wechselt.

12. Woche. Grosso modo sind die Verhältnisse 12 Wochen nach der Amputation dieselben, das Rückenmark kann bis an das Ende des Knorpelrohres vorstoßen, oft nur als ein Kanal, das von einem Neuroepithel ausgekleidet wird. Eine weitere

Differenzierung an den Bruchenden ist im Gange, d. h. der Knorpel des Regenerates wird gelegentlich großzellig und hypertrophisch, etwa wie in einem wachsenden Epiphysenknorpel; die Grundsubstanz verliert ihre Metachromasie, wird eosinophil

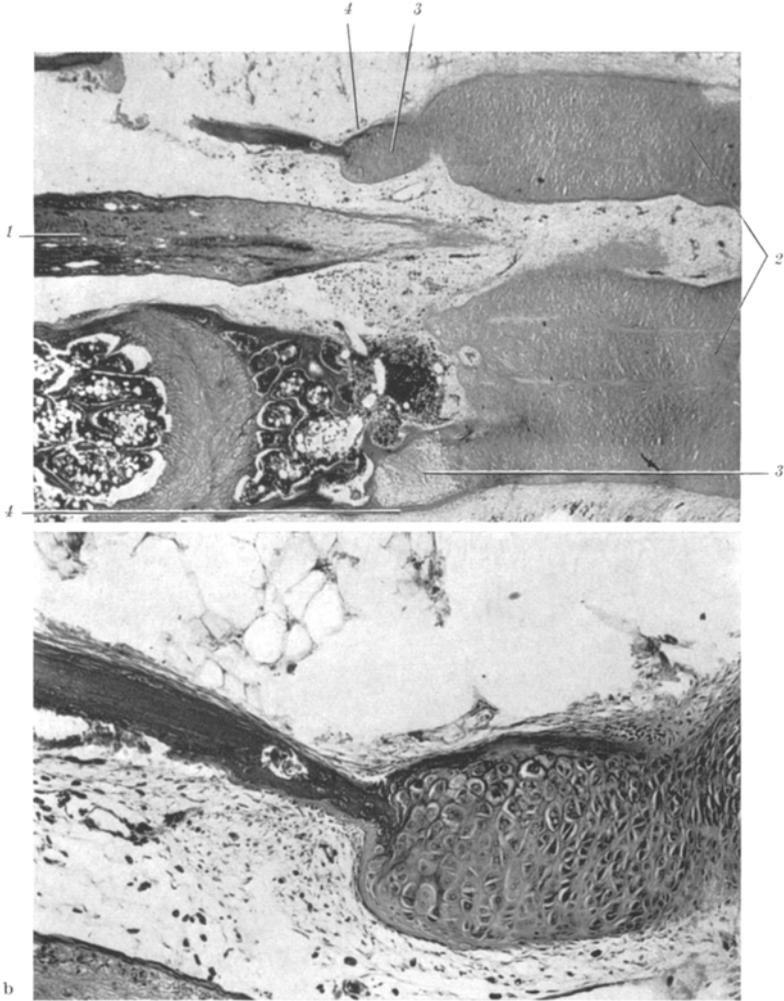


Abb. 2a u. b. Kontrolle, 12. Woche. a Übersicht eines Sagittalschnitts: 1 Rückenmark. 2 Regeneriertes Knorpelrohr von lockerem Bindegewebe mit einzelnen Pigmentzellen ausgefüllt. An seinem kranialen Ende (3) umschriebene Herde mit hyperplastischem Knorpel, die außen z. T. von Osteoid bedeckt werden (4) (Vergr. 28 ×). b Detail aus Abb. 2a im Bereich des Wirbelbogens. Osteoblastentätigkeit ist deutlich dorsal und ventral. Osteoidbildung über dem hyperplastischen Knorpel (Vergr. 112 ×)

und relativ dicht. Am Rand der Bruchstelle ist etwas reichlicher Osteoid entwickelt; es bildet vom Periost aus Bälkchen und kleine Platten, die den „blasigen“ Knorpel bedecken und umsäumen (Abb. 2). Gelegentlich besteht eine unmittelbare Kontinuität zwischen dem Osteoid und den kompakteren, eosinophilen Anteilen der

Knorpelgrundsubstanz, wobei die Knorpelzellen kleiner zu werden scheinen, wie wenn eine direkte Metaplasie von Knorpel in Vorknochen vor sich gehen würde.

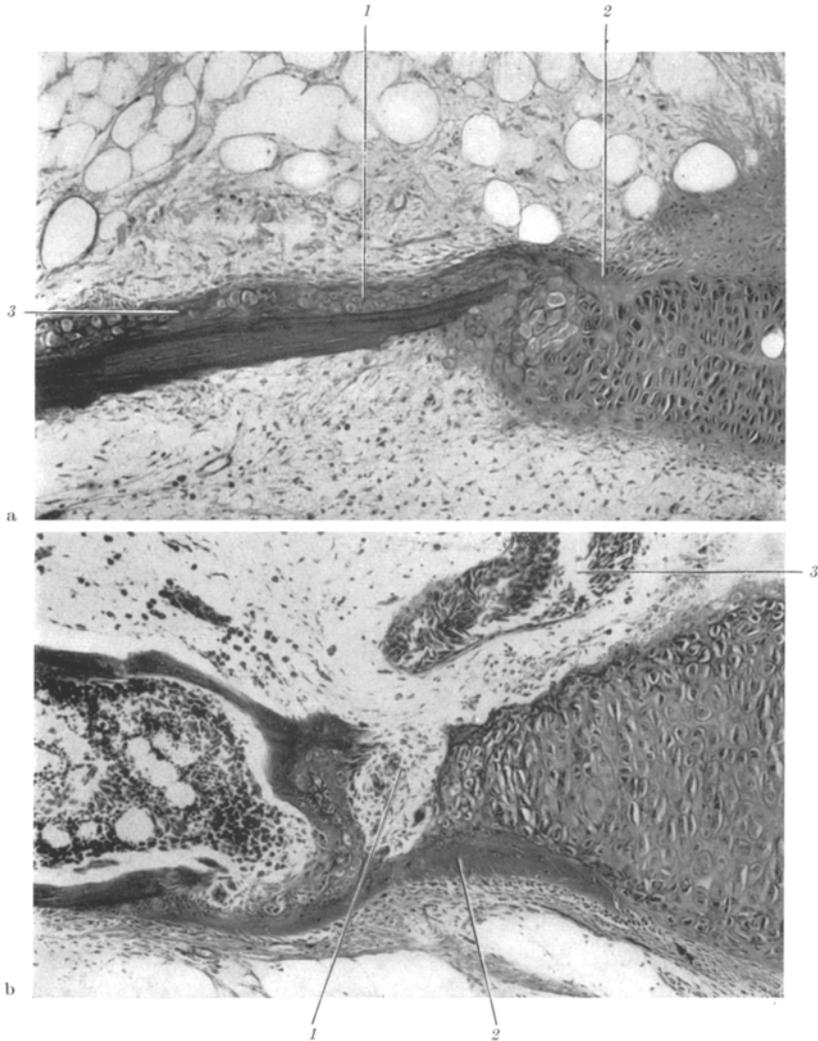


Abb. 3a u. b. Kontrolle, 12. Woche. a Bruchende des Wirbelbogens mit subperiostal entstandener, dünner Knorpelschicht (1), von schmaler Osteoidschicht überlagert. Bei 2, weiter caudal, wird diese Schicht breiter (2) mit deutlichem Osteoblastensaum. Kranial, direkte Metaplasie vom subperiostalen Knorpel in Knochen (3) (Vergr. 112 \times). b Gleiches Tier. Bruchende des Wirbelkörpers mit Abbau des Knorpels und Entwicklung eines primären Markraumes (1), wo z.T. eine dünne Osteoidschicht den chondroklastisch abgebauten Knorpel bedeckt. Relativ breite neugebildete Knochenschicht periostal (ventral) mit Osteoblasten (2). 3 Großes regeneriertes Gefäß im Knorpelrohr (Vergr. 112 \times)

Selten entsteht im Periost der am Bruchende vorhandenen präformierten Knochenplatten, besonders im Bereich des Wirbelbogens bzw. der cranialen Querfortsatzacke, eine dünne Knorpelzellschicht, die durch eine derartige direkte Meta-

plasie in Vorknochen übergeführt wird (Abb. 3a). Auch kommen bei vereinzelt Tieren herdförmige Auflösungserscheinungen am regenerierten Knorpel vor, die zur Bildung von Räumen führen, welche wie „primäre Markräume“ aussehen: Die Kontinuität des Knorpels und des Perichondriums ist unterbrochen, ein Pfropfen aus lockerem gefäßreichen Bindegewebe stößt vor und resorbiert das Knorpelgewebe, wobei meist Chondroklasten auftreten (Abb. 3b). Gelegentlich werden an den Rändern einer solchen Lücke dünne osteoide Ablagerungen sowie deutliche Osteoblastensäume festgestellt. Sehr weit ist im großen und ganzen die Verknöcherung nicht fortgeschritten. Leider kann über die Kalkablagerung nichts ausgesagt werden, da die Präparate vollständig entkalkt worden sind.

Bemerkenswert scheint die Tatsache zu sein, daß Herde von sog. hypertrophischem Knorpel sowohl an der unmittelbaren Kontaktstelle mit vorbestehenden Skeletstückchen als auch periostal nur spärlich auftreten und daß eine metachromatische Reaktion beinahe nur in unmittelbarer Umgebung der Knorpelzellen beobachtet wird. Die Überführung eines solchen relativ primitiven Knorpels in Knochen bzw. in Vorknochen kann sowohl durch direkte Metaplasie als auch nach vorheriger Resorption mit sekundärer Apposition von Osteoid erfolgen. Beide Prozesse treten am gleichen Objekt auf, beide sind allerdings nie sehr intensiv.

Gruppe 2: Calcium Behandlung. 8. Woche. Im allgemeinen bestehen keine großen Unterschiede gegenüber den Kontrollen. Die Zonen des hypertrophischen Knorpels treten bereits in diesem Zeitpunkt deutlicher in Erscheinung (Abb. 4) und es wird reichlicher Osteoid gebildet, welches das abgebrochene Stück vom Wirbelbogen z. B. ganz umscheidet und sich weiter in die Perichondriumzone fortsetzt. Es sind deutlich nachweisbare Osteoblastenreihen, vor allem periostal, vorhanden. Ferner kann, wenn auch nur ausnahmsweise, eine Knorpelresorption durch angedeutete primäre Markraumbildung gesehen werden, allerdings ohne daß eine stärkere Osteoidablagerung in ihrem Bereich erfolgen würde. Gelegentlich tritt ebenfalls periostal eine Knorpelneubildung auf, sie ist etwas stärker als bei den Kontrollen. Auf einen Nebenbefund sei noch hingewiesen, der offenbar als Zufallsbild bei einigen Tieren dieser Gruppe zu deuten ist. Bei einem Tier wurde die Andeutung einer Gabelung des regenerierenden Knorpelrohres mit entsprechender Gabelung des Rückenmarksregenerates gefunden (Abb. 5). Man kann sich fragen, ob die Teilung des Rückenmarkstumpfes dabei nicht einen maßgebenden Einfluß ausübt, denn es sieht so aus, als ob dieses sekundäre „Rückenmarksblastem“ gegen den Knorpel stoßen und dadurch die Bildung eines zweiten Kanals veranlassen würde. Dies ist freilich lediglich eine Hypothese, welche durch weitere Versuche geprüft werden sollte. Die Bildung von doppelten Schwanzregeneraten, also von verdoppelten Schwänzen, ist bei Lacertiliern bekannt; so hat SŁOTOPOLSKY¹² außerordentlich lehrreiche Röntgenbilder derartiger Befunde veröffentlicht. Wie er und andere gezeigt haben, können sie ohne weiteres experimentell erzeugt werden. Unsere Befunde lassen allerdings vermuten, daß unter Umständen auch unvollständige Doppelbildungen möglich sind.

12. Woche. Im Vergleich zu den Kontrollen sind die Bezirke mit hypertrophischem Knorpel ausgedehnter, besonders ventral, am Rande des gespaltenen Wirbelkörpers; die Zellen sind hier oft wie blasig aufgetrieben, nur von spärlichen Grundsubstanzbrücken voneinander getrennt. Die großzellige Umwandlung läßt sich zuweilen auch an der Außenfläche der alten Knochenbruchstücke nachweisen, also im Bereich des Periostes dieser Teile. Es ist hier eine tiefgreifende Umwandlung vor

sich gegangen, indem eine kontinuierliche Osteoidplatte mit neuem Periost und Osteoblasten diese großzellige Knorpelschicht bedeckt. Kranialwärts erstreckt sie

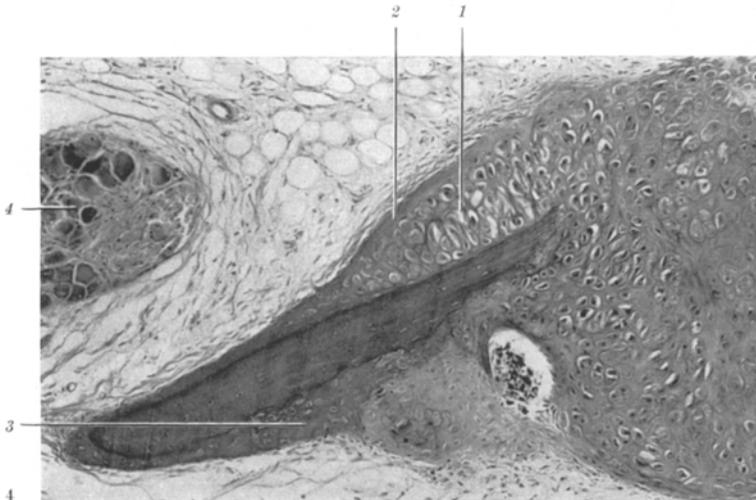


Abb. 4

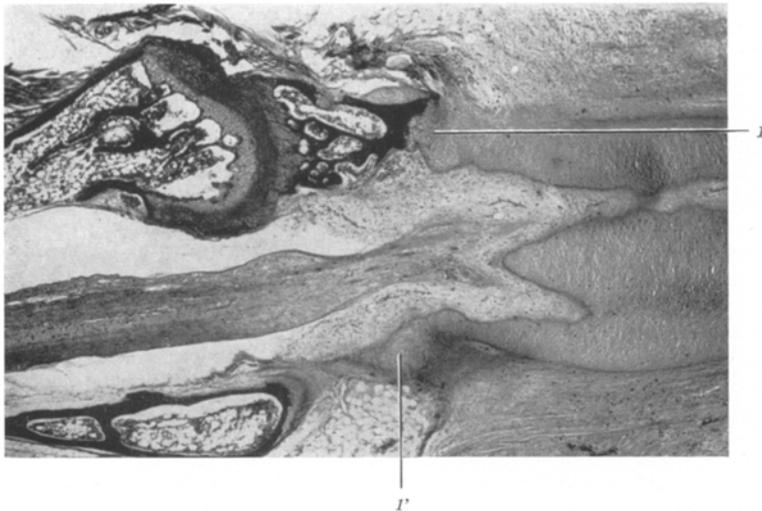


Abb. 5

Abb. 4. Calcium, 8. Woche. Abbruchstelle des Wirbelbogens. Man beachte (im Vergleich zu Abb. 1 b) die deutlicher aufgetretene subperiostale Knorpelschicht (1), von Osteoid überlagert (2) sowie die Knochenneubildung ventral (3). Bei 4: Intervertebralganglion (Vergr. 112 ×)

Abb. 5. Calcium, 8. Woche. Übersicht der Bruchstelle. Wie in den Abb. 1 a und 2 a liegt das regenerierte Knorpelrohr auf der rechten Seite des Bildes (caudal). Es läßt eine Andeutung von Verdoppelung erkennen bei gleichzeitiger Gabelung des Rückenmarksregenerates. Mäßig stark entwickelte Bezirke mit hyperplastischem Knorpel an den Kontaktstellen des Knorpelrohrs mit den Bruchenden (1 und 1') (Vergr. 28 ×)

sich mit ziemlicher Regelmäßigkeit an der Oberfläche des Knorpelrohres, allerdings nur über die Bezirke hypertrophischen Knorpels (Abb. 6a). Auf Seite des Endostes, am Rand der durch die Amputation eröffneten Markräume, sind die Befunde wech-

selnd: einerseits fehlt jegliche Osteoidbildung, und es wird der Knorpel durch Chondroklasten aufgelöst (Abb. 6b); andererseits ist Osteoid reichlich entwickelt und riegelt den eröffneten Markraum ab; es ist schwer, eine genaue Begrenzung zwischen diesem Osteoid und dem sich verdichtenden Knorpel zu ziehen. Das sind Gebiete, in denen eine direkte Metaplasie vorzukommen scheint.

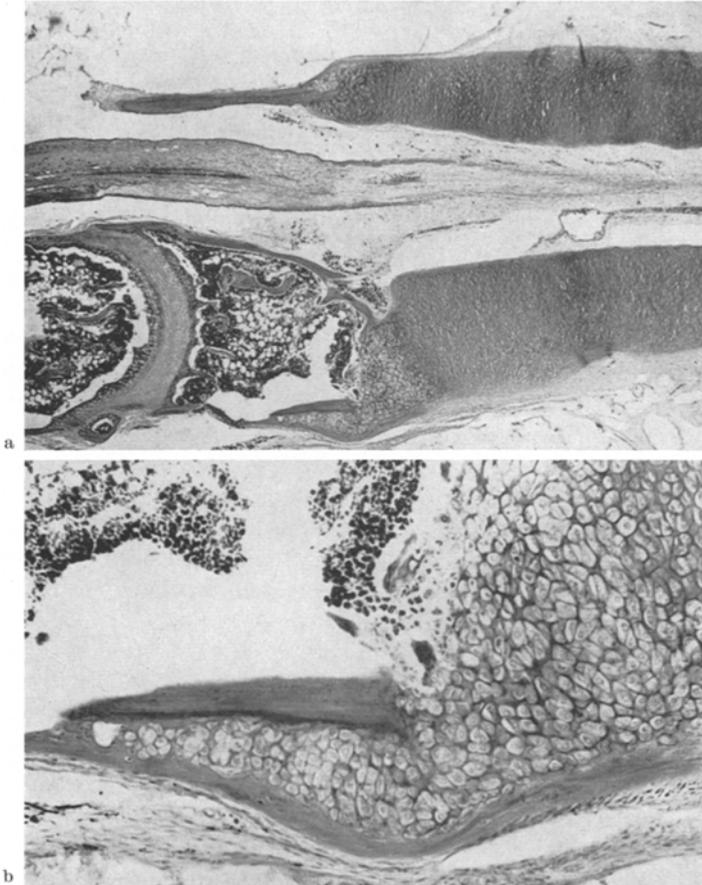


Abb. 6a u. b. Calcium, 12. Woche. a Übersicht der Bruchstelle mit deutlichem Regenerat des Rückenmarks, welches in die Lichtung des Knorpelrohrs eindringt. Die hypertrophische Beschaffenheit des Knorpels an der Verbindungsstelle zum Wirbelkörper ist besonders deutlich. b Osteoide Schicht z. T. mit jungem Knochen (vergrößert). Es beginnt hier ein Abbau des Knorpels (Vergr. a 28 \times , b 112 \times)

Es ist demnach der Prozeß der Knochenbildung nach Behandlung mit Calciumsalzen nur wenig beeinflußt worden. Die vergleichende Betrachtung zahlreicher Schnittpräparate läßt allerdings eine etwas stärkere Entwicklung eines hypertrophischen Knorpels und zugleich etwas mehr Osteoid erkennen als bei den Kontrollen. Auch sind deutlichere Osteoblastensäume, vor allem periostal zu beobachten. Die Verbindung

zwischen dem röhrenförmigen Knorpelregenerat und der Amputationsstelle ist kräftiger entwickelt.

Gruppe 3: Behandlung mit Ossopan*. 8. Woche: Das Knorpelrohr ist bei diesen Tieren genau gleich entwickelt wie in den anderen beiden Gruppen; der Verknöcherungsprozeß an seinem kranialen Ende verläuft nach dem gleichen Modus. Wenn allerdings Einzelheiten berücksichtigt werden, so ergeben sich einige wesentliche Unterschiede, die bei allen Regenerationen dieser Gruppe auffallen: 1. ist die Osteoblastentätigkeit wesentlich deutlicher, und 2. tritt im Knorpel des Regenerates schon im 8-Wochen-Stadium eine großzellige Umwandlung (sog. hypertrophischer Knorpel) in ausgeprägtem Maße auf (Abb. 7 u. 8).

Deutliche Osteoblastensäume, wie sie in keinem Fall der Gruppen 1 oder 2 festgestellt worden sind, lassen sich am Rand der Knochenplatten im Amputationsbereich nachweisen, hier wiederum besonders an der Bruchstelle des Wirbelbogens bzw. der kranialen Zacke des Querfortsatzes (Abb. 7 b). Dieses Knochenstück wird oft auf seiner dorsalen Fläche vom Knorpelregenerat partiell überdeckt und auch an dieser Stelle sind Osteoblasten deutlich zu erkennen. Das Periost ist breit und zellreich; die Überführung des Osteoids in Knochen ist in seinem Bereich in vollem Gang. Ferner wird in den gleichen Gebieten des Querfortsatzes, wie übrigens auch am Bruchende des Wirbelkörpers, das anstoßende Knorpelgewebe umgewandelt; es verdichtet sich seine Grundsubstanz besonders an Stellen, wo perichondral die ersten Andeutungen von Osteoidbildung vorkommen; die Knorpelzellen rücken auseinander, die Grundsubstanz sieht grobfaserig aus und färbt sich mit Fuchsin intensiv rot an, und es läßt sich keine deutliche Demarkationslinie zwischen Knorpel und Osteoid demonstrieren. Dies kann vor allem ventral gesehen werden, wo im lockeren Bindegewebe, das zwischen Rückenmarksregenerat und Innenwand der beginnenden Knorpelröhre gelegen ist (Abb. 7 b), eine Osteoidbildung eben sichtbar wird.

Das relativ frühzeitige Auftreten von hypertrophischem Knorpel am kranialen Ende, also an der Basis des Knorpelrohres, stellt einen charakteristischen Befund in dieser Gruppe dar. Tatsächlich kann bei allen Tieren bereits nach 8 Wochen eine Auftreibung dieser Stelle am Regenerat gesehen werden. In der Regel wird die wulstartig beschaffene Zone nach außen von einer deutlichen Schicht osteoiden Gewebes, z. T. sogar von

* Ossopan ist ein Präparat aus rohen, entfetteten und gemahlten Röhrenknochen von Kälbern. Es enthält neben den anorganischen Calciumsalzen (in unveränderter Bindung) alle organischen Bestandteile der bindegewebigen Knochenmatrix (Collagen, mucioide Grundsubstanz, Enzyme). Dank des schnellen Herstellungsverfahrens sind auch diese Bestandteile im natürlichen Verhältnis im Präparat vorhanden. Der Gehalt an Calcium beträgt im Durchschnitt 17%, der Collagengehalt 22%, der Gehalt an anderen Proteinen ca. 18%.

jungem Knochengewebe mit Osteoblasten umsäumt; auch tritt hier eine primäre Markraumbildung nach Auflösung des Knorpels auf, wie man sie bei den Kontrollen erst nach 12 Wochen sehen kann (Abb. 8a u. 8b).

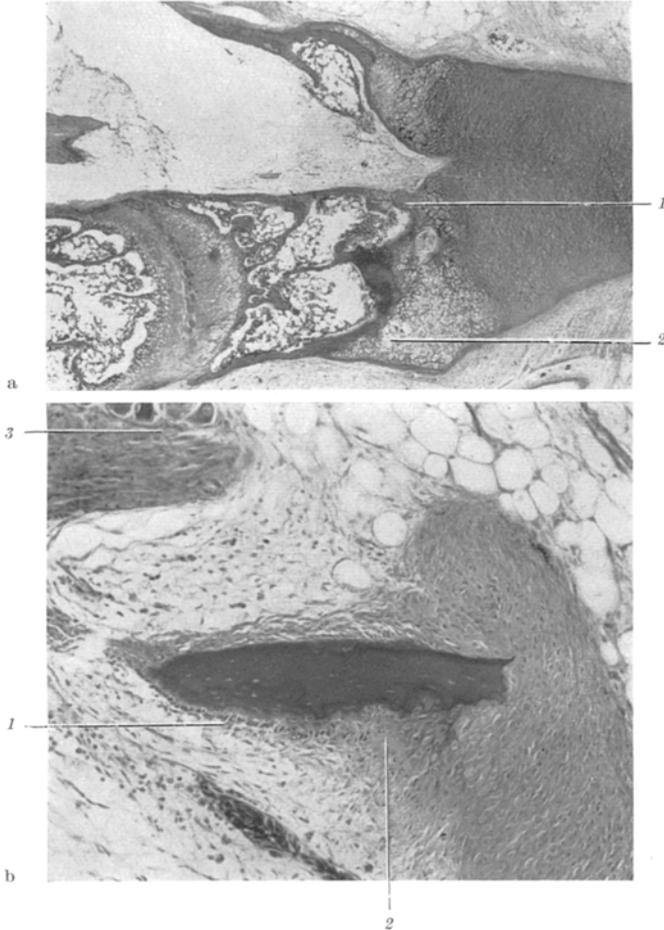


Abb. 7a u. b. Ossopan, 8. Woche. a Übersicht der Bruchstelle; Knorpelrohr (rechts) tangential getroffen. An seinem proximalen (kranialen) Ende ist der Knorpel ausgesprochen großzellig, hyperplastisch, von breiter osteoider, z. T. knöcherner Schicht innen wie außen bedeckt. Reichlich junger Knochen auch an der inneren Seite, am Abgang des Knorpelrohrs abgelagert (1). Beginnende Markraumbildung (2); vgl. Abb. 8 (Vergr. 28 ×). b Bruchstelle des Wirbelbogens: 1 Osteoblastensaum, 2 undeutliche Begrenzung zwischen Knorpelgrundsubstanz und Osteoid, 3 Intervertebralganglion (Vergr. 112 ×)

Diesen Befunden entsprechend erscheint das Osteoid und dessen Umwandlung in junges Knochengewebe viel reichlicher, so daß infolgedessen die Verbindung zwischen dem frakturierten Wirbel und dem knorpeligen Regenerat eine Stufe erreicht, die bei den Kontrollen auch in der

12. Woche in gleichem Maße noch nicht vorliegt und nach Behandlung mit Calciumsalzen höchstens angedeutet ist.

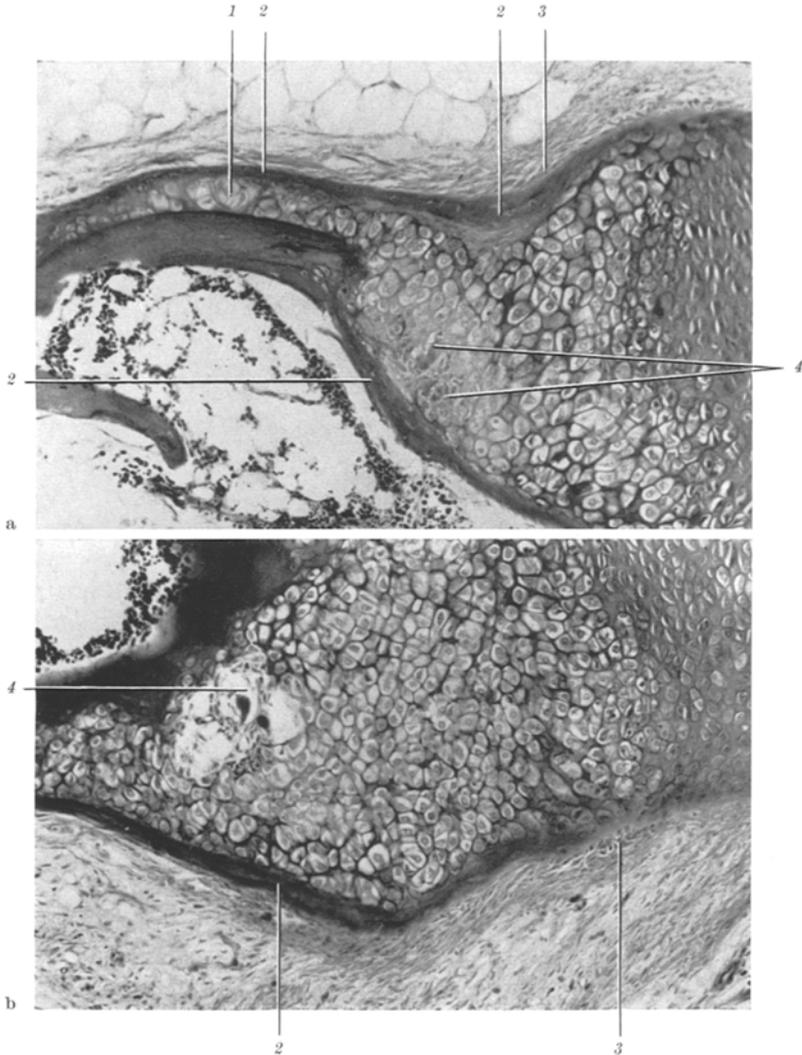


Abb. 8a u. b. Ossopan, 8. Woche. Vergrößerungen von Abb. 7a. a Dorsaler Teil der Bruchstelle mit deutlicher, breiter subperiostaler Knorpelbildung (1), von junger Knochenplatte bedeckt. Diese erstreckt sich über den hyperplastischen Knorpel (2). Reichliche Osteoblasten (3). Beginnende Markraumbildung (4). b Ventraler Teil: Markraumbildung im Knorpel mit 2 Chondroklasten (4), im übrigen wie bei a (Vergr. 112 ×)

12. Woche: Dieses Stadium läßt eine deutliche Intensivierung der Prozesse erkennen, die nach 8 Wochen bereits angedeutet oder schon im Gange waren. Der Umbau des Regenerationsknorpels schreitet fort, der

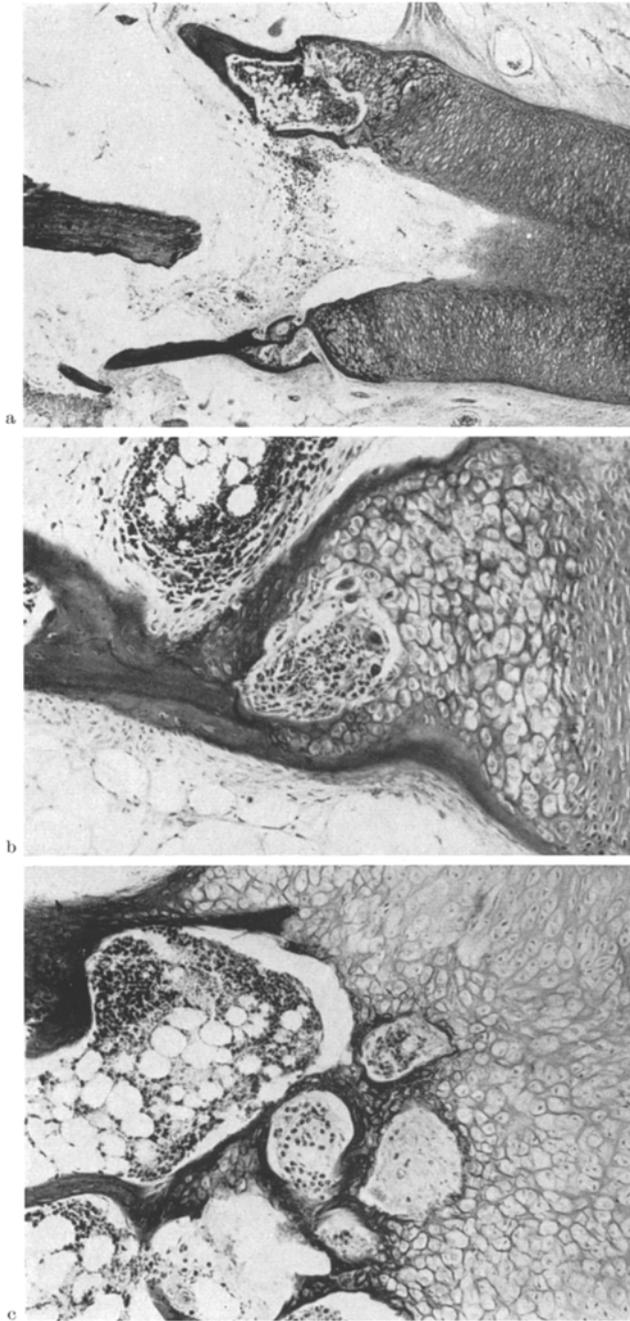


Abb. 9a—c. Ossopan, 12. Woche. a Übersicht der Bruchstelle: großzellige Knorpelumwandlung am kranialen Ende des Knorpelrohrs weiter fortgeschritten, mit Abbau durch Markraumbildung und Knochenapposition (Vergr. 28 ×). b Detail einer Markraumbildung mit Chondroklasten und den ersten myeloischen Zellnestern. Breite junge Knochenschicht ventral (unten) und dorsal (oben) (Vergr. 112 ×). c Ausgesprochen starke Markraumbildung von Osteoid und Knochen an den Rändern der Räume bei ausgesprochenem Knorpelzerfall (Vergr. 112 ×)

Anbau von neuem Knochen ist überall klar zu sehen, zuweilen sogar in sehr ausgesprochener Weise. Die Bezirke von hypertrophischem Knorpel

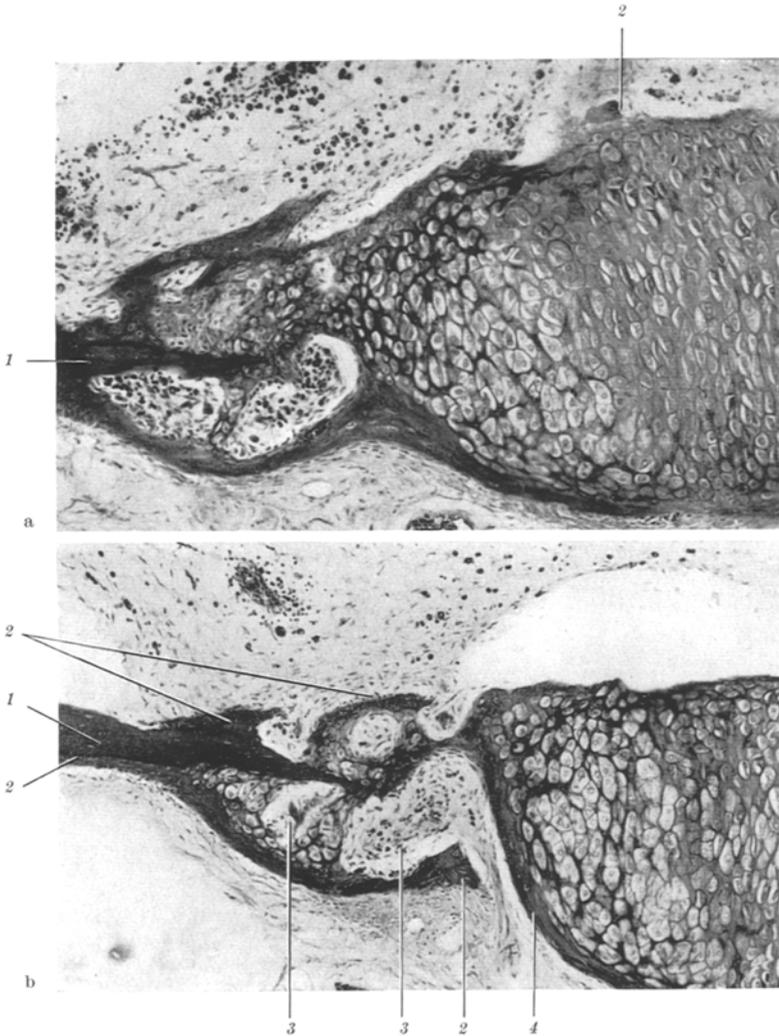


Abb. 10 a u. b. Ossopan, 12. Woche. Einzelheiten der Ummodellierung am kranialen Ende des Knorpelrohres. In a ist die reichliche Knochenneubildung vor allem deutlich, wobei Knorpelzellen gelegentlich in den osteoiden Bälkchen liegen bleiben. Abgesehen von einer kleinen Knochenlamelle (1) sind alle in diesem Bild sichtbaren Strukturen Regenerationsprodukte. Bei 2: ein Chondroklast an der Innenwand des Knorpelrohres (Vergr. 112mal). b Ähnliche Verhältnisse wie bei a, allerdings mit weiter fortgeschrittenem Umbau. 1 Altes Knochenplättchen, 2 neugebildeter Knochen, 3 primärer Markraum im Bereich des aufgelösten hyperplastischen Knorpels, von welchem Reste in den Bälkchen noch zu sehen sind, 4 perichondrale Schicht jungen Knochens (Vergr. 112 ×)

haben nicht nennenswert zugenommen (Abb. 9), sie werden am kranialen Ende des Knorpelrohres, außen wie innen, durch Knochenplättchen be-

deckt, und sie lassen eine deutliche, wenn auch zuweilen nur herdförmige Umwandlung beobachten: der Knorpel wird aufgelöst und es entwickeln sich reichliche primäre Markräume mit Knochenmarkszellen. Neben der reichlichen Knochenneubildung, periostal wie endostal, sind die fortgeschrittenen Ummodellierungsprozesse am Knorpel für diese Gruppe charakteristisch.

Die Entwicklung primärer Markräume läßt sich sowohl dorsal wie ventral verfolgen; im hypertrophischen Knorpel tritt eine Höhle auf, die neben Chondroklasten und indifferenzierten Bindegewebszellen auch myeloische Elemente enthält. Am Rand treten Osteoblasten auf und es wird junger Knochen angelagert (Abb. 9b). Dabei bleiben sehr oft Knorpelzellen im Osteoid bzw. Knochen innerhalb der Bälkchen des auf diese Weise entstehenden primitiven spongiösen Knochens liegen (Abb. 9b u. 9c). Diese Knochenneubildung ist wesentlich aktiver und vor allem viel weiter fortgeschritten als bei den Kontrollen (vgl. Abb. 3), was mit größter Wahrscheinlichkeit auf die tiefgreifende Umwandlung der Knorpelgrundsubstanz zurückzuführen ist. Hier, wie bei jeglicher chondralen Knochenbildung in der Ontogenese, wird zunächst der Knorpel großzellig und hyperplastisch, es beginnt eine Kalkablagerung in der Grundsubstanz, während gleichzeitig die Knorpelzellen zerfallen. Schließlich wird auch der gelegentlich periostal gebildete Knorpel (vgl. Abb. 8 u. 9) in diesen Vorgang mit einbezogen, indem die periostale Knochenbildung einerseits, die Markraumbildung andererseits, die Verknöcherung auch dieser knorpeligen Anteile herbeiführen. Es wird sogar, wie Abb. 10b deutlich veranschaulicht, die Kontinuität der periostal bzw. perichondral entstandenen äußeren Knochenplatten auf kurzer Strecke abgebaut, wobei undifferenziertes gefäßhaltiges Bindegewebe durch die Lücken hineinsprießt und zur Entwicklung des Markraumes beiträgt. Am kranialen Ende des Knorpelrohres ist eine relativ dicke junge Knochen-schicht entwickelt, die sich kranialwärts mit dem neugebildeten spongiösen Knochen verbindet. Überall sind hier reichliche Osteoblasten nachweisbar. Zeichen einer derartigen weiteren Organisation der Amputationsstelle werden bei den Tieren der beiden ersten Gruppen stets vermißt.

Diskussion

Sehr genau durchgeführte frühere Versuche anderer Autoren haben hervorgehoben, daß bei *L. muralis* (Mauereidechse), *L. agilis*, *L. vivipara*, *L. viridis* u. a. der autotomierte Schwanz innerhalb von 2—2½ Monaten fast in seiner ursprünglichen Länge oder nahe daran wiederhergestellt wird. Diese Wiederherstellung ist aber nur äußerlich vollkommen, und es zeigt bereits die röntgenologische Untersuchung, daß am knorpeligen

Skelet des Regenerates äußerst spärliches Knochengewebe, wenn überhaupt, dargestellt werden kann. In dieser Beziehung sind z. B. die Abb. 2 und 4, Tafel 8, der Veröffentlichung von SŁOTOPOŁSKY besonders aufschlußreich. (Eine histologische Kontrolle der Regenerate wurde allerdings von diesem Autor nicht vorgenommen.)

Die vorliegenden Versuche lassen, in Bestätigung der bisher bekannten Befunde, mit aller Deutlichkeit erkennen, daß das rasch entstehende Knorpelrohr des Schwanzregenerates unsegmentiert ist, was im Gegensatz zur äußeren Wirtelbildung steht, und ferner, daß dieses Knorpelgewebe nur sehr langsam, man möchte sagen zaghaft, verknöchert. Freilich muß dazu gesagt werden, daß die Lebensbedingungen in einem Terrarium und dazu noch in einem Laboratorium nicht ideal gewesen sind. Da jedoch alle 3 Tiergruppen gleichartig gehalten wurden, kann man bei der Beurteilung der Ergebnisse den Faktor Umwelt vernachlässigen.

Zwischen der Kontrollgruppe und der mit dem Knochenvollpräparat behandelten sind die Unterschiede sehr deutlich. Wie aus den ausführlichen Beschreibungen und den wiedergegebenen Mikrophotographien hervorgeht, erfolgt bei den behandelten Tieren (Gruppe 3) nicht nur im Periost des alten Knochens sowie im Perichondrium des Knorpelregenerates eine vermehrte Osteoblastentätigkeit und somit eine stärkere Ablagerung von Osteoid, sondern es wird das Knorpelgewebe des Regenerates frühzeitig beeinflusst, indem es bereits nach 8 Wochen eine charakteristische hypertrophische Beschaffenheit annimmt, welche bekanntlich in der Ontogenese den Verknöcherungsvorgang einleitet.

Besonders lehrreich ist die Tatsache, daß Bezirke von hypertrophischem Knorpel nach 8 Wochen nur dort auftreten, wo die periostale Osteoid- bzw. Knochenablagerung vor sich geht, genau wie man es sonst bei der Entwicklung knorpelig vorgebildeter Knochen kennt. Nach allen neueren Untersuchungen handelt es sich um Stellen erhöhter Aktivität der alkalischen Phosphatase². Die großzellige, hypertrophische Beschaffenheit des Knorpels in dieser Vorphase des Ossifikationsprozesses ist eigentlich das morphologische Korrelat einer vermehrten Glycogensynthese. Daß Glycogen im Mechanismus der Kalkablagerung innerhalb der Knorpelgrundsubstanz mit einer Rolle spielt, wurde von HARRIS bereits 1932⁷ vermutet, indem er die Hypothese aufstellte, daß das aus dem Glycogenabbau hervorgehende Hexosephosphat das Substrat der alkalischen Phosphatase sein würde. Die späteren Untersuchungen von GUTMAN und Mitarbeitern⁶ über die Bedeutung der phosphorylierenden Spaltung des Glycogens haben bekanntlich zur Entdeckung der Phosphorylase geführt, und die Hypothese untermauert, daß der erste Schritt im Phänomen der Kalkablagerung durch die Spaltung des Glycogens unter

Wirkung der Phosphorylase dargestellt wird; die entstehenden Hexosephosphatester werden ihrerseits durch die alkalische Phosphatase hydrolysiert, so daß PO_4 -Ionen freigesetzt werden. Einige Forscher haben allerdings diese Erklärung angezweifelt und betrachten das Glycogen lediglich als eine Energiequelle und die Glycogenolyse lediglich als eine Phase des ganzen Prozesses (Einzelheiten s. BOURNE².)

Wie dem auch sei, läßt die vergleichende Betrachtung der vorliegenden Versuche sehr deutlich erkennen, daß der Ossifikationsprozeß durch die Behandlung mit dem Knochenvollpräparat „Ossopan“ noch in einer weiteren Phase gefördert wird, nämlich in Bezug auf die Bildung primärer Markräume. Bereits in der 8. Woche des Versuchs sind derartige Bilder im hypertrophischen Knorpel nachweisbar (Abb. 8), in der 12. Woche sind sie bei allen Tieren ausgesprochen deutlich, während sie bei den Tieren, welche Calciumsalze erhielten, nur angedeutet werden und bei den Kontrollen in der 12. Woche eine Ausnahme darstellen (Abb. 3b). Dieser Befund erweitert frühere Beobachtungen von WEISSHAUPT¹³ an explantierten Hühnerphalangen *in vitro* sowie bis zu einem gewissen Grad die Ergebnisse von BUCHER u. WEIL an Knochenfrakturen von Hühnerembryonen³.

Diesbezüglich ist noch ein Punkt von Interesse: Diese Regenerationsversuche lassen erkennen, daß bei den Lacertiliern eine subperiostale Knorpelbildung vorkommt, welche sowohl durch direkte Metaplasie als auch über den Weg der Markraumbildung in Knochen übergeführt wird. Derartige Befunde habe ich bei der Explantation der Tarsalknochenanlage bei Hühnerembryonen vor langer Zeit erhoben¹⁰; sie sind durch H. B. FELL⁴ seither bestätigt worden.

Über eine wesentliche Frage, nämlich über die Kalkablagerung in der Knorpelgrundsubstanz, können unsere Untersuchungen keinen genaueren Aufschluß geben, weil die Präparate fast vollständig entkalkt werden mußten. Allerdings ist hervorzuheben, daß bei einem Tier, welches mit Knochenvollpräparat behandelt worden ist, am Ende der 12. Woche eine ausgesprochen starke Kalkablagerung darzustellen ist (Abb. 11); sie betrifft nicht nur die proximalen Enden des Knorpelrohres, sondern läßt sich ebenso reichlich distal nachweisen. Im Bereich des kranialen Drittels besteht darüber hinaus eine Vascularisation des Knorpelregenerates vom Periost aus, wobei oft sehr breite Säume jungen Knochengewebes die ins Innere des Knorpels ziehenden Gefäße umschneiden. Eine Abklärung der Verkalkungsfrage soll weiteren Versuchen vorbehalten werden. Es dürfte sehr wahrscheinlich die Kalkablagerung im wesentlichen von der Zeit und von der Ernährung abhängig sein. Bedauerlicherweise haben die bisherigen Untersucher meist nicht angegeben, wie alt die Regenerate waren, wenn sie, wie WOODLAND¹⁵, in einer ausführlichen Darstellung über

die Verhältnisse des Gecko, von einer Kalkablagerung an der Außen- und Innenfläche des Knorpelrohres sprechen (vgl. hierzu auch die älteren Angaben bei FRAISSE).

Ein weiterer Punkt des Regenerationsprozesses ist bis jetzt noch nicht richtig abgeklärt worden: Da die Autotomie immer im Bereich einer von

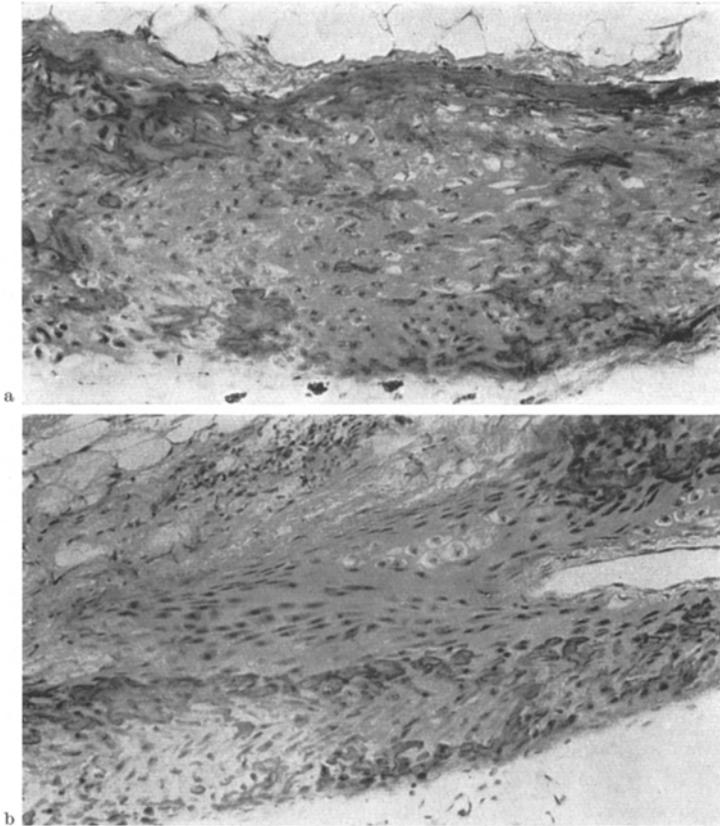


Abb. 11 a u. b. Ossopan, 12. Woche. a Teilstück aus einem distalen Teil des Knorpelrohres mit ausgedehnter Verkalkung in der Knorpelgrundsubstanz. An der äußeren Oberfläche (oben) deutliches verkalktes Osteoid (Vergr. 240 ×). b Ausschnitt aus dem kranialen Drittel des gleichen Regenerats; von rechts nach links zieht ein Blutgefäß durch die Wand des Knorpelrohres, von breiter osteoider Schicht umgeben; man beachte die reichlichen Osteoblasten (z. T. Schrägschnitt) (Vergr. 240 ×)

Knorpelgewebe umsäumten Querspalte im Wirbelkörper erfolgt, kann man sich fragen, ob und in welchem Maße dieses Knorpelgewebe an der Neubildung des regenerierenden Knorpelrohres mitbeteiligt ist, oder ob auch der neugebildete Knorpel aus dem Regenerationsblastem differenziert wird.

Zusammenfassung

An *Lacerta viridis* wurde die Regeneration des Schwanzes 8 und 12 Wochen nach Amputation innerhalb der „natürlichen“ Autotomiezone histologisch untersucht. Die Eidechsen wurden in 3 Gruppen gehalten:

Gruppe I: Kontrollen mit normalem Futter

Gruppe II: zusätzliche Fütterung von Calciumcarbonat (18,5 mg täglich) bzw Calciumlactat (70 mg) und

Gruppe III: zusätzliche Fütterung von Knochenvollpräparat „Ossopan“ (50 mg).

Die vergleichende Prüfung an Sagittalschnitten zeigt, daß unter der Ossopanbehandlung der Verknöcherungsprozeß an der Ansatzstelle zum knorpeligen Skelet des Schwanzregenerates wesentlich gefördert wird. Es entwickelt frühzeitig einen hypertrophischen Knorpel, in welchem bereits nach 8 Wochen eine primäre Markraumbildung entsteht; die Osteoblastentätigkeit wird gefördert, so daß reichliches Osteoid gebildet wird. In einem Fall konnte eine beträchtliche Kalkablagerung im primitiven Knorpel festgehalten werden. Auf grundsätzliche Fragen des Regenerationsvorganges nach Autotomie des Schwanzes bei Lacertiliern wird aufmerksam gemacht.

Literatur

- ¹ BARBER, L. WELLES: Correlations between wound healing and regeneration in fore-limbs and tail of lizards. *Anat. Rec.* **89**, 441—453 (1944). — ² BOURNE, G. H.: Phosphatase and Bone. In: G. H. BOURNE *The biochemistry and physiology of bone*. New York: Academic Press 1956. — ³ BUCHER, O., u. J. TH. WEIL: Der Einfluß von Knochenextrakt (Ossopan) auf die Konsolidation von Frakturen in vitro. *Experientia* (Basel) **7**, 38—40 (1951). — ⁴ FELL, H. B.: Skeletal development in tissue culture. In: G. H. BOURNE *The biochemistry and physiology of bone*. New York: Academic Press 1956. — ⁵ FRATISSE, P.: Die Regeneration von Geweben und Organen bei den Wirbeltieren bzw. Amphibien und Reptilien. Kassel: Fischer 1885. — ⁶ GUTMAN, A. B., and T. F. YU: *Trans. 1st Josiah Macy jr. Conf. on Metabolic Interrelations*. 1949, p. 11. — *Trans. 2nd Josiah Macy jr. Conf. on Metabolic Interrelations*. 1950, p. 167. — *Trans. 3rd Josiah Macy jr. Conf. on Metabolic Interrelations*. 1951, p. 90. — ⁷ HARRIS, H. A.: *Nature* (Lond.) **130**, 996 (1932). — ⁸ MISURI, A.: Ricerche sulla struttura della coda normale e rigenerata nella *Lacerta muralis* Merr. *Boll. Soc. Zool. (Ital.)* **11**, 300—316 (1910). — ⁹ QUATTRENI, D.: a) Piano di autotomia e rigenerazione della coda nei Sauri. *Arch. ital. Anat. Embriol.* **59**, 225—282 (1954). — b) Autotomia e struttura anatomica della coda dei Rettili. *Monit. zool. ital.* **61**, 36—48 (1953). — c) Ricerche sperimentali sulla rigenerazione della coda dei Sauri (Osservazioni in *Lacerta sicula campestris* De Betta e *L. muralis* Brueggemanni Bedr.) *Monit. zool. ital.* **62**, 210—222 (1954). — d) Ricerche anatomiche e sperimentali sull'autotomia della coda delle lucertole. *Arch. zool. ital.* **37**, 465—515 (1952). — ¹⁰ ROULET, F.: Studien über Knorpel- und Knochenbildung in Gewebekulturen. *Arch. exp. Zellforsch.* **17**, 1—42 (1935). — ¹¹ SIBTAIN, S. M.: Studies of the caudal autotomy and regeneration in *Mabuya dissimilis* Hallowell. *Proc. Indian Acad. Sci.* **B 8**, 63—78 (1939). — ¹² SLO-

TOPOLSKY, B.: Beiträge zur Kenntnis der Verstümmelungs- und Regenerationsvorgänge am Lacertilierschwanze. Zool. Jb. Abt. Anat. u. Ontog. **43**, 219—322 (1921). — ¹³ WEISSHAUPT, W.: Versuche über Wachstum und Differenzierung von Hühnchenphalangen in vitro und deren Beeinflussung durch Ossopan. Inaugural Dissertation Zürich 1950. — Vjschr. naturforsch. Ges. **95**, 197—211 (1950). — ¹⁴ WHITE, CH. POWELL: Regeneration of the lizards tail. J. Path. Bact. **28**, 63—68 (1925). — ¹⁵ WOODLAND, W. N. F.: Some observations on caudal autotomy and regeneration in the Gecko (*Hemidactylus flaviviridis* Rüffel) with notes on the tail of *Sphenodon* and *Pygopus*. Quart. J. micr. Sci. **65**, 63—100 (1920).

Professor Dr. FRED. C. ROULET, Robapharm A. G., Basel 6 (Schweiz)