

I. Chirurgische Klinik (*Vorstand: Prof. J. Sebestény*), Exp. Lab. d. II. Chirurgischen Klinik (*Vorstand: Prof. A. Hedri*) und Anatomisches Institut (*Vorstand: Prof. F. Kiss*) der Medizinischen Universität in Budapest

DIE WIRKUNG VON VERFÜTTERTEM KNOCHENPULVER AUF DIE KALLUSBILDUNG BEI VERSUCHSTIEREN*

Sándor Dubecz, György Ludány und Barnabás Somogyi

(Eingegangen am 17. März 1953)

Phosphorsaures Calcium und andere Calciumpräparate werden schon seit langem bei verschiedenen Knochenkrankheiten verabreicht. Wie die Untersuchungen zeigen, werden — per os gegeben — Calcium und Phosphor ihren Verbindungen entsprechend mehr oder weniger gut aus dem Darmkanal resorbiert. Ein Teil davon gelangt garnicht zur Resorption, sondern passiert den Darmkanal [26]. Zwischen den Ca- und P-Ionen besteht innerhalb des Organismus ein physikalisch-chemisches Gleichgewicht, bei dessen Verschiebung es im Ca- und P-Haushalt zu bedeutenden Störungen kommt. Es lässt sich experimentell nachweisen, dass die Zufuhr grosser Ca-Mengen auf die P-Resorption ungünstig wirkt und umgekehrt. Das im Körper zwischen den beiden Ionen bestehende Verhältnis ist von zahlreichen äusseren und inneren Faktoren abhängig (Dosierung, Nahrung, Resorption, pH-Verhältnisse usw.). Anhaltende Verabfolgung von CaCl_2 bewirkt Porosität des Knochensystems; bei intravenöser Verabreichung strömt Phosphor aus den Geweben in das Blut, wodurch auch in den Knochen ein relativer P-Mangel entsteht [19]. Die im Blutserum entstehende Ca-P-Verbindung ist ein nicht diffundierendes, kolloidales, komplexes Ca-Phosphat und in dieser Form verlässt der Kalk den Organismus. Der relative Phosphormangel wirkt auf zahlreiche Prozesse des intermediären Stoffwechsels hemmend [19], so z. B. auch auf die Kalkablagerung in den Knochen. Das gleiche gilt auch für das Mg [21], indem dieses bei dauernder Verabreichung ebenfalls Osteoporose herbeiführen kann.

In Kenntnis dieser Tatsachen fragen wir uns in bezug auf die Therapie mit Recht, ob die heute angewandte Dosierung der Ca-Präparate den physiologischen Anforderungen entspricht (*v. Ries*, 24)? Soviel steht jedenfalls fest, dass eine anhaltende Kalkanhäufung in den Geweben und besonders in den Knochen, nur dann stattfinden kann, wenn dem Organismus gleichzeitig auch Phosphor zugeführt wird.

Auf Grund dieser Erwägungen haben wir Untersuchungen mit einem Präparat aus rohen Knochen junger Tiere (Kalbs-, Ziegen- und Schafsknochen)

* Eine vorläufige Mitteilung erschien in ung. Sprache (*Orv. Hetilap*, 1951, No 27).

durchgeführt. Das Knochenvollpräparat enthält als organotherapeutisches Präparat die organischen und anorganischen Bestandteile der Röhrenknochen; Ca und P sind in physiologischem Verhältnis bzw. physiologischer Bindung in ihm vorhanden. Das Knochenpulver ist demnach als »natürlicher Knochenauszug« theoretisch das physiologischste Ca-P-Präparat.

Ferner ist anzunehmen, dass der pulverisierte, Wärmewirkungen nicht ausgesetzte rohe Knochen ausser Ca und P noch weitere, zum Teil bekannte, zum Teil noch unbekannt biologisch aktive Stoffe enthält, die auf die Neubildung des Knochens einen günstigen Einfluss haben können. Darauf deuten die Untersuchungen von *Levander* [18] hin, dem es als erstem gelungen ist, durch alkoholischen Knochenextrakt in Weichteilen heterotope Knochen- und Knorpelbildung herbeizuführen. Nach seinen neuen Untersuchungen soll der osteogene Stoff lipidartig sein. Diese Beobachtungen wurden von *Annersten* [1], *Bertelsen* [2], *Lacroix* [17] und neustens von *Roth* [25], *Hartley*, *Tanz*, *Schneider* [10] bestätigt. Nach *D'Allemagne* [5] kann jedoch die Frage noch nicht als völlig abgeschlossen betrachtet werden.

Mit den letzteren Untersuchungen ist gleichlaufend das gewebstherapeutische Verfahren von *Filatov* [17] und die gleiche Richtung hat auch die Vorstellung von *Hedri* [11] über ein biologisches Knochen-Klebeprinzip.

Bei der Entwicklung des Kallus ist die örtliche Ablagerung des Ca derart gesteigert, dass der Kalkgehalt, wie dies von *Mereiness* und *Retinski* [23] an Meerschweinchen nachgewiesen wurde, in der Nachbarschaft der Bruchstellen auch in den Geweben erhöht ist.

Unsere Versuche haben wir bei experimentell erzeugten Knochenfrakturen an Ratten und Hunden durchgeführt. Wir sind uns dessen bewusst, dass unsere Tierversuche nicht vollkommen mit menschlichen Bruchheilungen verglichen werden können, doch halten wir einen Vergleich von mehreren Gesichtspunkten aus für lehrreich und dazu geeignet, daraus gewisse Folgerungen zu ziehen. Serienuntersuchungen, gewissen Anforderungen entsprechende Tierversuche (einheitliches Versuchsmaterial, Ernährung, Pflege, Fixation usw.) und insbesondere die Möglichkeit der histologischen Untersuchung gewähren einen tieferen Einblick in den Prozess der Kallusbildung, als die klinische Beobachtung.

Die Versuche wurden an 40 Ratten und 8 Hunden in den Wintermonaten 1949—50 durchgeführt. Die Ratten entstammten der gleichen Zucht, waren gleichaltrig und wogen 150—200 g, die Hunde waren Geschwisterpaare, 1 Jahr alt und wogen 4—6 kg. Die Ernährung der Tiere wurde sorgfältig überwacht. Sie erhielten gemischtes, d. h. vegetarisches und animalisches Futter, bestehend aus ausgesuchten Speiseabfällen der Klinik, Fleisch, festeren Gemüseteilen, Brot, mit Käserinde und Hafer ergänzt. Die Kost der Ratten enthielt, auf 40 Kalorien berechnet, durchschnittlich 27 mg Ca, wodurch der Bedarf, mit der üblichen halbsynthetischen Diät verglichen, reichlich gesichert war.

Durch Ergänzung der Diät mit »Ossopan« Knochenpulver (0.05 g), das die Tiere in Brotkugelchen geknetet vor der Fütterung bekamen, erhielten sie täglich im Durchschnitt weitere cca. 20 mg Ca. Die Eiweissversorgung bewegte sich gegenüber dem Bedarf von 1,8 g zwischen 2,7—3,9 g. Die Versorgung war demnach sowohl quantitativ als auch qualitativ tadellos. Die Kost der Hunde war von ähnlicher Zusammensetzung, nur erhielten sie verhältnismässig mehr Fleisch. Da ihr relativer (pro Kalorie) Bedarf an Eiweiss und Ca geringer ist, als der der Ratten, wurde die Menge dieser Stoffe entsprechend, auch hier den Bedarf überschreitend, bemessen. Die Hunde bekamen 1,0 g Ossopan zu ihrer Tränke beigemischt. Der P-Gehalt der Nahrung war gleichfalls tadellos. Die Ratten nahmen täglich cca. 50 mg P zu sich; auch das Mengenverhältnis von Ca und P, war demnach das erwünschte (1:2). Mit der »Ossopan«-Verabreichung erhöhte sich die P-Darreichung täglich um 10 mg. Bei den Hunden gestalteten sich die Verhältnisse ähnlich.

Den Tieren wurde in Äthernarkose eines der Hinterbeine (Tibia und Fibula) gebrochen und dann die Bruchenden in einem, das Becken und das ganze Glied umfassenden Gipsverband fixiert. Die Gipsbandage wurde von den Tieren gut vertragen und als Schutz gegen Abnagen umgaben wir den Verband mit einem Drahtnetz.

Die Versuchstiere teilten wir in zwei gleiche Gruppen. Die eine erhielt bei der gleichen Kost auch Knochenpulver. Jede sonstige Behandlung wurde unterlassen. Von den Ratten beider Gruppen wurden 8 Wochen hindurch wöchentlich 2—3 Tiere getötet. Von den Frakturen wurden Rtg-Aufnahmen angefertigt und dann die Extremitäten histologisch untersucht. Die Hunde wurden ähnlicherweise in zwei, aus je vier Tieren bestehenden Gruppen untersucht. Je 1 Tier wurde am 17. Tag, je 2 am 31. und wieder je 1 Tier am 38. Tag vorgenommen. Natürlich wurden auch hier Rtg-Aufnahmen und histologische Untersuchungen gemacht.

Für die histologische Untersuchungen wurde das Material mit Salpetersäure entkalkt und in Paraffin-Zelloidin eingebettet. Bei der Färbung bedienten wir uns zum Teil des Löffler'schen Verfahrens (Hämatoxylin und Eosin), zum Teil der Apáthy'schen Pikrofuchsin-Methode.

Nach 1 Woche zeigten die Rtg-Aufnahmen keinen bedeutenden Unterschied. Im histologischen Schnitt sah man bei den behandelten Tieren in der Umgebung der Bruchenden und zwischen den Muskelfasern Blutergüsse, näher an den Knochen zeichneten sich Konturen neuer Bindegewebsfasern ab und neben dem Knochen waren in der Bindegewebsstruktur bereits Knorpelzellen zu sehen. Das Periost nimmt an der Neubildung des Knochens auffallend teil. (I. Woche Abb. a.) Im Kontrollpräparat sind die Bruchenden scharfkantig, zwischen den auseinandergeschobenen Muskelfasern nimmt langsam wucherndes Bindegewebe Platz. Man sieht auch entwickelte Knorpelzellen, die durch dichte Bindegewebsfasern voneinander getrennt sind; die Knochenhaut ist stellen-

weise verdickt, ist aber an der Knochenneubildung nicht beteiligt (I. Woche, Abb. b).

In der 2. Woche lässt sich auf den Rtg.-Aufnahmen der mit Knochenpulver behandelten Tiere zwischen den Bruchenden des Schienbeins eine ausdrückliche Kallusbildung wahrnehmen, während eine solche beim Kontrolltiere fehlt (2. Woche, Rtgbild a-b). Im histologischen Schnitt der behandelten Tiere (2. Woche, Abb. a) ist kein Bluterguss zu sehen, das neugebildete ausgebreitete Bindegewebe ist von zahlreichen Kapillaren durchsetzt. An den Bruchenden und neben der Knochenhaut sieht man in der Umgebung einzelner Gewebsfasern, mesenchymale Knocheninseln bildend, in ovalen Gruppen angeordnet, Osteoblasten. In diesem Falle also handelt es sich nicht um chondrogenen, sondern um Bindegewebskallus. Aus der Rtg.-Aufnahme schliessen wir, dass hier eine Zugkraft eingewirkt haben muss, die bindegewebige Verknöcherung auslöst (*Krompecher*¹³). Im Kontrollpräparat sind die Bruchenden durch ein dichtes Geflecht von Bindegewebsfasern verbunden, Knorpelzellen lassen sich in geringer Zahl und in dünner Schicht nur neben der Knochenhaut sehen; in der Markhöhle der Bruchenden sieht man einige junge Osteoblasten.

In der 3. Woche zeigt die Rtg.-Aufnahme zwischen den Bruchenden des dislozierten Schienbeins eine — im Verhältnis zu der vorher beobachteten — stärkere Kallusbildung; auf der Rtg.-Aufnahme des Kontrolltieres ist kein Kallus zu sehen (III. Woche, Abb. a-b). Im histologischen Schnitt des behandelten Tieres ist zwischen den beiden Bruchenden bereits das Knochengebälk im Entstehen begriffen. Im Kontrollschnitt ist um die Bruchenden herum, bei weniger Knochengewebe, die Bindegewebsvermehrung vorherrschend. Neben der Knochenhaut lassen sich Knorpelinseln beobachten.

In der 4. Woche sieht man auf der Rtg.-Aufnahme beim behandelten Tier zwischen den Bruchenden eine starke, beim Kontrolltier eine geringgradige Kallusbildung (IV. Woche, Abb. a-b). In den histologischen Schnitten sind die Bruchenden bereits nicht mehr scharfkantig und man kann von ihnen ausgehende Knochenbalken sehen (IV. Woche, Abb. a.) Im Kontrollpräparat färben sich die Knochenbalken noch blass (IV. Woche, Abb. b).

In der 5. Woche gibt der Kallus beim behandelten Tier einen dichteren Schatten, als beim Kontrolltier (V. Woche, Abb. a-b).

In der 6—8. Woche war bei den behandelten Tieren um die Bruchenden herum oft Callus luxurians zu beobachten, jedoch war auch bei den Kontrolltieren die Kallusbildung ziemlich stark. Histologisch zeigt die Fraktur in der 5.—8. Woche bei den behandelten und bei den unbehandelten Tieren ein im wesentlichen gleiches Bild, das jedenfalls in mancher Beziehung zugunsten der mit Knochenpulverpräparat behandelten Tiere verschoben ist, indem es im allgemeinen reicher an Knochengewebe ist, während im Kontrollpräparat der Knorpel überwiegt. Zufolge des darauf gelagerten dichten Knochengewebes ist es oft überhaupt nicht möglich, die Bruchenden abzugrenzen.

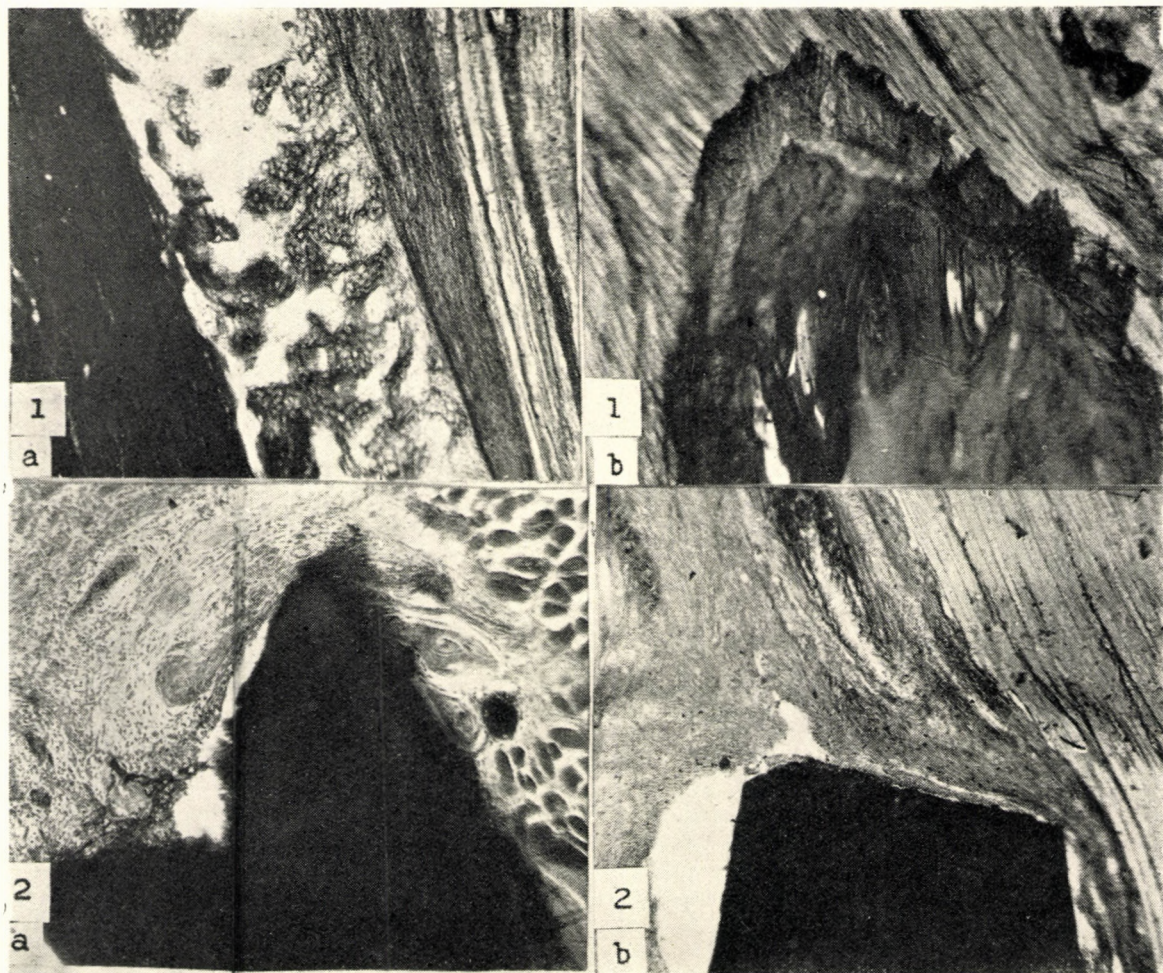


Abb. 1. Erste Woche. a) mit Knochenpulver ernährtes Tier, b) Kontrolltier, Abb. 2. Zweite Woche,

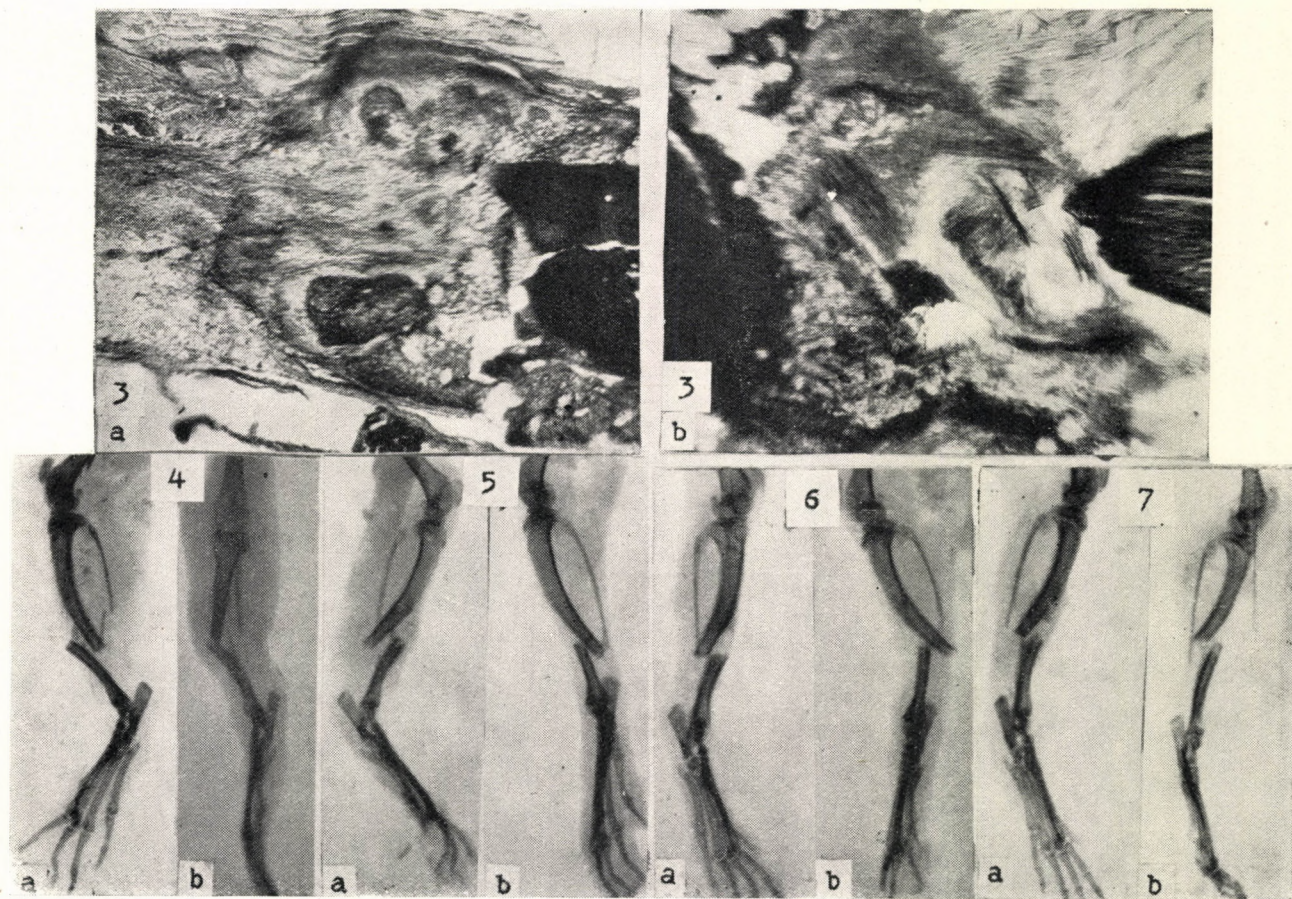


Abb. 3. Vierte Woche. a) mit Knochenpulver ernährtes Tier, b) Kontrolltier. Röntgenbilder :
 Abb. 4. Zweite Woche. a) mit Knochenpulver ernährtes Tier, b) Kontrolltier. Abb. 5.
 Dritte Woche. Abb. 6. Vierte Woche. Abb. 7. Fünfte Woche.

In den *Hundeversuchen* war am 17. Tag bei den mit Knochenpulver behandelten Tieren auf der Rtg.-Aufnahme eine mittelmässige Kallusbildung zu sehen, bei den Kontrolltieren wurde diese in geringerem Grade vorgefunden. Bis zum 31. Tag entwickelte sich bei sämtlichen Tieren ohne wesentlichen Unterschied ein mittelmässiger Kallus. Nach 38 Tagen war in beiden Tiergruppen eine mit gutem Kallus heilende Fraktur zu beobachten; bei dem mit Knochenpulver behandelten Tier war die Bruchlinie verschwunden. Histologisch liess sich zwischen den beiden kein wesentlicher Unterschied nachweisen; am 17. Tag ist bereits der neugebildete Kallus im Übergewicht, ein grosses Gebiet nehmen jedoch die Knorpelinseln und die Bindegewebsfaserbündel ein, deren Menge später allmählich zurückgeht.

Unsere Resultate lassen feststellen, dass die Neubildung des Knochens nach experimentell hervorgerufenem Knochenbruch bei den mit pulverisiertem rohem Knochen gefütterten Tieren bereits nach einer Woche weiter vorgeschritten ist. Bei den mit dem Knochenpulver gefütterten Tieren ist die Kallusbildung zwischen den Bruchenden in der 2. Woche bereits auch auf der Röntgenaufnahme sichtbar, was bei den Kontrolltieren erst zwei Wochen später erfolgte. Von der 5. Woche an jedoch besteht schon kein wesentlicher Unterschied, wenn auch die Kallusbildung bei den mit Knochenpulver behandelten Tieren deutlicher ist. Die behandelten Tiere werden von den Kontrolltieren eingeholt. Zu dem gleichen Ergebnis führten auch unsere *Hundeversuche*: am 17. Tag zeigen die Röntgenaufnahmen einen wesentlichen Unterschied zugunsten der mit der Knochenpulver behandelten Tiere. Auch hier erfolgt jedoch ein Ausgleich und nach 31 Tagen ist kein Unterschied zu beobachten.

Nach Abschluss und nach erfolgter vorläufiger Mitteilung unserer Experimente erhielten wir Kenntnis davon, dass *Küng* [15] im Laboratorium »Robapharm« analoge Ergebnisse bei Ratten erzielt hatte. Desgleichen wurden unsere Forschungen neuerdings von *Frank und Heppner* [8] auch beim Menschen bekräftigt. Im übrigen bewirkt das oben beschriebene Knochenpulver auch im Gewebsexplantat eine kräftige Beförderung der Knochenbildung (27, 28).

Zusammenfassung

Per os verabreichter pulverisierter Knochen junger Tiere (»Ossopan«) wirkt bei Ratten und Hunden anregend auf die Kallusbildung. Die erste Hälfte der für die Kallusbildung erforderlichen Zeit wird abgekürzt; die Ablagerung des Kalkes im osteoiden Gewebe wird beschleunigt. Unsere hier festgelegten Ergebnisse sind durch röntgenologische und histologische Befunde belegt.

LITERATUR

1. *Annersten, S.*: (1940) Acta chir. scand. **84**, Suppl. 60.
2. *Bertelsen, A.*: (1944) Acta orthop. scand. **15**, 139.
3. *Bier, A.*: (1923) Arch. f. klin. Chirurg, **127**, 10.
4. *Block, W.*: (1940) Die normale und gestörte Knochenbildung.
5. *D'Allemagne, M. J.*: (1951) Physiologie, **43**, 425.
6. *Fabrikant, M. B. u. Hartschnekov, N. S.*: (1950) Klinitscheskaja Med. Nr. 3. (Russ.)

7. *Filatov, V. P.* : (1950) *Klinitscheskaja Med.* Nr. 1. (Russ.)
8. *Frank, M. u. Heppner, Fr.* : (1953) *Dtsche Z. Chir.* **274**, 159.
9. *Gotti, D. u. Nicolai, P.* : (1948) *La clinica pediatrica* Nr. 3.
10. *Hartley, J., Tanz, S. S. u. Schneider, M. J.* : (1949) *Mont Sinai Hosp.* **15**, 383.
11. *Hedri, A.* : (1930) *Arch. f. klin. Chir. Verh. d. deutschen Ges. f. Chir.*
12. *Kopits, J.* : (1942) *Orthopaedia.* Budapest. (Ung.)
13. *Krompecher, J.* : (1943) *Izületképzés.* Kolozsvár. (Ung.)
14. *Kubányi, E.* : (1930) *Arch. f. klin. Chir.* **158**, 203.
15. *Küng, H. L.* : (1948) *Annales Pediatrici.* **176**, 6, 289.
16. *Küng, H. L.* : (1950) *Acta chir. Helv.* **18**, 64.
17. *Lacroix, P.* : (1946) *Arch. Biol.* **57**, 99.
18. *Levander, G.* : (1934) *Zbl. Chir.* 409 usw.
19. *Ludány, Gy., Sütő-Nagy, Gy. u. Cservény, J.* : (1944) *Magy. Orv. Arch.* **45**, 97. (Ung.)
20. *Ludány, G. u. Kenessey, I.* : (1940) *Z. f. ges. exp. Med.* **108**, 231; (1952) *Arch. int Pharmacodyn.* **89**, 48.
21. *Ludány, G. u. Sütő-Nagy, Gy.* : (1940) *Magy. Orv. Arch.* **41**, Nr. 5. (Ung.)
22. *Martin, B.* : *Arch. f. klin. Chir.* 113.
23. *Mereines u. Retinski* : (1940) *Vestn. Chirurg.* **59**, 279. (Russ.)
24. *v. Ries, J.* : (1945) *Schweiz. Med. Wschr.* **75**, 10, 217.
25. *Roth, H.* : (1950) *Schweiz. Med. Wschr.* **80**, 1051.
26. *Verzár, F.* : (1936) *Absorption from the intestine.* Longmans, London.
27. *Bucher, O.* : (1951) *Experientia.* **7**, 38: 1952. *Acta Anatomica* **14**, 98
28. *Weil, J.-Th* (1951) *Schweiz. Z. f. allg. Path. u. Bakt.* **14**, 205.

О ДЕЙСТВИИ КОРМЛЕНИЯ КОСТНОГО ПОРОШКА НА ОБРАЗОВАНИЕ КОСТНОГО РУБЦА У ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ш. Дубец, Дь. Лудань и Б. Шомодь

Резюме

Подача порошка, приготовленного из сырых костей молодых животных («Оссопан») через рот у крыс и собак усиливает образование костного рубца. Первая половина времени образования костного рубца становится более короткой а в то же время отложение извести в остеоидную ткань ускоряется.

К такимже результатам ведет рентгеновское и гистологическое исследование. Основное питание подопытных животных состояло из растительных продуктов а также из продуктов животного происхождения. Питание являлось богатым белком и известью. Экспериментальный перелом костей автор проводил под эфирным наркозом на задней конечности. Переломанные конечности зафиксировались гипсовой повязкой.