

Zeitschrift: Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft.
Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Annuaire de la Société
Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative

Band: 160 (1980)

Artikel: Die Fluorochromierung von Knochenanbau und -zirkulation

Autor: Rahn, Berton A.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-90803>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 19.10.2024

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

Die Fluorochromierung von Knochenanbau und -zirkulation

Berton A. Rahn

Knochenchirurgische Implantate verändern die Zirkulation im Knochen und bewirken inneren Umbau. Zur Analyse der Zusammenhänge müssen diese vitalen Vorgänge sichtbar gemacht werden. Es sind Färbetechniken entwickelt worden, welche erlauben, am lebenden Organismus Skelettveränderungen in ihrem zeitlichen Ablauf zu verfolgen oder Zonen gestörter Zirkulation abzugrenzen.

Von Vitalfärbetechniken wird gefordert, dass sie eine selektive Darstellung der interessierenden Strukturen gestatten. Erwünscht ist ein möglichst grosser Kontrast zwischen den angefärbten Geweben und ihrer Umgebung. Dabei sollten die untersuchten biologischen Vorgänge nicht merklich gestört werden. Es ist möglich, bestimmte Gewebsstrukturen durch Fluorochrome (fluoreszierende Substanzen) zu markieren. Die fluorochromierten Gewebsanteile leuchten vor einem dunklen Untergrund und können durch den guten Kontrast leichter erkannt werden. Damit genügen niedrigere Dosierungen der entsprechenden Farbstoffe, was auch eine geringere Toxizität bedeutet.

Darstellung der Knochenzirkulation

Die Knochendurchblutung kann durch Injektion von Tusche (Trueta und Cavadias, 1955), feindispersen Bariumsulfat (Rhinelander und Baragry, 1962) oder Kunststoff dargestellt werden. Die Untersuchung geschieht im histologischen Schnitt, im Röntgenbild oder der Mikroradiographie, am transparent gemachten Präparat oder nach Auflösen der Gefässumgebung. Lichtmikroskopische Techniken sowie das Rasterelektronenmikroskop (Draenert und Draenert, 1980) werden zur Darstellung der Gefässmorphologie verwendet. Alle diese Techniken der Gefässdarstellung bedingen einen Ein-

griff in die afferente Gefässbahn. Die Füllung der Gefässlumina geschieht passiv, meist mit statischem Druck in der Grössenordnung des systolischen Blutdruckes. Die Füllsubstanzen weisen nicht die gleichen rheologischen Eigenschaften auf wie das Blut, und zudem können die Partikel auch aggregieren. Es ist deshalb nicht immer mit absoluter Sicherheit gewährleistet, dass die physiologischen Verhältnisse korrekt wiedergegeben werden. Vitalfärbungen gelangen auch klinisch zur Anwendung, z. B. zur Abgrenzung von Verbrennungsnekrosen (Burri et al., 1965). Am Skelett wurden Sequester bei Knocheninfektionen mit Disulfidblau dargestellt. (Jenny et al., 1977). Für die experimentelle Knochenforschung wurde die Disulfidblau-Technik modifiziert (Gunst et al., 1979).

Mit Hilfe von Vitalfärbungen des Knochens konnten einige praktische Aspekte der Durchblutung im Zusammenhang mit der Osteosynthese dargestellt werden.

Unmittelbar nach einer Fraktur sind die intrakortikalen Gefässe an den Fragmentenden unterbrochen. Wenige Stunden nach dem Trauma hat sich die Zone, in der keine Zirkulation mehr stattfindet, auf mehrere Millimeter, von den Fragmentenden gemessen, ausgedehnt. Dies kann selbst dann beobachtet werden, wenn die Hauptgefässe in der Umgebung noch intakt geblieben sind. Der hauptsächlichste Blutzustrom zu den Röhrenknochen geschieht durch die Arteriae nutriticiae. Diese dringen durch die Kortikalis in den Markraum ein und verteilen sich dort auf die ganze innere Knochenoberfläche. Allgemein wird angenommen, dass von den Markraumgefässen aus ungefähr die inneren zwei Drittel der Kortikalis ernährt werden, während das äussere Drittel vom Periost aus durchblutet wird. Neuere Untersuchungen mit Vitalfarbstoffen (Gunst et al., 1979, Pfister et al., 1980) am Schaf und Kaninchen



Abb. 1. Vitalfärbung der Gefässräume im Knochen. Bereits 30 Sekunden nach intravenöser Verabreichung lässt sich der Fluoreszenzfarbstoff in Knochenproben nachweisen. Die Übersichtsaufnahme zeigt weiss eine funktionierende Durchblutung der Markhöhle, in den umgebenden Weichteilen und in den intrakortikalen Gefässen.

haben aber gezeigt, dass sowohl periostales wie endostales Versorgungssystem bis zu einem gewissen Grade Zirkulationsausfälle im anderen System kompensieren können. Dabei kann das endostale System bei einem Ausfall des periostalen Systems noch über 90% der Kortikalsdicke ernähren. Nach einem Ausfall des endostalen Systems wird vom periostalen System her noch bis zur Hälfte der Kortikalsdicke versorgt.

Eine Operation einer Fraktur bewirkt eine zusätzliche Störung der Zirkulation. Durch den operativen Zugang werden zum Teil Weichteilgefässe unterbrochen, zum Teil werden diese Teile auch vom Knochen abgelöst. Durch eine postoperative Schwellung (Oedem, Haematom) kann es im verletzten Gebiet zu einer Stase kommen. Je nach der Operationsmethode kommen noch unterschiedliche Operationsschäden dazu. Nur ein geringes Trauma ist beim Gebrauch eines fixateur externe zu erwarten. Die Weichteilschäden bleiben dabei minimal, und im Knochen ist die Zirkulation nur gerade um die Bohrlöcher gestört. Diese Technik wird vor allem dann angewendet, wenn die Weichteile im Frakturbereich durch das Unfallgeschehen schon stark geschädigt sind.

Reine Verschraubungen von Schaftbrüchen sind aus Stabilitätsgründen nur noch sehr selten in Gebrauch, im epiphysären und metaphysären Bereich ist dies jedoch eine übli-

che Technik. Der Gewebsschaden durch eine Verschraubung ist auf das lokale Trauma direkt um die Bohrlöcher (Abb. 3) und auf das Freilegen des Operationsgebietes beschränkt.

Die durch den Bohrvorgang traumatisierte Zone ist deutlich kleiner, wenn mit gut geschärftem Bohrer gearbeitet wird (Schmelzeisen pers. Mitt.).

Unter Osteosyntheseplatten sind, wie mit Hilfe von Vialfärbungen nachgewiesen wurde (Gunst et al., 1979), ausgedehntere Störungen zu erwarten. Die nicht durchblutete Zone weist ungefähr das Ausmass der Platte auf, geht aber über die direkte Kontaktzone zwischen Platte und Knochen hinaus (Lüthi et al., 1980). Es dürfte sich hier also nicht um eine direkte Druckwirkung auf die im Knochen gut geschützten Gefässe handeln. Die Tiefenausdehnung der gestörten Zone umfasst beim Schaf und beim Hund ungefähr einen Drittel bis eine Hälfte der Kortikalsdicke, beim Kaninchen oft die ganze Kortikalis.

Das Ausbohren der Markhöhle und das Einbringen eines Marknagels unterbrechen die medulläre Versorgung. Die periostale Zirkulation kann die Durchblutung bis ungefähr zur Mitte der Kortikalis und zum Teil auch darüber hinaus gewährleisten, es bleibt aber ein markhöhlennahes Kortikalisrohr ohne Zirkulation.

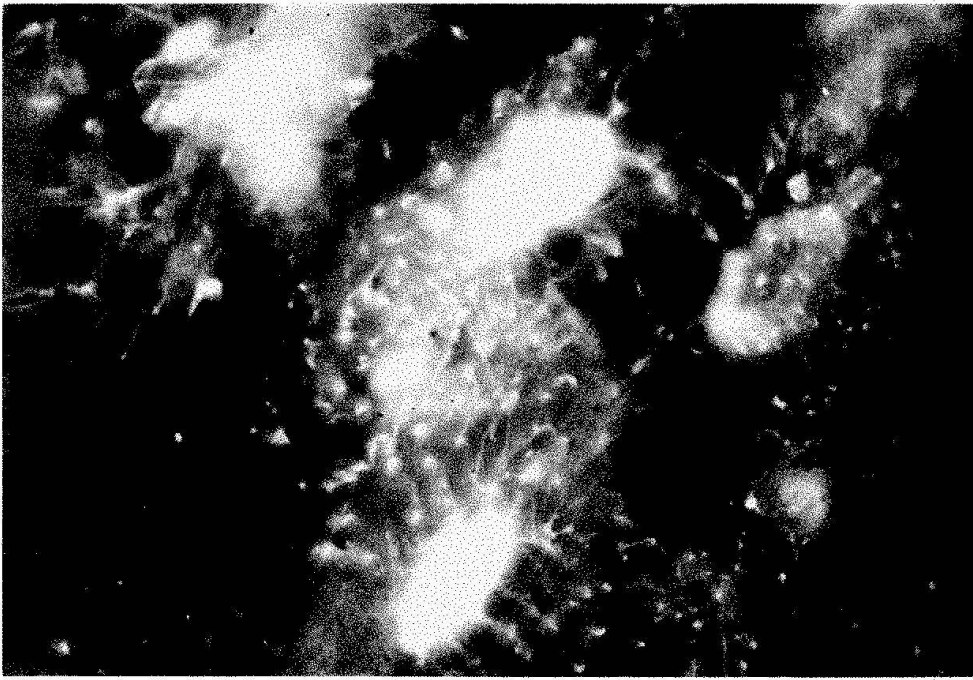


Abb. 2. Vitalfärbung der Knochenzellen. Der intravenös verabreichte Fluoreszenzfarbstoff lässt sich auch in den einzelnen Osteozyten und in deren Fortsätzen nachweisen.

Die Erholung von grösseren zirkulationsgestörten Arealen geht mit Knochenumbau (Havers'scher Umbau) einher. Dieser Umbau beginnt in der dritten bis vierten Woche an den Grenzen zwischen durchbluteter und nicht durchbluteter Kortikalis. Die Revaskularisierung geht so vor sich, dass die bestehenden Gefässräume rekanalisiert und wieder mit der Zirkulation verbunden werden. Darauf wird der Knochen um diese Gefässräume lokal resorbiert, um in der Folge durch neuen Knochen ersetzt zu werden. Dieser schrittweise Ersatz des Knochens im gestörten Gebiet geschieht prinzipiell nach dem gleichen Mechanismus, ob der Gefässschaden durch eine Platte (Gunst et al., 1979) oder durch einen Marknagel (Pfister et al., 1979) verursacht worden ist. Bei der Plattenversorgung, wo das Trauma auf der periostalen Seite ansetzt, geschieht dieser Ersatz zentrifugal, während beim Marknagel mit zentraler Störung der Knochenumbau zentripetal erfolgt (Pfister et al., 1979). An der Kaninchentibia ist der Schaden nach zwei bis drei Monaten behoben, beim Schaf dauert dies etwa vier bis sechs Monate. Eine Biopsie von einem Patienten nach Plattenfixation einer Tibiafraktur hat gezeigt, dass nach einem Jahr erst etwa zwei Drittel des Knochens umgebaut sind. Eine Wartezeit von eineinhalb bis zwei Jahren bis zur Plattenentfernung, wie es klinisch an der Tibia gehandhabt wird, scheint im Hinblick auf

Knochendurchblutung und -umbau adäquat zu sein. Inzwischen gelang es, die Auflösung zwischen durchbluteten und nicht durchbluteten Strukturen bis auf das Niveau der Havers'schen Kanäle zu bringen. Unter optimalen Bedingungen lassen sich sogar einzelne blaugefärbte Osteozyten darstellen. Die Anfärbung der Osteozyten ist aber wegen des geringen Kontrastes zur Umgebung nicht immer zuverlässig erkennbar. Fluorescein-Na (Siegfried, Zofingen) in Phosphatpuffer gelöst (10 g/100 ml) wurde den Versuchstieren intravenös verabreicht. Die danach entnommenen Knochenproben zeigen im Fluoreszenz-Mikroskop (Blauanregung, gelber Sperrfilter) eine deutliche grüngelbe Fluoreszenz vor dunklem Hintergrund. Bei schwacher Vergrößerung ist diese Fluoreszenz in den umgebenden Weichteilen und innerhalb der Havers'schen Kanäle sichtbar (Abb. 1). Bei stärkerer Vergrößerung sind die einzelnen Osteozyten und sogar die Osteozytenfortsätze, die sogenannten Canaliculi, deutlich von der Umgebung abgrenzbar (Abb. 2). Der Farbstoff ist bereits 30 Sekunden nach der Injektion in den Zellen anzutreffen. Nach einem Gewebstrauma, wie z. B. einer Fraktur oder Implantation einer Knochenschraube, sind deutlich Zonen sichtbar, in denen das Fluorochrom fehlt (Abb. 3). Die Moleküle der verwendeten Markiersubstanz weisen ein ungefähr doppelt so grosses Molekulargewicht wie ein Glukosemolekül auf. Es ist des-



Abb. 3. Durchblutungsstörung im Knochen. Das Bohren und Gewindeführen im Knochen hat die Zirkulation in den benachbarten Gefässen unterbrochen. Das Ausmass der Störung wird durch die Abwesenheit des Vitalfarbstoffs sichtbar gemacht.

halb anzunehmen, dass diese Substanz über die Durchströmung in den Gefässen hinaus auch die Versorgung des Gewebes widerspiegelt (perikapilläre Zirkulation). Mit dieser Intravitalfärbung steht uns daher eine empfindliche und fein auflösende Technik zur Abklärung der Zirkulationsstörung im Knochen zur Verfügung.

Markierung des Gewebsminerals

Bereits im 18. Jahrhundert wurde zur Darstellung des Knochenanbaus Färberröte (*rubia tinctorum*) an Versuchstiere verfüttert (Belchier, 1736). Die Verwendung von Färberröte und später des daraus isolierten Farbstoffes Alizarin wurde vor allem im

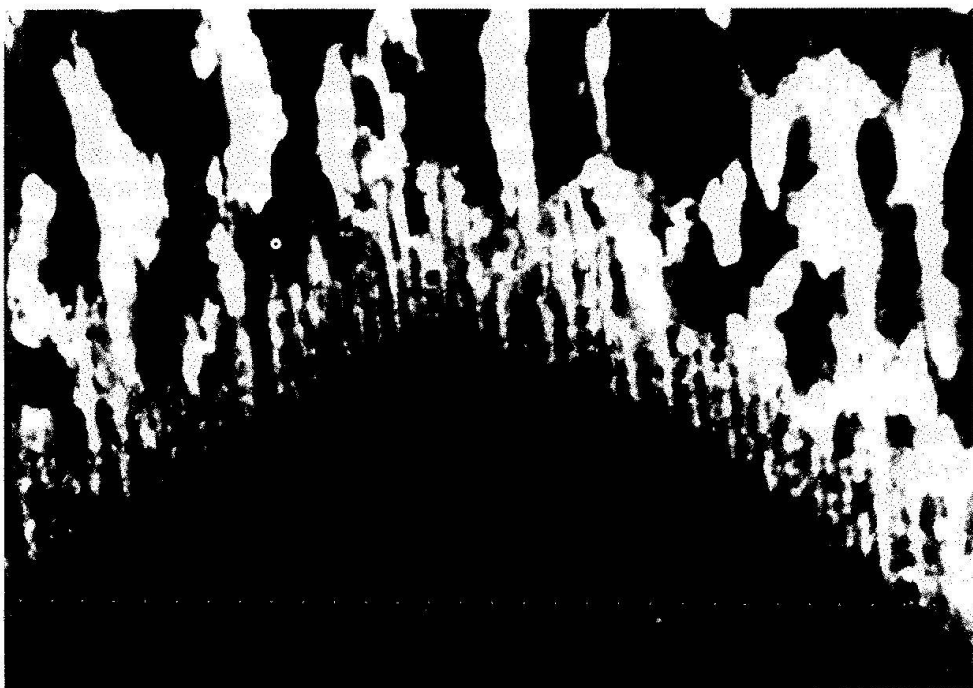


Abb. 4. Knochenbildung im Bereich der Wachstumsfuge. Die Markiersubstanz wurde dort eingelagert, wo Mineralisationsvorgänge stattfinden. Als charakteristisch für die chondrale Ossifikation ist die Verkalkung der Knorpelgrundsubstanz (fein gestreifte Zone) zwischen den Säulen der Knorpelzellen anzusehen.

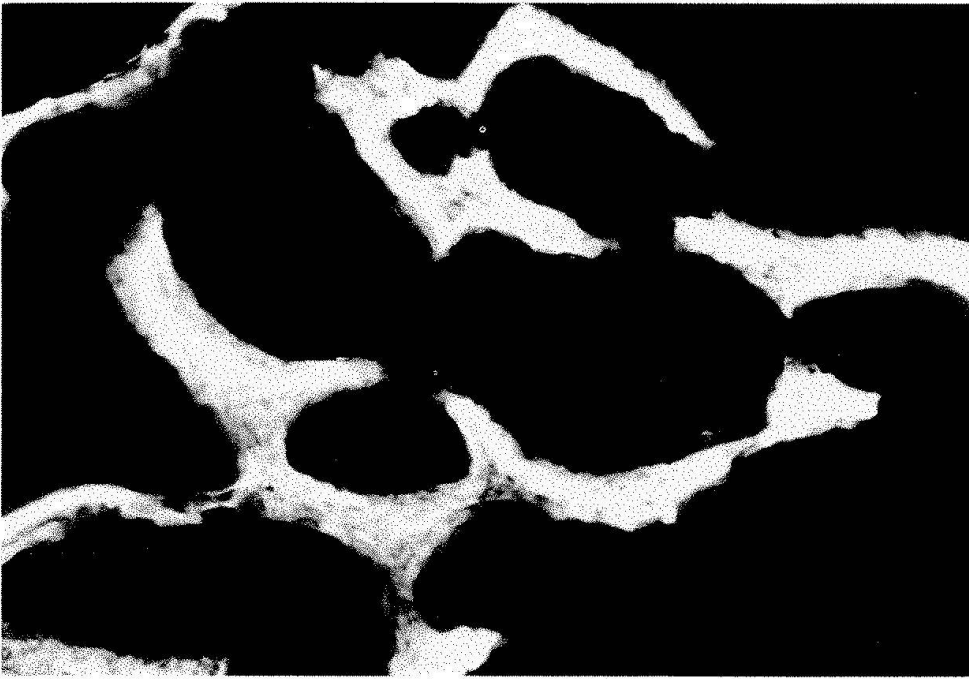


Abb. 5. Bildung von Faserknochen. Bei der Faserknochenbildung verkalken gleichzeitig relativ grosse Areale, sodass die gleiche Markiersubstanz über Distanzen von 0,5 mm und mehr nachweisbar ist.

19. Jahrhundert zu einer Standardtechnik in der Knochenforschung. Bedenken wegen der Hemmung von Knochenbildung und Mineralisation (Harris, 1964) haben das Alizarin etwas verdrängt. Tetracyclin-Antibiotika bilden mit Apatit Chelatkomplexe. Diese lassen sich durch ihre gelbe Fluoreszenz sichtbar machen und neugebildeter Knochen kann markiert werden (Milch et al., 1957). Die se-

quentielle Verabreichung von mehreren Marken erlaubt ein besseres Erfassen der zeitabhängigen Dynamik. Im Verlaufe der Zeit sind weitere Farbstoffe dazugekommen, so dass die Zeitmarken durch ihren Farbton unterscheidbar werden. Neben den Tetracyclinen haben sich die Substanzen Calcein (grün, Suzuki und Mathews, 1966), Calceinblau (Rahn und Perren, 1970), Xylenolorange

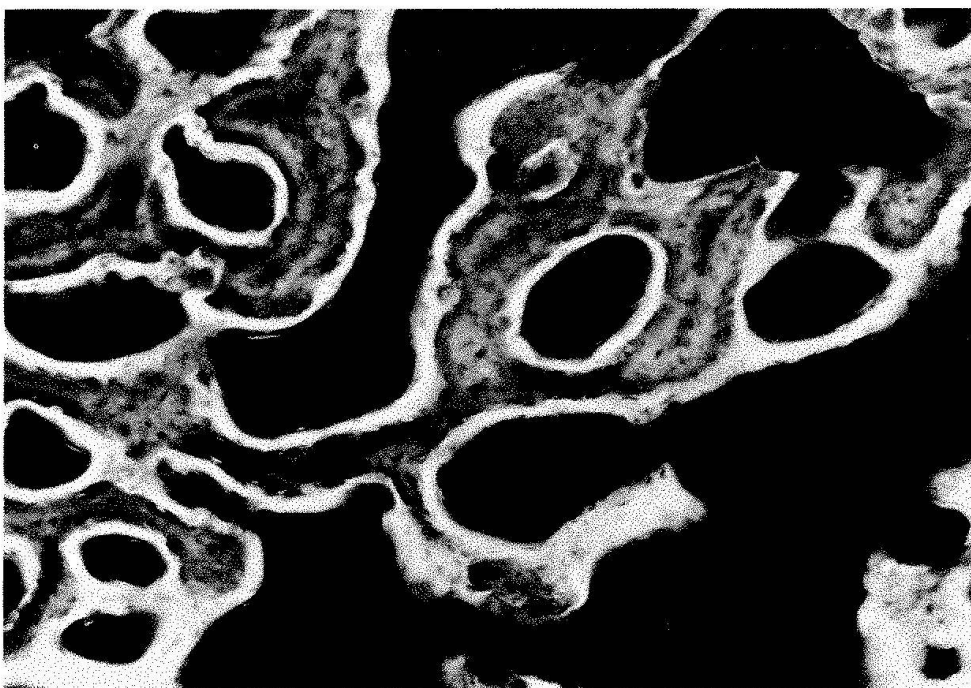


Abb. 6. Bildung von lamellärem Knochen. Lamellärer Knochen bildet sich in einer Geschwindigkeit von 1-2 Mikrometern pro Tag. Er wird praktisch immer aufgelagert auf eine bereits mineralisierte Struktur, in diesem Falle auf vorher gebildeten Faserknochen.



Abb. 7. Verschiebung von Knochenstrukturen. Während des Wachstums verschieben sich Knochenstrukturen durch Resorption auf der einen, Anbau auf der anderen Seite. Gefässräume machen diese Verschiebung mit, was aus der einseitigen Knochenbildung im Knocheninnern ersichtlich wird.

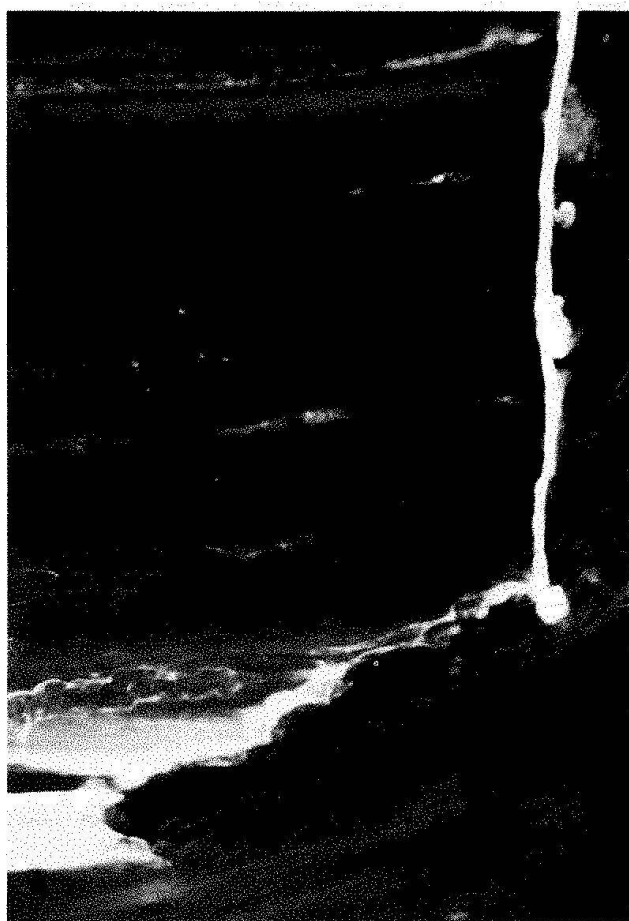


Abb. 8. Markiersubstanzen an freigelegten Oberflächen. Sägeschnitte (helle Linie oben rechts), mechanische Zerkümmern (helle Fläche unten links) und Knochenresorption (gezackte Linien unten links) können Bindungsmöglichkeiten für die Markiersubstanzen freilegen. Ihre spezielle Form und Lokalisation lässt diese Stellen sich vom Knochenanbau unterscheiden.

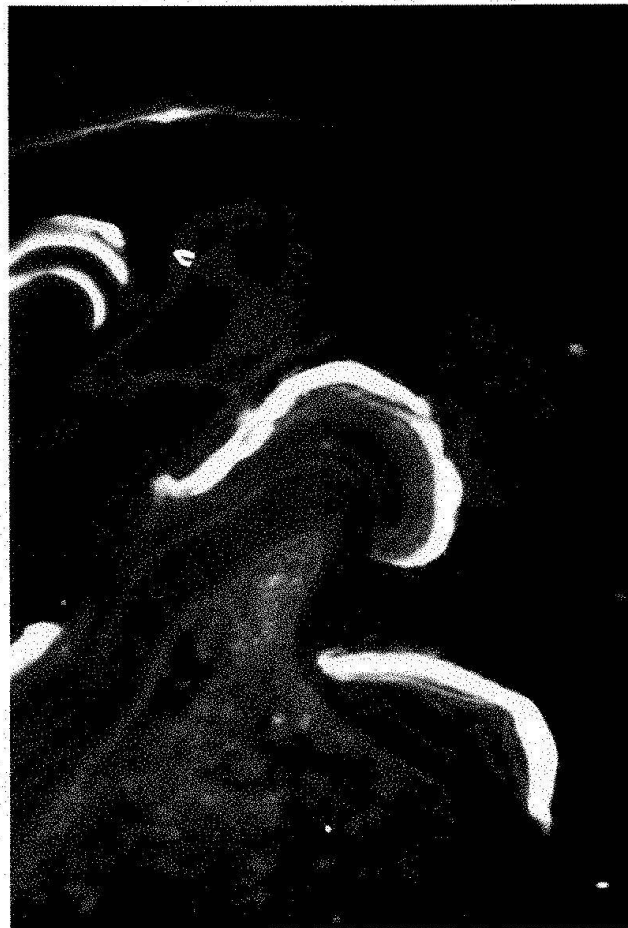
(Rahn und Perren, 1971), und Alizarinkomplexon (rot, Rahn und Perren, 1972) auf Grund ihrer Verträglichkeit für die intravitale Verabreichung als geeignet erwiesen. Daneben gelangen auch die ebenfalls als Komplexe eingebauten Porphyrine (Coutelier et al., 1963), Alizarinrot-S (Harris, 1960) und das orangegelb fluoreszierende Lumomagneson (Coutelier, 1973) zur Anwendung. Die Einlagerung des ebenfalls fluoreszierenden Procionrots (Prescott et al., 1968) und von Bleiacetat (Schneider, 1968) beruht nicht auf dem Mineralisationsprozess, die Substanzen werden aber ebenfalls als Zeitmarken in mineralisierenden Geweben verwendet.

Die Fluoreszenzmarken werden dort gefunden, wo Mineralisationsvorgänge stattfinden, so z.B. bei der Knochenbildung. Die chondrale Ossifikation (Abb. 4), die Faser-

knochenbildung (Abb. 5) und die lamelläre Knochenbildung zeigen dabei ein charakteristisches Markierungsmuster (Abb. 6). Die Verteilung und der Abstand der Farbmarken geben Auskunft über Ort, Richtung und Geschwindigkeit der Knochenbildungsvorgänge (Abb. 7). Die Auflösung zwischen einzelnen verabreichten Marken ermöglicht routinemässig Intervalle von wenigen Tagen zu unterscheiden. Das Minimum der zeitlichen Abstände, welche bei lamellärem Knochen noch eine Trennung zweier gleichfarbiger Marken erlaubt, liegt in der Grössenordnung von 12-24 Stunden. Durch kontinuierliche Verabreichung der Markiersubstanzen über eine bestimmte Zeit hinweg färbt sich die ganze während dieser Zeit gebildete Knochenmenge an. So kann der neugebildete Knochen mit einer Videokamera selektiv er-



a



b

Abb. 9. Selektives Herausheben einzelner Farbmarken. Durch spezielle Filterwahl im Fluoreszenzmikroskop ist es möglich, einzelne Farben intensitätsmässig aus der Umgebung herauszuheben. Aus der Abbildung 9a wurde im abgebildeten Beispiel die grünen Fluoreszenzlinien speziell hervorgehoben (Abb. 9b).

fasst werden. Das Videosignal kann in digitale Werte umgewandelt und morphometrisch ausgewertet werden. Neben den Orten der Knochenbildung binden auch andere Stellen Fluorochrome. Verkalkungen bei Gewebsnekrosen zeigen ebenfalls eine Einlagerung der verschiedenen Markiersubstanzen. An Orten, an denen Osteoklasten den Knochen resorbiert haben oder auch an Stellen, an denen die Knochenoberfläche mechanisch verletzt wurde, werden Bindungsmöglichkeiten für die entsprechenden Chelatkomplexe freigelegt (Abb. 8). Veränderungen der Filterkombinationen sowohl im Anregungsstrahlengang des Fluoreszenzmikroskops wie auch auf der Emissionsseite erlauben es, einzelne Fluoreszenzfarben gegenüber den anderen intensitätsmässig stark hervorzuheben. In der fotografischen Dokumentation wie

auch bei Betrachtung können dadurch einzelne Phasen der Knochenbildung separat erfasst werden (Abb. 9), was die Bildauswertung erleichtert. Die selektive Filterung zeigte noch einen weiteren Vorteil: Sogar ein farbenblinder Mitarbeiter unseres Labors konnte damit die verschiedenen Farbmarken identifizieren und auswerten. Mit der polychromen Fluoreszenzmarkierung des Knochenbaus steht uns eine experimentelle Technik zur Verfügung, die Auskünfte über die Dynamik der Mineralisationsvorgänge gibt. Sie lässt sich bereits mit relativ einfachen Mitteln durchführen und ist praktisch in jedem Labor möglich. Eine Kombination von Fluoreszenzmarkierung des neugebildeten Knochens mit einer Darstellung der Zirkulationsverhältnisse kann dazu beitragen, die gegenseitigen Beziehungen zu analysieren.

Literatur

- Belchier, J. (1965): An Account of the Bones of Animals being Changed to a Red Color by Aliment only. *Phil. Trans.* 39: 287-288 (1736). Nachgedruckt in: *Clin. Orthop.* 40: 3 (1965).
- Belchier, J. (1965): A Further Account of the Bones of Animals being Changed to a Red Color by Aliment Only. *Phil. Trans.* 39: 299-300 (1736). Nachgedruckt in: *Clin. Orthop.* 40: 4 (1965).
- Burri, C., Buchmann, B., Mühlbauer, R. (1965): Vitalfärbungen bei Verbrennungen. *Helv. chir. Acta* 32: 616-624 (1965).
- Coutelier, L. (1973): Le lumomagneson: marqueur fluorescent de l'os. *Experientia* 29: 192-193.
- Coutelier, L., Dhem, A., Vincent, A. (1963): La microscopie de fluorescence dans l'étude de l'ossification enchondrale. *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.* 3: 675-689.
- Draenert, K., Draenert Y. (1980): Die Gefäßversorgung langer Röhrenknochen. Ihre Architektur in Beziehung zu den Knochenbälkchen und Kanälen. *Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.* 131: 317.
- Gunst, M. A., Suter, C., Rahn, B. A. (1979): Die Knochendurchblutung nach Plattenosteosynthese. Eine Untersuchung an der intakten Kaninchentibia mit Disulfidblaufärbung. *Helv. chir. Acta* 46: 171-175.
- Harris, W. H. (1960): A Microscopic Method of Determining Rates of bone growth. *Nature* 188: 1038-1039.
- Harris, W. H., Travis, D. F., Friberg, U., Radin, E. (1964): The in vivo Inhibition of Bone Formation by Alizarin red S. *J. Bone Jt Surg.* 46A: 493-508.
- Jenny, G., Kempf, I., Jaeger, J. H., Bitar, S., Gebauer G. (1977): Coloration vitale au bleu de disulfine dans la cure chirurgicale de l'infection osseuse. *Rev. chir. Orthop.* 63: 531-537.
- Lüthi, U., Rahn, B. A., Perren, S. M.: Kontaktflächen zwischen Osteosyntheseplatte und Knochen. *Akt. traumatol.* 10: 131-136 (1980).
- Milch, R. A., Rall, D. P., Tobie, J. E. (1957): Bone Localization of the tetracyclines. *J. Nat. Cancer Inst.* 19: 87.
- Pfister, U., Rahn B. A., Perren, S. M., Weller, S. (1979): Vaskularität und Knochenumbau nach Marknagelung langer Röhrenknochen. *Akt. traumatol.* 9: 191-195.
- Prescott, C. H., Mitchell, D. F., Fahmy, H. (1968): Procion Dyes as Matrix Markers in Growing Bone and Teeth. *Am. J. Phys. Anthrop.* 29: 219-224.
- Rahn, B. A., Perren, S. M. (1970): Calcein Blue as a Fluorescent Label in Bone. *Experientia* 26: 519.
- Rahn, B. A., Perren, S. M. (1971): Xylenol Orange, a Fluorochrome Useful in Polychrome Sequential Labeling of Calcifying Tissues. *Stain Technol* 46: 125-129.
- Rahn, B. A., Perren, S. M. (1972): Alizarinkomplexon, Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau. *Experientia*, 28: 180.
- Rhineland, F. W., Baragry, R. A. (1962): Microangiography in Bone Healing. I. Undisplaced Closed Fractures. *J. Bone Jt Surg.* 44A: 1273-1298.
- Suzuki, H. K., Mathews, A. (1966): Two-Color Fluorescent Labeling of Mineralizing Tissues with Tetracycline and 2,4 bis (N,N'-Di-(Carbomethyl) Aminomethyl) Fluorescein. *Stain Technol.* 41: 57-60.
- Schneider, B. J. (1968): Lead Acetate as a Vital Marker for the Analysis of Bone Growth. *Am. J. Phys. Anthrop.* 29: 197-200.
- Trueta, J., Cavadias, A. X. (1955): Vascular Changes Caused by the Küntscher Type of Nailing. An Experimental Study in the Rabbit. *J. Bone Jt Surg.* 37B: 492-505.

PD Dr. Dr. Berton A. Rahn
Laboratorium für experimentelle Chirurgie
Schweizer. Forschungsinstitut
CH-7270 Davos-Platz