

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Genf
(Direktor: Prof. Dr. E. RUTISHAUSER).

Die alkalische Phosphatase in der Biologie des Knochengewebes*.

Histochemische Untersuchungen.

Von

GUIDO MAJNO und CHARLES ROUILLER.

Mit 23 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. März 1951.)

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung	1
I. Die Phosphatasen	
Historik	3
Biochemische Eigenschaften der Phosphatasen	4
Die Rolle der Phosphatase im Organismus	5
Die Verteilung der Phosphatase in den Geweben	7
Nachweis der Phosphatase in Gewebsschnitten	8
Fehlerquellen und Kontrollen	11
II. Eigene Untersuchungen	
Ziel der Arbeit	15
Untersuchungsmaterial, Technik	16
A. Die Phosphatase bei der Regeneration	16
Diskussion	21
B. Die Phosphatase bei der Resorption	28
Diskussion	33
C. Die Phosphatase und der schleichende Umbau	40
D. Die Phosphatase und die Onkose	44
Diskussion	47
Anhang: Nachweis der sauren Phosphatase	51
Schlußfolgerungen	54
Zusammenfassung	58
Literatur	59

Einleitung.

Das Gebiet der Phosphatasen nimmt einen der ausgedehntesten Bereiche der heutigen Enzymlehre ein. Die Bedeutung dieser Fermentgruppe entspricht derjenigen des Phosphations, welches bei den verschiedensten Stoffwechselvorgängen aktiv ist.

Die Beteiligung der Phosphatasen an der Knochenbildung ist erstmalig durch die Arbeiten von ROBISON (1922) bekannt geworden, und wenn auch über die Art dieser Beteiligung bei der Ossifikation neue

* Siehe den Zusatz über die saure Phosphatase auf S. 51.

Auffassungen entwickelt wurden, so blieb doch das Fermentsystem der Phosphatasen bis heute das einzige, dem man die wesentliche Funktion im knochenbildenden Prozeß zuerkennt*.

1939 wurden von GÖMÖRI²⁹ und TAKAMATSU³³ histochemische Methoden ausgearbeitet, die es ermöglichten, Phosphatase in Weichgewebsschnitten mikroskopisch nachzuweisen, und in letzter Zeit haben verschiedene Forscher diese Technik auch dem Phosphatasenachweis im Knochen angepaßt^{14, 57-60, 36, 65}.

Angesichts des Ausmaßes und der Genauigkeit der biochemischen Forschung könnte man sich fragen, ob die Ergebnisse der Histochemie tatsächlich noch zu einem tieferen Verständnis der biologischen Rolle der Fermente beitragen, oder ob hier nicht nur unproduktiver Luxus rein morphologischer Liebhäberarbeit getrieben wird. Die Unvollkommenheit der Histochemie, deren Methoden sowohl durch das Indirekte des Vorgehens als auch durch zahllose hineinspielende Nebenumstände eine ganze Reihe von Fehlerquellen bedingen, verlangt größte Zurückhaltung bei der Interpretation des mikroskopischen Bildes. Jedoch ist die Möglichkeit, die Fermente in ihren ursprünglichen topographischen Beziehungen in Zelle und Gewebe zu fixieren (Anwesenheit in den Zellkernen; Lagerung im Vergleich zum Glykogen, zum Calcium; Vorkommen in den Nekrosen; Veränderungen entsprechend den funktionellen Phasen des Gewebes usw.) von so weittragender Bedeutung für die Erkenntnis der Gewebsbiologie, daß die der Methode anhaftenden Nachteile doch reichlich aufgewogen werden.

Mit dieser Überzeugung haben wir die Histologie des Knochens diesmal unter Berücksichtigung des Verhaltens der Phosphatase untersucht, und wir stellten uns zur Aufgabe, die Beteiligung dieses Fermentes an normalen und einzelnen pathologischen Knochenprozessen zu bestimmen wie bei der metaplastischen Knochenbildung, bei Apposition und Resorption und bei der „Onkose“, dem Bilde der osteocytären Nekrobiose. Da sich alle diese Prozesse zu gleicher Zeit im gleichen Knochen abspielen, ist ihre lokale Analyse viel mehr Sache der Histochemie als der biochemischen Dosierung. Wir werden sehen, daß mit solchen Untersuchungsmethoden das Fermentvorkommen nicht nur quantitativ erfaßt wird, sondern daß auch über das Wesen eines Lokalprozesses Aufschluß gewonnen werden kann, Differenzierungen, die dem Biochemiker entgehen, wie z. B. die Beteiligung der alkalischen Phosphatase am Knochenabbau, oder das Auftreten des Fermentes während der Nekrobiose des Knochengewebes (Onkose).

* CARTIER und POLONOVSKI^{15a} haben kürzlich proteolytische Fermente im Knochengewebe nachgewiesen. Im Pathologischen Institut der Universität Genf sind zur Zeit Untersuchungen über die Rolle solcher Fermente bei der Osteogenese im Gange.

Im folgenden geben wir zunächst einige Vorbemerkungen über die Phosphatasen (S. 3), dann beschreiben wir die von uns angewandte histochemische Technik (S. 8) und besprechen anschließend unsere eigentlichen Untersuchungen (S. 15).

I. Die Phosphatasen.

Physiologische Chemie. Histochemie.

Historik.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts entdeckten die drei japanischen Forscher SUZUKI, JOSHIMURA und TAKAISHI⁹¹ im *Reis* ein Ferment, das von hexa-phosphorsaurem Inosit Phosphorsäure abspaltet. 1908 wurden Phosphatasen zum ersten Male in *tierischen Geweben* nachgewiesen, und 1912 beschrieben GROSSER und HUSLER³⁷ solche Fermente im Pankreas, in den Nieren, in der Milz und im Knochen. Zehn Jahre später brachte ROBISON das Vorhandensein der Knochenphosphatase mit dem Vorgang der *Ossifikation* in Beziehung: Seine Entdeckungen haben eine ganze Reihe von Arbeiten ins Leben gerufen, die in ihrer Gesamtheit heute das bestbekannte Kapitel der Ossifikationsbiochemie darstellen. Mit den Untersuchungen über die *Plasmaphosphatase* ist besonders der Name von KAY verbunden; mit Hilfe der von ihm ausgearbeiteten Dosierungsmethode (1929) hat er die Auswirkung gewisser Knochenerkrankungen auf den Fermentblutspiegel nachgewiesen, wie z. B. bei der Ostitis fibrosa v. RECKLINGHAUSEN und bei Rhachitis, Osteomalacie und Knochencarcinose (1930).

Bis vor etwa 10 Jahren ist das Studium dieser Fermente im Gebiet rein chemischer Bestimmungen geblieben, denn erst 1939 beschrieben GÖMÖRI²⁹ und, unabhängig von ihm, TAKAMATSU⁹³ die erste *histochemische Methode*, die es gestattete, die Phosphatase in Schnittpräparaten mikroskopisch sichtbar zu machen. Dieses Verfahren fand weite Verbreitung, und von den vielfachen interessanten Anwendungsmöglichkeiten nennen wir hier nur die zahlreichen Modifikationen zum Studium des Knochengewebes.

Heutzutage hat die Untersuchung auf Phosphatasen sogar in die *Bakteriologie* Eingang gefunden (Bakterien⁴, Virus⁹⁷). Mit Ausnahme des Knochens und des Muskels entspricht jedoch die Mehrzahl der beschriebenen Phosphataseorte keineswegs immer einer bekannten und genau umschriebenen Fermentfunktion.

Praktisch hat die Bestimmung der Phosphatase bei manchen Skeleterkrankungen (alkalische Hyperphosphatasämie) Bedeutung gewonnen. Eine alkalische Hyperphosphatasämie findet sich auch bei Stauungsikterus, und Veränderungen im histochemischen Phosphatasebild werden zur Diagnose von Leberbiopsien herangezogen¹⁷. Beim Prostatacarcinom findet sich eine saure Hyperphosphatasämie, die bei Behandlung mit östrogenen Hormonen wiederum abnimmt.

Auf dem Gebiet der Knochenpathologie findet die Phosphataseforschung noch ein reiches Arbeitsgebiet. Der niedrige Fermentgehalt der Knochen bei Osteogenesis imperfecta (LOBSTEIN) ist noch immer nicht erklärt. Kürzlich ist von J. C. RATHBUN unter dem Namen „*Hypophosphatasia*“ ein neuer pathologischer Zustand beschrieben worden. Der einzige bisher bekannte Fall betrifft ein Kind von 9 Wochen mit Skeletdeformationen nach Art der Rhachitis, aber mit einem Serumphosphatasewert von beinahe Null.

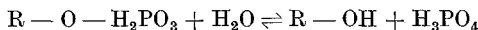
Wir verweisen hier auf die ausgezeichnete Monographie von J. ROCHE und N. VAN THOAI⁸¹, die alle neueren Ergebnisse auf dem Gebiet der alkalischen Phosphatasen zusammenfaßt.

Biochemische Eigenschaften der Phosphatasen.

Mit dem Ausdruck Phosphatase im weitesten Sinne bezeichnen wir jedes Ferment, das die Fähigkeit besitzt, die hydrolytische Spaltung eines Phosphorsäureesters zu katalysieren.

FOLLEY und KAY²⁷ leiten von der Art des gespaltenen Substrates 6 *Phosphatasegruppen* ab: Phosphomonoesterasen, Phosphodiesterasen, Pyrophosphatasen, Metaphosphatasen, Phosphoamidasen und eine die Lecithinase, Phytase, Adenylpyrophosphatase und Hexosephosphatase umfassende Fermentgruppe.

Im allgemeinen Gebrauch werden unter „Phosphatasen“ gewöhnlich die Phosphomonoesterasen verstanden⁸¹; zu diesen gehört auch die sog. „alkalische“ Phosphatase, die sich in tierischen Geweben in so außerordentlich weiter Verbreitung findet. Sie katalysiert die folgende Reaktion:



bei der R — OH den Alkohol- oder Phenolkomplex darstellt.

Eine der charakteristischen Grundeigenschaften der Phosphatasen ist die *Iso-dynamie*: Das gleiche Substrat kann von verschiedenen Enzymvarianten gespalten werden, die sich durch das jeweils spezifische p_H -Optimum und den Aktivator voneinander unterscheiden. In dieser Verschiedenheit ihres Wirkungsmilieus liegt auch der Unterschied zwischen den „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen. Die letzteren sind in einem p_H -Bereich zwischen 8,5 und 10 wirksam¹⁸ und werden unterhalb p_H 5 inaktiv. Die saure Gruppe besitzt ihre Aktivität zwischen p_H 3 und p_H 6 und ist oberhalb p_H 8 inaktiv. Der optimale Wirkungsbereich für jede der sauren Phosphatasen ist im allgemeinen enger begrenzt als bei den im alkalischen Milieu wirksamen Fermenten.

Untersuchungen über die *Aktivatoren* haben ergeben*, daß die gleiche Substanz, je nach dem Grade der Konzentration, aktivierend oder hemmend wirken kann. ERDTMAN z. B. entdeckte den aktivierenden Effekt des *Magnesiums* für die alkalische Phosphatase, und JENNER und KAY zeigten, daß die optimale Konzentration für das Mg zwischen 0,02 und 0,005 M liegt. Wird diese Konzentration überschritten, so wird die Fermentaktivität wieder gehemmt. CLOETENS^{18, 19} unterscheidet 2 *Klassen alkalischer Phosphatasen*: Eine *Phosphatase I*, die bei Fehlen von Magnesium keine Aktivität zeigt; durch geeignete Konzentrationen wird sie stark aktiviert und läßt sich dann nicht mehr von Cyanverbindungen hemmen. Die *Phosphatase II* verhält sich umgekehrt: Sie ist ohne Mg aktiv, von dem sie nur wenig beeinflußt wird, dagegen erfährt sie eine starke Hemmung durch Cyanate. Andere zweiwertige Kationen (Co, Mn, Zn) aktivieren ebenfalls die alkalische Phosphatase, während die Wirkung auf saure Phosphatase nur sehr gering oder null ist.

Von *organischen* Substanzen ist z. B. das oxydierte Glutathion als Aktivator wirksam, während es im reduzierten Zustand hemmt²¹. Auch einige Aminosäuren aktivieren, z. B. das Glycin in Konzentrationen unter 0,006 M. Auch andere Fermente vermögen als Aktivatoren aufzutreten: Trypsin stabilisiert die alkalische Phosphatase und beschleunigt deren Aktion; Urease, Amylase, Pankreaslipase aktivieren ebenfalls⁸¹ die Phosphatase.

Die saure Gruppe der Phosphatasen erfährt durch Fluorverbindungen eine Hemmung²⁸, während die alkalischen Phosphatasen von Fluor nur unter besonderen Bedingungen gehemmt werden. Ebenso wirken Phlorizin und die Phosphorylasen auf saure Phosphatasen hemmend.

Es ist interessant, daß gewisse Elemente, die auch Osteopathien zu erzeugen vermögen, wie z. B. das Fluor²⁸ und Selen⁴³, zugleich Hemmungsstoffe: Fluor für

* Vgl. die Arbeit von J. ROCHE und N. VAN THOAI.

die saure, Selen für die alkalische Phosphatase sind. Die Beziehungen, die zwischen diesen Vorgängen bestehen, sind noch nicht aufgeklärt.

Die Untersuchung der Wirksamkeit von Aktivatoren hat weiterhin ergeben, daß die aus den verschiedenen Organen isolierten Phosphatasen nicht identisch sind. Diese Tatsache ist auch von ROCHE bestätigt worden durch die Untersuchung des K_M (Affinitätskonstante für ein bestimmtes Substrat).

Immerhin handelt es sich bei diesen Unterschieden um hauptsächlich quantitative Unterschiede zwischen den Phosphatasen der einzelnen Organe; die allgemeinen Fermenteigenschaften sind stets die gleichen. Die Knochenphosphatase z. B. scheint mit derjenigen des Blutserums sowie mit der Nucleotidase identisch zu sein²⁷, unterscheidet sich dagegen von der Nieren- und Leberphosphatase durch eine größere Empfindlichkeit gegen p_H -Schwankungen nach der sauren Seite⁵ und durch das Fehlen der Reaktivierbarkeit nach erfolgter Hemmung.

Von gleicher Bedeutung wie die von den Phosphatasen katalysierte Hydrolyse ist deren Fähigkeit, auch Phosphorsäureester zu *synthetisieren*. Wir kommen auf den Seiten 28 und 38 darauf zurück.

Die genaue *Molekularstruktur* der Phosphatasen ist bisher noch nicht aufgeklärt da die Reindarstellung mit großen Schwierigkeiten verbunden ist. Bei der alkalischen Phosphatase handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen hochkomplexen spezifischen Eiweißkörper, der mit einem Peptid oder einer Aminosäure sowie mit einem zweiwertigen Metall (Mg) verbunden ist. Das Metall und das Peptid (oder die Aminosäure) sind unspezifisch und können im Austausch ersetzt werden⁸¹.

Die Rolle der Phosphatasen im Organismus.

Im allgemeinen wird angenommen, daß die Phosphatasen eine Rolle im Stoffwechsel der Kohlenhydrate, der Fette², der Nucleoproteide und anderer Eiweißverbindungen und auch im Calcifikationsprozeß* spielen. In der großen Mehrzahl der Fälle vollzieht sich diese Rolle im Sinne der Katalyse von hydrolytischen Spaltungen. Die synthetische Funktion der Phosphatasen ist *in vitro* durch eine einfache Gleichgewichtsverschiebung leicht nachzuweisen (vgl. S. 28 und 38), aber diese *In-vitro*-Existenz wird hypothetisch, wenn wir sie auch auf das lebende Gewebe übertragen, da wir die einzelnen Bedingungen des chemischen Gleichgewichtes im Gewebe nur sehr unvollkommen kennen.

MAGGE und REID haben nachgewiesen, daß das Vorkommen der Phosphatase im Bereich der Darmschleimhaut mit der *Zuckerabsorption* verknüpft ist. Reichlich Ferment enthält die zur Zuckerabsorption fähige Rectalschleimhaut¹⁴. Die Frage, in welcher Weise die Phosphatase der Nierenhauptstücke durch Phosphorylierung die Zuckerrückresorption vermittelt, wird noch diskutiert^{99, 14}. Beim Alloxandibetes scheint die Phosphataseaktivität der Hauptstücke im direkten Zusammenhang mit der Glykosurie zu stehen⁸⁹; hingegen ist beim Phlorizindibetes der Phosphatasegehalt der Niere unverändert⁵². Schließlich ist die Spaltung des Glykogens, die unter Phosphorylierung und Dephosphorylierung („Phosphorolyse“) vor sich geht, auch eine Etappe auf dem Wege zur Verkalkung³⁸. GLOCK hat in den Knochen von Rattenfetten, die sich kurz vor der Geburt befanden, die Ossifikationszentren als Orte der stärksten Glykogenansammlung gesehen²⁸. Bei der Untersuchung der Haarentwicklung haben JOHNSON und BEVELANDER⁴⁶ das Glykogen in bestimmter räumlicher Beziehung zur Phosphatase gefunden, und zwar befand sich das Ferment immer zwischen den Gefäßen und den Glucose-

* Wir können hier nur die wesentlichsten Tatsachen erwähnen. Die Besprechung aller Funktionen und Wechselbeziehungen der Phosphatasen (mit den Hormonen, dem Vitamin C¹⁴ usw.) würde zu weit führen.

depots abgelagert. — Die vorzugsweise Ansammlung von Phosphatase in Zellkernen hat an eine Beteiligung beim *Eiweißstoffwechsel* denken lassen, um so mehr, da die Nucleoprotide phosphorylierte Nucleinsäuren enthalten¹⁴. Im Verlauf der Mitose ist sowohl in den Chromosomen selbst als auch in deren unmittelbarer Umgebung eine starke Vermehrung der Phosphataseaktivität festzustellen, die möglicherweise mit dem Stoffwechsel der Desoxyrinbonucleinsäuren zusammenhängt^{98, 16}. Schließlich sei auch erwähnt, daß die Hyperglobulinämie bei Morbus Besnier-Boeck mit Hyperphosphatasämie einhergeht.

Zahlreiche Untersucher haben wiederholt auf die mögliche Rolle der Phosphatasen bei der *Kollagenbildung* hingewiesen. Untersucht man Wunden in der Reparationsphase, so findet man, daß das Maximum der Phosphataseaktivität mit dem Auftreten der Zwischenzellfasern zusammentrifft^{26, 15, 14, 59}. Auch in anderen Organen, in denen Fasereiweiße gebildet werden, hat man einen besonderen Reichtum an Ferment gefunden, so z. B. in den Haarfollikeln⁴⁶ und in den Seindrüsen der Insekten¹⁵.

1923 lenkte ROBISON die Aufmerksamkeit auf die Beteiligung der Phosphatase bei der im Knochen vor sich gehenden *Verkalkung*. Der amerikanische Forscher und seine Mitarbeiter zeigten in einer Reihe von Untersuchungen, daß sich in vitro die Verkalkung des Faserknorpels so gut wie mit Calcium- und Phosphorionen auch mit Calciumionen allein und einer veresterten Phosphorsäure erzielen ließ, sofern im letzteren Falle Phosphatase zugegeben wurde. Die Calcifikation fand somit zunächst eine Erklärung als chemisches Phänomen: Sobald das Produkt der Löslichkeiten $(Ca^{++}) \times (PO_4^{---})$ überschritten ist, bildet sich direkt ein Tricalciumphosphat. Die heutige Forschung nimmt darüber hinaus eine dem chemischen Niederschlag vorangehende Veränderung der Eiweißgrundsubstanz an. Nach ROCHE und DELTOUR⁷⁹ geht die Verknöcherung in 4 Phasen vor sich: 1. Verbinden sich das PO_4 -Ion und das Ca-Ion, jedes für sich, mit der Knochengrundsubstanz; 2. entsteht dadurch eine Veränderung in der Matrix, die mit dem Erscheinen von Basophilie sichtbar wird; die PO_4 - und Ca-Ionen werden wieder in Freiheit gesetzt und verbinden sich 3. zu einem unlöslichen Salz, das sich 4. durch einen noch nicht näher bestimmten Mechanismus in die Eiweißgrundsubstanz einlagert.

Da sich während der ersten Phase des Verknöcherungsprozesses — dank der Phosphatase — der Phosphor gegenüber dem Calcium im Überschuß befindet, erfolgt eine regelrechte „Drainage“ von Ca-Ionen zum Knochen hin.

Der Phosphor stammt dabei von einem Hexosephosphat, das unter der Einwirkung einer Phosphorylase aus Glykogen und einem Phosphat lokal gebildet würde. Das Glucose-1-phosphat wird in Glucose-6-phosphat umgewandelt und dann seinerseits von der Knochenphosphatase gespalten^{78, 38}.

Obwohl die Beteiligung der alkalischen Phosphatase an der Knochenbildung eine regelmäßige Erscheinung ist, muß darauf hingewiesen werden, daß sie *für die Verkalkung nicht unerlässlich ist: Sie begünstigt die*

Verkalkung, indem sie die lokale Konzentration der Phosphorionen erhöht und somit die Ca-Ionen dorthin drainiert. *Die Fixation des Calciums ist jedoch sowohl in vitro als auch in vivo ohne Gegenwart von Phosphatase möglich*⁸⁸.

Nach GÖMÖRI ist in den Verkalkungsherden des lebenden Gewebes und kürzlich eingetretener Nekrosen regelmäßig eine große Phosphataseaktivität festzustellen, während die Verkalkung der hyalinen Substanz ohne Fermentbeteiligung vor sich zu gehen scheint. Man könnte annehmen, daß es sich im letzteren Falle um einen einfachen Niederschlag des Phosphates aus einer Lösung handelt, in der das Löslichkeitsprodukt $(Ca) \times (P)$ überschritten ist. Nach ROSS (zit. nach GÖMÖRI) ist es aber nicht einmal nötig, daß dieser kritische Wert erreicht wird, weshalb man zur Erklärung dieses Verhaltens eine besondere Affinität des Eiweißsubstrates für das Ca-Ion angenommen hat.

Es gibt also Verkalkung auch ohne Phosphatase, und Phosphatase bewirkt nicht überall Verkalkung.

Die Verteilung der Phosphatasen in den Geweben.

Alle embryonalen Gewebe enthalten Phosphatasen, unter denen die „alkalischen“ Gruppen quantitativ vorherrschen. Die weitere Entwicklung bringt mit zunehmender Differenzierung Vorzugslokalisationen für die Phosphatase mit sich, von denen ebenfalls zahlreichere Orte die alkalische Fermentgruppe enthalten und zudem durch eine stärkere Enzymansammlung auffallen, als dies für saure Phosphatasen der Fall ist.

Nur selten nimmt der Fermentgehalt mit fortschreitendem Alter zu: Als Ausnahmen dieser Regel gelten besonders die Prostata, die beim Erwachsenen wesentlich reicher an saurer Phosphatase ist als beim Knaben⁸⁷, und die Niere, deren alkalischer Phosphatasegehalt nach der Geburt noch zunimmt⁸⁹.

Die Fermente können im Kern, im Cytoplasma oder außerhalb der Zelle gelagert sein. Am häufigsten finden sie sich in den Zellkernen. Die Verteilung in den Geweben variiert bei den verschiedenen Tiergattungen: Zum Beispiel sind die centroacinösen Zellen des Pankreas beim Hunde sehr phosphatasereich, dagegen phosphatasenegativ bei der Katze und beim Meerschweinchen (⁴⁴, alkalische Phosphatase; vgl. S. 51 betr. das Knochengewebe). Nach BOURNE⁸⁴ findet sich beim Menschen alkalische Phosphatase weder in der normalen Leber noch im Nervengewebe; die Bauchspeicheldrüse und die quergestreifte Muskulatur enthalten keine saure Phosphatase³⁰. Diese Angaben dürfen jedoch nicht ohne Vorbehalt übernommen werden, da die histologische Behandlung einen Verlust der Fermentaktivität bewirkt und nicht immer durch entsprechend längere Inkubationszeiten kompensiert werden kann⁵⁵. So z. B. haben BELFANTI und Mitarbeiter geringe Mengen saurer Phosphatase im Knochen chemisch bestimmt⁵, während nach GÖMÖRI die histochemische Methode regelmäßig negative Resultate ergibt, selbst bei ganz jungen und nicht-entkalkten Knochen³⁰.

Die Anwesenheit alkalischer Phosphatase in einem Gewebe bedeutet nicht immer, daß auch die saure Fermentgruppe darin vorkommt, und umgekehrt (z. B. enthält Nervengewebe nur saure Phosphatase¹⁴).

Untersuchungen über das Verhalten der Aktivatoren in Schnittpräparaten haben zur Unterscheidung von *Fermentuntergruppen* geführt, die in den biologischen

Klassifikationen sonst kein Äquivalent besitzen. So unterscheiden FEIGIN, WOLF und KABAT²⁵ 3 Typen alkalischer Phosphatase: Gruppe I spaltet eine große Zahl von Phosphorsäureestern und wird durch Glycin oder Arginin in einer Konzentration von M/4 gehemmt, desgleichen durch M/100 Kaliumcyanat, durch Hitze und durch Trichloressigsäure. Gruppe II spaltet im besonderen die Ester der Adenosintriphosphorsäure und wird durch Hitze und Trichloressigsäure gehemmt, dagegen von Glycin, Arginin und KCN nur wenig beeinflusst. Gruppe III, die ausschließlich in den Zellkernen vorkommt, wird von allen genannten Substanzen nur wenig gehemmt. (Bei unseren eigenen Untersuchungen am Knochen ist durch M/100 KCN stets vollständige Hemmung der Fermentaktivität eingetreten.)

In analoger Weise hat SELIGMAN auf Grund von Hemmung durch 1%ige d-Weinsteinsäure zwei saure Phosphatasetypen identifiziert⁸⁷.

In den *Geschwülsten* verhalten sich die Fermente sehr unterschiedlich: Einige Tumoren besitzen die für ihr Ursprungsgewebe charakteristische Phosphataseaktivität (Fibroadenoma mammae, osteogenetisches Sarkom, Ovarialcarcinom — saure Phosphatase⁵³), andere verlieren die Fermentaktivität (Carcinoma mammae, Fibrosarkom des Knochens). Bisweilen kann man feststellen, daß mit der malignen Umwandlung eine Verminderung des Gehaltes an alkalischer mit Vermehrung der sauren Phosphatase einhergeht³².

Die Verteilung der Phosphatasen in normalen und pathologisch veränderten Geweben ist in einer großen Zahl von Arbeiten behandelt worden. Die meist-untersuchten Organe sind die Niere⁸⁹, der Intestinaltractus die Genitalorgane^{2, 91}, das Nervensystem und die Leber^{44, 17}.

Unter den *kalkhaltigen Geweben* zeigt auch das Zahnorgan eine deutliche Phosphataseaktivität, und zwar im Stratum intermedium, d. i. in der den Odontoblasten unmittelbar unterliegenden Zahnpulpa. In den schmelz- und zahnbeinbildenden Zellen ist von manchen Autoren keine Phosphatase gefunden worden^{24, 32}, wohingegen andere Autoren^{7a, 70} in den Kernen der Ameloblasten und im Cytoplasma der Odontoblasten alkalische Phosphatase nachweisen konnten.

Die Lokalisationen der alkalischen Phosphatase im Knochengewebe wird auf S. 17 behandelt.

Nachweis der Phosphatase in Gewebsschnitten.

Der Kunstgriff, der es erlaubt, Fermente in histologischen Schnitten nachzuweisen, besteht im allgemeinen darin, daß man sie auf ihre Substrate einwirken läßt, z. B. Tyrosinase auf Tyrosin. Sofern die unmittelbaren Spaltungsprodukte nicht als solche sichtbar sind, muß man sie durch weitere Behandlung in Salze überführen, damit sie im mikroskopischen Bilde in Erscheinung treten (z. B. in schwarzes Sulfat).

Auch die Phosphatasen werden durch verschiedene Methoden dieser Art nachgewiesen, und für jedes Verfahren gibt es 2 Modifikationen, die jeweils der „alkalischen“ bzw. der „sauren“ Fermentgruppe angepaßt sind.

Die älteste und am meisten geübte Technik ist die von GÖMÖRI. Nach GÖMÖRI werden die Phosphatasen weder durch eine Fixation in Alkohol oder Aceton, noch durch die Paraffineinbettung zerstört, vorausgesetzt, daß die Temperatur im Wärmeschrank 56° C nicht überschreitet. Es ist also möglich, die Phosphatase in den Schnitten aktiv zu erhalten. Die Präparate werden dann in eine Pufferlösung mit einem dem Wirkungsbereich des zu untersuchenden Fermentes entsprechenden p_H gebracht, in die das zu spaltende Substrat (Glycerinester) und ein Calcium- oder Bleisalz (je nach dem p_H) sowie ein Aktivator zugegeben werden. Die Phosphatase spaltet den Ester, und das freigewordene Phosphation verbindet sich mit dem Metall (Ca, Pb) und gibt einen lokalisierten Niederschlag. Dieses Metallsalz überführt man in das Sulfid, das dann im Schnitt schwarz erscheint.

Die Spaltung des Phosphorsäureesters ergibt zwei Produkte: ein organisches Radikal (z. B. Glycerin) und das Phosphation. Anstatt die Phosphorgruppe nachzuweisen, wie es GÖMÖRI tut, *kann man auch das Alkoholradikal zum Phosphatasenachweis benutzen*, allerdings auf viel komplizierterem Wege. Die auf diesem Prinzip beruhenden Verfahren (MENTEN-JUNGE-GREEN, modifiziert von MANHEIMER-SELIGMAN [alkalische Phosphatase] und SELIGMAN [saure Phosphatase]) erfordern sehr viel schwierigere chemische Reaktionen, aber sie sind aus 2 Gründen interessant: 1. geben sie die gleichen Bilder, wie man sie bei den auf das PO_4 -Ion zielenden Reaktionen erhält, und ermöglichen damit eine gute Kontrolle der Phosphataseorte, und 2. vermeidet man die oft durch anderweitige Gewebsaffinitäten störend wirkenden Metallionen (Ca, Pb, Co).

Für eine kritische Durchsicht der Methoden verweisen wir auf die grundlegenden Arbeiten von DANIELLI²¹ und von LISON⁵⁵. Hier sei nur darauf hingewiesen, daß die Resultate für die alkalischen Phosphatasen sehr gleichmäßig sind, während die Ergebnisse für saure Phosphatasen noch nicht befriedigen. Das scheint daran zu liegen, daß die saure Gruppe viel weniger vorkommt und wahrscheinlich auch weniger beständig ist.

Wir behandeln hier im einzelnen den

Phosphatasenachweis im Knochen.

Bei Knochenpräparaten läßt sich die Originaltechnik von GÖMÖRI aus zweierlei Gründen nicht anwenden: Wird nämlich nicht entkalkt, so überdeckt das bereits im Knochen anwesende Phosphat auch dasjenige, welches während der Inkubation abgelagert wird, und andererseits führen die gewöhnlichen Entkalkungsverfahren (5%ige HNO_3 -Lösung usw.) zu einer irreversiblen Zerstörung des Fermentes.

BOURNE^{13, 14} hat diese Schwierigkeiten durch einen erfinderischen Kunstgriff überwunden: Zunächst inkubierte er die nicht-entkalkten kleinen Knochenstücken in der GÖMÖRISCHEN Lösung und ermittelte das Ferment in Form von Kobaltsulfid (schwarz); erst dann entkalkte er mit Trichloressigsäure, von der das Sulfid nicht angegriffen wird.

Diese Methode ermöglicht jedoch nur auf indirekte Weise praktische Resultate. Da nämlich auf diese Weise alle löslichen Phosphate als schwarzes Salz erscheinen, ist nicht mehr zu bestimmen, wo hier Phosphatase aktiv war und an welchen Orten bereits vorher lösliche Phosphate gelegen hatten. Um diese „Überschwärzung“ zu subtrahieren, muß man die Bilder mit Kontrollschnitten vergleichen, die keine Enzymbehandlung durchgemacht haben, woraus sich verschiedene Nachteile ergeben. Aus diesem Grunde hat die Methode keine Verbreitung gefunden.

GÖMÖRI hat vorgeschlagen, das Knochenphosphat zunächst in Sulfid zu überführen, dann zu inkubieren und das erhaltene Salz in eine mit Acridin rot färbbare Bleiverbindung zu verwandeln. CHRISTOPHE⁵⁵ gebraucht ein ähnliches Verfahren, bei dem das Phosphorradikal mit Alizarin gefärbt wird. Auch diese Methoden enthalten 2 Nachteile: Die Schwärzung läßt die Fermentaktivität anzeigende

rote Färbung nicht deutlich sichtbar werden, und durch das auftretende Ammoniumsulfid wird die Phosphatase gehemmt⁵⁸.

Keine dieser Methoden hat eine praktische Bedeutung gewonnen. Einen Fortschritt stellte deshalb die 1947 von LORCH veröffentlichte Methode dar, die den biochemischen Verhältnissen weitgehend Rechnung trägt. (Das von LORCH bearbeitete Entkalkungsverfahren beruht darauf, daß die Phosphatasen zunächst durch saure Lösungen, die auf Wasserstoffionenkonzentration oberhalb p_H 4,5 eingestellt sind, reversibel inaktiviert werden¹⁸, und diese Inaktivierung wird durch Zink verzögert. Eine alkalische Lösung bewirkt die Reaktivierung der Fermente.) Auf diese Weise ist es LORCH gelungen, die Phosphatase auch in entkalkten Schnitten nachzuweisen⁵⁷⁻⁶⁰.

Eine analoge Methode ist zu gleicher Zeit von GREEP-FISCHER-MORSE publiziert worden³⁶. KABAT und FURTH hatten bereits 1941 Versuche in dieser Richtung unternommen, indem sie Ammoniumcitrat auf fetale Knochen einwirken ließen⁴⁹.

Im folgenden geben wir die genaue Beschreibung der von uns angewandten Technik zum Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatasen: Es handelt sich mit einigen Änderungen um das Verfahren von LORCH-GÖMÖRI.

A. Alkalische Phosphatase.

1. *Fixierung* der Stücke in Chloroform-Alkohol und in Aceton bei 4° C, während 15—20 Std; die Lösung wird 1 mal gewechselt. (Die Originaltechnik verwendet 80%igen Alkohol. Wir erhielten bessere Resultate bei Benutzung von Alkohol abs. und Chloroform zu gleichen Teilen. Chloroform allein ist ein ausgezeichneter Konservator für die Phosphataseaktivität, aber kein Fixiermittel. Die Acetonfixierung dient nur zur Kontrolle.)

2. *Auswaschen* in destilliertem Wasser während einiger Minuten.

3. *Entkalkung* in Citrinsäure. Die Lösung setzt sich folgendermaßen zusammen:

Lösung A:	Lösung B:
Citrinsäure kryst. 21,0 g	n/10 HCl
n-NaOH 200,0 cm ³	
Aqua dest. ad 1000,0 cm ³	

Man mischt 70 cm³ der Lösung A mit 30 cm³ der Lösung B und gibt 0,2 cm³ 1%iges Zinksulfat und einen Tropfen Chloroform hinzu.

Die Stücke werden beständig hin- und herbewegt (eine Vorsichtsmaßnahme, die dem Belieben überlassen bleibt). Die Lösung wird bei einer Temperatur von 10° C gehalten und 2 mal täglich gewechselt. Die Dauer der Entkalkung schwankt zwischen 8 und 10 Tagen.

4. *Waschen* in destilliertem Wasser (das auf p_H 9,4 eingestellt ist) während 2 Std, dabei 1 mal gewechselt.

5. *Reaktivierung* bei 37° C in der von LORCH angegebenen Lösung: 1%iges Natrium diaethylbarbituricum (Veronal) mit 0,075% Glykokoll (p_H 9,4).

6. *Waschen* in destilliertem Wasser während einiger Minuten.

7. *Schnelle Entwässerung* in der Alkoholreihe:

Alkohol 95%	2 Std, 1 mal gewechselt,
Alkohol abs.	2 Std, 1 mal gewechselt,
Toluol	30 min, 1 mal gewechselt.

8. *Paraffineinbettung* 1½ Std bei 56° C.

9. *Anfertigung der Schnitten* mit dem Mikrotom innerhalb der auf die Einbettung folgenden 24 Std (3 Wochen nach der Einbettung geschnittenes Material zeigte noch keinen Verlust der Phosphataseaktivität). Schnittdicke 10 μ , Aufhängen auf kaltem Wasser, Aufziehen auf Objektträger.

10. *Trocknen* der Schnitte an der Luft, dann Xylol, Alkohol abs., Kollodium, Alkohol 95%, Alkohol 50%, Wasser.

11. Inkubation in der GÖMÖRISCHEN Lösung:

2% Calciumnitrat	10,0 cm ³
2% Magnesiumchlorid	10,0 cm ³
4% Natrium-glycerinphosphat	10,0 cm ³
1% Natrium-diäthylbarbiturat	70,0 cm ³

Die Inkubation dauert 6 Std bei 37° C (maximal 24 Std).

12. 2% Calciumnitrat, 2 min.

13. 2% Kobaltnitrat, 5 min.

14. Sorgfältiges *Auswaschen* in destilliertem Wasser.

15. 2% Ammoniumsulfid, 2 min.

Eine Kontrastfärbung ist nicht notwendig. Die Präparate, die für die gewöhnlichen histologischen Methoden vorgesehen sind, werden in MÜLLERSchem Formol (1 Teil MÜLLERSche Flüssigkeit: 10 Teile 4% Formol) fixiert, in Salpetersäure oder in Trichloressigsäure entkalkt, in Paraffin eingeschlossen und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Gleichzeitig fertigt man die Kontrollen an (vgl. S. 12).

B. Saure Phosphatase.

1. *Fixierung* in abs. Aceton bei 0—4° C während 24 Std, 2mal gewechselt

2. *Waschen* in destilliertem Wasser während einiger Minuten.

3. *Entkalkung* (s. Technik bei alkalischer Phosphatase).

4. *Waschen* in destilliertem Wasser während 2 Std, 2mal gewechselt. (Reaktivierung ist nicht notwendig, da die Entkalkung im p_H-Optimum des Enzyms vor sich geht.)

5. *Anfertigung von Gefrierschnitten*. Die Einbettung nach LISON hat bei uns keine positiven Resultate gegeben. (Einbettung nach LISON: Nach dem Aceton direkter Übergang in Toluol für 6 Std, 2mal gewechselt; anschließend Paraffin während 3 Std, 2mal gewechselt.)

6. Sehr lange *Inkubation* (24—48 Std bei 37° C) in der folgenden Lösung:

Acetompuffer für p_H 4,7 (bestehend aus gleichen Teilen

0,2 n-Essigsäure und	
0,2 n-Natriumacetat)	12,0 cm ³
1/10 M Bleinitrat	10,0 cm ³
Aqua dest.	74,0 cm ³
Natrium-glycerinphosphat 3,2%	4,0 cm ³

Andere Schnitte werden in die gleiche Lösung gelegt, aber mit einem Zusatz von 1/1000 M-Natriumfluorid (0,0042%) oder 1/100 M (0,042%). Diese Schnitte, die sonst genau wie die übrigen behandelt werden, dienen als Kontrolle, da das Fluor die sauren Phosphatasen hemmt.

7. *Spülen* in destilliertem Wasser 1/2 Std, 6—8mal gewechselt, um jeden Überschuß des Bleisalzes auszuwaschen.

8. Verdünntes Ammoniumsulfid während 2 min; Spülen in destilliertem Wasser; beliebige Grundfärbung mit Hämalaun-Eosin; Canadabalsam.

Nach LISON werden bei der Paraffineinbettung die besten Resultate in einer Tiefe von 150—500 im Innern des Blockes erhalten. Bei größerer Schnitttiefe ist die Reaktion weniger gleichmäßig.

Wir diskutieren diese Technik auf S. 51.

Fehlerquellen und Kontrollen.

Die histochemischen Methoden zum Phosphatasenachweis sind sehr indirekt: Es wird nicht das Ferment selbst in Erscheinung gebracht, sondern das Reaktionsprodukt eines Reaktionsproduktes, das unter dem

Einfluß des Fermentes entstanden ist. Ein solches Vorgehen birgt eine ganze Anzahl Fehlermöglichkeiten in sich, deren Kenntnis unerläßlich ist, um geeignete Kontrollen anzustellen und irrige Interpretationen zu vermeiden. Die wichtigsten Fehlerquellen und ihre Kontrollen* sind die folgenden:

1. *Verlust der Fermentaktivität. — Fixationseffekt.* Vergleicht man Gefrierschnitte der Niere, die 2 Std in 80%igem Alkohol fixiert worden sind, mit einem unfixierten Gefrierschnitt, so sieht man im Phosphatasebild keinen Unterschied. (Bei anderen Fixationsmethoden finden sich nur Intensitätsunterschiede — verglichen mit nicht-fixierten Präparaten —, keine Abweichungen der Lokalisation [DANIELLI²¹].)

Die *Paraffineinbettung* ist viel nachteiliger. Nach STAFFORD und ATKINSON bleiben bei Paraffineinbettung nur 20—30% der Aktivität der alkalischen Phosphatase und nur 5% der Aktivität des sauren Fermentes erhalten. DANIELLI gibt ähnliche Zahlen und stellt dazu fest, daß die Aktivitätsverminderung im ganzen Schnitt gleichmäßig, und zwar dem Grad der ursprünglichen Aktivität proportional ist**.

Infolgedessen werden die Verluste der Fermentaktivität bis zu einem gewissen Grade durch eine verlängerte Inkubation kompensiert (LISON). Wir haben gute Resultate mit *Celloidineinbettung* erhalten. Dagegen ist die *Einbettung im Vakuum* ungünstig: DANIELLI vermutet, daß das Glutathion bei Sauerstoffmangel reduziert wird und in diesem Zustand die Phosphatase hemmt.

Andere Aktivitätsverluste können durch die *Entkalkung* eintreten. Die Größe dieser Verluste ist quantitativ nicht bestimmt worden; immerhin erlaubt die Methode der Entkalkung eine Reaktivierung der alkalischen Phosphatase (CLOETENS¹⁹; durch Glycin, nach LORCH). Wir haben die Wirkung der Entkalkung geprüft, indem wir Präparate der Niere und der Blasenschleimhaut der gleichen „Entkalkung“ aussetzten und dann die alkalischen Phosphatase bestimmten: Der Unterschied, verglichen mit den Kontrollschnitten, war minimal. Zur Bestimmung des Verlustes von saurer Phosphatase haben wir Kleinhirngewebe 10 Tage lang „entkalkt“ (ohne anschließende Reaktivierung) und dabei festgestellt, daß die Fermentreaktion nur leicht schwächer ausfällt, ohne dabei das typische Zellbild zu beeinträchtigen (vgl. S. 53). Diese Resultate sind interessant. Die Tatsache muß jedoch festgehalten werden, daß die Inaktivierung der Phosphatasen durch Säuren (⁵ oder *Einbettungsmethoden*⁹) von Organ zu Organ variieren kann.

* Vgl. die ausgezeichneten kritischen Analysen von DANIELLI (1946) und von LISON (1948).

** DANIELLI kommt zu dem Schluß, daß die Lokalisationsresultate der histochemischen Methoden keinen Irrtümern ausgesetzt sind. Das trifft zu, soweit Fixation und Einbettung in Frage stehen — die Diffusion läßt jedoch auch lokalisatorische Fehler entstehen (vgl. 3).

2. *Verluste von Phosphaten* oder von anderen Salzen können bei der auf die Inkubation folgenden Behandlung entstehen:

DANTELLI²¹ hat darauf hingewiesen, daß die Passage durch manche Lösungen nachteilig werden kann, wenn gewisse optimale Zeiten überschritten werden (speziell die Auswaschung nach Kobaltnitrat, 1 min; nach Ammoniumsulfat, 5–10 min; und die letzte Entwässerung durch die Alkoholreihe, 3 min).

3. *Anwesenheit von Phosphaten bereits vor der Inkubation.* Sie werden geschwärzt wie die Orte der Phosphataseaktivität (Kontrolle s. unter 7).

4. *Die Affinität des Kobaltnitrates zu den Geweben* läßt die Schnitte ein leichtes diffuses Braun annehmen, das besonders in den Zellkernen eine diffuse Phosphataseimprägnation vortäuschen kann (Kontrolle s. unter 7).

5. *Die Affinität des Ammoniumsulfates zum ionisierbaren Eisen*, soweit es im Schnitt enthalten ist, führt zur Bildung von Eisensulfid, welches dann nicht von Kobaltsulfid zu unterscheiden ist (Kontrolle s. unter 7).

6. *Die Affinität des Gewebes zum Blei* beeinträchtigt den Nachweis der sauren Phosphatase⁷³ (Kontrolle s. unter 7).

7. *Ausgesucht lokalisierte Adsorption der Phosphorradikalen* im Verlauf der Inkubation. Theoretisch könnten die Phosphorradikale ihre Entstehungsorte verlassen und von anderen Gewebsformationen, die eine besondere Affinität zu diesen Ionen haben, adsorbiert werden. Tatsächlich gelang es DANIELLI zu zeigen, daß sich ein künstlich hervorgerufener Calciumphosphatniederschlag immer an den Stellen im Schnitt anhäuft, die auch bei der Methode von GÖMÖRI vorzugsweise geschwärzt werden²¹. Diese Koinzidenz würde die Brauchbarkeit der Methode (von GÖMÖRI) sehr in Frage stellen, wenn nicht eine exakte Kontrollmöglichkeit bestünde: Die Phosphatase setzt während der Inkubation PO_4 -Ionen und organische Radikale in Freiheit. Die Technik von LORCH weist das Phosphorion nach. Wenn man nun das organische Radikal für sich allein nachweist, was allerdings komplizierte Verfahren erfordert^{21, 52, 62, 65, 87, 89}, so bleiben die Niederschlagsorte doch die gleichen. Man muß also annehmen, daß an den Orten erhöhter Phosphataseaktivität zugleich eine elektive Affinität zum Calcium besteht²¹.

Die unter 3–7 angeführten Fehlerquellen werden alle dadurch *kontrolliert*, daß man von jedem in Frage kommenden Schnitt jedesmal 3 Kontrollpräparate in unterschiedlicher Weise behandelt: a) ohne Inkubation; b) Inkubation ohne Glycerophosphat; c) Zerstörung des Fermentes durch Hitze, oder Hemmung mit 1/100 M KCN bei alkalischen bzw. 1/100 M bis 1/1000 M NaF bei sauren Phosphatasen.

8. *Eine einfache Diffusion der Phosphate* während der Inkubation in die Umgebung ihrer Entstehungsorte vollzieht sich zweifellos; man vermeidet sie durch Abkürzung der Inkubationsdauer (s. auch unter 9).

9. *Diffusion des Fermentes.* Eine ungenügende Fixierung kann Diffusionsartefakte erzeugen (LISON). Andererseits haben LEMON und

WISSEMAN bessere Lokalisationsresultate ohne jede Fixation erhalten. Viel mehr ist eine zu späte Fixierung zu fürchten, und die Inkubation selbst begünstigt die Diffusion. FEIGIN und Mitarbeiter²⁵ haben kürzlich gezeigt, daß während der Inkubation ein fortschreitendes Diffundieren der Phosphatase in die Inkubationsflüssigkeit erfolgte, und daß das Ferment sekundär von den Zellkernen „gefangen“ wird. Ein Gewebe, das sonst negativ reagiert, zeigt bei Zugabe von Phosphatase zur Inkubationsflüssigkeit eine streng in den Kernen lokalisierte Schwärzung. JACOBY und MARTIN haben nachgewiesen, daß die von der Mucosa abgetrennte Duodenalmuskulatur nicht mehr die positive Phosphatase-reaktion zeigt, die bei Inkubation zusammen mit der Mucosa stets eintritt. In der Umgebung eines Herdes starker Phosphataseaktivität, wie z. B. in den Drüsen des Endometriums zeigen die Zellkerne im allgemeinen eine stärkere Fermentreaktion als andere morphologisch gleichartige, aber weiter von den Drüsen entfernt gelegene Kerne. Diese Aktivitätsvermehrung wird nicht etwa von diffundierten Phosphaten vorgetäuscht, sondern ist Ansammlung von Phosphatase, die gemäß der Klassifikation von NEWMAN und Mitarbeitern mit derjenigen des betreffenden Herdes identisch ist. Viele bisher beschriebene Kernlokalisationen könnten demnach falsch sein²⁵.

Wenn die Gewebe in gutem Lebenszustand fixiert werden und dies in einem geeignet gewählten Fixierungsmittel geschieht (Chloroform — abs. Alkohol nach unserer Erfahrung; Chloroform allein ist zu vermeiden), so ist die Diffusion des Fermentes (post mortem) nur sehr geringfügig und kann bei der Beurteilung vernachlässigt werden. Zum Teil läßt sich die *während der Inkubation* eintretende Diffusion durch einige Kunstgriffe kompensieren: Die entparaffinierten Schnitte müssen mit Kollodium behandelt werden (FEIGIN und Mitarbeiter nennen in ihrer Arbeit über Phosphatasediffusion diese Vorsichtsmaßnahme nicht). Die Inkubationsdauer muß dem Aktivitätsgrad des Fermentes angemessen sein (kurze Inkubation bei hoher Fermentaktivität). An den Kontrollstücken müssen alle Partien entfernt sein, die ihr Ferment abgeben könnten (der Knochen muß z. B. ohne Periost eingebettet werden). Die Beachtung der beiden letzten Punkte verhütet auch die Diffusion der Phosphate (vgl. unter 8).

Die Histochemie der Phosphatase erfordert eine sehr komplizierte Technik, die durch zahlreiche Kontrollverfahren ergänzt werden muß. Die Kenntnis der verschiedenen Fehlermöglichkeiten verlangt in jedem Falle eine genaueste, kritische Betrachtung. Da die Stücke dünn und verhältnismäßig wenig eingebettet sind, müssen sehr *viele Blöcke* angefertigt werden. Darüber hinaus müssen alle Bilder mit Schnitten verglichen werden, die nach den *gewöhnlichen histologischen Methoden* gefärbt worden sind, und zwar sowohl Schnitte von den Blöcken, die die

Spezialbehandlung für Phosphatase durchgemacht haben, als auch von Blöcken, die speziell zur Beurteilung des Gewebsbildes fixiert und eingebettet wurden.

Trotz aller dieser Schwierigkeiten erhält man bei exakter und gut geübter Ausführung der Technik sehr gleichmäßige Resultate (Abb. 1).

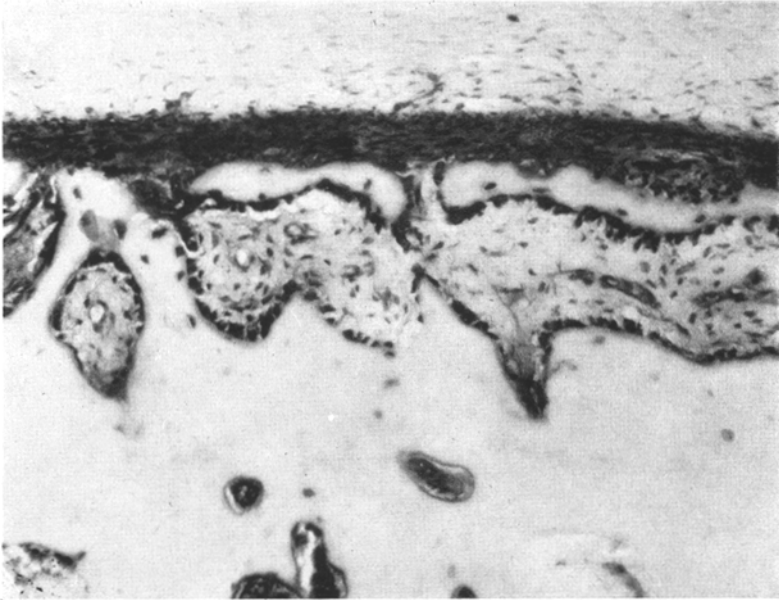


Abb. 1. Normales Knochengewebe. (Mittlere Vergrößerung. Neugeborener Hund [Nr. 4], Tibia.) Entkalkung und Einbettung nach der Methode von LOBCH. Darstellung der alkalischen Phosphatase nach GÖMÖRI. — *Oben*: Cambiumschicht des Periostes. Die Reaktion ist stark positiv und kontrastiert scharf mit der darüberliegenden Faserschicht. — *Mitte*: Markräume mit in Aktivität befindlichen Osteoblasten, die durch hohen Fermentgehalt auffallen. — *Unten*: Corticalisknochen; die Gefäßkanäle und die oberflächlich gelegenen Osteocyten sind phosphataseimprägniert.

II. Eigene Untersuchungen.

Ziel der Arbeit.

Im Hinblick auf das Verhalten der alkalischen * Phosphatase sollten 4 Prozesse der Knochenbiologie untersucht werden:

A. Die Phosphatase bei der Regeneration. Dieses Thema ist in einigen Arbeiten anderer Untersucher behandelt worden^{13, 14, 56, 64}, deren Ergebnisse wir nachgeprüft haben.

B. Die Phosphatase bei der Resorption. Im Gegensatz zu der allgemein bekannten Funktion des Fermentes bei der Ossifikation bleibt seine Bedeutung bei dem entgegengesetzten Prozeß, der Resorption, noch zu klären.

* Vgl. S. 51 über die saure Phosphatase.

C. Die Phosphatase und der „schleichende Umbau“ (*creeping replacement*). Meist wird die Auffassung vertreten, daß die Abbaukittlinien* unverschiebbliche Grenzen sind und anzeigen, wie weit der Abbau jeweils vorgeschritten war, bevor ein neuer Anbau stattfand. Andere (s. S. 40) sehen dagegen in diesen Linien den Ausdruck eines interstitiellen Wachstums im Knochen (schleichender Umbau, *creeping replacement*). Der Nachweis von Phosphatase entlang diesen Linien würde die zweite Auffassung stützen.

D. Die Phosphatase und die Onkose. Die Onkose (Definition s. S. 44) ist eine Form der Nekrobiose des Osteocyten; sie umschließt dabei aktive Prozesse wie Kernvervielfachung und periostäre Knochenauflösung. Es wäre interessant zu wissen, ob die Phosphatase an diesem Wiedererwachen der biologischen Aktivität „*sub finem vitae*“ beteiligt ist.

*Untersuchungsmaterial**.*

Zum Teil handelt es sich um *experimentelle* Untersuchungen, indem an Knochen von Meerschweinchen, Kaninchen und neugeborenen Hunden mechanisch und thermisch Läsionen erzeugt wurden. Das *menschliche* Material stammt ausschließlich von Biopsien: In einem Fall bei einer PACETschen Erkrankung, ein anderes Mal eine Pseudoarthrose und Fragmente von 2 Knochenoperationen.

Technik. Die Versuchstiere wurden mit Chloroform getötet, die Knochen präpariert und mit der Diamantscheibe unter Kaltwasserstrahl 1–2 mm dicke Scheibchen ausgeschnitten. Das *menschliche* Material wurde in der gleichen Weise in Scheibchen geschnitten und sofort nach der Entnahme fixiert. Die Untersuchung auf Phosphatase wurde mit Hilfe der oben angegebenen Technik vorgenommen***.

A. Die Phosphatase bei der Regeneration.

Die *normale Knochenbildung* haben LORCH, GREEP-FISCHER-MORSE bei verschiedenen Tiergattungen im Wachstum untersucht. Die Re-

* Die basophilen Linien, die in sehr unterschiedlicher Form und Anordnung das Knochengewebe durchziehen, sind mit den allgemein gehaltenen Ausdrücken „Kittlinien“⁹⁴, „cementing lines“⁹⁵, „lignes basophiles (ou lignes cimentantes)“ bezeichnet worden; man kann sie spezieller unterscheiden als (I) Linien, die zwei verschieden angeordnete Lamellensysteme trennen: „Abbaukittlinien“, „reversal lines“, „lignes d'érosion“ und (II) Linien, die zwischen 2 Lamellen des gleichen Systems eingeschaltet sind: „Unterbrechungskittlinien“⁹⁴ oder „Haltlinien“, „resting lines“, „lignes d'arrêt“.

** Für die Herstellung der Schnitte sei an dieser Stelle Frl. MARIANNE GOETZ herzlichst gedankt.

*** Die Orte positiver Phosphatasereaktion in den histologischen Schnitten nennen wir „*phosphatasehaltig*“ (Gehalt an Phosphatase) oder Ort von „*Phosphataseaktivität*“, ohne darin einen Unterschied sehen zu wollen. Es ist selbstverständlich, daß sich dieser Ausdruck „Aktivität“ auf die „optimalen“ Verhältnisse bezieht, die durch die Technik der histochemischen Untersuchung künstlich geschaffen werden (p_H -Optimum, hohe Konzentration an Substrat, Gegenwart von Aktivatoren). Insofern kann diese Aktivität im histologischen Schnitt nicht dem Begriff der Aktivität, wie sie in einem lebenden Gewebe herrscht, gleichgesetzt werden. Nur die Orte der Enzymgegenwart sind derart vergleichbar.

generation des Knochens im Anschluß an eine experimentell gesetzte Läsion ist dagegen erst wenig bekannt. Zwar hat BOURNE bereits 1943 dieses Thema auf Grund von Untersuchungen am Kaninchen behandelt, indem er die Regeneration von Borlöchern verfolgte; jedoch bediente er sich einer Technik, die weniger präzise ist als diejenige von LORCH (S. 9).

Erst im Laufe unserer eigenen Untersuchungen haben wir von der Arbeit von McKELVIE und MANN⁶⁴ Kenntnis bekommen. Sie arbeiten nach der Methode von LORCH und machen vorläufige Mitteilungen über die Entwicklung von Knochenautotransplantaten an der Tibia des Kaninchens. Wir behandeln ihre Ergebnisse weiter unten.

Die bis heute gewonnenen Kenntnisse über die Histochemie der Phosphatase bei der normalen und pathologischen Knochenbildung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Im *Periost* findet man das Maximum der Fermentaktivität im Bereich der tiefen Zellschicht, wo sie sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma erscheint. Des weiteren findet sich Phosphatase in den kollagenen Fasern^{58, 64}. In den faserigen Lagen des Periostes nimmt die Fermentaktivität schnell ab, und die äußerste Schicht enthält nur noch in den Kernen Spuren des Fermentes.

Das *Endost* und die die *HAVERSSchen Kanäle auskleidende Zellschicht* sind ebenso phosphataseaktiv wie das Cambiumblatt des Periostes.

In den *Osteocyten* findet sich Phosphatase nur in den jungen, den Knochenoberflächen nahegelegenen Knochenzellen, die älteren Osteocyten enthalten kein Ferment.

Enchondrale Ossifikation. Die Knorpelzellen, die normalerweise negativ reagieren, werden im Stadium der hypertrophischen Säulen sehr stark fermenthaltig. Es ist dies eine Analogie zum Verhalten des Periostes, bei dem die Entwicklung der Fibroblasten (äußere Schicht) zu Osteoblasten (Keimschicht) vom Erscheinen der Phosphatase begleitet ist.

Die *Knochengrundsubstanz* des erwachsenen Knochens enthält kein Ferment mit Ausnahme der Stellen, die auf dem Wege der Verkalkung sind (LORCH, Arbeit im Druck; zit. nach²⁰).

Bei der *Reparation* erscheint das Ferment zunächst (1. Tag) in den Wanderzellen, später (vom 3. Tage an) in den knochenbildenden Zellen. Bei Vitamin-C-Mangel wird der Prozeß verlangsamt (BOURNE¹⁴). Nach Anderen tritt das Ferment erst nach 10—12 Tagen auf.

Wir untersuchten die *Regeneration* des Knochens nach experimentell erzeugten Läsionen und stellten uns dabei zur Aufgabe, die folgenden Punkte genauer zu klären:

1. den Zeitpunkt des Auftretens der Phosphatase;
2. die Beziehung der Phosphatase zur Grundsubstanz (Osteoid und Kalk);
3. die Phosphatase im Lebenscyclus des Osteocyten;
4. die Phosphatase bei der Osteonekrose.

Untersuchungsmaterial.

a) Bei 20 erwachsenen männlichen und weiblichen *Meerschweinchen* haben wir mit einer diamantbesetzten Scheibe, die durch kontinuierliche Berieselung mit destilliertem Wasser gekühlt wurde, Längsschnitte in der Tibia erzeugt. Auf diese Weise erhielten wir 10—15 mm lange, 1—2 mm breite Spalte, die die ganze Corticalis vom Periost bis zum Mark durchtrennten. Die Tiere wurden am 1., 2., 3., 14. und 21. Tag nach dem Eingriff getötet.

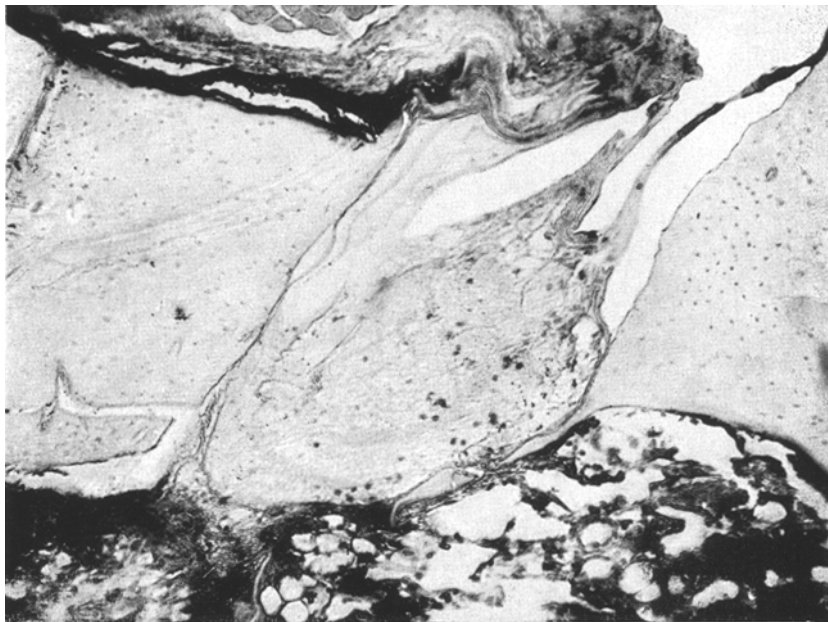


Abb. 2. Histochemie der alkalischen Phosphatase bei der Knochenregeneration (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Meerschweinchenknochen. Tibiaquerschnitt, die 24 Std zuvor mit der Diamantscheibe längsgespalten wurde. Lupenvergrößerung. — *Bildmitte*: Die Spalte ist von einem mit Leukocyten durchsetzten Blutgerinnsel ausgefüllt. — *An beiden Seiten* die Corticalis, deren Periost oben im Bilde, besonders links, als dicker schwarzer Strich erscheint. — *Unten*: Sehr fermentreiches Mark. — Zu beachten das Fehlen der Phosphataseaktivität im engeren Bereiche der Spalte (vgl. Text, S. 19).

Die gleiche Operation wurde ausgeführt:

b) An Tibia und Radius von 4 neugeborenen *Hunden*. Bei diesen wurden die Stadien des 7., 14. und 23. Tages untersucht.

c) Am Os metatarsale I von 2 jungen *Kaninchen* (1200 g); das eine wurde am 2., das andere am 6. Tage getötet. Die äußeren Metatarsalknochen dienten als Kontrolle.

Um Nekrosen größerer Ausdehnung und einen erheblicheren Knochenumbau zu erhalten, haben wir:

d) Bei 3 neugeborenen *Hunden* *Hitzenekrosen* erzeugt: Das Periost des Radius wurde bloßgelegt und während 30 sec mit einer auf 100° C erhitzten Metallfläche in Kontakt gebracht. Die Temperatur wurde durch einen elektrisch geheizten Refraktärstein auf gleicher Höhe gehalten. Die Untersuchung erfolgte nach 1 Std., 4. und 7. Tage.

Beschreibung der Befunde.

a) *Mechanische Schäden am Meerschweinchen.* Nach 24 Std ist die Spalte von einem Blutgerinnsel ausgefüllt. Es findet sich noch keine celluläre Reaktion; mit Ausnahme einiger positiv reagierender Leukocyten ist keine Phosphatase nachzuweisen. — Periost und Endost erscheinen als schwarze Bänder, die an der Stelle der Verletzung jeweils unterbrochen sind. In den Gefäßkanälen der beiden gegenüberliegenden Knochenränder herrscht die normale Enzymaktivität (Abb. 2).

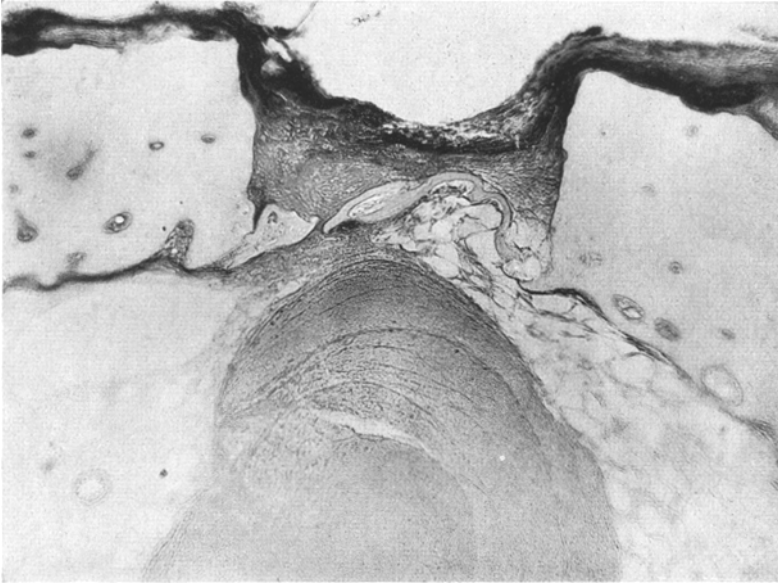


Abb. 3. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Kaninchen. Querschnitt eines Mittelfußknochens, der 48 Std zuvor längsgespalten wurde. Lupenvergrößerung. — *Bildmitte:* Die gesetzte Spalte. — *Unten:* Hämatom im Markraum. — *Oben:* Periost, Beginn der Regeneration mit starker Phosphataseaktivität. In den Gefäßkanälen der Corticalis beginnt die Phosphatase zu schwinden (vgl. die Abb. 8 und 9, wo das Ferment ganz aus diesen verschwunden ist).

Nach 48 Std findet man sowohl im Periost als auch im Endost in der Umgebung des Einschnittes eine Zellanhäufung, deren Kerne und Cytoplasma eine ausgesprochene Phosphataseaktivität zeigen. Am Endost sieht man bereits hier und da Anfänge fibrocapillärer Resorption und die beginnende Osteoblastenwucherung; beide Prozesse sind von Phosphataseaktivität begleitet. In den Gefäßkanälen, die dem Einschnitt nahe liegen, ist die Fermentreaktion weniger stark positiv als in den weiter entfernten. Die Kerne aller lebendigen Osteocyten färben sich regelmäßig braun, aber dasselbe ist in den Kontrollschnitten zu finden. Hier handelt es sich also um ein Artefakt infolge der Affinität des Osteocytenkerns zu den Kobaltsalzen, ein Verhalten, das besonders im Meerschweinchenknochen auffällt. An den Rändern des Einschnittes sind die Osteocyten nicht mehr zu sehen, und bei gewöhnlichen Färbemethoden erscheinen sie nekrotisch. Auf der Oberfläche des nekrotischen Knochens beginnt bereits stellenweise eine feine strichförmige Ablagerung von phosphataseaktivem Osteoid, die deutlich mit der darunter liegenden negativ reagierenden Corticalis kontrastiert.

Nach 3 Tagen: Die Periostwucherung hat sich an beiden Seiten der Spalte ausgedehnt, und ihr entsprechend findet sich eine starke Phosphataseaktivität.

Nach 6 Tagen: Im Bereich des Einschnittes und an beiden Knochenhäuten geht eine lebhaft Knochenneubildung vor sich: Verzweigte osteoide Wucherungen mit sehr schwach reagierender Grundsubstanz beherrschen das Bild. Die darin eingeschlossenen Osteocyten sind schwarz.

Nach 14 Tagen: Die Spalte ist jetzt mit groben Knochenbälkchen ausgefüllt, deren Ränder mit Osteoblasten besetzt sind. Die Verteilung des Fermentes in den Zellen ist die gleiche wie im Stadium des 6. Tages; die Reaktion der Grundsubstanz ist jedoch intensiver.

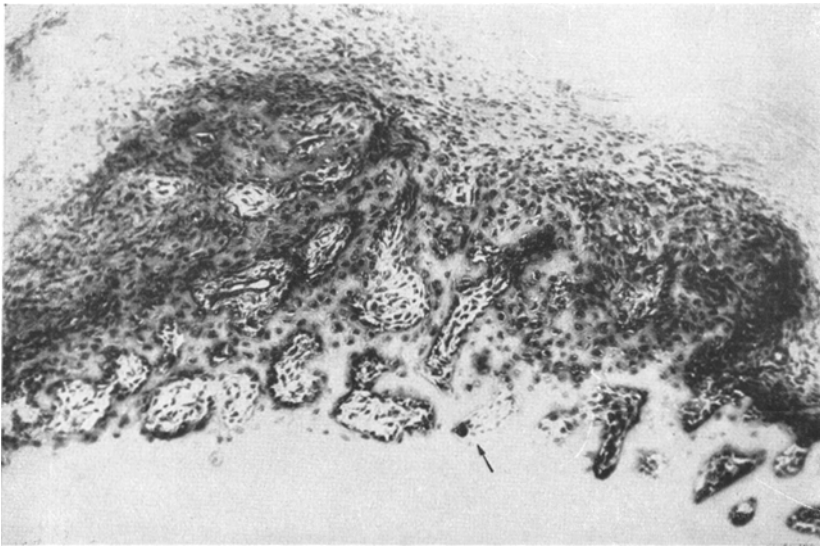


Abb. 4. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Kaninchen. Querschnitt durch einen Mittelfußknochen, der 6 Tage zuvor mit der Diamantscheibe längsgespalten wurde. Mittlere Vergrößerung. Vom Periost ausgehende Osteophyten in der Umgebung der Spalte. — Unten: Nekrotische Corticalis. Zuzufolge Phosphataseverlustes sind die Gefäßkanäle nicht zur Darstellung gelangt. Beachte die Fermentimprägnation sowohl in den Zellen als auch in der Grundsubstanz der Osteophyten (Bildmitte). Der Pfeil weist auf einen sehr phosphatasereichen Osteoclast (stark vergrößert in Abb. 16. Text, S. 21 und 30).

Nach 21 Tagen: Das Knochenregenerat gibt sich durch seinen größeren Zell- und Gefäßreichtum zu erkennen. Die Grundsubstanz und die in ihr eingeschlossenen, jetzt „alten“ Osteocyten haben ihre Fermentaktivität verloren.

b) *Mechanische Verletzungen beim Hunde.* Die Entwicklung des Herdes ist ähnlich wie beim Meerschweinchen (Abb. 5—7); es besteht nur der Unterschied, daß die osteoiden Ränder der in Verkalkung befindlichen jungen Osteophyten negativ reagieren, während die mittlere Partie des Bälkchens phosphataseaktiv erscheint (Abb. 6).

c) *Mechanische Beschädigung am Kaninchenknochen.* Stadium nach 48 Std (Abb. 3): Man sieht das innerhalb der Markhöhle ausgebreitete Hämatom. Die Reparation hat bereits eingesetzt und erscheint als massive Zellbildung mit sehr intensiver Phosphatasereaktion. Hingegen ist das Endost nicht aktiv und dicht am Einschnitt ist der Enzymgehalt sogar vermindert.

Nach 6 Tagen hat sich vom Periost aus eine knochenbildende Schicht entwickelt, die ebenso dick ist wie die gesamte Corticalis (Abb. 4). Die Cambiumschicht, aus der die Osteophyten entstehen, ist außerordentlich reich an Phosphatase. Auch die Osteophyten reagieren positiv, und zwar in ihren Spitzenausläufern stärker als an der Basis. Zwischen den Osteophyten finden sich Stellen hyalinen Knorpels, welcher hypertrophisch aussieht und ebenfalls einen sehr hohen Phosphatasegehalt besitzt. Im Bereiche des halben Knochenumfangs, mit dem Einschnitt als Scheitel, ist die Corticalis in ihrer gesamten Dicke nekrotisch. In den Gefäßen des nekrotischen Bezirkes fehlt die Reaktion überall; nur die neugebildeten perforierenden Gefäße reagieren positiv.

d) *Hitzeschäden beim Hund.* Nach 1 Std. zeigt der Diaphysenquerschnitt, daß im Bereiche der Wärmewirkung jede Phosphataseaktivität aufgehört hat (Abb. 8). Dies ist die selbstverständliche Folge der weit oberhalb der Hitzeresistenzgrenze liegenden Temperatur von 100° C. Es ist interessant, daß das mit der histochemischen Methode erhaltene Bild kein Äquivalent in den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten besitzt: Die Einwirkung einer Temperatur von 100° bewirkt Koagulation der Osteocyten — einen wirklichen Fixationsprozeß —, den die gewöhnlichen Färbungen nicht besonders erkennen lassen.

Nach 7 Tagen (Abb. 9) befindet sich die nekrotische Zone in Sequestrierung. Sie wird nicht resorbiert, sondern nach außen abgestoßen, und der Defekt wird wieder durch Corticalis ersetzt. Im nekrotischen Knochen ist nicht die Spur einer Fermentaktivität vorhanden (er ist auf der Abbildung kaum sichtbar!); das neugebildete Gewebe hingegen ist stark imprägniert und die Grenze zwischen beiden sehr scharf, ohne daß sich Zeichen von Diffusion nachweisen lassen.

Diskussion.

1. Zeitpunkt des Auftretens der Phosphatase im Knochenregenerat.

Die ersten Zellwucherungen, die durch Phosphatasereichtum auffallen, sind nach 48 Std im Periost und Endost sichtbar.

BOURNE fand das Ferment am 3. Tag. LIVOTI erhielt erst nach 16 Tagen ein positives Resultat. Anscheinend hatte der Autor keine Kenntnis der Methode von LORCH und bediente sich einer Technik, bei der die Stücke nicht entkalkt wurden. MCKELVIE und MANN verzeichnen das erste Phosphataseerscheinen am 10.—12. Tag, was wahrscheinlich zu spät ist. Sie sehen in diesem späten Auftreten eine „Latenzzeit“, die dem Hämatom, dessen saure Reaktion eine hemmende Wirkung bedinge, zuzuschreiben sein soll. Diese etwas vereinfachende Erklärung ist häufig in der Literatur zu finden. SWENSON und LLOYD-CLAFF⁹² bestreiten die saure Reaktion des Frakturhämatoms. Jedenfalls haben wir in unseren Schnitten das Ferment sehr frühzeitig in unmittelbarer Nähe des Hämatoms auftreten gesehen (Abb. 3).

BOTTERELL und KING¹² bestimmten die Phosphatase in den Frakturherden quantitativ und fanden, daß das Ferment vom 4. Tage an etwas und vom 8. Tage an stark zunimmt. Demgegenüber erscheint das Ferment im histochemischen Präparat frühzeitiger. Vielleicht ist es so, daß die Zunahme der Phosphatase im Bereich des Periostes und Endostes bei der Gesamtbestimmung zunächst deshalb nicht erfaßt wird, weil das

Ferment im nekrotischen Bezirk verschwunden ist und dieser Verlust erst kompensiert werden muß, bevor es bei chemischer Bestimmung zu einem Ansteigen des Fermentspiegels kommen kann.

2. Die Beziehung der Phosphatase zur Grundsubstanz.

In bezug auf das Interstitium sind die mit der Methode von LORCH-GÖMÖRI erhaltenen Bilder außerordentlich schwierig zu interpretieren. *Nur eines kann als sicher angenommen werden; Dort, wo keine Reaktion*

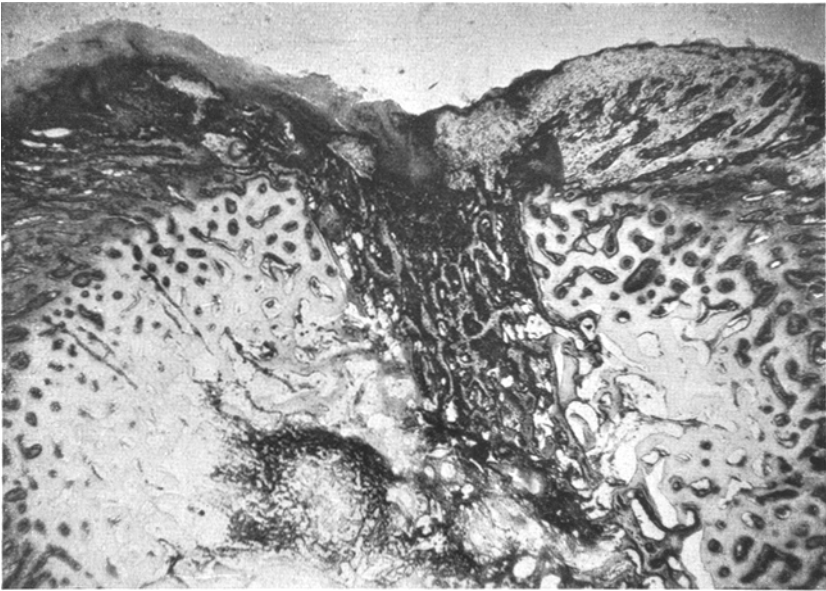


Abb. 5. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Neugeborener Hund (Nr. 1). Querschnitt durch die Tibia, die 7 Tage zuvor längsgespalten wurde. Mittlere Vergrößerung. — Im Bereich der Spalte intensive Regenerationsvorgänge mit erhöhter Phosphataseaktivität. — Beachte die starke Reaktion im peripheren Abschnitt der Corticalis, am Orte des exzentrischen Knochenwachstums (oben, links und rechts der Spalte).

eintritt, findet sich auch kein Ferment. Umgekehrt bedeutet eine positive Phosphatasereaktion aber noch längst nicht immer, daß an der betreffenden Stelle auch physiologischerweise die Phosphatase wirklich extracellulär vorgelegen hat. Doppelt begründete Zweifel bestehen: 1. kann es sich um Fermentdiffusion vom Endost oder Periost her und 2. auch um Imprägnation mit Phosphaten, die während der Inkubation aus der Umgebung einwandern, gehandelt haben.

Zum Zwecke der Erkennung tatsächlicher *Diffusionsartefakte* sind wir ähnlich wie FEIGIN-WOLF-KABAT und JACOBY-MARTIN (S. 13/14) vorgegangen: Von einer Anzahl Rattenrippen wurden die einen mit belassenem Periost, die anderen nach sorgfältiger Entfernung der

Knochenhaut entkalkt und in Paraffin eingebettet. Abb. 23 zeigt das Resultat: Dort, wo das Periost belassen worden war, reagiert die unterliegende Grundsubstanz schwach positiv, und es finden sich viele positiv reagierende Osteocyten. Dagegen findet sich dort, wo das Periost entfernt wurde, keine interstitielle Imprägnation, und positiv reagierende

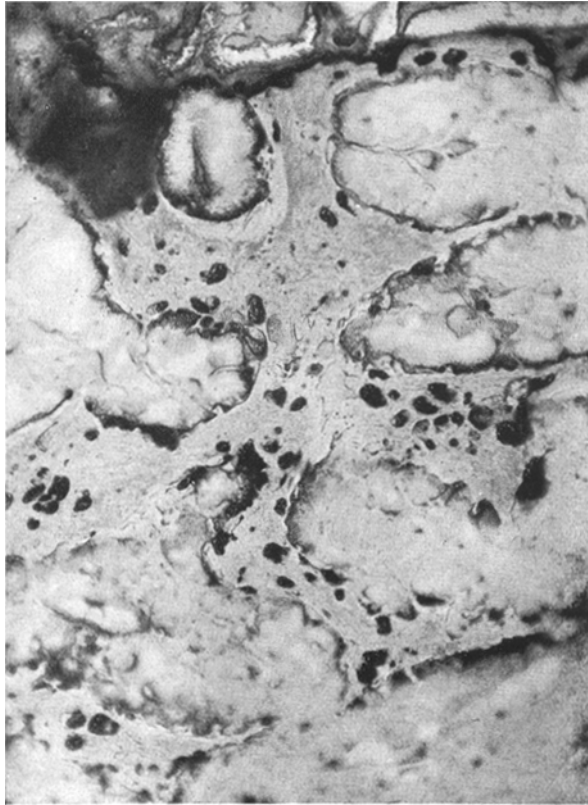


Abb. 6. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Gleiches Präparat wie Abb. 4. Starke Vergrößerung eines Osteocyten in der Spalte. — Die einzelnen Osteocyten zeigen einen hohen Enzymgehalt. Die Knochengrundsubstanz ist nur schwach imprägniert. Beachte den hellen osteoiden Rand, besonders links oben (vgl. Text, S. 20).

Osteocyten sind viel seltener. Es besteht also kein Zweifel, daß die Diffusion hier ebenso vor sich geht wie in anderen Geweben, und zwar nicht nur der Phosphatase, sondern auch der Phosphate; den letzteren wird die Diffusion durch die besondere Affinität der Grundsubstanz sicherlich noch erleichtert. — Infolgedessen erlauben im Bereiche der interstitiellen Substanz nur negative Bilder den Schluß, daß hier kein Ferment aktiv war.

Unter Berücksichtigung dieses Kriteriums haben wir einen interessanten *Unterschied zwischen physiologischer endo- und periostaler Apposition und der regenerativen Knochenneubildung* gefunden:

Im Appositionswachstum des physiologischen Umbaus zeigt der gerade in Neubildung befindliche Knochen (z. B. die osteoiden Ränder)



Abb. 7. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Neugeborener Hund Nr. 4. Tibiaquerschnitt. Mittlere Vergrößerung. Vom Periost ausgehende Osteophyten in der Umgebung der Spalte. — *Oben*: Die Cambiumschichte des Periostes mit intensiver Phosphatasereaktion. — *Unten*: Corticalis mit Gefäßkanälen. — *Bildmitte*: Langgestreckte Osteophyten mit positiv reagierenden Osteocyten, während die Knochenzellen in der Corticalis keine Phosphatasereaktion zeigen (Text, S. 20).

stets positive Reaktion, und zwar um so mehr, je jünger die Bildung ist. Wenn dagegen — und das ist bei der Regeneration der Fall — die Knochenbildung beschleunigt vor sich geht, reagiert die neugebildete Grundsubstanz zunächst negativ und imprägniert sich erst später mit Phosphatase (z. B. beim Meerschweinchen und Hund; nicht beim Kaninchen). Das besagt nicht, daß zwischen normaler und regenerativer

Verknöcherung ein eigentlicher, biochemischer Unterschied besteht. In der Regeneration treten durch den beschleunigten Rhythmus Phasenverschiebungen von Prozessen auf, die normalerweise zeitlich sehr eng aufeinanderfolgen oder sich erst gleichzeitig abspielen: die Bildung der Grundsubstanz und die Einlagerung des Calciums. Diese Analyse der Komponenten erlaubt aber den Schluß, daß die Phosphatase bei dem

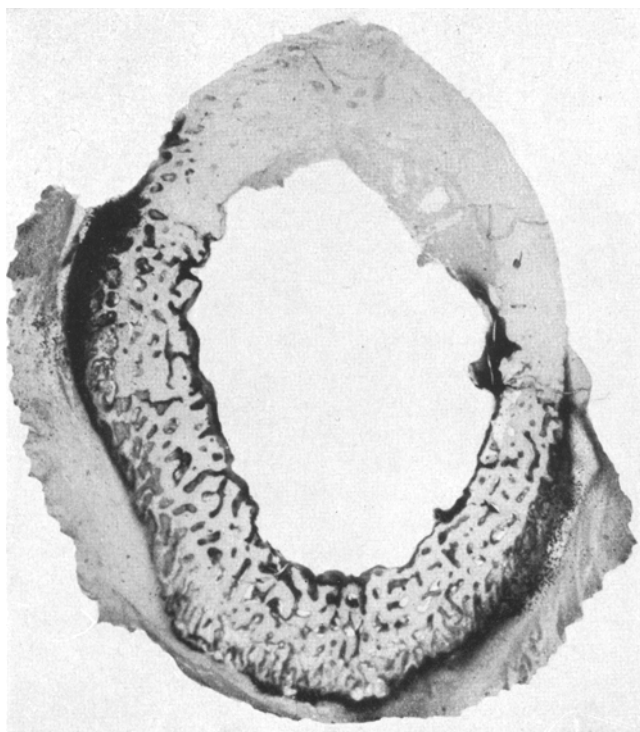


Abb. 8. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Neugeborener Hund Nr. 5. Tibiaquerschnitt. Lupenvergrößerung. Die helle Zone (rechte Bildhälfte) entspricht der 60' zuvor erfolgten Applikation einer auf 100° C erhitzten Metallfläche während 30 sec. In diesem Bereich ist das Ferment nicht mehr aktiv (vgl. Text, S. 21).

Prozeß der Calcifikation in viel größerem Maße beteiligt ist als bei der Bildung der Grundsubstanz.

Eine sichere Interpretation der vorübergehenden, aber regelmäßig auftretenden positiven Reaktion der neugebildeten Grundsubstanz läßt sich an Hand der Methode von GÖMÖRI nicht geben. Immerhin ist der Gegensatz zu dem stets negativen Ergebnis beim erwachsenen Knochen bemerkenswert.

Die Annahme, daß die Phosphatase auch eine bestimmte Rolle bei der *Bildung kollagener Fasern* spiele, ist noch nicht bewiesen. DANIELLI

und FELL^{22, 23, 26} sehen in dem gleichzeitigen Auftreten von Phosphatase und kollagenen Fasern, wie es im Laufe der Vernarbung von Hautwunden gesehen wird, einen Hinweis auf den Zusammenhang des Fermentes mit der Kollagenbildung. Die Untersuchung des Knochens liefert zu dieser Annahme keinen weiteren Beweis. Im Knochengewebe ist die Anwesenheit der Phosphatase bereits durch ihre unbestrittene Funktion bei der Verkalkung genügend erklärt, und andererseits ist die Affinität der Grundsubstanz für Phosphor und Calcium bei der Methode von GÖMÖRI stets eine unvermeidbare Ursache für Artefakten.

Die Phosphatase und der Lebenscyclus der Knochenzelle. Bei der Untersuchung der Knochenregeneration haben wir dasselbe gefunden, was bereits von anderen Untersuchern für das physiologische Wachstum beschrieben wurde; daß nämlich der junge Osteocyt, ebenso wie sein Stammvater der Osteoblast, noch Ferment enthält. In dem Maße aber, in dem die Knochenzelle von der peri- oder endostalen Oberfläche weg in die Tiefe rückt und altert, geht ihre Enzymaktivität verloren. Daß es sich bei der positiven Reaktion in den den Knochenhäuten zunächst gelegenen Osteocyten nicht nur um einen Artefakt infolge Diffusion von der Oberfläche (gemäß den Angaben von FEIGIN und Mitarbeitern), wurde im vorigen Abschnitt (S. 22) auseinandergesetzt, indem wir zeigten, daß dieses Bild den reellen Fermentverhältnissen entspricht und durch den Diffusionsartefakt nur verstärkt erscheint.

Man darf also schließen, daß die Beteiligung der Phosphatase an der Knochenbildung gemäß einem bestimmten Reaktionscyclus vor sich geht.

Im Bindegewebe und im erwachsenen Knorpel findet sich keine Phosphatase; sobald sich aber in diesen Geweben die Verknöcherung vorbereitet, tritt das Ferment in Erscheinung. Die positiven histochemischen Bilder im Bereiche des Periostes und des hypertrophischen Knorpels zeigen das Auftreten der Phosphataseaktivität als eine der ersten Äußerungen der sich vorbereitenden Verknöcherungsfunktion.

Die Tatsache, daß die junge Knochenzelle noch Ferment enthält, der erwachsene Osteocyt dagegen, genau wie Bindegewebe oder Knorpel, keine aktive Phosphatase mehr besitzt, macht offenbar, daß die Phosphatase, nachdem sie ihre Rolle bei der Knochenbildung gespielt hat, für den Stoffwechsel des fertigen Knochens nicht mehr erforderlich ist. Wir kommen auf dieses Verhalten im Kapitel über die Onkose zurück, wo wir die Frage besprechen werden, ob es sich hierbei um einen wirklichen Verlust des Fermentes oder nur um dessen reversible Inaktivierung handelt; denn das Wiedererscheinen der Phosphatase während der Nekrobiose der Knochenzelle (Onkose) läßt eine Reaktivierung vermuten.

Die Phosphatase und die Nekrose des Knochens. Im nekrotischen Knochen ist keine Phosphatase mehr nachzuweisen. Während das Ferment aus den Osteoblasten und den jungen Osteocyten verschwindet,

sehen wir zu gleicher Zeit sein Erscheinen in den Regenerationsherden; beides läßt sich bereits nach 48 Std beobachten.

Das Enzym ist aus dem abgestorbenen Knochen verschwunden und wir finden es nur noch an den Randgebieten, wo perforierende Gefäße entstehen und dort, wo Osteoclasten Abbautätigkeit entfalten. Wenn es überhaupt eine allgemeine diffuse Knochenauflösung gibt, so kann sie nur durch andere Mechanismen geschehen, bei denen jedenfalls keine Phosphatase beteiligt ist. Die gegenteilige Behauptung von MCKELVIE und MANN, die eine diffuse positive Fermentreaktion bei in Resorption

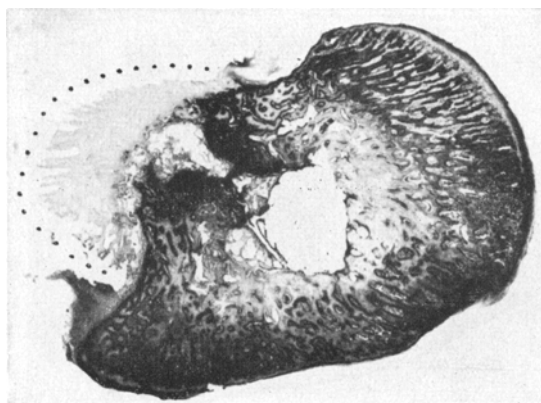


Abb. 9. Knochenregeneration. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Neugeborener Hund Nr. 7. Radiusquerschnitt am Orte der 7 Tage zuvor erfolgten 30 sec langen Applikation einer auf 100° C erhitzten Metallfläche. Lupenvergrößerung. Die geschädigte Knochenpartie (links oben) zeigt keine Fermentreaktion und befindet sich in Sequestrierung. Unterhalb des Sequesters finden sich 2 Zonen mit sehr starker Fermentaktivität, die die Wiederherstellung der Corticaliskontinuität anzeigen (Text, S. 21).

befindlichen Transplantaten gesehen haben, erscheint uns nicht überzeugend, da wir wissen, daß die Schwärzung der Grundsubstanz bei der Methode von GÖMÖRI auch durch einen Artefakt zustande kommen kann. Zudem haben wir in unseren Präparaten niemals eine positive Phosphatasereaktion erhalten, sei es in durch Fraktur, Fissur oder durch Hitze entstandenen Nekrosen.

Es ist interessant, hierbei das Verhalten der Knochennekrose mit den Nekrosen der Weichgewebe zu vergleichen, bei denen tatsächlich im allgemeinen eine Phosphataseimprägnation stattfindet³². Der tote Knochen verliert seine Phosphatase und stimuliert das umgebende Mesenchym zu einer nicht-entzündlichen Reaktion (Resorption und Osteogenese). Die Nekrosen der weichen Gewebe verursachen in der Umgebung eine entzündliche Reaktion und imprägnieren sich mit Phosphatase. GÖMÖRI nimmt an, daß es sich dabei um eine Adsorption handelt³².

Die Onkose als besondere Form der Osteocytennekrose behandeln wir im Abschnitt V gesondert, da sich in bezug auf die Phosphatase einige Besonderheiten ergeben.

B. Die Phosphatase bei der Resorption.

Seitdem ROBISON (1922) eine Verbindung der alkalischen Phosphatase mit dem Mechanismus der Knochenbildung entdeckt hat, ist die Funktion des Fermentes fortan einstimmig als zur Osteogenese gehörig aufgefaßt worden: Wenn auch die Theorien über die Wirkungsweise im einzelnen gewisse Wandlungen erfahren haben, so bleibt doch die Phosphatase das unbestrittene *Calcifikationsenzym**.

Da bereits über den Prozeß der Knochenbildung keineswegs in allen Punkten Klarheit herrscht, ist es nicht verwunderlich, daß der gegen-
teilige Vorgang der Knochenresorption kaum oder nur wenig aufgeklärt ist, wenigstens was die Rolle der Phosphatase anbetrifft. Oft ist die Acidose zur Erklärung der Mineralauflösung herangezogen worden, aber kein Schema der Phosphataseaktivität trägt bisher der Rolle dieses Fermentes bei der Resorption des Knochens Rechnung.

Nichtsdestoweniger bleibt die doppelsinnig — synthetisch und lytisch — wirkende Aktion ein Postulat des Fermentgeschehens, von dem auch die Phosphatasen keine Ausnahme machen. JEAN ROCHE drückt sich in einem kürzlichen Überblick folgendermaßen aus: „Die Bildung von Phosphorsäureestern unter Einwirkung der alkalischen Phosphatase gehört zu den charakteristischsten enzymatischen Synthesen und ist so bezeichnend, daß das Anstellen dieser Reaktion in verschiedenen Lehrbüchern als Übung in praktischen Kursen vorgeschlagen worden ist. Die Zahl der durch Fermentsynthese erhaltenen Ester ist außerordentlich groß . . .“ Man könnte sich nicht treffender ausdrücken.

Wenn die Phosphatase tatsächlich auch die Reaktionen des Knochenabbaues katalysiert**, so ist es wenig wahrscheinlich, daß die quantitative Bestimmung des Fermentgehaltes in einem Knochenfragment über die Beteiligung der Phosphatase bei der Resorption im speziellen Aufschluß geben kann. Apposition und Resorption spielen sich zu gleicher Zeit im gleichen Knochen ab und verflechten sich in einem Maßstab, der nur im mikroskopischen Bilde erkannt werden kann. Hier können die Ergeb-

* Nur wenige Untersucher haben die Rolle der Phosphatase auch in anderer Hinsicht betrachtet (s. 6) und eine Beteiligung an der Ablagerung der organischen Grundsubstanz angenommen.

** Es sei hier daran erinnert, daß die *Bildung* des Knochens mit einer *lytischen* Tätigkeit der Phosphatase einhergeht (Lyse der Phosphorsäureester); im Gegensatz dazu entspräche der *Osteolyse* eine *synthetische* Fermentaktion (Resynthese der Ester).

nisse der Histochemie wichtig werden, und aus diesem Grunde haben wir uns vorgenommen festzustellen, ob die Phosphatase in Resorptionsherden anwesend ist.

Knochenresorption kann sich auf verschiedene Weise vollziehen. In klassischer Weise unterscheidet man:

1. Die *lacunäre Resorption*, die einerseits unter Beteiligung von mehrkernigen Riesenzellen (Osteoclasten), andererseits auch durch osteoclastenähnliche Zellen erfolgt. An Stellen von Knochenauflösung erscheint das Endost oft hyperplastisch oder sogar fibrös.

2. Die *vasculäre Resorption*, bei der der Knochen von „perforierenden“ Capillaren durchbrochen wird, die von einer sehr verschiedenen dicken fibro-cellulären Adventitia begleitet sind. (Um zu vereinfachen, sprechen wir im folgenden von „*Osteoclasie*“ und — im Gegensatz dazu — von „*fibrocapillärer Resorption*“, unter welcher die anderen Resorptionsmodalitäten, deren Wesen sehr verwandt ist, verstanden werden.)

3. Die *Halisterese*. Während die unter 1. und 2. genannten Vorgänge gleichzeitig die organische Grundsubstanz und die Mineralsalze betreffen, interessiert die Halisterese zunächst den Mineralanteil allein. Einen solchen Prozeß, für dessen Eigenart heutzutage LERICHE und POLLICARD⁵⁴ eintreten, hielt v. RECKLINGHAUSEN seinerzeit für die Grundlage der Skeletentkalkung bei Rachitis und Osteomalacie.

Das einzige mit Sicherheit identifizierbare Bild der Knochenresorption sind die Osteoclasten, und wir können uns nicht denjenigen anschließen, die den Osteoclasten die Beteiligung an der Resorption absprechen (nach HÄGGQUIST erfolgt das Auftreten der Osteoclasten sekundär, im Anschluß an den osteolytischen Prozeß).

In unseren Präparaten menschlichen und tierischen Knochens haben wir deshalb in erster Linie die Osteoclasie in Betracht gezogen.

a) Tierexperimentelles Untersuchungsmaterial.

Das *Meerschweinchen* eignet sich schlecht für solche Untersuchungen. Verschiedene Beobachter haben auf die Seltenheit der Osteoclasten beim Meerschweinchen hingewiesen (H. KIND). Andererseits sind auch die cytologischen Bilder, die wir beim Meerschweinchen und auch beim *Hunde* erhalten haben, weniger klar als beim *Kaninchen*. Infolgedessen haben wir bei Hunden und Meerschweinchen keine befriedigenden Schlüsse über die Beteiligung der Phosphatase an der Osteoclasie ziehen können. Es sei deshalb nur gesagt, daß die wenigen Osteoclasten, die mit Sicherheit zu identifizieren waren, 6 Std nach der Inkubation eine schwache Phosphataseaktivität ihres Cytoplasmas und des Zellkernes zeigten, und daß die Nucleolen am stärksten geschwärzt waren.

Beim *Kaninchen* hingegen sind die Resultate sehr klar. Technik und Material sind oben beschrieben worden (S. 18). Hier sei dazu ergänzt,

daß nach 6 Tagen die Osteoclasten am Orte der Regeneration sehr zahlreich und gut zu erkennen waren. Man sieht sie meistens in der Umgebung des Ursprunges der vom Periost ausgehenden osteoiden Sprossen, wo sie an der Oberfläche der Corticalis zwischen den Ver-

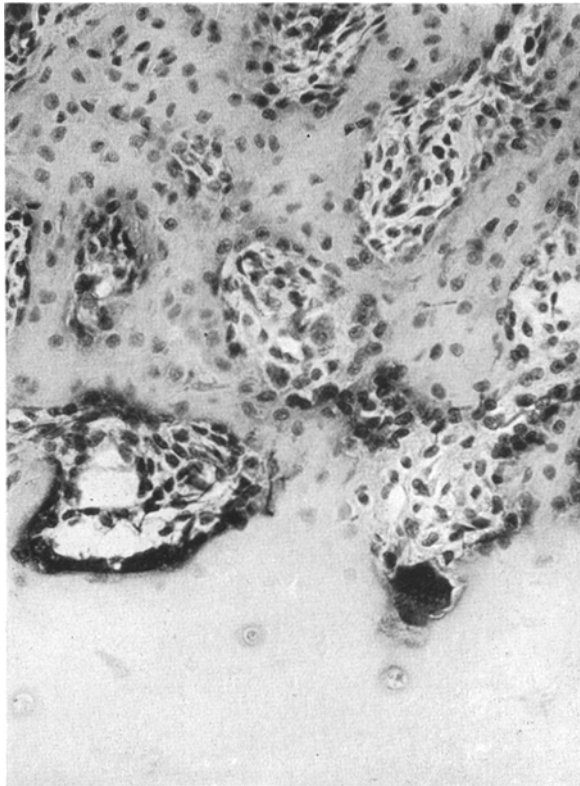


Abb. 10. Knochenresorption. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Kaninchen. Schnitt durch einen Metatarsalknochen, in der Nähe einer 6 Tage zuvor mit der Diamantscheibe gesetzten Spalte. — Unten: Die nekrotische Corticalis. — Oben: Sub-periostale Osteophyten. Beachte den hohen Fermentgehalt des an der Corticalis (rechts unten) nagenden Osteoclasten. In der Markhöhle (Bildmitte links) positive Fermentreaktion des auskleidenden Endostes; möglicherweise handelt es sich hier um ein Bild fibrocapillärer Resorption (vgl. Text, S. 31). Alle jungen Osteocyten reagieren positiv.

zweigungen der Osteophyten nagen (Abb. 10—12). Schon bei Lupenvergrößerung fallen sie als schwarze Punkte auf, die Orten starker Phosphataseansammlung entsprechen (Abb. 4, s. Pfeil). Wenn wir sie mit den Osteoblasten vergleichen, so sehen wir, daß die Kerne der Osteoclasten und auch ihr Cytoplasma nicht weniger intensiv geschwärzt sind als die umliegenden Osteoblasten. Die Imprägnation kann im Extrem (und nach 14stündiger Inkubation) so weit gehen, daß jedes

Detail der Zellstruktur verdeckt ist. Überblickt man die Intensität der Reaktionen im Cytoplasma und in den Kernen als Ganzes, so ist man erstaunt zu sehen, daß überall in den Osteoclasten mindestens ebenso starke Schwärzung aufgetreten ist wie in den Osteoblasten, bisweilen sogar noch intensiver (Abb. 10 und 11): Letzteres betrifft besonders die in den HOWSHIPschen Lacunen gelegenen Osteoclasten. Dort, wo ein Osteoclast der Grundsubstanz anliegt, ist deren Rand scharf — dies findet sich besonders in den Lacunen — und bisweilen zeigt der Knochen-



Abb. 11. Knochenresorption. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Kaninchen. Schnitt durch einen Metatarsalknochen in der Nähe einer 6 Tage zuvor mit der Diamantscheibe gesetzten Spalte. Starke Vergrößerung. — Unten: Die nekrotische Corticalis. — Bildmitte: Resorptionsherd mit einem in der Spitze des Ausläufers befindlichen Osteoclasten. Man vergleiche seinen Phosphatasegehalt mit dem der Osteoblasten (Text, S. 30).

rang an dieser Stelle einen feinen schwarzen Saum. Es ist das nicht die diffuse Tönung, die man in der den Osteoblasten unterliegenden Knochen- substanz sieht.

Alle diese Besonderheiten sind in menschlichen Knochenpräparaten noch ausgeprägter (S. 51).

Wie wir oben gesagt haben, ist die *fibrocapilläre Resorption nicht sicher zu erkennen*. Immerhin fanden wir im Gebiete der Osteoclasten- tätigkeit an den Ursprüngen der Osteophyten solche Stellen, die mit großer Wahrscheinlichkeit als Orte fibrocapillärer Resorption angesehen werden können (Abb. 10). Abb. 10 zeigt eine Bucht der Markhöhle, in der sich Fasermark findet (links im Bilde); sie enthält keine Osteoclasten. Statt dessen ist die Bucht von einem außerordentlich phosphatase- reichen Endost ausgekleidet, das hier ebenso tief geschwärzt ist wie

sonst dort, wo sicher eine Knochenapposition stattfindet. Hier jedoch ist der Knochenrand ganz scharf, ohne abgesetztes Osteoid. Das Bild ist noch verführerischer durch die leichte Einbuchtung, in welcher sich die resorbierende Endostschicht anlagert und dadurch, daß dort, wo die Delle am ausgeprägtesten ist, auch die Phosphatasereaktion stärker ist als im übrigen Endost. Und schließlich sieht es, durch die Gegenwart von Osteoclasten in der näheren Umgebung (rechts im Bilde), so aus, als ob sich die ganze Zone in Resorption befände.

b) Menschliches Knochenmaterial.

Die Biopsie einer PAGETSchen Erkrankung lieferte uns das reichste Beobachtungsgut.

Es handelt sich um Stücke der Crista iliaca eines 70jährigen Mannes, bei dem die Erkrankung einige Jahre zuvor eingesetzt hatte. Serumphosphatase 40 EB. — Die nach den gewöhnlichen Methoden gefärbten Schnitte zeigen das typische Bild des Morbus Paget: Grobe Knochenbälkchen, die ein zellreiches Fasermark einschließen; Apposition und Resorption sind außerordentlich lebhaft; deutliches Mosaikbild.

Die histochemischen Reaktionen auf Phosphatase ergaben sehr gleichmäßige Bilder: Nach mittlerer Inkubationsdauer (6 Std) erscheint das Mark so schwarz, daß die Struktur größtenteils unkenntlich ist (Abb. 18). Das Präcipitat findet sich in den Fibrocyten, in den Osteoblasten und auf den kollagenen Fasern (Abb. 22, I). Das Knochengewebe reagiert überall negativ, mit Ausnahme der osteoiden Ränder, die bisweilen braun erscheinen.

Sehr eindrucklich ist das Bild der Osteoclasten: Meistens haben sie das Aussehen von schwarzen Seen, schwärzer selbst als die Osteoblasten (Abb. 13—14), und alle cytologischen Details sind in der vollkommenen Imprägnation des Protoplasmas untergegangen. Dort, wo die Osteoclasten in den HOWSHIPSchen Lacunen liegen, erscheint auch hier der Knochenrand bisweilen schwarz gesäumt, als wenn der Osteoclast die Grundsubstanz hier mit Ferment durchtränkt hätte (Abb. 13, Pfeil). — Andere Osteoclasten, aber zahlenmäßig viel seltener, enthalten weniger Ferment im Kern und Cytoplasma als das umgebende Markgewebe: Bisweilen sind sie dem Knochen angelagert, viel öfter liegen sie mitten im Mark (Abb. 14).

An den Stellen fibrocapillärer Resorption findet sich überall eine intensive Fermentaktivität. Bei 6stündiger Inkubation ergeben die Endostzellen eine ebenso positive Reaktion wie die übrigen Markzellen.

Auch die osteoiden Ränder sind bisweilen imprägniert, aber im allgemeinen weniger stark als die Säume der HOWSHIPSchen Lacunen.

Die PAGETSche Krankheit hat uns das eindrucklichste Anschauungsmaterial geliefert. Andere Biopsien boten uns Gelegenheit, die gleichen

Beobachtungen bezüglich der Resorption zu machen: Wir haben einen Fall von Malleolarpseudoarthrose (nicht infiziert) bei einem 55jährigen Mann untersucht. In einem anderen Falle handelte es sich um die Großzehenphalanx einer erwachsenen Frau, die wegen einer Exostose reseziert worden war.

Wir haben in solchen Präparaten nicht mehr derartige Osteoclasten angetroffen, wie wir sie bei der PAGETSchen Krankheit gesehen haben, aber an den Stellen, die wir als Resorptionsherde identifizieren konnten,

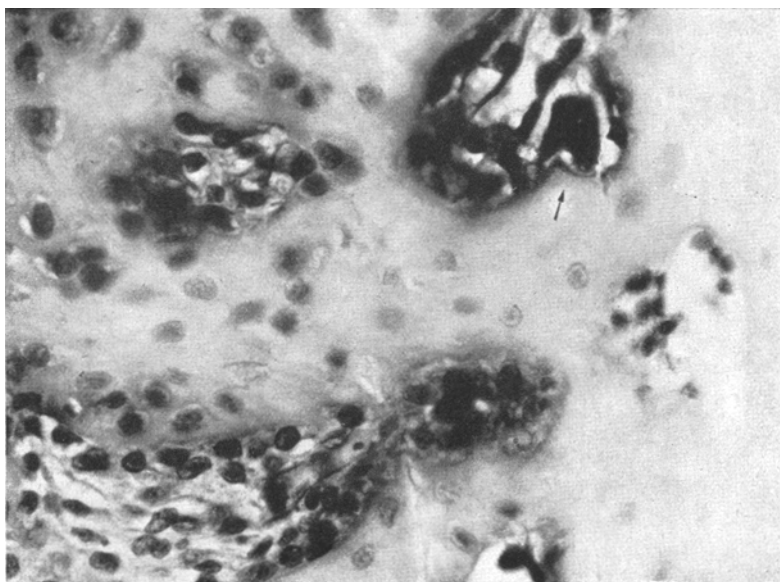


Abb. 12. Knochenresorption. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Der gleiche Herd wie in der vorhergehenden Abbildung, aber an anderer Stelle. Starke Vergrößerung. — *Oben rechts*: Ein Osteoclast. — *Rechts*: Nekrotische Corticalis ohne Fermentreaktion; Osteophyten beginnen sich anzusetzen (Text, S. 30).

fanden wir eine deutliche Erhöhung der Phosphataseaktivität im Vergleich mit dem benachbarten Endost (Abb. 15). Die Fermentvermehrung ist in diesem Bild sogar noch auffallender, weil hier Mark und Endost im allgemeinen weniger stark reagieren als im Falle des Paget-Knochens.

Diskussion.

Die beschriebenen Bilder sind unseres Erachtens Ausdruck der Beteiligung der Phosphatase bei der Resorption von Knochengewebe. Wir stützen uns dabei auf die folgenden Argumente:

a) An den Stellen, die anatomisch sicherlich Resorptionsherde sind, findet sich im allgemeinen eine sehr bedeutende Phosphataseaktivität. Man könnte einwenden, daß die Resorption bei der PAGETSchen Erkrankung

pathologisch ist und die Bilder infolgedessen zum Studium der allgemeinen Resorptionsgesetze unbrauchbar seien. Dazu ist jedoch zu sagen, daß man bei den histochemischen Reaktionen auf Phosphatase qualitativ stets die gleichen Bilder erhält wie in anderen Knochenpräparaten menschlicher und tierischer Herkunft, die nicht von einem Morbus Paget stammen; der Unterschied ist nur quantitativ, indem die Fermentaktivität bei der Ostitis deformans größer ist.

Das weitaus wichtigste Gegenargument besteht durch die Tatsache, daß sehr verschiedene Zelltypen Phosphatase enthalten, ohne daß bei ihnen irgendeine Beziehung zum Knochen oder dessen Resorption bestünde. Hierzu muß auf folgendes hingewiesen werden:

b) In den Resorptionsherden nimmt die Aktivität der Phosphatase zu und wird intensiver als dort, wo sich das Endost in Ruhe befindet. Das ist beim Menschen ebenso wie im Tierversuch. Das Gleichlaufen von Zelltätigkeit mit Phosphataseaktivität zeigt, daß das Ferment nicht dem Eigenstoffwechsel der Zelle angehört, sondern daß es als Aktionssubstanz für die osteolytische Funktion anzusehen ist.

c) Der Knochenrand ist unmittelbar dort, wo die Osteoclasten nagen, bisweilen mit Ferment imprägniert, und dies sogar auch dann, wenn der Osteoclast dem Knochen nicht unmittelbar anliegt, sondern sich in einem geringen Abstand befindet (Abb. 13, Pfeil). Allem Anschein nach handelt es sich nicht um einen Diffusionsartefakt, denn solche Bilder sind ausschließlich für Osteoclasten charakteristisch; der Rand, dem die Osteoblasten angelagert sind, reagiert negativ oder nur sehr diffus auf Phosphatase. *Das sieht man gut an den Stellen, wo die Osteoblastenreihe von einem Osteoclasten unterbrochen wird: Nur hier findet sich ein tiefschwarzer Saum (Abb. 13, Pfeil).*

Dieses Bild ist das Äquivalent der engen Beziehung zwischen Osteoclast und Knochensubstanz. Es spricht für eine aktive Penetration des Fermentes in die Knochensubstanz hinein, und die vorzugsweise Ansammlung in den HOWSHIPschen Lacunen läßt sich als Beweis für die Beteiligung der Phosphatase bei der Osteolyse ansehen. Umgekehrt halten wir dieses histochemische Bild auch für einen Beweis der lytischen Tätigkeit der Osteoclasten. Zu diesen Befunden steht die Ansicht von HÄGGQUIST, der den Osteoclasten lytische Fähigkeiten abspricht, nicht im Einklang.

d) Ein Artefakt infolge Diffusion des Fermentes ist sehr unwahrscheinlich (vgl. S. 13ff.). Man müßte annehmen, daß Kern und Cytoplasma der Osteoclasten das Ferment im Laufe der Inkubation „einfangen“. Aber einerseits würde die Diffusion noch nicht die Beobachtung erklären, daß der Osteoclast sehr häufig beträchtlich mehr Ferment enthält als die umliegenden Zellen (Abb. 10 und 11), und andererseits betreffen die von FEIGIN und Mitarbeitern nachgewiesenen Artefakte

auch nur die Phosphatasewanderung in die Kerne und nicht in das Cytoplasma.

Schließlich können wir hier auch noch den wichtigen Befund anführen, daß in mehreren Schnitten einer Serie *die gleichen Osteoclasten auch alle den gleichen Enzymgehalt aufweisen*, wobei nicht übersehen werden kann, daß im jeweiligen Einzelschnitt *die verschiedenen Osteoclasten einen verschiedenen Enzymgehalt besitzen*. Diejenigen Osteoclasten, die in Howship'schen Lacunen gelegen sind, sind im allgemeinen am phosphatase-

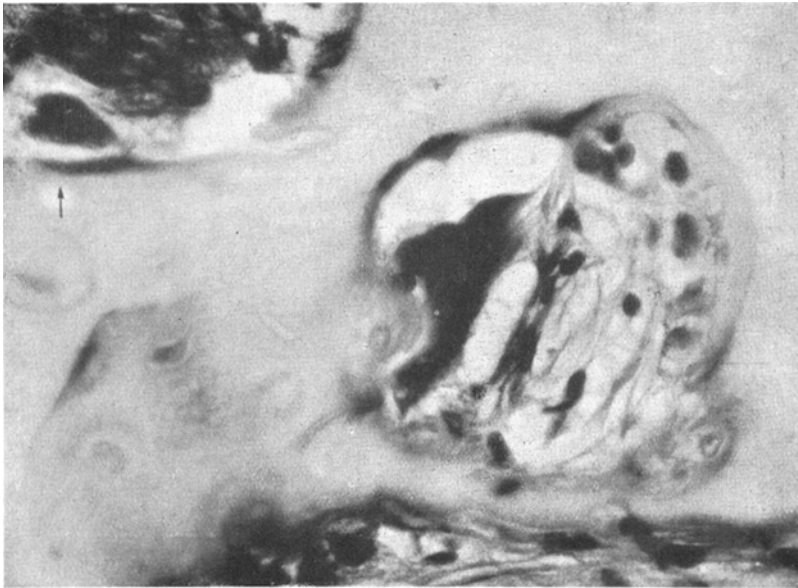


Abb. 13. Knochenresorption. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. PAGETSche Erkrankung. Biopsie der Crista iliaca. Starke Vergrößerung. Bilder anderer Osteoclasten. Man beachte den positiv-schwarzen Saum unterhalb des Osteoclasten links oben (Pfeil) (Text, S. 34).

reichsten. Die „blassesten“, d. h. die am wenigsten phosphatasehaltigen Zellen liegen oft etwas vom Knochenrande entfernt (Abb. 14). *Diese Feststellungen führen uns zur Annahme zweier Phasen der Osteoclasten-tätigkeit: Eine „Ruhephase“ und eine „Aktionsphase“ (osteolytische Phase)*, wobei in letzterer der Enzymgehalt bedeutend erhöht ist.

Unsere Resultate decken sich nicht mit den Befunden von anderen, die nur in den Nucleolen der Osteoclasten Phosphatase gefunden haben, nicht aber im übrigen Cytoplasma. Dieser Widerspruch kann auf verschiedene Weise erklärt werden:

Unterschied in der Tierart. Die Beobachtungen von LORCH und von GREEP-FISCHER-MORSE betreffen den Knochen von Katzen und Ratten, Tiere, an denen wir nicht selbst experimentiert haben.

(Wir beschäftigen uns augenblicklich mit *Untersuchungen über die Unterschiede*, die durch die Tiergattung und das Alter der Versuchstiere bedingt sind.)

Entsprechend dem oben Gesagten kann eine biologische ‚Phasen‘-Differenz der Osteoclasten vorliegen. Nach der Beschreibung von McKELVIE und MANN erscheinen diese Zellen (d. h. solche Osteoclasten ohne Phosphatase im Cytoplasma) „ohne Zusammenhang mit der Resorption“,

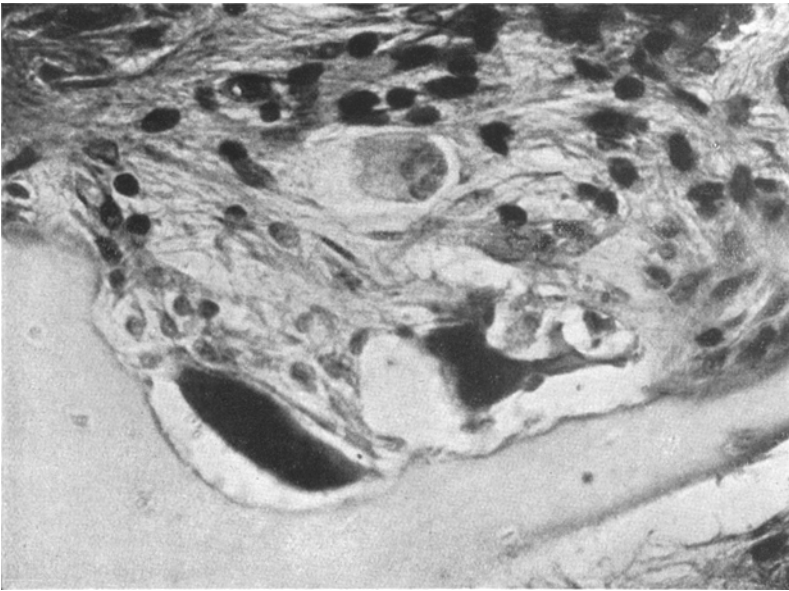


Abb. 14. Knochenresorption. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. PAGETSche Erkrankung. Biopsie der Crista iliaca. Starke Vergrößerung. Bild, welches 2 Phasen der Osteoclastentätigkeit vermuten läßt. — Bildmitte unten: Zwei aktive Osteoclasten (dem Knochen angelagert, hoher Phosphatasegehalt).

Bildmitte oben: Osteoclast im Ruhestadium (entfernt vom Knochen, fast keine Phosphatasereaktion). (Vgl. Text, S. 36.)

sind also nicht so gelagert, als ob sie das Knochentransplantat anzunagen scheinen. Dagegen liegen die von LORCH⁵⁸ abgebildeten Osteoclasten zwar der Knochenoberfläche an, aber es finden sich keine Bilder regelrechter HOWSHIPscher Lacunen.

Die unterschiedliche Technik ist zu berücksichtigen. Die Fixation in Chloroformalkohol gewährleistet eine bessere Konservierung der Phosphatase als Alkohol allein. LORCH entkalkt während 3 Tagen und inkubiert 1 Std lang. Wir entkalkten während 8—10 Tagen und ließen den Knochen 6—14 Std in der Inkubationslösung.

Zur Zeit unserer Arbeiten ist von McKELVIE und MANN eine vorläufige Mitteilung in der Literatur erschienen, in der die Entwicklung von Knochentrans-

plantaten bei Kaninchen behandelt wird, so wie sie sich bei Untersuchung mit der Phosphatasetechnik darstellt. Sie fordern ebenfalls, daß dem Ferment eine *Mitwirkung bei der Osteolyse* zukommen muß, im besonderen bei der Lyse der Transplantate. Die Abbildungen der Autoren sind noch nicht veröffentlicht, aber der Beschreibung zufolge scheint uns in mehreren Punkten eine kritische Überprüfung angezeigt.

Zunächst verneinen die Genannten jede Beteiligung der Osteoclasten an der Resorption der Transplantate. In einem ersten Stadium „sind die transplantierten Knochen von Zellen, die den Osteoblasten gleichen, umgeben“; später imprägnieren

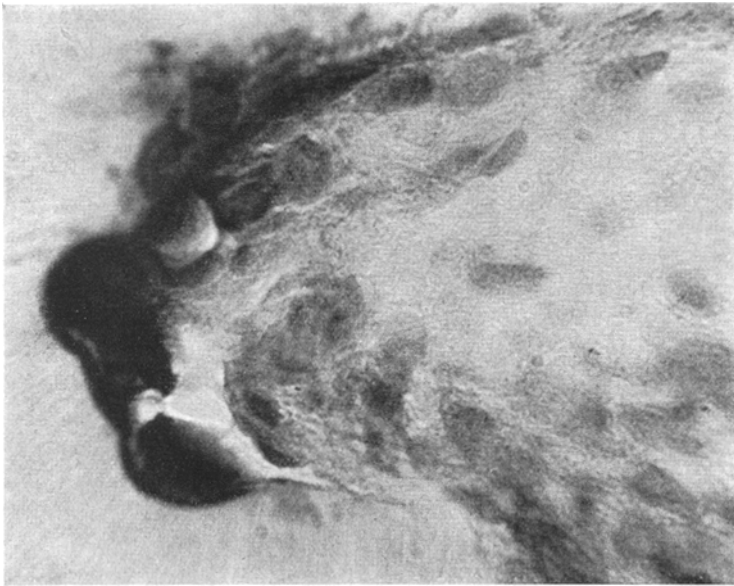


Abb. 15. Knochenresorption. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. Knochenfragment aus der Nähe einer Malleolarpseudarthrose. Starke Vergrößerung. Endost in Resorptionstätigkeit: Zone mit starker Phosphatasereaktion (Text, S. 33).

sich die Fragmente mit Phosphatase. Das Ferment soll von den Osteoblasten abgesondert sein und mit der Auflösung des Knochens in Verbindung stehen.

Nun, die Phosphataseimprägnation der Transplantate kann ein Diffusionsartefakt sein (Abb. 23).

Andererseits heißt es, daß die osteolytisch aktive Phosphatase von Zellen her Stamme, die „den Osteoblasten ähnlich und nicht von ihnen unterscheidbar“ seien. Bei einem so beschriebenen Bilde kann es sich wohl um die Resorptionsweise des fibrocapillären Abbaues gehandelt haben. Jedoch läßt sich in einem Bezirk mit Reparationsvorgängen, wo beständig Knochenan- und -abbau nebeneinander herlaufen, die fibrocapilläre Resorption nicht mit Sicherheit als solche identifizieren, wie das für die Osteoclasie möglich ist. Die Orte fibrocapillärer Struktur sind in bezug auf ihre Funktion in doppelter Richtung interpretierbar, und wir haben sie absichtlich erst an zweiter Stelle unserer Untersuchungen über die Resorption berücksichtigt.

McKELVIE und MANN sind also zur selben Schlußfolgerung gekommen wie wir — nämlich, daß die Phosphatase an der Resorption beteiligt ist —, jedoch haben sie sich auf nicht einwandfreie Bilder gestützt.

Die Anwesenheit der alkalischen Phosphatase beim Geschehen der Knochenresorption ist bewiesen, und es bleibt noch deren biochemische Bedeutung zu erörtern.

In den Osteoblasten erscheint das Enzym mit einer offensichtlich gut definierbaren Funktion: Erleichterung der Calcifikation. Infolgedessen mag es zunächst erstaunen, daß man das gleiche Ferment auch in den Zellen antrifft, deren biologische Bedeutung entgegengesetzt ist: Abbau des Knochengewebes. Diese Feststellung hat uns dazu geführt, die Umkehrung der Fermentaktivität zu berücksichtigen, und solche Umkehrbarkeit (Rückläufigkeit) eines Prozesses ist nichts Außergewöhnliches im Rahmen der Biochemie.

Es ist daher überflüssig, hier die Existenz zweier verschiedener Fermente anzunehmen, wie es McKELVIE und MANN fordern. Das gleiche Enzym ist zur Katalyse sowohl der Synthese als auch der Spaltung seines Substrates befähigt, vielleicht infolge von Änderungen in der Bindung mit dem Vektormolekül⁴⁸. Wir erwähnen als Beispiel hier nur, daß BERGMANN und Mitarbeiter⁷ mit den bei der Autolyse wirksamen Kathepsinen auch die Synthese der Eiweißkörper erzielen konnten.

Übrigens ist bereits im Jahre 1927 von MARTLAND und ROBISON die oben erwähnte Fermentsynthese beschrieben worden⁸¹: Von anorganischen Phosphaten wurden bei Gegenwart größerer Mengen Glycerin bis zu 25% der Phosphate durch die aus Tierknochen extrahierte alkalische Phosphatase mit dem Alkohol verestert. Die gleiche Fähigkeit wurde 1930 von KAY für die Nierenphosphatase nachgewiesen. Trotz zahlreicher ähnlicher Veröffentlichungen in der Literatur wurde die Bedeutung dieser Vorgänge niemals auf den Stoffwechsel des Knochens übertragen. Es sei noch angeführt, daß GUTMAN und GUTMAN (1941) eine Phosphorylase im Knochen beschrieben, deren Funktion könnte darin bestehen, die Ester zu synthetisieren, die dann von der Phosphatase hydrolytisch gespalten würden³⁸.

1949 haben MEYERHOF und GREEN bei Untersuchungen über die Gleichgewichtskonstante der unter Phosphataseeinwirkung ablaufenden reversiblen Reaktionen:

$$K = \frac{(\text{Anorganisches Phosphat})}{(\text{Wasser})} \times \frac{(\text{Alkohol})}{(\text{Ester})}$$

festgestellt, daß die Phosphorylierungsgeschwindigkeit bedeutend geringer ist als man auf Grund der Kenntnis der Hydrolysegeschwindigkeit angenommen hatte: Hier spielt die Tatsache hinein, daß — wie bei den meisten enzymkontrollierten Gleichgewichtsreaktionen — *das Massen-*

wirkungsgesetz nicht allein den Vorgang beherrscht. Und noch ein anderer Faktor kommt hinzu: Die Affinität des anorganischen Phosphates zum Ferment verschiebt das Gleichgewicht im Sinne einer Verlangsamung der Phosphorylierung.

Man kann nun eigenartigerweise eine Beschleunigung der Phosphorylierung erzielen, indem man zu der Lösung noch einen weiteren Phosphorsäureester hinzu gibt, der einen höheren energetischen Gehalt besitzt (z. B. Phosphokreatin) als der bereits synthetisierte. Die Be-

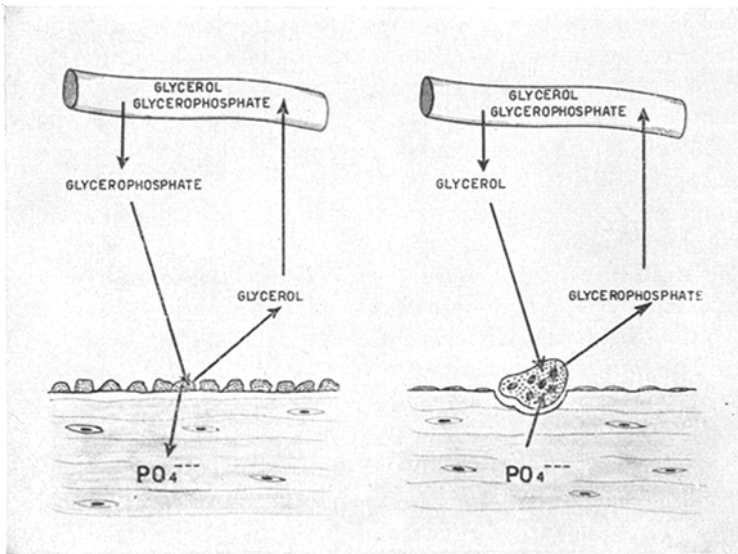


Abb. 16. Die reversible Aktion der Phosphatase beim Knochenumbau (Hypothese abgeleitet aus histochemischen Befunden): I. Apposition: Hydrolyse. Die Phosphatase des Osteoblasten spaltet das Glycerophosphat in Glycerin, welches vom Blute aufgenommen wird, und in ein Phosphorradikal, das sich in der Knochengrundsubstanz fixiert. — II. Resorption: Veresterung. Die Phosphatase des Osteoclasten synthetisiert das Glycerin des Plasmas und den Phosphorkomplex aus dem Knochen zu Glycerophosphat (Text, S. 38).

schleunigung der weiteren Phosphorylierung erfolgt durch *direkten* Transport des PO_4 -Radikals des zugesetzten Esters („Donator-Ester“) an den vorhandenen Alkohol*. Dieser besondere Modus der Veresterung, für den ebenfalls die Phosphatase verantwortlich ist⁶⁷, wurde von AXELROD „Transphosphorylierung“ genannt³. Seine biologische Bedeutung ist jedoch noch nicht erwiesen, da diese Reaktion *in vitro* nur abläuft, wenn die Substanzen in sehr hohen Konzentrationen zusammengegeben werden.

* Hierbei spielt sich etwas sehr Besonderes ab: Mit Hilfe radioaktiver Isotopen hat man nachweisen können, daß das PO_4 -Radikal des Donators nicht erst ionisiert wird und sich dann selbständig an den Alkohol heftet, sondern daß es unter dem Einfluß des Phosphataseschutzes direkt mit dem Alkohol in Verbindung tritt.

Die Phosphatasen können demzufolge über zwei verschiedene Mechanismen die Estersynthese katalysieren: Phosphorylierung und Transphosphorylierung.

Noch bleibt die Frage offen, *welcher Faktor* im Organismus den Ausschlag nach der *Richtung der Synthese bestimmt*. Die Intervention verschiedener Substanzen (Kationen, Peptide, Phosphatdonatoren⁸¹) ist in Betracht gezogen worden, aber Beweise stehen noch aus. Andererseits muß die Richtung der Gleichgewichtsreaktion auch vom Massenwirkungsgesetz beherrscht sein⁶²; die Ansammlung von Alkoholen kann nur als reine Hypothese angenommen werden; dagegen wäre eher eine lokale Anreicherung von PO_4 -Ionen anzunehmen, die aus der Knochensubstanz durch Einwirkung eines anderen Faktors (nach einigen Autoren CO_2) in Freiheit gesetzt würden. Die Phosphatase würde dann nur sekundär in Aktion treten, indem sie einen Teil des PO_4 -Überschusses verestert.

In diesen Punkten müssen rein biochemische Untersuchungen nähere Aufklärung bringen.

Die Abb. 16 zeigt in schematischer Darstellung unsere Auffassung über die Rolle der Phosphatase einerseits beim Knochenanbau, andererseits beim Abbau von Knochengewebe, auf Grund der oben beschriebenen Untersuchungsergebnisse.

C. Die Phosphatase und der schleichende Umbau (Creeping replacement).

Der Knochenumbau besteht in einem ständigen Ersatz alten Knochengewebes durch neues. Die einzelnen Abschnitte verschiedenaltigen Knochens bleiben durch eine sehr dünne Schicht basophiler Substanz getrennt, die in Schnittpräparaten als ein welliges Band erscheint („Abbaukittlinie“, vgl. EBNER, 1875)*.

Niemand bezweifelt, daß die Abbaukittlinien durch den Knochenumbau entstehen, aber über die Art ihrer Entstehung werden zwei Auffassungen vertreten, die dazu geführt haben, zwei grundsätzlich verschiedene Umbaumechanismen anzunehmen.

Für die große Mehrzahl der Forscher spielt sich der Knochenumbau in 2 Phasen ab: Resorption — Apposition (*indirekter Umbau* von LEXER). *Die Abbaukittlinie selbst kann sich nicht verschieben*: Sie bezeichnet die äußerste Grenze bis zu welcher der lokale Resorptionsprozeß jeweils vorgedrungen ist.

Andere glauben, daß diese Linie selbst eine dynamische Bedeutung besitzt. Sie wäre eine bewegliche Grenze zwischen 2 Knochenterritorien, von denen das eine zurückweicht, das andere sich vordrängt. Diese Art Umbau vollzieht sich also im eigentlichen Innern des Knochengewebes selbst, ohne Vermittlung von Osteoblasten oder Osteoclasten (*direkter Umbau* von LEXER). Diese 2. Auffassung stammt von

* Siehe auch die Anmerkung auf S. 16 betr. den Unterschied zwischen diesen und den „Haltelinien“.

BARTH, der den Namen „schleichender Umbau“ geprägt hat. Auch MARCHAND, und in der Folge zahlreiche andere, besonders LEXER, vertraten diese Auffassung. AXHAUSEN war der erste, der sie ablehnte. Durch ein sehr gründliches Studium der Histologie von Knochentransplantaten kamen DE JOSSELYN, DE JONG und EYKMAN VAN DER KEMP zu derselben Ansicht wie AXHAUSEN, ohne zu leugnen, daß ihre

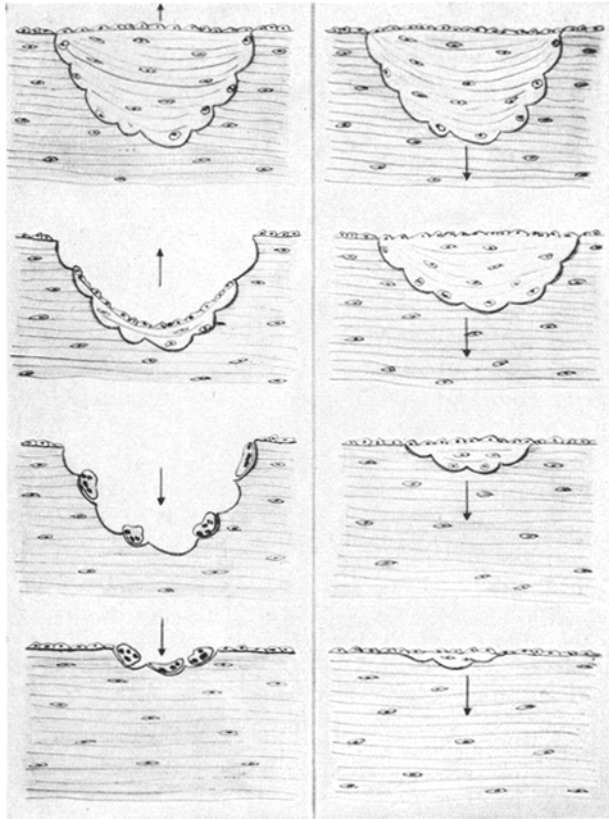


Abb. 17. Die beiden Interpretationen für die Abbaukittlinien. I. Oberflächenumbau. — Auf eine Phase der Osteoclastenabbautätigkeit folgt ein Knochenanbau vermittelt Osteoblasten. Die basophile Kittlinie bezeichnet die äußerste Grenze bis zu welcher die Resorption jeweils vorgedrungen ist. — II. „Schleichender Umbau“ (creeping replacement). Die basophile Linie ist beweglich und in dem Maße im Vorschreiten, in dem der junge Knochen in den alten eindringt (Text, S. 40).

Ansicht nicht absolut beweisbar sei. Nach Ansicht der letztgenannten Forscher „erlauben einzig Serienschritte die ‚direkte‘ Form des Umbaues auszuschließen“. Trotz diesen Veröffentlichungen ist die Vorstellung des „schleichenden Umbaues“ am Leben geblieben und man findet sie besonders häufig in der amerikanischen Literatur, als „*creeping replacement*“ bezeichnet.

Zusammengefaßt. Bei der Betrachtung eines Osteons ist das konzentrische Wachstum unbestritten. Der Vorgang des exzentrischen Wachstums ist jedoch nur hypothetisch (s. Abb. 17).

Von diesen beiden Interpretationen des Umbaues stützt sich die erste auf unzweifelhafte morphologische Befunde. Die zweite beruht mehr auf hypothetischen Erwägungen und ist biologisch wenig einleuchtend. Immerhin hat sich diese Vorstellung nicht ohne jeden Grund so lange erhalten; auf Grund der histologischen Bilder allein läßt sie sich nicht absolut widerlegen: Nichts sagt uns mit Sicherheit, ob eine Abbaukittlinie fix oder beweglich ist; jedes Bild gestattet beide Interpretationen. Darüber hinaus scheint die (ziemlich häufige) Gegenwart von zweikernigen Osteocyten in der Nachbarschaft dieser Linien für ein Wachstum in diesem Bereich zu sprechen*.

Wir haben dieses Problem durch die Untersuchung des Phosphataseverhaltens in ein neues Licht setzen wollen: *Wenn nämlich diese Abbaukittlinien tatsächlich Ausdruck eines interstitiellen Umbaues sind, dann müßte ihr Vorschreiten auch mit den Prozessen der Osteolyse und Osteogenese einhergehen, also von erhöhter Fermentaktivität begleitet sein.*

Es hat sich aber gezeigt, daß die Phosphataseaktivität im Bereich dieser Linien, so lange wir die Inkubation auch dauern ließen, stets null blieb oder nicht größer war als die des unmittelbar umliegenden Gewebes. Das ist ein regelmäßiger Befund.

Bei der Sequestrierung von hitzegeschädigtem Knochen sahen wir, daß der nekrotische Bezirk zum Teil resorbiert und von jungem Knochen ersetzt worden ist. Die Grenze zwischen altem und neuem Knochen ist ohne erhöhte Enzymaktivität, während im Bereiche des Endostes starke Aktivität herrscht. Der Zuwachs vollzieht sich also an der Oberfläche und nicht in der Tiefe des Gewebes.

Der Paget-Knochen stellt ein ideales Untersuchungsmaterial für ein solches Studium dar. In ihm spielt sich sehr intensiver Umbau ab. Abbaukittlinien treten dabei in großer Zahl auf. Die Untersuchung von Schnittpräparaten bestätigte unsere bereits am experimentellen Material erhobenen Befunde: Die Abbaukittlinien sind einzig durch die Lichtbrechungserscheinungen sichtbar (Abb. 18). Bisweilen bilden sich infolge Retraktion an ihrer Stelle Spalten.

Es sei hier bemerkt, daß auch McKELVIE und MANN in ihrer vorläufigen Mitteilung, die uns im Laufe unserer Experimente zugänglich wurde, die Existenz eines „creeping replacement“ verneinen; sie scheinen jedoch in ihren Untersuchungen die Abbaukittlinien nicht als Kriterium genommen zu haben.

Wir haben nur eine einzige Stelle gefunden, wo die Abbaukittlinie eine positive Phosphatasereaktion gezeigt hat, aber in diesem Falle handelte es sich sicher um eine Diffusion des Fermentes vom Endost her. Die Fermentaktivität nahm rasch ab, je weiter sich die Linie in ihrem Verlaufe von der Appositionszone entfernte. Die Ausnahme war also nur scheinbar.

Abgesehen von diesem einen Falle reagierten alle Abbaukittlinien — im Paget-Knochen ebenso wie in allen anderen untersuchten Knochenpräparaten — im ganzen Verlaufe durchweg negativ.

Selbst wenn die gewöhnlichen histologischen Methoden uns keinen eigentlichen Beweis für den Ausschluß dieser Auffassung liefern, so halten wir den „schleichenden Umbau“ — bei dem das Osteon eine

* Es handelt sich in Wirklichkeit um Erscheinungen, die mit der Nekrobiose (Onkose) zusammenhängen.

exzentrische Erweiterung erfährt, etwa wie eine Metastase in der Leber — schon aus einfachen Überlegungen für sehr unwahrscheinlich. Es fällt schwer, sich das Eindringen jungen Knochengewebes in das alte vorzustellen. WEINMANN und SICHER finden es „enttäuschend“

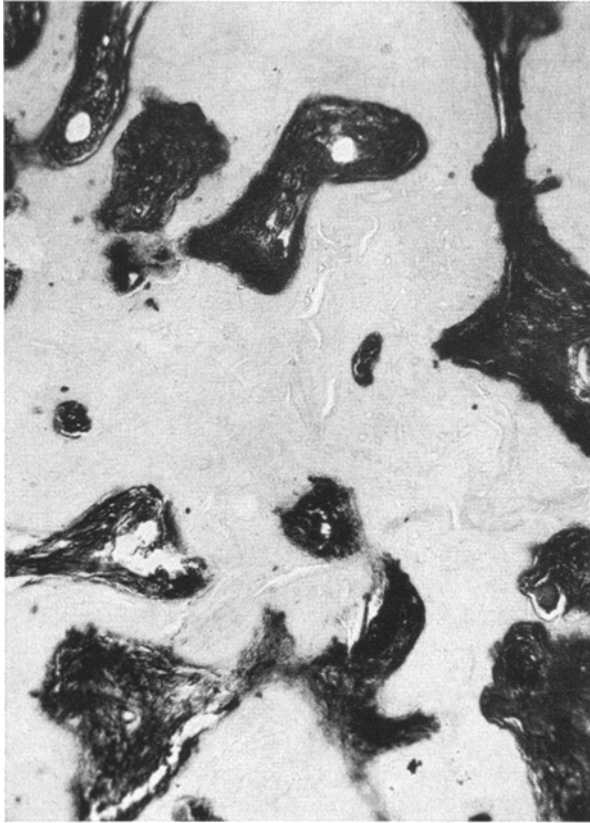


Abb. 18. Untersuchung auf Abbaukittlinien. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. PAGERSche Erkrankung. Biopsie der Crista iliaca. Gleiche Region und gleiche Vergrößerung wie in der vorhergehenden Abbildung. Trotz der langen Inkubationszeit, die die außerordentlich starke und fast zusammenfließende Reaktion der Mark- und Gefäßräume erklärt, bleibt die Knochensubstanz negativ. Die Abbaukittlinien sind nur durch den Lichtbrechungseffekt sichtbar. Dieser Befund ist ein Argument, welches gegen den „schleichenden Umbau“ (creeping replacement) spricht (Text, S. 40 ff.).

feststellen zu müssen, daß diese Auffassung noch immer aufrecht-erhalten wird.

Die Histochemie der Phosphatase bildet zu dieser Frage einen wesentlichen Beitrag: Das Fehlen der Phosphatase entlang den Abbaukittlinien ist unseres Erachtens ein definitives Argument gegen das „creeping replacement“.

D. Die Phosphatase und die Onkose.

Der Ausdruck „Onkose“ stammt von V. RECKLINGHAUSEN, der damit eine besondere Form der nekrobiotischen Entartung der Knochenzelle bezeichnete. Das Wort Onkose nimmt auf die auffälligste Erscheinung des Vorganges Bezug, nämlich auf die Schwellung des Knochenkörperchens, die mit einer Vergrößerung der Knochenhöhle einhergeht (durch „Thrypsis“, Verdauung).

Dieser Begriff, der sonst wenig bekannt ist, wurde von RUTISHAUSER und seinen Schülern^{83, 84, 86, 96}, die darin den Ausdruck wichtiger knochenbiologischer Vorgänge sehen, weitgehend angenommen.

Während V. RECKLINGHAUSEN seinerzeit in der Onkose ein für die Rachitis und die Osteomalacie charakteristisches Verhalten der Knochenzelle sah, weiß man heute, daß sie auch physiologischerweise bereits im normalen Knochengewebe existiert und in verstärktem Maße bei den meisten, wenn auch nicht bei allen Knochenaffektionen auftritt.

Rein bildlich besteht die Onkose in einer Schwellung des Knochenkörperchens, welche somit vom gesamten Zelleib ausgefüllt zu werden scheint. Die Zelle selbst erleidet eine Reihe regressiver Veränderungen und verschwindet. Man könnte diese Erscheinung als eine Lysis der Zelle sowie der umgebenden Knochensubstanz auffassen, aber der Vorgang ist sehr komplexer Natur: Die regressiven Erscheinungen werden von *progressiven* Prozessen überlagert, von denen die Kernvervielfachung ein häufig zu beobachtender Beweis ist.

Die Abb. 22 gibt die Phasen der Onkose wieder, wie sie bei den gewöhnlichen Färbungen zu sehen sind (4). Das Knochenkörperchen, das im lamellär gebauten Knochen länglich ist, wird kugelig. Die proximalen Abschnitte der Knochenkanälchen erweitern sich, und die Begrenzung der Zellwand wird unregelmäßig und verschwommen. Oft beobachtet man um die Knochenzellhöhle herum einen acidophilen oder basophilen Ring als Ausdruck einer Veränderung der Knochensubstanz. Der Zellkern verändert sich in mehrfacher Weise: Schwellung, Pyknose, Fragmentation. Sehr oft sammelt sich das Chromatin halbmondförmig am Rande der Knochenhöhle an und scheint sogar, wie unter Druck, in die Knochenkanälchen gedrängt zu werden (Abb. 22, V 4). Bisweilen beobachtet man eine regelrechte Kernvervielfachung — bis zu 2 Kernen —, aber man sieht keine Mitosen. Im weiteren Verlauf verschwindet die Knochenzelle mehr und mehr. Bei Thioninfärbung ist der Verlauf der Knochenkanälchen granuliert und gestückelt. Endlich bleibt nur noch der veränderte Umriß der leeren Zellhöhle.

Die Frage, ob die ersten Phasen des Prozesses *reversibel* sind, kann noch nicht beantwortet werden.

RUTISHAUSER faßt die Onkose nicht nur als einen regressiven Vorgang (Nekrobiose) auf, sondern sieht dabei auch eine besondere Form der Knochenauflösung: die pericytäre Osteolyse.

Kürzlich hat einer seiner Schüler, H. KIND, bei histologischen und chemischen Untersuchungen von Knochentransplantaten an Kaninchen 2 Verlaufsformen der Osteocytennekrose unterschieden: 1. Die *schnelle* Nekrose, die — in diesem Falle — auf ein direktes Trauma ursächlich zurückzuführen ist; sie vollzieht sich innerhalb der ersten 6 Std nach der Gewalteinwirkung und ist nicht von pericytären Veränderungen begleitet. 2. Vollzieht sich eine *langsame* Nekrose — der vasculäre

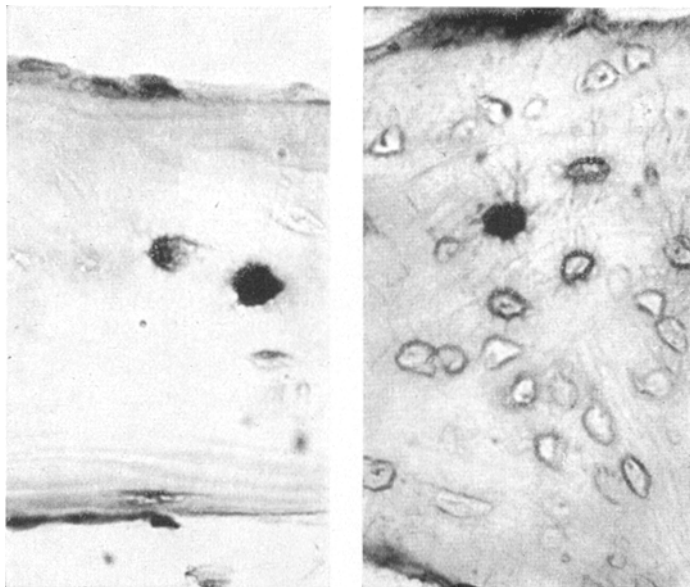


Abb. 19. Onkose. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. Pseudoarthrose nach Knöchelbruch; Knochenbälkchen aus der Umgebung der Verletzung. Mittlere Vergrößerung. Das Bild zeigt das Aussehen der onkotisch veränderten Knochenzellen (rundlich und stark phosphatasehaltig) und ihre Lagerung (weitab vom Endost, welches oben und unten sichtbar ist). Text, S. 46.

Störungen zugrunde zu liegen scheinen — nach Art einer „wirklichen Autolyse“ im Verlaufe von 24—32 Std; das ist die Onkose.

Die onkotischen Zellen finden sich meistens in Gruppen, und zwar häufig an Stellen, die von den Gefäßen am weitesten entfernt liegen. Diese Beziehung zwischen onkotischer Nekrobiose und der Gefäßverteilung im Knochen ist von SÄEGESSER⁸⁶ klargestellt worden.

Die Untersuchung der Onkose unter Berücksichtigung des Verhaltens der alkalischen Phosphatase schien uns wichtig, da wir hier die Möglichkeit sahen, einen der sicherlich zahlreichen fermentativen Vorgänge des ganzen onkotischen Prozesses zu erfassen, von denen wir sonst nur die Folgeerscheinungen (die pericytäre Osteolyse) vor Augen haben. Zu diesen Untersuchungen haben wir uns menschlicher Knochenpräparate

bedient, da in diesen die Bilder der Onkose deutlicher sind als im Knochen der üblichen Versuchstiere.

Über die Verteilung der Phosphatase in den verschiedenen *Zellen der knochenbildenden Reihe* weisen wir auf die oben wiedergegebenen histo-chemischen Untersuchungen (Abb. 1) hin.

Von besonderer Wichtigkeit ist es, daß die onkotischen Zellen im allgemeinen am weitesten von den Oberflächen entfernt zu finden sind, also dort, wo die normalen Osteocyten keine aktive Phosphatase enthalten.

Infolgedessen müssen für die Diagnose einer onkotischen phosphatasehaltigen Knochenzelle 3 Bedingungen erfüllt sein:

1. *Topographie.* Zellen entfernt von Gefäßen oder endo- und peristalen Oberflächen.

2. *Form.* Rundliches Knochenkörperchen mit Erweiterung des Beginnes der Knochenkanälchen. Eventuell vergrößerter oder verdoppelter Kern.

3. *Phosphataseaktivität.* In der onkotischen Zelle muß deutlich Phosphataseaktivität zu erkennen sein, dagegen nicht oder nur sehr viel weniger in den umliegenden (normalen) Osteocyten.

Wir haben zahlreiche Bilder gefunden, die diese 3 Bedingungen erfüllen; darüber hinaus ließen sich verschiedene Stufen des Prozesses unterscheiden (s. Abb. 22):

Zu Beginn der onkotischen Umwandlung sieht man eine diffuse schwarze Imprägnation; die Kerne sind nicht deutlich vom Cytoplasma zu unterscheiden. Das Knochenkörperchen ist geschwollen und seine Ränder sind bisweilen mit einem schwarzen Saum versehen. — In diesem Stadium ist die Beteiligung der Knochenkanälchen sehr unterschiedlich; bisweilen ist das ganze Kanälchensystem phosphataseimprägniert, häufiger aber nur ein Teil desselben (Abb. 22 IV).

Bei voller Entwicklung des onkotischen Prozesses ist die Schwärzung des Osteocyten sehr intensiv. Das ganze Knochenkörperchen gleicht einer schwarzen Lake, in der der Zellkern nur selten zu erkennen ist. Die Einmündung der Knochenkanälchen ist erweitert und ebenfalls schwarz imprägniert, wodurch die onkotische Zelle ein „stacheliges“ Aussehen erhält (Abb. 22 V).

In der letzten Phase, die schwierig zu erfassen ist, verschwindet die Phosphatase wieder; ein Teil derselben scheint in die Kanälchen diffundiert zu sein (Abb. 22 VI). Etwas später ist das erweiterte Knochenkörperchen leer. Von Fermentaktivität findet sich nicht mehr die Spur. Die Auflösung der Knochenzelle und der umgebenden Zone ist vollzogen. Der Prozeß ist erloschen.

Diskussion.

Bei der Diagnose solcher Onkosebilder darf erst dann mit Sicherheit angenommen werden, daß tatsächlich ein Wiedererscheinen der Phosphataseaktivität in der onkotischen Knochenzelle vorliegt, wenn den verschiedenen Fehlerquellen Rechnung getragen worden ist:

Als erstes besteht die Möglichkeit eines *Schnittartefaktes*: Eine anscheinend tief im Knochen gelegene und von seinen Oberflächen weit

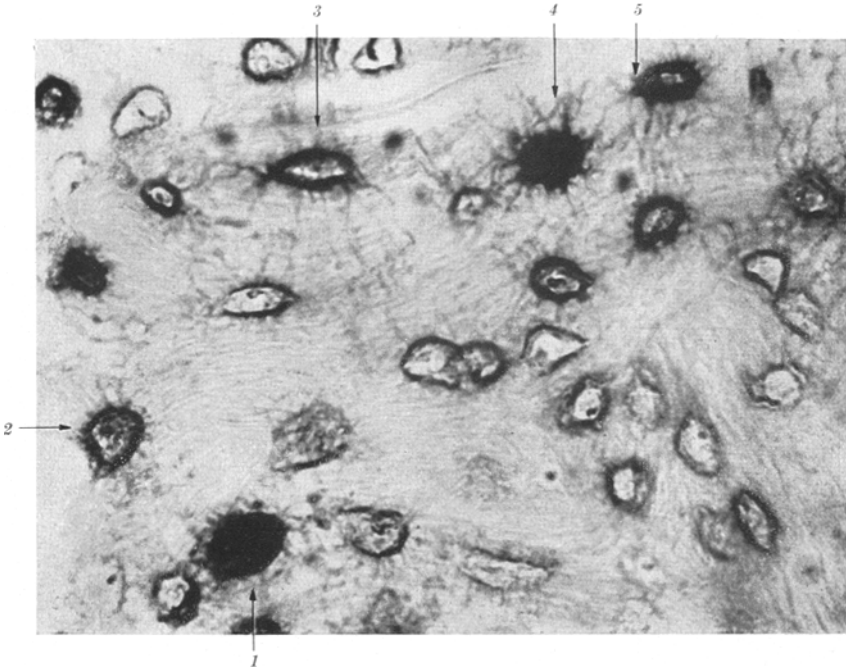


Abb. 20. Onkose. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. Pseudoarthrose nach Knöchelbruch; altes Knochenbälkchen aus der Umgebung der Verletzung. Starke Vergrößerung. Ausschnitt aus dem vorhergehenden Präparat (rechts) bei stärkerer Vergrößerung. Gebiet zahlreicher Osteocyten in verschiedenen Stadien der Onkose. Der Beginn des Prozesses ist an den Osteocyten 3 und 5 zu sehen, in den Knochenzellen 1 und 4 hat er sein Maximum erreicht. Bei 2 ist der Prozeß fast vollendet. Vgl. das Schema der Abb. 23 (Text, S. 46).

entfernte Zone kann — einem Tangentialschnitt zufolge — in Wirklichkeit nahe dem Endost oder einer Gefäßkanalwand gelegen haben und es können also Osteocyten getroffen worden sein, die bereits normalerweise einen höheren Phosphatasegehalt aufweisen. Derartige Irrtümer kann man durch Untersuchung von Serienschnitten vermeiden und vor allem durch Berücksichtigung der für die Onkose charakteristischen Formveränderungen (Abrundung der Zellhöhle; eventuell Erweiterung der Kanälchen).

Zweitens ist zu prüfen, ob nicht eine *Diffusion des Fermentes* oder seiner Spaltungsprodukte erfolgt ist. Wie wir oben (S. 22) dargelegt haben, kann solche Diffusion von Phosphatase in die oberflächlichen Osteocyten von der nahen Osteoblastenreihe her stattfinden. Es muß jedoch als ausgeschlossen erachtet werden, daß eine Diffusion bis zu den onkotischen Zellen vordringt, die am weitesten von der Oberfläche entfernt liegen, zumal die dazwischenbefindlichen Osteocyten negativ reagieren (Abb. 19).

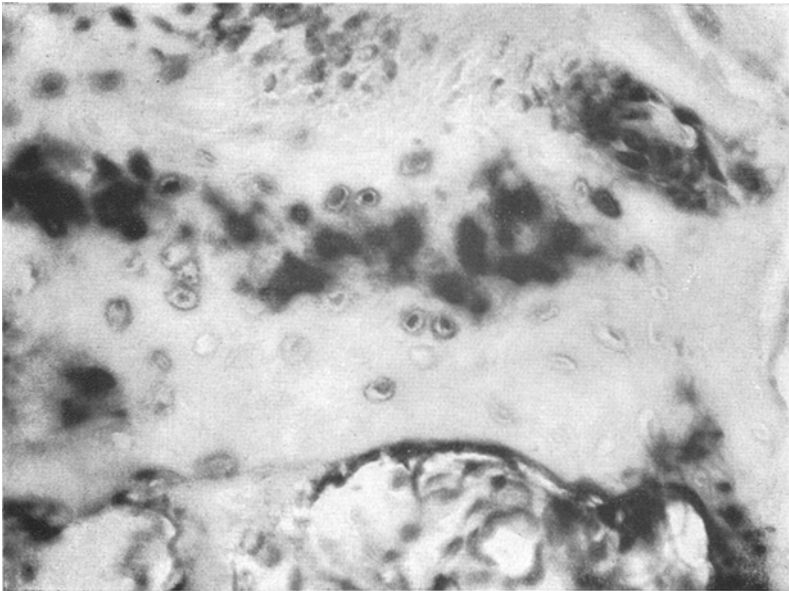


Abb. 21. Onkose. Histochemie der alkalischen Phosphatase (Methode von LORCH und GÖMÖRI). Mensch. Pseudoarthrose nach Knöchelbruch. Knochenbälkchen aus der Umgebung der Verletzung. Starke Vergrößerung. Nester von Knorpelzellen im Zentrum eines durch enchondrale Ossifikation entstandenen Knochenbälkchens (Reste des ursprünglichen Knorpels). Beachte den Unterschied in Form und Fermentgehalt zwischen diesen Zellen und den umgebenden Osteocyten. — Ohne genaue Betrachtung kann dieses Bild eine centrotrabeculäre Onkose vortäuschen (vgl. Text, S. 48).

Drittens kommt in Betracht, daß bei *ungenügender Entkalkung* Tricalciumphosphate im Gewebe liegenbleiben und die betreffenden Zellen infolgedessen wie bei Phosphatasegegenwart geschwärzt werden. Zur richtigen Interpretation müssen also in jedem Falle Kontrollschnitte untersucht werden (vgl. S. 13, Fehlerquellen Nr. 3).

Außer diesen mehr technischen Punkten müssen auch Fehlerquellen biologischer Natur erwogen werden:

Einerseits kann es sich, sofern enchondral gebildetes Knochengewebe vorliegt, um *centrotrabeculär erhaltengebliebene Knorpelzellen* handeln, welche onkotische Osteocyten vortäuschen. Eine solche

Verwechslung ist jedoch unmöglich, wenn man das Verhalten der Kerne und die Lage der Zellen zueinander berücksichtigt und besonders wenn die Kanälchen fehlen (Abb. 21). Die Frage solcher Täuschung stellt sich nicht, wenn — wie wir es in unserem Material sahen — das für die Onkose beschriebene Phosphataseverhalten in reinem Bindegewebsknochen (der nicht enchondral gebildet wurde), wie z. B. bei der PAGET-schen Erkrankung, gefunden wird.

Andererseits muß man in Betracht ziehen, daß die Schwärzung *an Stelle einer Rückkehr der Phosphataseaktivität* ebensogut deren *ununterbrochenes Weiterbestehen* in einigen Osteocyten anzeigen könnte, die sozusagen den jugendlichen Charakter der Osteoblastenzeit bewahrt haben; dies wird noch wahrscheinlicher dadurch, daß die Onkosebezirke in weniger ausgereiften Knochenlagen im Innern der Bälkchen auftreten (grobgebündelter Faserknochen). Das Experiment hat uns jedoch gezeigt, daß das Enzym im Verlauf metaplastischer Knochenbildung aus den alt gewordenen Knochenzellen verschwindet. Andererseits genügt in typischen Fällen die spezielle Morphologie der Onkose, um jeden Zweifel zu beheben, besonders wenn die fraglichen Zellen mit unmittelbar benachbarten, nichtonkotischen Zellen verglichen werden.

Es stellt sich nun die Frage nach einer Erklärung für die Beteiligung der Phosphatase am onkotischen Prozeß. Handelt es sich um einen Antransport neuer Phosphatase, oder um die Reaktivierung von lokal vorhandenem Ferment, welches nur inaktiv war? Die Annahme eines Fermentantransportes ist bei Kenntnis der Tendenz der Weichgewebe, sich mit Phosphatase zu imprägnieren, zunächst einleuchtend. Wir konnten nun aber nachweisen, daß die Knochennekrose — im Tierversuch wenigstens — eine Ausnahme von dieser Regel macht, und daß im übrigen die positive Reaktion *vor* dem Tode des Osteocyten auftritt, die deshalb sicherlich nicht auf passiver Imprägnation einer nekrotischen Zelle beruht. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, daß dieses Wiedererscheinen der Phosphatase ein vitales Phänomen ist.

Die Onkose ist kein einfach passives Geschehen. Sie muß als eine „*Krankheit*“ *des Osteocyten* (RUTISHAUSER) aufgefaßt werden, die zwar mit dem Tode des Zellindividuums endet, aber erst nach einer Reihe von Umformungen als Folge vitaler Reaktionen. Diese Umformungen finden nicht statt, wenn die Knochenzelle plötzlich, und infolgedessen „ohne Krankheit“ abstirbt.

H. KIND hat als erster diese Abhängigkeit der Morphologie des nekrotischen Osteocyten von der Ablaufgeschwindigkeit des Prozesses erkannt. Nur in einem Punkte bedarf seine Auffassung einer Korrektur: Das „langsame Absterben“ (die Onkose) entspricht nicht einer „wirklichen Autolyse“. Jede tote Knochenzelle verschwindet letzten Endes durch Autolyse — ohne eine Vergrößerung der Zellhöhle. In einem

macerierten Knochen ist auch die ganze Zelle verschwunden, aber ohne Onkose, und zwar ohne daß Phosphatase nachzuweisen wäre; diese ist der gemeinsame Ausdruck von Leben und Tod. Andererseits erlaubt auch die beobachtete Kernvervielfachung nicht die Interpretation der Onkose als Leichenerscheinung.

Wir sehen in der Onkose das Resultat der Befreiung verschiedener Enzyme. Dieser Vorgang kommt zwar dem der Autolyse nahe, aber von dieser unterscheidet sich die Onkose dadurch, daß *die lebende Zelle das autolytische Geschehen modifiziert*. Die histochemische Darstellung der Phosphatase zeigt, daß ein Unterschied besteht: Bei der Onkose erscheint das Ferment — bei der plötzlichen Osteonekrose findet sich keine Phosphatase.

Dieses plötzliche „Erscheinen“ eines Fermentes, das nicht vorher in der Zelle enthalten schien, ist nicht außergewöhnlich, sondern ein häufiges Vorkommnis: WILMER hat ein plötzliches und vorübergehendes Auftreten von Phosphatase im Verlauf der Mitose beschrieben⁹⁸. Um so weniger erstaunt uns dieses Wiederauftreten der Phosphatase bei der Onkose, da sie in den jungen Stufen der knochenbildenden Zellreihe schon vorhanden war.

Die *Annahme einer Reaktivierung* wird durch verschiedene Tatsachen gestützt*. Wir erwähnen die Aktivierung der Phosphatase durch das Thrypsin, durch Aminosäuren und gewisse Polypeptide (auch im Verlauf der Onkose erfolgen eiweißlösende Prozesse: „Thrypsis“, oder Verdauung der Knochensubstanz); auch Freisetzung von Phosphorsäure kann zu Beginn der Autolyse nachgewiesen werden⁸².

Das Wiederauftreten der Phosphatase ist wahrscheinlich nur *einer* der fermentativen Prozesse, die der Onkose zugrunde liegen. Auch die Erweiterung der Zellhöhle ist Folge der Freisetzung von Fermenten. Proteolytische Fermente lösen das Eiweiß der Grundsubstanz auf.

Dazu ist zu sagen, daß sich die Autolyse im sauren Milieu abspielt, bei einem p_H also, bei dem die alkalische Phosphatase nicht wirksam sein kann. Die Wasserstoffionenkonzentration kann am jeweiligen Gewebsort jedoch ganz anders sein als wir bei einer chemischen Gesamtbestimmung ermitteln können: Mit cytochemischen Methoden hat man innerhalb der Zellen p_H -Schwankungen von p_H 5 bis p_H 8 messen können⁸¹. Auch das für die saure Phosphatase ermittelte p_H , das anscheinend außerhalb der physiologischen Wasserstoffionenkonzentration

* J. ROCHE⁸⁰ hat darauf hingewiesen, daß bei jungen Ratten die Phosphataseaktivität im Knochen im Laufe des Wachstums geringer wird und sich bei einem Minimalwert befindet, wenn das Tier 70 g Gewicht hat, aber diese Aktivitätsverminderung wird wieder aufgehoben, wenn man Magnesiumsulfat zum Substrat hinzugibt. Das Vermögen zur Hydrolyse bleibt also hoch, auch bei der erwachsenen Ratte. ROCHE schließt daraus: „Ainsi, pendant la période de développement où la formation de la substance osseuse s'opère avec une vitesse considérable, la phosphatase est activée pratiquement au maximum; au contraire, lorsque la calcification est plus lente, l'enzyme demeure en quelque sorte *„en sommeil“* dans le tissu osseux.“

liegt, kann nicht anders verständlich sein (vgl. S. 16). Andererseits ist die Phosphatase, die wir in den histochemischen Präparaten „aktiv“ sehen, nicht notwendigerweise auch in den onkotischen Zellen *in vivo* aktiv gewesen: Man kann sagen, daß die Phosphatase *in aktivierbarer Form vorhanden* ist, aber man darf nicht ohne weiteres daraus folgern, daß das Ferment hier genau die gleiche Funktion erfülle wie z. B. bei der Osteoblastenresorption.

Es ist interessant, daß auch McKELVIE und MANN, die die gleiche Technik von LORCH-GÖMÖRT auf das Knochengewebe anwenden, unter den von den Osteoblasten abstammenden Zellen 2 Typen festgestellt haben, die sich auch in ihrem Phosphataseverhalten unterscheiden:

a) Die *Osteocyten*. Sie liegen in ihren Zellhöhlen und werden bei den gewöhnlichen Färbemethoden sichtbar. Sie verlieren schnell ihre Phosphataseaktivität.

b) „*Grundsubstanzzellen*“ („*matrix cells*“). Sie liegen in Höhlen, die nicht gut abgrenzbar sind und bleiben bei Hämatoxylin-Eosinfärbung unsichtbar. Nur bei der Phosphatasemethode erscheinen Reste der Zellkerne. Diese Zellelemente stünden mit der Knochensubstanz in viel engerem Kontakt, und die in ihnen enthaltene Phosphatase würde sich an der Bildung der organischen Grundsubstanz beteiligen (daher der Name „*matrix cells*“).

Die Beschreibungen (und Interpretationen) sind ohne photographische Abbildungen nicht leicht zu verstehen. In unserem Material haben wir keine entsprechenden Bilder gefunden.

Wir haben uns bei dieser Untersuchung der *Onkose* ausschließlich an Präparate *menschlichen Knochens* gehalten. Beim Kaninchen, Meerschweinchen und bei der Ratte haben wir zwar ähnliche Bilder gesehen, aber die Beurteilung ist nicht ebenso leicht: Im Knochen dieser Tiere finden sich schon normalerweise rundlich geformte Osteocyten, sogar mit positiver Phosphatasereaktion (z. B. bei der Ratte). Solche Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergattungen sind auch für zahlreiche andere Organe beschrieben worden (vgl. S. 7).

In Knochentransplantaten von *Kaninchen* hat H. KIND keine Phosphatase gefunden, trotzdem die Bezirke mit *Onkose* sehr ausgedehnt waren. Da er sich jedoch einer Technik bediente, die der unserigen nicht genau gleich ist, können wir zu seinen Resultaten hier nicht Stellung nehmen.

Das Schema der Abb. 22 veranschaulicht den Lebenscyclus der menschlichen Knochenzelle. Die Zusammenstellung berücksichtigt dabei unsere Resultate, die sich aus der Histochemie der Phosphatase ergaben, einschließlich der verschiedenen Phasen der *Onkose*. Es muß dabei als selbstverständlich vorausgesetzt werden, daß es *bei der Mehrzahl der Osteocyten gar nicht bis zu solchen Stadien kommt*. Die Kolonne IV (Beginn der *Onkose*) zeigt die Veränderungen auf einer Stufe, bei der der ganze Prozeß höchstwahrscheinlich noch reversibel ist. Zur Vervollständigung des Schemas wurde bei jedem Stadium auch das Aussehen des Osteocyten bei den gewöhnlichen Färbungen dargestellt.

Anhang.

Nachweis der sauren Phosphatase.

Es ist bekannt, daß auch saure Phosphatase in kleinen Mengen im Knochen auftritt⁵, aber der histochemische Nachweis ist bis jetzt noch nicht geglückt, nicht einmal in ganz jungen und nicht entkalkten

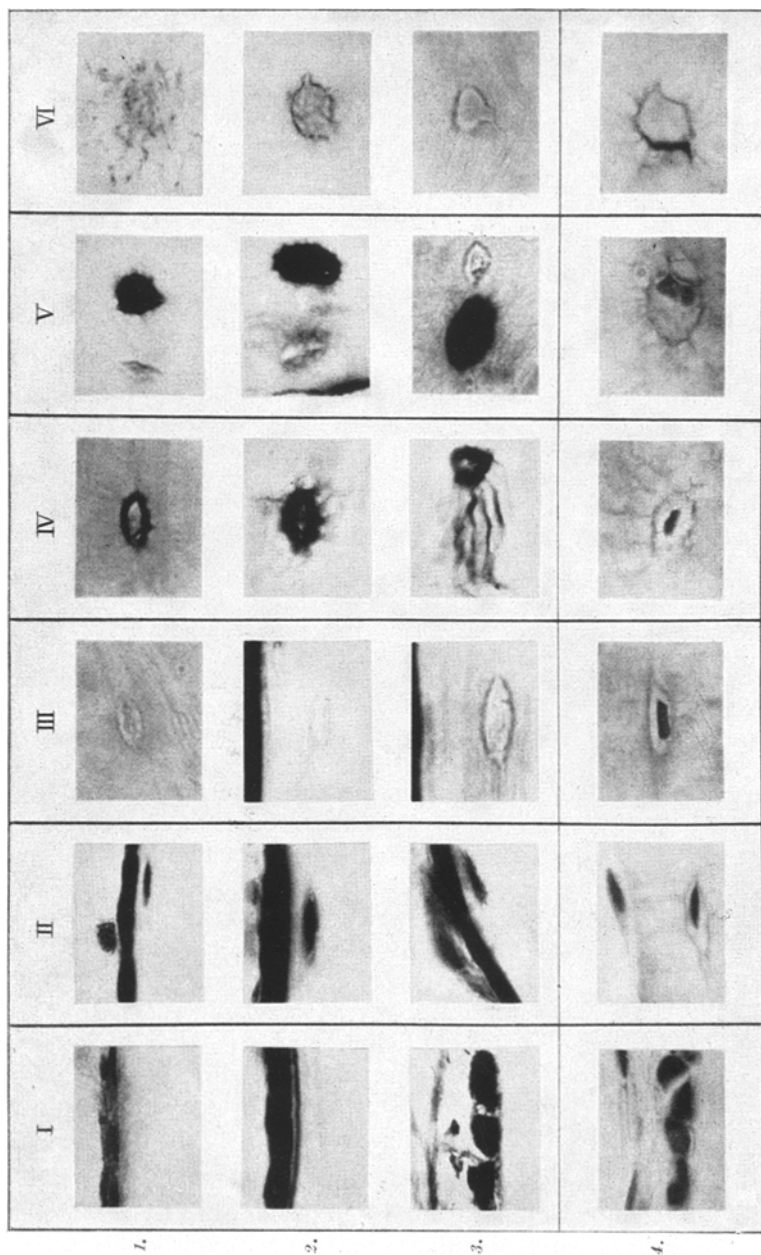


Abb. 22. Der Lebenszyklus der menschlichen Knochenzelle vom Standpunkt der alkalischen Phosphatase. Dieses Schema faßt die Evolution der menschlichen Knochenzelle vom osteoblastischen Stadium bis zur Nekrobiose (Onkose) zusammen. Man unterscheidet 6 Stadien, beruhend auf der Morphologie der Zelle und ihr Gehalt an alkalischer Phosphatase. Die 6 vertikalen Gruppen stellen die 6 Stadien dar; in jeder von ihnen stammen die 3 ersten Abbildungen von Schnitten, die durch die LORCH-Gewörsche Technik hergestellt worden sind: Die schwarze Färbung entspricht der enzymatischen Aktivität. — Das 4. Bild jeder Gruppe (unten) zeigt einen Osteocyt im selben Stadium, mit H.-E.-gefärbt. — *I Osteoblast* (phosphataseereich) *1* in Ruhestand; *2* in Aktivität, der doppelte schwarze und weiße Strich ist ein osteoider Saum; *3* in Aktivität, in der PAGETSchen Krankheit, die Phosphatase befindet sich im Kern und im Cytoplasma des Osteoblasts und in den kollagenen Fasern des Knochenmarks (oben); *4* die H.-E.-Färbung erlaubt die Unterscheidung von Kern und Cytoplasma (Zentrum). (Der Knochen ist unten.) — *II Junger Osteocyt* (phosphataseereich; s. S. 22—23): *1* unter dem Endost, ein junges Osteocyt (positiv); oben, eine Zelle des Knochenmarks; *4* die obere Zelle gehört zum Endost. — *Erwachsenes Osteocyt* (die alkalische Phosphatase ist nicht mehr vorhanden): *1* der Osteocyt ist nur wegen dem Unterschied in der Lichtbrechung sichtbar, er zeigt keinerlei enzymatische Aktivität; *2, 3* dieselben Bemerkungen (oben; das Endost); *4* vergleiche die scharfen Grenzen der Zellenhülle mit dem entsprechenden Bild der folgenden Gruppe. — *IV Antizipierende Onkose* (Wiederversinken der alkalischen Phosphatase). In diesem Stadium ist der Prozeß vielleicht noch rückgängig. Alle diese Osteocyten liegen weit entfernt von der Oberfläche. *1* Der Osteocyt ist morphologisch wenig verändert, aber die phosphatasische Aktivität erscheint wieder; *2* ein fortgeschritteneres Stadium der Onkose: Erweiterung der Zellenhülle, anfangende Imprägnierung der Kanälchen; *3* die gleichen Bemerkungen, die vorliegende enzymatische Imprägnierung des Kanälchensystems ist nicht konstant in der Evolution der Onkose; *4* die H.-E.-Färbung zeigt die Vergrößerung der Zellenhülle, die Unregelmäßigkeit ihrer Grenzen und die Erweiterung der Kanälchenmündungen. — *V Ausgesprochene Onkose* (die phosphatasische Aktivität wird wieder so stark wie in den Osteoblasten). *1* Vergleiche die Form und die enzymatische Aktivität des onkotischen Osteocyten mit dem Normalen (links); *2* dieselben Bemerkungen (links; das Endost), stacheliges Aussehen der Zelle, das einer Erweiterung der Kanälchen entspricht; *3* dieselben Bemerkungen, vergleiche die respektive Größen der beiden Osteocyten (der rechte ist normal); *4* die H.-E.-Färbung zeigt eine Kernschwellung, ein Teil des Kerns ist in ein erweitertes Kanälchen gedrängt, dieses ist ein häufiger Befund bei der Onkose. — *VI Endstadium der Onkose* (Schrumpfung des alkalischen Phosphatase). Hier ist die Lyse des Osteocyten vollendet. *1* Die Phosphatase ist beinahe ganz verschwunden, man findet einige Spuren in den Kanälchen; *2, 3* die Zellenhülle ist leer, sichtbar durch den Unterschied in der Lichtbrechung, die Erweiterung der Kanälchen ist deutlich; *4* dasselbe Bild, die H.-E.-Färbung zeigt ein Kernrest (links), dessen untere Extremität in ein Kanälchen dringt.

Knochen³⁰. In Berücksichtigung der bereits erwähnten Befunde von STAFFORD und ATKINSON (S. 12) haben wir das ständige Mißlingen der Paraffineinbettung zugeschrieben. Tatsächlich ist uns beim ersten Versuch mit einem Gefrierschnitt der Nachweis der sauren Phosphatase gelungen.

Die Knochen stammten von Kaninchen und einer neugeborenen Katze. Wir haben die Präparate nach der LORCHSchen Methode entkalkt, aber ohne anschließend zu reaktivieren, da wir vermuteten, daß die saure Phosphatase durch die Entkalkungslösung, deren p_H dem Wirkungsbereich des Fermentes entspricht, nicht inaktiviert werden würde. Um diese Annahme zu kontrollieren, haben wir ein Stück *Kleinhirnschubstanz* während 8 Tagen in die Entkalkungslösung gelegt und dann ohne Reaktivierung eingebettet. Unter dem Mikroskop erschienen die Purkinje-Zellen in ihrem charakteristischen Bilde mit Imprägnation aller Verästelungen; nur die Intensität der Reaktion war etwas schwächer als in den nicht „entkalkten“ Schnitten. (Es ist zu bemerken, daß die saure

Phosphatase des Kleinhirns durch die Paraffineinbettung nicht zerstört wird; die saure Phosphatase des Knochens geht dabei zugrunde.)

Die Inkubation muß sich über 24—48 Std. erstrecken. Eine positive Reaktion tritt besonders in den Osteoblasten und in den Markzellen auf. Wir müssen uns hier auf die Feststellung beschränken, daß das Ferment nachweisbar ist, und können nicht auf das Verhalten im einzelnen eingehen. Die sehr lange Inkubationszeit, die Unmöglichkeit Kollodium auf die Schnitte zu bringen, die frei in der Inkubationslösung umherschwimmen — alles das begünstigt etwaige Diffusionsartefakte und macht die Interpretation der erhaltenen Bilder noch viel schwieriger als beim Nachweis der alkalischen Phosphatase.

Schlußfolgerungen.

Die Histochemie der alkalischen Phosphatase gestattet uns Einblicke in die Knochenbiologie, die weder durch die quantitative Dosierung des Biochemikers noch durch die üblichen Verfahren der Histologie vermittelt werden können.

Das technische Vorgehen ist kompliziert, aber eine ganze Reihe angemessener Kontrollverfahren ermöglichen, den Genauigkeitsgrad der Untersuchungen von Stufe zu Stufe zu überprüfen.

Diese Kontrollen zeigen einerseits, daß die mit der Methode von GÖMÖRI erhaltenen *cytologischen* Bilder des Knochengewebes zuverlässig sind; andererseits zeigen sie, daß eine Anzahl der Bilder zu Interpretationsfehlern verleiten können, soweit die Beurteilung der *interstitiellen* Substanz in Frage steht. Nur durch Anwendung anderer Techniken sind solche Fehler zu vermeiden.

Die *Verteilung des Fermentes in den Zellen* veranlaßt uns zu einigen Bemerkungen. Im Gegensatz zu anderen Geweben ist die physiologische Funktion der Phosphatase im Knochen bekannt: Sie steht im Zusammenhang mit dem Phosphor-Calciumstoffwechsel. In den Zellen der knochenbildenden Reihe ist das Ferment nur vorübergehend aktiv. Die Phosphatase erscheint bei der Knochenbildung im Bindegewebe und im Knorpel, sobald sich diese Gewebe auf die Ossifikation vorbereiten. Ist der Knochen einmal gebildet, so erlischt die Fermentaktivität. Nur an den Knochenoberflächen findet sich beständig Phosphatase. Das beweist, daß das Enzym für die Bildung des Knochens erforderlich, aber nicht für den Eigenstoffwechsel der erwachsenen Knochenzelle notwendig ist. Der bei quantitativer Bestimmung niedrige Phosphatasegehalt der Diaphysenknochen ist hierzu die Parallele.

Biologisch gesehen ist das vorübergehende Auftreten eines Fermentes in Beziehung mit einer bestimmt umrissenen physiologischen Funktion durchaus nicht erstaunlich, aber histochemische Belege gibt es deren nur wenige. Als ein anderes Beispiel nennen wir das Erscheinen von

alkalischer Phosphatase in den Chromosomen während des Ablaufes der Mitose (S. 6).

Sofern auch die ausgewachsenen, gesunden Osteocyten am Phosphor-Calciumstoffwechsel beteiligt sind, kann dies nur in einem ganz minimalen Grade vor sich gehen. Dem entspricht, daß bei einem Calciumbedarf des Organismus das Ca mit Hilfe der Osteoclastenresorption an der Knochenoberfläche gewonnen wird. Eine *interstitielle* Mobilisierung (im Sinne eines „schleichenden Umbaues“) findet nicht statt.

Die Beteiligung der alkalischen Phosphatase bei der Resorption von Knochengewebe zeigt sich deutlich durch den hohen Fermentgehalt der Osteoclasten und erlaubt den Schluß, daß die *Phosphatase nicht nur ein Ferment der Knochenbildung (Ossifikation), sondern auch das der Knochenresorption und damit des Knochenumbaus ist*. So gewinnt auch die Hyperphosphatasämie gewisser Skeleterkrankungen ihre Bedeutung nicht nur als Ausdruck des erhöhten Abbaues, sondern vor allem auch des vermehrten Umbaues bei der v. RECKLINGHAUSENSCHEN Erkrankung und beim Morbus Paget. Diese Auffassung stimmt gut überein mit der bekannten Tatsache, daß lokale Injektion von Phosphatase keineswegs zu örtlicher Verkalkung führt. (Einige gegenteilige Resultate sind nicht bestätigt worden²⁰.)

Die Rolle der Phosphatase bei der Knochenresorption steht höchstwahrscheinlich mit dem *Mineralstoffwechsel* in Zusammenhang (Veresterung des PO_4 -Überschusses). BENOIT und CLAVERT haben kürzlich bei Enten durch Follikulininjektionen Osteosklerose erzeugt und beobachtet, daß eine ganze Anzahl von Spongiosabälkchen unverkalkt blieben. Schuf man nun bei diesen unter Follikulinwirkung stehenden Tieren die Bedingungen, die im allgemeinen zur Osteoclasie führen — z. B. Ca-Mangeldiät —, so konnte man feststellen, daß die Osteoclasten auch hier in sehr großer Zahl auftreten, sich aber nicht an den unverkalkten Bälkchen festsetzen. Im übrigen ist es bekannt, daß an den osteoiden Rändern keine Osteoclasten zu finden sind. Solche Befunde stützen die Annahme, daß die *Phosphatase der Osteoclasten die Resorption der Mineralanteile des Knochens vermittelt*.

Wir besitzen also dank der Histochemie mehrere Merkmale, die uns eine sichere Unterscheidung der Osteoclasten von anderen Riesenzellen gestatten: Die Osteoclasten besitzen einen positiven Tropismus für die Kalksalze und sind mit den zu ihrer chemischen Aufnahme und Weitergabe notwendigen Fermenten versehen; die LANGHANSschen Riesenzellen³² und die Megakaryocyten¹⁶⁰ enthalten keine alkalischen Phosphatasen.

Das Erscheinen der Phosphatase im Laufe der *onkotischen Nekrobiose* besitzt nicht nur im Rahmen der speziellen Knochenbiologie Interesse. Die Verbindung von reaktiven und regressiven Prozessen ist eine häufige

Beobachtung in der Morphologie. Im Gebiete ganzer Gewebe ist diese Verbindung leicht zu erkennen. Schwieriger und auch seltener ist dies bei einzelnen Zellen zu erfassen: Beispiele sind die Kernvervielfachung in der atrophischen quergestreiften Muskulatur und in der Nekrobiose der Osteocyten. Die Reaktivierung eines Fermentes, das dem Anschein nach nicht mehr am Zellstoffwechsel beteiligt war, gehört zu den dem Tode vorausgehenden „progressiven“ Erscheinungen (RUTISHAUSER).

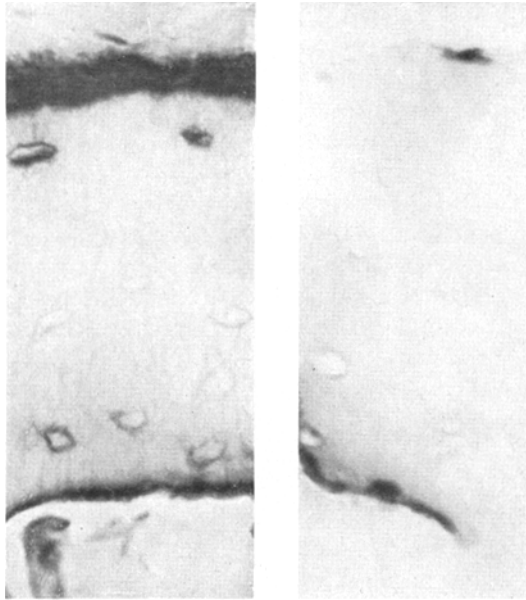


Abb. 23. Untersuchung der Diffusionsartefakte. Rippenknochen der Ratte; das Endost liegt unten im Bilde: Entkalkung und Einbettung nach der Methode von LORCH, Darstellung der alkalischen Phosphatase nach GÖMÖRI. — I. Das Periost (oben) und Endost (unten) sind belassen und reagieren stark positiv. Die den Knochenhäuten zunächstliegenden Osteocyten reagieren ebenfalls positiv. — II. Das Periost (oben) ist entfernt worden. Es reagieren jetzt sehr viel weniger subperiostale Osteocyten positiv. Schlußfolgerung: Die positive Reaktion der den Knochenhäuten zunächstliegenden Osteocyten ist sicher auch Ausdruck der ihnen eigenen Fermentaktivität, die jedoch durch Diffusions-effekte verstärkt erscheint (Text, S. 22).

Die Histochemie der Fermente bietet uns ein weiteres Mittel zur Erkennung eines Krankheitszustandes der Zelle.

BODIAN und MELLORS haben ein solches Phänomen an Nervenzellen festgestellt: Bei Durchtrennung eines peripheren Nerven erleiden die zugehörigen *Ganglienzellen* degenerative Veränderungen, die durch die Chromatolyse sichtbar werden; gleichzeitig tritt eine starke Vermehrung der sauren Phosphatase auf. Auch bei *Lebercirrhose* findet sich die alkalische Phosphatase in sehr viel reicherm Maße als in der normalen

Leber¹⁷. In der *Sublimatniere* enthalten die Zellen der Hauptstücke bisweilen mehr, bisweilen weniger Phosphatase als normalerweise¹.

Die Veränderung des Enzymgehaltes der Zelle kann einen Krankheitszustand anzeigen, sie kann aber auch Ausdruck der regelmäßigen physiologischen Funktion sein. Unsere Beobachtung von „aktiven“ und von „Ruhe“-Osteoclasten läßt sich z. B. mit der Veränderlichkeit des Fermentgehaltes im Endometrium während des Menstruationscyclus vergleichen⁷⁴.

Im Knochengewebe zeigt das Verhalten der alkalischen Phosphatase deutlich den *Unterschied zwischen Nekrose und Nekrobiose*. In der allgemeinen Pathologie beruht diese Unterscheidung — ziemlich abstrakt — letztes Endes auf einer Bewertung der Zeit. Eine *längere Dauer* der Nekrobiose bedeutet einen *Kampf* zwischen Leben und Tod, einen Kampf, der sich im Zellinnern abspielt und den wir logisch erschließen, aber meistens ohne morphologischen Beweis annehmen müssen. Das Knochengewebe macht von der Regel eine Ausnahme: Durch seine beiden Modifikationen der Nekrose — die *brüske Nekrose* ohne Veränderung der Knochenzellhöhle und die *langsame Nekrobiose* mit Schwellung oder Onkose — findet der Ausdruck Nekrobiose, sonst wenig konkret, seine Berechtigung. Das Verhalten der Phosphatase betont diese Unterscheidung, indem das Ferment in einem Falle (Onkose) auftritt, nicht aber im anderen (bei der brüsken Nekrose) (RUTSHAUSER).

Schließlich gestattet uns das Studium der *Grundsubstanz* einige Bemerkungen über die Vorgänge ihres Mineralstoffwechsels. Sofern die Knochengrundsubstanz im erwachsenen Zustand überhaupt am Phosphor-Calciumstoffwechsel teilnimmt, so geschieht das sicherlich ohne lokale Mitwirkung der Phosphatase. Der normale Stoffwechsel des Phosphors und des Calciums in bezug auf die Zwischensubstanz ist sozusagen „unterschwellig“ und wird von den physikalisch-chemischen Gleichgewichtsgesetzen (p_H , Lösungskonzentrationen usw.) beherrscht. *Die Phosphatase beteiligt sich nur, um Mineralumsetzungen größeren Ausmaßes zu erleichtern*. So ist es möglich, auf Grund der beobachteten Bilder (osteoide Ränder, Osteophyten) in der Periode der *Osteogenese* eine *interstitielle* Fermentaktivität anzunehmen — und zu einem geringeren Grade auch während der *Resorption*: Die Osteoclasten scheinen den Rand, dem sie anliegen, bisweilen mit ihrem Enzym zu imprägnieren, und dies hin und wieder so weitgehend, daß es schwierig ist, im Bilde zwischen der in Resorption befindlichen Knochensubstanz und dem Zelleibe des Osteoclasten eine Grenze zu ziehen. Wir erinnern daran, daß nach DANIELLI²¹ nur die extracelluläre oder die im Zellkern befindliche Phosphatase aktiv sein kann, während die Bedingungen im Cytoplasma die Fermentaktivität hemmen. Sollten sich die mit der Methode

von GÖMÖRI erhaltenen Bilder durch andere Techniken bestätigen lassen (aus Gründen, die auf S. 13 auseinandergesetzt wurden), so können wir annehmen, daß die interstitielle Knochensubstanz mindestens zu Beginn ihrer Existenz und wenn sie resorbiert wird, mit einem „fermentativen Leben“ ausgestattet ist.

Zusammenfassung.

Im *ersten Abschnitt* werden die biochemischen Eigenschaften der Phosphatasen, ihre Rolle im Organismus und ihre Verteilung in den einzelnen Geweben besprochen.

Anschließend werden die verschiedenen Verfahren zum histochemischen Phosphatasenachweis in Weichgeweben und im Knochen beschrieben. Die einzelnen Fehlerquellen der Methode und geeignete Kontrollverfahren werden erörtert.

Der *zweite Abschnitt* behandelt die eigenen Untersuchungen. Das experimentelle Material (traumatische und thermische Läsionen) stammt von Meerschweinchen, Kaninchen und neugeborenen Hunden. Menschliches Material erhielten wir durch Biopsien (PAGETSche und andere Erkrankungen).

Vier Fragen aus der Knochenbiologie werden unter Berücksichtigung des Verhaltens der *alkalischen Phosphatase* geprüft:

1. *Die Phosphatase bei der Regeneration.* Nach 48 Std ist das Ferment bereits in Regeneration nachzuweisen. Nach der gleichen Zeit verschwindet es aus nekrotisch gewordenem Knochen.

Die Nekrosen der Weichgewebe zeigen eine gegenläufige Tendenz, denn sie imprägnieren sich mit alkalischer Phosphatase.

Das Ferment ist für die Stoffwechselvorgänge der erwachsenen Knochenzelle nicht erforderlich.

Es ist möglich, daß eine interstitielle Imprägnation mit Phosphatase in der in Verknöcherung befindlichen Knochenmatrix stattfindet, sowie rund um die anliegenden Osteoclasten. Diese Bilder können jedoch bei der GÖMÖRISchen Methode durch Artefakte zustande kommen. Es werden andere celluläre Diffusionsartefakte aufgezeigt.

2. *Die Phosphatase bei der Resorption.* Der hohe Phosphatasegehalt der Osteoclasten beim Menschen und beim Kaninchen läßt den Schluß zu, daß das Ferment bei der Resorption eine Rolle spielt, vielleicht durch Vermittlung der Synthese von Phosphorsäureestern.

Die Osteoclasten vertreten den Typ einer spezialisierten Riesenzelle: Es ist ihnen ein positiver Tropismus für Kalksalze eigen (BENOIT und CLAVERT), und sie besitzen das für die stoffwechselhafte Verarbeitung notwendige Ferment.

Die alkalische Phosphatase ist nicht nur das Ferment der Osteogenese, sondern auch dasjenige des Knochenumbaus.

3. *Die Phosphatase und der „schleichende Umbau“ (creeping replacement).* Das Fehlen der Phosphataseaktivität entlang den „Abbaukittlinien“ ist ein entscheidendes Argument gegen die Auffassung des unter „schleichendem Umbau“ verstandenen Prozesses.

4. *Die Phosphatase und die Onkose.* Nach Besprechung der Morphologie und der Bedeutung der Onkose, die von RUTISHAUSER und seinen Schülern als eine besondere Form der osteocytären Nekrobiose aufgefaßt wird, wird gezeigt, wie sich die — menschlichen — onkotischen Osteocyten durch ein Wiederauftreten der Phosphatase auszeichnen. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Wiederaktivwerden des in der erwachsenen Knochenzelle „ruhenden“ Fermentes.

Gestützt auf ihre histochemischen Befunde bei der Untersuchung der alkalischen Phosphatase erläutern die Verfasser den biologischen Cyclus der menschlichen Knochenzelle durch 6 Lebensstufen (vgl. Abb. 22).

Anhang. Das Vorkommen *saurer* Phosphatase im Knochengewebe kann in Gefrierschnitten histochemisch dargestellt werden.

Wir sprechen unseren Dank Herrn Dr. O. HASE für die gewissenhafte Übersetzung des französischen Manuskriptes aus.

Literatur.

- ¹ ARNOLD, W.: Verh. dtsch. path. Ges. **125** (1950). — ² ATKINSON, R., and H. ELFTMAN: Endocrinology **40**, 30 (1947). — ³ AXELROD, B.: J. of biol. Chem. **176**, 295 (1948). — ⁴ BAYLISS, M., D. GLICK and R. A. SIEM: J. Bacter. **55**, 307 (1948). — ⁵ BELFANTI, S., A. CONTARDI and A. ERCOLI: Biochemic. J. **29**, 517, 842, 1491 (1935). — ⁶ BENOIT, J., et J. CLAVERT: C. r. Soc. Biol. Paris **141**, 911 (1947). — ⁷ BERGMANN, M., and H. FRAENKEL-CONRAT: Zit. nach J. B. SUMNER u. C. SOMERS, Chemistry and Methods of Enzymes, S. 192. New York: Acad. Press, Inc. Publ. 1947. — ^{7a} BEVELANDER, G., and P. L. JOHNSON: J. dent. Res. **25**, 381 (1946). — ⁸ BLUM, G.: Lancet **1944**, 75. — ⁹ BODANSKY, O.: J. of biol. Chem. **118**, 341 (1937). — ¹⁰ BODANSKY, O.: J. of biol. Chem. **179**, 81 (1949). — ¹¹ BODIAN, D., and R. C. MELLORS: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **55**, 243 (1944). — ¹² BOTTERELL, E. H., and E. J. KING: Lancet **1935**, 1267. — ¹³ BOURNE, G. H.: Amer. J. Anat. **82**, 81 (1948). — ¹⁴ BOURNE, G. H., MCKENZIE and MCKINNON: Quart. J. exp. Physiol. **32**, 1 (1944). — ¹⁵ BRADFIELD, J. R.: Nature (Lond.) **157**, 876 (1946). — ^{15a} CARTIER, P., et M. POLONOVSKI: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **27**, 12 (1945). — ¹⁶ CHEVREMONT, M., et H. FIRKET: Archives de Biol. **40**, 441 (1949). — ¹⁷ CLEVELAND, F. P., D. F. RICHFIELD, E. A. GALL and L. SCHIFF: Arch. of Path. **49**, 333 (1950). — ¹⁸ CLOETENS, R.: Biochem. Z. **307**, 352 (1941). — ¹⁹ CLOETENS, R.: Arch. internat. Pharmacodynamie **69**, 386 (1944). — ²⁰ DALLEMAGNE, M. J.: Ann. Rev. Phys. **1950**, 101. — ²¹ DANIELLI, J. F.: J. of exper. Biol. **3**, 110 (1945). — ²² DANIELLI, J. F., H. B. FELL and E. KODICEK: Proc. Nutr. Soc. Cambridge **4**, 197 (1946). — ²³ DANIELLI, J. F., H. B. FELL and E. KODICEK: Brit. J. exper. Path. **26**, 367 (1946). — ²⁴ ENGEL, M. B., and W. FURUTA: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **50**, 5 (1942). — ²⁵ FEIGIN, I., A. WOLF and E. A. KABAT: Amer. J. Path. **26**, 147 (1950). — ²⁶ FELL, H. B., and J. F. DANIELLI: Brit. J. exper. Path. **24**, 196 (1943). — ²⁷ FOLLEY, S. J., and H. D. KAY: Erg. Enzymforsch **5**, 159 (1936). —

- ²⁸ GLOCK, G. E.: *J. of Physiol.* **98**, 1 (1940). — ²⁹ GÖMÖRI, G.: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **42**, 23 (1939). — ³⁰ GÖMÖRI, G.: *Arch. of Path.* **32**, 189 (1941). — ³¹ GÖMÖRI, G.: *J. cellul. a. comp. Physiol.* **17**, 71 (1941). — ³² GÖMÖRI, G.: *Amer. J. Path.* **19**, 197 (1943). — ³³ GÖMÖRI, G.: *Amer. J. clin. Path.* **16**, 347 (1946). — ³⁴ GÖMÖRI, G.: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **72**, 449 (1949). — ³⁵ GREEP, R. O., and C. J. FISCHER: *Science (Lancaster, Pa.)* **105**, 666 (1947). — ³⁶ GREEP, R. O., C. J. FISCHER and A. MORSE: *J. Amer. dent. Assoc.* **36**, 427 (1948). — ³⁷ GROSSER, P., u. J. HUSLER: *Biochem. Z.* **39**, 1 (1912). — ³⁸ GUTMAN, A. B., and E. B. GUTMAN: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **48**, 687 (1941). — ³⁹ GUTMAN, A. B., F. B. WARRICK and E. B. GUTMAN: *Science (Lancaster, Pa.)* **95**, 461 (1942). — ⁴⁰ HÄGGQVIST: *Acta chir. scand. (Stockh.)* **65**, 180 (1929). — ⁴¹ HANSEN, A. E.: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **31**, 1023 (1934). — ⁴² HEPLER, O. E., and J. P. SIMONDS: *Arch. of Path.* **40**, 37 (1945). — ⁴³ HOITNIK, A. W. J. H.: *Arch. néerl. Physiol.* **26**, 323 (1942). — ⁴⁴ JACOBY, F.: *J. of Physiol.* **105**, 19 (1946). — ⁴⁵ JACOBY, F., and B. F. MARTIN: *Nature (Lond.)* **163**, 875 (1949). — ⁴⁶ JOHNSON, P. L., and G. BEVELANDER: *Anat. Rec.* **95**, 193 (1946). — ⁴⁷ DE JOSSELIN DE JONG, R., u. P. H. EYKMAN VAN DER KEMP: *Beitr. path. Anat.* **59**, 268 (1928). — ⁴⁸ KABAT, E. A.: *Science (Lancaster, Pa.)* **93**, 43 (1941). — ⁴⁹ KABAT, E. A., and J. FURTH: *Amer. J. Path.* **17**, 303 (1941). — ⁵⁰ KAY, H. D.: *Biochemic. J.* **20**, 791 (1926). — ⁵¹ KIND, H.: *Beitr. path. Anat.* **111**, 283 295, (1952). — ⁵² KRITZLER, R. A., and A. B. GUTMAN: *Amer. J. Physiol.* **134**, 94 (1941). — ⁵³ LEMON, H. M., and C. L. WISSEMAN: *Science (Lancaster, Pa.)* **109**, 233 (1949). — ⁵⁴ LERICHE, R.: *Physiologie et Pathologie du tissu osseux*. Paris: Masson & Co. 1939. — ⁵⁵ LISON, L.: *Bull. Histol. appl.* **25**, 23 (1948). — ⁵⁶ LI VOTI, P.: *Giorn. ital. Chir.* **518**, 478 (1949). — ⁵⁷ LORCH, I. J.: *Nature (Lond.)* **158**, 269 (1946). — ⁵⁸ LORCH, I. J.: *Quart. J. microsc. Sci.* **88**, 159 (1947). — ⁵⁹ LORCH, I. J.: *Quart. J. microsc. Sci.* **88**, 367 (1947). — ⁶⁰ LORCH, I. J.: *J. Bone Surg. B.* **31**, 94 (1949). — ⁶¹ MAJNO, G., and C. ROUILLER: *Arch. Sci. Soc. phys. hist. nat. Genève* **3**, 248 (1950). — ⁶² MANHEIMER, L. H., and A. M. SELIGMAN: *J. nat. Canc. Inst. Wash.* **9**, 181 (1948). — ⁶³ MARTLAND, M., and R. ROBISON: *Biochemic. J.* **21**, 665 (1927). — ⁶⁴ McKELVIE, A. M., and T. C. MANN: *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **23**, 449 (1948). — ⁶⁵ MENTEN, M. L., J. JUNGE and M. H. GREEN: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **57**, 82 (1944). — ⁶⁶ MEYERHOF, O., and H. GREEN: *J. of biol. Chem.* **178**, 655 (1949). — ⁶⁷ MEYERHOF, O., and H. GREEN: *J. of biol. Chem.* **183**, 377 (1950). — ⁶⁸ MEYERHOF, O., and P. OESPER: *J. of Mol. Chem.* **179**, 1371 (1949). — ⁶⁹ MOOG, F.: *J. cellul. a. comp. Physiol.* **28**, 197 (1946). — ⁷⁰ MORSE, A., and R. O. GREEP: *Anat. Rec.* **99**, 379 (1947). — ⁷¹ MOYSON, F.: *Ann. Soc. roy. zool. Belg.* **77**, 68 (1946). — ⁷² NEWMAN, W., I. FEIGIN, A. WOLF and E. A. KABAT: *Amer. J. Path.* **26**, 257 (1950). — ⁷³ NEWMAN, W., E. A. KABAT and A. WOLF: *Amer. J. Path.* **26**, 489 (1950). — ⁷⁴ PRITCHARD, J. I.: *Amer. J. Anat.* **81**, 352 (1947). — ⁷⁵ RATHBUN, J. C.: *Amer. J. Dis. Childr.* **75**, 822 (1948). — ⁷⁶ RECKLINGHAUSEN, F. v.: *Untersuchung über Rachitis und Osteomalacie*. Jena: Gustav Fischer 1910. — ⁷⁷ ROBISON, R.: *Erg. Enzymforsch* **1**, 280 (1932). — ⁷⁸ ROBISON, R., and M. MARTLAND: *Biochemic. J.* **18**, 1354 (1924). — ⁷⁹ ROCHE, J., et G. H. DELTOUR: *Bull. Soc. Chim. biol. Paris* **25**, 1260 (1943). — ⁸⁰ ROCHE, J., A. FILIPPI et A. LEANDRI: *Bull. Soc. Chim. biol. Paris* **19**, 314 (1937). — ⁸¹ ROCHE, J., and N. VAN THOAT: *Adv. Enzymol.* **10**, 83 (1950). — ⁸² RONDONI, P.: *Elementi di Biochemica*, S. 1046—1050. Turin: Unione tipogr. editr. torin. 1942. — ⁸³ RUTISHAUSER, E.: *Brux. méd.* **1947**, Nr 10, 1. — ⁸⁴ RUTISHAUSER, E.: *Cahiers mensuels méd.* **3**, 285 (1947). — ⁸⁵ RUTISHAUSER, E., and M. BIANCHI: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **58**, 241 (1938). — ⁸⁶ SAEGESSER, F.: *Inaug.-Diss. Nr 1848*. Genf 1945. — ⁸⁷ SELIGMAN, A. M., and L. H. MANHEIMER: *J. nat. Canc. Inst. Wash.* **9**, 427 (1949). — ⁸⁸ SOBEL, A. E., J. COHEN and B. KRAMER: *Biochemic.*

- J. **29**, 2640 (1935). — ⁸⁹ SOULAIRAC, A., P. DESCLAUX and J. TEYSSEYRE: Ann. Endocrinol. **10**, 535 (1949). — ⁹⁰ STAFFORD, R. O., and W. B. ATKINSON: Science (Lancaster, Pa.) **107**, 279 (1948). — ⁹¹ SUZUKI, YOSHIMORA u. TAKAISHI: Tokyo Imp. Univ. Coll. Agr. Bull. **7**, 503 (1907). — ⁹² SWENSON, O., and C. LLOYD CLAFF: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **61**, 151 (1946). — ⁹³ TAKAMATSU, H.: Trans. jap. path. Soc. **29**, 492 (1939). — ⁹⁴ WEIDENREICH, F.: In v. MOELLENDORFFS Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd 2, „Das Knochengewebe“. 1930. — ⁹⁵ WEINMANN, J. P., and H. SICHER: Bone and Bones. St. Louis: The Mosby Co. 1947. — ⁹⁶ WETTSTEIN, P.: Acta radiol. (Stockh.) **28**, 282 (1947). — ⁹⁷ WILLMER, E. N.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **55**, 206 (1944). — ⁹⁸ WILLMER, E. N.: J. of exper. Biol. **19**, 11 (1942). — ⁹⁹ WILMER, H. A.: Arch. of Path. **37**, 227 (1944). — ¹⁰⁰ WISLOCKI, G. B., and E. W. DEMPSEY: Anat. Rec. **96**, 249 (1946). — ¹⁰¹ WOLF, A., E. A. KABAT and W. NEWMAN: Amer. J. Path. **19**, 423 (1943).