

## Phasenkontrast- und fluoreszenzoptische Untersuchungen zur Funktion der Osteocyten\*

H. P. VITALI

Osteologisches Labor der II. Chirurgischen Universitätsklinik Köln-Merheim  
(Direktor: Prof. Dr. W. SCHINK)

Eingegangen am 15. August 1965

Die Ergebnisse auf dem Gebiet der Stoffwechselphysiologie des Knochens machen eine Neuorientierung der morphologischen Betrachtungsweise notwendig. Vor allem die Tracer-Untersuchungen legen einen vom Osteoblasten-Osteoclastensystem unabhängigen Reglermechanismus der Calcium-Homöostase nahe. Die Topographie dieses sog. „verfügbaren Calciums“ ist demnach sowohl zur Interpretation der Stoffwechselkinetik als auch der morphologischen Beurteilung pathologischer Knochenveränderungen von Interesse.

Der Austausch des Knochenminerals erfolgt an der Oberfläche. Neben den mit dem Blutstrom in engem Kontakt stehenden Oberflächen der Makrostruktur muß die „innere Oberfläche“ — Lacunen und Canaliculi — berücksichtigt werden. Voraussetzung zur Darstellung einer perilacunären und pericanaliculären Osteolyse ist die direkte Beurteilung der Kalkdichte bei ausreichend starker Auflösung. Die beste zur Verfügung stehende Methode zur Messung der Verkalkungsdichte ist die Mikroradiographie. Ihr Auflösungsvermögen ist durch die Korngröße des Films bestimmt und somit auf etwa das 300fache beschränkt. Die Canaliculi können daher nur bei extremen Calcipenien beobachtet werden. Das Phasenkontrastverfahren beruht auf der Darstellung optischer Dichteunterschiede. Die beste Darstellung erhält man durch Annäherung des Eindeckmediums an die optische Dichte der zu untersuchenden Struktur. Zur Beurteilung der Dichte des Knochenminerals  $D=0,62$  hat sich unter den geprüften Medien das Cedax  $D=0,58$  am besten bewährt.

### Methodik

Die durch Biopsie frisch entnommenen Knochenproben werden in kaltem (4°) auf pH 7,2 gepufferten Formol (p.a. — Alkohol-Sucrosegemisch) 2 Tage fixiert. Der Calciumverlust kann hierbei vernachlässigt werden. Die Probe wird durch die Alkoholreihe geführt und geringfügig modifiziert nach BURKHARDT in Methacrylat unentkalkt eingebettet. Etwa 4  $\mu$  dicke Schnitte werden direkt auf den Objektträger aufgezogen. Das Spreiten in Wasser (pH 5,8 bis 6,4) hat deutliche Calciumverluste zur Folge. Die Schnitte werden dann in Cedax 0,58 eingedeckt. Partien mit perilacunärer und pericanaliculärer Osteolyse werden photographiert und derselbe Schnitt für eine der folgenden Verfahren verwendet: Grundsубstanz: PAS-Alcianblau; Toluidinblau, wäßrig pH 3,4. Fasern: Färbung nach NOVELLI, Polarisation. Calcium: Mikroradiographie. Calciumeinlagerung: Fluoreszenzmikroskopie nach vorheriger Markierung durch Tetracyclin.

---

\* Die Untersuchungen wurden mit der dankenswerten Unterstützung der Stiftung des Volkswagenwerkes durchgeführt.

### Befunde

Der voll verkalkte Knochen hat im Flachschnitt zum Lamellenverlauf eine homogene, glatte Struktur. Quer zur Lamellierung werden glatte Bänder von mehr oder minder granulierten Zwischenräumen unterbrochen (s. unter SMITH, 1960). Die Osteocytenlacunen und Canaliculi sind scharf und glattrandig begrenzt (Abb. 1a).

In der Umgebung einzelner Osteocyten stellen sich deutliche granuliert Höfe dar. Diese Höfe haben entweder die Form zungenförmiger Ausläufer, meist im Bereich eines oder mehrerer Canaliculi (Abb. 1b) oder umgeben die ganze Lacune. Die Zellen liegen vorzüglich

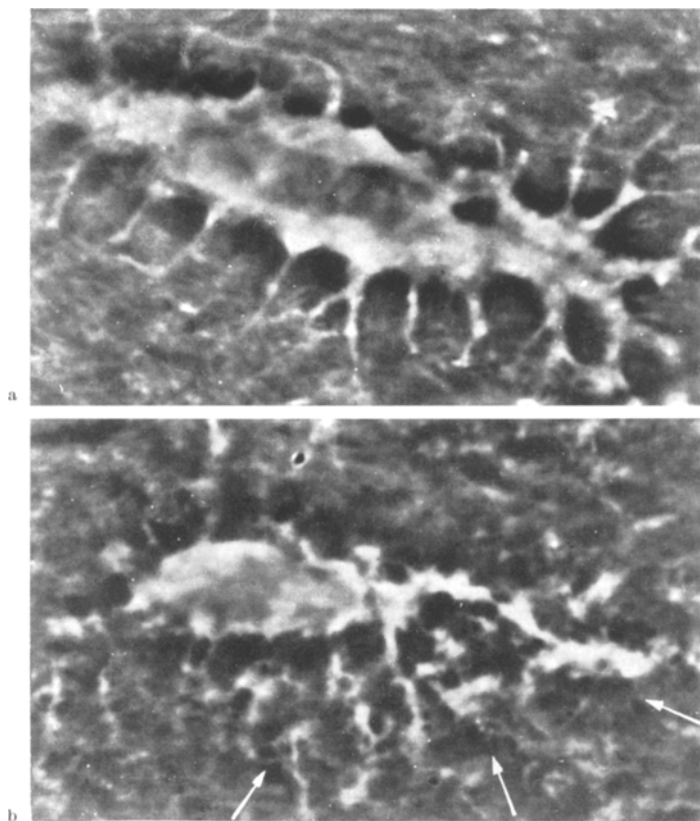


Abb. 1. a Osteocyt, Phasenkontrast, 2600 vergr. Scharfe Begrenzung von Lacune und Canaliculi;  
b Osteocyt, Phasenkontrast, 2600  $\times$  vergr. Perilacunäre und pericanaliculäre Entkalkungszone

in den durch das Zusammenlaufen dreier Trabekel gebildeten Zwickeln und entsprechen im Aussehen häufig den großen polygonalen Osteocyten, wie sie KNESE (1964) beschrieben hat. Die Höfe sind jedoch keinesfalls auf diesen Zelltyp beschränkt. Besonders in Proben von pathologischem Knochen ist keine Beziehung zu irgendeiner Osteocytenform festzustellen. Ebensovienig sind zellfreie Lacunen bevorzugt. In einem Zwickel durchschnittlicher Größe findet man normalerweise 0—4 Lacunen mit Höfen, während ihre Zahl im pathologischen Knochen bis auf 25 ansteigt.

Wesentlich häufiger beobachtet man eine pericanaliculäre Granulierung. Die Canaliculi, normalerweise scharf konturiert, sind unscharf begrenzt oder von einer granulierten Zone umgeben (Abb. 2). Im Schnitt hat man den Eindruck einer Vermehrung, da nun auch die quer geschnittenen Kanälchen deutlich zur Darstellung kommen. Die Konturen einzelner Kanälchen können unscharf gezeichnet sein oder aber ganze Gruppen zu einem granulierten Feld verschmelzen. Interessanterweise sind die in Richtung zur Knochenoberfläche verlaufen-

den Kanälchen am stärksten verändert (Abb. 3). Eine deutliche Strukturauflockerung findet sich ebenfalls häufig nahe den Kittlinien.

Die Veränderungen um Lacunen und Canaliculi verlaufen nicht gleichsinnig. Ausgeprägte pericanaliculäre Felder finden sich im Bereich scharf begrenzter Lacunen. Liegt ein peri-



Abb. 2. Die linke Lacune ist scharf begrenzt, während die Canaliculi Zeichen der Entkalkung aufweisen. In der rechten Lacune beginnende perilacunäre und fortgeschrittene pericanaliculäre Entkalkung (Phasenkontrast, 2600  $\times$  vergr.)

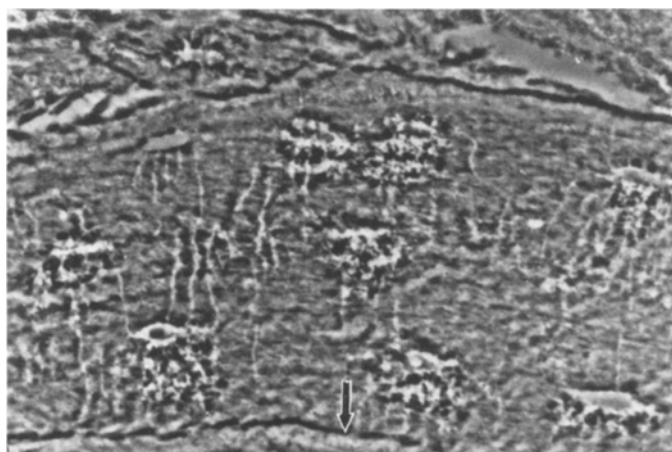


Abb. 3. Pericanaliculäre und perilacunäre Entkalkungshöfe. Die stärksten Veränderungen sind in Richtung des Pfeiles zur Knochenoberfläche gerichtet (250  $\times$  vergr.)

lacunärer und pericanaliculärer Hof vor, so kann nicht selten eine Grenze zwischen beiden beobachtet werden. Nach Entkalkung der Schnitte mit Säuren, gepufferter Citronensäure und EDTA verschwindet das beschriebene Bild. Mit Cedax 0,58 eingedeckt, stellen sich die Faserbündel durch Diffraktionserscheinungen unscharf dar und unterscheiden sich eindeutig vom unentkalkten Schnitt.

*Mikroradiographie und Phasenkontrastbild.* Die Mikroradiographie von 10  $\mu$  dicken Schnitten zeigt durch dichte Säume scharf begrenzte Lacunen. Einzelne Höhlen sind unscharf begrenzt und liegen in Höfen geringerer Dichte. Die Unterschiede sind nicht so deutlich wie im Phasenkontrast, lassen aber eine eindeutige Übereinstimmung von Mikroradiographie und Phasenkontrast erkennen (Abb. 4). Die granulierten Partien können daher als Orte geringerer Kalkdichte identifiziert werden.

*Toluidin und Phasenkontrast.* Nachdem entsprechende Lacunen photographiert wurden, haben wir die Schnitte in verschiedenen Lösungen entkalkt, gefärbt und dieselben Lacunen wieder aufgesucht. In keinem Fall konnte im Bereich der granulierten Höfe eine Metachromasie beobachtet werden. Das gleiche gilt für unentkalkte Schnitte. Da im Gegensatz zu

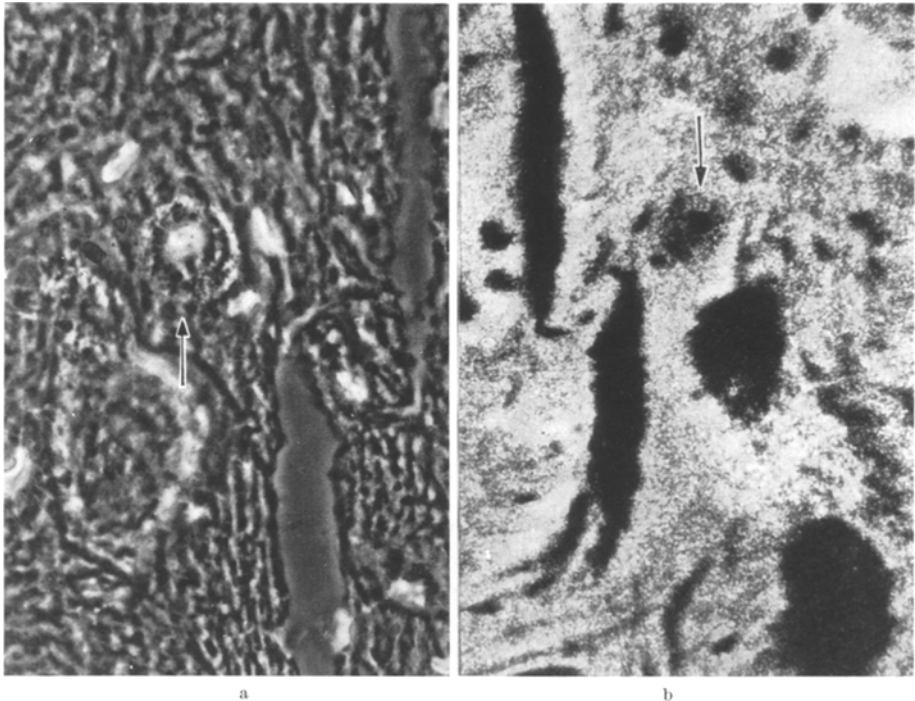


Abb. 4a u. b. Phasenkontrastbild (a) und Mikroradiographie (b) desselben Schnittes. Die markierte Zelle ist im Phasenkontrast (320  $\times$  vergr.) von einem granulierten Hof, in der Mikroradiographie (200  $\times$  vergr.) von einem dunklen, d.h. kalkarmen Hof umgeben

Angaben in der Literatur die perilacunäre Metachromasie in unserem Material sehr selten zu beobachten war, wurde der Katalysator Benzoylperoxyd durch „Porophor“ ersetzt. Trotz kräftigerer Metachromasie von Osteocyten und Mastzellen konnten entsprechende perilacunäre Veränderungen nur selten beobachtet werden.

*PAS, Alcianblau und Phasenkontrast.* Die Befunde entsprachen der Toluidinfärbung.

*Novelli-Färbung, Polarisation und Phasenkontrast.* Im Bereich von Osteoclasten beobachtet man nicht selten eine Aufspaltung des Matrixkollagens. Im Gegensatz dazu sind die Lacunen, von Schrägschnitten abgesehen, stets scharf begrenzt. In der Färbung nach NOVELLI (1958) entspricht der Farbton der granulierten Höfe dem des Osteoids (rosa), die Phasenstruktur ist jedoch anatomisch ungestört. Auch im polarisierten Licht lassen die Faserzüge kein von der normal verkalkten Matrix abweichendes Verhalten erkennen (Abb. 5).

*Färberische Veränderungen der Osteocyten und Phasenkontrast.* Mit Toluidinblau können orthochromatische und metachromatische Osteocyten unterschieden werden (VITTALI, 1964). Zellen mit perilacunären Höfen im Phasenkontrast lassen keine einheitliche Färbereaktion erkennen. Die Entkalkungshöfe um Lacunen mit Zeichen der Onkose und „gesund

aussehenden“ Zellen weisen lediglich graduelle Unterschiede auf. Aktive Osteocyten haben meist ausgedehnte Entkalkungshöfe.

*Tetracyclinmarkierung und Phasenkontrast.* Das Tetracyclin lagert sich im Knochen in zwei Phasen ab. An der Knochenoberfläche stellt sich eine dichte, gelbe, bandartige Fluoreszenz dar (Abb. 8). Sie umfaßt je nach osteoblastärer Aktivität und Verkalkungszustand der Knochenoberfläche unterschiedlich weite Partien. Im Querschnitt ist sie stets scharf begrenzt. Liegt die Markierung längere Zeit zurück, so sind die Tetracyclinbänder in den Knochen „eingewandert“ und von gleicher Intensität, jedoch von geringerer Breite. Der Anteil der Fluoreszenzräume an der Gesamtoberfläche der Bälkchen ist wesentlich größer als der der aktiven Osteoblastensäume.

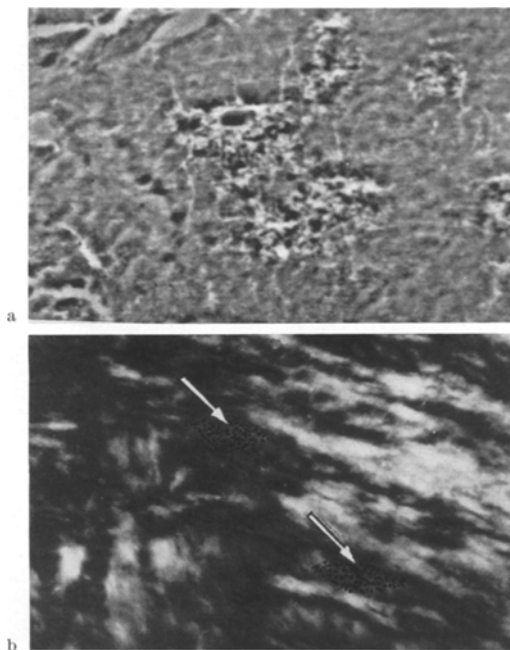


Abb. 5a u. b. Perilacunäre Osteolyse im Phasenkontrast (a) und polarisiertem Licht (b). Die Fasern verlaufen unverändert durch den Entkalkungsbereich (20 $\times$  vergr.)

Die zweite Phase zeigt ein gänzlich anderes Verhalten. Die Fluoreszenz ist diffus ohne deutliche Begrenzung, durchwegs schwächer und häufig von schlierenartiger Struktur (Abb. 8). Sie nimmt gegen das Knocheninnere zu ab. Auftreten und Ausdehnung variieren im gesunden und kranken Knochen. Das hervorstechendste Merkmal dieser Phase ist ihre Flüchtigkeit. Lag die Tetracyclinmarkierung mehr als 14–21 Tage zurück, so kann nur in den Fällen gelegentlich eine diffuse Phase beobachtet werden, welche eine starke Einlagerung auf Grund der zugrundeliegenden Erkrankung erwarten ließ.

Ein ähnliches Verhalten zeigt die im Ausmaß wesentlich geringere perilacunäre und pericanaliculäre Markierung (Abb. 8). Die Zahl der markierten Lacunen und die Dichte der Einlagerung sind sehr verschieden. In Knochenproben von Gesunden sind nach 3tägiger Markierung nur vereinzelt randnahe Osteocyten markiert, in pathologischen Knochen auch zahlreiche in Bälkchenzentrum liegende Zellen. Die Fluoreszenz um Lacunen ist überwiegend scharf begrenzt, die der Canaliculi scharf oder diffus (Abb. 6).

Die Untersuchung der Partien mit diffuser Oberflächenfluoreszenz durch den Phasenkontrast ergibt eine Begrenzung der Tetracyclineinlagerung auf granulierten Bezirke. Nie konnte eine Markierung der phasenkontrastoptisch voll verkalkt erscheinenden Bezirke beobachtet werden.

Ein ganz anderes Bild ergibt der Vergleich bei den Osteocyten. Hier sind Lacunen und Canaliculi in granulierten Höfen sehr selten markiert. Die Durchsicht unseres Materials ergab

zwei Lacunenformen, welche bevorzugt Tetracyclin einlagern. Die eine zeichnet sich durch eine zurückgesetzte, zellferne, scharf begrenzte Verkalkungsfront aus. Sie ist von einem auffallend dunklen, breiten Saum umgeben. Die Zelle wird also von einer Hülle unverkalkter Matrix begrenzt (Abb. 7). Die Verwechslung mit einem Schrägschnitt ist ausgeschlossen, wenn ein Canaliculum Schale und Kalkfront in einer Ebene passiert. Ähnliche Bilder erhält man mit der Froscheschen Blockfärbung, Halo-Volume. Bei der zweiten Lacunenform wird die Wand durch eine sehr feingranulierte Verkalkungsfront gebildet. Die Begrenzung der Lacune zur Zelle ist häufig nur schwer auszumachen. Ein dunkler Saum fehlt meist.

Die sichere Lokalisation einer Calcium-einlagerung allein mit dem Phasenkontrast ist jedoch nicht möglich. Es sind keineswegs alle Oberflächenpartien und Zellen der beschriebenen Form markiert. Vor allem bei den Osteocyten ist die Einlagerung von Tetracyclin im Vergleich zur Zahl der „bevorzugten“ Lacunen selten. Dem Nachweis des Tetracyclins sind häufig durch die hellgrüne Eigenfluoreszenz des gering verkalkten



Abb. 6

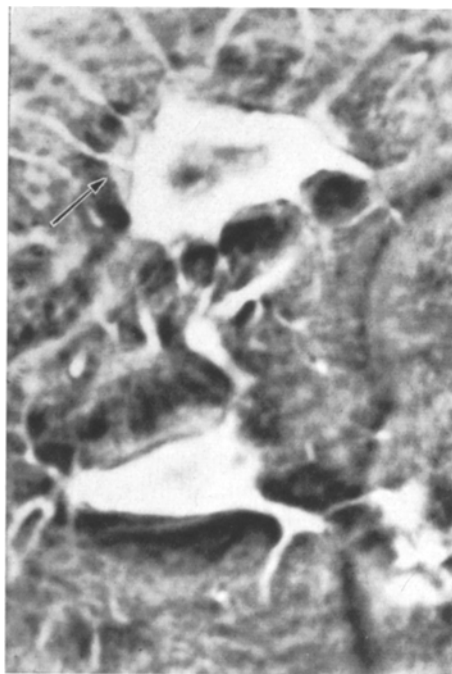


Abb. 7

Abb. 6. Perilacunäre und -canaliculäre Tetracyclinfluoreszenz. Scharf begrenzte Einlagerung. Flachschnitt, daher ist die Rückwand ebenfalls dargestellt (400× vergr.)

Abb. 7. Die Zellen sind teilweise von unverkalkter Matrix umgeben. In der linken Lacune sieht man deutlich den Verlauf eines Kanälchens durch beide Schichten (Pfeil) (2400× vergr.)

Knochens Grenzen gesetzt. Darüber hinaus besteht eine bevorzugte Markierung bestimmter Knochenpartien, die wahrscheinlich auf regionalen Unterschieden der Durchblutung beruhen.

### Diskussion

Unterschiede in Größe und Form der Osteocyten und ihrer Lacunen sind seit langem bekannt. Färberische Veränderungen wurden seit v. RECKLINGHAUSEN (1910) wiederholt beschrieben. Die Deutung dieser Befunde schwankt zwischen Onkose und aktiver osteocytärer Osteoclasie. Mit unterschiedlichem Erfolg wurde wiederholt versucht, alle osteocytären Erscheinungsformen der einen oder anderen Theorie einzuordnen. Auf Grund der oben beschriebenen Befunde sind wir der Auffassung, daß drei dynamisch sicher in Beziehung stehende Formen unterschieden werden müssen.

1. *Onkose*. v. RECKLINGHAUSEN (1910) führte die lacunären und perilacunären Veränderungen auf einen fermentativen Abbau (Trypsis) des Knochens zurück. In Übereinstimmung mit SCHMIDT (1921) sah er die Ursache in einer Nekrobiose der Osteocyten. RUTISHAUSER (1951), SAEGESSER (1945), MAYNO (1951) und

KIND (1951) schließen sich der Auffassung an, beantworten aber die Frage des Entstehungsmechanismus unterschiedlich.

In neuerer Zeit haben FROST (1960), JOWSEY (1964), URIST (1963) und JOHNSON (1964) auf den Zelluntergang und die ihn begleitenden Veränderungen des umgebenden Knochens hingewiesen. Wir können FROSTs Befunde im wesentlichen bestätigen, fanden jedoch keine strenge Altersabhängigkeit, vielmehr ist gerade bei Adoleszenten ein ausgedehnter Zelluntergang nicht selten.

Die Untersuchungen zur Deutung der onkotischen Vorgänge wurden aus methodischen Gründen überwiegend an pathologischen Knochen durchgeführt. Nach v. RECKLINGHAUSEN (1910) sind die perilacunären Höfe geradezu pathognomonisch für Osteomalacie und Rachitis und somit als pathologische Erscheinungen zu bewerten. Im Gegensatz dazu fanden wir leere Lacunen und die Stadien des Osteocytenunterganges in allen untersuchten menschlichen Knochenproben. Sie sind in der normalen Compacta häufiger als in der Spongiosa. Wenn auch sichere Unterschiede zwischen gesunden und pathologischen Knochen bestehen, sind wir doch der Ansicht, daß es sich bei der Onkose primär um einen physiologischen Vorgang handelt.

2. *Osteocytäre Osteoclasie.* Die Formänderung der Lacunen wurde von ZAWISCH (1927) nicht als Ausdruck eines regressiven Vorganges, sondern als aktive Lebensäußerung der Osteocyten aufgefaßt. Nach LIPP (1954) und RUTH (1961) soll der Umbau großer Knochenareale durch abwechselnden osteocytären Ab- und Anbau erfolgen. Die Autoren kommen zu der Auffassung, daß „den Osteocyten eine weitgehende Einflußnahme auf die umliegende Matrix möglich ist“ (LIPP, 1954). Nach Ansicht von RUTISHAUSER und MAYNO (1951) sind diese Vorgänge allerdings frühe und noch reversible Stadien der Onkose.

Die enzymatische Grundlage einer osteoclastären Zellfunktion wurde mit dem Nachweis einer Amino-peptidase (LIPP, 1959) und einer Protease (BÉLANGER, 1964) dargestellt. Allerdings können die bekannten proteolytischen Enzyme das Kollagen bei physiologischem pH und 37° C nicht abbauen. Viele Befunde sprechen jedoch für eine celluläre Acidogenese, was, wie aus anderen Organen bekannt ist, eine erhöhte Abbauaktivität der in den Lysosomen vorliegenden proteolytischen Enzyme gegenüber Kollagen zur Folge hat.

Überzeugend sind die elektronenoptischen Befunde von BAUD (1962), welcher sowohl osteoclastenähnliche Villi, als auch eine Massierung Lysosomen entsprechender Granula im Bereich der Resorptionsbuchten beobachten konnte (s. auch FELL, 1964). BAUD (1962) stellte in Übereinstimmung mit den histologischen Untersuchungen HELLER-STEINBERGS (1951) u. a. eine wesentlich gesteigerte Aktivität nach PTH-Gaben fest. Gleichzeitige regressive Veränderungen sind nicht beschrieben; damit scheint die Osteoclasie als normale Funktion der Osteocyten bestätigt. Ähnliche Beobachtungen mit histologischen und mikroradiographischen Methoden beschrieb BÉLANGER (1965) sowohl nach PTH-Gaben als auch nach EDTA-Infusion. Allerdings kommt er auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß die Osteocyten erst die Matrix und dann das Mineral abbauen. Wesentlich ist jedoch auch hier der Nachweis der Reaktionsfähigkeit des osteocytären Systems.

Die eigenen Befunde hinsichtlich der osteocytären Osteoclasie entsprechen den Beobachtungen von LIPP (1954). Naturgemäß ist der eindeutige histologische

Nachweis an den einzelnen Zellen unmöglich. Jedoch finden sich Formänderungen der Osteocyten, die einen osteocytären Osteoclasie voraussetzenden Ortswechsel nahelegen.

3. *Osteolyse*. Dieser Begriff wird in der Literatur für alle Formen des perilacunären Knochenabbaus verwendet. Wie im vorgehenden Abschnitt ausgeführt, entspricht jedoch der perilacunäre Abbau vom Mineral *und* Matrix eher einer Osteoclasie, während die im folgenden zu besprechende Mobilisation des Minerals allein eine „Lyse“ im engeren Sinne darstellt. Diese Unterscheidung wurde, wohl vorwiegend aus methodischen Gründen, bisher nicht getroffen. Auf Grund der vorgetragenen Untersuchungen kann man den Begriff Osteolyse auf die perilacunäre und canaliculäre Calcium-Mobilisation beschränken.

Unter dem Eindruck der Virchowschen Vorstellung, daß Osteoid ausschließlich neugebildeter unverkalkter Knochen sei, wurde die Möglichkeit einer Entkalkung alten Knochens abgelehnt (POMMER, 1935). MÜLLER (1858) läßt sie lediglich in begrenztem Umfang für die Spongiosa gelten. Erst RINDFLEISCH (1886) und VOLKMANN (1865), v. RECKLINGHAUSEN (1910) und ZIEGLER (1887) haben die Existenz kalkloser Zonen im alten Knochen nachgewiesen und auf eine Halisterase (VOLKMANN) zurückgeführt. Der Mechanismus einer rein physikochemischen Calcium-Mobilisation aus der Umgebung der Osteocyten wurde von LERICHE postuliert. HELLER-STEINBERG (1951) wies nach PTH-Gaben mit der modifizierten Cossa-Methode färberische Veränderungen um Osteocyten im unentkalkten Schnitt nach. Eindeutig konnten Entkalkungshöfe im pathologischen Knochen durch die Mikroradiographie beobachtet werden (HEUCK, 1964; BÉLANGER, 1963; JOWSEY, 1964), jedoch wegen des geringen Auflösungsvermögens der Mikroradiographie nur in extremen Fällen. HEUCK (1964) brachte die Entkalkungshöfe erstmals mit der Topographie des aktiven Calciums in Verbindung und konnte eine gesteigerte Affinität zu Bleisalzen in diesem Bereich nachweisen. Elektronenmikroskopisch brachte ROBINSON (1964) ebenfalls kalkarme Randbezirke um Lacunen und Canaliculi zur Darstellung, die jedoch im Gegensatz zu den beschriebenen Entkalkungszonen eng begrenzt und relativ gleichförmig die Kalkfront auflockern.

Mit der von uns benützten Phasenkontrastmethode entfallen die Nachteile histochemischer und mikroradiographischer Methoden. Der Vergleich mit der Mikroradiographie weist die phasenkontrast-optischen Strukturunterschiede als Kalkdichteunterschiede aus (Abb. 4). Da eine maximale nützliche Vergrößerung von 1300fach möglich ist, können auch lytische Vorgänge um Canaliculi beobachtet werden.

Eine Osteolyse in der gegebenen Definition liegt jedoch nur vor, wenn die Faserarchitektur ungestört ist. Die kombinierte phasenkontrast-optische, polarisations-optische und färberische Untersuchung ein und desselben Schnittes erbrachte keinen Anhalt für die Zerstörung der Fasern im Entkalkungsbereich (Abb. 5). Ebensowenig konnte eine Veränderung der perilacunären Kittsubstanz nachgewiesen werden. Auch Cetylpyridiumchlorid-, Alkohol- oder Carnoy-Fixierung brachte keine Änderung des Befundes. Da wir annahmen, daß das als Katalysator verwendete Benzolperoxyd das Färbeergebnis beeinträchtigt, verwendeten wir „Porophor“. Das Resultat war eine kräftigere Metachromasie der üblicherweise reagierenden Gewebsbestandteile, jedoch keine zusätzliche, insbesondere keine perilacunäre Anfärbung. Gemessen an dem kräftigen Ausfall der Färbung ist demnach eine ausschlaggebende Beeinträchtigung des Resultates unwahrscheinlich oder betrifft nur eine der metachromatisch reagierenden Stoffgruppen. Am eingreifendsten ist der Entkalkungsvorgang. Die geringsten Veränderungen erhielten wir bei einer Schnitt-Citratentkalkung von ca. 10 min Dauer, EDTA führte zu einem blässeren Färbeergebnis, insbesondere der Meta-



chromasie, Säureentkalkung zu sehr unterschiedlichen Resultaten. Im Gegensatz zu anderen Autoren (z.B. ACHARD, 1936; BÉLANGER, 1963) gelang auch durch Entkalkung in 5%iger Salpetersäure keine vermehrte Darstellung von Höfen. Offensichtlich ist unsere Schnittentkalkung (10 min) zu schonend, um die entsprechenden Matrixpartien zur Farbaufnahme vorzubereiten. Im Zusammenhang wesentlich ist die Beobachtung ACHARDs (1936), daß entsprechend unseren Befunden die Faserarchitektur im Bereich der Höfe ungestört ist. Unsere bisherigen Untersuchungen sind jedoch weder darauf ausgerichtet noch geeignet, färberische

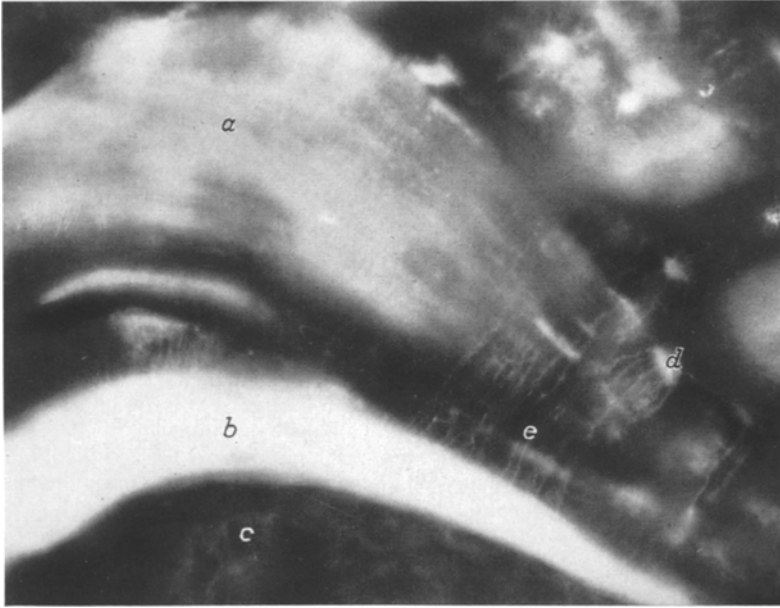


Abb. 8. Knochenschliff, 60  $\mu$  dick. Das kräftige, breite Band (unten) entspricht dem im Markierungszentrum gebildeten Knochenmineral. Die fleckige, schwächere Aufhellung (oben) ist diffus in gering-verkalktem Knochen eingelagertes Tetracyclin. Die perilacunäre und pericanaliculäre Fluorescenz ist zum Markraum (unterer Bildrand) ausgerichtet, in der rechten Bildseite dargestellt. *a* Diffuse Fluorescenz, *b* bandförmige Fluorescenz, *c* Mark, *d* perilacunäre Fluorescenz, *e* canaliculäre und pericanaliculäre Fluorescenz

Veränderungen der Kittsubstanz sicher auszuschließen. Im Rahmen der durch die Methodik gegebenen Möglichkeiten kann jedoch eine elastische Zerstörung des Knochens im Entkalkungsbereich weitgehend ausgeschlossen und damit das Vorliegen einer Osteolyse in der gegebenen Definition nachgewiesen werden.

Es besteht nun die Möglichkeit, daß die Höfe geringerer Kalkdichte auf einem primären perilacunären Kalkmangel beruhen (POMMER, 1925). Dagegen spricht, daß die Verkalkung meist um die jungen Osteocyten beginnt und nach unserem bisherigen Wissen um den Verkalkungsvorgang eine isolierte Mangelverkalkung um einen Osteocyten unwahrscheinlich ist. Ein wichtiges Argument ist weiterhin, daß die pericanaliculäre Granulation stets zur Knochenoberfläche gerichtet ist (Abb. 3) und zusammen mit der der Lacunen bei bestimmten Osteopathien zahlenmäßig zunimmt. Der Vorgang der sekundären Entkalkung durch Osteolyse scheint damit am wahrscheinlichsten.

Die Untersuchung pathologischer Knochenproben läßt quantitative Unterschiede perilacunärer Veränderungen erkennen. Die Vermutung liegt daher nahe,

daß die Osteolyse den Ausdruck eines osteocytären Mineralumsatzes darstellt. Durch die Verabreichung von Tetracyclin vor der Entnahme der Knochenproben konnten wir eine perilacunäre und pericanaliculäre Einlagerung nachweisen. Nach unseren bisherigen Beobachtungen ist das Tetracyclin im histologischen Schnitt auf kalkhaltige Partien beschränkt. Die Bindung des Antibioticums durch Kollagen und Lipoproteide ist zu gering, so daß die Fluoreszenz stets Ausdruck einer Calciumeinlagerung darstellt. Die perilacunäre und -canaliculäre Fluoreszenz ist, wie die Oberflächenfluoreszenz, flüchtig und markiert damit das aktive oder verfügbare Calcium. Dennoch bestehen nach den vorliegenden Beobachtungen wesentlich Unterschiede, weshalb darauf noch näher eingegangen werden soll.

Das Tetracyclin lagert sich in zwei unterscheidbaren Phasen ein. Die derbe, bandartige Fluoreszenz entspricht dem Bereich des im Markierungszeitraum gebildeten Minerals (Abb. 8). Die diffuse Oberflächenfluoreszenz ist flüchtig und findet sich ausschließlich an Orten phasenkontrastoptisch nachgewiesener geringer Verkalkungsdichte (8). Die Auflösung des Fluoreszenzbildes ist ausreichend um für diese Fraktion eine von ROBINSON postulierte pericanaliculäre Konzentration auszuschließen.

Im Gegensatz dazu ist die perilacunäre Markierung nie im Bereich von Entkalkungshöfen anzutreffen. Sie ist nie diffus, wie die Oberflächenfluoreszenz, sondern stets scharf begrenzt (Abb. 6). Da im gesunden Knochen nur vereinzelt Zellen markiert sind, ist die Definition einer Calcium-einlagernden Zellform schwierig. Die markierten Lacunen entsprechen jedoch fast ausschließlich den in Abb. 7 dargestellten Zellen.

Der entscheidende Unterschied liegt jedoch im Verhalten der diffusen Oberflächenfluoreszenz und der perilacunären Fluoreszenz im pathologischen Knochen. Wir konnten Osteopathien wie primärer Hyperparathyreoidismus, Hyperthyreose und Osteomalacie mit stark verminderter Calciumdichte des gesamten Knochens und markanter diffuser Oberflächenfluoreszenz, jedoch ohne Markierung der Osteocyten beobachten. Bei denselben Erkrankungen mit demselben Entkalkungsgrad fanden wir bei Proben von anderen Patienten zahlreiche Lacunen mit Tetracyclineinlagerung. Die isolierte Perfusion eines Beines durch EDTA im Tierversuch mit folgender Markierung ergab eine Zunahme der diffusen Fluoreszenz, jedoch keine Osteocytenmarkierung (VITALI).

Fassen wir unsere phasenkontrastoptischen Befunde zusammen, so ergibt sich als wesentlichste Beobachtung die morphologische Bestätigung des von biochemischer Seite postulierten dualen Reglermechanismus der Calciumhomöostase (TALMAGE, ELLIOT, 1958; JEFFAY, BAYNE, 1964; NEUMANN, 1964; NORDIN, 1964; MCGREGOR, 1964; NICHOLS, 1963, u. a.). Danach besteht das verfügbare Calcium aus einer physikalisch-chemischen Gesetzen folgenden und durch die Membran des umgebenden Zellsyncytiums gesteuerten Phase. Sie entspricht unserer diffusen Fluoreszenz und scheint nach den vorliegenden Beobachtungen unter normalen Bedingungen entgegen der Annahme ROBINSONS (1964) die bedeutendere Fraktion zu sein. Die zweite Phase des verfügbaren Calciums wird rein durch celluläre Aktivität mobilisiert und gesteuert. Sie entspricht unserer perilacunären pericanaliculären Fluoreszenz. Die osteocytäre Aktivität ist aus mikroradiographischen Untersuchungen schwer-pathologisch veränderter Knochenproben und elektronenmikroskopischen Befunden bekannt. Die zur Untersuchung verwendete Methodik

erlaubt jedoch erstmalig routinemäßig die exakte Beurteilung der inneren und äußeren Oberfläche des Knochens bei gleichzeitiger optimaler cytologischer Untersuchungsmöglichkeit. Sie gestattet zugleich aber auch die Integration morphologischer und biochemischer Untersuchungsergebnisse.

### Zusammenfassung

Zum Nachweis umschriebener Unterschiede der Kalkdichte wurde eine spezielle Phasenkontrastmethode eingesetzt, die der Mikroradiographie gegenüber den Vorteil besserer Strukturauflösung, geringeren technischen Aufwandes bei gleichzeitig guter cytologischer Beurteilungsmöglichkeit besitzt. Die vergleichende Anfärbung der Schnitte erlaubt die Unterscheidung onkotischer, aktiv osteoclastischer und osteolytischer Vorgänge um Osteocyten. Durch die phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen tetracyclinmarkierter Knochenproben können auf Grund verschiedener morphologischer Charakteristica zwei verschiedene Phasen des „verfügbaren Calciums“ nachgewiesen werden. Im Bereich gering verkalkter Knochenoberflächen findet sich eine diffuse, um voll verkalkte Osteocytenlacunen und Osteocytencanaliculi eine scharf begrenzte Fraktion. Die mineralstoffwechselphysiologische Bedeutung dieser beiden Fraktionen wird in Beziehung zu neueren biochemischen Untersuchungen gesetzt.

### Osteocyte Activity, as Studied in Phase Contrast and Fluorescence Microscopy

#### Summary

A special phase contrast method was used to demonstrate localized differences of mineralisation in undecalcified bone sections. This method has the advantage over microradiography in that it permits better structural differentiation with a minimum of technical outlay. The comparative staining of the sections facilitates the distinction of oncotic, active osteoclastic and osteolytic processes around osteocytic lacunae. With phase contrast and fluorescence microscopic examination of tetracycline labelled bone specimens it is possible to distinguish two different phases of "available calcium" on the basis of different morphological characteristics. A diffuse tetracycline fluorescence is seen in low density surfaces of the trabeculae, whereas the fluorescence is well defined around fully calcified osteocytic canaliculi and lacunae. The importance of these two fractions in the physiology of mineral metabolism is discussed in the light of new biochemical data.

### Literatur

- ACHARD, J.: Physikochemische Untersuchungen am lamellären Knochen. *Z. Zellforsch.* **23**, 573 (1936).
- BAUD, C. A., and D. H. DUPONT: The fine structure of the osteocytes in the adult compact bone. In: *Electron microscopy*, vol. 2. New York: Academic Press 1962.
- BÉLANGER, L. F., J. ROBICHON, B. B. MIGICOVSKY, D. H. COPP, and J. VINCENT: Resorption without osteoclasts. In: *Mechanisms of hard tissue destruction*. Washington, D. C.: A.A.A.S. 1963.
- T. SEMBA, S. TOLNAI, D. H. COPP, L. KROOK, and C. GRIES: The two faces of resorption. III Europ. Symp. on Calcified Tissues, Davos 1965.
- BURKHARDT, R.: Präparative Voraussetzungen einer klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarkes. Blut (im Druck).
- FELL, H. B.: Some factors in the regulation of cell physiology in selectal tissues. In: *Bone biodynamics*. Boston: Little, Brown & Co. 1964.

- FROST, H. M.: Preparation of thin undecalcified bone sections. *Stain Technol.* **33**, 273 (1958).  
— Osteocyte death in vivo. *J. Bone Jt Surg A* **42**, 138 (1960).
- HELLER-STEINBERG, M.: Ground substance, bone salts and cellular activity in bone formation and destruction. *Amer. J. Anat.* **89**, 347 (1951).
- HEUCK, F.: Zur Topographie des mobilen Kalzium im Knochen. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **3** (1964).
- IBSEN, K. H., and M. R. URIST: The biochemistry and physiology of the tetracyclines. *Clin. Orthop.* **32**, 143 (1964).
- JEFFAY, H., and H. R. BAYNE: Parathyroid hormone and release of calcium 45 from bone. *Amer. J. Physiol.* **206**, 415 (1964).
- JOHNSON, L. C.: Morphologie analysis in pathology. In: *Bone biodynamics*. Boston: Little Brown & Co. 1964.
- JOWSEY, J., B. L. RIGGS, and P. J. KELLY: Mineral metabolism in osteocytes. *Proc. Mayo Clin.* **39**, 480 (1964).
- KIND, H.: Studien zur Frage der Osteolyse; histologische und chemische Untersuchungen an experimentellen Frakturen und Transplantaten. *Beitr. path. Anat. allg. Path.* **111**, 283 (1951).
- KNESE, K.-H.: Knochenbildung und Entwicklung der Knochenstruktur. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **47**, 35 (1963).
- LAPIERE, CH. M., and J. GROSS: Animal collagenase and collagen metabolism. In: *Mechanisms of hard tissue destruction*. Washington, D. C.: A.A.A.S. 1963.
- LERICHE, R., et A. POLICARD: Les problemes de la physiologie normale et pathologique de l'os. Paris: Masson & Cie. 1926.
- LIPP, W.: Neuuntersuchung des Knochens. *Acta anat. (Basel)* **162**, 20 (1954).  
— Amino-peptidase in bone cells. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 205 (1959).
- MAYNO, G., u. CH. ROULLER: Die alkalische Phosphatase in der Biologie des Knochengewebes. *Virchows Arch. path. Anat.* **321**, 1 (1951).
- MCGREGOR, J.: Blood-bone equilibrium. In: *Bone biodynamics*. Boston: Little, Brown & Co. 1964.
- MÜLLER, H.: Zit. M. B. SCHMIDT.
- NEUMAN, W. F.: Blood-bone exchange. In: *Bone biodynamics*. Boston: Little, Brown & Co. 1964.
- NICHOLS, G.: In vitro studies of bone resorptive mechanisms. In: *Mechanisms of hard tissue destruction*. Washington, D. C.: A.A.A.S. 1963.
- NORDIN, B. E. C.: Some observation the measurement of bone formation rate with bone-seeking isotopes. In: *Bone biodynamics*. Boston: Little, Brown & Co. 1965.
- NOVELLI, A.: Nuova colorazione selectiva delle fibre connettivali. *Boll. Soc. ital. Pat.* **5**, 145 (1958).
- POMMER, G.: Über Osteoporose, ihren Ursprung und ihre differentialdiagnostische Bedeutung. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **136**, 1 (1925).
- RECKLINGHAUSEN, F. v.: Untersuchungen über Rachitis und Osteomalazie. Jena: Gustav Fischer 1910.
- RINDFLEISCH: Zit. M. B. SCHMIDT.
- ROBINSON, R. A.: Observations regarding compartments for tracer calcium in the body. In: *Bone biodynamics*. Boston: Little, Brown & Co. 1964.
- RUTH, E. B.: Basophilic islands in osseous tissue and their relation to resorption. *Anat. Rec.* **140**, 307 (1961).
- RUTISHAUSER, R., and G. MAYNO: Physiopathology of bone tissue. The osteocytes and fundamental substance. *Bull. Hosp. Joint Dis.* **12**, 468 (1951).
- SCHMIDT, M. B.: Rachitis und Osteomalazie. In: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. 9/1. Berlin: Springer 1929.
- SCHINK, W., u. H. P. VITTALI: Morphologische Untersuchungen zur Stoffwechselphysiologie des Knochens. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* (im Druck).
- SMITH, J. W.: The arrangement of collagen fibres in human secondary osteones. *J. Bone Jt Surg. B* **42**, 588 (1960).
- TALMAGE, R. V., and J. R. ELLIOTT: Removal of calcium from bone as influenced by the parathyroid. *Endocrinology* **62**, 717 (1958).

- URIST, M. R., U. S. MACDONALD, M. J. MOSS, and W. A. SKOOG: Rarefying disease of the selection. In: Mechanism of hard tissue destruction. Washington, D. C.: A.A.A.S. 1963.
- VIRCHOW, R.: Zit. M. B. SCHMIDT.
- VITALI, H. B.: Unveröffentlichte Beobachtung.
- Neue Untersuchungsmethoden zum Studium systemisierter Knochengewebsveränderungen und Möglichkeiten der Objektivierung therapeutischer Maßnahmen. I. Badenweiler Symposium (Osteoporose) 1964.
- Funktionelle Histologie des Knochens. Im Druck.
- VOLKMANN, J.: Zit. M. B. SCHMIDT.
- ZAWISCH-OSSENITZ, C.: Über Inseln von basophiler Substanz in den Diaphysen langer Röhrenknochen. Z. mikr.-anat. Forsch. **10**, 472 (1927).
- ZIEGLER, E.: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, Bd. 2. 5. Aufl., S. 123, 1887.

Dr. H. P. VITALI  
Städtische Krankenanstalt der Chirurgischen Klinik  
5 Köln-Merheim, Ostmerheimer Str. 200