

## Elektronenmikroskopische Darstellung der periosteocytären Matrix durch Ultradünnschnitt-EDTA-Entkalkung\*

K. DONATH und G. DELLING

Pathologisches Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. G. Seifert)

Eingegangen am 2. August 1971

### Electron Microscopic Demonstration of the Periosteocytic Matrix by EDTA-Decalcification of Ultrathin Sections

*Summary.* The mineralization pattern of the periosteocytic matrix of cortical bone was examined by decalcifying ultrathin sections of the tibial metaphysis of female rats. Since contrast material is only absorbed by the non-mineralized osseous matrix the section decalcified sections show a negative of the mineralized tissue. Investigations of non-decalcified sections of bone made for comparison were performed. This method is useful for demonstrating the mineralization pattern of the periosteocytic matrix as well as for excluding artefacts in non-decalcified sections of bone.

*Zusammenfassung.* An der Metaphysencorticalis der Tibia weiblicher Ratten wurde der Mineralisationsgrad der periosteocytären Matrix mit Hilfe der Schnittentkalkung untersucht. Da Kontrastmittel nur von nichtmineralisiertem Knochengewebe aufgenommen werden, erhält man nach der Schnittentkalkung ein Negativbild der mineralisierten Knochenmatrix. Vergleichende Untersuchungen zu unentkalkten Schnitten wurden durchgeführt. Die Methode ist zur Darstellung des Mineralisationsgrades der periosteocytären Matrix sowie zum Ausschluß von Artefakten an unentkalkten Knochenschnitten geeignet.

Die Bedeutung des Osteocyten für die Calcium-Homöostase ist in den letzten Jahren ausführlich dargestellt worden (Baud, 1962; Bélanger, 1969; Cameron, 1969; Talmage, 1970; Matthews, 1970; Baud und Aul, 1971). Ultrastrukturelle Veränderungen sowohl des Osteocyten als auch der periosteocytären Matrix wurden sowohl unter physiologischen Bedingungen (Jande und Bélanger, 1971) als auch bei gesteigerter Knochenresorption (Remagen, Caesar und Heuck, 1968) beschrieben. Dabei ließen sich die mit unterschiedlichen Methoden der Fixation, Entkalkung und Kontrastierung erhobenen Befunde nur teilweise miteinander vergleichen. Unklarheit besteht unter anderem über die Art und Ausdehnung der osmiophilen Membran bzw. der Mucopolysaccharidscheide in der Wand der Osteocytenhöhlen. Da sowohl der Oberfläche der Lacunenwand als auch der Wand der Canaliculi mit ihren Osteocytenausläufern eine wesentliche Stoffwechselfunktion zugeordnet worden ist, ist die weitere Aufklärung der Ultrastruktur dieser Gewebsregion notwendig. Wir versuchten deshalb eine geeignete Darstellung der periosteocytären Matrix zu erreichen.

### Material und Methodik

Bei 10 weiblichen, 120 g schweren Sprague-Dawley-Ratten wurden beide Tibia durch Perfusion mit Glutaraldehyd fixiert (Donath und Delling, 1971). Nach der Fixation wurden

\* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

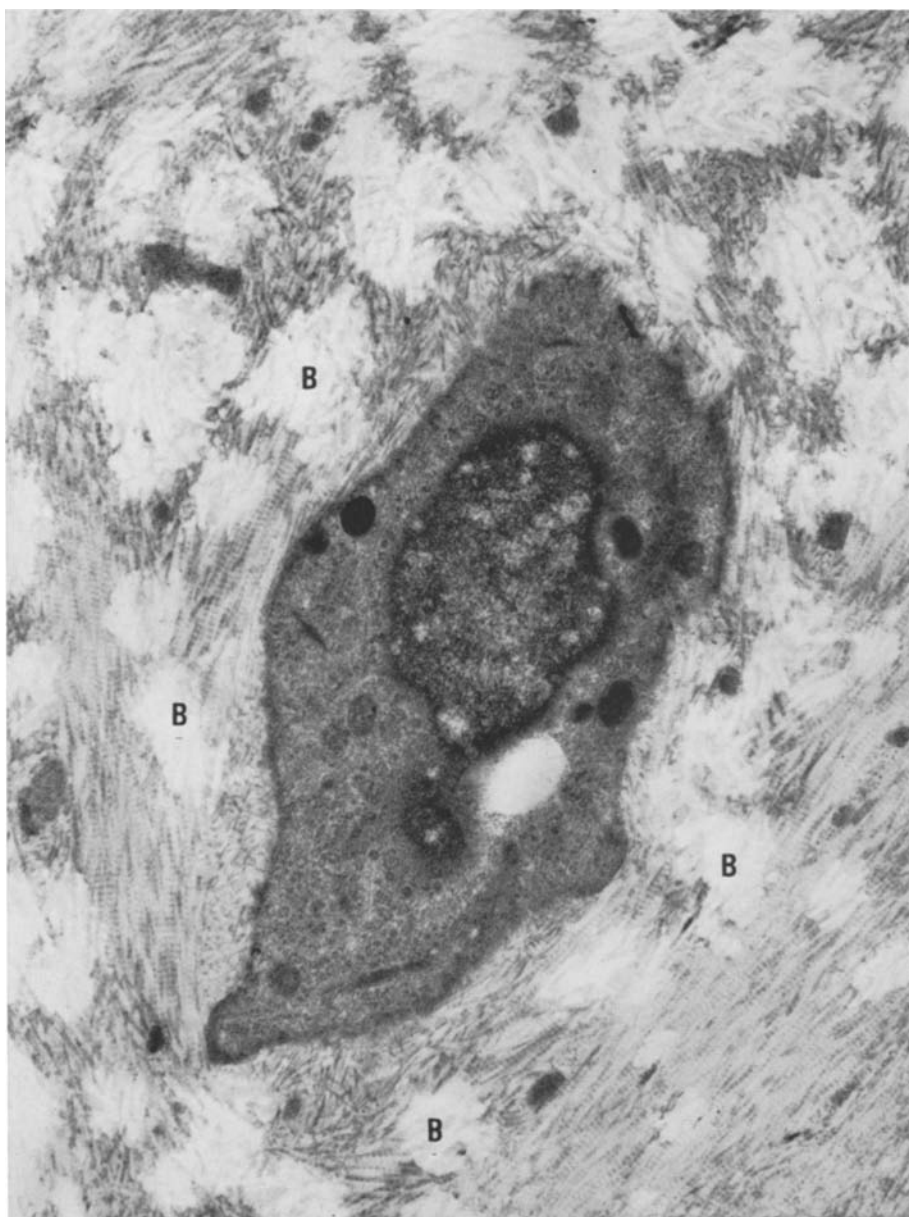


Abb. 1. Schnittentkalkte Metaphysencorticalis der Rattentibia. Osteocyt bei experimentellem Hypoparathyreoidismus. Perfusionsfixation (Glutaraldehyd mit Cacodylatpuffer; Osmiumsäure), vor der Entkalkung mit Uranylacetat kontrastiert. Mineralisierte Bezirke (B). 12300  $\times$

kleinere Blöcke der Metaphysencorticalis zugesägt, in Epon 812 eingebettet und mit dem Ultramikrotom (Reichert)<sup>1</sup> feingeschnitten. Die Kontrastierung je eines Schnittes erfolgte mit Uranylacetat (Stenpak und Wand, 1964), mit Bleicitrat (Venable und Coggeshall, 1965)

<sup>1</sup> Mit freundlicher Unterstützung der Werner-Otto-Stiftung, Hamburg.

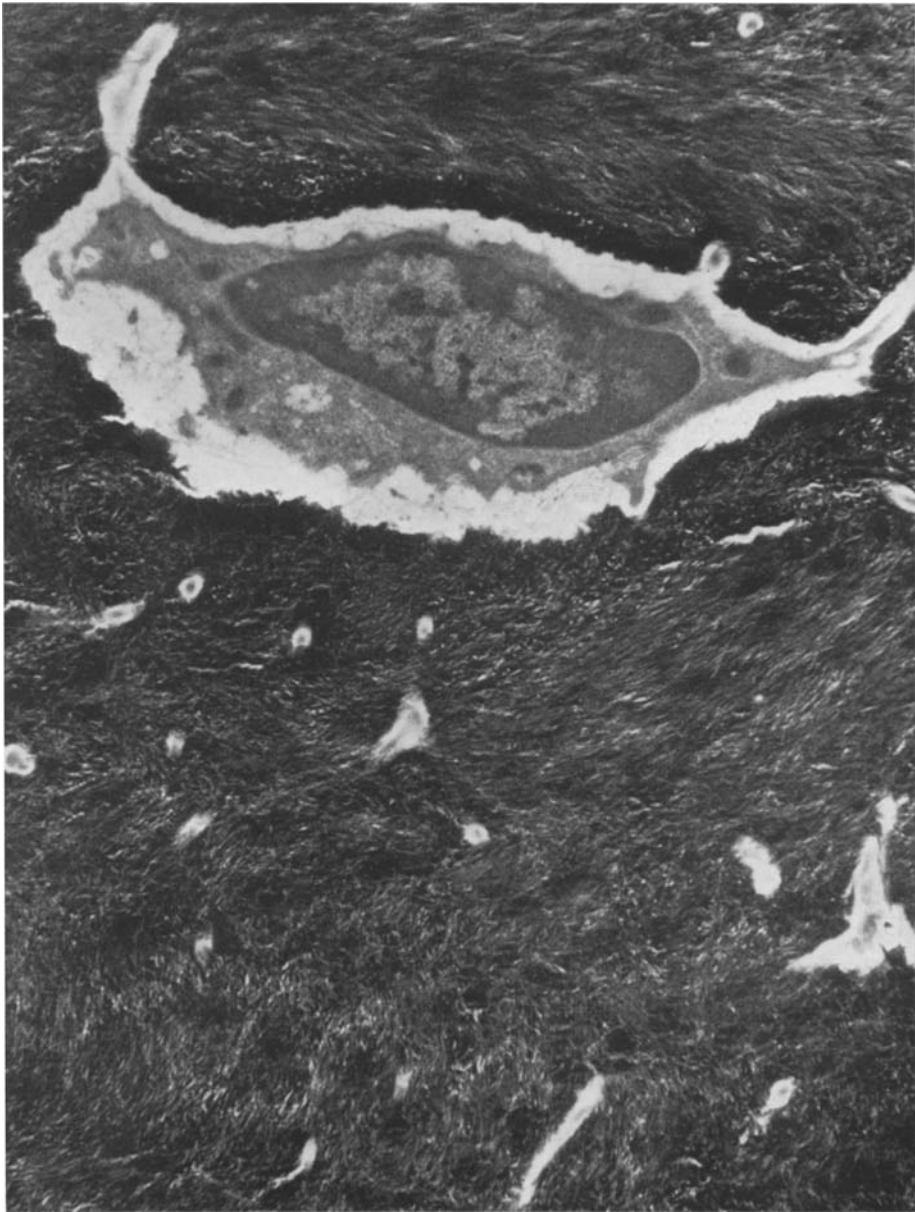


Abb. 2. Unentkalkte Metaphysencorticalis der Rattentibia. Osteocyt mit weitem Osteocytendorf bei experimentellem Hypoparathyreoidismus. Perfusionsfixation (Glutaraldehyd mit Cacodylatpuffer; Osmiumsäure), Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. 12300  $\times$

sowie in Kombination von Uranylacetat und Bleicitrat. Jeweils ein korrespondierender Schnitt wurde mit einem Tropfen 1%iger EDTA-Lösung (pH 7,4; eingestellt mit Triäthanolamin) im Anschluß an die Kontrastierung entkalkt. Insgesamt wurden pro Gewebelöckchen 6 Schnitte mit dem Elektronenmikroskop Philips EM 300 untersucht.

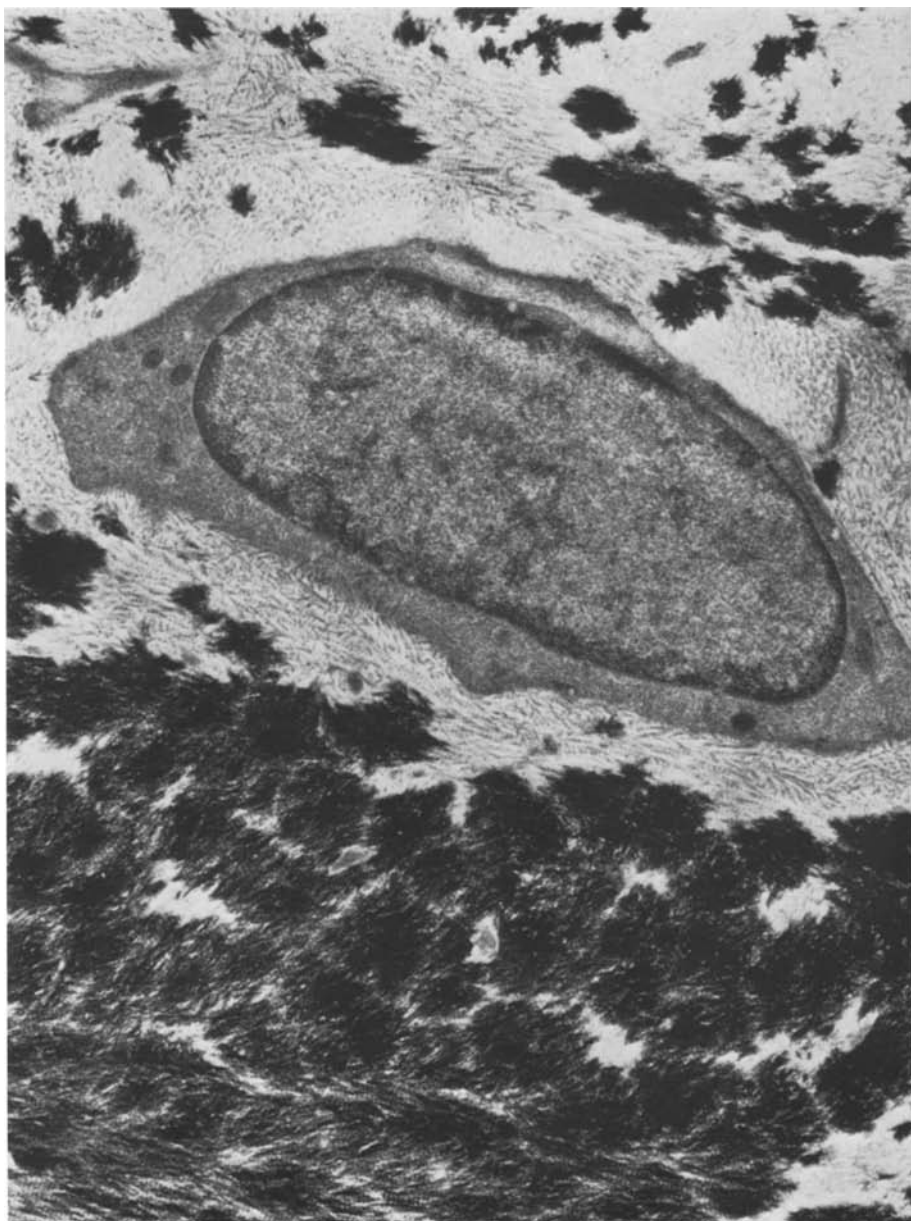


Abb. 3. Unentkalkte Metaphysencorticalis der Rattentibia. Fehlender Osteocytencytenlacunenraum zwischen Lacunenwand und Osteocytenoberfläche. Experimenteller Hypoparathyroidismus. Perfusionsfixation (Glutaraldehyd mit Cacodylatpuffer; Osmiumsäure), Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. 12300  $\times$

### Ergebnisse

Im kontrastierten Ultradünnschnitt kommt es nach der Entkalkung zur Negativdarstellung der mineralisierten Knochenbezirke. Die verkalkte Knochenmatrix ist für Kontrastmittel (Osmiumsäure, Uranylacetat, Bleicitrat u. a.) nicht

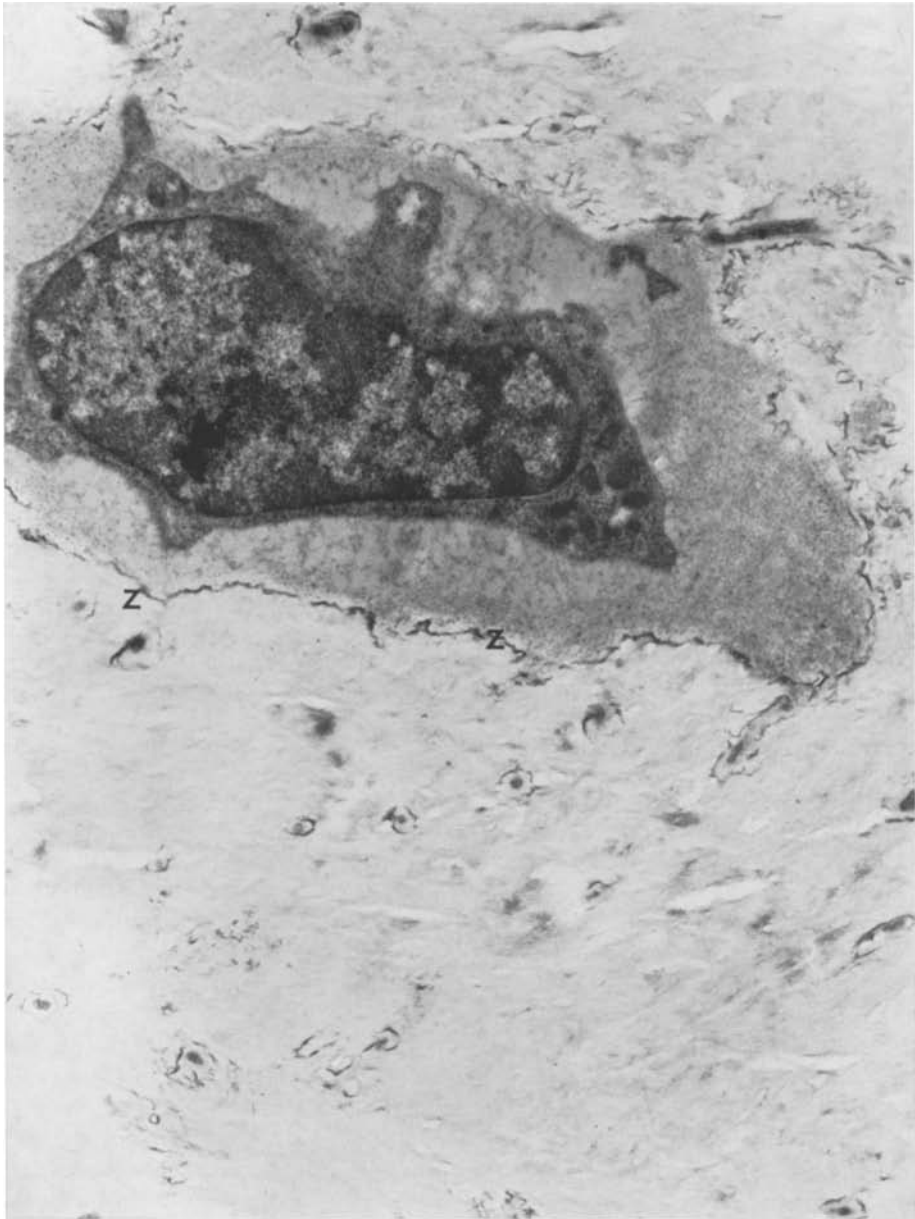


Abb. 4. Schnittentkalkte Metaphysencorticalis der Rattentibia. Osmiophile Grenzzone (Z). Experimenteller Hypoparathyreoidismus. Perfusionsfixation (Glutaraldehyd mit Cacodylatpuffer, Osmiumsäure), Kontrastierung mit Uranylacetat vor der Entkalkung. 12300  $\times$

erreichbar, da die Calciumapatitkristalle die kollagenen Fasern vollständig bedecken (Glimcher, 1968). Eine Anlagerung von Kontrastmittel an die Calciumapatitkristalle wurde bei quantitativen Messungen (Intensitätsbestimmungen)

nicht beobachtet. Bei der Entkalkung kontrastierter Schnitte (Osmiumsäure und Uranylacetat) wird Calcium, ebenso wie alle anderen bivalenten Kationen, durch EDTA komplex gebunden und herausgelöst. Osmiumsäure und Uranylacetat werden vom EDTA dagegen nicht angegriffen, so daß die nicht verkalkten Bezirke kontrastiert, die verkalkten jedoch unkontrastiert dargestellt werden (Abb. 1). Je nach Lage der Osteocyten (markraumnah, zentral) wechselt die Struktur der pericellulären Matrix und die Weite der Osteocytenhöhle (Abb. 2). Die pericelluläre Matrix besteht bei markraumnahen Osteocyten vorwiegend aus kollagenen Fasern (Abb. 3), deren Verlauf von der radiären zur parallelen Ausrichtung mit der Entfernung vom Markraum wechselt. Zwischen den kollagenen Fasern liegt eine elektronenoptisch hellere Grundsubstanz, die bei längerer Entkalkung gelöst wird und im pericellulären Raum als flockiges Material erscheint. Sog. „dense bodies“, die auch im nichtkontrastierten Schnitt nachweisbar sind, verändern ihre Dichte nach EDTA-Entkalkung nicht. Die Übergangszone vom unverkalkten zum verkalkten Knochen erscheint scharf abgegrenzt und erlaubt eine Aussage über die Gesamtbreite. Membranähnliche osmiophile Substanzen finden sich in zentralen Abschnitten der Corticalis im Bereich der Mineralisationszone der Osteocytenhöhle (Abb. 4). Außerdem kommt es zur Ausbildung dieser osmiophilen Grenzzone entlang der Canaliculae der Osteocytenausläufer. Die osmiophilen Substanzen zeigen einen diskontinuierlichen Verlauf, der in der Osteocytenlacune vielfach von kollagenen Fasern unterbrochen wird.

### Diskussion

Schenk und Riede (1971) führten lichtmikroskopisch vergleichende mikroradiographische Untersuchungen an teilentkalkter Femurcorticalis durch. Elektronenmikroskopisch liegen bisher Untersuchungen entweder am blockentkalkten oder am unentkalkten Material vor. Für die Befunde, die am entkalkten Material erhoben wurden, blieb der Einfluß des EDTA ungeklärt. Für das unentkalkte Material wurde ein Einfluß der Phosphatpuffer der Fixierlösung auf nachträgliche Calciumphosphatniederschläge diskutiert. Die Verwendung der unterschiedlichen Puffer (Cacodylat, s-Collidin) ließen jedoch keinen Unterschied erkennen (Donath und Delling, 1971). Ebenso soll der pH-Wert und der Calciumgehalt (Remagen et al., 1968) der Streckflüssigkeit beim Feinschneiden einen Einfluß auf das Mineralisationsmuster haben. Die vergleichenden Untersuchungen von blockkontrastierten unentkalkten und schnittentkalkten Proben ließen keine Unterschiede im Mineralisationsgrad der periosteocytären Matrix erkennen. Durch die Schnittentkalkung ist eine eindeutige Darstellung der periosteocytären Matrix möglich. In Übereinstimmung mit Jande und Belanger (1971) kann eine reine Mucopolysaccharidscheide, wie sie von Baud und Morgenthaler (1963), Cameron (1964) und Remagen et al. (1968) vermutet wurde, nicht nachgewiesen werden. In einzelnen, überwiegend älteren Osteocyten kommt es dagegen zur Ausbildung einer unvollständigen membranähnlichen osmiophilen Grenzzone, deren Funktion noch ungeklärt ist (Cooper, Milgram und Robinson, 1966; Remagen et al., 1968). Besonders deutlich tritt diese Grenzzone an den Canaliculae der Osteocytenausläufer hervor. Funktionelle Veränderungen der Osteocyten und damit der Knochenmatrix werden durch die Negativdarstellung erheblich deutlicher dargestellt.

## Literatur

- Baud, C. A.: Morphologie et structure inframicroscopique des osteocytes. *Acta anat. (Basel)* **51**, 209—225 (1962).
- Aul, E.: Osteocyte differential count in normal human alveolar bone. *Acta anat. (Basel)* **78**, 321—327 (1971).
- Morgenthaler, P. W.: Structure submicroscopique du rebord lacuno-canaliculaire osseux. *Morph. Jb.* **104**, 476—486 (1963).
- Bélanger, L. F.: Osteocytic osteolysis. *Calcif. Tiss. Res.* **4**, 1—12 (1969).
- Cameron, D. A.: The ultrastructural basis of resorption. *Calcif. Tiss. Res.* **4**, 279—280 (1969).
- Cooper, R. R., Milgram, J. W., Robinson, R. A.: Morphology of the osteon, an electron microscopic study. *J. Bone Jt. Surg. A* **48**, 1239—1271 (1966).
- Donath, K., Delling, G.: Einfluß von Fixation und EDTA-Entkalkung auf den Osteocyten und die pericelluläre Matrix. *Dtsch. Ges. Elektronenmikr., Karlsruhe 1971* (im Druck).
- Glimcher, M.: A basic architectural principle in the organization of mineralized tissue. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **61**, 16—36 (1968).
- Jande, S. S., Bélanger, L. F.: Electron microscopy of osteocytes and the pericellular matrix in rat trabecular bone. *Calcif. Tiss. Res.* **6**, 280—289 (1971).
- Matthews, J. L.: Ultrastructure of calcifying tissues. *Amer. J. Anat.* **129**, 451—458 (1971).
- Remagen, W., Caesar, R., Heuck, F.: Elektronenmikroskopische und mikroradiographische Befunde am Knochen der mit Dihydrotachysterin behandelten Ratte. *Virchows Arch. Abt. A* **345**, 245—254 (1968).
- Schenk, R. K., Riede, U. N.: Mikroradiographische Untersuchungen über die Löslichkeit der Knochensalze bei fraktionierter Entkalkung mit Versenat, Ascorbat und Zitrat. *Acta ant. (Basel)* **78**, 406—411 (1971).
- Stenpak, J. G., Ward, R. T.: An improved staining method for electron microscopy. *J. Cell Biol.* **22**, 697—701 (1964).
- Talmage, R. V.: Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Amer. J. Anat.* **129**, 467—476 (1970).
- Venable, J. H., Coggeshall, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25**, 407—408 (1965).

Dr. med. K. Donath  
Dr. G. Delling  
Pathologisches Institut UKE  
D-2000 Hamburg 20  
Martinistraße 52  
Deutschland