

Ultrastruktur und Entwicklung des Corticalisosteocyten

Tierexperimentelle Untersuchungen an der Rattentibia *

A. Schulz, K. Donath und G. Delling

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

Eingegangen am 19. Juli 1974

Ultrastructure and Development of Cortical Osteocytes

Experimental Investigation in the Rat

Summary. Osteocytic development was studied in cortical bone of the tibial metaphysis in the rat, with respect to the relationship between age and localization of the cells. The different development stages through which the osteocytes pass during their life cycle are characterized by functional alterations of the osteocyte itself, as well as pericellular structures of bone substance.

The osteoblasts, surrounded by bone matrix, are transformed to matrix osteocytes and then to young osteocytes. The young osteocytes are situated at the mineralization front of newly formed bone matrix. The osteocyte matures through complete mineralization of the perilacunar bone matrix. The mature osteocyte may acquire different functional aspects (inactive, formative, resorptive) or degenerate. The final phase is the empty lacunae, which is mineralized by micropetrosis.

Zusammenfassung. An der Metaphysencorticalis der Rattentibia wurde die Entwicklung des Osteocyten mit Hilfe seiner Alters-Lage-Beziehung im Knochen untersucht. Die funktionellen Veränderungen des Osteocyten und seiner pericellulären Strukturen charakterisieren die verschiedenen ultrastrukturell faßbaren Entwicklungsstadien der Knochenzelle.

Aus dem Osteoblasten entsteht über den Matrixosteocyten der junge Osteocyt, der an der Mineralisationsfront der neugebildeten Knochenmatrix liegt. Durch komplette Mineralisation der perilakunären Matrix entwickelt sich der reife Osteocyt. Dieser kann phasisch verschiedene Funktionszustände (inaktiv, formativ, resorptiv) annehmen oder degenerieren. Endstadium ist die Leere Lakune mit Einschluß von Zellresten und Kollagenfasern, die teilweise mineralisieren. Die Kenntnis der aufgeführten Stadien gestattet die Beurteilung experimenteller Veränderungen.

Einleitung

Ultrastrukturelle Untersuchungen des Knochens haben gezeigt, daß der Osteocyt keine ruhende Zelle eines bradytrophen Gewebes darstellt. Die ultrastrukturellen Charakteristika dieser Zelle (Baud, 1962) ändern sich je nach Teilnahme am Matrix- und Mineralstoffwechsel des Knochens (Cameron *et al.*, 1964; Remagen *et al.*, 1968; Belanger, 1969). Der Funktionszustand des Osteocyten, dem eine zentrale Bedeutung im Mineral- und Stoffaustausch des Knochens zukommt (Matthews, 1971; Holtrop and Weniger, 1972), läßt sich an dem wechselnden Gehalt intracellulärer Strukturen und Organellen ablesen (Baud, 1968).

Der Osteocyt ist jedoch nicht als isoliertes Reaktionszentrum endokriner und metabolischer Einflüsse auf den Knochen zu betrachten. Er steht in enger funk-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

tioneller Beziehung zu den morphologischen Strukturen seiner unmittelbaren Umgebung, die sich in gleichermaßen empfindlicher Weise verändern können (Delling und Donath, 1972; Scherft, 1972). Bereits unter physiologischen Bedingungen können verschiedene Funktionszustände des Osteocyten nachgewiesen werden. Jande und Belanger (1969 und 1971) untersuchten den spongiösen Knochen der Ratte und definierten ultrastrukturell drei Phasen der Aktivität des Osteocyten. Sie unterschieden eine formative, eine resorptive und eine degenerative Phase. 1971 versuchte Jande durch Untersuchung der Spongiosa an der Kückentibia eine Zuordnung zwischen Zellalter und Aktivitätsphase. Danach befindet sich die jüngste Zelle in der formativen Phase, diese geht mit zunehmender Reife der Zelle in die resorptive Phase über und endet schließlich mit der alternden Zelle in der degenerativen Phase.

Die Kenntnis der Verknüpfung bestimmter funktioneller Charakteristika des Osteocyten mit seiner Entwicklung ist zur Abgrenzung pathologischer Veränderungen unter endokrinen oder metabolischen Einflüssen unerlässlich. Von der Vorstellung ausgehend, daß die Lage des Osteocyten im Knochen ein Maß für das Alter des Osteocyten darstellt, haben wir diese Alters-Lage-Beziehung der Zelle im Hinblick auf ihre ultrastrukturell faßbaren Funktionsbilder untersucht.

Die von früheren Untersuchern (Jande and Belanger, 1971; Jande, 1971) unter ähnlicher Fragestellung betrachtete Spongiosa wird nur von endostalen Knochenoberflächen begrenzt und stellt morphologisch eine besondere Knochenstruktur dar. Sie ist raschen Veränderungen durch Knochenumbauvorgänge ausgesetzt und läßt daher eine verlässliche Alters-Lage-Bestimmung ihrer Osteocyten nicht in jedem Falle zu. Daher haben wir die Osteocyten an der metaphysären Tibiacorticalis untersucht, da hier durch das appositionelle Knochenwachstum eine eindeutige Alters-Lage-Bestimmung möglich ist. Als Versuchstiere dienten Ratten, deren corticaler Knochen aus lamellären Ring-Systemen aufgebaut ist (Abb. 1).

Material und Methoden

Versuchstiere waren wachsende Ratten (weibliche Albinoratten, Stamm Wistar CFN) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 130 g. Die Aufarbeitung des Knochenmaterials erfolgte unentkalkt (Donath und Delling, 1971). Nach 10minütiger Perfusion der Tiere durch die Aorta abdominalis mit einem Glutaraldehyd-Cacodylatpuffergemisch (Glutaraldehyd 2,3%; pH 7.2–7.4; 300 mosm) wurden beide Tibiae entfernt und die metaphysäre Corticalis in Blöcke von maximal 1 mm Kantenlänge zerlegt. Anschließend erfolgte eine weitere Immersionsfixation des Materials für 4 h in dem gleichen Glutaraldehyd-Cacodylatpuffergemisch bei +4° C. Die Proben wurden dann in Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4; 300 mosm) gespült und mit einem 1,33%igen Osmiumtetroxyd-s-Collidin-Puffergemisch für 2 h nachfixiert. Nach erneuter Spülung in s-Collidin Puffer wurden die Gewebeproben über die aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxyd entwässert. Nach Vorbehandlung der Knochenstückchen in einem Propylenoxyd-Epongemisch von steigender Konzentration (3:1, 1:1, 1:3) im Vakuum (3 Tage) erfolgte die Einbettung in Epon 812 (abgewandelt nach Luft, 1961; A:B = 2:8).

Die Feinschnitte wurden am Ultramikrotom Reichert OMU 2 mit einem Diamantmesser hergestellt. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat (Donath und Delling, 1971). Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Schnitte führten wir am Siemens I und am Philips EM 300 bei 80 kV Strahlspannung durch. Neben den ultrastrukturellen Merkmalen der Zelle wurden die Strukturen der osteocytären Umgebung untersucht und in das Funktionsbild mit einbezogen. In Anlehnung an die Benennung morphologischer Charakteristika des Osteocyten und seiner Umgebung durch andere Untersucher (Remagen *et al.*, 1968; Jande, 1971; Scherft, 1972; Wassermann und Yaeger, 1965) wurden Bezeichnungen

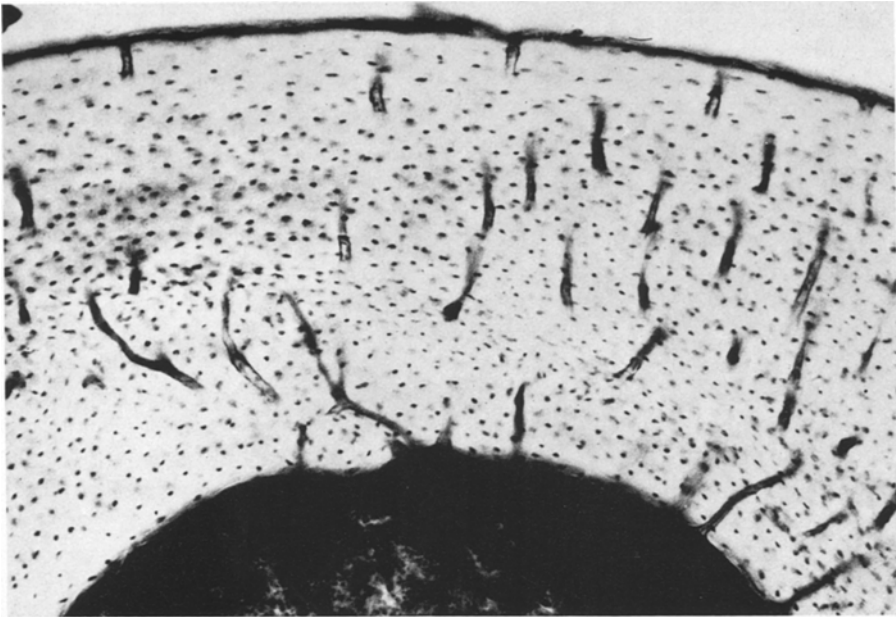


Abb. 1. Sektor der Tibiacorticalis einer Ratte mit periostaler und endostaler Knochenoberfläche. Unentkalkter Schliff, Stückfärbung basisches Fuchsin, 25 ×

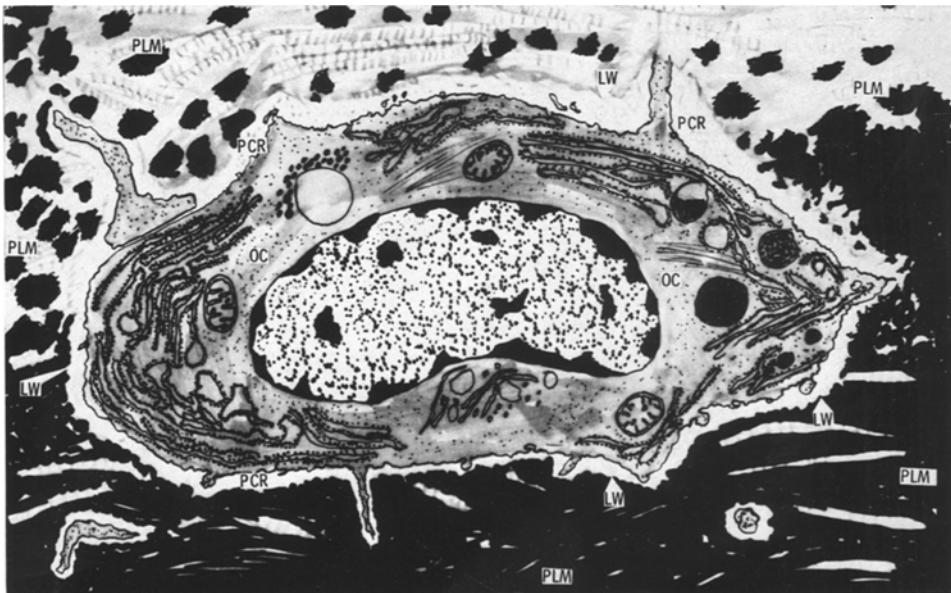


Abb. 2. Schematische Darstellung des Osteocyten und der periosteocytären Strukturen: OC Osteocyt, LW Lakunenwand, PCR pericellulärer Raum, PLM perilakunäre Matrix

gen der periosteocytären Strukturen wie pericellulärer Raum (PCR), Lakunenwand (LW), perilakunäre Matrix (PLM), interlakunäre Matrix (ILM) in der Beurteilung besonders berücksichtigt (Abb. 2).

Ergebnisse

Aus dem Osteoblasten entwickelt sich durch Synthese von Knochenmatrix, Matrixausschleusung und Ablagerung in der Umgebung der Matrixosteocyt. Entsprechend liegt die Knochenzelle in diesem Entwicklungsstadium nahe der end- oder periostalen Knochenoberfläche und weist die cellulären Charakteristica der Proteinsynthese auf (Abb. 3a). Der Zelleib ist dicht angefüllt mit einem rauhen endoplasmatischen Reticulum, das oft vesikelartig erweitert ist. Das Golgifeld ist klein, die Mitochondrien sind nicht sehr zahlreich. Der Zellkern ist glattwandig. Die Zellmembran liegt der Lakunenwand dicht an, ein pericullärer Raum ist nicht erkennbar. Die perilakunäre und interlakunäre Knochenmatrix weist ein unterschiedliches Mineralisationsmuster auf und enthält besonders zur Knochenoberfläche hin nur wenige kleine Kristallisationskeime. Diese sind bei der angewandten Kontrastierung als schwarze büschelförmige Bezirke erkennbar, die keine eindeutige Ausrichtung zum Verlauf der Kollagenfasern zeigen.

Im nächsten Entwicklungsstadium befindet sich die als junger Osteocyt zu bezeichnende Knochenzelle (Abb. 3b). Sie ist als Folge fortwährender Osteoblastentätigkeit bereits wieder von der Oberfläche ihrer Entstehung durch appositionelle Knochenmatrixablagerung abgerückt. Der junge Osteocyt ist allseits von Knochenmatrix umgeben. Der Zellkern ist rundlich-oval und glatt begrenzt. Die Komposition der Zellorganellen deutet auf eine erhöhte Proteinsynthese hin durch das vorherrschende rauhe endoplasmatische Reticulum. Die pericellulären Strukturen dieser Zelle lassen jedoch schon deutliche Unterschiede im Vergleich zum entstehenden Osteocyt erkennen. Die Zellmembran liegt nur noch stellenweise der Lakunenwand an, so daß sich ein spaltförmiger pericellulärer Raum entwickelt und die ihn begrenzende Lakunenwand in ihrem Verlauf deutlich sichtbar wird. Der pericelluläre Raum enthält fein granuläres und filamentäres Material. Die Lakunenwand ist glatt. Charakteristische Veränderungen zeigt die perilakunäre Matrix. Sie ist bereits zum älteren Knochen hin dicht mineralisiert, zeigt aber in Richtung auf die Knochenoberfläche eine noch aus fleckförmigen, teils konfluierenden Kristallisationszentren bestehende Mineralisation. Dieser Osteocyt liegt damit an der Grenze zum komplett mineralisierten Knochen, an der sogenannten Mineralisationsfront.

Mit fortschreitender Mineralisation und weiterer subperiostaler Knochenneubildung ist der Osteocyt schließlich vollständig von mineralisiertem Knochen umgeben und wird zum reifen Osteocyt (Abb. 4a—b). Ultrastrukturell ist der reife Osteocyt durch eine vollständig mineralisierte perilakunäre Matrix charakterisiert. Lakunenwand, pericellulärer Raum und Osteocyt sind jedoch in ihrer Substruktur variabel. Der Zellkern ist bei der ruhenden Zelle groß und besitzt eine glatte Kernmembran. Das Cytoplasma enthält geringere Anteile proteinsynthetisierender Zellorganellen. Meist sind jedoch ein deutliches Golgifeld und vermehrt Mitochondrien ausgebildet. Die Organellenzusammensetzung ist abhängig vom Funktionszustand des Osteocyt. Während der in Abb. 4a enthaltene Osteocyt sich in einer inaktiven Phase befindet, kann der reife Osteocyt auch durchaus verschiedene Aktivitätsmerkmale zeigen. Neben Osteocyt mit formativer Aktivität bestehen solche mit resorptiver Aktivität (Abb. 4b). Das Cytoplasma der resorbierenden Zelle ist aufgelockert, es finden sich Vacuolen und Phagolysosomen. Der pericelluläre Raum wird erweitert und von granulären sowie

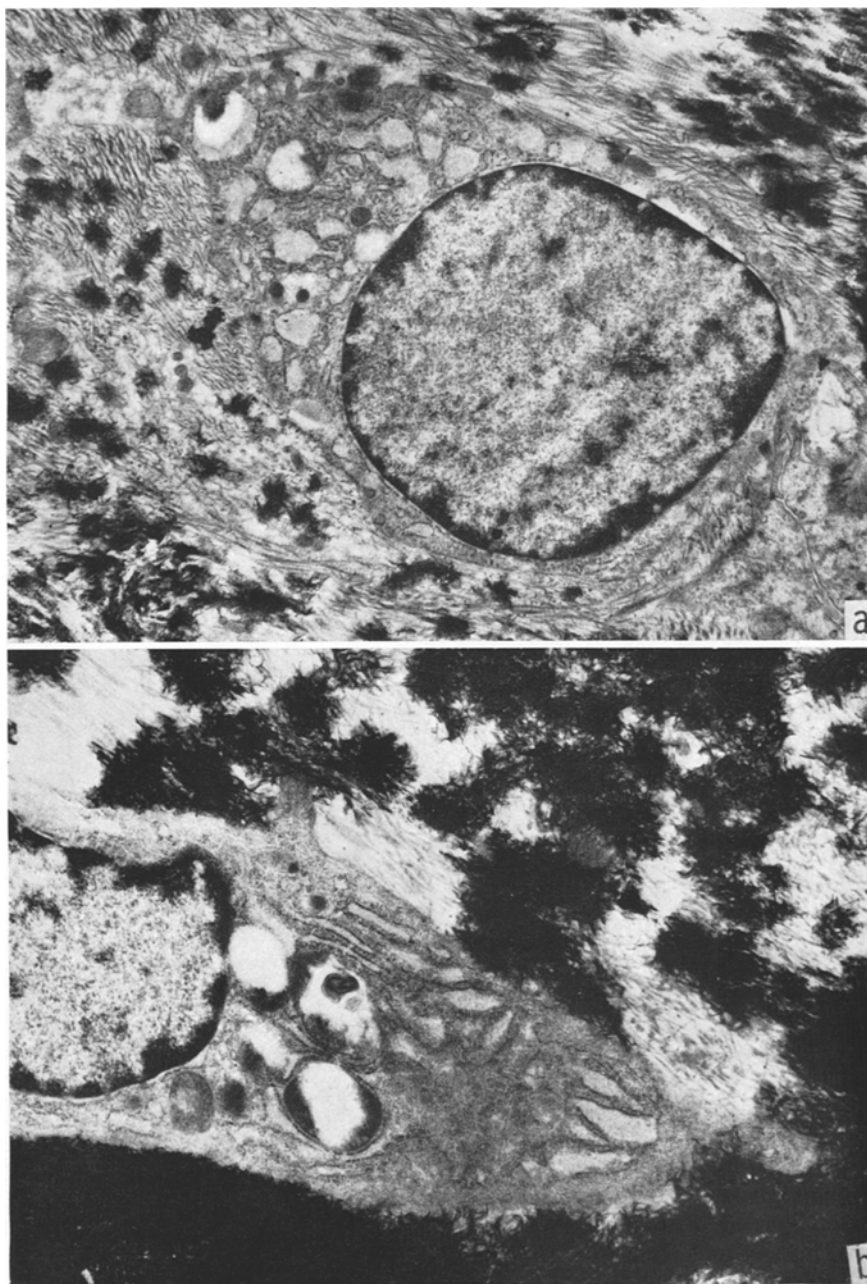


Abb. 3a u. b. Elektronenmikroskopische Darstellung der osteocytären Entwicklung. (a) Matrixosteocyt mit proteinsynthetisierenden Zellorganellen und beginnender fleckförmiger Mineralisierung der PLM (schwarze sternförmige Niederschläge). (b) Junger Osteocyt an der Mineralisationsfront gelegen, bereits zum Teil von komplett mineralisierter perilakunärer Matrix umgeben. Uranylacetat und Bleicitrat, (a) 9000 \times , (b) 14500 \times

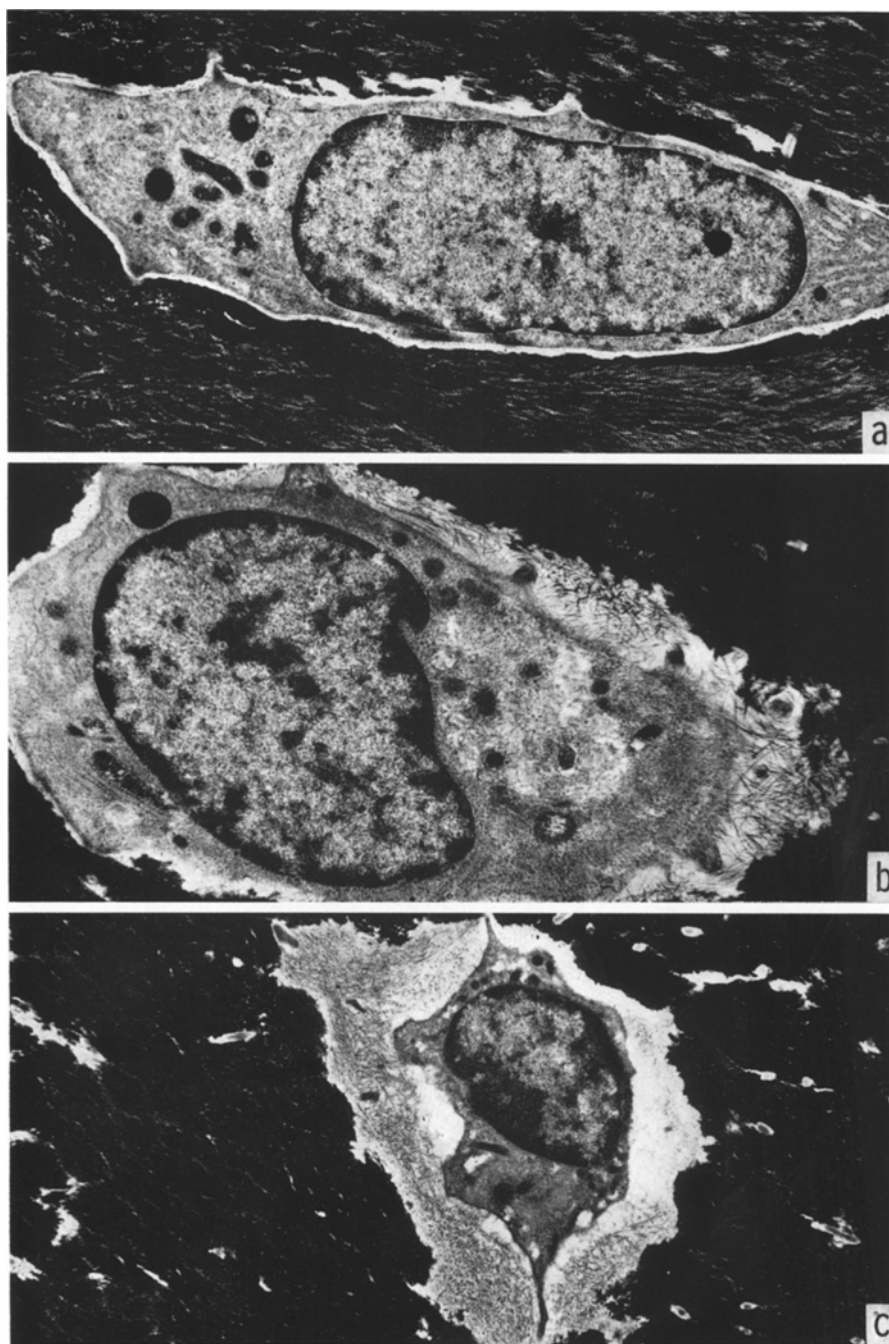


Abb. 4a—c. Elektronenmikroskopische Darstellung der osteocytären Entwicklung. (a) Reifer inaktiver Osteocyt mit schmalen pericellulärem Raum, glatter Lakunenwand und komplett mineralisierter perilakunärer Matrix. (b) Resorbierender reifer Osteocyt mit breitem pericellulärem Raum und gezackter Lakunenwand. (c) Degenerierender Osteocyt. Uranylacetat und Bleicitrat, (a) 6750 \times , (b) 7760 \times , (c) 5400 \times

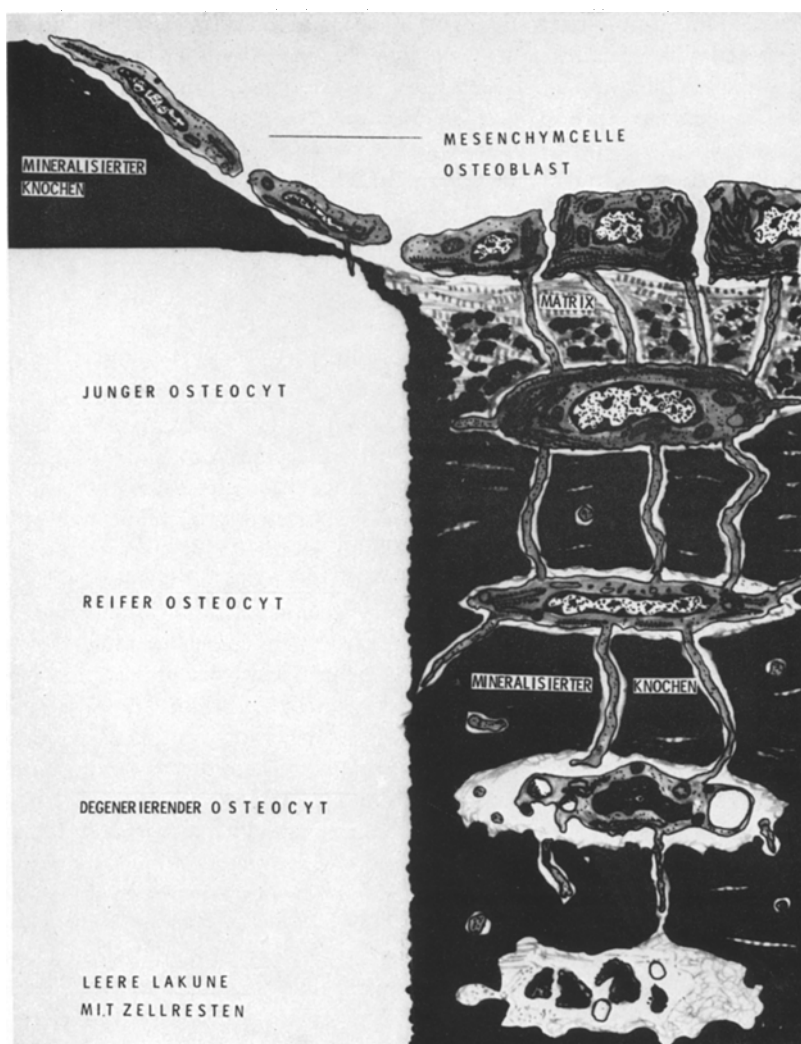


Abb. 5. Schematische Darstellung der osteocytären Entwicklungsstadien vom Osteoblasten zur leeren Lakune

fibrillären Strukturen angefüllt. Die Lakunenwand ist bizarr geformt mit tiefen Einbuchtungen. Stellenweise sind mineralisierte Matrixanteile freigelegt und ragen halbinselförmig in den pericellulären Raum. Intracellulär liegen vereinzelt auch phagocytisierte Fragmente mineralisierter Knochenmatrix.

Inmitten der älteren Knochenlamellen ist neben dem reifen Osteocysten das nächste Entwicklungsstadium ausgebildet — der degenerierende Osteocyt (Abb. 4c). Der Zellkern weist eine beginnende Pyknose mit Verklumpung des Heterochromatins auf. Im Cytoplasma sind wenig Zellorganellen, vor allem aber reichlich Vakuolen. Bei einem schmalen Cytoplasmasaum ist der pericelluläre Raum breit

und enthält fein granuläres und reticuläres Material. Auffällig verändert ist die Lakunenwand, die tiefe Einbuchtungen aufweist. Im Stadium des Zellunterganges findet man schließlich nur noch eine leere Lakune mit Zellresten. In der Lakune liegen Kollagenfasern, die in ihrem Verlauf unterschiedlich angeschnitten sind. Die Lakunenwand ist stark eingebuchtet. Die pericelluläre Matrix ist besonders dicht mineralisiert. Die Kollagenfasern innerhalb der Lakune weisen unregelmäßige Calcifikationen auf, die zum Teil konfluieren (Mikropetrosis). Die beobachteten Stadien der osteocytären Entwicklung sind in Abb. 5 schematisch dargestellt.

Diskussion

Der Osteocyt wurde von Cooper *et al.* (1966) als ein von mineralisierter Knochenmatrix umgebener Osteoblast bezeichnet. Der Osteocyt unterscheidet sich jedoch hinsichtlich seiner funktionellen Möglichkeiten und seines Organellengehaltes wesentlich vom Osteoblasten. Er entsteht aus dem Osteoblasten, verliert aber im Laufe seiner verschiedenen Entwicklungsstadien einige seiner ultrastrukturellen Funktionsmerkmale und gewinnt neue hinzu. Die Fähigkeit zur Knochenresorption ist die Haupteigenschaft, die der Osteocyt hinzugewinnt (Frost, 1960; 1963; Jowsey, 1964; Belanger, 1969; Heuck, 1970). Im resorbierenden Osteocyt sind lysosomale Organellen vorhanden, in denen hydrolytische Enzyme nachgewiesen werden konnten (s. Baud, 1968). Gleichzeitig bleibt aber die Fähigkeit des Osteocyten zur Matrixsynthese erhalten, wie es durch den autoradiographischen Nachweis hoher Incorporationsraten von radioaktiv markierten Aminosäuren in den Osteocyten gezeigt werden konnte (Koburg, 1961).

Dem jungen Osteocyten wird übereinstimmend eine vorwiegend formative Funktion zugeschrieben (Jande, 1971; Jande und Belanger, 1971; Cameron *et al.*, 1964; Baud, 1968). Über die weitere Entwicklung des Osteocyten bestehen unterschiedliche Auffassungen. Jande (1971) beobachtete am spongiösen Knochen einen funktionellen Wechsel der osteocytären Aktivität während des Lebenszyklus der Zelle. Aus der knochenbildenden Zelle wird eine knochenresorbierende. Diese degeneriert schließlich und geht zugrunde. Unsere Untersuchungen an der Corticalis zeigen dagegen, daß der Osteocyt zunächst ein Reifestadium erreicht, wenn seine umgebende Matrix voll mineralisiert ist. In diesem Stadium können je nach Stimulation eine formative, eine resorptive und eine inaktive Phase unterschieden werden. Im Reifestadium befindet sich der größte Teil der Corticalisosteocyten. Die Gesamtheit der reifen Osteocyten steht mit ihren verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten unter dem Einfluß metabolischer und endokriner Veränderungen des Gesamtorganismus.

Als phasischen Leistungswandel bezeichnete Zichner (1970) die elektronenmikroskopisch beobachteten Veränderungen des Osteocyten und seiner pericellulären Strukturen unter Calcitoninbehandlung. Untersuchungen über die Reversibilität dieser funktionellen Zellveränderungen unter verschiedenen endokrinen und metabolischen Bedingungen fehlen bisher. Ebenso ist die physiologische Bedeutung der Zelldegeneration nicht bekannt. Sie führt über einen Zellverlust

zur sogenannten Mikropetrosis (Frost, 1960) und damit zur kompletten Mineralisation der Osteocytenlakune (Jowsey *et al.*, 1964). Durch derartige Vorgänge wird die intraossale Stoffaustauschfläche reduziert, die nach Frost (1963) in 1 mm³ Corticalis durch 20 mm² Lakunenwandungen und 200 mm² Wandungen der Osteocytencanaliculi repräsentiert wird. Bezogen auf das Gesamtskelettsystem, das zu etwa 80% aus corticalem Knochen besteht, sind osteocytäre Veränderungen deshalb von großer Bedeutung in der Pathogenese generalisierter Osteopathien. Die Abgrenzung pathologischer Veränderungen von den hier beschriebenen physiologischen Funktionsmerkmalen des Osteocyten soll daher das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Literatur

- Baud, C. A.: Morphologie et structure inframicroscopique des ostéocytes. *Acta anat.* (Basel) **51**, 209—225 (1962)
- Baud, C. A.: Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **56**, 227—236 (1968)
- Belanger, L. F.: Osteocytic osteolysis. *Calcif. Tiss. Res.* **4**, 1—12 (1969)
- Belanger, L. F., Semba, T., Tolnai, S., Copp, D. H., Krook, L., Gries, C.: The two faces of resorption. In: III. European Symposium on Calcified Tissues, p. 1 (H. Fleisch, H. J. J. Blackwood, and M. Owen, eds.). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966
- Cameron, D. A., Paschall, H. A., Robinson, R. A.: The ultrastructure of bone cells. In: Frost, H. M. (ed.), p. 91—104: Bone biodynamics. Boston: Little 1964
- Cooper, R. R., Milgram, J., Robinson, R. A.: Morphology of the osteon, an electron microscopic study. *J. Bone Jt Surg. A* **48**, 1239—1271 (1966)
- Delling, G., Donath, K.: Morphometrische, elektronenmikroskopische und physikalisch chemische Untersuchungen über die experimentelle Osteoporose bei chronischer Acidose. *Virchows Arch. Abt. A* **358**, 321—330 (1973)
- Donath, K., Delling, G.: Elektronenmikroskopische Darstellung der periosteocytären Matrix durch Ultradünnschnitt-EDTA-Entkalkung. *Virch. Arch. Abt. A* **354**, 305—311 (1971)
- Frost, H. M.: In vivo osteocyte death. *J. Bone Jt Surg. A* **42**, 138—150 (1960)
- Frost, H. M.: Bone remodelling dynamics. Springfield: Charles C. Thomas 1963
- Heuck, F.: Comparative investigation of the function of osteocytes in bone resorption. *Calcif. Tiss. Res.* **4** (Suppl.), 148—149 (1970)
- Holtrop, M. E., Weinger, J. M.: Ultrastructural evidence for a transport system in bone. In: Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins, p. 365 (R. V. Talmage and P. L. Munson eds.). Amsterdam: Excerpta Medica 1972
- Jande, S. S.: Fine structural study of osteocytes and their surrounding bone matrix with respect to their age in young chicks. *J. Ultrastruct. Res.* **37**, 279—300 (1971)
- Jande, S. S., Belanger, L. F.: Ultrastructural changes associated with osteocytic osteolysis in normal trabecular bone. *Anat. Rec.* **163**, 204 (1969)
- Jande, S. S., Belanger, L. F.: Electron microscopy of osteocytes and the pericellular matrix in rat trabecular bone. *Calcif. Tiss. Res.* **6**, 230—239 (1971)
- Jowsey, J., Riggs, B. L., Kelly, P. J.: Mineral metabolism in osteocytes. *Mayo Clin. Proc.* **39**, 480—484 (1964)
- Koburg, E.: Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweißstoffwechsel der Zellen des Knorpels und Knochens. *Beitr. path. Anat.* **124**, 108—135 (1961)
- Luft, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409 (1961)
- Matthews, J. L.: Ultrastructure of calcifying tissues. *Amer. J. Anat.* **129**, 451—458 (1971)
- Remagen, W., Höhling, H. J., Hall, T. A., Caesar, R.: Electron microscopic and microprobe observation on the cell sheath of stimulated osteocytes. *Calcif. Tiss. Res.* **4**, 60—68 (1969)

- Scherft, J. P.: Beginning endochondral ossification in embryonic mouse radii. J. Ultrastruct. Res. **42**, 342—353 (1972)
- Wassermann, F., Yeager, J. A.: Fine structure of the osteocyte capsule and of the wall of the lacunae in bone. Z. Zellforsch. **67**, 636—652 (1965)
- Zichner, L.: Calcitonin Wirkung auf die Osteocyten der heranwachsenden Ratte. Klin. Wschr. **48**, 1444—1448 (1970)

Dr. med. A. Schulz
Pathologisches Institut der Universität
D-2000 Hamburg 20
Martinistraße 52
Bundesrepublik Deutschland