

Morbus Paget des Knochens

Untersuchungen zur Ultrastruktur der Osteoclasten und ihrer Cytopathogenese*

A. Schulz, G. Dellling, J.-D. Ringe und R. Ziegler

Pathologisches Institut (Direktor: Prof. Dr. G. Seifert),
Abteilung Klinische Osteologie (Direktor: Prof. Dr. F. Kuhlencordt)
der I. Medizinischen Klinik der Universität Hamburg,
Abteilung für Endokrinologie (Direktor: Prof. Dr. E.F. Pfeiffer)
des Zentrums für Innere Medizin und Kinderheilkunde der Universität Ulm

Paget's Disease of Bone

Ultrastructure and Cytogenesis of Osteoclasts

Summary. The cytogenesis of giant osteoclasts in Paget's disease of bone was studied by means of electron microscopy. 26 iliac crest biopsies were made and divided for light and electron microscopic investigation. A special procedure was used for electron microscopic preparation of bone without previous decalcification.

Paget osteoclasts are characterized by their high content of nuclei. Several nuclei may show paracrystalline inclusions pointing to a possible virus infection of these cells. Giant osteoclasts have an increased mobility and a high resorptive activity, manifest by the dissection of bone fragments from endosteal bone surfaces.

Cell membrane interdigitations between mononuclear cells and osteoclasts occur as a morphologic concomitant of cell fusion. Frequent occurrence of such cell membrane contacts seem to indicate an increased tendency to cell fusion among the mononuclear precursors of Paget-osteoclasts. Precursor cells are located in the pericapillary region, and morphologically resemble pericytes.

The assumption of an increased rate of cell fusion amongst the precursor cells of osteoclasts might explain the development of giant osteoclasts in this disease. Further studies of the paracrystalline nuclear inclusions of Paget-osteoclasts are necessary to determine whether this process can be considered to be a cytopathogenic effect of virus infection.

Key words: Paget's disease — Osteoclasts — Ultrastructure — Cytogenesis.

* Mit Unterstützung der Sonderforschungsbereiche 34 (Hamburg) und 87 (Ulm) der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Sonderdruckanforderungen an: Dr. Andreas Schulz, Pathologisches Institut, Universität Hamburg, Martinistr. 52, D-2000 Hamburg 20, Bundesrepublik Deutschland

Zusammenfassung. Zur Frage der Cytopathogenese der Riesenosteoclasten beim Morbus Paget des Knochens wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an menschlichen Knochenbiopsien durchgeführt. Anteile von 26 aus diagnostischen Gründen entnommenen Beckenkammbiopsien wurden nach einem besonderen Präparationsverfahren unentkalkt für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet.

Die Paget-Osteoclasten zeichnen sich durch eine hohe Kernzahl aus. Einzelne Zellkerne besitzen parakristalline Einschlüsse, die Hinweis auf eine Virusinfektion der Zellen sein können. Die Riesenosteoclasten zeigen eine gesteigerte Zellbeweglichkeit und hohe Resorptionsleistung durch Dissektion von Knochenfragmenten aus den endostalen Oberflächen.

Zwischen einkernigen Zellen und Osteoclasten finden sich ultrastrukturell Zellmembraninterdigitationen, die dem Vorgang der Zellfusion entsprechen. Die häufige Beobachtung dieser Zellmembrankontakte spricht für eine erhöhte Zellfusionstendenz von einkernigen Vorläuferzellen der Osteoclasten beim Morbus Paget. Die Vorläuferzellen stammen aus dem pericapillären Bereich und entsprechen morphologisch den Pericyten.

Die Annahme einer gesteigerten Zellfusionsrate von einkernigen Osteoclastenvorläuferzellen würde die Entwicklung der Riesenosteoclasten erklären, die für den Morbus Paget des Knochens typisch sind. Ob diesem Vorgang ein durch Viren ausgelöster cytopathogener Effekt zugrunde liegt, muß durch weitere Untersuchungen an den parakristallinen Einschlüssen der Osteoclastenkerne geprüft werden.

Einleitung

Die durch Paget (1877) erstmals beschriebene Ostitis deformans ist heute ein morphologisch und klinisch fest definiertes Krankheitsbild. Umfangreiche pathologisch-anatomische und klinische Studien (Schmorl, 1932; Collins, 1956; Sissons, 1966) haben gezeigt, daß der Morbus Paget des Knochens eine zumeist multilokuläre Erkrankung des Skeletsystems ist, die im höheren Erwachsenenalter auftritt und zu ausgedehnten Skeletdeformitäten führen kann. Bevorzugt befallen sind der Schädel, die Wirbelsäule, der Beckenring und die proximalen Femuranteile (Schmorl, 1932). Histologisch findet sich in den erkrankten Skeletregionen ein erhöhter Knochenumbau, der von den Knochenumbauprozessen bei endokrinen (generalisierten) Osteopathien (Delling, 1975) abweicht. Knochenresorption und Knochenumbau sind gleichermaßen stark aktiviert, wobei die Knochenresorption durch besonders große vielkernige Osteoclasten erfolgt (Rasmussen and Bordier, 1974). Offenbar entsteht durch einen raschen Wechsel von Knochenresorption und Knochenanbau die typische Mosaikstruktur des Paget-Knochens (Schmorl, 1932). Diese besteht aus lamellär aufgebauten Knochenarealen, die durch sog. Kitt- oder Zementlinien miteinander verfugt sind (Erdheim, 1935; Sisson, 1976). In den Markräumen bildet sich ein stark vaskularisiertes Bindegewebe aus, das arterio-venöse Anastomosen enthalten kann (Edholm and Howart, 1953). Diesen morphologischen Veränderungen entsprechen

in der Radiocalciumkinetik (Heaney and Whedon, 1958) gesteigerte Mineralaustauschvorgänge. Die erhöhte alkalische Phosphatase im Serum ist Ausdruck des verstärkten Knochenanbaus, während die gesteigerte Hydroxyprolinausscheidung Folge einer vermehrten Resorption und des Abbaus von Knochencollagen ist (Sissons, 1976; Rasmussen und Bordier, 1974).

Trotz dieser morphologischen und klinischen Kenntnisse ist die Ursache des Krankheitsprozesses noch ungeklärt. Während Paget (1877) eine entzündliche Ätiologie annahm, wird heute auch die Vorstellung vertreten, daß es sich um eine benigne neoplastische Erkrankung der Knochenzellen handle (Rasmussen und Bordier, 1974). Hinweise für eine mögliche Virusätiologie haben sich durch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Osteoclasten aus erkranktem menschlichen Knochengewebe beim Morbus Paget ergeben (Rebel et al., 1976).

Diese neuen ätiologischen Aspekte und die noch offene Frage nach der Cytogenese der für diese Erkrankung typischen Riesenosteoclasten haben uns daher zur elektronenmikroskopischen Untersuchung einer größeren Serie von Knochenbiopsien von Patienten mit einem Morbus Paget veranlaßt. Nach Entwicklung eines geeigneten Präparationsverfahrens (Schulz, 1975, 1977) konnten diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen zusätzlich an für die Diagnostik entnommenen Beckenkammbiopsien durchgeführt werden.

Material und Methoden

Untersucht wurden Knochenbiopsien aus dem Beckenkamm von 26 Patienten mit einem Morbus Paget der Beckenregion. Das Alter der 9 weiblichen und 17 männlichen Patienten lag zwischen 50 und 75 Jahren. In allen Biopsien ergab die diagnostische Auswertung den eindeutigen histologischen Befund eines Morbus Paget. Die mit einer elektrischen Hohlfräse (Innendurchmesser 5 mm) entnommenen Biopsien (Burkhardt, 1966) wurden für die licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung geteilt und getrennt aufgearbeitet. Für die unentkalkte Aufarbeitung zur elektronenmikroskopischen Untersuchung gingen wir nach einer eigens hierfür entwickelten Präparations- und Einbettungstechnik vor (Schulz, 1975, 1977):

Der für die Elektronenmikroskopie bestimmte Teil der zylindrischen Stanzbiopsie wurde in etwa 1 mm breite Scheiben zerlegt und für 3 h in einem Glutaraldehyd-Na-Cacodylat-Puffergemisch fixiert (2,30% Glutaraldehyd; pH 7,4; 300 mosmol). Nach dem Spülen in s-Collidin-Puffer (pH 7,4) erfolgte die Nachfixierung in 1,3%igem Osmiumtetroxid-s-Collidin Puffergemisch. Die unentkalkten Biopsiescheiben betteten wir in einem niederviskösen Epongemisch ein und stellten mit Glasmessern Semidünnschnitte her. Ultradünnschnitte wurden mit Diamantmessern auf einem LKB-Ultratome III hergestellt und mit gesättigter alkoholischer Uranylacetat- und wäßriger Bleizitratlösung kontrastiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte an einem Zeiss EM 9 S II bei 60 KV.

Ergebnisse

Die Spongiosarchitektur ist beim Morbus Paget in den befallenen Skeletabschnitten umgeformt. Die Spongiosa besteht aus breiten plumpen Knochentrabekeln, die unregelmäßige Oberflächen mit tiefen Einbuchtungen aufweisen. Histologisch sind im Semidünnschnitt die typischen Kittlinien zu erkennen, die die

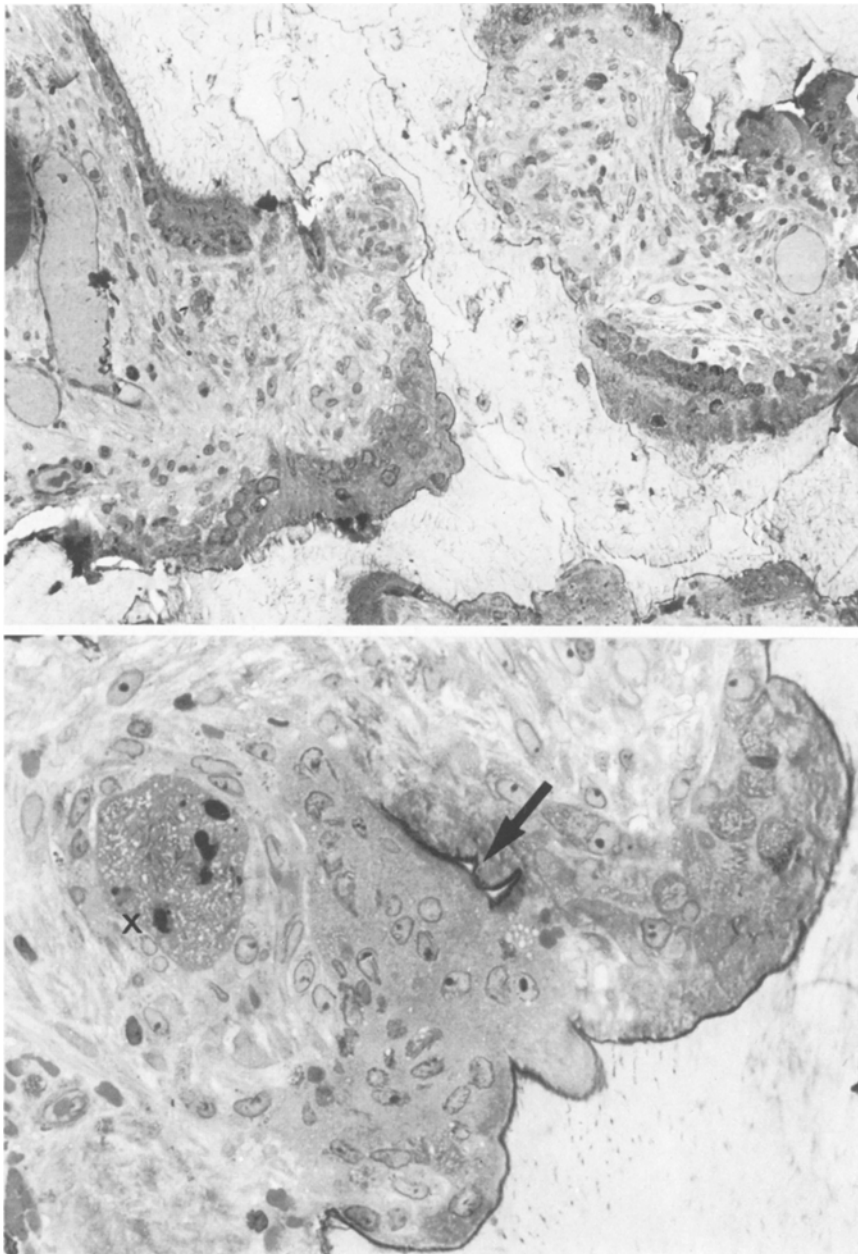


Abb. 1. Oben: Knochenstruktur beim M. Paget. Die plumpen Spongiosabalken (hellgrau) zeigen zahlreiche Kittlinien. Auf den endostalen Oberflächen tiefe Resorptionslakunen und breite Osteoidsäume (dunkelgrau). Unentkalkter Semidünnschnitt, Azur II Methylenblau $\times 70$. Unten: Riesenosteoclast beim M. Paget mit über 30 Zellkernen in einer Schnittebene. Dissektion eines Knochenfragmentes (*Pfeil*). Degenerierender Osteoclast mit Kernpyknosen ohne Bezug zur Knochenoberfläche (*x*). Unentkalkter Semidünnschnitt, Azur II Methylenblau $\times 430$

Mosaikstruktur des Paget-Knochens besonders deutlich hervortreten lassen (Abb. 1 oben).

Auf den endostalen Oberflächen der Spongiosabälkchen finden sich häufig in enger Nachbarschaft Knochen bildende und Knochen resorbierende Zellen. Die Knochenneubildung erfolgt durch ein bis zweireihig angeordnete kubische Osteoblasten. Diese Zellen liegen auf unterschiedlich breiten Osteoidsäumen, die zum älteren mineralisierten Knochen zumeist durch eine scharf markierte Linie abgegrenzt sind (Abb. 1). Die gesteigerten Knochenanbauvorgänge beim Morbus Paget sollen in der vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchung nicht weiter berücksichtigt werden.

In tiefen Resorptionslakunen und perforierenden Resorptionstunneln liegen die für die Pagetsche Knochenerkrankung typischen vielkernigen Riesenosteoclasten (Abb. 1 unten). Diese großen Osteoclasten enthalten in einer Schnittebene häufig 30 bis 60 Zellkerne. Die Osteoclasten zeigen dabei nicht nur eine lakunäre Knochenresorption, sondern auch eine Dissektion von schmalen Knochenvorsprüngen, die zwischen benachbarten Lakunen liegen. Auf diese besondere Knochenresorptionsform wird bei der Beschreibung der ultrastrukturellen Untersuchungsergebnisse näher eingegangen. Neben intakten Osteoclasten finden sich auch solche, die pyknotische Zellkerne und eine Vacuolisierung des Cytoplasmas aufweisen. Diese degenerativ veränderten Osteoclasten haben keine direkte Beziehung zu den benachbarten Knochenoberflächen (Abb. 1 unten). In den Markräumen der Paget-Spongiosa findet sich ein lockeres Bindegewebe, das von zahlreichen ektatischen Blutleitern durchsetzt wird, welche lediglich eine einschichtige Endothelbegrenzung besitzen und damit postcapillären Venolen entsprechen (Abb. 1 oben).

Ultrastruktur der Osteoclasten

Die Form der Osteoclasten ist sehr variabel. Zumeist finden sich rundlich ovale Zellen, die sich der Knochenoberfläche anpassen und auch tiefe Resorptionslakunen vollständig ausfüllen können (Abb. 3 und 4). Der Zellaufbau zeigt in Abhängigkeit von der Schnittebene eine polare Anordnung der Zellbestandteile. Die Resorptionszone nimmt nur einen Teil der basalen dem Knochen anliegenden Zellfläche ein. Sie besteht aus einem Bürstensaum mit fingerförmigen Cytoplasmafortsätzen (Abb. 4 unten). Darüber liegt eine Vesikelzone im Cytoplasma des Osteoclasten. Die Zellkerne sind in dem von der Resorptionszone abgewandten Teil der Zelle angeordnet und von perinucleären Golgi-Feldern umgeben. Die übrigen Organellensysteme wie Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Reticulum sind diffus im restlichen Cytoplasma verteilt, wobei die Resorptionszone einschließlich der Vesikelzone frei von anderen Zellorganellen ist.

Häufig finden sich in einzelnen Zellkernen der Paget-Osteoclasten Einschlusskörper, die in den Osteoclasten skeletgesunder Patienten nicht vorkommen (Abb. 2). Es sind Formationen mikrotubulärer Strukturen, die nicht in jedem Zellkern aber fast in allen Osteoclasten nachweisbar sind. Diese Mikrotubuli liegen parallel in Bündeln vor, die in verschiedenen Richtungen angeordnet sind und dabei eine geflechtartige Struktur bilden können. Neben diesen locker

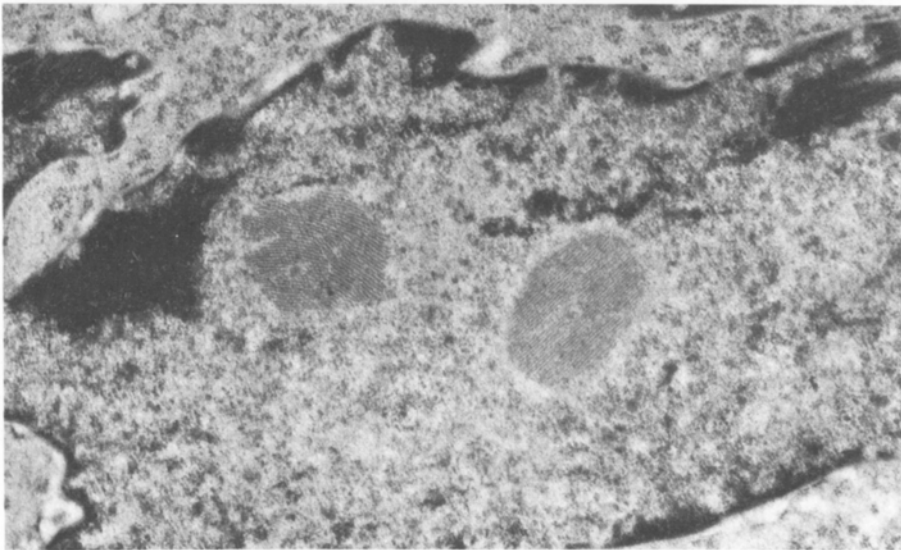
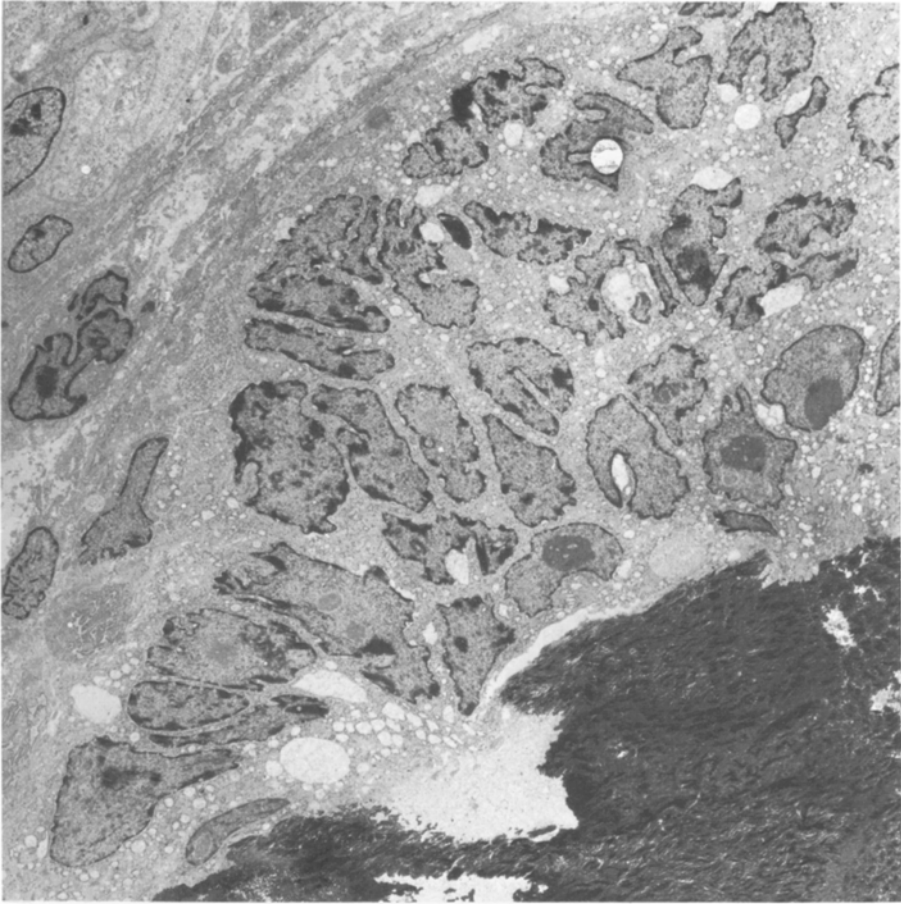


Abb. 2. Oben: Elektronenmikroskopische Übersicht eines Riesenosteoclasten ohne Resorptionszone beim M. Paget mit über 30 Zellkernen in einer Ultradünnschnittebene. In einzelnen Zellkernen parakristalline mikrotubuläre Einschlüsse. $\times 2600$. Unten: Mikrotubuläre Einschlüsse in parakristalliner Form. Mikrotubuli parallel angeordnet, größte meßbare Länge bis $0.5\ \mu$, Durchmesser $100\ \text{\AA}$. $\times 12000$

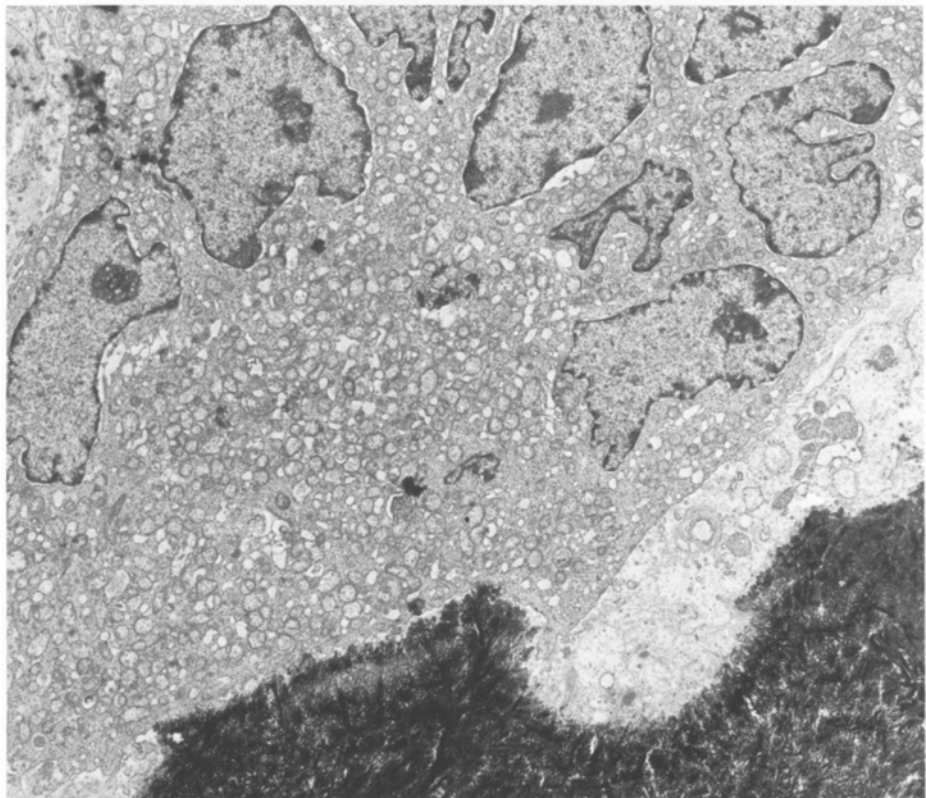
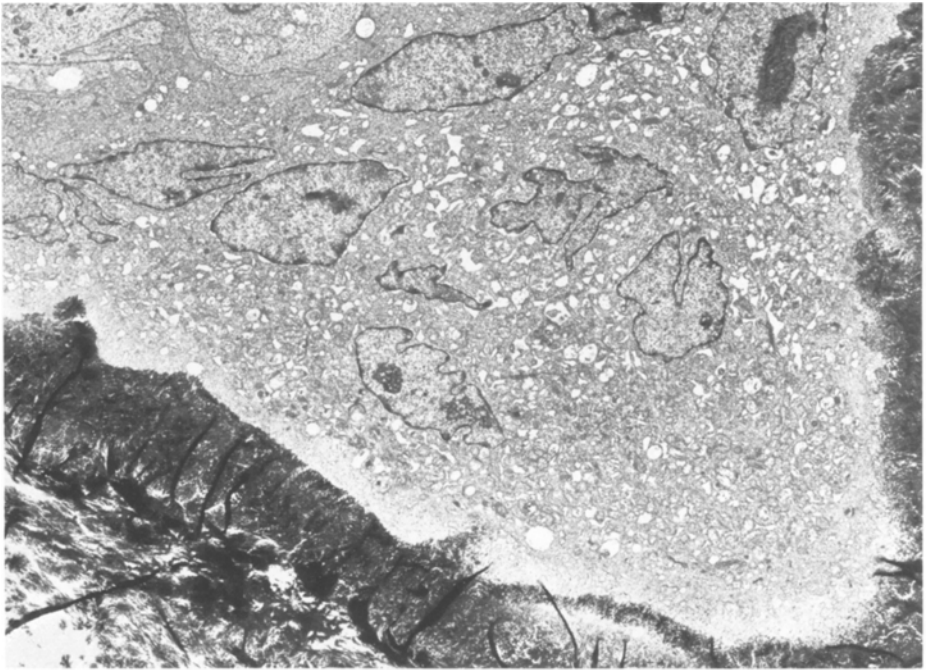


Abb. 3. Oben: Paget-Osteoclast in tiefer Resorptionslakune mit randlich angeschnittener Resorptionszone in der Tiefe der Einbuchtung. $\times 2900$. Unten: Paget-Osteoclast in Migration über der Knochenoberfläche. Der Osteoclast hat eine Resorptionslakune verlassen (rechts unten) und bewegt sich über die Knochenoberfläche. Keine basale Resorptionszone. $\times 4000$

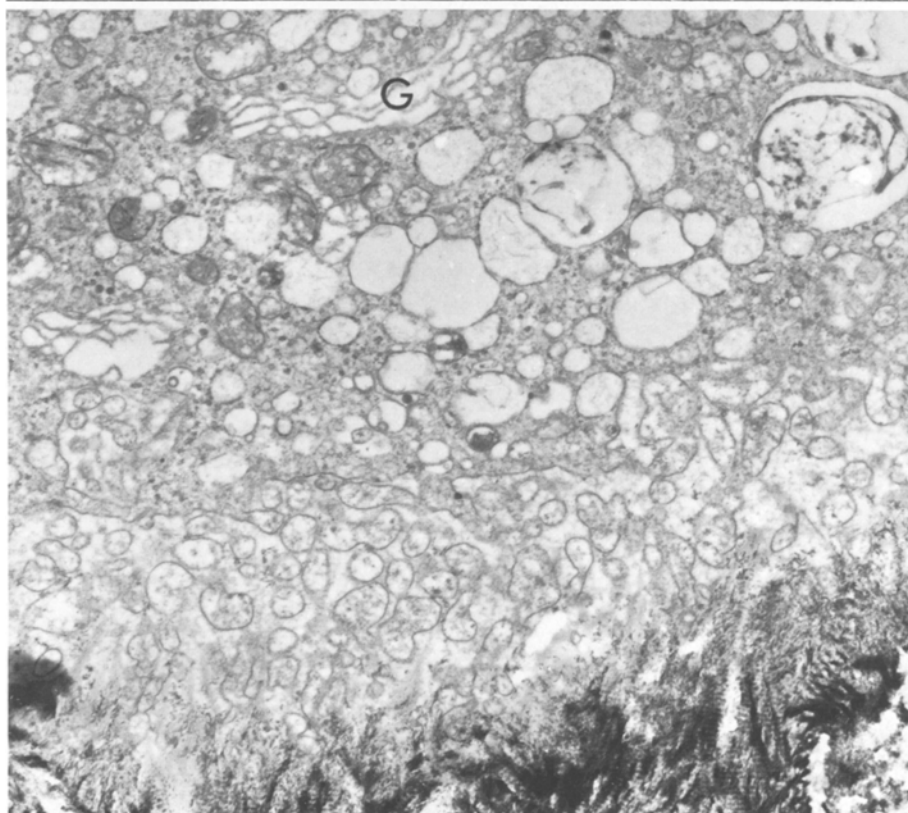
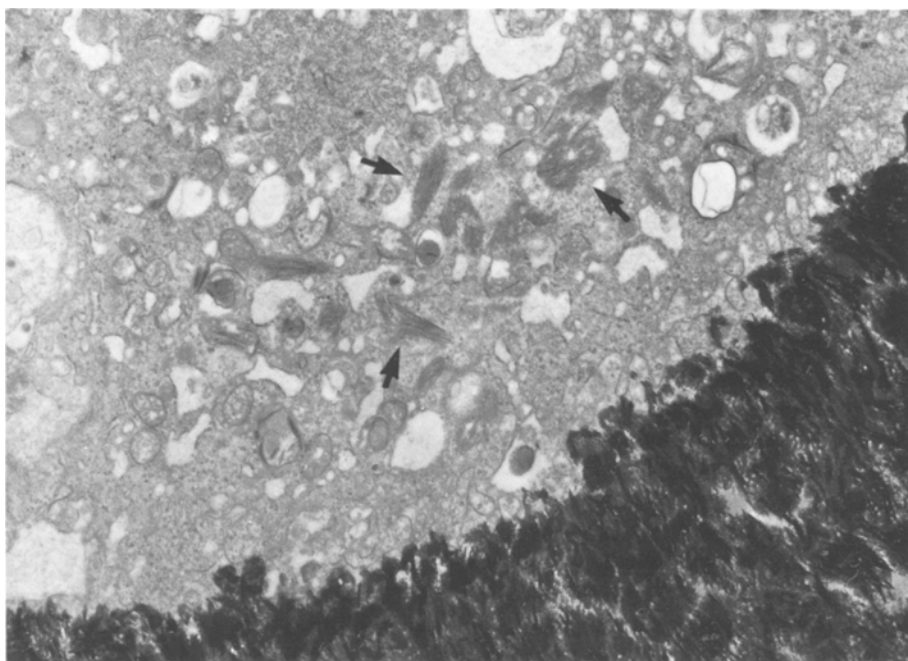


Abb. 4. Oben: Basale Cytoplasmaregion eines Osteoclasten in Migrationsphase mit multiplen Bündeln parallel angeordneter Mikrofilamenten (*Pfeil*). $\times 8500$. Unten: Basaler Abschnitt eines Paget-Osteoclasten mit Resorptionszone bestehend aus einem Bürstensaum mit fingerförmigen Cytoplasmafortsätzen und darüber angeordneter phagolysosomaler Vesikelzone. Oberhalb finden sich im Cytoplasma einzelne lamelläre Golgifelder (*G*). $\times 23000$

im Karyoplasma verteilten Bündeln, finden sich auch rundliche in parakristalliner Form vorliegende Inklusionen, die von einem schmalen Chromatin-freien Hof umgeben werden (Abb. 2 unten). Die Mikrotubuli bestehen im Längsschnitt aus 2 parallelen Membranen zwischen denen die Matrix aufgeheilt ist. Der Durchmesser eines Mikrotubulus beträgt 100 Å. Die Länge ist nicht sicher bestimmbar, da sie in Abhängigkeit von der Schnittebene variiert. Bei annähernd parallelem Anschnitt ist eine kontinuierliche Länge der Mikrotubuli bis 0,5 µ meßbar.

Es kann angenommen werden, daß Paget-Osteoclasten unterschiedliche Aktivitäts-Phasen haben. Es wechseln Resorptionsphasen mit Migrationsphasen. Bei der Migration bewegen sich die Osteoclasten über die Knochenoberfläche, um an einem anderen Standort erneut in eine Resorptionsphase einzutreten. Entsprechend finden sich im fixierten Ultradünnschnitt Osteoclasten, die aus ihren Resorptionslakunen ausgewandert sind und über die angrenzende Knochenoberfläche gleiten, ohne daß basale Resorptionszeichen erkennbar sind. Diesen Zellen fehlt ein basaler Bürstensaum und eine Vesikelzone (Abb. 3 unten). Häufig treten in diesen basalen Cytoplasmaregionen der Osteoclasten Ansammlungen kurzer Bündel von parallel angeordneten Mikrofilamenten auf (Abb. 4 oben).

Bei der osteoclastären Resorption lassen sich ultrastrukturell zwei Formen unterscheiden. Die häufiger zu beobachtende Form ist die lakunäre Resorption, bei der im Bereich des Bürstensaums der Osteoclasten eine mit fortschreitender Resorption tiefer werdende Einbuchtung im mineralisierten Knochen entsteht. Bei der lakunären Resorption sind die mikrovillären Cytoplasmafortsätze, die den Bürstensaum bilden, senkrecht zur Knochenoberfläche angeordnet (Abb. 4 unten). Angrenzend an die Cytoplasmaeinfaltungen des Bürstensaumes findet sich in der Zelle eine Vesikelzone aus Phagolysosomen. Diese Vesikelzone entsteht einerseits durch Bewegung primärer Lysosomen von den Golgi-Feldern in Richtung auf den Bürstensaum, andererseits durch den Vorgang der Phagocytose mit Ausbildung von Phagosomen, die an den Einbuchtungen des Bürstensaumes in die Zelle eintreten.

Die zweite Form der osteoclastären Resorption ist eine dissezierende Resorption. Die Osteoclasten bilden dabei Zellausläufer, die vorspringende Kanten der Knochenoberfläche umschlingen und unterminieren (Abb. 5). Durch Unterhöhlung kommt es schließlich zur Abtrennung ganzer Knochenfragmente von der Knochenoberfläche. Die Fragmente des noch mineralisierten Knochens werden in Pseudovacuolen von der Zelle umschlossen und resorbiert. Die Membran der Vacuole weist wiederum fingerförmige Ausstülpungen auf, die dem Bürstensaum an der Basis der Osteoclasten entsprechen. Im Cytoplasma des Osteoclasten findet sich in der Umgebung dieser Vacuole eine Anreicherung phagolysosomaler Vesikel (Abb. 6 oben).

Beim Resorptionsvorgang kommt es zuerst zur Auflösung der Apatitkristalle. Die nadelförmigen Mineralbestandteile werden von den Kollagenfasern abgelöst und finden sich in intervillösen Spalträumen des Bürstensaums. Anschließend gelangen sie durch Aufnahme in phagolysosomale Vesikel in die Zelle. Durch die Demineralisation werden die Kollagenfibrillen der Knochenmatrix demaskiert, wobei ihre periodische Querstreifung erkennbar wird (Abb. 6 unten). Eine Phagocytose von größeren quergestreiften Kollagenfaserfragmenten durch Osteoclasten ist nicht nachzuweisen.

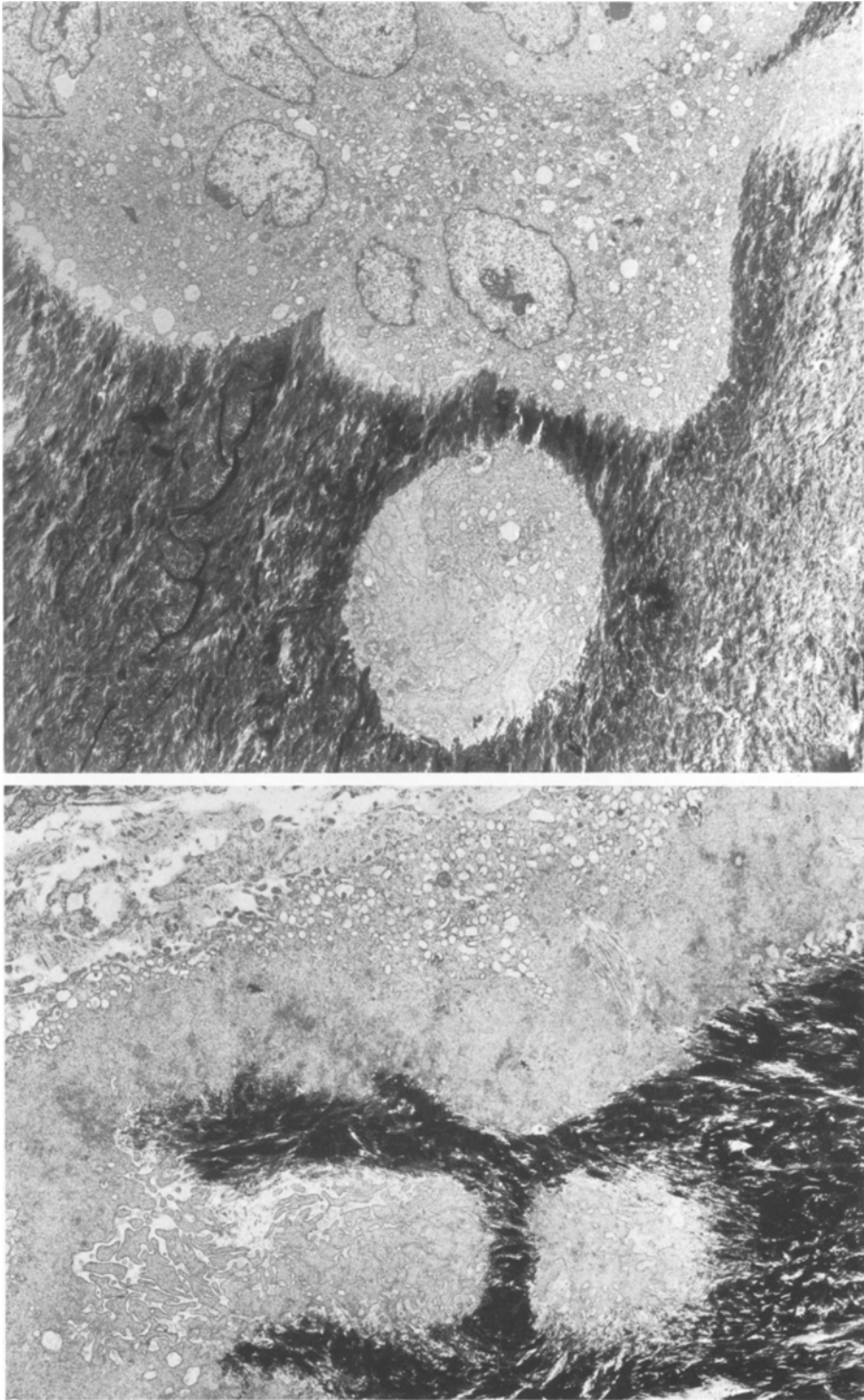


Abb. 5. Dissezierende Knochenresorption von Paget-Osteoclasten. Plumpe fingerförmige Cytoplasmafortsätze des Bürstensaums unterminieren den Knochen und führen durch kommunizierende Resorptionstunnel zur Abtrennung von Knochenfragmenten. Oben und unten $\times 2800$

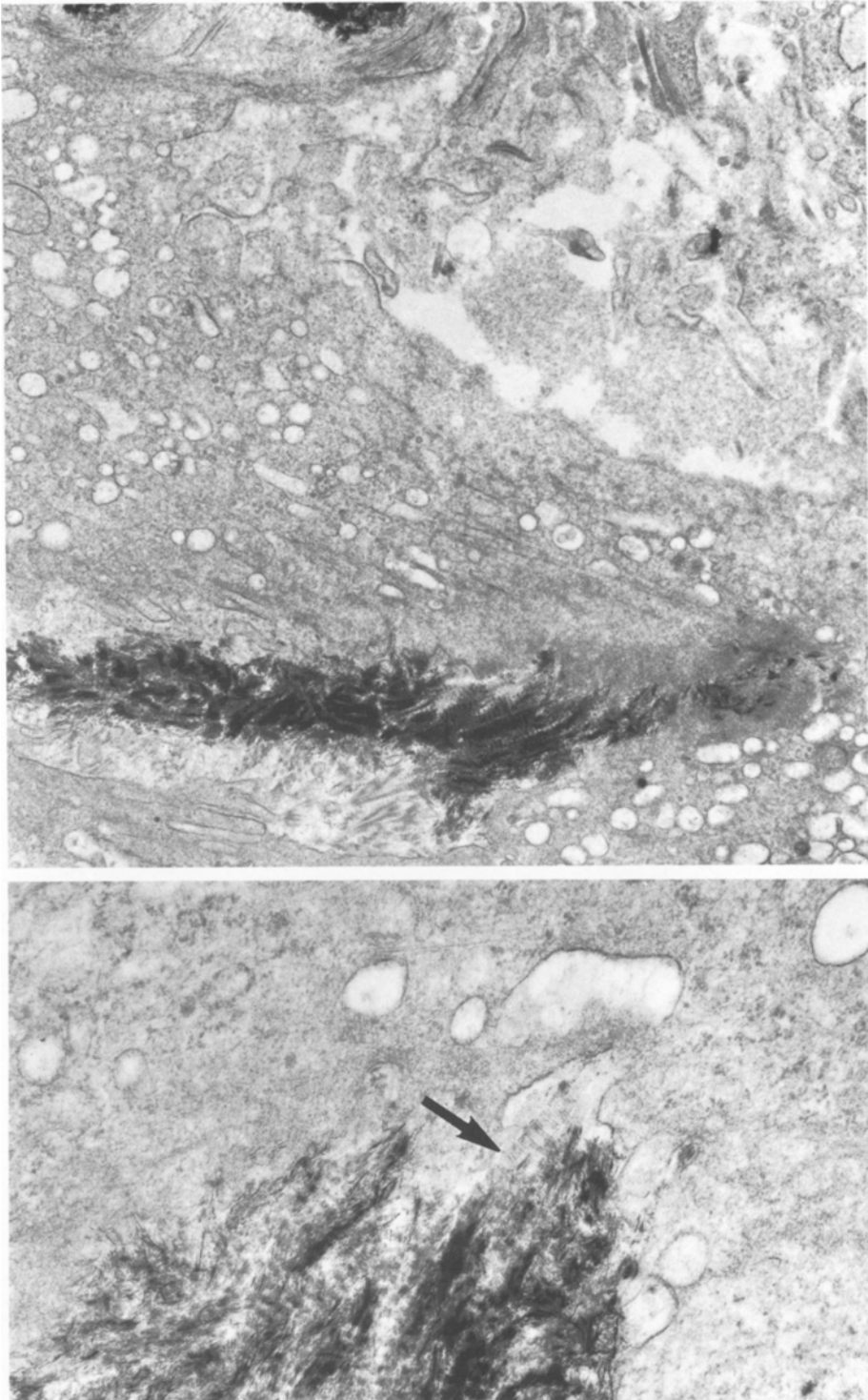


Abb. 6. Oben: Osteoclastäre Resorption von abgelösten Knochenfragmenten. Die dissezierten Knochenbruchstücke werden von Osteoclasten in Form einer Pseudovacuoole umschlossen. Die Vacuolenwand besteht aus einem andeutungsweise erkennbaren Bürstensaum. In der Umgebung findet sich eine Anreicherung phagolysosomaler Vesikel. $\times 10\,800$. Unten: Biphasischer Resorptionsvorgang mit Demineralisation der Kollagenfibrillen, deren Querstreifung erkennbar wird (*Pfeil*). Die nadelförmigen mineralisierten Proteoglycanbestandteile liegen in den Falten des Bürstensaums und werden phagocytiert. Die Degradation der Kollagenfibrillen erfolgt extrazellulär. $\times 25\,500$

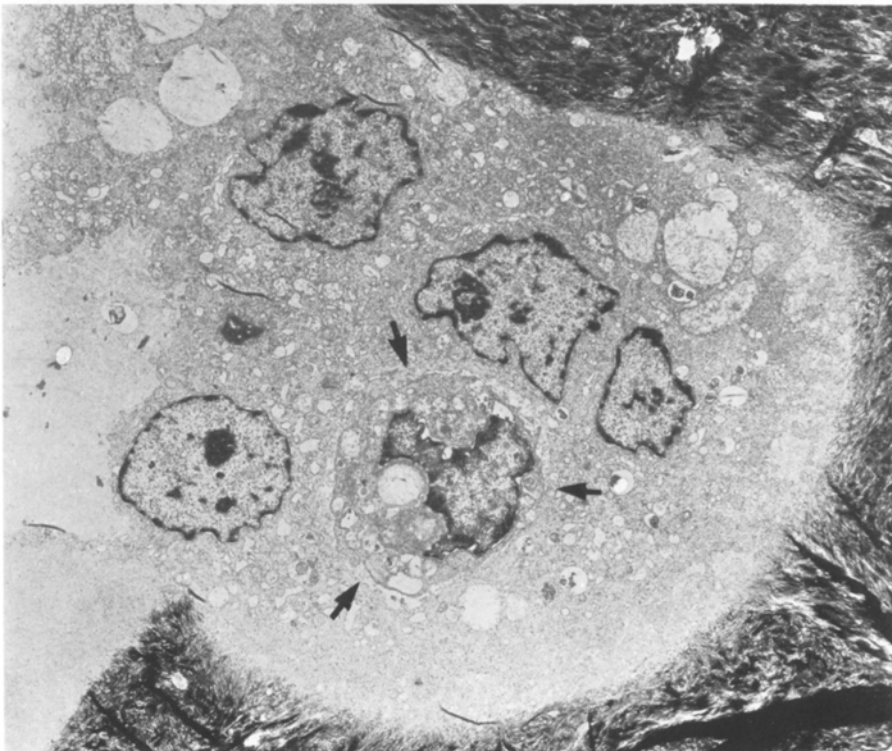
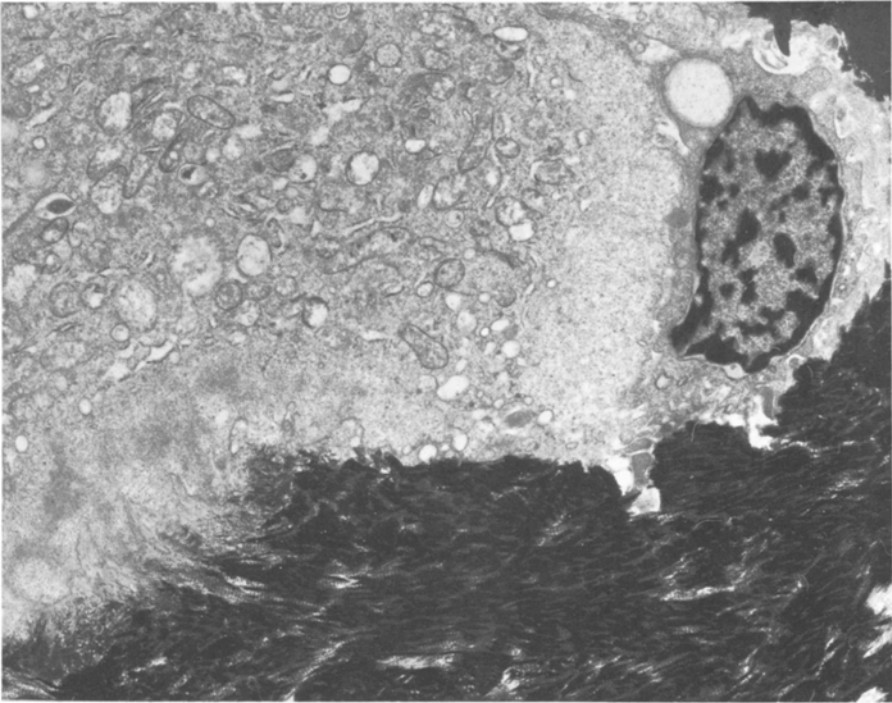


Abb. 7. Phagocytose von Osteocyten durch Paget-Osteoclasten. Oben: Ein Osteoclast erreicht einen Osteocyten durch Resorption der Lakunenwand. $\times 7500$. Unten: Phagocytose des Osteocyten durch Aufnahme in eine Digestionsvacuole. Keine Fusion von Osteocyten mit Osteoclasten. $\times 3900$

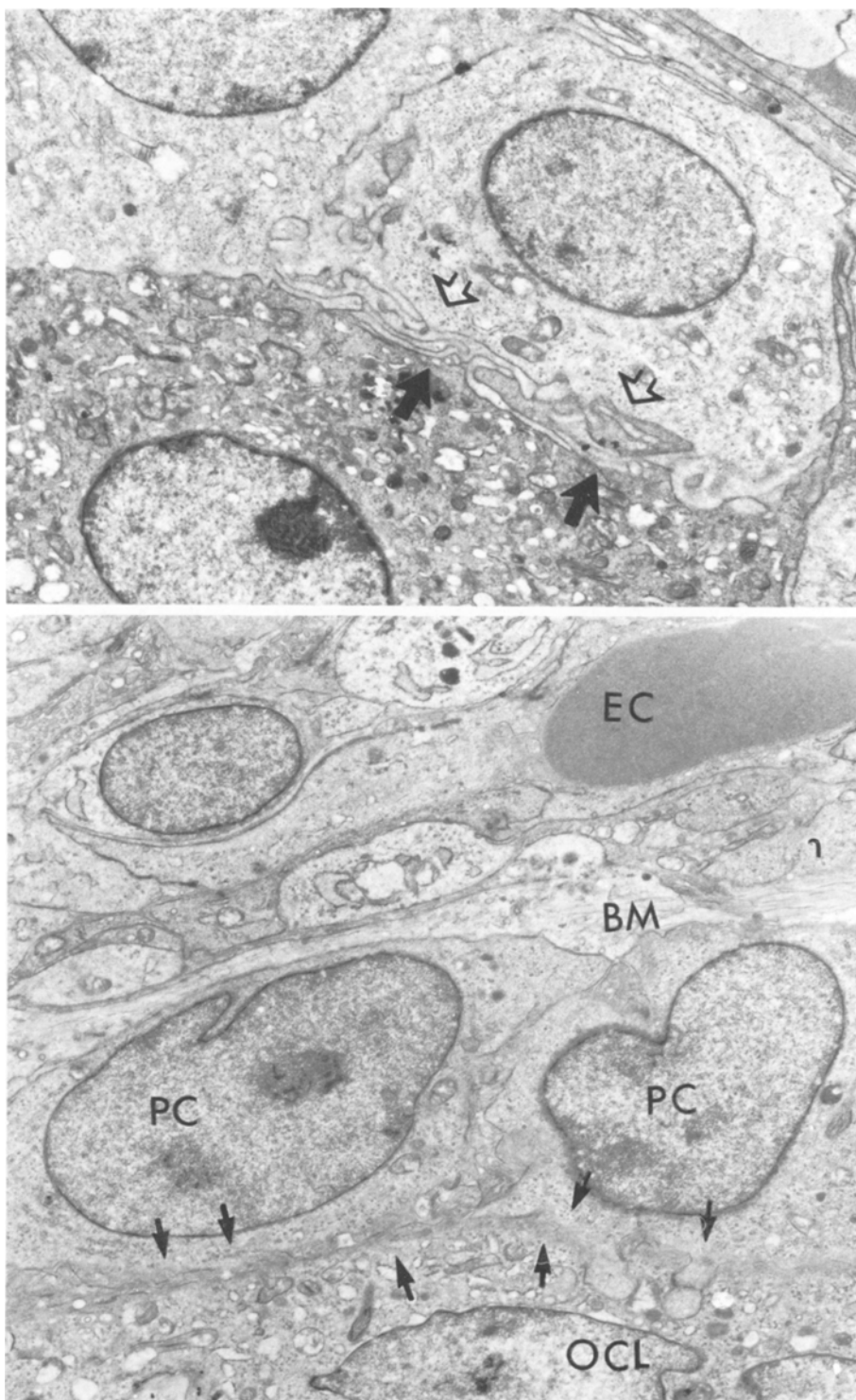


Abb. 8. Zellfusion von einkernigen Vorläuferzellen mit Osteoclasten. Oben: Lamelläre Interdigitationen (*Pfeil*) zwischen der Zellmembran einer einkernigen Zelle und dem darunter liegenden Osteoclasten. $\times 5500$. Unten: Pericytäre Zellform aus der Umgebung einer Capillare mit Erythrocyt (*EC*) in Zellfusion mit einem Osteoclasten. Lamelläre Interdigitationen (*Pfeile*) zwischen den Zellmembranen der Pericyten (*PC*) und den Osteoclasten (*Ocl*). Zwischen den Ausläufern der Capillarendothelzellen und den Pericyten findet sich eine Basalmembran (*BM*). $\times 8000$

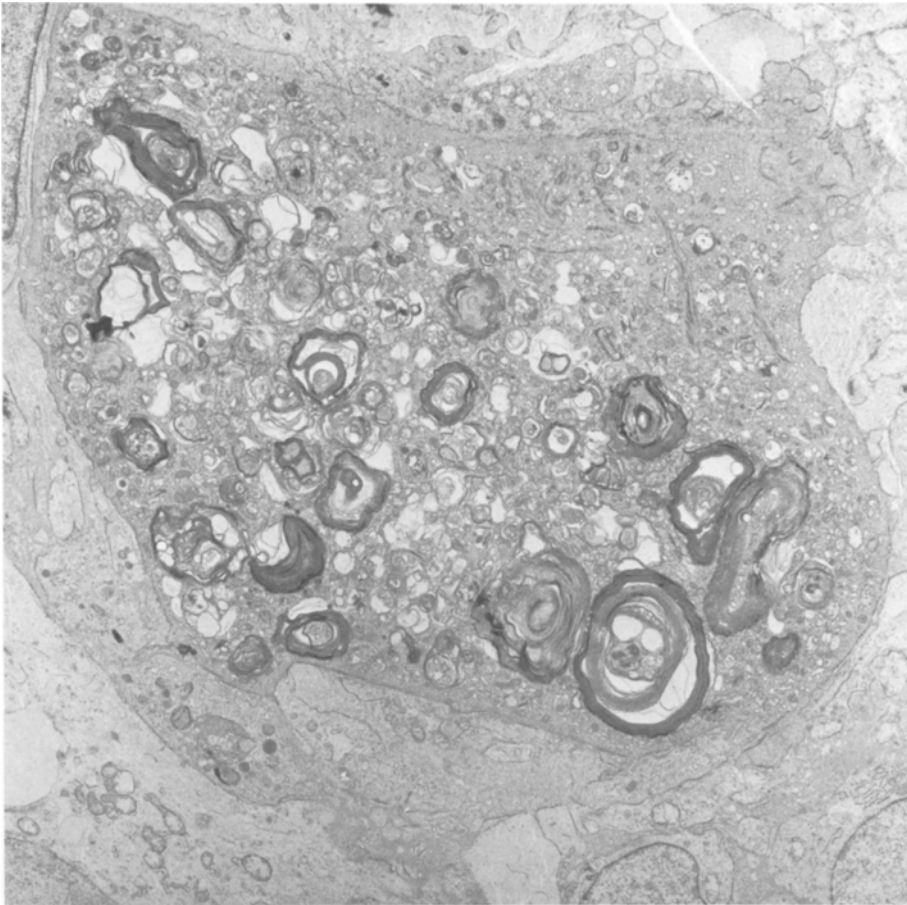


Abb. 9. Degenerierender Paget-Osteoclast ohne Zellkernanschnitt. Zahlreiche Myelinfiguren in Autophagosomen. $\times 3700$

Bei der Resorption des Knochens werden auch Osteocytenlakunen erreicht (Abb. 7 oben). Die Osteocyten zeigen dabei degenerative Veränderungen mit Vacuolisierung des Cytoplasmas und beginnender Zellkernpyknose durch Heterochromatinkondensation. Im weiteren Verlauf folgt nicht eine Fusion, sondern eine Phagocytose des Osteocyten durch den Osteoclasten. Der Osteocyt liegt dann in einer großen Vacuole und ist dem weiteren Digestionsprozeß unterworfen, der mit zunehmenden degenerativen Kern- und Cytoplasmaveränderungen einhergeht (Abb. 7 unten). Kernteilungsfiguren wie Mitosen oder Amitosen sind in den Osteoclasten nicht nachweisbar. Dagegen finden sich elektronenmikroskopisch Zellmembranphänomene, die Zellfusionsprozessen entsprechen:

Bei der Untersuchung von Zellmembranveränderungen der Osteoclasten zeigt sich, daß häufig enge Membrankontakte mit benachbarten einkernigen Zellen bestehen. Diese Membrankontakte sind Interdigitationen von Cytoplasmafortsätzen. In der Anfangsphase bildet sich ein labyrinthartiges Geflecht von Pseudo-

podien zwischen beiden Zellen aus. In der nächsten Phase lagern sich die Zellen dicht aneinander, so daß die Interdigitationen eine lamelläre Zone bilden (Abb. 8 oben). Darauf kommt es über zunehmende Unterbrechungen der Kontinuität beider aneinandergelagerter Zellmembranen zur Fusion der Zellen (Abb. 8 unten).

Die mit den Osteoclasten oder zu Osteoclasten fusionierenden einkernigen Zellen sind wenig differenzierte Zellen aus der Umgebung der Capillaren und Venolen. Sie enthalten einen großen chromatinarmen rundlich ovalen Zellkern und ein organellenarmes Cytoplasma mit wenigen Mitochondrien, Lysosomen und freien Ribosomen. Von den endothelialen Gefäßwandzellen sind sie zumeist durch eine Basalmembran getrennt (Abb. 8 unten). Nach der cellulären Substruktur und der räumlichen Beziehung dieser Zellen zu den Blutgefäßen handelt es sich um pericytäre Zellformen.

Außer intakten Osteoclasten treten Osteoclasten mit degenerativen Kern- und Cytoplasmaveränderungen auf. Sie zeigen eine zunehmende Anzahl von Autophagenvacuolen, die Myelinfiguren enthalten (Abb. 9). Nach einer bisher nicht bekannten Zeitspanne gehen diese mehrkernigen Riesenzellen daher zugrunde. Für einen Übergang oder eine Auflösung in Osteoblasten ergeben sich keine morphologischen Hinweise.

Diskussion

In der Pathogenese des gesteigerten Knochenumbaus beim Morbus Paget wird der Knochenresorption durch mehrkernige Osteoclasten eine entscheidende Rolle zuerkannt. Die Osteoclasten beim Morbus Paget stellen eine Sonderform dar, die durch eine Größenzunahme, gesteigerte Zellkernzahl und erhöhte Einzelzellaktivität im Vergleich zu den normalen Osteoclasten des menschlichen und tierischen Knochengewebes charakterisiert ist (Schulz, 1977). Unter hormoneller Stimulation durch Parathormon kommt es auch am normalen menschlichen und tierischen Knochengewebe zur Steigerung der Einzelzellaktivität der Osteoclasten (Göthlin and Ericsson, 1976; Hall, 1975). Funktionsmorphologische Merkmale der erhöhten Zellaktivität sind die Ausbildung des Bürstensaums (Hancox, 1972; Schenck, 1974) und die Stimulation des lysosomalen Systems der Zelle (Lucht and Maunsbach, 1973; Schulz und Delling, 1976). Das lysosomale System besteht aus dem Golgi-Feld sowie den primären und sekundären Lysosomen. Während in den perinucleären Golgi-Feldern die Bildung der primären Lysosomen erfolgt (Cameron, 1969; Scott, 1967), die als Transportvesikel zur Ausschleusung und Abgabe hydrolytischer Enzyme dienen (Vaes, 1968), nehmen Phagosomen an den Einfaltungen des Bürstensaums mineralisierte Partikel auf (Lucht, 1972; Bonnucci, 1974).

In den Osteoclasten besteht offenbar ein entgegengesetzt gerichteter Vesikelstrom, der unmittelbar angrenzend an die Einfaltungen des Bürstensaumes zu einer Anreicherung von vesikulären Zellorganellen führt: Primäre Lysosomen wandern in Richtung auf die basale Zellmembran zur Ausschleusung von Enzymen, Phagosomen entstehen an der basalen Zellmembran der Osteoclasten und gelangen in die Zelle mit phagocytiertem Material. Auf diese Weise kommt

es in aktiv resorbierenden Osteoclasten zur Ausbildung einer Vesikelzone über dem Bürstensaum. Hier findet eine Fusion von primären Lysosomen und Phagosomen zu Phagolysosomen oder sekundären Lysosomen statt, da in allen vesikulären Zellorganellen dieser Region das für den Resorptionsvorgang erforderliche Enzym saure Phosphatase nachgewiesen werden konnte (Doty and Schoffield, 1972). Bei inaktiven Osteoclasten fehlt diese typische polare Anordnung der Vesikelzone, so daß ihr Vorhandensein andererseits als sicheres funktionsmorphologisches Kriterium für aktiv resorbierende Osteoclasten angesehen werden kann (Schulz und Delling, 1976).

Osteoclasten sind mobile Zellen, die Bewegungen auf der Knochenoberfläche durchführen (Gaillard, 1975). Entsprechende Momentaufnahmen ergeben sich am fixierten Gewebe, in dem Osteoclasten erscheinen, die aus ihren Resorptionslakunen herausgeglitten sind. Diese Osteoclasten weisen bei der Migration über die Knochenoberfläche keinen Bürstensaum auf, sie sind anscheinend kurzfristig in eine inaktive Phase eingetreten. Die Resorptionstätigkeit der Osteoclasten läuft danach offenbar biphasisch ab: Es wechseln Phasen der Migration ohne Resorption mit Phasen der Resorption ohne Migration. Bei der Resorption entstehen typische Lakunen als Einbuchtung unter der Basis der Osteoclasten. Die Resorption erfolgt durch Demineralisation und Freilegung der Kollagenfasern mit anschließender Aufspaltung der organischen Knochenmatrixbestandteile (Bonucci, 1974). Bei der Migrationsphase verläßt der Osteoclast die Resorptionslakune und erzeugt an einer anderen Stelle nach Wiedereintritt in die Resorptionsphase eine erneute Lakune. Folgt ein rascher Wechsel zwischen Migrations- und Resorptionsphase, so entstehen eng benachbarte Resorptionslakunen, da der Osteoclast nur kurze Wegstrecken zurücklegt. Zwischen benachbarten Resorptionslakunen bilden sich dabei kammartige Knochenvorsprünge heraus, die durch Pseudopodien der Osteoclasten umschlungen und unterminiert sowie anschließend ganz abgelöst werden können. Bei den Paget-Osteoclasten ist diese Form der dissezierenden Resorption besonders häufig zu beobachten. Sie spricht für eine gesteigerte Zellmotilität und einen raschen Wechsel von Migrations- und Resorptionsphasen bei den Paget-Osteoclasten und erklärt dadurch auch die hohe Resorptionsleistung dieser Zellen. Paget-Osteoclasten besitzen besonders zahlreiche Zellkerne (Rasmussen und Bordier, 1974). In jeder Schnittebene ist die Zahl der Zellkerne in Paget-Osteoclasten um das drei- und vierfache höher als in endokrin-stimulierten Osteoclasten (Schulz und Delling, nicht publiziert). Die Ursache für diese starke Zunahme der Kernzahl ist bisher nicht bekannt. Lichtmikroskopische und autoradiographische Studien haben zu der Annahme geführt, daß Osteoclasten durch Zellfusion einkerniger Vorläuferzellen entstehen, wobei die Natur dieser Zellen noch umstritten ist (Hall, 1975; Göthlin und Ericsson, 1976). Unsere Untersuchung ergibt keine Hinweise auf eine endomitotische oder amitotische Kernteilung, die die Zunahme der Zellkernzahl in den Paget-Osteoclasten erklären könnte. Dagegen finden sich ultrastrukturelle Zellmembrankontakte zwischen einkernigen Zellformen und den Osteoclasten, die auf Zellfusionsvorgänge schließen lassen, wie sie auch bei der Entstehung anderer Formen von Riesenzellen beobachtet wurden (Schulz et al., 1976). Die Ultrastruktur dieser Vorläuferzellen ähnelt nach der Organellen-Ausstattung den Pericyten der Capillaren, ohne daß bisher eine eindeutige Zuordnung au

morphologischer Basis möglich ist. Auf die auffällige Vermehrung pericytärer Zellformen beim Morbus Paget wurde auch die Untersuchungen über die Vascularisation des Paget-Knochens hingewiesen (Demmler, 1974). Der Zunahme von Zellgröße und Kernzahl bei den Paget-Osteoclasten liegt daher wahrscheinlich eine erhöhte Fusionsrate der Vorläuferzellen zugrunde. Die Ursachen hierfür sind noch unbekannt. Aus Gewebekulturversuchen ist bekannt, daß die großen Osteoclasten eine besonders hohe Zellmotilität aufweisen (Göthlin und Ericsson, 1976), so daß auf eine Beziehung zwischen Zellgröße und Einzelzellaktivität der Osteoclasten geschlossen werden kann.

Ein besonderer morphologischer Befund sind mikrotubuläre Einschlüsse in den Zellkernen von Paget-Osteoclasten. Diese nucleären Einschlüsse sind zumeist in einer Region der Zellkerne konzentriert und stehen in räumlicher Beziehung zueinander. Gelegentlich bilden sie auch rundliche parakristalline Einschlußkörper, die von einem chromatinfreien Hof umgeben werden. Diese mikrotubulären Einschlüsse in den Zellkernen der Paget-Osteoclasten wurden bereits in ihrer Struktur eingehend beschrieben (Malkani et al., 1976; Rebel et al., 1974a, 1974b, 1975). Unsere Untersuchungen bestätigen das von diesen Autoren beschriebene morphologische Bild und die geometrische Anordnung der Mikrotubuli. Während Malkani et al. (1976) jedoch einen Durchmesser der Mikrotubuli von 150 Å angaben, liegt der von uns gemessene Durchmesser mit 100 Å um $\frac{1}{3}$ niedriger. Lediglich 90 Å geben Singer et al. (1976) für den Durchmesser eines einzelnen Mikrotubulus an. Da die Befunde jedoch morphologisch identisch sind, muß angenommen werden, daß die abweichenden Meßergebnisse durch unterschiedliche Fixations- und Präparationsmethoden bedingt sind.

Die Bedeutung der mikrotubulären Einschlüsse ist noch unklar. Als Aggregationsform von Zellkernproteinen können sie Ausdruck eines besonderen Funktionszustandes der Osteoclasten sein (Rebel et al., 1974a). Da entsprechende Veränderungen in Osteoclasten unter verschiedensten experimentellen Bedingungen bisher nicht beobachtet werden konnten (Rebel et al., 1976), ist die Annahme einer exogenen Entstehung dieser Einschlüsse wahrscheinlicher. Dabei kommt vor allem eine Virusinfektion der Osteoclasten in Betracht (Rebel et al., 1976; Malkani et al., 1976). Diese Deutung stützt sich auf die Beobachtung mikrotubulärer und parakristalliner nucleärer Einschlußkörper bei einer Reihe von Virusinfektionen wie Masernvirus (Nakai et al., 1969; Kallmann et al., 1959), Herpes- und Adenoviren (Ghadially, 1975). Dabei ist es bisher unklar, ob die neben den Viruspartikeln vorkommenden parakristallinen Strukturen als Proteine der Wirt-Zelle oder der Viren anzusehen sind (Ghadially, 1975). Als Begleitphänomen von Virusinfektionen mit Adenoviren konnten in der Gewebekultur auch virusfreie Proteinkristalle beobachtet werden (Morgan and Rose, 1960). Aufgrund dieser parakristallinen Einschlüsse in den Paget-Osteoclasten ergibt sich im Rahmen einer möglichen Virusinfektion der Hinweis auf einen cytogenetischen Aspekt der Riesenosteoclasten beim Morbus Paget. Aus Untersuchungen in der Zellkultur virusinfizierter Zellen ist bekannt, daß bestimmte Virusstämme einen cytopathogenen Effekt auf die Zellen ausüben können, der sie zur Bildung von Riesenzellen über einen Prozeß der Zellfusion veranlaßt (Falke und Richter, 1961). Die Annahme liegt daher nahe, daß auch beim Morbus Paget eine erhöhte Fusionstendenz von Vorläuferzellen der Osteoclasten durch eine mögliche Virus-

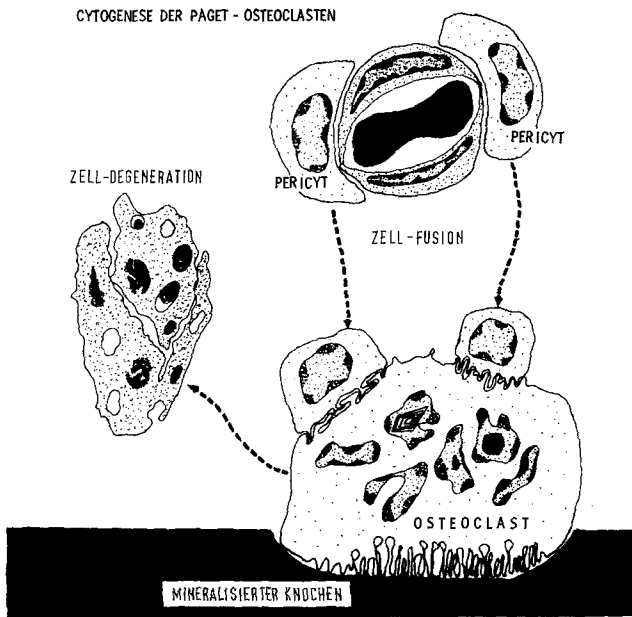


Abb. 10. Schematische Darstellung zur Cytogenese der Osteoclasten beim Morbus Paget

infektion induziert sein könnte. Diese Vorstellung bleibt jedoch hypothetisch, solange der Beweis einer Virusinfektion nicht geführt ist. Zukünftige Untersuchungen an den parakristallinen Einschußkörpern in Paget-Osteoclasten müssen zeigen, ob die ursprüngliche Auffassung Pagets (1877) von der entzündlichen Ätiologie dieser Erkrankung durch den Nachweis von Virusproteinen erneut gestützt werden kann. Die Frage nach der Ätiologie der Pagetschen Knochenerkrankung bleibt somit noch unbeantwortet. Die aufgrund unserer ultrastrukturellen Untersuchung entwickelten Aspekte zur Cytogenese der Paget-Osteoclasten lassen sich hingegen abschließend in einem Schema zusammenfassen (Abb. 10). Danach sprechen die morphologischen Befunde dafür, daß diese Osteoclasten durch Zellfusion aus Vorläuferzellen entstehen, die anscheinend identisch mit dem Pericyten der Capillaren sind. Nach bisher unbekannter Lebensdauer gehen diese hoch aktiven und beweglichen Osteoclasten zugrunde. Für die Auflösung der Osteoclasten in Einzelzellen und eine Transformation im Osteoblasten ergeben sich keine morphologischen Hinweise. Die gleichzeitige Stimulation des Knochenanbaus im Paget-Knochen ist daher eine weitere offene Frage in der Pathogenese dieser Skeleterkrankung.

Literatur

- Bonucci, E.: The organic-inorganic relationship in bone matrix undergoing osteoclastic resorption. *Calc. Tiss. Res.* **16**, 13–36 (1974)
- Burckhardt, R.: Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarkes. *Blut* **14**, 30–45 (1966)

- Collins, D.H.: Paget's disease of bone, -incidence and subclinical forms. *Lancet* **2**, 51–57 (1956)
- Cameron, D.A.: The ultrastructural basis of resorption. *Calc. Tiss. Res.* **4**, 279–280 (1969)
- Delling, G.: Endokrine Osteopathien. In: *Veröffentl. Path.* **98**, Stuttgart: Fischer 1975
- Demmler, K.: Die Vaskularisation des Paget Knochens. *DMW* **99**, 91–95 (1974)
- Doty, S.B., Schoffield, B.H.: Electron Microscopic localization of hydrolytic enzymes in osteoclasts. *Histochem. J.* **4**, 245–258 (1972)
- Edholm, D.G., Howart, S.: Studies on the peripheral circulation in osteitis deformans. *Clin. Sci.* **12**, 277–285 (1953)
- Erdheim, J.: Über die Genese der Paget'schen Knochenerkrankung. *Beitr. path. Anat.* **96**, 1–60 (1935)
- Falke, D., Richter, I.E.: Mikrokinematographische Studien über die Entstehung von Riesenzellen durch Herpes-B-Virus in Zellkulturen. *Arch. ges. Virusforsch.* **11**, 73–99 (1962)
- Gaillard, P.J.: Parathyroid gland and bone in vitro. *Schweiz. med. Wschr.* **87** (Suppl.) 14, 447 (1957)
- Ghadjialy, F.N.: Ultrastructural pathology of the cell. London-Boston: Butterworths 1975
- Göthlin, G., Ericsson, J.L.E.: The osteoclast. Review of ultrastructure, origin and structure-function relationship. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **120**, 201–231 (1976)
- Hall, B.K.: The origin and fate of osteoclasts. *Anat. Res.* **183**, 1–12 (1975)
- Hancox, N.M.: The osteoclast. In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*, G.H. Bourne (ed.) Vol. I, Chapter 5. New York-London: Academic Press 1972
- Heaney, R.P., Whedon, G.D.: Radiocalcium studies of bone formation rate in human metabolic bone disease. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **18**, 1246–1267 (1958)
- Kallman, F., Adams, J.M., Williams, R.L., Imagawa, D.T.: Fine structure of cellular inclusions in measles virus infections. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 379–392 (1959)
- Lucht, U.: Cytoplasmic vacuoles and bodies of the osteoclast. An electron microscope study. *Z. Zellforsch.* **135**, 229–244 (1972)
- Lucht, U., Maunsbach, A.B.: Effects of parathyroid hormone on osteoclasts in vivo. An Ultrastructural and histochemical study. *Z. Zellforsch. mikr. Anat.* **141**, 529–544 (1973)
- Malkani, K., Basle, M., Rebel, A.: Goniometric observations of nuclear inclusions in osteoclasts in Paget's bone disease. *J. Submicr. Cytol.* **8**, 229–236 (1976)
- Morgan, C., Rose, H.M.: Adenoviruses and herpes simplex virus with particular reference to intracellular crystals. In: *IV Int. Kongreß für Elektronenmikroskopie, Verhdlg. Band II*, W. Bargmann, D. Peters und C. Wolpers (Hrsg.) pp. 590–602. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960
- Nakai, T., Shand, F.L., Howatson, A.F.: Development of measles virus "in vitro". *Virology* **38**, 50–67 (1969)
- Paget, J.: On a form of chronic inflammation of bones (Osteitis deformans). *Med. Chir. Trans. Lond.* **60**, 37–63 (1877)
- Rasmussen, H., Bordier, Ph.: *The physiological and cellular basis of metabolic bone disease*. Baltimore: Williams and Wilkins Company 1974
- Rebel, A., Malkani, K., Basle, M., Bregeon, Ch.: Ultrastructural characteristics of the osteoclast in Paget's disease. *Rev. Rhum.* **41** (12), 767–771 (1974a)
- Rebel, A., Malkani, K., Basle, M.: Anomalies nucléaires des ostéoclastes de la maladie osseuse de Paget. *La nouvelle Presse médicale* **20**, 1299–1301 (1974b)
- Rebel, A., Bregeon, Ch., Basle, M., Malkani, K.: Les inclusion des ostéoclastes dans la maladie osseuse de Paget. *Rev. Rhum.* **47**, 637–641 (1975)
- Rebel, A., Malkani, K., Basle, M., Bregeon, Ch.: Osteoclast ultrastructure in Paget's disease. *Calc. Tiss. Res.* **20**, 187–199 (1976)
- Scott, B.L.: The occurrence of specific cytoplasmic granules in the osteoclast. *J. Ultrastruct. Res.* **19**, 417–431 (1967)
- Singer, F.R., Melvin, K.E.W., Mills, B.G.: Acute effects of calcitonin on osteoclasts in man. *Clin. Endocrinology* **5**, 333s–340s (1976)
- Sissons, H.A.: Epidemiology of Paget's disease. *Clin. Orthop.* **45**, 73–79 (1966)
- Sissons, H.A.: Paget's disease of bone. In: *Bones and Joints, Int. Acad. Path. Monograph*, L.V. Ackermann, H.J. Spjut, M.R. Abell (eds.). Baltimore: Williams and Wilkins Company 1976
- Schenk, R.K.: Ultrastruktur des Knochens. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **58**, 72–83 (1974)
- Schmorl, G.: Über Ostitis deformans Paget. *Virchows Arch.* **283**, 694–751 (1932)

- Schulz, A.: Einbettung mineralisierten Knochengewebes für die Elektronenmikroskopie. *Beitr. Path.* **156**, 280–288 (1975)
- Schulz, A.: Normal- und Ultrastruktur des Knochengewebes. In: *Knochenveränderungen bei Niereninsuffizienz*, U. Gessler (Hrsg.), Nephrologie in Klinik und Praxis, Band IV. München: Dustri 1977
- Schulz, A.: A reliable method of preparing undecalcified human bone biopsies for electron microscopic investigation. *Microscop. Acta* 1977 (im Druck)
- Schulz, A., Delling, G.: Das lysosomale System des Osteoclasten beim primären Hyperparathyreoidismus — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Beckenkammbiopsien. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **60**, 285–289 (1976)
- Schulz, A., Maerker, R., Delling, G.: Das zentrale Riesenzellgranulom. Histochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen zur Histogenese. *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* **370**, 163–175 (1976)
- Vaes, G.: On the mechanism of bone resorption. *J. Cell Biol.* **39**, 676–697 (1968)

Eingegangen am 8. August 1977