

## VERÄNDERUNGEN DES FETTGEHALTES IN DEN KNORPELZELLEN WÄHREND DES EMBRYONALEN LEBENS

István Nagy, Gyula Sávoy, László Berek und Bertalan Csillik  
(Eingegangen: am 12. Dezember 1950.)

Schon seit der Mitte des vorigen Jahrhunderts ist es bekannt, dass das Fett ein stets vorhandener, deutoplasmatischer Bestandteil der Knorpelzellen ist. (Leidig, Flemming, Hammar, Sacerdotti.) Nach Sacerdotti verändert sich der Fettgehalt der Knorpelzellen je nach dem Alter des Individuums. Er machte seine Beobachtungen an Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen und Menschen. Er verarbeitete auch in 5 $\frac{1}{2}$  Monat altes Menschenembryo und fand in dessen sämtlichen Knorpelzellen Fett. Seiner Meinung nach sind schon im Neugeborenen in allen Knorpelzellen Fettkörnchen zu finden und die Quantität des Fettes wächst bis zum 45. Jahre, dann nimmt der Fettgehalt allmählich ab. Im 70—75. Jahr findet man nur am äusseren Rande des Knorpels Fett in einigen Knorpelzellen. Auch dieses ist eher Ringförmig, in der Mitte basischen gefärbten Körnchen. Entgegen Sacerdotti behauptet Bacsich, dass weder das Alter, noch einige verschiedene acute Erkrankungen eine Rolle bei der Veränderung des Fettgehaltes der Knorpelzellen spielen.

Das Plasma der entwickelten Knorpelzellen enthält Fett in ansehnlicher Menge. Dieses bildet sich nach Ranvier aus Glykogen, nach Froboese aus Albuminen. Was die Fettretention betrifft, lautet nach Froboese die allgemeine Auffassung wie folgt: » . . . ein lebhafter, sich unsichtbar vollziehender Fettstoffwechsel dieser Zellen vorausgesetzt werden müsste. Geht man dagegen von der doppelten Funktion diesen Zellen aus, dem fermentativen Knorpelabbau und der (rezeptiven) Schlackenbeseitigung, so liegt die Annahme nahe, dass sie die Knorpelabbauprodukte in die typische, speicherungsadäquate Stapelstoffform, in Fett, überführen, als welches sie es aufbewahren, bis durch das Einsprossen der Kapillaren eine wirksame (um nicht zu sagen rationelle) Abfuhrmöglichkeit geschaffen ist, von der dann durch den Totalzerfall der Zellen in ausgiebigster Masse Gebrauch gemacht wird.« Inwieweit diese Feststellung der Wahrheit entspricht, kann man nach den bis jetzt bekannten Angaben noch nicht entscheiden. Soviel ist bestimmt, dass die Verknöcherung mit dem Einbruch der Kapillaren beginnt, weil dann vergrösserte Nahrungsansprüche auftreten. Der Zweck unserer Untersuchungen war mit morphologischen Methoden zu bestimmen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Fettinhalt der Knorpelzellen und der Verknöcherung während des embryonalen Lebens vorhanden ist.

Unsere Untersuchungen wurden an menschlichen, Schweine- und Kaninchen-Embryonen ausgeführt. Es wurden 10 menschliche, 9 Schweine- und 43 Kaninchen-Embryonen verarbeitet. In jedem Fall untersuchten wird die Epiphysen der Röhrenknochen und das Sternum.

Das Material wurde in 4% Formalin fixiert und mit Gefriermikrotom geschnitten. Im Weiteren haben wir unsere Schnitte von 8—12  $\mu$  Dicke mit einer kombinierten Methode gefärbt. Den Grund unseres Färbungsverfahrens bildeten zwei Methoden, und zwar die Methode von *Karoliny* und die von *Bacsich*. Das *Karoliny*-Verfahren ist eine simultane Kern- und Fettfärbung, wo man den Kern mit Hämatein, das Fett aber mit Sudan III färbt. Diese Methode bewährt sich aber nicht, denn wenn unsere Lösung nicht ganz frisch war, so unterdrückte das Hämatein die Sudanfärbung. Bei der *Bacsich*-Methode färbt man mit Carbol-Sudan. Diese Technik hat den Nachteil, dass sie keine simultane Färbung ist und deshalb der Kern allein gefärbt werden muss. Mit dem Kombinieren beider Methoden gelang es uns die oben erwähnten Fehler auszumerzen und ein Verfahren zu finden, welches auch bei Verwendung älterer Stammlösungen eine vollkommene simultane Fett- und Kernfärbung ermöglicht. Die Zusammenstellung der bei unseren Versuchen benützten Farblösung ist wie folgt: Zu 100 ccm der *Karoliny*-Stammlösung<sup>1</sup> gibt man 10 ccm der unverdünnten *Bacsich*-Stammlösung.<sup>2</sup> Die so erhaltene 110 ccm Farblösung wird mit 10 ccm dest. Wasser verdünnt. Mit dieser Lösung wird 30 Minuten gefärbt. Nach Abspülen mit 50% Alkohol und Leitungswasser werden unsere Präparate in Glycerin eingeschlossen. Beide Stammlösungen können lange Zeit aufbewahrt werden und ihre Mischung geschieht erst kurz vor dem Gebrauch.

Beim *Menschen* wurden 3, 4, 5, 6, 7 Monate alten Embryonen und ein Neugeborenes untersucht. In den Knorpelzellen des 3. Monate alten Embryos fanden wir kein morphologisch nachweisbares Fett. Das Fett zeigte sich erst im 4. Monat des embryonalen Lebens, in den Epiphysen der Röhrenknochen

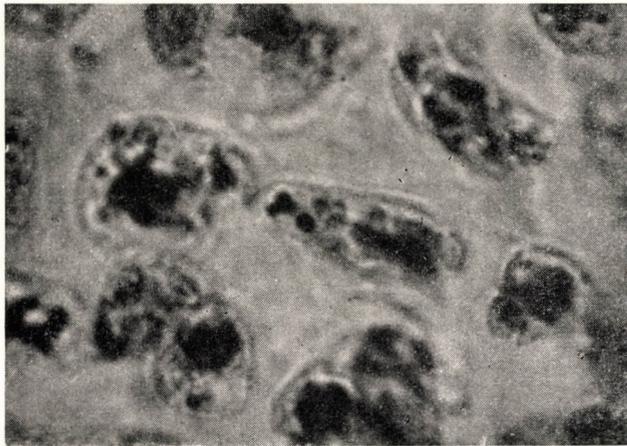


Fig. 1. Knorpelzellen mit Fettkörnchen aus dem Sternum eines 4 Monate alten menschlichen Embryos. Gefrierschnitt 12  $\mu$ . Sudan. Stärkste Vergrößerung.

<sup>1</sup> *Herstellung der Karoliny'schen Stammlösung*: 1 gr Hämatein wird in 100 ccm abs. Alkohol gelöst + 100 ccm dest. Wasser + 100 ccm Glycerin + 2 gr Alaun + 10 ccm. Ac. acet. conc. Zu 100 ccm dieser Lösung fügt man 20 ccm Aceton-Alkohol und 2—3 gr Sudan III zu.

<sup>2</sup> *Herstellung der Stammlösung nach Bacsich*: Ein Gemisch von 200 ccm 96% Alkohol + 5 Vol.% Ac. carbol. cryst. + 1 gr Sudan III wird auf Wasserbad bis zum Sieden gewärmt und nach Filtern auf 24 Stunden in Eisschrank gestellt. Nach einem wiederholten Filtern gibt man zu dieser Lösung 40 ccm Wasser tropfenweise. Die abermals filtrierte Lösung wird in einer gut schliessenden Flasche mit Glasstöpsel aufbewahrt.

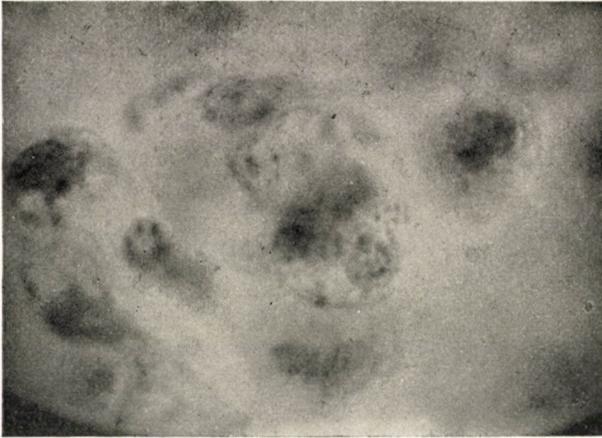


Fig. 2. Knorpelzellen mit wesentlich kleineren Fettkörnchen aus dem Caput femoris desselben Embryos, wie Fig. 1. Gefrierschnitt 12  $\mu$ . Sudan. Stärkste Vergrößerung.

in kleinerer, im Sternum in grösserer Menge. (Fig. 1., 2.) Die Menge des Fettes wuchs während des intrauterinen Lebens nach und nach, sowohl in den Epiphysen der Röhrenknochen, als im Sternum, und zwar in der Weise, dass der Fettgehalt beider Knorpel sich im VII. Monat des embryonalen Lebens ausglich. Bei dem Neugeborenen fanden wir überall ganz ausgebildete Fett. Die Fettkörnchen waren hauptsächlich an den zwei Polen der Zellen lokalisiert, wie von *Orth* und *Bacsich* bei Erwachsenen beschrieben wurde. Das in den menschlichen Knorpelzellen gefundene Fett gibt die typische, apfelsinenrote Sudan-Reaktion.

In einige unserer Schnitte fanden wir längs der Blutgefässe solche Knorpelzellen, welche in ziemlich grosser Menge Fettkörnchen enthielten. Dieser Befund unterstützt *Froboese's* Annahme, dass der Einbruch der Kapillaren in den Knorpel nur eine Möglichkeit der Fettabfuhr schafft, welche aber nur nach dem Zerfall der Zellen vor sich gehen kann. Diese Meinung *Froboese's* wird auch durch *Sacerdotti's* Beobachtung unterstützt, der in dem Hyalinknorpel des Greises meistens in der Nähe des Perichondrium Fettkörnchen fand, obwohl dort die meisten Blutgefässe zu finden sind.

Zu Gunsten der Annahme von *Froboese* spricht auch unsere Beobachtung, da wir um den Verkalkungspunkt in den geschwollenen Knorpelzellen noch Fett gefunden haben, wogegen in den degenerierten Knorpelzellen kein, oder nur ganz wenig Fett vorhanden war. Weder in den geschwollenen, noch in den degenerierten Knorpelzellen nahm das Fett die typische apfelsinenrote Farbe an, sondern zeigte ein braun-röte Färbung.

Die von uns verarbeiteten Schweine-Embryonen waren 1½, 2, 2½ und 3 Monate alt. Schon beim 1½ Monat alten Embryo waren in den Knorpelzellen Fettkörnchen zu finden. Diese vermehrten und vergrösserten sich bis

zum dritten Monat wesentlich; also der Fettgehalt der Knorpelzellen vermehrte sich auch hier parallel mit dem Wachsen des Embryos. Die Körnchen waren teilweise apfelsisenrot, gaben also die typische Sudan-Reaktion, wir fanden aber auch braun-violett gefärbte Körnchen. (Fig. 3.)



Fig. 3. Knorpelzellen aus der distalen Epiphyse des Femurs eines  $2\frac{1}{2}$  Monat alten Schweineembryos. Gefrierschnitt  $12\ \mu$ . Sudan. Starke Vergrößerung.

Bei den *Kaninchen*-Versuchen benützten wir 10, 15, 18, 20, 22, 24 und 28 Tage alte Embryonen. In 10 tägigen Embryonen fanden wir noch keine Knorpelanlage. In den 15 tägigen sind die Knorpelanlagen schon ausgebildet. Die Zellen der Anlage der Wirbelsäule und des Rippenknorpels enthielten kaum etwas Fett. In den knorpeligen Anlagen des Schädels, des Beckens und des Sternums fanden wir jedoch fein verteiltes Fett. Bei dem 22 tägigen Kaninchenembryonen war auch in den Knorpelzellen der Wirbelanlage fein verteiltes Fett vorhanden. Bei demselben enthielten die Knorpelzellen des Sternums schon grössere Fetttropfen. Beim Kaninchen gibt das Fett nicht die typische Sudan-Reaktion, sondern färbt sich braun-violett. (Fig. 4.)

Der interessante Befund ist noch zu erwähnen, dass wir im Rippenknorpel eines  $2\frac{1}{2}$  Jährigen Kindes Knorpelzellen gefunden haben, in denen das Fett ringförmig gelagert war. In der Mitte des Ringes befand sich ein sich basisch färbender Stoff. Dies widerspricht der Behauptung *Frey's*, wo nach diese Anordnung für die Knorpelzellen von älteren Individuen kennzeichnend wäre. Nach *Sacerdotti* ist dieser, sich basisch färbender Stoff nicht der Zellkern, sondern eine Fettseife.

Beachtet man die Zeit der Schwangerschaft beim Menschen (9 Monate), beim Schwein (4 Monate) und beim Kaninchen (28 Tage), so zeigen unsere Untersuchungen, dass das Fett in den Knorpelzellen des Menschen-, des Schweine- und des Kaninchen-Embryos in selben Phase der Schwangerschaft erscheint. Diese Phase entspricht ungefähr der Mitte der Schwangerschaft.

In weiteren vermehrt sich die Menge des in den Knorpelzellen zu findenden Fettes parallel mit der Entwicklung des Embryos. Das ist der Anfang der stufenweisen Fettzunahme, welche nach *Sacerdotti* bis zum 45-sten Lebensjahre dauert.

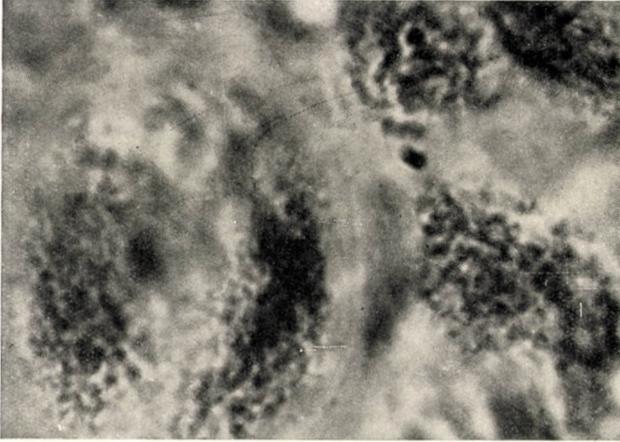


Fig. 4. Knorpelzellen aus dem Sternum eines 22 tågigen Kaninchenembryos. Gefrierschnitt 12  $\mu$ . Sudan. Stärkste Vergrößerung.

Wie schon erwähnt, haben wir bei den Kaninchen- und teilweise auch bei den Schweine-Embryonen solche Fettkörnchen gefunden, die sich braun-violett färbten. Nach *Froboese* kommt diese Farbnuance durch eine Doppelfärbung mit Sudan und Hämatoxylin zustande und zeigt die Anwesenheit von Phosphatiden und Cholesterin. Um die Qualität der anwesenden Lipotide näher zu bestimmen, wandten wir *Ciaccio's* Verfahren für die differenzierende Färbung der Lipotide an. Nach diesem Verfahren sind hier ungesättigte Phosphatide vorhanden.

Aus unseren Untersuchungen ist auch klar ersichtlich, dass die Knorpel, die früher verknöchern, in früheren Stadien der Entwicklung mehr Fett enthalten, als die später verknöchern. So enthält z. B., das Caput femoris, das im 1.—2. Lebensjahr verknöchert, weniger Fett als das Sternum, dessen Verknöcherung schon im VII. Embryonalmonat beginnt. Dieser Unterschied gleicht sich in den späteren Stadien des embryonalen Lebens aus.

Unsere Feststellungen weisen darauf hin, dass zwischen dem Fettgehalt der Knorpelzellen und dem Verknöcherungsprozess des Knorpels ein Zusammenhang besteht. Die Rolle des Fettgehaltes des Knorpels bezüglich des Verknöcherungsprozesses ist noch unklar. Es ist aber wahrscheinlich, dass das Fett als Energiedepot eine Rolle spielt; der Phosphorgehalt des Fettes würde dabei zur Bildung der Knochengrundsubstanz verwendet werden. Wieweit diese Auffassung zu Recht besteht, soll im Laufe weiterer Versuche entschieden werden.

## Zusammenfassung

1. Das Fett erscheint in den Knorpelzellen des Embryos ungefähr in der Mitte der Schwangerschaft.
2. Die Menge des Fettes nimmt in Laufe des embryonalen Lebens stufenweise zu.
3. Früher verknöchern Knorpel enthalten am Anfang der Entwicklung mehr Fett als die später verknöchern.

## LITERATUR

1. *Bacsich* : 1934. Vizsgálatok a fehérvérsejtek zsírtartalmáról (zsírfestési eljárás fehérvérsejtekben). Mitteilungen aus den anatomisch-histologischen Instituten der Universitäten in Budapest und Szeged (Ungarn). Vol. V.
2. *Bacsich* u. *Wlassich*, 1932. A porcsejtek zsírtartalmának az egyén tápláltsági fokával és a tuberculosissal kapcsolatos változása. Magyar Orvosi Arch. 33 kt. 274 o.
3. *Froboese*, 1926. Über das Vorkommen von Fett in jungen Embryonen. Zeitschr. f. mikr.-anat. Forsch. Bd. 7. S. 527.
4. *Karoliny*, 1930. Eljárás a sejtanyag és a zsír simultan megfestésére. Magyar Orvosi Arch. 31 kt. 440 o.
5. *Leydig*, 1857. Lehrbuch d. Histologie, Meidinger, Frankfurt.
6. *Möllendorf*, 1930. Handb. d. Mikr. Anat. d. Menschen. Bd. II/3. S. 210. Springer, Berlin.
7. *Orth*, 1885. Cursus d. norm. Histologie. Engelmann. Leipzig.
8. *Ranvier*, 1864. J. d. Physiol. Vol. 6, p. 574.
9. *Romeis*, 1948. Mikr. Technik. Leibniz, München.
10. *Sacerdotti*, 1900. Über das Knorpelfett. Virchow's Arch. path. Anat. Bd. 159. S. 152.
11. *Sawarsin* u. *Rumiantzew*, 1946. Kurs gistologii. Medgis. Moskwa.
12. *Törő*, 1942. Az ember fejlődése. Egyetemi Nyomda, Debrecen.

ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИПОИДНОМ СОДЕРЖАНИИ ХРЯЩЕВЫХ КЛЕТОК  
В ПЕРИОД ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ЖИЗНИ

И. Надь, Д. Шавай, Л. Берек и Б. Чиллик

## Резюме

Авторы исследовали, в разных периодах эмбрионального развития, содержание липоида хрящевых клеток в зародышах человека, свинки и кролика. Для окрашивания служила новая комбинация метода «Судан». Результаты следующие:

1. Липоид появляется в эмбриональных клетках приблизительно в половинный период беременности.
2. Количество липоида постепенно повышается в течение эмбриональной жизни.
3. Хрящи, в которых оксификация начинается раньше, в начале развития содержат больше липоида, чем другие.