

## ÜBER DIE KORRELATION ZWISCHEN LIPOIDGEHALT DER KNORPELZELLEN UND OSSIFIKATION

István Nagy, Gyula Sávoy und Bertalan Csillik

(Eingegangen am 4. März 1953)

Es ist bekannt, dass die Knorpelzellen als ständige deutoplasmatische Bestandteile Fetttröpfchen enthalten. Im Laufe unserer vorhergehenden Untersuchungen über die Veränderungen im Fettgehalt der embryonalen Knorpelzellen hatten wir festgestellt, dass die sich früher verknöchernenden Knorpel im Frühstadium der Entwicklung mehr Fett enthalten als die sich später verknöchernenden. Wir gaben auch an, dass nahe des Ossifikationsherdes die Fetttröpfchen sich braunviolett färben, was nach *Froboese* [2] eine Folge der Doppelfärbung mit Sudan III und Hämatoxylin ist und auf die Anwesenheit von Phosphatiden und Cholesterin hindeutet.

Um uns über die Natur der in der Nähe des Ossifikationsherdes befindlichen fettartigen Stoffe zu orientieren, haben wir die in Verknöcherung begriffenen Knorpel verschieden alter Schweine-, Kaninchen- und Menschenembryonen mit Hilfe der *Ciaccio'schen* differenzierenden Fettfärbung untersucht. Dieses Verfahren beruht bekanntlich auf dem verschiedenen Löslichkeitsvermögen der Lipide. Unseren Feststellungen nach wurden die Körnchen, die im Plasma der dem Ossifikationsherd nahe gelegenen Knorpelzellen enthalten sind schon nach 24—36-stündiger Bichromatbehandlung in Alkohol, Benzol u. a. unlöslich und liessen sich mit Sudan III färben. Nach *Ciaccio*, macht 1—2-tägige Bichromatbehandlung nur die ungesättigten Phosphatide unlöslich, sodass die nahe des Ossifikationskernes gelegenen sudanophilen Granula der Knorpelzellen Phosphatide sein dürften.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die in den Knorpelzellen enthaltenen Phosphorlipide irgendwie mit dem Verknöcherungsprozess in Beziehung stehen. Da die hervorragendsten Mikrotechniker — wie *Romeis* [5] und *Lison* — die Zuverlässigkeit der Differenzierungs-Fettfärbungen bezweifeln, haben wir unsere diesbezüglichen Ergebnisse auch mit Hilfe biochemischer Untersuchungen kontrolliert.

Zu diesem Zweck wurden menschliche und Schweineknorpel verschiedenen Alters sorgfältig von der Knorpelhaut gereinigt und das unter Umständen äusserlich noch anhaftende Fett durch Betupfen mit in Äther getauchter Watte entfernt. Hierauf wurden die Knorpel in kleine Stücke zerschnitten und das Fett mit dem *Soxhlet'schen* Verfahren mit einem kochenden Äther-Alkoholgemisch herausgelöst. Der Extrakt wurde eingedampft und die Trockensubstanz

bestimmt. Nun wurde das in der Lösung enthaltene Fett mit Schwefelsäure behandelt und nach Entfärbung mit Wasserstoffhyperoxyd der Phosphorgehalt der Lösung nach *Fiske* und *Subbarow* (1) kolorimetrisch bestimmt. Die hierbei erhaltenen Daten sind an der folgenden Tabelle angeführt und an Abbildung 1 veranschaulicht.

Nr.	Material	Phosphorgehalt in $\gamma$ /l mg Fett
1.	Neugeborenes Nr. 1. (Mensch) Rippenknorpel .....	8,32
2.	« Nr. 1. « Caput femoris .....	11,67
3.	« Nr. 1. « Sternum .....	10,10
4.	« Nr. 1. « Verschiedene Knorpel .....	9,13
5.	« Nr. 2. « Rippenknorpel .....	7,20
6.	« Nr. 2. « Caput femoris .....	10,95
7.	« Nr. 2. « Sternum .....	9,02
8.	3 Monate altes Schweineembryo Rippenknorpel .....	5,30
9.	3 Monate altes Schweineembryo Epiphysenknorpel .....	7,00
10.	45-jähriger Mann Rippenknorpel .....	6,80

Aus der Tabelle geht hervor, dass die sich verknöchernden Knorpel (Caput femoris, Sternum, Epiphysenknorpel) in jedem Falle mehr Phosphor, und infolgedessen auch mehr Phosphatide enthalten als die sich nicht verknöchernden Rippenknorpel. So enthielt z. B. der Caput femoris bei dem Neugeborenen Nr. 1 41,5% und bei dem Neugeborenen Nr. 2 52% mehr Phosphor als die entsprechenden Rippenknorpel, während bei dem 3 Monate alten Schweineembryo der Phosphorgehalt der Epiphysenknorpel den der Rippenknorpel um 32% übertraf.

Die erhaltenen Phosphorwerte ermöglichten auch die Berechnung des prozentuellen Phosphatidgehaltes in den verschiedenen Knorpelgattungen. Da die Phosphatide durchschnittlich 38% Phosphor enthalten, lässt sich berechnen, dass z. B. im Fettgehalt der Rippenknorpel des Neugeborenen Nr. 1 21% und im Fettgehalt des Caput femoris rund 30% Phosphatide enthalten waren. Wir betonen aber, dass wir wegen der geringen Zahl der uns zur Verfügung stehenden Bestimmungsdaten noch nicht in der Lage sind, den Phosphorgehalt der einzelnen Knorpelarten mathematisch in Relation zu stellen; es soll nur der stets vorhandene Phosphatidüberschuss hervorgehoben werden, der bei den sich verknöchernden Knorpeln ausnahmslos in Erscheinung tritt und in völligem Einklang mit den schon erwähnten histochemischen Untersuchungen steht. Hier sei auch erwähnt, dass die aus den ossifizierenden Knorpeln hergestellten Äther-Alkohol-Extrakte nach Absorbierung über Aluminiumhydroxyd im ultravioletten Licht eine Fluoreszenz zeigen.

Nach dem oben Gesagten erhebt sich von selbst die Frage nach dem Schicksal dieser Fette während des Ossifikationsvorganges. Eine Antwort

hierauf versuchten wir durch Untersuchung des Sternums verschieden alter menschlicher Embryonen zu erhalten. Es wurden Gefrierschnitte von 12  $\mu$  Dicke angefertigt und mehrere Stunden lang in alkoholiger Sudan III-Lösung gefärbt. Dabei ergab sich folgendes :

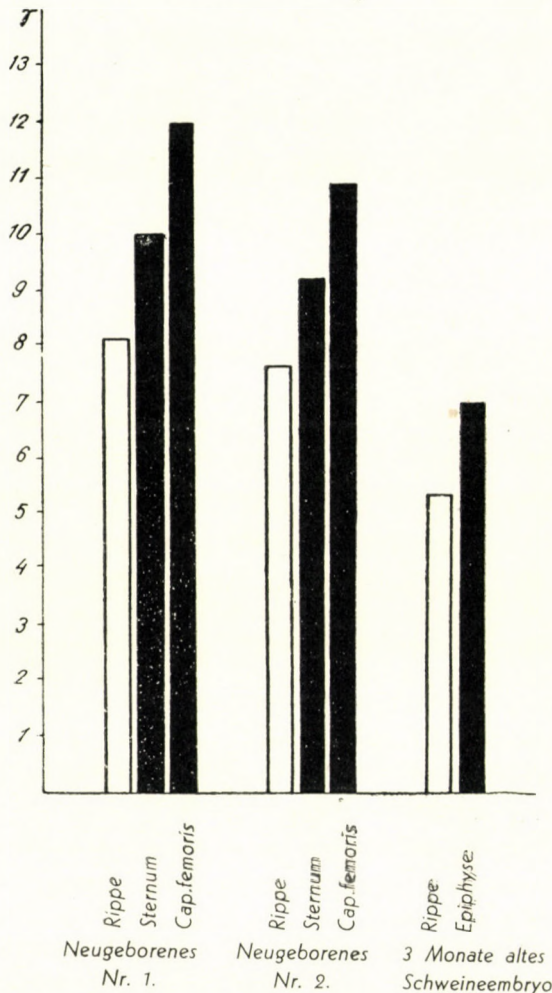


Abb. 1. Phosphorgehalt des äther-alkoholigen Auszuges verschiedener Knorpel, ausge rückt in  $\gamma$ /mg Fett.

1. In der Ruhezone der Knorpelzellen (d. h. dort, wo noch keinerlei Anzeichen einer Ossifikation zu erkennen sind) nehmen an beiden Polen der Zellen neben dem Kern sich intensiv färbende Fetttröpfchen Platz, wie das auch von Orth und später von Bacsich beschrieben wurde (s. Abb. 2).

2. In den in der Umgebung des Ossifikationsherdes gelegenen Knorpelzellen, die bereits degenerative Veränderungen aufweisen und an deren Peripherie die Verkalkung der Grundsubstanz bereits eingesetzt hat, sind die Fetttropfchen stark vermindert und stellenweise ganz verschwunden (s. Abb. 3).

### Besprechung der Befunde

Auf Grund unserer mit Hilfe des *Ciaccio*-Verfahrens durchgeführten Untersuchungen lässt sich feststellen, dass in der Umgebung des Ossifikationskernes die Knorpelzellen Phosphatidgranula enthalten. Diese unsere Feststellung wird auch durch biochemische Untersuchungen bekräftigt. Mit dem Fortschrei-

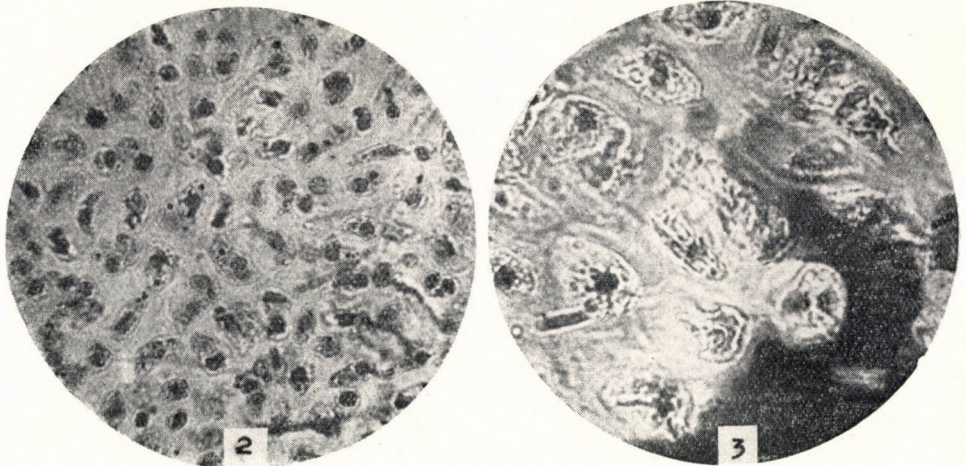


Abb. 2. Ruhendes Knorpelgewebe aus dem Sternum eines 6 Monate alten Embryos. Gefrierschnitt 12  $\mu$ , Sudan III-Hämatoxylin.

Abb. 3. In Degeneration begriffenes Knorpelgewebe aus dem Sternum eines 6 Monate alten Embryos. Gefrierschnitt. 12  $\mu$ , Sudan III-Hämatoxylin.

ten des Ossifikationsprozesses verschwinden die Lipoidkörnchen sukzessiv aus den Knorpelzellen; die in Degeneration begriffenen Knorpelzellen enthalten gar keine Lipoide mehr. Unseres Erachtens weist dies darauf hin, dass die Lipoide, und zwar in erster Linie die Phosphatide, bei der Verknöcherung verbraucht werden.

Unsere obige Feststellung, derzufolge die ätheralkohollöslichen Stoffe der Knorpelzellen im Vorbereitungsprozess der Ossifikation eine bedeutende Rolle spielen, wird auch durch die im Jahre 1945 von *Lacroix* [3] durchgeführten Untersuchungen bestätigt, nach denen die aus den Knochen von Kaninchenembryonen gewonnenen alkoholigen Extrakte eine knochenbildende Wirkung

besitzen. *Lacroix* nennt diesen alkohollöslichen Stoff »Osteogenin«. Wir halten es für möglich, dass dieses Osteogenin nichts anderes ist als irgendeines der oben genannten Lipoide. Endgültig wird diese Frage erst durch die chemische Analyse des Osteogenins zu entscheiden sein.

Schliesslich erscheint uns auch die Beobachtung von *Silberberg* und *Silberberg* [7] erwähnenswert, dass durch eine stark fetthaltige Diät die Verknöcherung bei Mäusen stark beschleunigt wird. Es ist anzunehmen, dass auch hier von einer die Ossifikation begünstigenden Wirkung der Phosphatide die Rede ist.

#### Zusammenfassung

Verfasser haben auf Grund von histo- und biochemischen Untersuchungen am menschlichen und Schweine-Knorpelzellen festgestellt, dass die in den Knorpelzellen befindlichen Fetttröpfchen Phosphatide enthalten. Die prozentuelle Phosphatidmenge ist in den sich verknöchernden Knorpeln grösser als in den sich nicht verknöchernden.

Die physiologische Rolle des Fettgehaltes der Knorpelzellen ist laut Verff., dass sie im Ossifikationsprozess verbraucht werden.

#### LITERATUR

1. *Fiske, C.* und *Y. Subbarow* : (1935) In Fr. Rapport : Mikrochemie des Blutes. Wien-Leipzig.
2. *Froboese* : (1926) Über das Vorkommen von Fett in jungen Embryonen. Ztschr. f. mikr. Anat. Forsch. 7, 527.
3. *Lacroix* : (1945) Recent investigations on growth of bone. Nature, 156, 576.
4. *Nagy, Sáway, Berek, Csillik* : (1951) Veränderungen des Fettgehaltes in den Knorpelzellen während des embryonalen Lebens. Acta Morphologica Hung. I, 3, 307.
5. *Romeis, B.* : (1948) Mikroskopische Technik. Leibniz, München.
6. *Roulet, Fr.* : (1948) Methoden d. Path. Histologie. Wien.
7. *Silberberg* and *Silberberg* : (1950) Skeletal growth and articular changes in mice receiving a high-fat diet. Am. Jour. Path. 26.
8. *Straub* : (1948) Biokémia. Budapest. (Ung.)
9. *Törő* : (1947) Szövettan. Debrecen. (Ung.)
10. *Zavarzin i Rumjancev* : (1946) Kurs histologii. Moskau. (Russ.)

#### СОДЕРЖАНИЕ ЛИПОИДА В ХРЯЩЕВЫХ КЛЕТКАХ И ЕГО СВЯЗЬ С ОБРАЗОВАНИЕМ КОСТИ

И. Надь, Дь. Шавай и Б. Чиллик

#### Резюме

Авторы, путем гистохимического и биохимического исследования хряща человека и свиней, установили, что капли жира, размещающиеся в хрящевых клетках, содержат фосфатиды. Процентное содержание фосфатидов в окостенеющем хряще более высоко чем в покоящемся.

Физиологическая роль содержания жира в хрящевых клетках — по мнению авторов — состоит в том, что они доставляют часть фосфора, нужного для процесса образования костей.