

mor⁶. These observations together with the present report indicate that this compound is capable of interfering in some way with endocrine mechanisms in the female reproductive system.

Résumé. Dihydroelatericine A administré par voie buccale à des souris femelles au moins pendant deux semai-

nes, empêche la fertilisation. L'examen histologique des ovaires démontre que la substance prévient l'ovulation.

B. SHOCHAT⁷, A. M. BEEMER, S. GITTER and D. LAVIE

Rogoff Wellcome Medical Research Institute, Beilinson Hospital, Petah-Tikva, Israel Institute for Biological Research, Ness-Ziona, and the Department of Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot (Israel), 22 October 1972.

⁶ Z. SPEISER, Thesis, Tel-Aviv University (1964).

⁷ Present address: The Clinical Laboratory, Beilinson Hospital, Petah-Tikva (Israel).

Ultrastrukturelle Untersuchungen der juxtaepiphysären Kapillaren nach Perfusionsfixation

Während die knorpelige Epiphyse eines Embryos noch von zahlreichen gefässführenden Knorpelkanälen durchzogen wird, ist mit dem Einsetzen der enchondralen Ossifikation der hyaline Epiphysenknorpel bei den Säugtieren gefässlos (BROOKES¹). Bei den Vögeln hingegen wird der Wachstumsknorpel der langen Röhrenknochen von sog. Knorpelkanälen in seiner ganzen Länge durchbohrt (LUTFI²). Diese Knorpelkanäle enthalten Kapillaren, die mit den juxtaepiphysären Kapillaren in Verbindung stehen.

Der Einsprossungsprozess der juxtaepiphysären Kapillaren in den Epiphysenknorpel war Ziel wiederholter licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen (IRVING³; ANDERSON und PARKER⁴; SCHENK et al.^{5,6}; BROOKES¹). Nach routinemässiger Gewebeentnahme und Immersionsfixation wurden in den juxtaepiphysären Kapillaren grosse

Endothellücken beschrieben, durch welche zahlreiche Erythrocyten in die eröffneten Lakunen ausgetreten waren (ANDERSON und PARKER⁴; SCHENK et al.^{5,6}). Es war deshalb von Interesse, die Ultrastruktur der Epiphysen-Metaphysengrenze nach Perfusionsfixation zu untersuchen.

Material und methodik. Für die Untersuchung wurden 6 männliche Wistar-Ratten (mittleres Gewicht 80 g) verwendet. Die Tiere erhielten eine Altromin-R-Standard-Diät sowie Trinkwasser ad libitum. Die Perfusion selbst erfolgte weitgehend nach Angaben von FORSSMANN et al.⁷. Da eine gute Kühlung der Perfusionslösung für die Gewebeerhaltung wesentlich schien, wurden in Abänderung der von den genannten Autoren beschriebenen Anlage das Kühlbad und die Vorrichtung zur Sättigung der ersten Spüllösung mit Sauerstoff unmittelbar vor die Ansatzstelle für den Mikroschlauch gesetzt. Ein Dosenmanometer mit Reiberhahn wurde am Kühlbehälter angebracht und erlaubte so, sowohl den Blutdruck der Versuchstiere bei Perfusionsbeginn zu messen als auch den gewünschten Perfusionsdruck einzuregulieren.

Die Narkose der Tiere erfolgte durch i.p. Verabreichung von Nembutal (ca. 60 mg/kg KG). Procedure: Ein heparinierter PVC-Mikroschlauch PE 90 wurde in die Aorta descendens eingeführt. Der gemessene Blutdruck betrug bei den Tieren im Durchschnitt ca. 100 bis 110 cm H₂O. Eine vorher angelegte Ligaturschlinge um die Aorta descendens wurde angezogen und der Mikroschlauch in die Arteria iliaca communis vorgeschoben. Während 5 min wurde mit einer Ringer-Procaïn-Lösung nach FORSSMANN et al.⁷ (4–8°C; pH = 7,4; 350 mOsm) in zwei Varianten gespült: bei 3 Tieren bei einem Druck von 100 cm H₂O; bei 3 Tieren bei einem Druck von 140 cm H₂O. In einem weiteren Schritt wurde sodann mit einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung (4–8°C; pH 7,4; 0,1 molar; 350 mOsm) bei einem Perfusionsdruck von 60–80 cm HO₂ während 30 min fixiert. Nach nochmaliger Durchspülung mit s-Collidin-Waschpuffer (400 mOsm) war die Perfusionsfixation der Tibiaepiphysenfugen beendet. Daran anschliessend erfolgte die Entnahme der Tibiaepiphysenfuge



Fig. 1. Kapillarsprosse aus einer juxtaepiphysären Kapillare (Pfeil) dringt in Lakune (L) zwischen zwei mineralisierte Knorpelsepten vor. Beachte das intakte Endothel ohne Erythrocyten-Extravasat nach der Perfusionsfixation. CL = Kapillarlumen. Perfusionsdruck: 140 cm H₂O. × 3800.

¹ M. BROOKES, *The Blood Supply of Bone. An Approach to Bone Biology* (Butterworth and Co., Ltd., London 1971).

² A. M. LUTFI, Ph. D. Thesis, The Queen's University of Belfast 1967.

³ M. H. IRVING, *J. Anat.* 98, 631 (1964).

⁴ C. E. ANDERSON und J. PARKER, *J. Bone Jt. Surg.* 48A, 899 (1966).

⁵ R. K. SCHENK, D. SPIRO und J. WIENER, *J. Cell Biol.* 34, 275 (1967).

⁶ R. K. SCHENK, J. WIENER und C. SPIRO, *Acta anat.* 69, 1 (1968).

⁷ W. G. FORSSMANN, G. SIEGRIST, L. ORCI, R. PICTET und C. ROUILLER, *J. Microsc.* 6, 279 (1967).

und zweistündige Nachfixierung der Gewebestückchen in s-Collidin-gepuffertem 2%igem OsO_4 . Zwischenwässerung in s-Collidin-Waschpuffer. Entwässerung über aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxyd. Einbettung in Epon 812.

Befunde. Nach der Perfusionsfixation sind die Kapillaren im Bereiche der Epiphysen-Metaphysengrenze frei von Erythrocyten. Die ultrastrukturellen Untersuchungen zeigen, dass die Endothelschlingen der juxtaepiphysären Kapillaren in die eröffneten Lakunen hineinreichen, wobei die Endothelien in unmittelbaren Kontakt entweder mit den in Auflösung begriffenen Chondrocyten oder mit den Knorpelkapseln kommen (Figuren 1 und 2). Die Kapillarendothelien sind ausgesprochen zart und weisen keine Basalmembran auf. Sie enthalten Lysosomen in Form von «dense bodies», vereinzelt Mitochondrien und zahlreiche freie Ribosomen (Figur 2). Häufig finden sich sog. gap-junctions, wo sich zwei aneinander grenzende Endothelausläufer dachziegelartig überdecken. An den Endothelien der juxtaepiphysären Kapillaren lassen sich Endothelporen beobachten, deren Durchmesser nie grösser als ca. 50 μm ist. Sowohl bei niederen als auch bei hohen Perfusionsdrücken finden sich keine erythrocytären Extravasate (Figuren 1 und 2).

Diskussion. Im Bereiche der Eröffnungszone sprossen blind endigende Kapillaren in den Epiphysenknorpel ein (ANDERSON und PARKER⁴; SCHENK et al.^{5,6}). Wie die Untersuchungen nach Perfusionsfixation zeigen, handelt es sich um porenhaltige Kapillaren mit fehlender Basalmembran. Wie aus Untersuchungen am immersionsfixierten Epiphysenknorpelmaterial hervorgeht, liegen

zwischen dem abgebauten Knorpel und den Kapillaren zahlreiche freie Erythrocyten. Diese Beobachtung wird nach ANDERSON und PARKER⁴ auf eine zeitweilige Öffnung der Kapillaren zurückgeführt. Nach den Untersuchungen von SCHENK et al.^{5,6} soll dies darauf beruhen, dass die einsprossenden Kapillaren sich solange erweitern, bis sie mit der knorpeligen Wandung, d.h. mit der Knorpelkapsel, in direkten Flächenkontakt kommen. Nach der Auflösung der queren Trennwand soll die Spitze der Kapillarsprosse in die nächste Lakune vordringen. Während dieser Phase nun sollen ausgedehnte Lücken in der Gefässwand entstehen, durch welche corpusculäre Blutelemente sowie Plasma in die neueröffneten Lakunen austreten können (SCHENK et al.^{5,6}). Zu denselben Ergebnissen kommt auch SCHOEFL⁸ bei der Betrachtung von Kapillarsprossen im entzündlichen Granulationsgewebe. Das Auftreten derartiger Extravasate wurde auf den Umstand zurückgeführt, dass neugebildete Blutgefässe äusserst leicht verletzbar sind und eine abnorme Permeabilität aufweisen (SCHOEFL⁸). Neuere Untersuchungen der Mikrozirkulation in vivo haben gezeigt, dass einzelne rote Blutzellen das Kapillarlumen verlassen können (BRANEMARK⁹). Bei einer solchen Erythrocytendiapedese haftet zunächst der Erythrocyt mit einem sich verlängernden Zellausläufer am Endothel an. Er zwängt sich sodann durch eine ca. 1 μm grosse Endothelöffnung durch und liegt anschliessend parallel zur Endothelbegrenzung. Dieses Phänomen wurde jedoch nur bei vorübergehender Haemostase oder nach kurzer Ultraviolettexposition, d.h. nach Endothelschädigungen, beobachtet (BRANEMARK⁹). Die Endothelien der juxtaepiphysären Kapillaren bleiben auch nach hohen Perfusionsdrücken intakt, so dass keine Erythrocyten in den Extrazellulärraum austreten können. Demzufolge ist der Schluss berechtigt, dass Erythrocyten-Extravasate durch grosse Endothellücken in den juxtaepiphysären Kapillaren (SCHENK et al.⁶; ANDERSON und PARKER⁴) auf einem fixations-bedingten Artefakt beruhen. Die Beurteilung von immersionsfixierten Endothelien führt somit leicht zu Fehlinterpretationen, was sich durch eine entsprechende Perfusions-Fixation vermeiden lässt.

Die Tatsache jedoch, dass im immersionsfixierten Epiphysenknorpel Erythrocyten aus den juxtaepiphysären Kapillaren austreten können, ist gleichzeitig ein Hinweis dafür, dass das umliegende Knorpelmaterial durch einen chondrolytischen Prozess aufgelockert sein muss (RIEDE et al.¹⁰). Infolgedessen vermag der Kompressionsdruck, der beim Zerklüffern des Epiphysenknorpelgewebes entsteht, die Blutsäule in den Kapillaren vorzutreiben, sodass die Kapillarendothelien an bestimmten Stellen einreissen.

Summary. After perfusion-fixation, the juxtaepiphyseal capillaries reveal endothelial cells with pores and without basement-membrane. Extravasates of erythrocytes are artefacts and are due to overexpanding of the endothelial cells in a loosened cartilage matrix.

R. ZINKERNAGEL, U. N. RIEDE und R. K. SCHENK

Laboratorium für Elektronenmikroskopie
der Universität Basel,

Pestalozzistr. 20,

CH-4056 Basel (Schweiz), 27. März 1972.

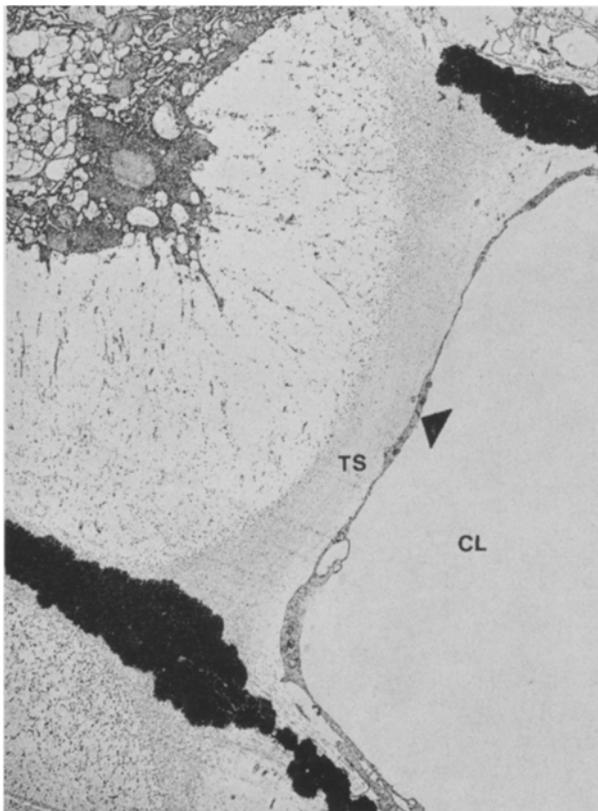


Fig. 2. Ausschnitt aus Endothel einer juxtaepiphysären Kapillare der Eröffnungszone. Gap-junction (Pfeil). Endothel liegt der transversalen Knorpelsepte (TS) eng an. CL = Kapillarlumen. Perfusionsdruck: 100 cm H_2O . $\times 9500$.

⁸ G. I. SCHOEFL, Virchows Arch. Path. Anat. 337, 97 (1963).

⁹ P. I. BRANEMARK, *Intravascular Anatomy of Blood Cells in Man* (S. Karger Verlag, Basel, München, Paris, New York 1971).

¹⁰ U. N. RIEDE, Beitr. path. Anat. 144, 23 (1971).