

## Über das Vorkommen von Lymphocyten in Reticulumzellen

Obwohl die Lymphocyten einen erheblichen Teil der geformten Blutelemente darstellen, wissen wir, abgesehen von ihrer Herkunft aus dem lymphatischen Gewebe, gegenwärtig noch relativ wenig Gesichertes über ihr Schicksal und ihre Funktion im normalen und kranken Organismus<sup>1-5</sup>. Sicherlich ist dies zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Lymphocyten morphologisch undifferenziert erscheinen und keine spezifischen Granula aufweisen. In dieser Hinsicht haben auch die in jüngster Zeit durchgeföhrten elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Zellen keine wesentlich anderen Verhältnisse geschaffen<sup>2,6-8</sup>.

Etwas eindeutiger dagegen ist die Situation hinsichtlich der Entwicklung der Lymphocyten, wo kaum Zweifel bestehen, dass zumindest die grossen Lymphocyten prä- und postnatal aus retikular-lymphatischen Vorstufen hervorgehen<sup>2,8-11</sup>. Dagegen sollen die kleinen Lymphocyten aus den mittleren und grossen durch Mitose gebildet werden<sup>3,11-13</sup>.

Im Rahmen funktionell-morphologischer Untersuchungen an den Reticulumzellen des Thymus junger Ratten konnten wir bei normalen Tieren, aber häufiger bei bestrahlten und zugleich adrenalektomierten Tieren immer wieder feststellen, dass stark basophile Rundzellen im Cytoplasma von Reticulumzellen vorkommen (Figur 1 und 2). Diese Zellen stimmen hinsichtlich ihrer Grösse und Form weitgehend mit den reifen Lymphocyten im Thymus überein. Sie unterscheiden sich aber von diesen durch die stärkere Basophilie ihres exzentrisch gelegenen Kernes, der elektronenoptisch nach Osmiumsäurefixierung aus dichtgelagerten submikroskopischen Partikeln besteht, die gewöhnlich den gesamten Kernraum ausfüllen (Figur 1). Ein Nucleolus ist nicht eindeutig zu erkennen. Bei einigen dieser Zellen wird der Kern grössten Teils nur von einem äusserst dünnen Cytoplasmamantel umhüllt (Figur 2), während bei anderen das gesamte Cytoplasma extrem seitlich des Kernes liegt, so dass auf der entgegengesetzten Seite die doppeltlamellierte Zellmembran der Kernmembran unmittelbar aufzuliegen scheint

(Figur 1). Möglich ist aber auch, dass an solchen Stellen noch keine Differenzierung in Kern- und Zellmembran vorliegt. Eindeutig konnte dies bisher nicht ermittelt werden. In dem spärlichen Cytoplasma liegen einzelne Mitochondrien, die zum Teil eine deutliche Innenstruktur haben, während bei anderen eine strukturierte Grundsubstanz von einer Membran umgeben ist. Offensichtlich handelt es sich hierbei um Promitochondrien, die noch nicht voll ausgebildet sind (Figur 1).

Das Cytoplasma der Reticulumzellen, das diese lymphoiden Zellen umgibt, lässt außer den bekannten submikroskopischen Elementen des endoplasmatischen Retikulums (Figur 1) noch mehr oder weniger stark osmiophile Strukturen erkennen, die zum Teil von einer Doppelmembran umgeben sind. Offensichtlich handelt es sich hierbei um phagocytierte Zell- bzw. Kernteile, die hier abgebaut werden. Dafür spricht in erster Linie der destruierte Charakter dieser Zelleinschlüsse (Figur 2).

Nach den bisherigen Befunden ist anzunehmen, dass es sich bei den hier ermittelten intracytoplasmatischen Zellen um Lymphocyten handelt, die sich in der Entwick-

<sup>1</sup> H. BRAUNSTEINER, J. PAERTEN und N. THUMB, Blood 13, 417 (1958).

<sup>2</sup> H. BRAUNSTEINER, *Physiologie und Physiopathologie der weissen Blutzellen* (Georg Thieme, Stuttgart 1959), p. 67.

<sup>3</sup> H. BRAUNSTEINER, R. HÖFER und S. SAILER, Dtsch. med. Wschr. 86, 721 (1961).

<sup>4</sup> K. E. FICHTELIUS, Schweiz. med. Wschr. 91, 1181 (1961).

<sup>5</sup> R. KLIMA, Schweiz. med. Wschr. 91, 1166 (1961).

<sup>6</sup> M. BESSIS, in HEILMEYER und HIRTMAYER, *Handbuch der gesamten Hämatologie* (Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1960), p. 32.

<sup>7</sup> N. GRANBOULAN, Rev. Hémat. 15, 52 (1960).

<sup>8</sup> H. KLUG, Fol. haemat., im Druck.

<sup>9</sup> A. PISCINGER, Z. Zellforsch. 40, 101 (1954).

<sup>10</sup> E. GRUNDMANN, Verh. dtsch. Ges. Path. 42, Tagg. 211 (1959).

<sup>11</sup> C. P. LEBLOND und G. SAINTÉ-MARIE, Ciba Symposium on haemopoiesis (Churchill, London 1960).

<sup>12</sup> G. SAINTÉ-MARIE und C. P. LEBLOND, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 97, 263 (1958).

<sup>13</sup> N. B. EVERETT, W. O. REINHARDT und J. M. YOFFEY, Blood 15, 82 (1960).

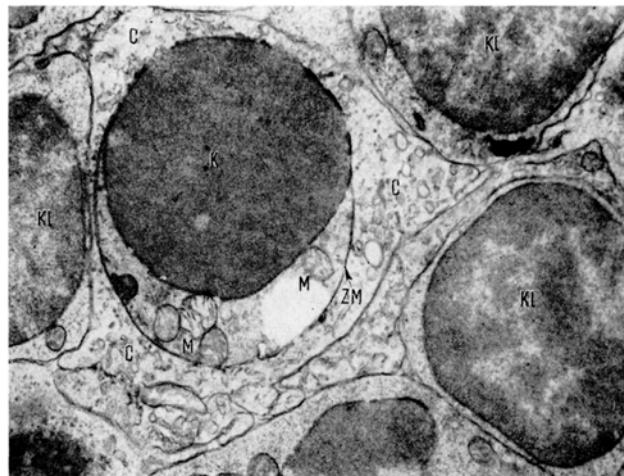


Fig. 1. Schnitt durch den Thymus einer jungen, bestrahlten und adrenalektomierten Ratte. Osmiumsäurefixierung; Vestopal W. C = Cytoplasma der Reticulumzelle; K = Kern der eingeschlossenen Zelle; KL = Kerne von reifen Lymphocyten; M = Mitochondrien; ZM = Zellmembran der eingeschlossenen Zelle; unten: Lymphocyt in Mitose. Vergrösserung 8700.

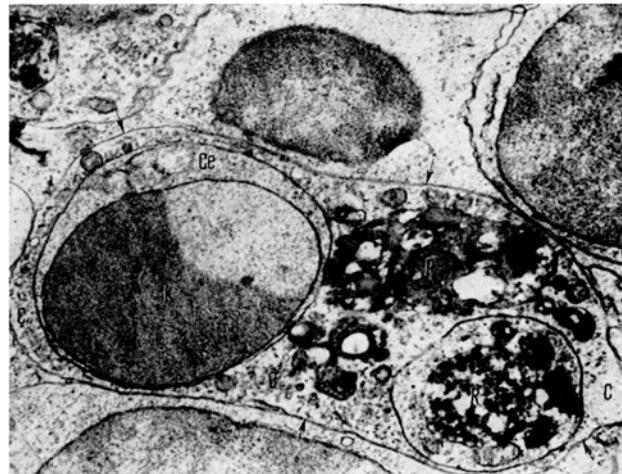


Fig. 2. Schnitt durch den Thymus einer jungen, adrenalektomierten und bestrahlten Ratte. Osmiumsäurefixierung; Vestopal W. C = Cytoplasma der Reticulumzelle; Ce = Cytoplasma der eingeschlossenen Zelle; K = Kern der eingeschlossenen Zelle; R = phagocytierte Zell- und Kernfragmente. Die Pfeile deuten auf die Zellmembran der Reticulumzelle. Vergrösserung 8700.

lung befinden. Für diese Annahme sprechen nicht nur die Morphogenese der Mitochondrien, sondern vor allem auch die Ultrastruktur des Kernes, die auf eine starke Aktivität dieses Organells schliessen lässt. Auf Grund der submikroskopischen Beschaffenheit dieser Zellen erscheint jedenfalls unwahrscheinlich, dass es sich um alte, phagozytierte Lymphocyten handelt. Demgegenüber dürfte es sich bei den osmiophilen Substanzen im Cytoplasma der Reticulumzellen um phagozytierte Kernfragmente von Lymphocyten handeln, die hier möglicherweise eine strukturelle Transformation erfahren, wobei sie einen bestimmten molekularen Abbau erfahren, um dann eine spezifische Wiederverwendung für Zellneubildungen zu finden. Ob dies tatsächlich der Fall ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Eine derartige «endoplasmatische» Bildung von Lymphocyten in den Reticulumzellen wäre ein ganz neuartiges Phänomen der Zellbildung. Mit dieser Deutung der hier angeführten Befunde stimmt weitgehend die von TROWELL aufgestellte Hypothese überein, wonach jene Reti-

culumzellen, welche Lymphocyten phagozytieren, sich selbst zu diesen Zellen umwandeln<sup>14</sup>. Weitere umfangreiche Untersuchungen sind im Gange.

*Summary.* The incidence of lymphoid cells in the cytoplasm of thymus reticulum cells of white rats will be reported. The localisation of these cells has been clearly demonstrated by the electron-microscope. We regard them as immature lymphocytes apparently formed in the cytoplasm of reticulum cells, certain compounds of phagocytised cellular and nuclear fragments of dead lymphocytes being used in this process.

H. KLUG

Universitäts-Geschwulstklinik der Charité, Berlin (Deutschland), 26. Februar 1962.

<sup>14</sup> O. A. TROWELL, J. biophys. biochem. Cytol. 3, 317 (1957).

### Lipids of Epiphyseal Cartilage

The main organic and inorganic compounds of epiphyseal cartilage have been previously described and widely reported by BOURNE<sup>1</sup>, MEYER<sup>2</sup>, CARTIER<sup>3</sup>, ZAMBOTTI<sup>4</sup>, POLONOWSKI<sup>5</sup>, PICARD<sup>6</sup>, and DULCE<sup>7</sup>. Correlations between general metabolic pathways of epiphyseal cartilage and mineralization have been discussed by ZAMBOTTI<sup>4,8</sup>. The presence of lipids and phospholipids in cartilage has been shown histochemically by BORGHESE<sup>9</sup>. Although TINACCI et al.<sup>10</sup> have envisaged, in the histochemical way also, in different types of cartilage (epiphyseal, costal etc.) the presence of triglycerides, cholesterol and phospholipids, no qualitative and quantitative analyses have as yet been carried out to determine the nature and composition of lipids of epiphyseal cartilage.

In order to analyze the lipids in cartilage, we started pooling epiphyseal plates of newborn pigs. Cartilage (fresh or stored at  $-30^{\circ}\text{C}$ ) was homogenized in 'Virtis' 45 in cold water ( $0^{\circ}\text{C}$ ), during 30 min. The homogenate was frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  and dried in a freezing apparatus keeping the plate temperature at  $10^{\circ}\text{C}$  and the pressure at 0.1 mm Hg.

Tab. I. Lipids, total and lipidic phosphorus, total nitrogen, total and free cholesterol of epiphyseal cartilage from new born pigs (average data from 5 analyses)

| Analyzed compounds | % of the weight of the freeze-dried tissue | Remarks  |
|--------------------|--|--|
| Extracted lipids   | 6.60%                                      | 2% referred to fresh tissue                    |
| Total phosphorus   | 3.3%                                       | determined on 20 mg of freeze-dried homogenate |
| Lipidic phosphorus | 0.70%                                      | determined on 32 mg of freeze-dried homogenate |
| Total nitrogen     | 8.37%                                      | determined on 34 mg of freeze-dried homogenate |
| P/N                | 0.38%                                      |  |
| Total cholesterol  | 0.35%                                      | determined on 32 mg of freeze-dried homogenate |
| Free cholesterol   | 0.14%                                      | determined on 30 mg of freeze-dried homogenate |

The loss of water was 79% (average values calculated by difference in weight between fresh and freeze dried tissue). On the freeze dried homogenate we determined total nitrogen with Kjeldahl method, total phosphorus as suggested by ALLEN<sup>11</sup> and total lipids extracted with methanol and chloroform (1:2) after purification from non-lipid material on a column of powdered cellulose (BÖTTCHER et al.<sup>12</sup>).

Purified lipid extract was divided in three samples (A, B, C). Lipidic phosphorus was determined in sample A with ALLEN method<sup>11</sup>, free and total cholesterol in sample B with SPERRY and WEBB method<sup>13</sup>, fatty acids by gas-chromatography<sup>14</sup> in sample C after saponification and methylation as worked out by BÖTTCHER et al.<sup>12</sup>.

In Table I and II average data of five analyses carried out on 36 g of cartilage are shown. In addition to the data reported on Table II, there are small amounts of other fatty acids.

Our findings do not allow considerations on specific functions of these compounds<sup>15</sup>. TINACCI and CIONI<sup>10</sup> suggested that synthesis of phospholipids could take place in epiphyseal cartilage, where they are interesting as dynamic rather than depot factors. Our purpose will be to carry out

<sup>1</sup> G. H. BOURNE, in *Biochemistry and Physiology of Bone* (Academic Press Inc., New York 1956), p. 297.

<sup>2</sup> K. MEYER, E. DAVIDSON, A. LINKER, and P. HOFFMAN, Biochem. biophys. Acta 21, 506 (1956).

<sup>3</sup> P. CARTIER, C. R. Soc. Biol. 144, 331 (1950).

<sup>4</sup> V. ZAMBOTTI, Sci. med. ital. (Ed. franc.) 5, 611 (1957).

<sup>5</sup> J. POLONOWSKI, VIes Journées Biochimiques Latines, Genève, 25 au 28 mai 1961, Rapports (Ed. Médecine et Hygiène, Genève 1961), p. 31.

<sup>6</sup> J. PICARD, VIes Journées Biochimiques Latines, Genève, 25 au 28 mai 1961, Résumé (Ed. Médecine et Hygiène, Genève 1961), p. 66.

<sup>7</sup> H. J. DULCE, Hoppe Seyler's Z. 319, 257 (1960).

<sup>8</sup> V. ZAMBOTTI, Suppl. 1° a Reumatismo (1960).

<sup>9</sup> E. BORGHESE, Z. Zellforschung 25, 622 (1936).

<sup>10</sup> F. TINACCI and P. CIONI, Boll. Soc. Ital. Biol. sperim. 20, 1092 (1960).

<sup>11</sup> R. J. L. ALLEN, Biochem. J. 34, 858 (1940).

<sup>12</sup> C. J. F. BÖTTCHER, F. P. WOODFORD, E. BOELSMA-VAN HOUTE, and C. M. VAN GENT, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 794 (1959).

<sup>13</sup> W. M. SPERRY and M. WEBB, J. biol. Chem. 187, 97 (1950).

<sup>14</sup> The authors are greatly indebted to Prof. KLENK for the provision of certain fatty acid unsaturated esters ( $C_{20}-C_{22}$ ).