

## Frühveränderungen in der proximalen Femurepiphyse nach experimenteller Blutkreislaufstörung\*

G. BENEKE und N. DEUTSCHLE

Pathologisches Institut der Justus Liebig-Universität Gießen  
(Direktor: Prof. Dr. W. SANDRITTER)

Eingegangen am 30. Juli 1967

### *Early Changes in the Proximal Epiphysis of the Femur after Experimental Interruption of the Blood Circulation*

**Summary.** The blood circulation of the proximal femoral epiphysis was interrupted in young and old rabbits by cutting either the lig. cap. fem. or the str. synoviale, or by cutting both. Only the young animals (not the old) displayed pathological changes in the articular cartilage and epiphysis. The epiphyseal cartilage was not damaged. The articular cartilage became widened because of damage of cells in the deeper layer of cartilage. The cellular damage led to a release of lysosomes and hence to degradation and edema of the intercellular substance. Only very small foci of regeneration could be seen emanating from the regions of the damage. In addition, the disturbance of circulation in the epiphysis led to a necrosis of the bone marrow and to localised bone-necrosis. A regeneration of the bone began relatively soon. Thus, degenerative and regenerative processes took place simultaneously.

**Zusammenfassung.** An jungen und alten Kaninchen wurde experimentell eine Blutkreislaufstörung (Durchtrennung des Lig. cap. fem. allein, Durchtrennung des Str. synoviale allein, Durchtrennung von Lig. cap. fem. und Str. synoviale) erzeugt. Nur die jungen Tiere, nicht aber die alten, zeigten pathologische Veränderungen des Gelenkknorpels und der knöchernen Epiphyse. Der Epiphysenfugenknorpel wurde nicht geschädigt. Der Gelenkknorpel wird unter dem Einfluß der Kreislaufstörung verbreitert. Ursache dafür ist eine Knorpelzellschädigung in den tieferen Knorpelschichten. Sie führt wahrscheinlich über die Freisetzung lysosomaler Fermente zu einer Degradation und damit zu einem Ödem der Intercellularsubstanz. Nur vereinzelt sind Regenerate vom Schädigungsgebiet ausgehend zu beobachten. In der knöchernen Epiphyse kommt es zur Knochenmarksnekrose und zur herdförmigen Knochennekrose. Relativ früh setzt aber schon wieder eine Knochenneubildung ein. Dadurch verlaufen degenerative und regenerative Prozesse in der knöchernen Epiphyse zeitlich weitgehend nebeneinander ab.

Die Osteochondritis deformans coxae (*Legg-Calvé-Perthesche Krankheit*) wird heute im allgemeinen als Folge einer Kreislaufstörung in der kindlichen proximalen Femurepiphyse angesehen. Welcher Art diese Kreislaufstörungen sind, kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Über die frühesten Stadien der Erkrankung ist bisher wenig bekannt, da meist nur pathologisch-anatomische Untersuchungen in fortgeschrittenen Stadien vorliegen. Es fehlte nicht an Bemühungen perthesähnliche Bilder im Tierexperiment zu erzeugen. Sie wurden teils durch Kreislaufunterbrechungen der Gefäße im Ligamentum capitatis femoris (L.c.f.) und der lateralen Epiphysengefäße, teils durch massive Traumen hervorgerufen (MÜLLER, 1924; NUSSBAUM, 1924; ZEMANN SKY und LIPP MANN, 1929; CORDES, 1930; RANDLOV-MADSEN, 1949). Die hierbei erhobenen Befunde können jedoch aufgrund verschiedener Versuchs anordnungen, Versuchsdauer und unterschiedlichen Tiermaterials nicht einheitlich beurteilt werden.

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

In den vorliegenden Untersuchungen sollten an den proximalen Femurepipophysen junger und alter Kaninchen folgende Fragen geklärt werden:

Welche Veränderungen treten

1. am Gelenkknorpel,
2. an der spongiösen Epiphyse und
3. am Epiphysenfugenknorpel (nur junger Kaninchen)

des Oberschenkelkopfes junger und alter Kaninchen nach experimenteller epiphysealer Kreislaufstörung auf und in welcher Weise sind sie von Grad und Dauer der Kreislaufstörung abhängig?

### Material und Methode

Die Versuche wurden an 27 jungen und 15 alten Kaninchen (durchschnittliches Gewicht 1,3 bzw. 3,7 kg) verschiedener Rassen, weiblichen und männlichen Geschlechts durchgeführt. Bei allen jungen Kaninchen war der Epiphysenfugenknorpel des Oberschenkelkopfes vollständig ausgebildet, bei den alten Tieren war er entweder nur noch in Resten vorhanden oder nicht mehr nachweisbar.

Die Tiere wurden in insgesamt 6 Versuchsgruppen eingeteilt (Tabelle 1). Bei den Tieren der Versuchsgruppen 1 und 4 wurde nur das L.c.f. und die in ihm verlaufenden Gefäße, bei den Tieren der Versuchsgruppen 2 und 5 wurde nur das Stratum synoviale des Schenkelhalses mit seinen Gefäßen und bei den Tieren der Versuchsgruppen 3 und 6 das L.c.f. und das Stratum synoviale gleichzeitig durchtrennt. Diese Operation wurde immer nur an einem Hüftgelenk vorgenommen und das andere zur Kontrolle unversehrt gelassen.

*Tabelle 1. Zusammenstellung der Versuchsgruppen, der Anzahl der untersuchten Tiere, der Versuchsbedingungen und der Versuchszeit*

Ver- suchs- gruppe	Zahl der Tiere	Operation	Tag der Tötung nach der Operation
<b>Junge Tiere</b>			
1 A	5	Durchtrennung des L.c.f.	3
1 B	3		14
2 A	3	Durchtrennung des Str.syn.	3
2 B	5		14
3 A	4	Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3
3 B	5		14
3 C	2		30
<b>Alte Tiere</b>			
4 A	4	Durchtrennung des L.c.f.	3
4 B	3		14
5 A	4	Durchtrennung des Str.syn.	3
6 A	4	Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3

Zur Durchtrennung von L.c.f. und Stratum synoviale wurde die Gelenkkapsel von der Beugeseite her unter Schonung der Muskulatur und der größeren Blutgefäße operativ freigelegt. Das L.c.f. konnte nach Eröffnung der Gelenkkapsel durch einen ca. 3—4 mm langen Schnitt parallel zum Labium acetabulare unter geringer Abduktion des Oberschenkels mit einem feinen Skalpell durchschnitten werden. Das Stratum synoviale mit seinen Gefäßen ließ sich mit einem sichelförmig geschliffenen Skalpell bei gleichzeitiger Rotation im Hüftgelenk durch einen zirkulären Schnitt am Übergang des Oberschenkelkopfes zum Schenkel-

hals durchtrennen. Nach Verschluß der Operationswunde erhielten die Tiere 30000 IE/kg Cardomyocel ad us. vet.

Die Tiere wurden am 3., 14. oder 30. Tag nach der Operation getötet und sowohl das operierte Hüftgelenk wie auch das der Kontrollseite in 4%iger gepufferter Formalinlösung nach LILLIE (1954) fixiert. Nach Entkalkung mit 5%iger Salpetersäure, Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Paraffineinbettung wurden 7  $\mu$  dicke Schnitte angefertigt und zur histologischen Beurteilung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Von Präparaten einzelner Fälle wurden Alcianblaufärbungen (STEEDMAN, 1950), PAS-Reaktionen (nach Angaben von KISZELY und POSALAKY, 1964) und Färbungen mit gepufferten sauren und basischen Farbstoffen (PISCHINGER, 1926, 1927) angefertigt. Es war darauf zu achten, daß die Schnitte sowohl durch den Trochanter major als auch durch den Bereich der Fovea führten, um bei allen Präparaten die gleiche Schnittebene beurteilen zu können.

Nach Feststellung des mikroskopischen Befundes wurden an den Schnitten folgende Messungen vorgenommen.

### 1. Messungen am Gelenkknorpel

a) *Messung der Gelenkknorpelbreite.* Mit einem Meßocular wurden bei ca. 60facher Vergrößerung an 17—20 verschiedenen Stellen die Dicke des Gelenkknorpels (obere Begrenzung: Gelenkflächenrand; untere Begrenzung: Eröffnungszone; Meßstrecke: senkrecht zur Knorpeloberfläche) ermittelt.

b) *Messung der Zellzahl pro Gelenkknorpelflächeneinheit.* Bei einem Tier der Gruppe 2b und 2 Tieren der Gruppe 3b wurden im histologischen Schnitt die Anzahl der Knorpelzellen pro Flächeneinheit bestimmt (Mikrofotos von verschiedenen Stellen des Gelenkknorpels, die jeweils die gesamte Knorpelschichtdicke erfaßten).

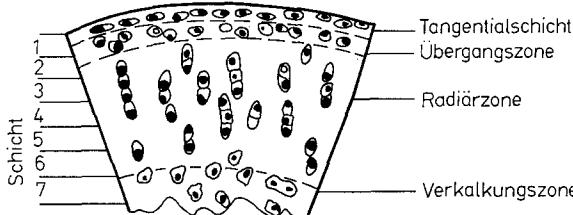


Abb. 1. Schema der Einteilung des Gelenkknorpels in sieben gleich breite Schichten (links) gegenübergestellt der anatomischen Einteilung (rechts)

c) *Messung der Knorpelzellkerngröße in verschiedenen Schichten des Gelenkknorpels.* Dazu wurde der Gelenkknorpel in 7 gleich breite Schichten unterteilt (Abb. 1; Schicht 1 beginnt am Gelenkflächenrand, Schicht 7 endet an der Eröffnungszone) und in jeder Schicht die durchschnittliche Fläche der Knorpelzellkerne bestimmt. Dazu wurden einzelne Zellen bei starker Vergrößerung ( $800\times$ ) fotografiert und auf den nochmals nachvergrößerten Positiven mit Hilfe eines Planimeters die Zellkernfläche gemessen. Die tatsächliche Kernfläche läßt sich unter Berücksichtigung der Gesamtvergrößerung mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors aus den Planimetereinheiten errechnen.

d) *Messung des DNS-Gehaltes der Knorpelzellkerne.* 10  $\mu$  dicke Schnitte des operierten und gesunden Oberschenkelkopfes eines Tieres der Versuchsgruppe 2 wurden nach FEULGEN und mit Fastgreen pH 8,1 (ALFERT und GESCHWIND, 1953) gefärbt und mit Hilfe des integrating Microdensitometer nach DEELEY der Fa. Barr & Stroud, London, der relative DNS- und der Histongehalt der Knorpelzellkerne der Schichten 1 und 6 des Gelenkknorpels cytofotometrisch gemessen. Aus den gemessenen Werten wurde der Feulgen-Fastgreen-Quotient (WALB und SANDRITTER, 1964) berechnet.

### 2. Messungen an der knöchernen Epiphyse

Zur Objektivierung möglicher Veränderungen der Knochenspongiosa wurde versucht, bei allen Tieren der Gruppe 1a—3b die Knochenbälkchenfläche im histologischen Schnitt zu bestimmen. Dazu wurde ein Areal bestimmter Größe aus der Epiphyse fotografiert; die

Negative wurden verzerrungsfrei mit Hilfe eines Projektors vergrößert und von den projizierten Knochenbälkchen Nachzeichnungen angefertigt. Die gezeichneten Knochenbälkchen wurden planimetriert und die ermittelten Werte bei bekanntem Vergrößerungsmaßstab auf die realen Flächenwerte umgerechnet.

### *3. Messungen am Epiphysenfugenknorpel*

Um mögliche Wachstumsstörungen im Bereich des Epiphysenfugenknorpels zu objektivieren, wurde nach der Methode der Gelenkknorpeldickenmessung die durchschnittliche Breite des Fugenknorpels der jungen Tiere (Gruppen 1a—3c) bestimmt.

Um Unterschiede in den Versuchsergebnissen abzusichern, wurde die statistische Streuung der Mittelwerte berechnet und der *t*-Test angewendet (angewendete Formeln nach WEBER, 1961).

### **Ergebnisse**

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in Befunde am Gelenkknorpel, an der knöchernen Epiphyse und am Epiphysenfugenknorpel unterteilt.

#### *Befunde am Gelenkknorpel*

Bereits bei Betrachtung der mikroskopischen Präparate fiel auf, daß bei jungen Kaninchen (Gruppen 1a—3c) der Gelenkknorpel des Oberschenkelkopfes, dessen epiphysealer Kreislauf operativ geschädigt wurde, dicker ist als auf der unversehrten Seite. Dieser subjektive Eindruck ließ sich durch Messungen objektivieren. In Abb. 2 werden die durchschnittlichen *Gelenkknorpeldicken* kreislaufgeschädigter Oberschenkelköpfe bei allen jungen und alten Tieren den Knorpeldicken der nichtgeschädigten Kontrollseiten gegenübergestellt. Nur bei *jungen Tieren* (Gruppen 1a—3c) sind die Gelenkknorpel der operierten Hüftköpfe durchweg dicker als die der nichtoperierten. Das Ausmaß der Dickenzunahme ist sowohl vom Grad als auch von der Dauer der Kreislaufschädigung abhängig.

Wird lediglich die Blutzufuhr zur Epiphyse durch die Gefäße im L.c.f. unterbrochen (Gruppen 1a und b), so verdickt sich der Gelenkknorpel geringfügig um 19% nach 3 Tagen bzw. 17,5% nach 14 Tagen. Eine Unterbrechung der Blutzufuhr durch die im Stratum synoviale verlaufenden Gefäße (Gruppen 2a und b) führt zu einer Dickenzunahme von 25,3% nach 3 Tagen bzw. 32,9% nach 14 Tagen. Die deutlichste Knorpelverdickung kann bei den Tieren der Gruppen 3a bis 3c beobachtet werden, bei denen die Versorgung der Epiphyse durch die Ligamentgefäße und die Gefäße im Stratum synoviale gleichzeitig geschädigt wurde. Die Dickenzunahme beträgt hier 21,9% nach 3 Tagen, 52,6% nach 14 Tagen und 99,6% nach 30 Tagen. Die statistischen Berechnungen ergaben, daß sich die Meßwerte, die an den Gelenkknorpel geschädigter Oberschenkelköpfe gewonnen wurden, immer in statistisch signifikanter Weise von den Meßwerten der Kontrollseiten unterscheiden (Tabelle 2).

Dagegen verdickte sich bei *alten Tieren* der Gelenkknorpel am operierten Hüftgelenk im Vergleich zur jeweiligen Kontrollseite nicht.

Es ergab sich damit die Frage, ob die Knorpelverdickung durch einen Wachstumsprozeß hervorgerufen oder Folge degenerativer Veränderungen ist. Zunächst wurde zur Klärung dieser Frage die *Zellzahl im Gelenkknorpel* ermittelt. Im Vergleich zum Knorpel des nichtoperierten Hüftgelenkes nimmt bei Auszählung eines Streifens, der jeweils die gesamte Knorpelbreite erfaßt, die Zahl der Zellen im Knorpel des operierten Hüftgelenkes absolut ab.

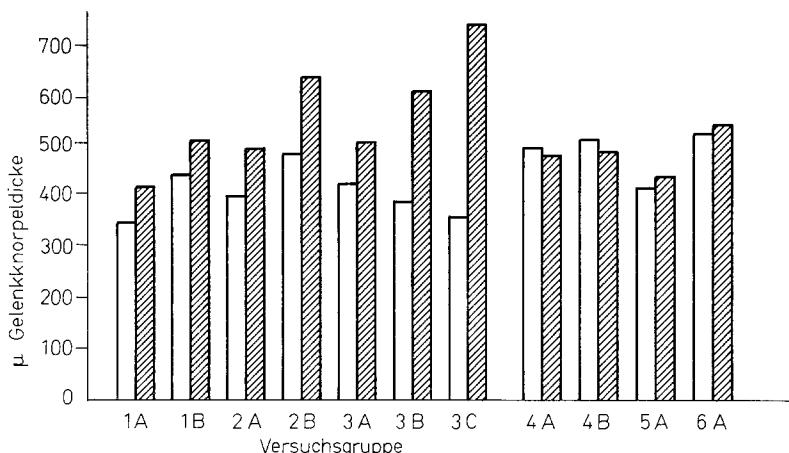


Abb. 2. Grafische Darstellung der durchschnittlichen Gelenkknorpeldicken. Schraffierte Flächen: Gelenkknorpeldicken kreislaufgeschädigter Oberschenkelköpfe; weiße Flächen: Gelenkknorpeldicken nichtgeschädigter Oberschenkelköpfe zum Vergleich

Versuchsgruppe	Alter der Versuchstiere	Versuchsbedingungen	Versuchszeit (Tage)
1 A		Durchtrennung des L.c.f.	3
1 B			14
2 A	junge Tiere	Durchtrennung des Str.syn.	3
2 B			14
3 A		Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3
3 B			14
3 C			30
4 A	alte Tiere	Durchtrennung des L.c.f.	3
4 B			14
5 A		Durchtrennung des Str.syn.	3
6 A		Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3

Dieser Befund spricht bereits gegen ein experimentell ausgelöstes Knorpelwachstum und für einen Untergang von Knorpelzellen. Da sich aber der Knorpel absolut verdickt (vgl. Abb. 2; Tabelle 2), muß die Dickenzunahme auf einer Vergrößerung des Interstitialvolumens beruhen.

In weiteren Untersuchungen sollte nun geklärt werden, in welcher Schicht des Gelenkknorpels sich im wesentlichen diese Veränderungen vollziehen. Dies war nur möglich durch Bestimmung der Zellzahl pro Flächeneinheit in den verschiedenen Knorpelschichten (Abb. 3). Dabei zeigte sich, daß in den gelenkspaltnahmen Knorpelschichten die Zahl der Knorpelzellen pro Flächeneinheit auch nach experimenteller Schädigung gegenüber den Kontrollseiten gleichbleibt. In den tiefen Knorpelschichten ist jedoch die Zellzahl pro Flächeneinheit gegenüber den Kontrollen erheblich vermindert.

Diese relative Verschiebung hat zwei Ursachen:

1. eine absolute Vermehrung des Interstitialsubstanzvolumens, da der Knorpel absolut breiter wird (vgl. Abb. 2; Tabelle 2);

Tabelle 2. Gelenkknoepfendicke von normalen und experimentell geschädigten Hüftgelenkköpfen

Operation	Versuchs-zeit in Tagen	Operierte Hüfte	Gesunde Hüfte zum Vergleich		$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ in $\mu$	Dicke-zunahme %	$t_{\text{Tab.}}$	$t_{\text{Tab.}}$	$f$	$\alpha$
			$\bar{x}_1$ der Gelenk-knochen-dicke in $\mu$	$N$						
Durchtrennung des L.c.f.	3 14	406,1 501,6	88 55	341,3 426,9	89 51	64,8 74,7	19,0 17,5	4,000 5,895	2,58 2,63	175 104
Durchtrennung des Str.syn.	3 14	487,6 621,6	57 95	389,1 467,4	53 74	98,5 154,2	25,3 32,9	3,794 7,117	2,63 2,59	108 167
Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3 14 30	493,3 589,3 706,3	80 94 60	404,6 386,2 353,8	75 102 62	88,7 203,1 352,5	21,9 52,9 99,6	4,476 12,460 18,667	2,60 2,58 2,62	153 194 120

$\bar{x}$  = Mittelwert;  $N$  = Anzahl der Messungen;  $t_{\text{Tab.}}$  = Berechneter  $t$ -Wert;  $t_{\text{Tab.}} =$  Abgelesener  $t$ -Wert;  $f$  = Freiheitsgrad;  $\alpha$  = Irrtumswahrscheinlichkeit.

2. eine absolute Verminderung der Zellzahl, da die Zellzahl in der gesamten Knorpelbreite abnimmt.

Diese Zellzahlverminderung erfolgt über *degenerative Zellveränderungen*. Während bei verdicktem Gelenkknorpel die Knorpelzellen in der Nähe des

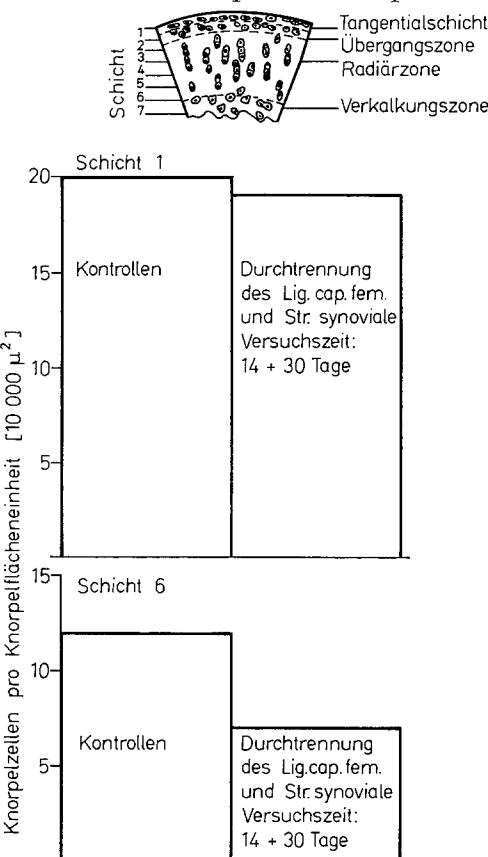


Abb. 3. Vergleich der Knorpelzellzahl pro Flächeneinheit in den oberflächlichen (Schicht 1) und tieferen (Schicht 6) Gelenksknorpelschichten beim normalen und experimentell geschädigten Gelenkknorpel

Gelenkspaltes stets in normaler Dichte zusammen liegen und unverändert angetroffen werden (Abb. 4), lässt sich in allen tiefen Knorpelschichten eine Degeneration feststellen. In weniger stark verdickten Gelenkknorpeln ist die Zelldegeneration nur in tiefen Knorpelschichten anzutreffen. Bei den stark verdickten Knorpeln beginnt sie dagegen schon in der Radiärzone und nimmt in mittleren und tieferen Knorpelschichten stärkere Ausmaße an. Die Zellen verlieren ihre typische strukturelle Ausrichtung. Die Zellkerne sind klein, geschrumpft und erscheinen hyperchromatisch (Abb. 4). Bei maximaler Verdickung des Knorpels können herdförmige Nekrosen beobachtet werden. Die Zellgrenzen sind verwischt, die Kerne meist nur schattenhaft erkennbar. Dazwischen liegen vereinzelt teils runde, teils ovale Knorpelzellnester, die Regeneraten erhalten gebliebener Knorpelzellen entsprechen (Abb. 5).

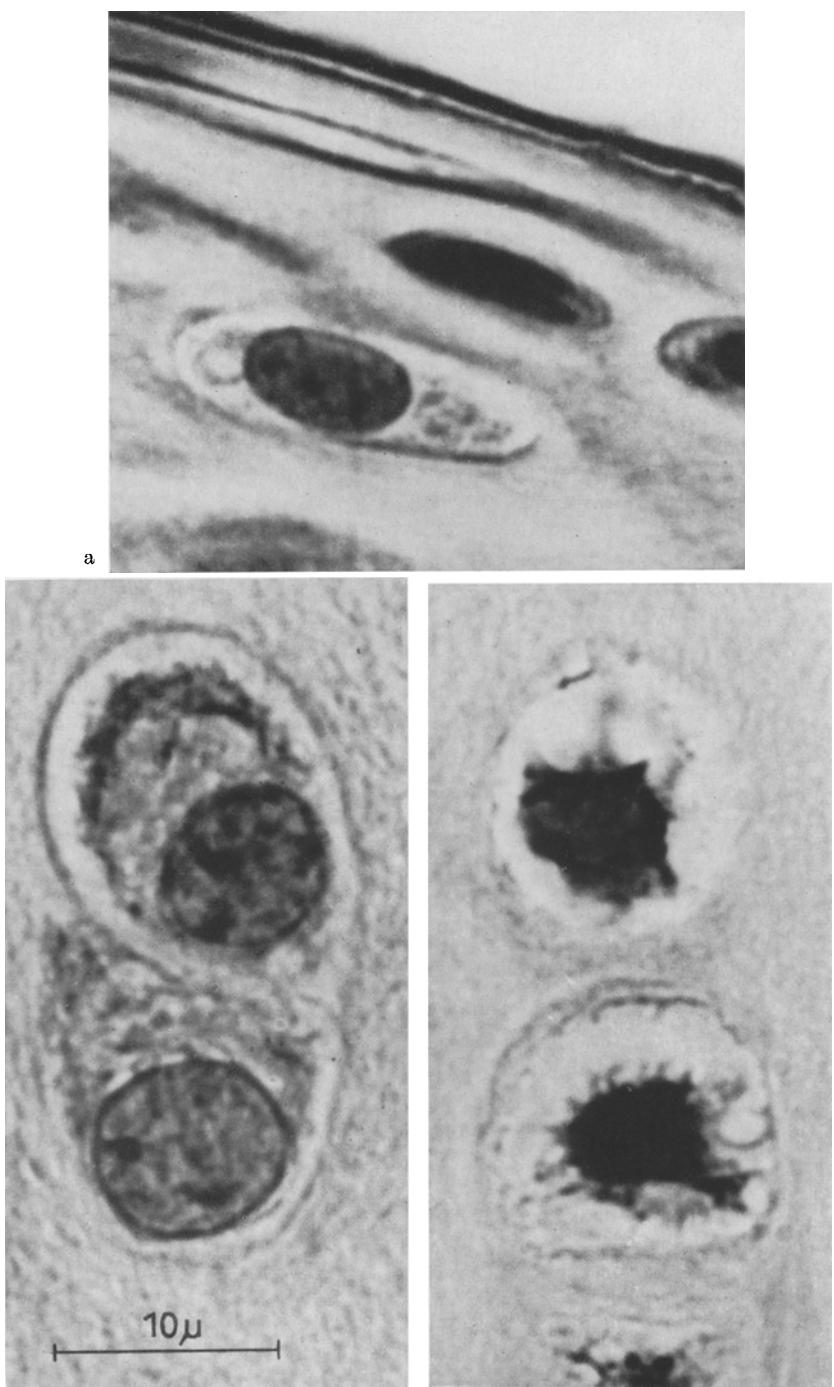


Abb. 4a—c. Knorpelzellen in den verschiedenen Schichten des Gelenkknorpels normaler und experimentell geschädigter Femurepiphysen. Versuchsbedingungen: Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn. Versuchszeit: 14 Tage. Färbung: H.-E. a Knorpelzellen an der Oberfläche des Gelenkknorpels (Schicht 1; vgl. Abb. 1) von normalen und experimentell geschädigten Femurepiphysen. b Knorpelzellen in den tiefen Schichten des Gelenkknorpels (Schicht 6; vgl. Abb. 1) von normalen Femurepiphysen. c Knorpelzellen in den tiefen Schichten des Gelenkknorpels (Schicht 6; vgl. Abb. 1) von experimentell geschädigten Femurepiphysen

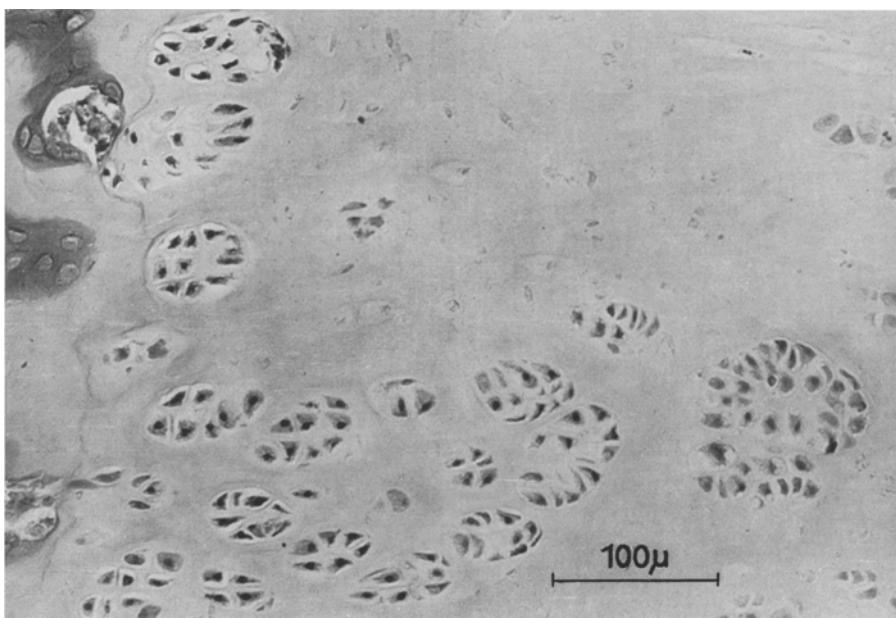


Abb. 5. Herdförmige Knorpelnekrosen (obere rechte Bildhälfte) und Knorpelzellregenerate (untere und linke Bildhälfte) in der Umgebung. Versuchszeit: 30 Tage. Versuchsbedingungen: Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn., Färbung: H.-E.

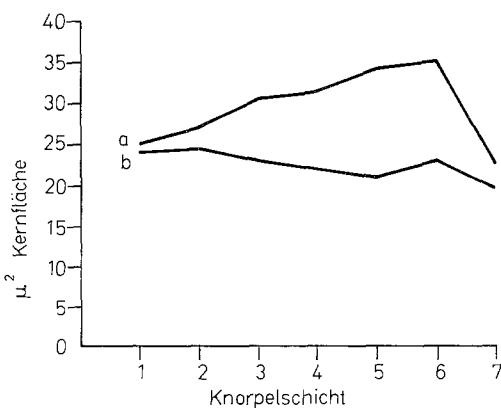


Abb. 6. Darstellung der mittleren (Mittelwert von 50 Einzelmessungen) Zellkernflächen in den Gelenkknorpelschichten 1—7 (vgl. Abb. 1). Kurve a: Kernflächen bei nichtgeschädigten Epiphysen. Kurve b: Kernflächen bei kreislaufgeschädigten Epiphysen. Versuchsbedingungen: Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn. Versuchszeit: 14 Tage

Wie an Serienschnitten ermittelt werden konnte, haben diese Regenerate keine Beziehung zu den oberflächlichen Zellschichten des Gelenkknorpels. Sie sind in der Tiefe unmittelbar oberhalb der Verkalkungszone lokalisiert (Abb. 5) und befinden sich in der Nachbarschaft vollständig nekrotischen Knorpelgewebes.

Diese subjektiv ermittelten Zellkernveränderungen ließen sich durch Messungen der Zellkernflächen in den verschiedenen Knorpelschichten objektivieren. Bei normalem Gelenkknorpel junger Tiere beträgt die durchschnittliche Zellkern-

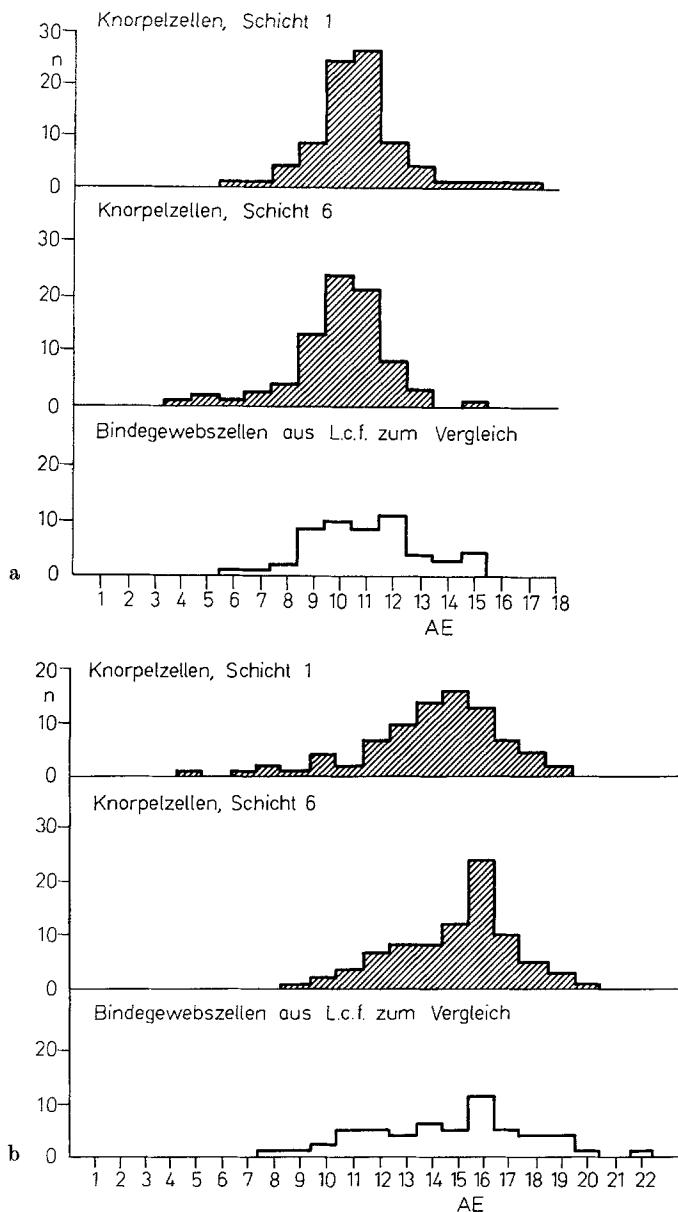


Abb. 7 a u. b. Grafische Darstellung der Meßergebnisse (A.E.) von feulgengefärbten Knorpelzellkernen in oberflächlichen und tiefen Schichten des Gelenkknorpels (Schicht 1 und 6; vgl. Abb. 1) verglichen mit diploiden Bindegewebzellen. AE: Arbeitseinheiten. a Meßergebnisse am normalen Gelenkknorpel. b Meßergebnisse am experimentell geschädigten Gelenkknorpel. Versuchsbedingungen: Durchtrennung des Str.syn. Versuchszeit: 14 Tage

fläche in Schicht 1  $25 \mu^2$ . Mit wachsendem Abstand von der Gelenkoberfläche nimmt die durchschnittliche Kernfläche ständig zu, erreicht ein Maximum von  $35 \mu^2$  in Schicht 6 und nimmt in Schicht 7 wieder Werte unter  $25 \mu^2$  an (Abb. 6,

Kurve a). An pathologisch verdickten Gelenkknorpeln geschädigter Oberschenkelköpfe haben die Zellkerne in Schicht 1 den gleichen Wert von  $25 \mu^2$  Kernfläche wie in Schicht 1 des normalen Gelenkknorpels. In den tieferen Knorpelschichten sind jedoch (besonders Schicht 6) die Knorpelzellkerne deutlich kleiner als in den vergleichsweise untersuchten Kontrollen (Abb. 6, Kurve b).

Diese Zellkernveränderungen sind nicht durch eine DNS-Verminderung bedingt. Sowohl im Gelenkknorpel des kreislaufgeschädigten Oberschenkelkopfes als auch im Gelenkknorpel des nichtgeschädigten Oberschenkelkopfes ist der DNS-Gehalt der Knorpelzellen in Schicht 1 und 6 gleich groß und entspricht dem DNS-Gehalt der diploiden Bindegewebszellen im L.c.f. (Abb. 7a und b). Bei der Fastgreenfärbung (pH 8,1) waren in der Schicht 6 des Gelenkknorpels bei kreislaufgeschädigten Oberschenkelköpfen in den Zellkernen etwa doppelt so hohe Werte meßbar als bei den Kontrollen. Dadurch ergab sich ein Feulgen (AE)-Fastgreen (AE)-Quotient von 2,7 für die Knorpelzellkerne in den ungeschädigten und von 1,1 in den geschädigten Gelenkknorpeln. Diese Zellkernveränderungen müssen daher aufgrund der dargestellten Befunde als frühe Form der Pyknose aufgefaßt werden.

Weitere Hinweise über die Ursache der Gelenkknorpelverdickung gab die Beurteilung der Intercellularsubstanz in den tiefen Knorpelschichten. Bei Kontrolltieren kann in diesen Knorpelschichten eine deutliche Färbung mit Alcianblau gefunden werden, und der basische Farbstoff Methylenblau wird bis zu pH 1,5 gebunden. Dadurch lassen sich reichlich Säuregruppen (der sauren MPS) in der Intercellularsubstanz nachweisen. Bei den Tieren mit stark verbreiterten Gelenkknorpeln war die Alcianblaufärbung in den entsprechenden Knorpelschichten deutlich schwächer und eine Bindung des Methylenblaus erst ab pH 5 zu erreichen. Die Verbreiterung konnte somit nicht durch eine Vermehrung der sMPS in der Intercellularsubstanz zustande gekommen sein. Vielmehr sprechen die Befunde für eine Konzentrationsabnahme der basophilen Substanz (sMPS) in der Intercellularsubstanz.

#### *Befunde an der spongiösen Epiphyse*

Wie auch beim Gelenkknorpel fanden sich histologisch erfaßbare pathologische Veränderungen im Knochenmark, im Bereich der Osteoblastensäume und der Spongiosabälkchen nur bei jungen Tieren. Darüber hinaus sind die Veränderungen von den Versuchsbedingungen abhängig. Wird nämlich das L.c.f. durchtrennt, dann findet man keine pathologischen Veränderungen in der knöchernen Epiphyse. Erst bei alleiniger Durchtrennung des Stratum synoviale oder bei gleichzeitiger Durchtrennung des L.c.f. und Stratum synoviale treten Veränderungen hervor, die in ihrer Intensität von der Versuchszeit abhängig sind. Bereits nach einer Versuchszeit von 3 Tagen, deutlicher noch nach 14 Tagen, findet man ausgedehnte Nekrosen des Knochenmarks (Abb. 8b). An den Spongiosabälkchen fehlen die Osteoblasten (vgl. Abb. 8a und b). Die Osteocyten haben ihre lockere Kernstruktur verloren und sind kleiner und pyknotisch geworden (vgl. Abb. 8a und b). Einzelne Osteocyten sind nicht mehr nachweisbar.

Während nach einer 14tägigen Versuchszeit die nekrotischen Veränderungen in den Knochenbälkchen weiter fortgeschritten sind, setzen bereits regeneratorische Prozesse ein. Im Winkel zwischen Epiphysenfugenknorpel und Gelenk-

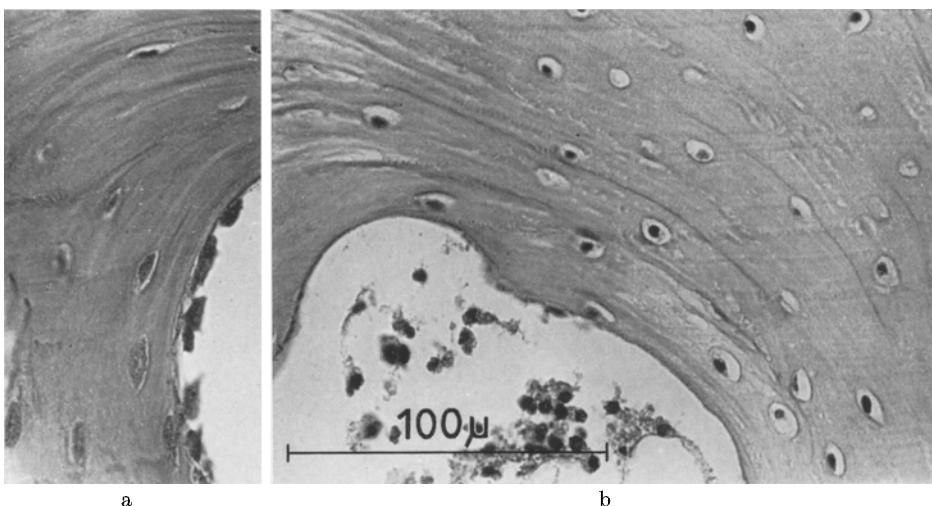


Abb. 8a u. b. Mikroskopische Veränderungen im Bereich der knöchernen Epiphyse. Färbung: H.-E. a Ausschnitt von der Knochenspongiosa bei einem Kontrolltier. Deutlich erkennbarer Osteoblastensaum. Im Knochenbalkchen Osteocyten mit locker strukturierten Zellkernen. b Nekrose des Knochenmarkes. Fehlender Osteoblastensaum um die Knochenbalkchen. Pyknose oder Fehlen der Osteocytenkerne. Versuchsbedingungen: Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn. Versuchszeit: 14 Tage

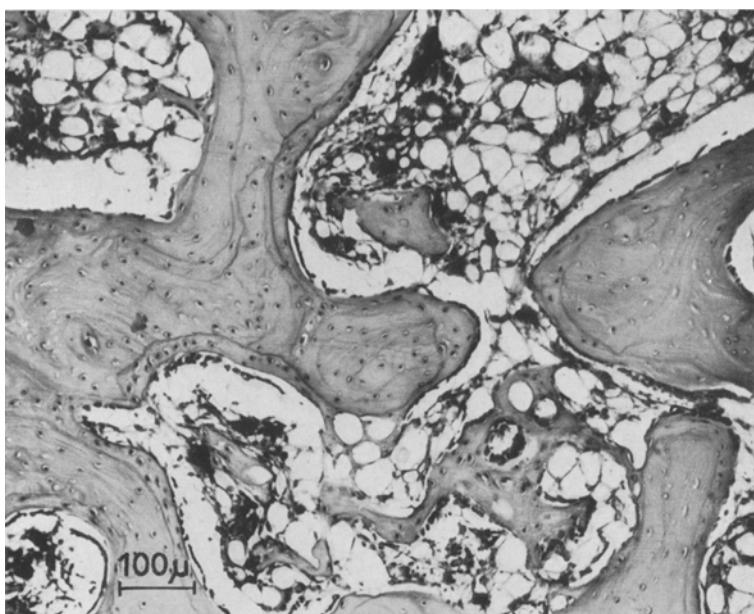


Abb. 9. Mikroskopische Veränderungen im Bereich der knöchernen Epiphyse. Junges Bindegewebe und neugebildete Osteoidinseln im Markraum, osteoide Säume auf den alten Spongiosabalkchen. Marködem. Färbung: H.-E. Versuchsbedingungen: Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn. Versuchszeit: 14 Tage

knorpel dringt in breiter Schicht zellreiches, gut vascularisiertes Bindegewebe weit in die Markräume vor. Die zentral gelegenen Markräume werden von einem

lockerem, retikulärem Bindegewebe, mit Fettzellen durchsetzt, ausgefüllt. Darin liegen Inseln neugebildeten Osteoids (Abb. 9). Auch auf den nekrotischen Spongiosabälkchen sind teilweise Lamellen frischen Osteoids abgelagert worden, die bisweilen spornartig in den Markraum hineinragen und Anschluß an die Osteoidinseln gewinnen. Einreihige Säume von einkernigen Zellen überziehen nekrotische Knochenbälkchen und neues Osteoid.

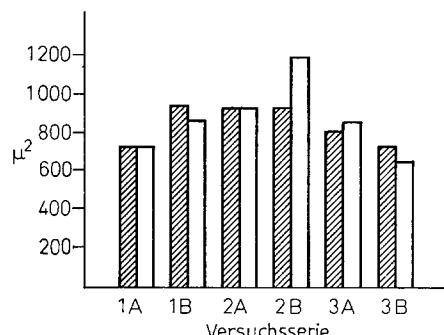


Abb. 10. Darstellung der durchschnittlichen Knochenbälkchenfläche in  $2,59 \text{ mm}^2$  großen Arealen aus der knöchernen Epiphyse. Schraffierte Säulen: Knochenbälkchenflächen bei kreislaufgeschädigten Epiphysen; weiße Säulen: Knochenbälkchenfläche bei nichtgeschädigten Epiphysen zum Vergleich

Versuchsgruppe	Versuchsbedingungen	Versuchszeit (Tage)
1 A	Durchtrennung des L.c.f.	3
1 B		14
2 A	Durchtrennung des Str.syn.	3
2 B		14
3 A	Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3
3 B		14

Nach 21 Tagen ist die Regeneration weiter fortgeschritten. Die nekrotischen Knochenbälkchen sind vielfach von unterschiedlich breiten Lamellen neugebildeten Osteoids mit eingeschlossenen Osteocyten eingeschaltet. In den Markräumen findet man wieder, jetzt jedoch häufiger, Osteoidinseln. Diese können kontinuierlich in die Osteoidlamellen auf den Spongiosabälkchen übergehen. Die Markräume sind von zellreichem Granulationsgewebe oder faserreichem Bindegewebe angefüllt. Dazwischen liegen einzelne Fettzellen und nun auch wieder kleine Herde blutbildender Zellen.

Mit der planimetrischen Flächenbestimmung der angeschnittenen Knochenbälkchen in der knöchernen Epiphyse konnten keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 10). Dort wo die errechneten Mittelwerte von Kontroll- und Versuchstieren Unterschiede aufwiesen (Versuchsgruppe 2 b), ließen sie sich wegen einer relativ hohen Standardabweichung nicht statistisch sichern. Die Ursache dafür liegt offensichtlich in dem Nebeneinander von Knochenabbau und Knochenregeneration.

*Befunde am Epiphysenfugenknorpel*

Bei allen jungen Tieren (Versuchsgruppen 1a—3c) ergab sowohl die histologische Beurteilung als auch die Messung der Dicke des Epiphysenfugenknorpels (Abb. 11) keinen pathologischen Befund. Die Epiphysenfugenknorpel der kreislaufgeschädigten und normalen Hüftköpfe sind annähernd gleich dick und haben eine Breite von ca. 300  $\mu$ .

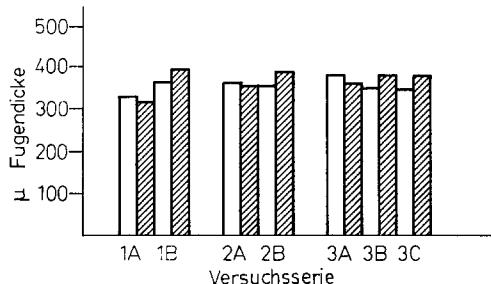


Abb. 11. Darstellung der durchschnittlichen Epiphysenfugendicke bei allen jungen Tieren. Schraffierte Säulen: Fugendicke bei kreislaufgeschädigten Epiphysen; weiße Säulen: Fugendicke bei nichtgeschädigten Epiphysen zum Vergleich

Versuchsgruppe	Versuchsbedingungen	Versuchszeit (Tage)
1 A	Durchtrennung des L.c.f.	3
1 B		14
2 A	Durchtrennung des Str.syn.	3
2 B		14
3 A	Durchtrennung des L.c.f. und des Str.syn.	3
3 B		14

### Diskussion

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nur bei jungen, nicht aber bei alten Kaninchen nach Schädigung ihres epiphysealen Kreislaufs Veränderungen in der knöchernen Epiphyse und am Gelenkknorpel des Oberschenkelkopfes auftreten. Die Veränderungen hängen von der Stärke der Kreislaufstörung ab (STEWART, 1933; WOLCOTT, 1943). Wie beim jungen Menschen, so sind auch beim Kaninchen die lateralen Epiphysengefäße die wichtigsten Blutgefäße, die den Oberschenkelkopf versorgen. Die pathologischen Veränderungen werden noch verstärkt, wenn gleichzeitig das L.c.f. durchtrennt wurde. Demnach muß angenommen werden, daß die Gefäße im L.c.f. zu einem gewissen Teil den Oberschenkelkopf versorgen, wenn auch ihre Bedeutung nicht sehr groß sein dürfte. Die alleinige Durchtrennung des L.c.f. ruft nämlich, wie auch STEWART (1933) und WOLCOTT (1943) zeigen konnten, keine oder nur unbedeutende morphologische Schäden hervor. Die Oberschenkelköpfe alter Tiere, bei denen die gleichen Operationen durchgeführt wurden, zeigten dagegen keine pathologischen Veränderungen. Demnach müssen metaphysäre Gefäße nach Schwund des Epiphysenfugenknorpels die Funktion der epiphysären Gefäße übernehmen. Wenn auch dieses Ergebnis nicht ohne weiteres auf menschliche

Verhältnisse übertragen werden kann, so ist doch die von LANG (1962) geäußerte Meinung, das Epiphysenfugenstadium könne trotz fehlendem Fugenknorpel funktionell weiterbestehen, in Frage zu stellen. Die Durchblutungsstörung schädigt bei jungen Tieren sowohl den Gelenkknorpel wie auch die knöcherne Epiphyse, nicht aber den Epiphysenfugenknorpel.

Im Gegensatz zur Ansicht von BERNBECK (1927), der die Verdickung des Gelenkknorpels überhaupt an den Anfang der Perthes-Genese stellt, haben sowohl frühere Arbeiten (NUSSBAUM, 1924) als auch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt, daß die Gelenkknorpelverdickung die Folge einer epiphysären Kreislaufstörung ist. Dafür spricht die Tatsache, daß diese Verdickung nur bei jungen, nicht aber bei alten Tieren beobachtet werden konnte. Außerdem war die Dickenzunahme des Gelenkknorpels bei jungen Tieren von Grad und Dauer der Kreislaufschädigung abhängig. Der Gelenkknorpel wird verbreitert. Dies dürfte das morphologische Substrat für die röntgenologisch nachweisbare Verbreiterung des Gelenkspaltes in frühen Phasen der Pertheschen Erkrankung sein. Diese Verbreiterung beruht aber nicht, wie NUSSBAUM (1924) annahm, darauf, daß der Gelenkknorpel normal weiterwächst und die Resorption durch die subchondralen Blutgefäße ausbleibt. Es handelt sich vielmehr um eine Degeneration des Gelenkknorpels infolge Kreislaufstörung.

Im knochennahen Drittel des Gelenkknorpels kommt es zur Schädigung der Knorpelzellen, wie auch JONSÄTER (1953) und ARNAUDOW (1962) nachweisen konnten, die bis zur Nekrose führen kann. Dies ist offensichtlich die empfindlichste Stelle des Gelenkknorpels. Die Ernährung des Gelenkknorpels erfolgt durch Diffusion sowohl von der Gelenkhöhle wie auch von subchondralen Markgefäßen (ECKHOLM, 1951). Dort wo nach Blutkreislaufstörung in der Epiphyse die Gelenkknorpelveränderungen auftreten (Grenze zwischen unteren zum mittleren Drittel) liegt offensichtlich die Nahtstelle dieser beiden Versorgungsgebiete. Die Zellen werden dort schwer geschädigt (Pyknose der Zellkerne, Nekrose von Knorpelzellen). Durch die Zellschädigung werden wahrscheinlich lysosomale Fermente freigesetzt, die reichlich in Knorpelzellen enthalten sind (FELL und DINGLE, 1963; MEYER, 1965). Fermente für die vollständige Degeneration der sauren Mucopolysaccharide sind in Lysosomen der Knorpelzellen nachgewiesen worden (PLATT, 1967). Die Degeneration der sauren MPS bewirkt einen erhöhten Wassereinstrom, der durch die nachgewiesene Volumenzunahme der Intercellularsubstanz zur Knorpelverbreiterung führt. Diese Interpretation findet durch die vorliegenden Untersuchungen eine Unterstützung, da in den experimentell verbreiterten Gelenkknorpeln histochemisch niemals vermehrt, sondern eher vermindert saure MPS dargestellt werden konnten. Nur vereinzelt sind in den geschädigten Knorpelabschnitten Regenerate nachweisbar. Diese gehen dann nicht, wie beim physiologischen Gelenkknorpelwachstum von den oberflächlichen Knorpelzellen (an der Gelenkhöhle) aus (OTTE, 1965), sondern nehmen ihren Ursprung offensichtlich von Zellen aus der Umgebung des Schädigungsbereiches.

An der knöchernen Epiphyse bestehen die degenerativen Veränderungen in chronologischer Reihenfolge in Knochenmarknekrose, Osteoblastenschwund und Osteocyteneukrose. Daneben laufen schon sehr bald regenerative Prozesse in Form von Bindegewebs- und Osteoidneubildung ab, die bereits nach 14tägiger Versuchsdauer beobachtet werden konnten und von Zellen des Periostes aus-

gehen. Diese erreichen den Oberschenkelkopf auf dem gleichen Weg, auf dem auch die lateralen Epiphysengefäße in den Oberschenkelkopf eintreten. Das neu gebildete Osteoid wird schalenförmig an die nekrotischen Knochenbälkchen angelagert. Im Gegensatz zu NUSSBAUM (1924), MÜLLER (1924) und JONSÄTER (1953) muß aufgrund der vorliegenden Befunde das Regenerationsstadium zumindest beim Tier noch weiter vorverlegt werden, als bisher angenommen wurde.

Einige Autoren (CORDES, 1930; BURCKHART, 1948; ZEMANNSKI, 1929) konnten Femurkopfdeformierungen auch beim Tier nach epiphysealer Kreislaufstörung beobachten. In den vorliegenden Untersuchungen konnten solche Deformitäten weder makroskopisch noch mikroskopisch gefunden werden. Die Ursache hierfür liegt sicherlich in der relativ kurzen Beobachtungszeit von maximal 30 Tagen.

### Literatur

- ALFERT, M., and J. J. GESCHWIND: Selective Staining method for basic proteins of cell nuclei. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 991—999 (1953).
- ARNAUDOW, M.: Zur Frage der deformierenden Arthropathie als Folge der epiphysären Knochennekrose. Bruns' Beitr. klin. Chir. **205**, 477—502 (1962).
- BERNBECK, R.: Zur Pathogenese der jugendlichen Hüftknorpelnekrose. Arch. orthop. Unfall-Chir. **44**, 164—200 (1950).
- BURCKHARDT, E.: Perthes, Osteochondritis dissecans und Coxa vara infantum im Tierexperiment. Helv. chir. Acta **15**, 3—23 (1948).
- CALVÉ, J.: Sur une forme particulière de pseudoxalgie greffée sur des déformations caractéristiques de l'extremité supérieure du fémur. Rev. Chir. (Paris) **42**, 54—84 (1910).
- CORDES, E.: Über die Entstehung der subchondralen Osteonekrosen. Bruns' Beitr. klin. Chir. **149**, 248—296 (1930).
- EKHOLM, R.: Articular cartilage nutrition. Acta anat. (Basel), Suppl. **15** (1951).
- FELL, H. V., and J. T. DINGLE: Studies on the mode of action of excess of Vit. A 6. Cytosomal protease and the degradation of cartilage matrix. Biochem. J. **87**, 403—408 (1963).
- JONSÄTER, S.: Coxa plana. A histopathologic and arthographic study. Acta orthop. scand., Suppl. **12** (1953).
- KIZELY, G., and Z. PÓSALAKY: Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. Budapest: Akadémiai Kiadó 1964.
- LANG, F.: Über Art und Bedeutung der Kreislaufunterbrechung in der Ätiologie und Pathogenese der aseptischen Epiphysennekrosen. Bruns' Beitr. klin. Chir. **171**, 581—637 (1941).
- LANG, F. J.: Mikroskopische Befunde bei juveniler Arthritis deformans (Osteochondritis deformans juvenilis coxae Legg-Calvé-Perthes) nebst vergleichenden Untersuchungen über Femurkopfepiphysen mit besonderer Berücksichtigung der Fovae. Virchows Arch. path. Anat. **239**, 76—143 (1922).
- , u. J. THURNER: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, Bd. 2, Teil 4. 7. Lieferung. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1962.
- LEGG, A. E.: An obscure affection of the hip-joint. Boston med. surg. J. **162**, 202—204 (1910).
- LILLIE, R. D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. The Blakiston Division, New York-Toronto-London: McGraw-Hill Book Co. 1954.
- MEYER, K.: Stoffwechsel und degenerativer Rheumatismus. Rheumatologisches Symposium in der Klinik für Physikalische Medizin und Balneologie der Universität Gießen in Bad Nauheim vom 24.—26. April 1964. Rheumatismus **36**, 36 (1965).
- MÜLLER, W.: Experimentelle Untersuchungen über Nekrosen und Umbauprozesse am Schenkelkopf nach traumatischen Epiphysenlösungen und Luxationen und ihre klinische Bedeutung. Bruns' Beitr. klin. Chir. **132**, 490—522 (1924).
- NUSSBAUM, A.: Die arteriellen Gefäße der Epiphysen des Oberschenkels und ihre Beziehungen zu normalen und pathologischen Vorgängen. Bruns' Beitr. klin. Chir. **130**, 495—535 (1924).
- OTTE, P.: Über das Wachstum der Gelenkknorpel. Theoretische und klinische Medizin in Einzeldarstellungen, Bd. 23. Heidelberg: Hüthig 1965.

- PERTHES, G.: Über Osteochondritis deformans juvenilis. Langenbecks Arch. klin. Chir. **101**, 779—807 (1913).
- PISCHINGER, A.: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Z. Zellforsch. **3**, 169—197 (1926).
- Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen und ihre Beziehung zur Färbung bei verschiedenen H-Ionen-Konzentrationen. Z. Zellforsch. **5**, 347—385 (1927).
- PLATT, D.: Persönliche Mitteilung (1967).
- RANDLOV-MADSEN, A. A.: Experimental investigations into the aetiology of Calvé-Perthes disease. Acta orthop. scand. **19**, 6—18 (1949).
- STEEDMAN, H. F.: Alcian blue 8 GS. A new stain for mucin. Quart. J. micr. Sci. **91**, 477—479 (1950).
- STEWART, W. J.: Aseptic necrosis of the head of the femur following traumatic dislocation of the hip-joint. J. Bone Jt Surg. **15**, 413—438 (1933).
- WALB, D., and W. SANDRITTER: Inclusion bodies in rectal polyps. Arch. Path. **78**, 104—107 (1964).
- WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik. Jena: VEB Gustav Fischer 1961.
- WOLCOTT, W. E.: The evolution of the circulation in the developing femoral head and neck. Surg. Gynee. Obstet. **77**, 61—68 (1943).
- ZEMANSKY, A. P.: The pathology and pathogenesis of Legg-Calvé-Perthes disease (Osteochondritis juvenilis deformans coxae). Amer. J. Surg. **4**, 169—187 (1928).
- , and R. K. LIPPmann: The importance of the vessels in the round ligament to the head of the femur during the period of growth and their possible relationship to Perthes' disease. Surg. Gynee. Obstet. **48**, 461—469 (1929).

Dozent Dr. G. BENEKE  
Pathologisches Institut der Justus Liebig-Universität  
63 Gießen, Klinikstr. 32 g