

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KNORPELBILDUNG III. HÄMOGLOBIN- UND MILCHSÄUREGEHALT DER REGENERIERENDEN GELENKFLÄCHE IN VERSCHIE- DENEN REGENERATIONSSTADIEN

ÉVA OLÁH, Cs. HADHÁZY und KATALIN KOSTENSZKY

(Eingegangen am 18. September 1958)

### Einleitung

BÜRGER [9] bezeichnete eine Gewebsgruppe »bradytrophe Gewebe«. Nach seiner Definition rechnen zu dieser Gruppe alle Gewebsformen, die überhaupt keine oder nur sehr wenige Kapillaren enthalten (Knorpel, Auglinse, Hornhaut, einzelne Wandschichten größerer Gefäße usw.). Bei diesen Geweben erfolge daher die Zufuhr der Nährstoffe und der Abtransport der Schlackenstoffe durch Diffusion. Infolgedessen sei der »Optimalzustand«, den die ausreichende Vaskularisation bzw. Blutversorgung darstellt, bei den bradytrophischen Geweben nicht vorhanden. Die »zufriedenstellende Blutversorgung« gewährleistet bekanntlich mehrere augenfällige Gegebenheiten: die entsprechende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, die ungestörte Abfuhr der Schlackenstoffe, die Sicherung des konstanten inneren Milieus und den Transport einzelner Wirkstoffe (WENT, [50]). Nach BÜRGER bedeutet demnach die Bradytrophie den Mangel all dieser Funktionen in mehr oder minder großem Ausmaß. Auf diese Weise wird die Tatsache verständlich und plausibel, daß die bradytrophischen Gewebe im allgemeinen (DICKENS und WEIL—MALHERBE [15]) — und so auch der Knorpel (BYWATERS [12]; DICKENS und WEIL—MALHERBE [14]; HILLS [25]; CARTIER [13]) — über anaeroben glykolytischen Stoffwechsel verfügen. Bei anaerober Glykolyse besteht ganz allgemein Sauerstoffmangel, infolgedessen wird das aus der Glykogenspaltung entstehende Pyruvat nicht im Zitratkreis verarbeitet, sondern wandelt sich zu Milchsäure um. Sehr wahrscheinlich verfügen daher die die Gefäße entbehrenden bradytrophischen Gewebe nicht über die für die biologischen Oxydationen erforderliche Sauerstoffmenge, während andererseits der Sauerstoffmangel in diesem Fall weder als eine pathologische noch als anomale Erscheinung betrachtet werden kann.

STRUGHOLD [45] hat im Zusammenhang mit den allgemeinen Fragen des Sauerstoffmangels festgestellt, daß im Mittelpunkt dieses Problems die intrazelluläre biologische Oxydation stehe; diese sei der gemeinsame Nenner, der jeden Sauerstoffmangel und seine Folgen erkläre. BECKER [7] brachte

eine sehr gründliche und ausführliche Übersicht der durch biologische Oxydationen verursachten Schädigungsmöglichkeiten. Nach seiner Gruppierung kann eine Störung infolge Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel und »Wirkstoffdefekten« entstehen. Eine Art des Zustandekommens des Sauerstoffmangels kann eine allgemeine oder lokale Kreislaufinsuffizienz sein, die sich neben lokalen Manifestationen in einer ischämischen Hypoxidose äußert. (Im Rahmen vorliegender Mitteilung kann es nicht unsere Aufgabe sein, das hauptsächlich von der BÜCHNERSchen und REINSchen Schule gelieferte umfangreiche Literaturmaterial über die Hypoxidose als ätiologischen Faktor aufzuarbeiten, sondern wir beschäftigen uns nur mit den uns unmittelbar interessierenden Fragen.)

Aus den Angaben von BÜCHNER [8], GROSSE—BROCKHOFF [22], HOLLE, BURKHARDT, ARNDT und BLÖDORN [27] sowie anderen wissen wir, daß die Hypoxie die einzelnen Gewebelemente um so mehr berührt, je stärker sie differenziert sind. Am empfindlichsten sind die Nervenzellen, Herzmuskel, Leber- und Nierenzellen. HOLLE, BURKHARDT, ARNDT und BLÖDORN [27] legen in ihrer auch zahlreiche Literaturangaben über die ischämische Hypoxidose der Nierenepithelzellen enthaltenden Mitteilung dar, daß die Erscheinungen bei der ischämischen Veränderung mit der Behinderung sämtlicher Blutfunktionen zusammenhängen und man neben der Wirkung des Sauerstoffmangels auch mit der Ionenveränderung (Milieu), einer Schädigung der Durchspülfunktion, mit Nährstoffmangel und darüber hinaus noch mit dem Problem der anomalen Gefäßwandpermeabilität rechnen müsse. Sie betrachten als erste Manifestation der Kreislaufschädigung die Beeinflussung des Reaktionsmilieus, welche die Grundlage der späteren Autolyse legt. FRUNDER [20] bemerkt, ein Gewebsreiz könne Azidose herbeiführen, im geschädigten Gewebe komme es zu geschädigter Atmung, die anaerobe Glykolyse zustande bringt, die wiederum zunehmende Gewebssäuerung herbeiführt, welche die Aktivierung einzelner proteolytischer Fermente bewirken kann. Auf diese Weise schreitet der Prozeß bei hochdifferenzierten Geweben zur Nekrobiose bzw. Nekrose fort. Die Differenzierung der bindegewebigen Elemente ist bekanntermaßen geringer, und der vorgenannten Veränderung gegenüber führt der Sauerstoffmangel bei diesen — wie auch die infolge Stauung auftretende Induration zeigt — eher zur Fasernvermehrung. Von den Granulationsgewebszellen wissen wir, daß sie pluripotent, d. h. verhältnismäßig wenig differenziert sind. Es kann angenommen werden, daß eine Hypoxie, die an Epithelgeweben bereits irreversible Veränderungen zustande bringt, ihre Vitalität überhaupt nicht berührt, aber durch die auf biologische Oxydationen ausgeübte Wirkung deren Lebensweise modifiziert.

Um die Prozesse untersuchen zu können, welche der im erwachsenen Organismus vor sich gehenden Knorpelbildung vorangehen und sie begleiten, haben wir in früheren Untersuchungen ein »morphologisches und chemisches

Modell« gesucht und im »KROMPECHER—PUKYSchen Halbgelenk« gefunden (KROMPECHER [30, 31]; HADHÁZY und OLÁH [23]). Dessen Wahl ergab sich schon deshalb von selbst, weil KROMPECHERS Hypothese über die regenerative Knorpelbildung anlässlich des Studiums dieses Modells entstanden war. Diese Hypothese (KROMPECHER [31, 32, 33]) schreibt der druckbedingten Verengung bzw. Obliteration der Gefäße und der aus diesem Grunde eintretenden »Anoxie« und »Bradytrophie« bei der Knorpelbildung kausale Bedeutung zu. Bei der Untersuchung der Vaskularisationsverhältnisse unseres Modells mit verschiedenen Methoden vermochten wir (HADHÁZY, KOSTENSZKY und OLÁH [24]) gleichfalls einen Zusammenhang zwischen der Verringerung der Vaskularisation und der Knorpelbildung zu beobachten. Es lag daher auf der Hand, die Untersuchung der Folgen dieser Gefäßpauperisation in Angriff zu nehmen. Am auffallendsten unter diesen Folgen war die Beeinträchtigung der Hämoglobin- bzw. Sauerstoffversorgung, weshalb wir in erster Linie das Zustandekommen des eventuellen Sauerstoffmangels teils mit Hilfe der Hämoglobinbestimmung, teils durch Bestimmung der als indirekten Indikator des Sauerstoffmangels betrachteten Milchsäurewerte untersuchten.

#### Methoden

Für diese Untersuchungen wurden insgesamt 55 Hunde verwendet, bei denen wir, wie in einer früheren Mitteilung [23] ausführlich beschrieben, die Halbgelenkbildung nach dem Verfahren von KROMPECHER und PUKY vornahmen, die im wesentlichen darin besteht, daß die die distale Gelenkfläche des Femurs bedeckende und die unmittelbar darunter befindliche Spongiosa entfernt wird. Operation und Nachbehandlung erfolgten genau wie in der erwähnten Mitteilung beschrieben. Die Hunde wurden 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation getötet, das operierte Gelenk sofort herausgenommen und geöffnet. Wir isolierten das die regenerierende Gelenkfläche bildende Granulationsgewebe (III. Schicht), das also in der anlässlich der Gelenkbildung angelegten Knochenwunde anwesend war. Ebenso isolierten wir das an der Vorderwand der Gelenkkapsel — der neu entstandenen Gelenkfläche gegenüber — haftende Granulationsgewebe (I. Schicht). In diesen beiden Materialien führten wir Hämoglobin- und Milchsäurebestimmungen durch. Abb. 1 zeigt die topographische Anordnung der Untersuchungstoffe in situ.

Für die *Hämoglobinbestimmungen* benutzten wir 15 Hunde, die wir in 5 Gruppen zu je 3 Hunden einteilten. Die Untersuchungen an den einzelnen Gruppen geschahen zu den bereits erwähnten postoperativen Zeitpunkten. Die I. und III. Schichten wurden abgelöst, gesondert auf der analytischen Waage gewogen, mit der Schere zerstückelt und 3 Tage lang mit der 5fachen Menge dest. Wasser extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bestimmten wir das Hämoglobin im Supernatans nach der von BÁLINT [4] mitgeteilten WONGSchen Methode. Wir trennten das Eisen vom Hämoglobinmolekül (durch Behandlung mit konz. Schwefelsäure und Kalumpersulfat) und bestimmten die Ferri-Ionen in dem nach Eiweißfällung gewonnenen Filtrat. Die Ergebnisse teilen wir im Ferri-Ionenwert mit und bemerken, daß auch die Hämoglobinmenge in mg% errechnet werden kann, wenn man diese Werte mit 0,294 multipliziert.

Die *Milchsäurebestimmungen* wurden bei 40 Hunden vorgenommen, die wir in 5 Gruppen zu je 8 Hunden einteilten, welche zu den erwähnten Zeitpunkten getötet wurden. Nach möglichst schneller Isolierung wurde das Gewicht der III. und I. Schicht in vorher abgewogenen Gefäßen festgestellt. Wir zerstückelten die Stoffe mit der Schere und nahmen die Extraktion mit der 20fachen Menge 3%iger Trichloressigsäure während 48ständiger Aufbewahrung im Eisschrank und mehrmaligem Schütteln vor. Der Extrakt wurde filtriert und die im trichloressigsäuren Medium bereits eiweißfreie Lösung nach VAN SLYKE [44] mit Kupfersulfatkalziumhydroxydlösung behandelt, um die störenden Kohlenhydrate zu entfernen. Nach dem Zentrifugieren bestimmten wir die Milchsäure in der gereinigten Lösung entweder nach der Methode von FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFER [19] oder nach der von BARKER—SUMMERSON [5]. In einigen Fällen wurden die Bestimmungen nach beiden Methoden ausgeführt.

Das Friedemann—Cotonio—Schaffersche Verfahren gelangte etwas modifiziert (TANKÓ, 49) zur Anwendung. Die Oxydation der Milchsäure zu Azetaldehyd erfolgte in schwach saurem Phosphorsäuremedium in Anwesenheit von Mangansulfat, wozu wir tropfenweise  $n/100$  Kaliumpermanganat bis zur konstanten Rosafärbung gaben. Der Destillierkolben wurde mit einem Mikrobrenner erwärmt, aber vorher mit einem mit Tropfenfänger versehenen langen Kondensor verbunden, damit die Substanzen mit höherem Siedepunkt, die die Bestimmung eventuell stören, während der Destillation in den Kolben zurücktropfen. Das durchdestillierende Azetaldehyd fingen wir in 1,3%iger Kaliummetabisulfitlösung auf, banden das überschüssige Bisulfit erst mit  $n/5$ , dann mit  $n/200$  Jodlösung, spalteten das Aldehydbisulfit mit Natriumhydrocarbonat und titrierten das nunmehr freiwerdende Bisulfit mit  $n/200$  Jodlösung.

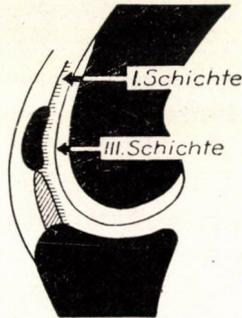


Abb. 1

Die BARKER—SUMMERSONSche Methode kam ohne Modifikation zur Anwendung; als Standard benutzten wir Lithiumlaktat (2 mg%ige Lösung).

Zur Ergänzung der Milchsäurebestimmungen nahmen wir auch Trockensubstanzbestimmungen vor und untersuchten den Milchsäuregehalt des Blutes und normalen Gelenkknorpels.

### Ergebnisse

Der Hämoglobinnachweis erfolgte mit Hilfe von Eisenbestimmungen. Die Resultate sind in der Tabelle »a« und in den Diagrammen »b« und »c« der Abb. 2 angegeben. Die Tabelle zeigt in  $\mu\text{g}$  Ferriionen/g Granulationsgewebe die individuellen Ergebnisse und den Durchschnitt der I. und III. Schichten der 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation getöteten Tiere. Das Diagramm »b« gibt die zeitlichen Veränderungen dieser Durchschnittswerte, das Diagramm »c« die Differenz zwischen der I. und III. Schicht wieder. In diesem Fall haben wir die 7tägigen Werte sowohl bei der I. wie III. Schicht jeweils als 100% angenommen und die Werte der anderen Altersgruppen dazu ins Verhältnis gesetzt.

Wie aus obigen Angaben hervorgeht, zeigt die III. Schicht eine allmählich fortschreitende Ferriionen-, d. h. Hämoglobinverminderung, die von dem 7tägigen Wert von  $40,7 \mu\text{g}$  zu dem 70tägigen Wert von  $13,1 \mu\text{g}$  ununterbrochen weitergeht. Das an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebe

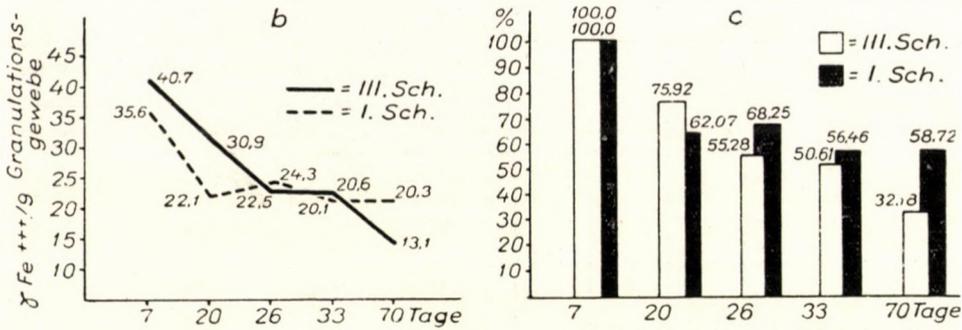


Abb. 2

Resultate der Hämoglobinbestimmungen (Erklärung im Text.)

	1	2	3	Durchschnitt	1	2	3	Durchschnitt
	Hund I. Schichte				Hund III. Schichte			
7 Tägig	37,0	23,8	46,0	35,6	36,6	36,8	48,8	47,0
20 „	17,3	25,0	24,0	22,1	38,0	23,8	31,0	30,9
26 „	16,6	32,0	23,9	24,3	19,2	25,8	24,1	22,5
33 „	14,9	25,0	20,3	20,1	23,6	21,0	17,2	20,6
70 „	27,0	15,6	19,0	20,3	13,9	14,6	10,7	13,1

(I. Schicht) weist demgegenüber zwei Unterschiede auf. Einer besteht darin, daß der Initialwert (35,6 µg) am 7. Tage von vornherein niedriger ist als der Wert von 40,7 µg der III. Schicht. Die Differenz zwischen den beiden ist zwar denkbar, kann aber wegen der individuellen Schwankungen dennoch nicht berücksichtigt werden. Als wesentlicher Unterschied ist aber zu betrachten, daß die 20, 26, 33 und 70 Tage alten Stoffe der I. Schicht nahezu die gleichen, aber keinesfalls weit voneinander entfernte Werte zeigen (22,1, 24,3, 20,1, 20,6 µg), im Gegensatz zu dem ständig sinkenden Eisen- bzw. Hämoglobingehalt der III. Schicht, was zu der Schlußfolgerung führen muß, daß das Ausmaß der Vaskularisation der Gelenkflächenschicht 70 Tage lang ständig abnimmt, während die Vaskularisation des an der Kapsel haftenden Granulationsgewebes etwa vom 20. Tage an praktisch unverändert bleibt.

Die Ergebnisse der Milchsäurebestimmungen sind in den Diagrammen »a« und »b« der Abb. 3 sowie in nachfolgenden Angaben dargestellt (die Zahlenangaben der Tabelle entsprechen dem Milchsäurewert in mg%):

I. Schicht

Zeitspanne zwischen Operation und Tötung	Hund Nr.								Durchschnitt	Durchschnittl. Abweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8		
7 Tage .....	97	75	104	103	134	138	128	74	106	19
20 „ .....	123	106	136	197	117	140	114	112	130	20
26 „ .....	139	142	104	119	163	193	127	171	144	23
33 „ .....	184	221	227	196	124	110	117	166	168	38
70 „ .....	129	113	98	166	121	80	164	172	130	27

III. Schicht

Zeitspanne zwischen Operation und Tötung	Hund Nr.								Durchschnitt	Durchschnittl. Abweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8		
7 Tage .....	125	142	111	87	146	150	115	92	121	19
20 „ .....	164	263	151	228	128	128	140	121	165	27
26 „ .....	162	185	160	208	195	235	296	256	212	37
33 „ .....	188	176	274	187	140	148	109	202	178	34
70 „ .....	111	87	85	112	120	110	148	130	112	14

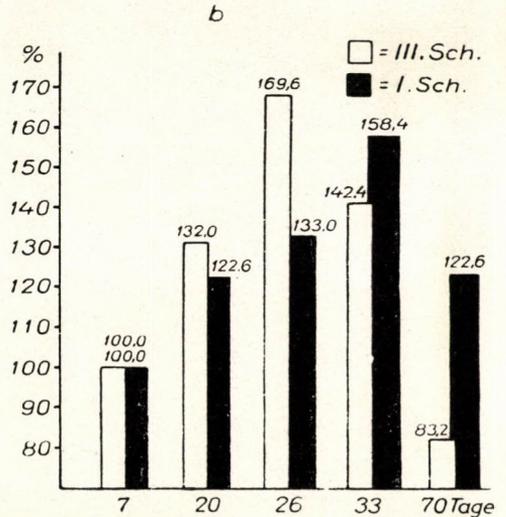
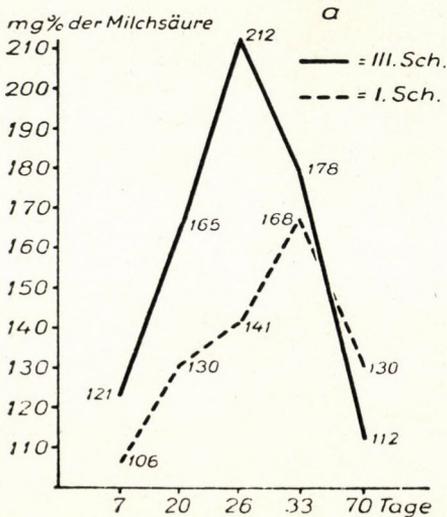


Abb. 3

Das Diagramm »a« der Abb. 3 zeigt die zeitliche Veränderung der festgestellten Durchschnittswerte, während in »b« die 7tägigen Werte sowohl der I. wie III. Schicht mit jeweils 100% angenommen und die Werte der anderen Stadien im prozentualen Verhältnis dazu angegeben sind.

Die Angaben des Gelenkflächengranulationsgewebes (III. Schicht) zeigen, daß nach 7 Tagen das reich vaskularisierte Granulationsgewebe — im Verhältnis zum Blut (32 mg%) — bereits einen hohen Wert aufweist. Von hier an ist bis zum 26. Tage eine sehr starke Erhöhung (bis zu 212 mg%) zu beobachten. Im Zusammenhang damit sei erwähnt, daß wir bei unseren früheren Untersuchungen in diesem Stadium die ersten morphologischen Anzeichen der Knorpelbildung in dieser Schicht wahrnehmen konnten. Hiernach fällt die Kurve steil ab, und der Milchsäurewert beträgt am 33. Tage (Erscheinen isolierter Knorpelinseln) 178 mg%, am 70. Tage (Entstehung konfluierender Knorpelinseln) 112 mg%. Wir dachten natürlich auch an die Möglichkeit, daß für diese Differenzen die Unterschiede im *Trockensubstanzgehalt* verantwortlich sind. Die vorgenommenen Untersuchungen ergaben folgendes: Der prozentuale Durchschnitt der Trockensubstanz war bei dem 7tägigen Material 19,8, bei dem 20tägigen 18,0, bei dem 26tägigen 21,0, dem 33tägigen 19,6 und dem 70 Tage alten 24,2%. Die Trockensubstanzbestimmungen bestätigen demnach unsere obigen Angaben. Die verhältnismäßig niedrigen Milchsäurewerte der 7tägigen Stoffe steigen im 20, 26 und 33 Tage alten Granulationsgewebe nahezu auf das Doppelte bei etwa gleichem Trockensubstanzgehalt, während wir im 70tägigen Stadium trotz des höheren Trockensubstanzgehaltes eine geringere Milchsäuremenge als am 7. Tage gewinnen.

Das an der Kapsel haftende Granulationsgewebe (I. Schicht) zeigt eine in der Intensität zwar herabgesetzte, aber ebenfalls stärker steigende Tendenz als das 20-, 26-, ja auch als das 33tägige Material (130, 141, 168 mg%). Von da an sehen wir eine geringe Senkung (auf 130 mg%) bis zum 70. Tage.

Die Unterschiede im Verhalten der beiden Schichten können wir folgendermaßen zusammenfassen: Die III. Schicht enthält bereits am 7. Tage mehr Milchsäure und zeigt eine größere Erhöhung als die I. Schicht. Ihren Höhepunkt erreicht die Steigerung bei der III. Schicht am 26., bei der I. Schicht am 33. Tage; die Senkung der Milchsäurewerte ist am 70. Tage bei der III. wesentlich größer als bei der I. Schicht.

Die Milchsäurebestimmungen im Blut und normalen Gelenkknorpel gaben folgende Werte (in mg%):

	Individuelle Ergebnisse								Durchschnitt mg%	Durchschn. Abweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Blut .....	31	21	40	38	35	20	20	38	32	6
Gelenkknorpel ....	100	225	71	201	135	90	73	123	129	47

Sämtliche Untersuchungsergebnisse (Milchsäure, Hämoglobin, frühere planimetrische Untersuchungen der III. Schicht, 24) sind in den Diagrammen »a« und »b« der Abb. 4 zusammengefaßt. Im Diagramm »a« sind die Milchsäurewerte der III. Schicht in mg%, die Ferriionen in  $\mu\text{g}$ , die Gefäßgebiete im Prozentsatz der Gesamtgranulationsgewebsfläche in nicht zueinander ins Verhältnis gesetzten Werten angegeben. Dieselben Werte der I. Schicht — mit Ausnahme der planimetrischen Angaben des Gefäßgebietes — finden sich im Diagramm »b«. Diesen ist folgendes zu entnehmen :

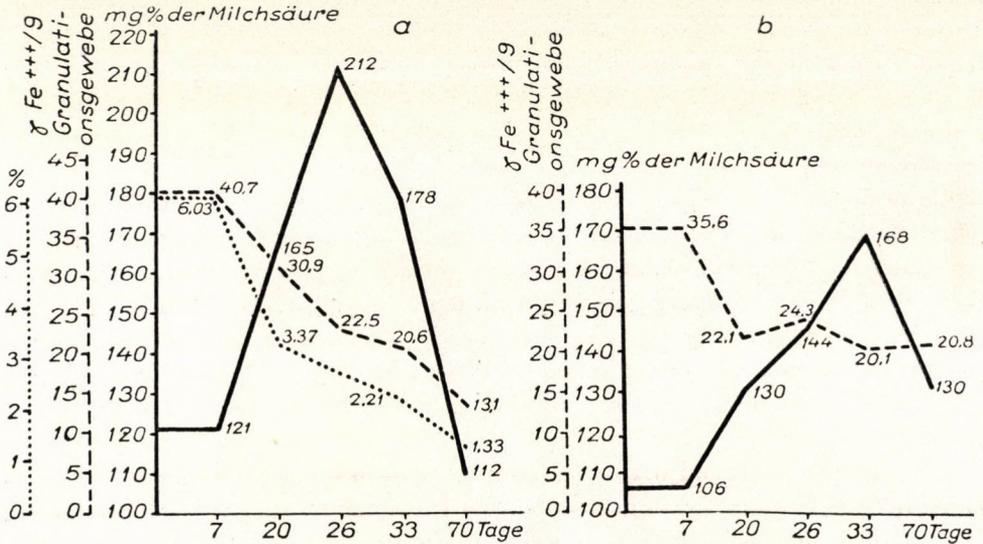


Abb. 4

In bezug auf das Granulationsgewebe der Gelenkfläche ergaben der durch die Hämoglobinbestimmung und die planimetrische Messung charakterisierte Vaskularisationszustand und die Milchsäurewerte bis zum 26. Tage das erwartete Bild. In dem Maße, wie die Vaskularisierung abnimmt, steigt der Milchsäuregehalt. Dem 7tägigen verhältnismäßig hohen Fe+++-Gehalt (40,7  $\mu\text{g}$ ) entspricht ein relativ niedriger Milchsäuregehalt (121 mg%). Im wesentlichen dasselbe finden wir am 20. (30,9  $\mu\text{g}$ /165 mg%) bzw. 26. Tage (22,5  $\mu\text{g}$ /212 mg%). Bisher führte also der ständig zunehmende Sauerstoffmangel zu dauernd vermehrter Milchsäureanhäufung. Vom 26. Tage sehen wir eine qualitative Änderung, da die Vaskularisation weiter abnimmt, aber auch die Milchsäurewerte sinken, die am 33. Tage nur noch 178, am 70. Tage 104 mg% ausmachen. Bei weiterhin zunehmendem Sauerstoffmangel sehen wir demnach sich verringernde Milchsäuremengen.

Das spiegelbildartige Verhalten der Eisen-Milchsäurewerte tritt bei der an der Kapsel haftenden (I.) Granulationsgewebsschicht bis zum 20. Tage

besonders schön in Erscheinung. Die Ferriionen vermindern sich von 35,6 auf 22,1  $\mu\text{g}$ , während die Milchsäure zugleich von 106 auf 130  $\text{mg}\%$  steigt. Von da an erhöhen sich am 26. und 33. Tage bei ziemlich stagnierendem Vaskularisationszustand die Milchsäurewerte (141 und 168  $\text{mg}\%$ ), doch ist diese Erhöhung von geringerem Ausmaß als bei der III. Schicht. Bei im großen ganzen gleichfalls unverändertem Vaskularisationszustand erfolgt auch die Senkung der Milchsäurewerte (auf 130  $\text{mg}\%$ ), und zwar in geringerem Maße als bei der III. Schicht.

Nachfolgende Zahlenangaben zeigen die Werte der Milchsäurebestimmungen nach FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFER und BARKER—SUMMERSON aus denselben Materialien:

Nach FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFER: 16,6  $\mu\text{g}$ , 9,8  $\mu\text{g}$ , 7,0  $\mu\text{g}$ , 8,2  $\mu\text{g}$ , 19,8  $\mu\text{g}$ .

Nach BARKER—SUMMERSON: 18,0  $\mu\text{g}$ , 10,0  $\mu\text{g}$ , 5,9  $\mu\text{g}$ , 8,3  $\mu\text{g}$ , 20,0  $\mu\text{g}$ .

Wie ersichtlich, stimmen die gewonnenen Werte gut überein.

In einigen Fällen (hauptsächlich in jüngeren Stadien) untersuchten wir, ob nicht anlässlich der Befreiung von Kohlenhydraten Milchsäure aus Triphosphat entsteht (TANKÓ [48]). Mit der Methode von MEYERHOF und LOHMANN [37] ließ sich das in den untersuchten Fällen nicht nachweisen.

### Besprechung

Anlässlich der Operationen kamen es zu Blutungen teils aus der geöffneten Gelenkkapsel, teils aus der erschlossenen Spongiosa. Das daraus entstandene Hämatom bzw. Granulationsgewebe füllte das Gebiet zwischen Kapsel und Gelenkfläche aus und haftete an beiden. Wenn wir vom 5. Tage an die Gelenke bewegten, so teilte sich das Granulationsgewebe in den meisten Fällen in zwei Abschnitte, der eine behielt die Verbindung zur Kapsel (I. Schicht), der andere zur Spongiosa (III. Schicht). In manchen Fällen geschah die Trennung nicht in gerader Linie, es isolierte sich eine in der Mitte gelegene Schicht, die im weiteren entweder zu der einen oder zur anderen rechnete. Diese wäre die II. Schicht, an der wir teils wegen ihres unsicheren Vorkommens, teils wegen ihres nicht charakteristischen Verhaltens keine Bestimmungen vorgenommen haben. Da wir diese Aufteilung jedoch auch in unseren früheren Mitteilungen benutzten, wollen wir weiterhin dabei bleiben. Das Schicksal der beiden Schichten gestaltet sich späterhin unterschiedlich. Die I. gesellt sich zum Kapselgewebe, die III., d. h. die an der Knochenoberfläche befindliche, differenziert sich in Richtung zum Knorpel. In der anfänglichen Vaskularisierung bestehen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Schichten, doch ist wesentlich, daß das Granulationsgewebe der Gelenkfläche den eventuellen Einwirkungen der Umgebungsfaktoren (Druckwirkung der kontralateralen Gelenkfläche, unmittelbare knöcherne Umgebung) in auffallender

Weise ausgesetzt ist. Die Gestaltung dieser beiden Schichten in verschiedener Richtung gibt uns die Möglichkeit, innerhalb desselben Gelenks Vergleiche anzustellen und die Prozesse, welche die Knorpelbildung begleiten, zu berücksichtigen.

Im Rahmen unserer vorangegangenen Untersuchungen (HADHÁZY, KOSTENSZKY, OLÁH [24]) trachteten wir das Verhalten der Vaskularisation mit morphologischen Methoden (Injektion, planimetrische Berechnung des Gefäßgebietes) festzustellen. Diese Resultate mußten durch eine den funktionellen Zustand besser widerspiegelnde Methode ergänzt werden. Die Hämoglobinstimmungen haben wir zum Teil aus diesem Grunde durchgeführt. Die beiden Bestimmungsverfahren ergaben parallele Ergebnisse, und da sie dieselbe Frage von zwei verschiedenen Seiten prüfen, können sie auch als wechselseitige Kontrolle gelten, denn die Zuverlässigkeit der Resultate wird durch das ähnliche Verhalten der Werte sicherlich erhöht.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß nach und nach, parallel zur Dauer der nach der Operation verstrichenen Zeit, die Verkleinerung des Gefäßquerschnitts und deshalb Hämoglobinsenkung eintritt. Neben der ständigen Verminderung des Hämoglobins als Sauerstoff transportierender Substanz kann der Gewebstoffwechsel als ziemlich empfindlicher Indikator der Sauerstoffversorgung dienen. Beobachten wir demnach parallel zur Hämoglobinsenkung eine wesentliche Vermehrung der in der anaeroben Phase der Glykolyse entstehenden Milchsäure, so spricht das dafür, daß anaerobe Glykolyse stattfindet, was Mangel an dem für die Stoffwechselprozesse erforderlichen Sauerstoff anzeigt. Aus ähnlichen Erwägungen wird der Milchsäurenachweis auch von LONG [36], CARTIER [13], LIPSCHITZ und BUEDING [35] sowie GROSSE—BROCKHOFF [22] angewandt. Wir gewannen auch mit zwei als zuverlässig anerkannten Methoden enorm hohe Milchsäurewerte und halten es daher für sehr wahrscheinlich, daß sich eine relative ischämische Hypoxidose entwickelt hat, deren Folge anaerobe Glykolyse war. In seinen in letzter Zeit erschienenen Mitteilungen ist KROMPECHER [32, 33] auf Grund theoretischer Überlegungen zu der Schlußfolgerung gelangt, daß die der Neodifferenzierungsknorpelbildung vorangehende Verminderung der Vaskularisation zum Übergang auf den Stoffwechsel durch anaerobe Glykolyse führt, und nach dem Studium seiner anfänglichen Hypothese sind auch wir — unabhängig von ihm — zu diesem Schluß gekommen.

Die infolge der Hypoxidose entstehenden Stoffwechselprodukte bringen aller Wahrscheinlichkeit nach Reaktionsprozesse in Gang. Nach Literaturangaben wirken nämlich die hier in Frage kommenden Produkte gegen Gefäßverengung bzw. Gefäßobliteration. So übt z. B. laut SCHRÖDER, SCHOOP und STEIN [42] der Sauerstoffmangel selbst lokal erweiternde Wirkung auf die Kapillaren aus. Den vasodilatatorischen Effekt der Kohlensäure erkannte u. a. schon BAYLISS [6] und unter gewissen Bedingungen wurde dasselbe auch von

FLEISCH [17] beobachtet. Die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration wirkt gleichfalls erweiternd auf die Kapillaren (MEVES [38]; FLEISCH [17]; ATZLER und LEHMANN [3]). Den vasodilatatorischen Effekt der in der anaeroben Phase entstehenden Milchsäure hat GASKELL [21] bereits 1880 beschrieben, und seither wurde er von mehreren bestätigt (KELLER, LOESER und REIN [29], u. a.). Eine den obigen ähnliche Wirkung üben die phosphorylierten Stoffwechselprodukte (FLEISCH und WEGER [18]), wie auch Adenosintriphosphat (RIEGLER, [41]) aus. Ebenso ist die arteriolenerweiternde Wirkung des hier gegebenenfalls vorkommenden Histamins bekannt (SCHRÖDER—SCHOOP und STEIN [42]). Diese Faktoren scheinen sämtlich am Prozess teilzunehmen, und ihr Effekt wirkt nach obigen Angaben gegen die Verminderung der Vaskularisation. So ergibt sich von neuem die Frage, welches der wichtige Faktor sei, der trotz der eben erwähnten Kompensationsbestrebungen die ständig fortschreitende Einengung der Vaskularisation herbeiführt. In unseren früheren Mitteilungen haben wir uns mit dieser Frage bereits beschäftigt [23, 24], und neben der Aufrechterhaltung jener Ausführungen (mechanischer Faktor, Verknöcherung an der Grenze von Knochen- und Granulationsgewebe, eventuelle chemische Substanz) wollen wir noch eine Möglichkeit erwähnen. Wir halten es für denkbar, daß die dünnwandigen Gefäße durch die Zell-, hauptsächlich aber durch die Fasernvermehrung immer mehr in den Hintergrund gedrängt bzw. komprimiert werden.

Jedenfalls schreitet der Prozeß weiter fort, verläuft aber doch nicht auf die beim Epithelgewebe übliche Weise, d. h. die die Autolyse hervorrufenden proteolytischen Fermente werden nicht aktiviert. Die Abweichung von der erwarteten Richtung ist auch durch die Senkung der Milchsäurewerte gekennzeichnet, die bei der III. Schicht größer ist und rascher eintritt als bei der I. Bei der III. Schicht, d. h. dem Granulationsgewebe der Gelenkfläche, kommt es zur Knorpelbildung. Auf diese Weise ergibt sich die Möglichkeit, eine Beziehung zwischen der Knorpelbildung bzw. der Hypoxie, der anaeroben Glykolyse bzw. der Milchsäureproduktion zu suchen. Auf diese Beziehung weist auch schon der Umstand hin, daß die Milchsäurewerte dann am höchsten sind, wenn die ersten morphologischen Anzeichen der Knorpelbildung beobachtet werden können. Zugleich muß berücksichtigt werden, daß bei der I. Schicht gleichfalls Milchsäurevermehrung vorkommt, obwohl hier Knorpelbildung nicht wahrzunehmen ist. Aus den Angaben von KRONTOWSKI und MAGATH [34], NEUHAUS [39], OKUNEFF [40], BÜCHNER [8] und anderen wissen wir, daß die milchsäureproduzierenden anaeroben Prozesse in wachsenden und sich differenzierenden Geweben im allgemeinen gesteigert sind. So müssen wir unabhängig von der Knorpelbildung mit der Anwesenheit einer gewissen Milchsäuremenge an der regenerierenden Gelenkfläche rechnen. Die beiden wachsenden und sich entwickelnden Granulationgewebsschichten enthalten aber Milchsäure in verschiedener Menge, die sich in Knorpelrichtung differenzierende

wesentlich mehr als die andere. Die quantitative Differenz und zeitliche Verschiebung der Milchsäurekurve der III. Schicht dürften daher mit der Knorpelbildung zusammenhängen, um so mehr, als die hohen Werte von ungefähr 200 mg% mit fortschreitender Knorpelbildung den für den Knorpel bezeichnenden Milchsäuremengen (etwa 130 mg%) immer näher kommen.

Anläßlich unserer morphologischen Beobachtungen [23] sahen wir, daß bereits am 7. Tage eine sich auf die Spongiosa-Granulationsgewebsgrenze lokalisierende bindegewebsartige Verknöcherung in Gang kommt, die in allen unsererseits beobachteten Stadien anwesend war und die das Knochenmark begrenzende Platte produziert. Darüber hinaus sind Umbauerscheinungen an den dem Granulationsgewebe naheliegenden Spongiosaabschnitten wahrnehmbar, d. h. man muß in beiden Fällen mit Osteoblastentätigkeit rechnen. CARTIER [13] fand bei der Untersuchung des Verknöcherungsprozesses, daß die Milchsäurewerte in der Initialphase steigen, später sinken, und daß die Milchsäureproduktion von der Aktivität der Osteoblasten abhängt. Er machte diese Beobachtungen bei chondraler Verknöcherung, bei welcher der Knorpel von vornherein eine größere Milchsäuremenge enthält. In unserem Fall war das präformative Gewebe nicht Knorpel, aber da in der Umgebung dennoch auch Osteoblastentätigkeit stattfindet, erkennen wir das Vorhandensein der Möglichkeit an, halten sie aber in unserem Fall nicht für primär.

Worauf also läßt sich die nach dem 26. Tage beobachtete Senkung der Milchsäurewerte zurückführen? Theoretisch wäre eine Normalisierung der Sauerstoffversorgung und im Zusammenhang damit die Aufhebung der anaeroben Richtung möglich. Dies glauben wir auf Grund sowohl des morphologischen Bildes als auch der Hämoglobinwerte ausschließen zu können. Man könnte sich ferner vorstellen, daß entweder wegen Nährstoffmangel oder Schädigung des Fermentsystems (bei einer oder mehreren Stufen) Produktionsausfall vorliegt.

Gleichzeitig könnte man aber auch annehmen, daß zwar Milchsäure entsteht (die Substanz ist also vorhanden, und die Fermentsysteme funktionieren gut), aber zur Bildung einer anderen Substanz verbraucht wird. Unsere bisherigen Ergebnisse geben keine Antwort auf diese Frage, die wir bei den weiteren Untersuchungen beachten werden.

BÜRGER und SCHLOMKA [10] nahmen im Laufe ihrer Forschungsarbeiten über das Altern Untersuchungen an bradytrophem Geweben vor, die infolge ihres herabgesetzten Kreislaufs für diesen Zweck besonders geeignet sind. Im Laufe der Untersuchungen stellten sie fest [11], daß diese Gewebe eine metachromatische Substanz in verhältnismäßig großer Menge enthielten. Auf diese Beziehung zwischen bradytrophem Gewebeszustand und metachromatischer Substanz wurde auch in anderen Mitteilungen hingewiesen (ALTSHULER und ANGEVINE [2]; FAVILLI [16]; u. a.). Bereits in der Einleitung erwähnten wir, daß für den Stoffwechsel der bradytrophem Gewebe nach einigen Angaben die anaerobe Glykolyse charakteristisch sei. Aus den Untersuchungen von KAUNITZ

und SELZER [28] sowie SCHÜRMAN und MACMAHON [43] u. a. wissen wir, daß unter den Stoffwechselveränderungen der serösen Entzündung die Anwesenheit der milchsäureproduzierenden anaeroben Glykolyse am kennzeichnendsten sei. Nach den Angaben von ALTSHULER und ANGEVINE [2] kommt es jedoch bei den subakuten und chronischen Formen der serösen Entzündung sehr oft zur Vermehrung der sauren Mukopolysaccharide. Dies wäre bereits eine zweite Beziehung — neben der obigen — zwischen der Bildung der Mukopolysaccharide und der anaeroben Glykolyse. Dieselben Autoren verweisen in ihrer zusammenfassenden Mitteilung auf die Rolle der Mukopolysaccharide in degenerativen Prozessen [1, 2] und bemerken, daß bei der Pathogenese der Sklerose, des Amyloids, Hyalins und Fibrinoids eine Ähnlichkeit in der Teilnahme der Grundsubstanz an ihrer Entstehung beobachtet werden kann. Sie erwähnen, daß auch physikalische Agenzien, wie Trauma und Hypoxie, zur Vermehrung der Mukopolysaccharide führen. Ähnlich verhält es sich auch bei verschiedenen bakteriellen Infektionen und geschwulstigen Veränderungen; ferner muß auch mit hormonalen Faktoren gerechnet werden. So stellte z. B. SZIRMAY [46, 47] bei seinen Untersuchungen über die bindegewebige Grundsubstanz des Hahnen- bzw. Kapaunenkammes fest, daß sich die Mukopolysaccharide auf Wirkung von Testosteron vermehren. FAVILLI [16] hebt diese Rolle der Schilddrüsen- und Sexualhormone gleichfalls hervor.

So scheint in manchen Fällen eine Beziehung zwischen der anaeroben Glykolyse und der Bildung der sauren Mukopolysaccharide zu bestehen, die in anderen Fällen nicht auffällt. Dennoch halten es KROMPECHER und wir (auch auf Grund der gegenwärtig an Haut verschiedenen Alters und an der Nabelschnur durchgeführten Untersuchungen) nicht für ausgeschlossen, daß zwischen der Bildung der sauren Mukopolysaccharide und der anaeroben Glykolyse eine allgemeinere Beziehung vorliegt.

In Kenntnis der vorstehend angeführten Tatsachen ergibt sich letzten Endes die Frage, inwieweit der Prozeß der Hypoxie bzw. anaeroben Glykolyse bei der Knorpelbildung eine kausale Rolle spielen bzw. als Begleiterscheinung betrachtet werden kann. Laut unserer gegenwärtigen Hypothese kann die oben besprochene »relative Hypoxie« an und für sich einen prädisponierenden Zustand, aber keinen bestimmenden Faktor der Knorpelbildung bedeuten. Dies erscheint sogleich als natürlich, wenn wir berücksichtigen, daß an den verschiedensten Stellen des Organismus — auch bei Anwesenheit pluripotenter Zellen — Hypoxie ohne Knorpelbildung zustande kommen kann. Dieser prädisponierende Faktor entwickelt sich im Laufe des sich realisierenden Knorpelbildungsprozesses zu einer Begleiterscheinung. Gleichzeitig kann die anaerobe Glykolyse des hypoxidotischen Zustandes (zusammen mit der Beschränkung anderer Kreislauffunktionen) bei der Entstehung der Mukopolysaccharide im allgemeinen, also auch der für den Knorpel bezeichnenden Mukopolysaccharide, von determinierender, kausaler Bedeutung sein.

### Zusammenfassung

Anläßlich früherer Untersuchungen beobachteten die Verfasser, daß das Knorpelgewebe unter Neodifferenzierungsverhältnissen herabgesetzte Vaskularisation aufweist bzw. sich in avaskulärer Umgebung entwickelt. Von den Folgen der verminderten Vaskularisation bzw. ihres partiellen Aufhörens behandelt vorliegende Mitteilung das Problem des Sauerstoffmangels.

An 55 Hunden wurde die Halbgelenkbildungsoperation nach KROMPECHER und PUKY vorgenommen und die Untersuchung der Tiere 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation durchgeführt. Vom operierten Gelenk wurde das an der regenerierenden Gelenkfläche angebroffene Granulationsgewebe sowie der an der Gelenkkapsel haftende Teil des Granulationsgewebes isoliert. Die beiden Granulationsgewebsschichten zeigten einen wesentlichen Unterschied, indem sich in der ersteren Knorpel entwickelt hatte, in der letzteren dagegen nicht. An 15 Hunden wurden Hämoglobinbestimmungen nach WONG, an 40 Hunden Milchsäurebestimmungen nach FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAEFFER sowie nach BARKER und SUMMERSON vorgenommen, mit denen der etwaige Sauerstoffmangel nachgewiesen werden sollte. In Anlehnung an Literaturangaben wurden die Milchsäurebestimmungen auf Grund der Überlegung durchgeführt, daß in Ermangelung des für die Stoffwechselprozesse erforderlichen Sauerstoffs anaerobe Glykolyse vor sich geht, die zur Milchsäurevermehrung führt.

Nach den Untersuchungsergebnissen nimmt der Hämoglobingehalt des Granulationsgewebes der Gelenkfläche in den untersuchten Stadien dauernd ab. Demgegenüber ergab das an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebe — in dem also Knorpel nicht entsteht — am 20., 26., 33. und 70. Tage nahestehende Werte. Auch die Resultate der Milchsäurebestimmungen in den beiden Granulationsgewebsschichten fielen unterschiedlich aus. Die Gelenkflächenschicht enthält bereits am 7. Tage mehr Milchsäure, der Höhepunkt der aus den Ergebnissen zusammengestellten Kurve ist am 26. Tage zu beobachten und liegt höher als bei der anderen Schicht. Das an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebe enthält die meiste Milchsäure am 33. Tage und zeigt bis zum 70. Tage eine geringere Senkung als die andere Schicht.

Im Besitze dieser Resultate wird es als sehr wahrscheinlich erachtet, daß sich unter den Untersuchungsbedingungen ein hypoxidotischer Zustand entwickelt hat, dem bei der Neodifferenzierungsknorpelbildung prädisponierende Bedeutung zugeschrieben wird. In der Mitteilung werden das in späteren Stadien wahrnehmbare gegensätzliche Verhalten der Hämoglobin- und Milchsäurewerte, der vorausgesetzte Mechanismus und die wahrscheinlich die Milchsäurewerte verändernden Prozesse erörtert. Unter diesen Prozessen erwähnen Verfasser die Bildung der Mukopolysaccharide und ihre Hypothese, daß die anaerobe Glykolyse des hypoxidotischen Zustandes (parallel mit der Beschränkung anderer Kreislauffunktionen) bei der Bildung der Mukopolysaccharide im allgemeinen und daher auch der für den Knorpel bezeichnenden Mukopolysaccharide von determinierender Bedeutung sein kann.

### LITERATUR

1. ALTSHULER, C. H., ANGEVINE, D. M.: (1949) Histochemical Studies on the Pathogenesis of Fibrinoid. *Amer. J. Path.* 25, 1061. — 2. ALTSHULER, C. H., ANGEVINE, D. M.: (1951) Acid Mucopolysaccharide in Degenerative Disease of Connective Tissue, with Special Reference to Serous Inflammation. *Amer. J. Path.* 27, 141. — 3. ATZLER, E., LEHMANN, G.: (1922) Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Blutgefäße von Säugetieren. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 197, 221. — 4. BÁLINT, P.: (1952) Klinikai laboratóriumi diagnosztika. Egészségügyi Kiadó, Budapest, 176. — 5. BARKER, S. B., SUMMERSON, W. H.: (1941) The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material. *J. Biol. Chem.* 38, 535. — 6. BAYLISS, W. M.: (1901) The Action of Carbondioxide on Blood Vessels. *J. Physiol.* 26, 32. zit. S. M. HILTON (26). — 7. BECKER, V.: (1954) Geweblich gebundener Sauerstoffmangel. (Histotoxisch bedingte Hypoxidosis.) *Klin. Wschr.* 32, 577. — 8. BÜCHNER, F.: (1956) Allgemeine Pathologie. Urban u. Schwarzenberg, München—Berlin. II. Aufl. — 9. BÜRGER, M.: (1949) Einführung in die pathologische Physiologie. Georg Thieme, Leipzig, III. Aufl. 476. — 10. BÜRGER, M., SCHLOMKA, G.: (1928) Ergebnisse und Bedeutung chemischer Gewebsuntersuchungen für die Altersforschung. *Klin. Wschr.* 7, 1944. — 11. BÜRGER, M.: (1939) Die chemischen Altersveränderungen an Gefäßen. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 167, 273. — 12. BYWATERS, E. G. L.: (1937) The Metabolism of Joint Tissues. *J. Path. Bact.* 44, 247. — 13. CARTIER, P.: (1951) Les constituants minéraux des tissus calcifiés. V. Les anions organiques de l'os. *Bull. Soc. Chim. biol.* 33, 161. — 14. DICKENS,

- F., WEIL-MALHERBE, H.: (1936) Metabolism of Cartilage. *Nature*, 139, 125. — 15. DICKENS, F., WEIL-MALHERBE, H.: (1936) Metabolism of Normal and Tumour Tissue. XIV. A Note on the Metabolism of Medulla of Kidney. *Biochem. J.* 30, 659. — 16. FAVILLI, F.: (1952) Probleme der Mucopolysaccharide des Bindegewebes der Schleimsubstanzen und ihre spezifischen Enzyme. *Wien. Klin. Wschr.* 64, 405. — 17. FLEISCH, A.: (1918) Experimentelle Untersuchungen über die Kohlensäurewirkung auf die Blutgefäße. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 171, 86. — 18. FLEISCH, A., WEGER, P.: (1937) Die gefäßweiternde Wirkung der phosphorylierten Stoffwechselprodukte. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 239, 362. — 19. FRIEDEMANN, T. E., COTONIO, M., SCHAFFER, PH. A.: (1927) The Determination of Lactic Acid. *J. Biol. Chem.*, 73, 335. — 20. FRUNDER, H.: (1951) Wasserstoffionenkonzentration im Gewebe lebender Tiere. G. Fischer, Jena, zit. HOLLE, G., BURKHARDT, R., ARNDT, S., BLÖDORN, M. (27). — 21. GASKELL, W. H.: (1880) On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels. *J. Physiol.* 3, 48, zit. Hilton, S. M. (26). — 22. GROSSE-BROCKHOFF, F.: (1944) Sauerstoffmangel als klinisches Problem. *Klin. Wschr.* 23, 145. — 23. HADHÁZY, Cs., OLÁH, É.: (1958) Untersuchungen über die Knorpelbildung I. Problemstellung und allgemeine histologische Untersuchungen unter Neodifferenzierungsverhältnissen. *Acta Biol. Hung.* 9, 139. — 24. HADHÁZY, Cs., KOSTENSZKY, K., OLÁH, É.: (1959) Untersuchungen über die Knorpelbildung II. Die Vaskularisationsverhältnisse bei der Gelenkbildung. *Acta Biol. Hung.* 9, 271. — 25. HILLS, G. M.: (1940) The Metabolism of Articular Cartilage. *Biochem. J.* 34, 1070. — 26. HILTON, S. M.: (1953) Experiments on the Postcontraction Hyperaemia of Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 120, 230. — 27. HOLLE, G., BURKHARDT, R., ARNDT, S., BLÖDORN, M.: (1955) Über manometrische, histochemische, histologische und phasenoptische Befunde bei ischämischer Hypoxydase. *Virchows Arch. path. Anat.* 327, 150. — 28. KAUNITZ, H., SELZER, L.: (1938) Respirationsversuche über den Sauerstoffbedarf bei verschiedenen mit seröser Entzündung einhergehenden Gewebsschädigungen. *Z. ges. exp. Med.*, 103, 643. — 29. KELLER, C. J., LOESER, A., REIN, H.: (1930) Die Physiologie der Skelettmuskeldurchblutung. *Z. Biol.* 90, 260. — 30. KROMPECHER, ST.: (1955) La régénération et néoformation expérimentale des articulations. VI. Congrès Fédératif International d'Anatomie (Paris, 25–30 juillet 1955). *C. R. de l'Ass. des Anat.* 91, 813. — 31. KROMPECHER, ST. (1956) Die Beeinflussbarkeit der Gewebsdifferenzierung der granulierenden Knochenoberflächen, insbesondere die der Callusbildung. *Langenbeck's Arch. u. Dtsch. Z. Chir.*, 281, 474. — 32. KROMPECHER, ST.: (1958) Die qualitative Adaptation der Gewebe. *Z. mikr. anat. Forsch.*, 65, 59. — 33. KROMPECHER, ST.: (1958) A szövetdifferenciálódás kísérleti befolyásolása, különös tekintettel az izületképzésre. *M. T. A. Biol. Oszt. Közl. I.*, 81. — 34. KRONTOWSKI, A. A., MAGATH, M. A.: (1930) Glykolyse und Aciditätszunahme in den Gewebskulturen und analoge Erscheinungen im Organismus. *Klin. Wschr.*, 9, 2165. — 35. LIPSCHITZ, W. L., BUEHING, E.: (1939) *J. Biol. Chem.* 129, 333, zit. ARTZ, N. E., OSMAN, E. M.: *Biochemistry of Glucuronic Acid*. 1950. Academic Press, Inc., New York. — 36. LONG, C.: (1946) The Stabilisation and Estimation of Lactic Acid in Blood Samples. *Biochem. J.* 40, 27. — 37. MEYERHOF, O., LOHMANN, K.: (1934) Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. *Biochem. Z.*, 271, 89. — 38. MEVES, H.: (1953) Die Wirkung der Wasserstoffionen und der Kohlensäuren auf Gefäße und Muskulatur der Froschlunge. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 257, 259. — 39. NEUHAUS, C.: (1930) Über den Stoffwechsel des Granulationsgewebes (Atmung und Glykolyse). *Beitr. path. Anat.*, 83, 383. — 40. OKUNEFF, N.: (1933) Über einige physico-chemische Erscheinungen während der Regeneration. V. Über den Milchsäuregehalt regenerierender Axolotl Extremitäten. *Biochem. Z.*, 257, 242. — 41. RIEGLER, R.: (1932) Über die Ursache der vermehrten Durchblutung des Muskels während der Arbeit. *Verh. d. Dtsch. Pharmakol. Gesellschaft*, 11. Tagung, 8–11. IV. 1932, Wiesbaden. *Arch. exp. Path. Pharm.*, 167, 54. — 42. SCHRÖDER, W., SCHOOP, W., STEIN, E.: (1944) Die Durchblutung der Extremität im akuten Sauerstoffmangel unter besonderer Berücksichtigung der Funktion der arterio-venösen Anastomosen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 259, 124. — 43. SCHÜRMAN, P., MACMAHON, H. E.: (1933) Die maligne Nephrosklerose zugleich ein Beitrag zur Frage der Bedeutung der Blutgewebsschranke. *Virchows Arch. path. Anat.*, 291, 47. — 44. VAN SLYKE, D. D.: (1917) *J. Biol. Chem.*, 32, 455, zit. FRIEDEMANN, T. E., COTONIO, M., SCHAFFER, PH. A. (19). — 45. STRUGHOLD, H.: (1944) Hypoxydase. *Klin. Wschr.*, 23, 221. — 46. SZIRMAI, J. A.: (1956) Studies on the Connective Tissue of the Cock Comb I. Histochemical Observations on the Ground Substance. *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 96. — 47. SZIRMAI, J. A.: (1956) Studies on Connective Tissue of the Cock Comb. II. Effect of Androgens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93, 92. — 48. TANKÓ, B.: (1942) Vergleichende Glykolyse- und Atmungsversuche mit Glykogen und Fructosediphosphat im Muskel. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 276, 1. — 49. TANKÓ, B.: Persönliche Mitteilung. — 50. WENT, I.: (1958) *Élettan, Medicina Kiadó, Budapest.*

### ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ХРЯЩЕЙ Ш. СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙСЯ ПОВЕРХНОСТИ СУСТАВА В РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РЕГЕНЕРАЦИИ

Е. ОЛАХ, Ч. ХАДХАЗИ и К. КОШТЕНСКИ

В ходе предшествующих исследований авторы наблюдали, что в условиях неодифференциации хрящевая ткань выявляет сниженную васкуляризацию или же она развивается в бессосудистой среде. Среди последствий уменьшенной васкуляризации или же частичного прекращения прорастания сосудов, авторы в настоящем сообщении занимаются проблемой кислородного голодания.

На 55 собаках проводились операции по Кромпехеру и Пуки для образования полусуставов, а затем по истечении 7, 20, 26 и 33, далее 70 дней после вмешательства животных подвергали исследованию. На оперированных животных авторы изолировали грануляционную ткань на восстанавливающейся поверхности сустава, как и ту часть грануляционной ткани, которая прилипла к капсуле сустава. Между двумя слоями грануляционной ткани они наблюдали значительную разницу, поскольку в первом слое образовался хрящ, а во втором последний отсутствовал. 15 собак использовались для выявления гемоглобина по Вонгу, а на 40 собаках проводилось определение молочной кислоты по методу Фридемманн—Котонио—Шаффера, как и Баркер—Саммерсона. Целью определений было выявление возможного кислородного голодания. Выявление молочной кислоты — опираясь на литературные данные — проводилось на основе того размышления, что вследствие отсутствия кислорода, необходимого для процессов обмена веществ, происходит анаэробный гликолиз, что обуславливает аккумуляцию молочной кислоты.

Результаты авторов доказали, что содержание гемоглобина в грануляционной ткани поверхности сустава в исследованных стадиях постоянно уменьшается. В противоположность этому прилипающая к сумке сустава грануляционная ткань, — значит в которой не образуется хряща — в 20, 26, 33 и 70 дневных стадиях дает близкие друг к другу величины. Результаты определений молочной кислоты также различны в двух слоях грануляционной ткани. Грануляционная ткань на поверхности сустава уже на 7 день содержит больше молочной кислоты, а максимум кривой, составленной из полученных результатов, проявляется на 26. день, и показывает большую величину, чем предыдущий слой. Прилипающая к сумке сустава грануляционная ткань содержит больше всего молочной кислоты на 33. день, а к 70. дню это содержание уменьшается в меньшей мере, чем в случае другого слоя.

На основе своих результатов авторы считают весьма вероятным, что при данных экспериментальных условиях развивалось состояние кислородного голодания, которому они приписывают предрасполагающее значение в неодифференциационном образовании хрящей. Авторы обсуждают в настоящей статье противоположное поведение величин гемоглобина и молочной кислоты, наблюдаемое в более поздних стадиях, далее предположенный ими механизм, как и процессы, предположительно альтертирующие величины молочной кислоты. Среди этих процессов следует отметить образование мукополисахаридов, как и то предположение авторов, что анаэробный гликолиз при состоянии кислородного голодания (вместе с ограничением других функций кровообращения) может иметь решающее значение в образовании мукополисахаридов вообще, следовательно и в образовании таких соединений, характерных для хрящей.

#### INVESTIGATIONS OF CHONDROGENESIS

##### III. Haemoglobine and lactic acid content of the regenerating joint surfaces in different steps of the regeneration

É. OLÁH, CS. HADHÁZY and K. KOSTENSZKY

In previous investigations it has been found that under the conditions of neodifferentiation, cartilage was growing in an environment poorly vascularized or wholly avascular. The present study deals with oxygen deficiency, as one of the results of the poor, or the partially absent, vascularization.

The semi-arthroplastic operation of Krompecher and Puky was performed on 55 dogs which were then studied 7, 20, 26, 33 and 70 days after surgery, respectively. The granulation

tissue on the regenerating articular surface and that adhering to the articular capsule were removed from the operated joints. The two strata of granulation tissue considerably differed from each other, insofar as one contained cartilage, whereas the other did not. Haemoglobin was determined according to Wong in 15 dogs, and in 40 dogs lactic acid determinations were carried out, by Friedemann—Cotonio and Schaffer's as well as Barker and Summerson's methods, in order to demonstrate the presence of oxygen deficiency. The lactic acid content was studied on the basis of the previous consideration that a lack of oxygen caused anaerobic glycolysis and this would lead to an accumulation of lactic acid.

The results indicated that the haemoglobin content of the granulation tissue on the joint surface was constantly decreasing during the stages tested. In contrast with this, the granulation tissue attached to the articular capsule (in which no cartilage had formed) yielded closely similar values after 20, 26, 33 and 70 days. The two kinds of granulation tissue contained different amounts of lactic acid. The granulation tissue on the articular surface contained more lactic acid from the 7th day on; the curve for its lactic acid content reached a peak after 26 days, and ran above that for the other kind of granulation tissue, which showed the maximum of lactic acid to be present on the 33rd day. The subsequent decrease of the lactic acid content was slower in the latter kind of granulation tissue, as judged from the 70 day values.

Our results tend to indicate that under the given conditions a hypoxic state develops and this seems to play the role of a predisposing factor in neodifferentiative cartilage growth. The divergence between the haemoglobin and lactic acid values during the later stages, the probable mechanism of the process, as well as the factors possibly affecting the lactic acid content, have been discussed, especially the formation of mucopolysaccharides. In our opinion, together with restrictions in other circulatory functions, the anaerobic glycolyses resulting from the oxygen deficiency may be of decisive importance in the formation of mucopolysaccharides in general, and of similar compounds peculiar to cartilage in particular.

Éva OLÁH

Dr. Csaba HADHÁZY

Dr. Katalin KOSTENSZKY

} Debrecen, 12. Anatomia, Ungarn