

Biochemische Untersuchungen zur Wirkungsweise des GAG-Peptid-Komplex Rumalon®

M. Adam, M. Krabcová, V. Pešáková

Abteilung für Bindegewebforschung des Rheumaforschungsinstitutes, Prag, Tschechoslowakei

Die Diagnose Osteoarthrose nimmt Bezug auf verschiedene ätiologisch-pathogenetische Faktoren. Das klinische Bild zeigt deutliche Unabhängigkeit von den makroskopisch und mikroskopisch nachweisbaren morphologischen Veränderungen. Nicht selten bleibt ein Gelenk trotz erheblicher pathologischer anatomischer Veränderungen lange Zeit symptomfrei, es besteht eine »latente Osteoarthrose«. Später kann es aus verschiedenen Gründen zu einem schmerzhaften Stadium, zu einer »aktivierten Osteoarthrose« kommen. Im weiteren Verlauf wird die nähere oder weitere Umgebung des Gelenkes in den pathologischen Prozeß einbezogen. Kommt es zu Störungen der muskulären Funktionen, so spricht man von »Dekomensation der Osteoarthrose«. Phasen einer Aktivierung und Dekompensation mit Auftreten von Schmerzen und reflektorischer Dysfunktion sind besonders in den Frühstadien der Osteoarthrose reversibel. Die therapeutischen Maßnahmen haben prinzipiell zum Ziel, die dekompenzierte und aktivierte Osteoarthrose wieder in eine latente Phase zu überführen. Von einer kausalen Therapie kann man derzeit kaum sprechen, da die osteoarthrotischen Veränderungen als irreversibel zu betrachten sind. Wir sind allenfalls

Zusammenfassung

Rumalon hat sich klinisch als erfolgreiches Therapeutikum der Osteoarthrose erwiesen. Der Wirkungsmechanismus dieses GAG-Peptid-Komplex auf den Stoffwechsel von Knorpel und Bindegewebe wurde daher an verschiedenen Testsystemen in vivo und in vitro biochemisch untersucht.

Rumalon erhöhte in Untersuchungen am Hühnerembryo den Einbau von radiomarkierten Praecursoren in Proteoglykan und Kollagen von Gelenk-, Sternal- und Rippenknorpel. Es zeigte sich, daß insbesondere die Synthese der Proteoglykan-Link-Proteine gefördert wird. Die Wirkung war am deutlichsten im Gelenkknorpel. Die Kollagensynthese in Bindegewebe von Kornea und Sklera wurde weniger beeinflußt. Am Granulom der Ratte war nach subkutaner Implantation eines Polyurethanschwammes die Synthese von Typ I Kollagen deutlich verstärkt, nicht die von Typ III Kollagen. In Versuchen zum Einbau der Praecursoren von Proteoglykan und Kollagen in normalen und osteoarthrotischen menschlichen Gelenkknorpel stimulierte Rumalon die Kollagensynthese nur am osteoarthrotischen Knorpel, der bereits deutlich verstärkte Synthese gegenüber der Norm zeigte. Der Einbau in Proteoglykan war bei Osteoarthrose reduziert, insbesondere war die Synthese der Link-Proteine betroffen. Rumalon förderte den Einbau von Praecursoren in Proteoglykan bei normalem und Osteoarthroseknorpel, insbesondere in die Linkproteine. Die Resultate führten insgesamt zur Vorstellung, daß Rumalon in diesen Untersuchungen zu einer Stabilisierung der Knorpelmatrix führt.

Vergleichende Untersuchungen betrafen DAK 16, eine hochmolekulare Fraktion aus Rumalon sowie verschiedene Komponenten des GAG-Peptid-Komplex. Dabei zeigten sich unterschiedliche Effekte. Auffällig war die hohe Aktivierung des Glykosaminoglykaneinbaus in Proteoglykan durch den Knochenmarkextrakt. Sonst erwies sich der Gesamtextrakt wirksamer als die untersuchten Komponenten.

Biochemical Investigations on the Mode of Action of GAG-Peptide-Complex (Rumalon®)

Rumalon has shown itself clinically to be an effective medication for osteoarthritis. The manner in which this GAG-peptide-complex acts upon the metabolism of cartilage and connective tissue has therefore been studied biochemically in various test systems both in vivo and in vitro.

In studies on chicken embryos, Rumalon augmented the incorporation of radioactively tagged precursors into the proteoglycan and collagen of articular, sternal and costal cartilage. It was found that in particular the synthesis of the proteoglycan link proteins is promoted. The effect was most clearly apparent in the articular cartilage. Collagen synthesis in the connective tissue of the cornea and sclera was less markedly influenced. In rat granulomas after subcutaneous implantation of a polyurethane sponge, the synthesis of type I collagen was markedly increased while that of type III collagen was not. In investigations of the incorporation of the precursors of proteoglycan and collagen into normal and osteoarthrotic human cartilage, Rumalon stimulated collagen synthesis only in osteoarthrotic cartilage, which already showed a marked increase in synthesis in relation to the normal. Incorporation into proteoglycan was reduced in osteoarthritis, the synthesis of the link proteins being particularly affected. Rumalon promoted the incorporation of precursors into proteoglycan in normal and osteoarthrotic cartilage, in particular into the link proteins. On the whole the results indicated that in these studies Rumalon tends to stabilise the cartilage matrix.

Comparative studies were carried out with DAK 16, a high-molecular fraction from Rumalon, and various components of the GAG-peptide-complex. In this connection differing effects were observed.

A striking feature was the marked activation by the bone marrow extract of the incorporation of glycosaminoglycan into proteoglycan. Otherwise the complete extract was found to be more effective than the investigated components.

imstande, die Progredienz medikamentös zu bremsen, in den Frühstadien vielleicht zu verhüten.

Die Osteoarthritis führt zu einem enzymatisch verstärkten Abbau des Kollagens und Proteoglykans, der durch eine gesteigerte Synthese nicht kompensiert werden kann. Von einer wirksamen Basistherapie der Osteoarthritis ist daher zu fordern, daß sie die pathologischen Abbauvorgänge in der Grundsubstanz des Knorpels hemmt und die Syntheseaktivität der Chondrozyten stimuliert. Da bislang keine klinisch-chemischen Parameter existieren, mit deren Hilfe sich die Intensität der osteoarthrotischen Prozesse bestimmen ließe, ist es schwierig, den Therapieeffekt zu verfolgen und zu entscheiden, ob das Medikament die anabolen oder katabolen Vorgänge beeinflusst.

Für die Basistherapie der Osteoarthritis steht seit längerer Zeit GAG-Peptid-Komplex = GAG-Pep (= Rumalon, Robapharm) zur Verfügung, der sich klinisch als erfolgreich erwiesen hat. Aus diesem Grund haben wir die Wirkung von Rumalon auf die Kollagen- und Proteoglykansynthese in vitro untersucht.

In einer *ersten Versuchsreihe* (Adam et al., 1) haben wir den Effekt von GAG-Pep auf 13 Tage alte Hühnerembryonen geprüft. GAG-Pep ohne Zusatz des Stabilisans Metakresol wurde unter sterilen Bedingungen in die Chorioallantois-Höhle eingebracht (Dosierungen siehe die betreffenden Abbildungen). Zur Untersuchung der Wirkung auf die Kollagensynthese wurden gleichzeitig $10 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Prolin in 0,1 ml Kochsalz-Lösung injiziert. Nach der Inkubationsdauer von 24 Stunden bei 37°C wurden die Embryonen freipräpariert und dekapitiert. Knorpel der Kniegelenke, vom Sternum und den Rippen wurde entnommen. Nach dem in Tab. 1 angeführten Vorgehen wurde Kollagen extrahiert. Zum Vergleich der Wirkung von GAG-Pep auf die Synthese von Knorpelkollagen mit der Wirkung auf die Kollagensynthese anderer Gewebe wurde der Gehalt an Hydroxyprolin, resp. an ^{14}C -Radioaktivität im Kollagen von Kornea und Sklera, die anstelle des Knorpelkollagens Typ II, Kollagen Typ I und III enthalten, bestimmt.

Die spezifische Radioaktivität der in 1 mM NaCl löslichen Kollagenfraktion aus dem Gelenkknorpel war nach der GAG-Pep-Behandlung 6,5mal höher als bei den nichtbehandelten Kontrollen. Beim Sternalknorpel stieg die Radioaktivität nach der Verabreichung von GAG-Pep etwa auf das 2,5fache an (s. Abb. 1).

Tab. 1 Isolation von Kollagen Typ II aus Knorpel von Hühnerembryonen

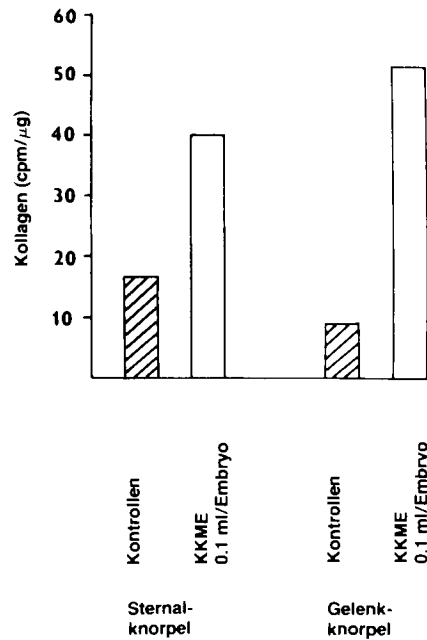
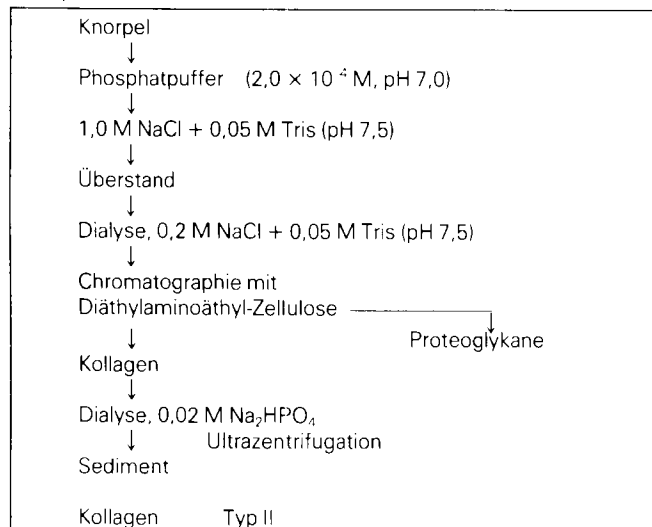


Abb. 1 Wirkung von GAG-Pep auf das Gelenkknorpel- und das Sternalknorpel-Kollagen (in 1,0M NaCl lösliche Fraktion) beim Hühnerembryo.

GAG-Pep führte auch zu erhöhtem Einbau von Radioaktivität in die Kornea und in die Sklera. Die Zunahme war jedoch nicht so ausgeprägt wie am Knorpel, insbesondere am Gelenkknorpel (Abb. 2).

In der gleichen Versuchsanordnung wie für die Kollagenuntersuchung wurde GAG-Pep zusammen mit $10 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Glucosamin in 0,1 ml physiol. NaCl pro Ei injiziert. 24 Stunden später wurden an den freipräparierten Embryonen die Kniegelenkknorpel entnommen. Die Glykosaminoglykane (GAG) wurden nach Pepsinverdauung unter Anwendung der Methode von Praus (12) isoliert und anschließend Hexosamin und ^{14}C Radioaktivität bestimmt. Die Resultate sind in Abb. 3 graphisch dargestellt. Bei beiden angewandten Dosierungen von GAG-Pep wurde ein deutlicher Anstieg der spezifischen Radioaktivität der GAG gemessen.

In unserer *zweiten Versuchsreihe* haben wir Polyurethanschwamm-Granulome zum Nachweis der GAG-Pep-Wirkung benutzt. Schwämmchen der Versuchsgruppe wurden vor der subkutanen Implantation unter sterilen Bedingungen mit gleichen Mengen von GAG-Pep imprägniert. Am 5. Tag nach der Implantation wurden $50 \mu\text{Ci}/100 \text{g}$ Körpergewicht ^{14}C -Prolin intraperitoneal injiziert. 48 Stunden später wurden die Tiere getötet. Die entnommenen Granulome wurden im Phosphatpuffer homogenisiert und das Kollagen extrahiert (Adam et al., 2). Kollagen-Typ III wurde nach Pepsinabbau nach der Methode von Fujii et al. (6) bestimmt.

GAG-Pep steigerte auch die Kollagensynthese im Polyurethanschwamm-Granulom. Die Zunahme der Radioaktivität war höher in der neutral-salz-löslichen Kollagenfraktion (NLK), die als Maß der Kollagenbiosynthese zu betrachten ist, als im säurelöslichen Kollagen (SLK), (Abb. 4). Die Radioaktivität der NLK-Fraktion erreichte bei den mit GAG-Pep-behandelten Schwämmen etwa 90% höhere Werte als bei den Kontrollschwämmen. Von großem Interesse ist das Verhältnis des Kollagens Typ I zum Kollagen Typ III im Granulationsgewebe. Es betrug bei den

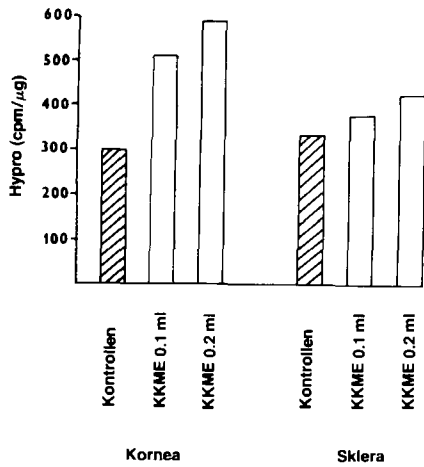


Abb. 2 Wirkung von GAG-Pep auf das Kornea und das Sklera-Kollagen beim Hühnerembryo.

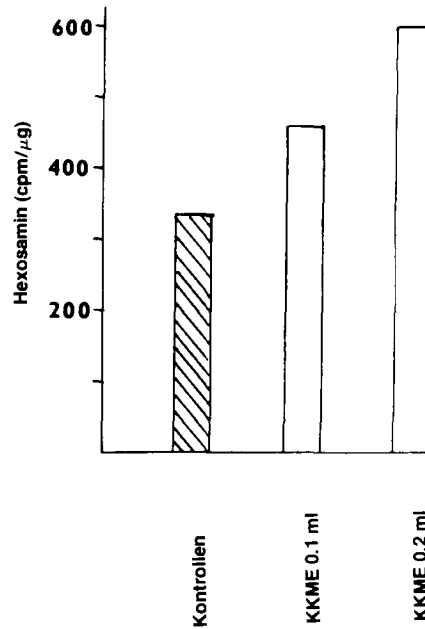


Abb. 3 Wirkung von GAG-Pep auf den Metabolismus der GAG im Gelenknorpel des Hühnerembryos.

Kontrollen 0,34, bei den mit GAG-Pep-behandelten Schwämmen lag es bei 1,268. Aus diesen Resultaten ist abzuleiten, daß GAG-Pep im Granulationsgewebe vorwiegend die Bildung von Kollagen Typ I stimuliert.

In der dritten Versuchsreihe haben wir normalen und osteoarthrotischen menschlichen Knorpel vom Femurkopf benützt (Adam et al., 3). Schnitte von Knorpel (1 g pro Probe) wurden mit ³H-Prolin (100 μCi/g Knorpelfeuchtgewicht) oder mit ¹⁴C-Glucosamin (50 μCi/g Knorpelfeuchtgewicht) und ³H-Leucin (100 μCi/g Knorpelfeuchtgewicht) in 4 ml Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung (pH 7,4) mit 20 mM D-Glukose und 10 mM L-Glutamin (37° C, 6 Stunden) inkubiert. Einem Teil der Proben wurden 80 μl GAG-Pep zugesetzt.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit kalter Kochsalzlösung ab gespült und in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Knorpelhomogenate wurden nachher mit 4 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) in 50 mM Natriumacetat (pH 5,8; 48 Stunden; 4° C) extrahiert.

Die GuHCl-Konzentration wurde mittels Dialyse gegen Na-Acetat-Puffer, pH 5,8, auf 0,4 mM verringert. Zur Herstellung einer Dichte von 1,69 g/ml wurde festes CsCl (1,19 g/l g Lösung) zugesetzt und danach zentrifugiert (48 Stunden, 20° C, 95 000 g) (Sajdera et al. 14). Die Bodenfraktion (5 ml), welche

Proteoglykanaggregat enthält, wurde dann zur weiteren Verwendung getrennt. Zur Herstellung einer Dichte von 1,5 g/ml wurden gleiche Mengen GuHCl (7,6 mM) in 0,05 M Natriumacetat, pH 5,8, sowie festes CsCl zugesetzt (Hascall et al., 7). Die Lösung wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben zentrifugiert. Die so gebildeten Gradienten wurden in 3 Teile fraktioniert, enthaltend entweder überwiegend Proteoglykanuntereinheiten (Fraktion A₁ D₁ D₂), resp. Hyaluronsäure (Fraktion A₁ D₃ D₄), resp. Link-Glykoprotein (Fraktion A₁ D₅). In den Kollagenversuchen wurde das Knorpelhomogenat zuerst mit GuHCl vorextrahiert und dann dem proteolytischen Abbau durch Proteinase ausgesetzt.

Die bei der Untersuchung des radiomarkierten Kollagens erhaltenen Resultate zeigen deutlich die Wirkungsweise von GAG-Pep: Während beim normalen Knorpel die Zugabe von GAG-Pep keine wesentliche Zunahme der eingebauten Radioaktivität ergab, wurden am osteoarthrotischen Knorpel, in welchem die Stoffwechsellvorgänge sehr viel stärker ausgeprägt sind (Steigerung des Prolineinbaus um + 127%), unter Einwirkung von GAG-Pep noch sehr viel höhere Werte (+ 73%) gemessen (Tab. 2).

Die Beeinflussung des Proteoglykanstoffwechsels des osteoarthrotischen Knorpels scheint anderer Natur als die des Kollagens

Tab. 2 Wirkung des GAG-Pep auf den Kollagenstoffwechsel im menschlichen Gelenknorpel nach sechsständiger Inkubation. Markierung mit ³H-Prolin (100 μCi/g Knorpelfeuchtgewicht)

		dpm/g Kollagen
Normaler Knorpel	Kontrolle	77 080
	GAG-Pep (80 μl/g Knorpelfeuchtgewicht)	78 030
Osteoarthrotischer Knorpel	Kontrolle	175 660
	GAG-Pep (80 μl/g Knorpelfeuchtgewicht)	305 000

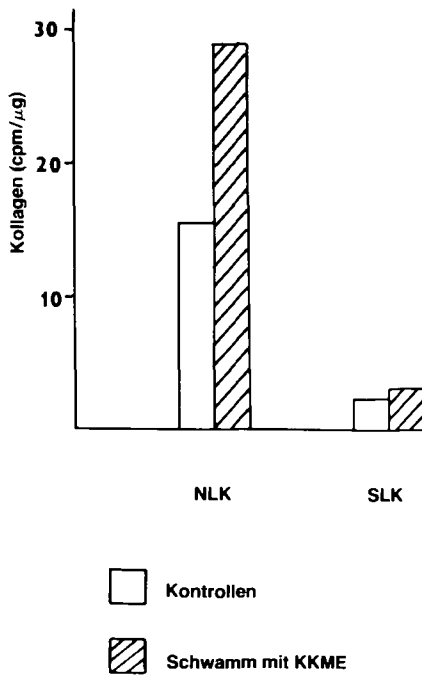


Abb. 4 Wirkung von GAG-Pep auf die Kollagensynthese beim Polyurethanschwammgranulom der Ratte.

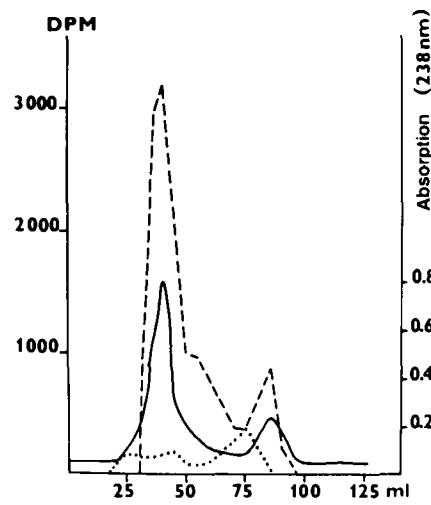


Abb. 5 Wirkung von DAK 16 auf den Proteoglykan-Proteincore-Gehalt des Knorpels von 3–4 Tage alten Ratten nach sechsständiger Inkubation. Markierung mit ³H-Prolin. Chromatographische Trennung an Sepharose 4B Säule (100 × 0,95 cm). Die Säule wurde mit 0,5M Natriumacetat (pH 7,0) equilibriert und eluiert (V₀ = 20 ml).
Radioaktivität: Kontrolle
DAK 16 Behandlung - - - - -
Gesamtproteininhalt (Absorption bei 238 nm) _____

zu sein. Die Radioaktivität in den Proteoglykanfraktionen wurde unter Einwirkung von GAG-Pep auch im gesunden Knorpel erhöht, allerdings ebenfalls im osteoarthrotischen Knorpel noch deutlich verstärkt (Tab. 3).

Der größte Anstieg der Radioaktivität wurde in Fraktion A₁D₅ beobachtet, welche hauptsächlich Link-Glykoprotein enthält. Der Einbau von Radioaktivität in diese Fraktion war bei osteoarthrotischem Knorpel im Vergleich mit normalem Knorpel sehr deutlich reduziert. Da das Link-Protein für die Bindung zwischen Hyaluronsäure und Proteoglykansubeinheiten eine unabdingbare Rolle spielt, kann die Normalisierung der bei Osteoarthrose reduzierten Synthese dieses Proteins als eine bedeutende Wirkung der GAG-Pep-Behandlung bezeichnet werden.

Die Ergebnisse, die beim Vergleich von normalem und osteoarthrotischem menschlichem Knorpel gewonnen wurden, zeigen,

daß die Wirkung von GAG-Pep wahrscheinlich mehr die katabolen als die anabolen Vorgänge, zumindest in vitro beeinflusst. Diese Schlußfolgerung steht in Übereinstimmung mit den Befunden, wonach GAG-Pep verschiedene Hydrolasen hemmt (Weigel et al., 16; Baici et al., 4).

In unserer 4. Versuchsreihe haben wir die Wirkung von DAK 16, der hochmolekularen Fraktion des GAG-Pep geprüft. In diesen Versuchen haben wir Hyalinknorpel und Haut von 2–4 Tage alten Ratten benützt. Die Gewebe-Homogenate wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei den Versuchen mit menschlichem Knorpel mit ³H-Prolin (50 μCi/g Gewebefeuchtgewicht) oder mit ³H-Prolin und ¹⁴C-Glukosamin (25 μCi/g Gewebefeuchtgewicht) inkubiert. DAK 16 (10 mg/g Gewebefeuchtgewicht) wurde bei einem Teil der Proben zugesetzt. Hautkollagen wurde anschließend mit 0,15 M resp. 0,45 M NaCl, Knorpelkol-

Tab. 3 Wirkung des GAG-Pep auf den Proteoglykanstoffwechsel im menschlichen Gelenkknorpel nach sechsständiger Inkubation. Markierung mit ³H-Leucin und ¹⁴C-Glukosamin (100 μCi bzw. 50 μCi/g Knorpelfeuchtgewicht)

		Fraktion							
		A ₁	A ₁ D ₁ D ₂	A ₁ D ₃ D ₄	A ₁ D ₅	A ₁	A ₁ D ₁ D ₂	A ₁ D ₃ D ₄	A ₁ D ₅
Normaler Korpel	Kontrolle	11320	15153	19885	16660	3337	7537	14599	24669
	GAG-Pep (80 μl/g Knorpelfeuchtgewicht)	21439	12313	20805	18581	8640	5515	15814	44166
Osteoarthrotischer Knorpel	Kontrolle	10355	8277	15610	5602	4345	2391	9552	4820
	GAG-Pep (80 μl/g Knorpelfeuchtgewicht)	19152	10367	18325	13081	7462	3904	14210	19211

lagen mit 1 M NaCl und 6 M Harnstoff-Lösungen extrahiert. Aus diesen Lösungen wurde Hydroxyprolin (nach Juva et al., 8) isoliert und auf Quantität (Stegemann, 15) und Radioaktivität untersucht (Tab. 4).

Proteoglykan wurde nach der Inkubation mit 4 M GuHCl extrahiert, wie in unserer 3. Versuchsreihe beschrieben zentrifugiert und anschließend die Radioaktivität gemessen (Tab. 5). Wie bereits früher von Kalbhen et al. (10) beschrieben, erhöht DAK 16 den Einbau der Praecursoren in beide hochmolekularen Komponenten des Bindegewebes, Kollagen und Proteoglykan. Die Fraktionierung des isolierten Knorpelproteoglykans nach Molekulargewicht auf Sepharose 4B zeigt deutlich die Unterschiede zwischen den mit DAK 16 behandelten und den unbehandelten Proben (Abb. 5, 6).

In einer 5. Versuchsreihe haben wir die Wirkung von GAG-Pep mit der Wirkung seiner Komponenten verglichen. Die Knorpelhomogenate von Hühnerembryonen haben wir wie früher mit GAG-Pep, außerdem mit zwei verschiedenen Knorpelextrakten und einem Knochenmarkextrakt inkubiert (10 mg von jedem Extrakt/g Knorpelfeuchtgewicht) und anschließend Kollagen und Proteoglykan extrahiert. Die Bedingungen für Inkubation und Extraktion entsprachen denen der 4. Versuchsreihe. Die Resultate zeigten, daß die verschiedenen Komponenten unterschiedliche Effekte auf den Stoffwechsel von Kollagen und Proteoglykan ausüben; der Gesamtextrakt GAG-Pep zeigte jedoch die ausgeprägteste Wirkung. Der Einbau an Radioaktivität der mit GAG-

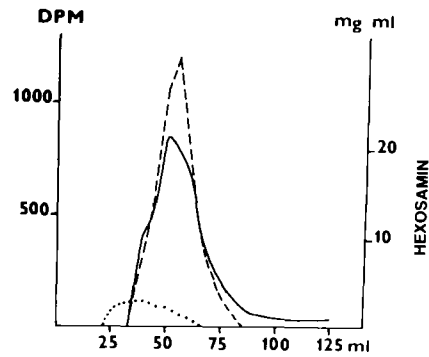


Abb. 6 Wirkung von DAK 16 auf den Glykosaminoglykangehalt des Knorpelproteoglykans von 3–4 Tage alten Ratten. Markierung mit ¹⁴C-Glukosamin (s. Tab. 5). Chromatographische Trennung an Sepharose 4B Säule entsprechend den Versuchen Abb. 5.

Radioaktivität: Kontrolle
 DAK 16 Behandlung -----
 Gesamthexosamingehalt (kolometrisch) _____

Pep behandelten Proben war am größten, sowohl im Kollagen als auch im Proteoglykan. Nur der Einbau von Glucosamin im Proteoglykan zeigte nach Behandlung mit Knochenmarkextrakt einen größeren Anstieg (Tab. 6).

Tab. 4 Wirkung des DAK 16 auf den Kollagenstoffwechsel der Rattensäuglinge nach sechsständiger Inkubation. Markierung mit ³H-Prolin (50 µCi/g Knorpelfeuchtgewicht)

	0,15 NaCl	Haut 0,45 NaCl Extrakt	1M NaCl	Knorpel 6M Harnstoff Extrakt	Rest
	in dpm/µ hyp				
Kontrolle	358	390	278	298	34
DAK 16	503	473	403	465	95

Tab. 5 Wirkung des DAK 16 auf den Proteoglykanstoffwechsel (4M GuHCl Extrakt) der Rattensäuglinge nach sechsständiger Inkubation mit ¹⁴C-Glukosamin und ³H-Prolin (25 µCi bzw. 50 µCi/g Knorpelfeuchtgewicht)

	Haut		Knorpel	
	dpm/mg Hexosamin	dpm/mg Protein	dpm/mg Hexosamin	dpm/mg Protein
Kontrolle	645 000	84 000	230	410
DAK 16	1 025 000	137 000	2 530	4 110

Hexosamin wurde mit der Methode von Randle und Morgan (13) und Protein mit der Methode von Lowry (11) bestimmt.

Tab. 6 Wirkung von verschiedenen Extrakten auf den Kollagen- und Proteoglykanstoffwechsel im Knorpel der Hühnerembryonen nach sechsständiger Inkubation. Markierung mit ³H-Prolin und ¹⁴C-Glukosamin (50 µCi bzw. 25 µCi/g Knorpelfeuchtgewicht)

Lösungsmittel Extrakte	Kollagen		Proteoglykan 4M GuHCl	
	1M NaCl in dpm/1mM hyp	6M Harnstoff	³ H in dpm/1 µg Protein	¹⁴ C in dpm/1 µg Hexosamin
Kontrolle	215	214	50	56
Knorpel I	454	292	117	171
Knorpel II	695	267	237	388
Knochenmark	680	320	161	792
Knorpelknochenmark	802	397	401	410

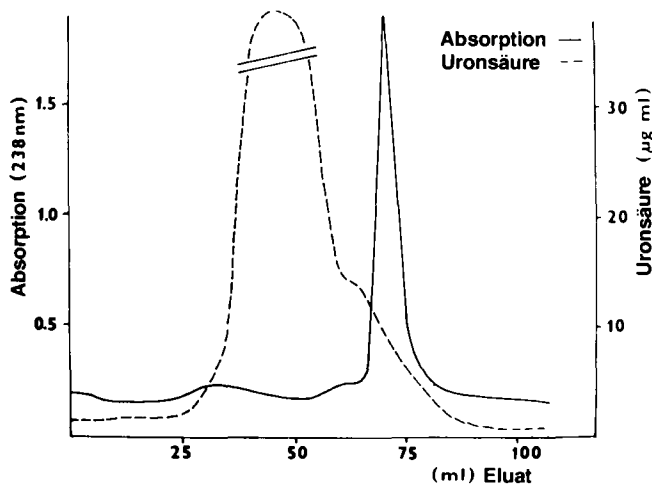


Abb. 7 Knorpel-Extrakt I.

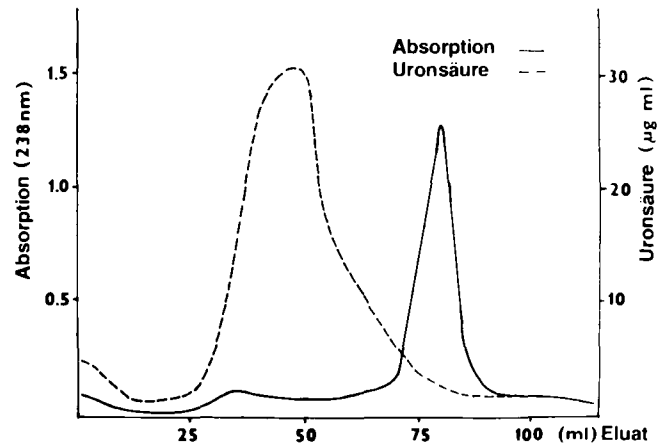


Abb. 10 GAG-Peptid-Komplex (GAG-Pep).

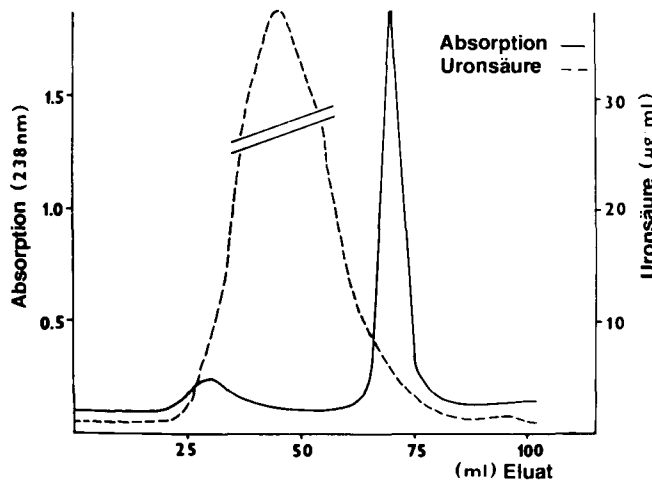


Abb. 8 Knorpel-Extrakt II.

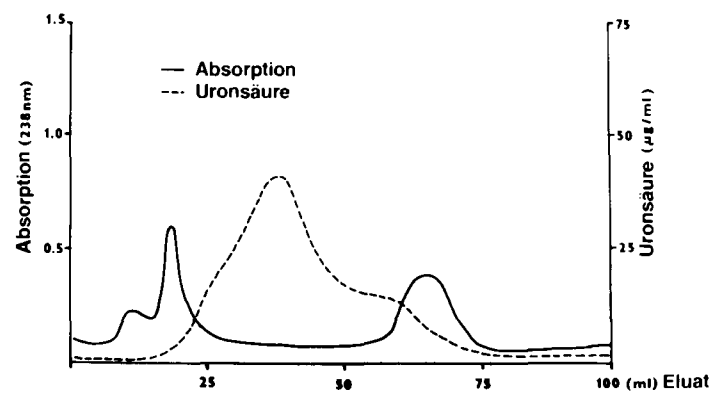


Abb. 11 DAK 16.

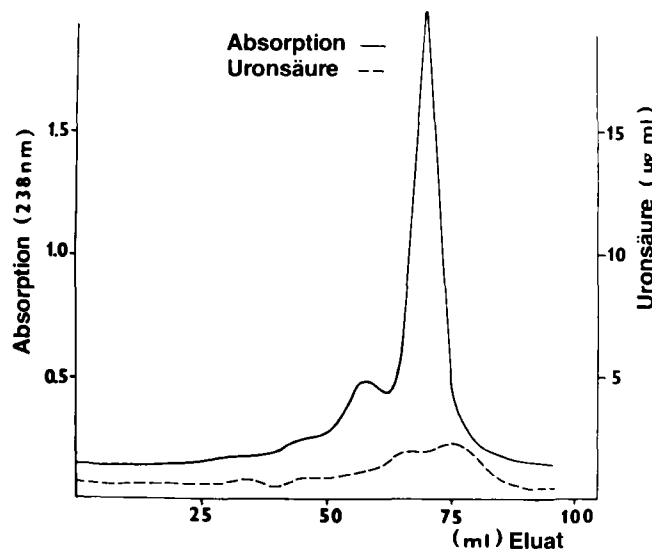


Abb. 9 Knochenmark-Extrakt.

Abb. 7–11 Chromatographische Auftrennung der verschiedenen KKME-Komponenten, deren Effekt auf Knorpel von Hühnerembryonen untersucht wurde. Sepharose 4B Säule (100 × 0,95 cm) wurde mit 0,5M Natriumacetat (pH 7) equilibriert und eluiert ($V_0 = 20$ ml).

Absorption bei 238 nm — Uronsäure - - - - -

Analytische Untersuchungen: Die genannten Befunde veranlaßten uns, analytische Untersuchungen zur Zusammensetzung einzelner Komponenten des GAG-Pep durchzuführen, um Näheres über die Identität der Inhaltsstoffe zu erfahren. Neben verschiedenen chromatographischen Verfahren wurde die Gelelektrophorese angewandt. Einzelextrakte wurden zuerst an Sepharose 4B fraktioniert. Die Absorption wurde bei 238 nm gemessen und der Gehalt an Uronsäuren der einzelnen Fraktionen nach Blumenkranz et al. (5) bestimmt (Abb. 7–11).

Beide Knorpelextrakte, ebenso wie GAG-Pep wiesen ziemlich ähnliche Verteilung der Uronsäuren als auch der bei 238 nm absorbierenden Stoffe auf. Die Zusammensetzung des Knochenmarkextraktes war im Vergleich mit diesen Testsubstanzen deutlich verschieden, u. a. wurden nur wenig Uronsäuren nach-

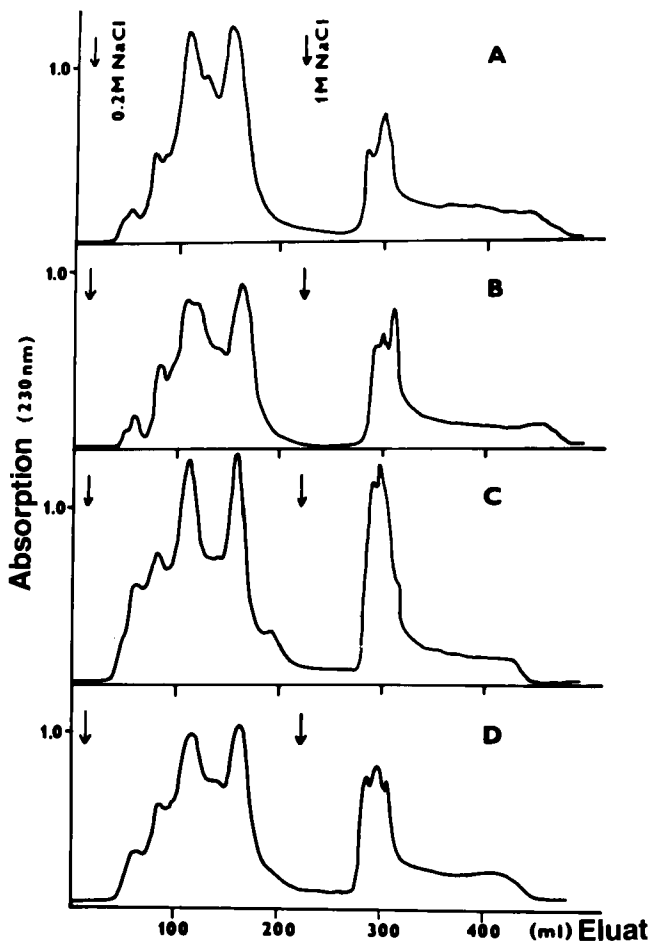


Abb. 12: A – Knorpel-Extrakt I.
B – Knorpel-Extrakt II.
C – Knochenmark-Extrakt.
D – GAG-Peptid-Komplex.

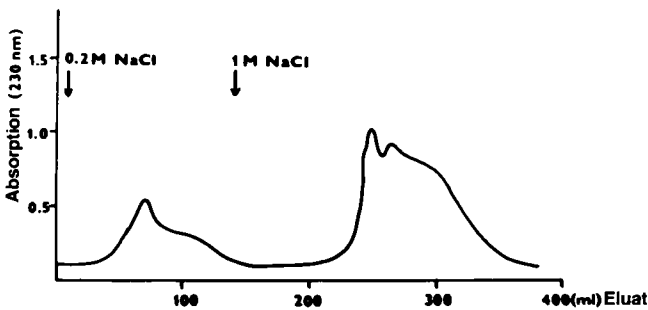


Abb. 13 DAK 16

Abb. 12 + 13 Chromatographische Auftrennung von GAG-Pep-Komponenten an DEAE-Cellulose (20 x 2,6 cm Säule). Die Säule wurde equilibriert und anschließend eluiert mit 0,2M NaCl/0,05M Tris-HCl (pH 7,5). Nachdem die Absorbanz die Basislinie wieder erreicht hatte, wurde die Säule mit 1M NaCl/0,05M Tris-HCl (pH 7,5) eluiert. Die erste mit 0,2M NaCl eluierte Fraktion enthält Kollagenproteine, die zweite, mit 1M NaCl eluierte Fraktion enthält Polysaccharidproteine.

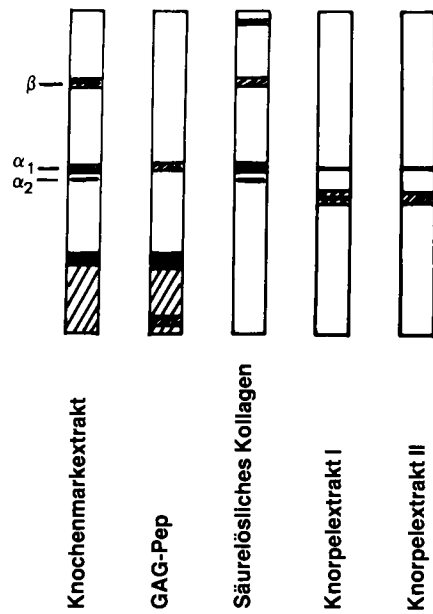


Abb. 14 Polyakrylamidgel-Elektrophorese der ersten Fraktionen nach der Trennung an DEAE-Cellulose. Vergleich mit säurelöslichem Kollagen.

gewiesen. DAK 16 ergab ungefähr die gleiche Fraktionierung wie sie bereits früher von Kalbhen (9) für Sephadex C 75 beschrieben wurde. Die Urnsäuren erschienen jedoch vorwiegend zwischen 25 und 65 ml, während die bei 238 nm absorbierenden Stoffe ihren Maximalwert bei 25 ml sowie zwischen 60–75 ml erreichten. Es handelte sich teilweise um hochmolekulare Substanzen (V_0 der Säule betrug 20 ml) und teilweise um Substanzen niedrigeren Molekulargewichts, von denen DAK 16 offensichtlich mehr enthielt als die 4 untersuchten Komponenten des Extraktes.

Die Extrakte wurden weiterhin auf DEAE-Zellulose-Säule fraktioniert. Bei Spülung mit 0,2 M NaCl werden Kollagene eluiert, während Polysaccharidproteine zurückgehalten bleiben. Diese können anschließend mit 1 M NaCl-Lösung eluiert werden. In den Kurven Abb. 12 ist deutlich zu sehen, daß alle Extrakte einen erheblichen Kollagenanteil aufweisen. Die Trennung der kollagenhaltigen Fraktionen mittels Gelelektrophorese zeigte, daß die beiden Knorpelextrakte hauptsächlich α -Ketten (offensichtlich Typ II) und Abbauprodukte größerer Moleküle enthalten. Kollagen im Knochenmarkextrakt enthielt neben β - und α -Ketten auch niedermolekulare Abbauprodukte. Die Zusammensetzung der Kollagene von GAG-Pep entspricht der Zusammensetzung der Teilkomponenten (Abb. 13, 14).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen, die hauptsächlich in vitro durchgeführt worden sind, können kaum direkt auf die klinisch-therapeutischen Bedingungen bei Patienten übertragen werden. Während in vitro die einzelnen Bestandteile der untersuchten Extrakte mehr oder weniger unmittelbar auf die Chondrozyten wirken, müssen sie bei intramuskulärer Applikation über verschiedene Barrieren zum Wirkungsort gelangen. Wir sind jedoch überzeugt, daß unsere Ergebnisse die wahrscheinlichen Wirkungsmechanismen des GAG-Pep bei der Osteoarthrose-therapie aufgezeigt haben. Für die klinische Osteoarthrosebe-

handlung ergibt sich aus diesen Befunden, daß nur eine langfristige Verabreichung des GAG-Pep von Nutzen sein kann und daß sie nur dann eine Chance hat, wenn reaktionsfähiger Knorpel vorhanden ist, dessen pathologisch veränderter Stoffwechsel günstig beeinflusst werden kann.

Der Firma Robapharm, AG, Basel, Schweiz, sind wir für die Überlassung von Rumalon und dessen Komponenten zu Dank verpflichtet.

Literatur

- (1) Adam, M., I. Brettschneider, J. Musilová, R. Praus: Effect of cartilage bone marrow extract on articular cartilage collagen formation. *Pharmacology* 16 (1978) 49–53
- (2) Adam, M., P. Fiehzek, K. Kühn: Investigation on the reaction of metals with collagen in vivo II: the formation of cross links. *Eur. J. Biochem.* 3 (1968) 411–414
- (3) Adam, M., J. Musilová, M. Krabcová, I. Brettschneider, V. Pešáková, Z. Deyl: Effect of cartilage bone marrow extract on the metabolism of collagen in osteoarthrotic cartilage. *Pharmacology* 21 (1980) 53–58
- (4) Baici, A., P. Salgam, K. Fehr, A. Böni: Hemmung der menschlichen lysosomalen Elastase durch den Knorpel-Knochenmarkextrakt Rumalon. *Z. Rheumatol.* 40 (1981) 44–46
- (5) Blumenkrantz, N., G. Asboe-Hansen: New Method for quantitative Determination of uronic acids. *Analyt. Biochem.* 54 (1973) 484–489
- (6) Fujii, T., K. Kühn: Isolation and characterisation of pepsin-treated type III collagen from calf skin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356 (1975) 1793–1801
- (7) Hascall, V. C., S. W. Sajdera: Protein-polysaccharide complex from bovine nasal cartilage. The functions of glycoprotein in the formation of aggregates. *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 2384–2396
- (8) Juva, K., D. J. Prockop: Modified procedure for the assay of ^3H or ^{14}C -labeled hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 15 (1966) 77–83
- (9) Kalbhen, D. A.: Analytical investigations of the cartilage extract in Rumalon. *Med. Pharmacol. exp.* 15 (1966) 344–350
- (10) Kalbhen, D. A., K. Karzel, R. Domenjoz: Isolierung und biologische Prüfung eines hochmolekulären Inhaltsstoffes aus einem Knorpel-extrakt. *Bull. chim. théor.* 1 (1966) 438–441
- (11) Lowry, H. O., N. Y. Rosenbrough, A. L. Farr, R. Y. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275
- (12) Praus, R.: A simple method for the separation of Glucosaminoglycans and Galactosaminoglycans. *J. Chromat.* 48 (1970) 535
- (13) Rondle, C. J. M., W. T. Y. Morgan: The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochem. J.* 61 (1955) 586
- (14) Sajdera, S. W., V. C. Hascall: Protein-polysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extraction procedures. *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 77–87
- (15) Stegemann, H.: Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin T und p-Dimethylaminohenzaldehyd. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 311 (1958) 41–45
- (16) Weigel, W., P. Iwangoff, B. Jasiński: Die Bedeutung der katabolen Vorgänge im Knorpel und ihre Beziehungen zur Pathogenese der degenerativen Gelenkerkrankungen. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 19 (1969) 780–785

MUDr. M. Adam, D. Sc.
Research-Institute on Rheumatic Diseases
Na Slupi 4
120 00 Praha-2/CSSR