

Morphologische Untersuchungen über den Einfluß von Rumalon® nach partieller Meniscektomie am Kaninchen

J. Gialamas¹, G. Partsch², H. Höger¹, D. Adamiker¹, R. Eberl²

¹ Forschungsinstitut für Versuchstierzucht (Leiter: Dr. med. vet. D. Adamiker) der Universität Wien, A-2325 Himberg, Austria

² Ludwig Boltzmann-Institut für Rheumatologie und Balneologie (Leiter: Univ. Prof. Dr. R. Eberl), Wien-Oberlaa, Austria

Einleitung

Für die Arthrose des Menschen, gesehen als gerontologischen oder pathologischen Prozeß, gibt es kein zufriedenstellendes Modell, mit Hilfe dessen antiarthrotische Substanzen getestet und in ihrer Wirkung miteinander verglichen werden können. Die experimentellen Arthrosen werden hauptsächlich durch Immobilisation von Gelenken (2, 8), Dislokation nach chirurgischen Eingriffen (4, 7), intraartikuläre Applikation chemischer (3) oder biologischer Agentien induziert.

In dieser Studie wurde die von Moskowitz (4) angewandte partielle Meniscektomie zur Arthroseauslösung am Kaninchen verwendet, um die Wirkung des GAG-Peptid-Komplex Rumalon® histologisch zu verfolgen. Neumüller (6) beschrieb bereits die Oberflächenveränderungen, die an denselben Tieren wie in dieser Studie aufgetreten waren, mittels Rasterelektronenmikroskopie.

Material und Methode

Für die Untersuchungen wurden spezifiziert pathogenfreie Kaninchen (Chinchilla Bastarde der Fa. W. Gassner, BRD) verwen-

Zusammenfassung

Der Einfluß des GAG-Peptid-Komplex (Rumalon®) auf die durch partielle Meniscektomie am rechten Kniegelenk induzierte Kniegelenksarthrose wurde an Kaninchen untersucht. Insgesamt 36 Tiere wurden für diesen Versuch herangezogen. Je die Hälfte der Tiere wurde 3× wöchtl. i.m. mit 0,5 ml/kg Rumalon®, resp. phys. NaCl behandelt. Sowohl von der Placebo- als auch von der Rumalon®-Gruppe wurden je 6 Kaninchen nach 12, 24 und 36 Tagen getötet und deren Kniegelenke histologisch untersucht.

Aufgrund der partiellen Meniscektomie traten in den operierten Gelenken Auffaserungen, Risse und Usuren, Fragmentationen des Gelenkknorpels sowie Erosionen auf, die zur Freilegung des subchondralen Knochens führten. Durch die Fehlbelastung traten auch in den nicht operierten Kniegelenken, welche zur Kontrolle mituntersucht wurden, z.T. schwere Veränderungen auf.

Nach 12 Tagen waren bei der Rumalon®-Gruppe zwar Faserdemaskierung und Asbestfaserungen im Gelenk- und Fugenknorpel, sowie nekrotische Herde im Fugenknorpel feststellbar, die Placebo-Gruppe wies stärkere pathologische Veränderungen auf.

Bei den nach 24 und 36 Tagen getöteten Tieren waren deutlich schwerere Veränderungen als nach 12 Tagen zu sehen. Rumalon® bewirkte nur mehr eine angedeutete Verschiebung der degenerativen Knorpelveränderungen im positiven Sinn.

Die histopathologischen Untersuchungen stimmen prinzipiell mit früher publizierten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen aus diesen Versuchen überein (Neumüller, 1981). Aus den Befunden wird abgeleitet, daß der GAG-Peptid-Komplex nur bei gering- bis mittelgradigen Degenerationen wirksam werden kann, wenn genügend reaktive Chondrozyten vorhanden sind.

Morphological Examinations on the Influence of Rumalon® Following Partial Meniscectomy in the Rabbit

The influence of the GAG-Peptide-complex Rumalon® on knee joint osteoarthritis induced by partial meniscectomy in the right knee was examined in rabbits. A total of 36 animals were included in this trial. One half of the animals were treated with 0.5 ml/kg Rumalon® i.m. 3 times per week, while the other half received physiological saline in the same dosage. In both the placebo and the Rumalon® group 6 animals in each case were killed after 12, 24 and 36 days and their knee joints were examined histologically.

As a result of the partial meniscectomy the joints thus treated showed fibrillations, wear lesions and fragmentations of the joint cartilage together with erosions which led to exposure of the subchondral bone. Due to load shifting, what in some cases were severe changes also occurred in the non-meniscectomised knee joint which was examined as a control.

After 12 days, although the Rumalon® group showed fibre demasking and asbestos-like fibrillation of the articular cartilage and meniscus together with necrotic foci in the meniscus, the placebo group showed more severe pathological changes.

In the animals killed after 24 and 36 days the changes were clearly more severe than after 12 days. Rumalon® now showed some evidence of retarding the development of the lesions.

The histopathological studies are fundamentally in conformity with previously published findings of electron microscopy in experiments of the same type (Neumüller, 1981). It is concluded from the results that the GAG-Peptide-complex can be effective only in slight to moderate degeneration when sufficient reactive chondrocytes are present.

Aufbau des Tierversuches

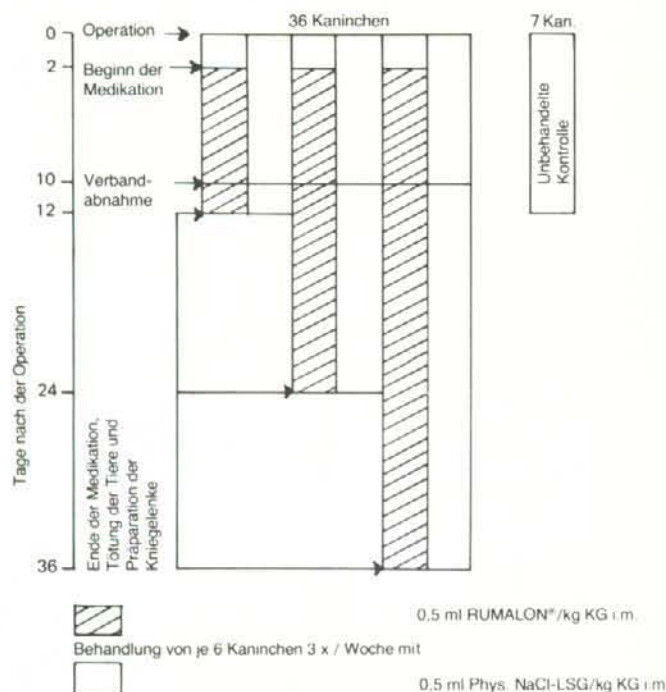


Abb. 1

det. 43 männliche und weibliche Tiere (3 bis 4 Monate alt) wurden mit einem Gewicht zwischen 2 und 2,5 kg 14 Tage vor Versuchsbeginn einzeln in Drahtkäfige mit Lochboden gesetzt. Futter (altromin 2023) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Raumtemperatur betrug $19^\circ \pm 1^\circ \text{C}$, die relative Luftfeuchte $55\% \pm 5\%$. Der Tierraum wurde mit 100% Frischluft belüftet, der Luftwechsel war 15fach in der Stunde. Die Beleuchtung (200 lux in 2 m Höhe) war zwischen 7 und 19 Uhr MEZ eingeschaltet.

Die Operation wurde unter Nembutalnarkose nach der von Moskowitz (4) angegebenen Operationstechnik der partiellen Menishektomie am rechten Kniegelenk durchgeführt, wobei ein Teil des medialen Meniskus entfernt wurde. Nach der Operation wurde ein gepolsterter, versteifter Verband für die Dauer von 10 Tagen angelegt, wobei der Winkel ca. 110° betrug. 2 Tage nach der Operation begann die Verabreichung von Rumalon bzw. Placebo. Die Tiere der Gruppen I, III und V erhielten 3× wöchentlich je 0,5 ml/kg Körpergewicht Rumalon i.m., die Tiere der Gruppen II, IV und VI je 0,5 ml/kg Körpergewicht physiologische NaCl-Lösung i.m. (Placebo). Die Tiere der Gruppe VII dienten als Kontrolle (Abb. 1).

Am Ende der jeweiligen Versuchsdauer wurden die Tiere durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Beide Kniegelenke wurden freipräpariert und von Femur und Tibia je eine senkrecht zur Gelenkfläche ausgeschnittene Knochenscheibe in gepuffertem 10%igem Formalin fixiert. Die Knochenstücke wurden 3 Tage lang in 6%iger Salpetersäure entkalkt und nach kurzer Entquellung in 5%iger Natriumsulfatlösung in Paraplast-plus eingebettet. 5 bis 7 μm dicke Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bzw. Alcianblau gefärbt, zusätzlich von einem Teil der Präparate auch Azan- und Eisenfärbungen angefertigt.

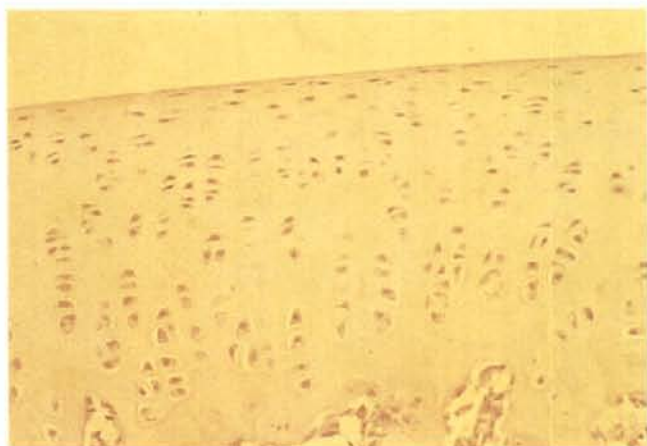


Abb. 2 Normaler Gelenkknorpel. Femur Kontrolltier, HE.

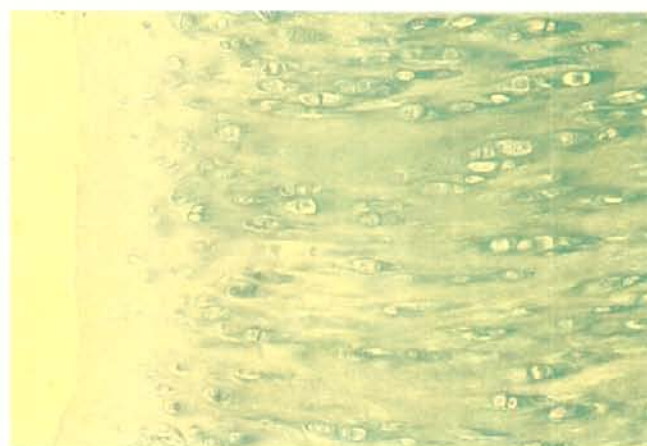


Abb. 3 Fortgeschrittene Faserdemaskierung und Asbestfaserung mit Verdämmung bzw. Schwund von Knorpelzellen. Tibia, Alcianblau.

Aufgrund der Zuordnung der arthrotischen Zustandsbilder zu verschiedenen Schweregraden wurde randomisiert eine zahlenmäßige Auswertung vorgenommen. Die Schweregrade wurden folgendermaßen definiert (Abb. 2–9):

Als Schweregrad 1 wird fortgeschrittene Faserdemaskierung bis zur Asbestfaserung mit Verkümmern der Chondrozytenkerne bezeichnet.

Schweregrad 2: Die Bildung oberflächlicher Erosionen und Usuren mit Veränderung der Knorpelstruktur.

Schweregrad 3: Bildung ausgedehnter Nekrosen, wobei es teilweise zu einer Loslösung des Gelenkknorpels vom Knochen kommt.

Schweregrad 4: Usuren, die bis zum subchondralen Knochen reichen, Fragmentation des Gelenkknorpels und Ausbildung von Knochenglatzen.

Die statistische Bewertung des Unterschiedes zwischen den Gruppen wurde anhand der Werte pro Tier nach dem verteilungsunabhängigen »Wilcoxon's stratified test« vorgenommen.

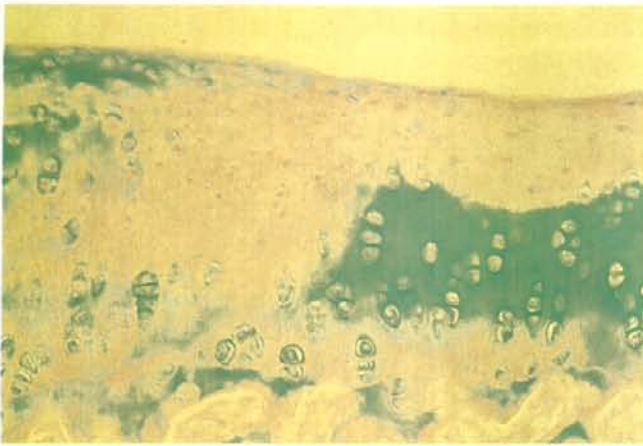


Abb. 4 Frische Nekrose (fehlende Anfärbbarkeit des hyalinen Knorpels), Tibia, Alcianblau.

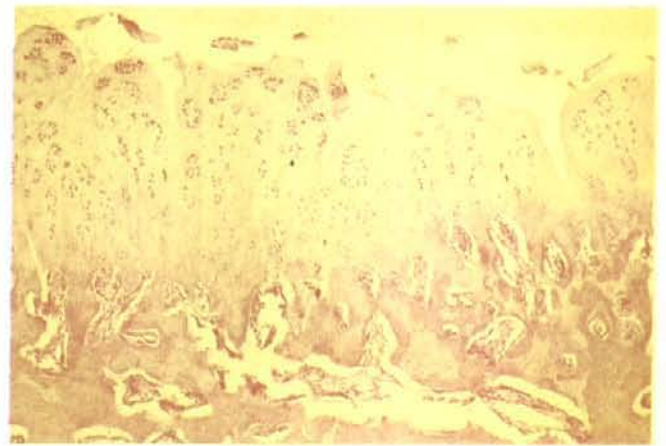


Abb. 7 Schwere Degeneration mit Zerklüftung des Gelenkknorpels, massive Brutkapselbildung, Tibia, HE.

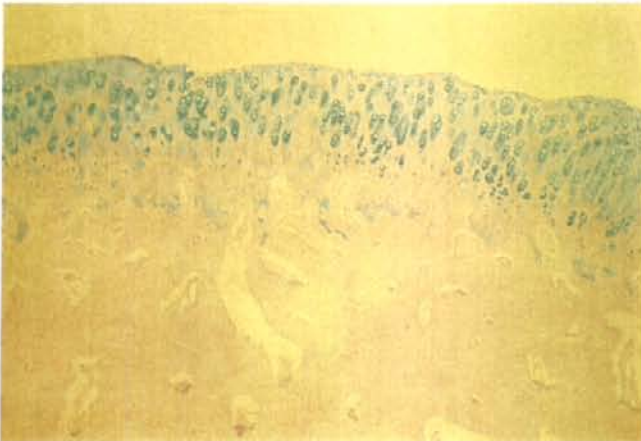


Abb. 5 Ausgedehnte Erosion nach fortgeschrittener Asbestfaserung, Femur, Alcianblau.

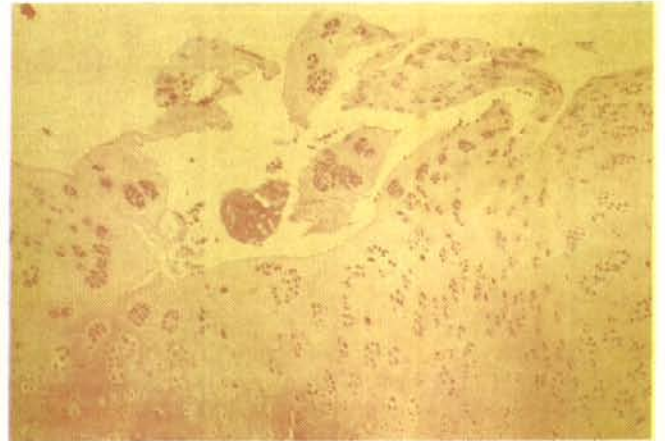


Abb. 8 Schwere Degeneration und Fragmentation mit Usur- und Brutkapselbildung, Tibia, HE.

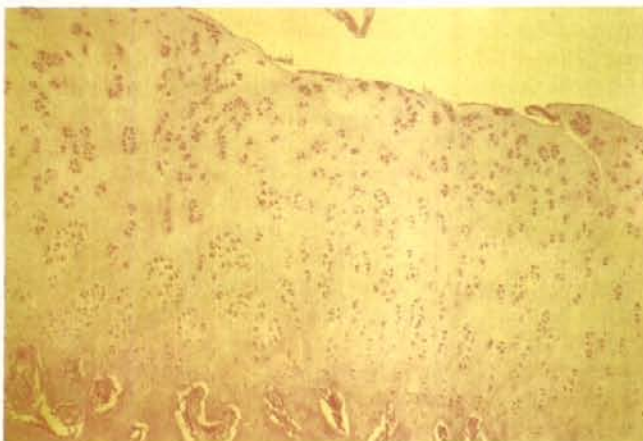


Abb. 6 Diffuse Knorpeldegeneration mit Fissur und Brutkapselbildung, Tibia, HE.



Abb. 9 Vollständige Nekrotisierung und Fragmentation des Gelenkknorpels, am Rande knorpelige Hyperplasie, Tibia, Alcianblau.

Ergebnisse

Der operative Eingriff hinterließ an den Tieren keine anhaltende Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Die Operationsstellen wiesen nach Verbandabnahme eine gering- bis mittelgradige ödematöse Schwellung auf, die rasch abklang.

Versuchsgruppen I und II (12 Tage Versuchsdauer)

Im Gelenkknorpel der operierten Kniegelenke trat eine fortgeschrittene Faserdemaskierung und Asbestfaserung bei allen Tieren in beiden Gruppen auf. An den nicht-operierten Gelenken waren diese Veränderungen in der Placebo-Gruppe häufiger als in der Rumalon-Gruppe. Erosionen bzw. Usuren fanden sich an den operierten Gelenken in der Placebo-Gruppe öfter als in der Rumalon-Gruppe; Nekrosen waren nur bei den Tieren der Placebo-Gruppe nachweisbar.

In den nicht-operierten Gelenken fehlten Nekrosen in beiden Gruppen; Usuren waren in der Placebo-Gruppe ebenso oft zu finden wie am operierten Gelenk. Nur bei einem einzigen Tier konnten in der Rumalon-Gruppe Usuren im unbehandelten Gelenk festgestellt werden. Bei allen Gelenken, die Usuren aufwiesen, waren Chondrozytencluster (Brutkapseln) stark vermehrt. Nekroseherde im Fugenknorpel beider Gelenke waren in der Rumalon-Gruppe etwas häufiger vorhanden als in der Placebo-Gruppe.

Versuchsgruppen III und IV (24 Tage Versuchsdauer)

Die Faserdemaskierung und Asbestfaserung waren in beiden Gelenken und Gruppen etwa im gleichen Ausmaß anzutreffen. Usuren hingegen zeigten sich in der Placebo-Gruppe in beiden Gelenken öfter als in der Rumalon-Gruppe, wobei das nicht-operierte Kniegelenk etwas stärker betroffen war. Mit der Länge der Versuchsdauer nahm die Anzahl und Ausdehnung der Nekrosen zu. Sie waren im Gelenkknorpel der operierten Gelenke in der Placebo-Gruppe etwas häufiger als in der Rumalon-Gruppe zu finden. Fragmentationen des Gelenkknorpels waren in der Placebo-Gruppe an beiden Gelenken, in der Rumalon-Gruppe nur im operierten Gelenk, und auch dort seltener anzutreffen. Bei einem einzigen Tier, und zwar in der Rumalon-Gruppe am nicht-operierten Gelenk, kam es zur völligen Lösung des Knorpels vom Knochen und somit zur Ausbildung einer Knochenglatze. Nekroseherde im Fugenknorpel waren ein seltener Befund, jedoch in der Rumalon-Gruppe etwas häufiger als in der Placebo-Gruppe, während Risse im Fugenknorpel an beiden Gelenken in der Placebo-Gruppe häufiger als in der Rumalon-Gruppe zu sehen waren.

Versuchsgruppen V und VI (36 Tage Versuchsdauer)

Die dem Schweregrad 1 zugeordneten Befunde entsprachen denen der Gruppe III und IV. Die pathologischen Veränderungen der höheren Schweregrade waren im Gegensatz zu den vorher besprochenen Versuchsgruppen häufiger im Fugen- als im Gelenkknorpel zu finden. Eine Beeinflussung durch Rumalon war in diesen Versuchsgruppen nicht mehr unterscheidbar.

Kontrollgruppe VII

Bei 5 der 7 Kontrolltiere war im Gelenkknorpel v. a. der Tibia eine geringe Faserdemaskierung nachweisbar. Am Femur eines Kaninchens war eine herdförmige Nekrose vorhanden. Außerdem waren bei zwei Tieren Risse im Fugenknorpel nachweisbar, eines davon wies zusätzlich eine herdförmige Nekrose im Fugenknorpel auf. Aufgrund dieser Befunde wurde auch für die Kontrolltiere ein Arthrose-Index errechnet.

Versuchsplan

Gruppe	Tier-Nr.	Menis-ektomie	Behandlung mit Rumalon (R) oder Placebo (P)	Versuchsdauer in Tagen
I	1–6	ja	R	12
II	7–12	ja	P	12
III	13–18	ja	R	24
IV	19–24	ja	P	24
V	25–30	ja	R	36
VI	31–36	ja	P	36
VII	37–43	nein	nein	12

Statistische Auswertung

Entsprechend der Art und der Häufigkeit der pathologischen Veränderungen und ihrer Zuordnung zu verschiedenen Schweregraden wurde für jede Gruppe der mittlere Arthrose-Index berechnet und für die Versuchsgruppen I bis VI in der Abb. 10 dargestellt. Für die Gruppe VII (Kontrolle) beträgt der Arthrose-Index 0,57, im Vergleich dazu jener für die nicht-operierten Gelenke der Rumalon-Gruppe nach 12 Tagen Versuchsdauer 1,33.

Diskussion

Schon im Gelenkknorpel der Kontrolltiere, die unbehandelt 12 Tage in den Käfigen gehalten wurden, war eine geringe Faserdemaskierung relativ häufig anzutreffen. Daher wurde der Schweregrad 1 erst ab dem Auftreten einer fortgeschrittenen Faserdemaskierung und Asbestfaserung definiert.

Die Arthrosen am operierten Gelenk entwickeln sich als Folge der Traumatisierung und der durch die Meniskektomie entstehenden Inkongruenz der Gelenkflächen (4). Im Gegensatz zu Moskowitz (4, 5) wurden in diesem Versuch keine weißen Neuseeländer Kaninchen verwendet, sondern Chinchilla Bastarde. Nach dem chirurgischen Eingriff waren die Kaninchen am operierten Gelenk mit einem versteiften Verband (10 Tage) versehen worden. Da die Kaninchen nach Moskowitz (4) einen Verband für 1 Woche erhielten, und nach Moskowitz (5) sofort nach dem Eingriff frei in den Käfigen herumlaufen konnten, waren unterschiedliche Ausbildungen der degenerativen Veränderungen im Vergleich zu diesen früheren Arbeiten zu erwarten.

Die Zeitdauer des Versuchs (insgesamt 36 Versuchstage) war in dieser Studie wesentlich kürzer als bei (4) mit 12 Wochen; trotzdem ließen sich auch schon nach dem ersten Versuchsabschnitt (12 Tage) wesentliche Einflüsse im Bereich des Gelenkknorpels wie auch im Fugenknorpel nachweisen.

Ob dieses frühzeitige Auftreten der arthrotischen Prozesse auf die verwendete Rasse oder die zusätzliche Immobilisation zurückzuführen ist, kann nicht schlüssig gesagt werden. Immobilisation allein kann auch zu degenerativen Prozessen im Gelenkknorpel führen (1, 8).

Das Alter scheint ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung degenerativer Prozesse nach Meniskektomie zu spielen, und Moskowitz (5) wies schon darauf hin, daß jüngere Tiere rascher Veränderungen zeigen.

Die in diesem Versuch verwendeten Chinchilla Bastarde entwickelten häufiger Ulzerationen an der Tibia, wogegen Moskowitz (4) solche pathologischen Befunde am femoralen Knorpel fand. Die operierten Gelenke der Chinchilla Bastarde zeigten im medialen Bereich deutlich knorpelig-knöchernen Exostosen.

Mittlerer Arthrose-Index am Kniegelenk des Kaninchens

Histologische Bewertung von Gelenk- und Epiphysenknorpel
(Mittel aus je 2 Knorpelpartien)

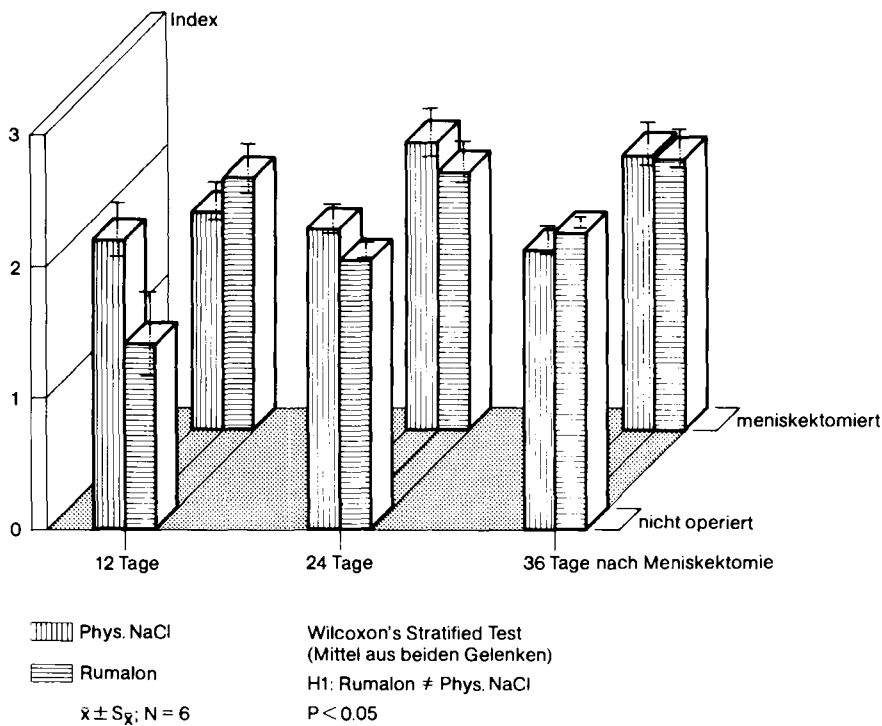


Abb. 10

Mittlerer Arthrose-Index am Kniegelenk des Kaninchens

REM-Bewertung der Knorpeloberflächen
(Mittel aus je 4 Knorpelpartien)

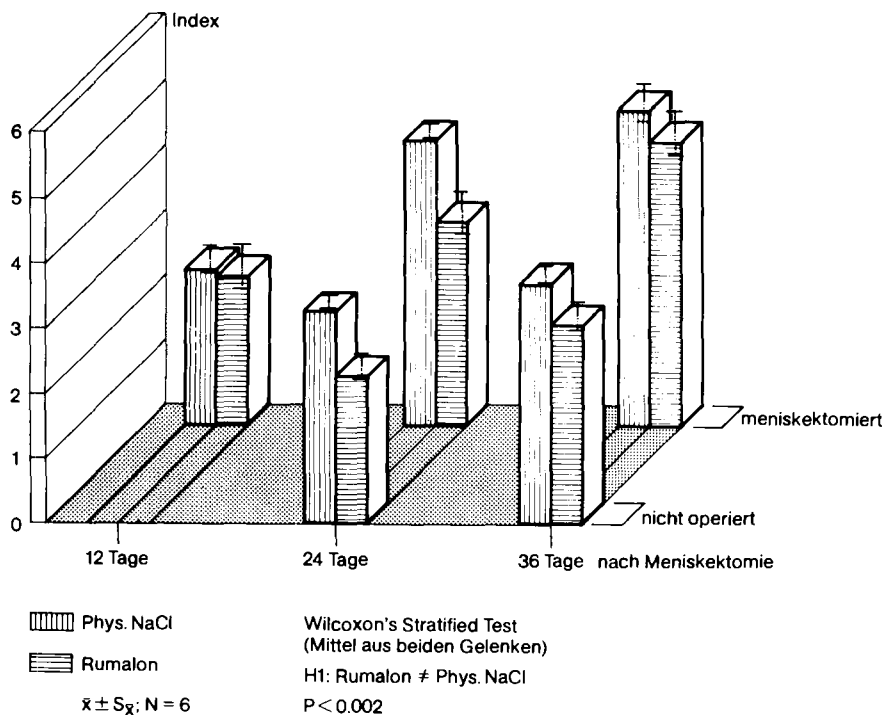


Abb. 11 aus: Neumüller, J., G. Partsch, D. Adamiker, R. Eberl. Int. J. Tiss. React. III, (1981) 1

Es muß besonders darauf hingewiesen werden, daß die nicht operierten Gelenke der Chinchilla Bastarde auch schon nach der ersten Versuchsstufe degenerativ verändert waren. Der Grad der Veränderungen entsprach etwa dem der operierten Gelenke und scheint aufgrund der Fehlbelastung aufgetreten zu sein (Abb. 10). Die graduell etwa gleich großen Veränderungen in den operierten und nicht-operierten Gelenken lassen jedoch eine rassenabhängige Disposition für Degeneration ableiten, so daß eine Immobilisation eines Gelenkes für die Arthroseauslösung genügen müßte. Mit fortlaufender Versuchsdauer (bis 36 Tage) waren histologisch schwerste Veränderungen aufgetreten. Eine Weiterführung der Experimente über ähnliche Zeiträume, wie Moskowitz sie beschrieb (4), erschien daher bei den in diesem Versuch verwendeten Kaninchen nicht zweckmäßig. Der von Neumüller et al. (6) durch rasterelektronenoptische Untersuchungen der Oberflächen der Gelenkknorpel festgestellte positive Einfluß von Rumalon (Abb. 11) konnte durch die histologische Untersuchung derselben Gelenke, die auch die Veränderungen der tieferen Schichten des Gelenkes und des Fugenknorpels einschließt, im selben Ausmaß nicht bestätigt werden. Einen eindeutig positiven Einfluß hat Rumalon nur am nicht-operierten Gelenk bis 12 Tage Versuchsdauer. Es scheint in der Lage zu sein, die Ausbildung von Asbestfaserung zu hemmen und die von Usuren stark zu reduzieren.

Am menispektomierten Kniegelenk derselben Gruppe sowie bei längerer Versuchsdauer ist die auf das Gelenk einwirkende Noxe so groß, daß die zusätzliche Behandlung mit Rumalon nicht in der Lage ist, die degenerativen Prozesse zu stoppen und histologisch nachweisbar protektiv zu wirken.

Nach 24 Tagen Versuchsdauer war ein exzessiver Verlust von Knorpelgewebe vorhanden, der bei einem Tier bis zur Freisetzung der subchondralen Markräume führte. Ein chondroprotektiver Effekt von Rumalon war zu diesem Zeitpunkt nur bei wenigen Tieren zu erwarten.

Nach 36 Tagen Versuchsdauer fehlt wegen der massiven Veränderungen, die auch im Rasterelektronenmikroskop nachweisbar waren (6), jede Schutzfunktion.

Im allgemeinen decken sich jedoch die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen von Neumüller et al. (6) sehr gut mit den histologischen Resultaten. In den Arthrose-

Indices der hier vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen am Fugenknorpel mit einbezogen, der bei der Oberflächenbeobachtung durch das Rasterelektronenmikroskop nicht zugänglich ist.

Zu ähnlichen Aussagen führen die Beobachtungen von Moskowitz (5), der in seinen Untersuchungen bei langsamerer Arthroseprogredienz eine sehr deutliche Verminderung von Usuren durch Rumalon noch 6 Wochen nach dem Eingriff, jedoch nicht mehr nach 12 Wochen nachwies. Diese in unseren Versuchen wiederholten Beobachtungen sind zu erklären aufgrund der Vorstellung, daß eine Verzögerung der Progredienz der Arthrose durch Rumalon nur solange möglich ist, als die Knorpelveränderungen ein geringeres Ausmaß erreicht haben. Wenn schließlich höhere Schädigungsgrade bestehen, nimmt die Progredienz jedoch wieder zu, ohne daß dann durch Rumalon-Behandlung noch eine wesentliche Besserung möglich wäre. Die Rumalon-Wirkung setzt demnach das Vorhandensein reaktionsfähiger Knorpelzellen voraus.

Literatur

- (1) Candolin, T., T. Videman: Surface changes in the articular cartilage of rabbit knee during immobilization. A scanning electron microscopic study of experimental osteoarthritis. Acta path. microbiol. scand. Sect. A 88 (1980) 291
- (2) Finsterbush, A., B. Friedman: Early changes in immobilized rabbits' knee joints: A light and electron microscopic study. Clin. Orthop. Rel Res. 92 (1973) 305
- (3) Kalbhen, D. A.: Arthrosis deformans. Experimentell-pharmakologische Studien und ihre klinische Bedeutung. Eular Verlag, Basel/Schweiz, 1982
- (4) Moskowitz, R. W., W. Davis, J. Sammarco, M. Martens, J. Baker, M. Mayor, A. H. Burstein, V. H. Frankel: Experimentally Induced Degenerative Joint Lesions Following Partial Meniscectomy in the Rabbit. Arthr. Rheum. 16 (1973) 397
- (5) Moskowitz, R. W.: Osteoarthritis. Arthr. Rheum. 20 (1977) S 104
- (6) Neumüller, J., G. Partsch, D. Adamiker, R. Eberl: The effect of a cartilage bone marrow extract on experimentally induced osteoarthritis in the knee joints of rabbits. Int. J. Tiss. React. III, (1981) 1
- (7) Reimann, I.: Experimental osteoarthritis of the knee in rabbits induced by alteration of the load-bearing. Acta orthop. scand. 44 (1973) 596
- (8) Roy, S.: Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization. Ann. rheum. Dis. 29 (1970) 634

Dr. J. Gialamas
Forschungsinstitut für Versuchstierzucht
der Universität Wien
Brauhausgasse 34, A-2325 Humberg/Austria