

RÖNTGENKLEINWINKELSTREUUNG AN KRANKEN MENSCHLICHEN MENISKUSFASERN

R. BONART, W. GRIMM, R. HOSEMANN, J. HÖHLING UND
G. PFEFFERKORN

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem (Deutschland)
und Institut für Medizinische Physik, Münster, Westfalen (Deutschland)

(Eingegangen am 9. Juli 1962)

SUMMARY

Small-angle X-ray diffraction of diseased human meniscus fibres

Formalin-fixed fibres of sound and diseased meniscus have been analyzed by small-angle diffraction to get informations about structural changes in macromolecular dimensions.

With degeneration of the meniscus fibres the small-angle pattern changed in a characteristic way. In the first stage of disease there were only changes in intensity of the diffraction lines but with increasing degeneration of the fibres the discrete reflexions of the 640-Å period vanished more and more in a characteristic way and there appeared a continuous small-angle scattering, which increased in proportion to the degree of disease. The continuous small-angle diffraction being elliptical at first was getting more and more circular with the degeneration of the fibres. An analysis of the continuous small-angle diffraction after the method of HOSEMANN AND MOTZKUS showed that the bands of fibres degenerated to rod-like substructures with an average diameter of about 200 Å and a length of 600–800 Å. In the first stages of degeneration they were orientated as the sound fibres (which showed the elliptic form of the continuous scattering), but this orientation got more and more lost with increasing disease (which was to be seen by the circular continuous scattering). The rod-like substructures are likely to degenerate further in more globular structures.

EINLEITUNG

Kranke Fasern von menschlichem Meniskus wurden mit Formaldehyd fixiert, mit destilliertem Wasser ausgewaschen und dann mit Alkohol getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten einige charakteristische Veränderung mit zunehmendem Krankheitsgrad*. Die normalen Debye-Scherrer-Aufnahmen zeigten ausser Textureffekten keine wesentlichen Unterschiede**.

* Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dr. DAHMEN in Münster durchgeführt und werden ausführlich an anderer Stelle publiziert.

** Dies steht in bester Übereinstimmung mit Ergebnissen von Prof. Kantola in Helsinki, der die Röntgenkleinwinkelstreuung vom Kollagen aus der Schwanzsehne kranker Ratten untersuchte¹.

zeigt Fig. 2. Die 3. Ordnung der 640-Å Periode behält ihre hohe Intensität, die 4. Ordnung ist nun aber merklich intensiver als in Stadium 1, die 5. gegenüber der folgenden Ordnung nicht so hervorgehoben. Im Gegensatz zum 1. Stadium tritt jetzt eine intensive Kleinwinkelstreuung auf. Da ihre Integralintensität wesentlich grösser als diejenige der diskreten Reflexe ist, so lässt sie auf eine starke Zunahme der Unordnung in kolloiden Dimensionen schliessen. Sie hat eine elliptische Gestalt. In Fig. 3a sind die mittels Mikrophotometer gewonnenen Niveaulinien gleicher Streuintensität dargestellt. Aus der Streutheorie folgt, dass in Stadium 2 stabförmige Segmente vorliegen müssen, in die der Knorpel in diesem Krankheitsstadium zerfallen ist. Die Auswertung des $\theta^2 \cdot I$ - θ -Diagramms (Fig. 3b) nach HOSEMANN-MOTZKUS³ längs des Äquators liefert einen mittleren Stabdurchmesser d_1 von etwa 200 Å. (Vgl. das Maximum D in Fig. 3b.) Längs des Meridians, also parallel zur mittleren Faserrichtung, treten dahingegen in diesem Diagramm 3 Maxima auf. Maximum A weist darauf hin, dass die stabförmigen Segmente eine mittlere Länge d_2 von 600–800 Å haben müssen. Die 2 anderen Maxima B, C lassen darauf schliessen, dass diese Stäbchen entweder eine kolloide Innenstruktur aufweisen und aus 3 bis 4 mehr oder weniger kugeligen Untereinheiten bestehen oder dass es im Krankheitsstadium 2 neben einem gewissen Prozentsatz der oben beschriebenen Stäbchen ohne Innenstruktur auch einzelne 200–400 Å lange Stäbchen noch gibt.

Im Degenerationsstadium 3 sind die diskreten Kleinwinkelreflexe bis auf die 3., 6. und 9. Ordnung verschwunden. Die kontinuierliche Kleinwinkelstreuung ist nun kugelsymmetrisch. Entweder sind jetzt die Stäbchen völlig unorientiert oder gänzlich in globuläre Untereinheiten zerfallen. Aus dem $\theta^2 \cdot I$ - θ -Diagramm, das nun im Gegensatz zu Fig. 3b in allen Richtungen nur noch 1 Maximum hat, erhält man einen mittleren Teilchendurchmesser (gemittelt über alle Teilchen und alle Richtungen innerhalb einzelner Teilchen) von 200–300 Å. Dies weist darauf hin, dass die stäbchenförmigen Einheiten noch nicht völlig in ihre kolloiden Untereinheiten zerfallen sind.

In Stadium 4 heben sich gegenüber der noch intensiven kontinuierlichen Kleinwinkelstreuung nur noch die 6. bis 9. Ordnung der 640-Å Periode als völlig unorientierte DEBYE-Kreise aus dem Untergrund ab. Im Stadium 5 verschwinden diese DEBYE-Kreise und ein neuer, allerdings ziemlich schwacher, DEBYE-Kreis erscheint, der einem 40-Å Gitterabstand entspricht. Im Stadium 1 bis 3 würde man diesen als die 16. Ordnung der 640-Å Periode erklären. Da dieser Reflex aber in den Degenerationsstadien nicht auftrat, so muss sich in diesem letzten Stadium etwas Entscheidendes an der inneren Struktur der Stäbchen geändert haben.

Eine eingehendere röntgenographische Prüfung in Verbindung mit medizinischen Untersuchungen wird erforderlich sein, um die gewonnenen Ergebnisse in Verbindung mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen noch weiter zu erhärten.

ZUSAMMENFASSUNG

Formfixierte Fasern von gesundem und degeneriertem Meniskus wurden röntgenographisch im Kleinwinkelgebiet untersucht, um bei zunehmender Degeneration Aussagen über strukturelle Veränderungen in makromolekularen Bereichen zu erhalten.

Das Röntgenkleinwinkeldiagramm verändert sich mit zunehmender Degeneration in bestimmter Weise. Während bei schwachem Zersetzungsgrad nur Intensitätsverschiebungen auftreten, verschwinden die einzelnen Reflexe der 640-Å Periode mit

zunehmendem Krankheitsgrad in charakteristischer Weise und es tritt zusätzlich eine stärker werdende kontinuierliche Kleinwinkelstreuung auf. Während die kontinuierliche Kleinwinkelstreuung anfänglich noch elliptisch ist, wird sie mit fortgeschrittener Faserdegeneration mehr und mehr kreisförmig. Eine Analyse dieser kontinuierlichen Streuung weist darauf hin, dass die Kollagenfasern bei fortschreitender Degeneration in stäbchenförmige Substrukturen zerfallen, mit einem Durchmesser von ~ 200 Å und einer Länge von 600–800 Å. Sie haben zu Anfang noch die Orientierung der gesunden Fasern, die aber bei fortgeschrittenem Krankheitsgrad verloren geht, und diese stäbchenförmige Substrukturen dürften weiterhin in mehr oder weniger globuläre Strukturgebilde zerfallen.

LITTERATUR

¹ K. KANTOLA, private Mitteilung.

² R. HOSEMANN, *Z. Physik*, **113** (1939) 751 und 104, 133.

³ R. HOSEMANN UND F. MOTZKUS, *Makromol. Chem.*, **39** (1960) 79 und 90.

Aus bekannten elektronenmikroskopischen Ergebnissen, die deutlich einen Zerfall der regelmässigen und geordneten Struktur der Kollagenfibrillenbündel zeigten, lag es deshalb nahe, bei Röntgeninterferenzversuchen zunächst pathologische Symptome in kolloiden Dimensionen zu suchen. Dazu bietet sich die Röntgenkleinwinkelmethode an. Es wurde Ni-gefilterte CuK-Strahlung in einer Kleinwinkelkammer von Kiessig und Kratky benutzt. Die erstere hat feine Lochblenden und ein Auflösungsvermögen bis herauf zu 500 Å, die letztere ein Schlitzblendensystem mit einer Auflösung von 1500 Å. Für den vorliegenden Fall war es vorteilhafter, die Kiessig-Kammer trotz ihres geringen Auflösungsvermögens zu benutzen, weil in ihr nicht die Analyse sehr erschwerende Spaltverschmierung stattfindet. Der bei Kollagen zu erwartende innerste Reflex von 640 Å konnte also in keinem Falle beobachtet werden. Nur die kontinuierliche Kleinwinkelstreuung wurde in der Kratky-Kammer untersucht und nach der Theorie von HOSEMAN² analysiert.

TABELLE 1

KLEINWINKELSTREUUNG VON DEGENERIERTEN MENISKUS

Stadium	Fasern	Orientierung	Kontinuierlich		Diskontinuierlich Hoher Ordnung des 640-Å Reflexes															
			d_1	d_2	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.			
1 h	1	g	w	?	?	m	ss	ww	s	m	m	m	s	w	w	m	n			
2 hi	2,3	g	me	200	700	s	s	m	s	s	m	m	s	w	w	m	n			
3 i	—	b	s, y	200	300	?	?	ww	ww	m	ww	ww	m	ww	ww	ww	n			
4 ii	—	n	ss, y	?	?	n	n	n	n	w	n	n	w	n	n	n	n			
5 ii	4	n	ss, y	200	250	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	w			

Abkürzungen: ss, sehr stark; s, stark; m, mittel; w, schwach; ww, sehr schwach; n, nichts; ?, nicht gemessen; h, gesunde Fasern; hi, etwas kranke Fasern; i, kranke Fasern; ii, sehr kranke Fasern; e, elliptische Gestalt; y, Kugelsymmetrie; g, gut; b, schlecht.

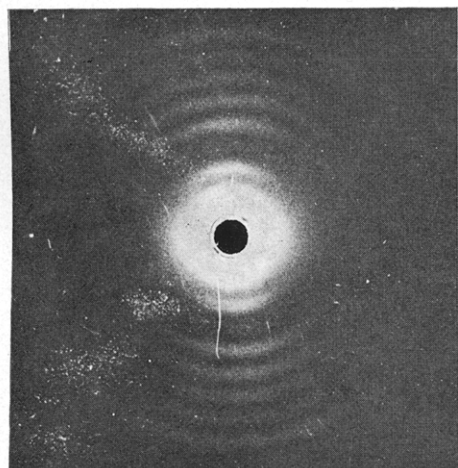


Fig. 1. Kleinwinkelstreuung eines gesunden Meniskus (Stadium 1). Die kontinuierliche Kleinwinkelstreuung erscheint in dieser Reproduktion viel zu stark.

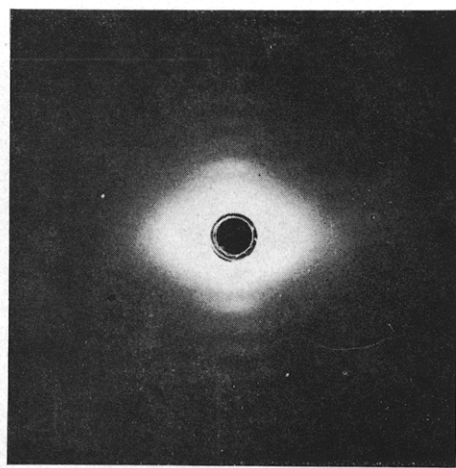


Fig. 2. Kleinwinkelstreuung von Meniskus im Degenerationsstadium 2. Die kontinuierliche Kleinwinkelstreuung hat zugenommen und besitzt elliptische Gestalt.

Die 14 von Dr. DAHMEN zur Verfügung gestellten Proben konnten ganz roh in 5 verschiedene Stadien der Degeneration eingeteilt werden. (vergl. Tabelle II). Das erste Stadium (gesunder Meniskus) zeigt fast keine kontinuierliche Kleinwinkelstreuung (in der Reproduktion der Fig. 1 erscheint die kontinuierliche Kleinwinkelstreuung nahe dem Äquator viel zu vorherrschend). Die 3. Ordnung der 640 Å Periode (das ist der 1. sichtbare Reflex ausserhalb der zentralen Schwärzung in Fig. 1) ist sehr stark.

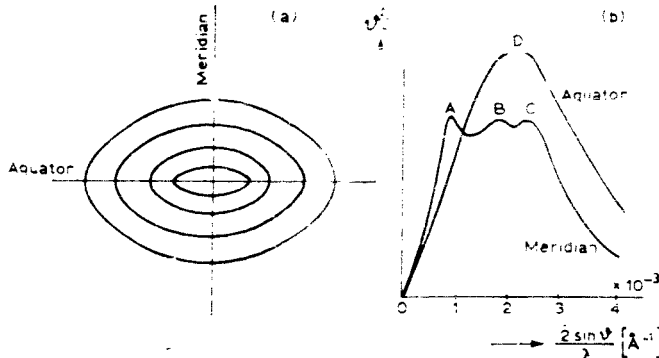


Fig. 3. Auswertung und kontinuierliche Kleinwinkelstreuung von Stadium 2. (a) Niveaumlinien gleicher Intensität. (b) $\theta^2 I$ - θ -Diagramm langs Äquator und Meridian.

Die 4. Ordnung ist kaum sichtbar, die 5. hingegen wieder weit betonter, die 6. bis 8. ist relativ schwach, die 9. ist ein bisschen stärker. Ausführlichere Untersuchungen dieser Intensitätsskala sind wünschenswert, weil sie in gewisser Weise von der des normalen Kollagens abweicht und für gesunden menschlichen Meniskus typisch zu sein scheint. Wenn die diskontinuierlichen Kleinwinkelreflexe in Fig. 1 bis 3 stets mehr oder weniger längs den DEBYE-Kreisen verschmiert sind, so hängt das damit zusammen, dass die Proben stets in ungestrecktem Zustand präpariert worden sind.

Die Röntgenkleinwinkel Aufnahme bei beginnender Degeneration (Stadium 2)

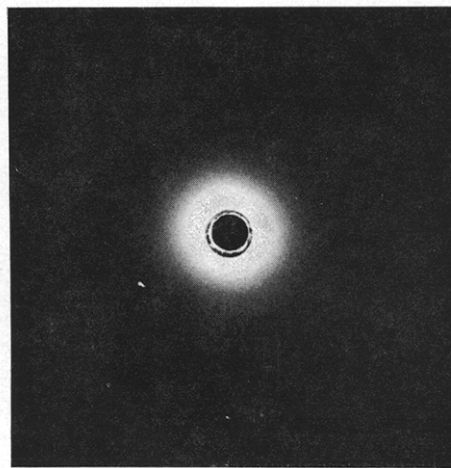


Fig. 4. Kleinwinkelstreuung vom Meniskus im Stadium 5. Der neu auftretende 40-Å DEBYE-kreis liegt ausserhalb des Bildes.