

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen  
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

## Das Bluteiweißbild bei experimenteller Amyloidose.

Von

GERHARD SCHNEIDER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. Juli 1948.)

Für die Erforschung der Amyloidose bedeutete die frühe Entdeckung der Verwandschaft der Globuline mit dem amyloiden Eiweißkörper auf Grund von Elementaranalysen (SCHMIEDEBERG) einen wesentlichen Fortschritt. Im Gegensatz zu den färberischen Eigenschaften des Amyloids, die für VIRCHOWS Begriffsprägung bestimmend waren, mußte also bei weiteren Studien an dieser Krankheit vor allem an eine Beziehung des Amyloids zum Bau- oder Umsatzeiweiß des befallenen Organismus gedacht werden. LETTERERS Amyloidarbeit vom Jahre 1925 kennzeichnete dabei die Amyloidose in klinischer und morphologischer Analyse und zahlreichen Experimenten als eine Störung des Blut- und Gewebeeiweißumsatzes im Gefolge von chronisch verlaufenden Krankheiten. Die Amyloidose hat ja in der Vorgeschichte und als Parallelkrankheit stets chronische Infekte oder langdauernde Zustände starken Körpereiweißzerfalls (Tumoren usw.). Auch tritt sie als Folge zahlreicher parenteraler Eiweißgaben bei Serumtieren auf. In Würdigung dieser Tatsache legte LETTERER (1, S. 554) schon früh sehr großen Wert auf die humoralen Vorgänge bei diesen Krankheiten und stellte als verknüpfendes Moment die Hyperglobulinämie heraus. Sie erst schafft die Möglichkeit an Amyloidose zu erkranken, stellt aber natürlich bei der Seltenheit des Amyloids nicht die Krankheit selbst dar. Für das Auftreten des amyloiden Körpers ist vielmehr eine besondere Konstellation im Verlaufe dieser Vorkrankheiten, formal gesehen also eine von der normal eintretenden Hyperglobulinämie abweichende Bluteiweißlage zu erwarten.

Leider kann die Klinik zu den Fragen der humoralen Vorgänge bei der Entstehung des Amyloids bis jetzt nur wenig beitragen. Das Auftreten des Amyloids wird bekanntlich erst spät diagnostizierbar und die Amyloidose ist außerdem so selten, daß die eigentlich ausschlaggebenden Vorgänge vor dem Niederschlag des Eiweiß in den Organen, d. h. das Auftreten der besonderen Bluteiweißlage für die Beobachtung kaum in Betracht kommen.

Um nun das Problem der formalen und kausalen Genese der Amyloidose in exakter Weise erforschen zu können, begründete LETTERER (I, S. 489f.) einwandfreie Methoden zur Erzeugung experimenteller Amyloidose bei weißen Mäusen. Sie alle laufen darauf hinaus, den Stoffwechsel der Maus von außen her oder endogen (durch Resorption eingeschmolzenen Körpereiweißes) mit größeren parenteralen Eiweißgaben zu belasten. Was bedeutet nun dieses nicht über den Verdauungstrakt ab- und umgebaute Eiweiß für den Organismus? Ein Teil der Autoren glaubt, daß allein die Überschwemmung des Organismus mit blutfremdem Eiweiß ein Versagen des notwendigen Abbaues herbeiführen kann und damit zur Ablagerung dieser Stoffe im Gewebe führt (KUSZYNSKI), teleologisch gedacht also eine Notmaßnahme des Organismus. Diesem Gedanken schließt sich auch mehr oder weniger RANDERATH an, obwohl er sich in der Frage der Genese dieser Eiweißkörper (Paraproteine) nicht festlegt.

Allein schon eine oberflächliche Betrachtung des Verlaufs der menschlichen und experimentellen Amyloidose macht eine so einfache Vorstellung wie die einer reinen Ablagerung blutfremder nicht abbaufähiger Proteine unwahrscheinlich. Ein Versagen des parenteralen Abbaues müßte dann vor allem bei Serumtieren, wo ja sehr viel eiweißreiche Kulturlösung einverleibt wird, in Form einer Amyloidose noch viel öfters beobachtet werden. Weiterhin besteht keinerlei Relation zwischen der verabreichten Kulturmenge und der Amyloidmenge, lediglich eine gewisse Reihenfolge im Befallen der Organe fällt auf. Andererseits tritt bei nur geringer exogener oder endogener Proteineinschwemmung schon Amyloid auf. LETTERER erzeugte Amyloid mit nur 0,6 mg Casein täglich, oder durch kolloidalen Schwefel und Selen, schließlich auch mit Phenol in destilliertem Wasser (2, S. 55). Bei der experimentellen Amyloidose kommt das zu „verarbeitende“ Eiweiß nur sehr langsam zur Wirkung, die Absceßbildung kann ganz minimal sein, dennoch tritt Amyloid auf. Ein „Versagen“ des Apparates des parenteralen Abbaues ist dabei wohl kaum möglich. Auch beim menschlichen Amyloid ist es charakteristisch, daß dasselbe bei Erkrankungen mit langsamer und relativ geringer und zeitlich protrahierter Eiweißschmelzung auftritt. Andererseits spricht das häufige Auftreten der experimentellen Amyloidose bei der Maus gegen eine Stoffwechselstörung im Sinne einer Lähmung der Verarbeitung überschüssigen oder artfremden Eiweißes, denn der sehr rasche Stoffwechsel der Maus sollte gut in der Lage sein, mit diesen protrahiert anfallenden Eiweißschlacken fertig zu werden. Es kann also auch im Experiment die „Überlastung“ kaum eine Rolle spielen. Während so allein schon die dynamische Betrachtung des Krankheitsbildes der Amyloidose die reine Stapelung eines unabgebauten Proteins

unwahrscheinlich macht, spricht das histologische Bild ebenfalls dagegen. Der amyloide Körper liegt interzellulär, ruft jedoch als solcher keinen oder nur ganz selten einen Fremdkörperreiz hervor. Also muß er ziemlich körperadäquat sein. Mit dem Gedanken einer Abbau-störung mit folgerichtiger Elimination ins Mesenchym läßt sich auch der isolierte Befall eines oder weniger Organe schlecht vereinbaren. So kann man zu dem Vermutungsschluß kommen, daß der Organismus bei der Amyloidentstehung gegenüber dem wirksamen Protein nicht etwa im Abbau versagend-passiv sich verhält, sondern daß der amyloide Körper das Produkt einer dem Organismus eigentümlichen Reaktion ist.

Von der Konzeption eines Antikörper-Antigenvorganges ausgehend gelang es LETTERER (2), den Beweis dieser These in Verfolgung der LÖSCHCKESchen Arbeiten über bestimmte Mengenverhältnisse der Antikörper-Antigenreaktion beim Amyloid zu erbringen. Im Einklang mit LÖSCHCKES Auffassung ist der amyloiderkrankte Organismus arm an Antikörpern und reich an Antigen, während der nicht erkrankte Organismus gerade umgekehrt sich verhält. Daß schon der zeitliche Abstand zwischen Anstellung der Trübungsreaktion zum Nachweis der Antikörper und dem Auftreten des Amyloids eine wesentliche Rolle spielt, zeigten die Versuche mit Pferdeseren (LETTERER 2, S. 41, 53, 59). Waren die Pferde schon lange im Serumdienst und an ausgedehnter Amyloidose erkrankt, so fielen die Fällungsreaktionen negativ aus.

Ein Weg dieses zeitliche Moment auszuschalten und vor allem auch den Zeitpunkt für das Zustandekommen dieser zu erwartenden besonderen Bluteiweißkonstellation zu finden, wäre eine laufende Anstellung der Präcipitationsprobe während der ganzen Dauer des Amyloidexperimentes. Aber man braucht wenigstens für die Maus dazu zuviel Serum. Da aber die Antikörper Globulinnatur besitzen, müßte schon allein die laufende Globulinbestimmung des Serums weitgehende Schlüsse ermöglichen. Es wird dabei nur die Antigenmenge nicht erfaßt, obwohl sie sicher ein nicht unwesentliches Moment darstellt.

In den nun zu schildernden Versuchen haben wir daher geprüft, wie sich die Entstehung der experimentellen Amyloidose im Globulin-gehalt des Serums (also der Fraktion, der auch die Antikörper angehören) bei der Maus ausdrückt. Für die Bestimmung des Globulins im Mäuseserum war eine von uns neugeschaffene nephelometrische Mikromethode am meisten geeignet (SCHNEIDER). Mit ihr läßt sich der Globulin- und Gesamteiweißgehalt noch bei  $0,015 \text{ cm}^3$  Serum relativ sicher ermitteln.

Das Amyloid wurde in den folgenden Versuchen durch subcutane Verabreichung von 10—15 Spritzen von je  $0,5 \text{ cm}^3$  einer 2- bzw.

3%igen Casein- oder Nucleinlösung in 0,25%iger Natronlauge im Verlaufe von 21 Tagen erzeugt. Die zur Lösung des Proteins nötige Natronlauge macht dabei eingehende Veränderungen am injizierten Gewebe, es entstehen bald größere Einschmelzungen des Unterhautzellgewebes. Neben der exogenen Antigengabe (Casein-Nuclein) wirkt also auch die Körpersubstanzeinschmelzung als Antigenquelle (sekundäre Antigenbildung) (LETTERER 3). Während bei den größeren Experimentalieren die Hyperglobulinämie als vermehrte Antikörperbildung nach exogenen Antigengaben (BERGER) und Autopräcipitine gegen Körpersubstanzeiweiß (CENTANNI) schon länger nachgewiesen worden sind, mußte zunächst geprüft werden, ob die Maus auf diese exogenen und endogenen Antigene in gleicher Weise reagieren kann.

Wurden Mäuse ein- oder fünfmal gespritzt, so zeigt das Blut danach eine Globulinvermehrung bei gleichzeitigem Albuminsturz. Beide Veränderungen des normalen Spiegels gleichen sich jedoch sehr bald wieder der Ausgangslage an. Die Bluteiweißverschiebung ist bei den fünfmal gespritzten Tieren bedeutend stärker ausgeprägt und dauert längere Zeit an. Vergleicht man diesen Vorgang mit den Ergebnissen von BERGER bei parenteraler Verabreichung bei Kaninchen, so steht fest, daß die Maus bei unserer Behandlung genau die gleiche Reaktion zeigt. Nicht gespritzte Tiere dienten als Kontrolle und behielten trotz der häufigen Blutentnahmen konstante Bluteiweißwerte.

Dieser Globulinanstieg ist für alle Tiere einer größeren Versuchsreihe eine konstante Erscheinung, denn von 83 Tieren mit 1—15 Injektionen zeigen 69 einen deutlichen Anstieg von über 10% des Anfangswertes, also außerhalb der methodischen Fehlerbreite.

Da die Maus erfahrungsgemäß erst bei einer größeren Zahl von Injektionen an Amyloid erkrankt, wurden nun laufende Beobachtungen am gleichen Tier im Zuge einer 21tägigen amyloidkrankmachenden Behandlung angestellt. Ausgehend von der Beobachtung, daß die Fünfspritzenverabreichung innerhalb von fünf Tagen genau wie nur eine Spritze jedoch protrahiert wirkt, wurde die Gesamtspritzenzahl dieser amyloidkrankmachenden Behandlung in 2—3 solche Raten aufgeteilt, und nach jeder Rate die Bluteiweißbestimmung vorgenommen. In früheren Versuchen zeigte sich bei fortlaufender Verabreichung der Injektionen ohne Intervall ein sehr uneinheitliches Bild, wobei die Reaktion des Tieres weder zeitlich noch mengenmäßig zu beurteilen war. Blutverlust und Injektionserfolg überlagerten sich in undurchsichtiger Weise. Deshalb wurde der Behandlungs- und Beobachtungsmodus folgendermaßen gewählt:

1. Feststellung des individuellen Bluteiweißspiegels des Versuchstieres vor der Behandlung durch zwei bis drei Bestimmungen innerhalb 8—12 Tagen.

2. Kräkmachende Behandlung und Beobachtung des Tieres in der Phase der Amyloidentstehung. Das Tier bekommt sofort nach der letzten Normalwertbestimmung die erste und in den folgenden 4 Tagen die weiteren vier Spritzen der ersten Fünferrate. 24 Stunden nach der fünften Spritze wird das Bluteiweiß bestimmt. Es folgen jeder Rate 2 Tage Pause. Dann kommen die weiteren Fünferraten mit derselben Bestimmungspause.

3. Endbestimmung des Bluteiweißes bei der Tötung des Tieres, die 2 Tage nach der letzten Spritze erfolgt.

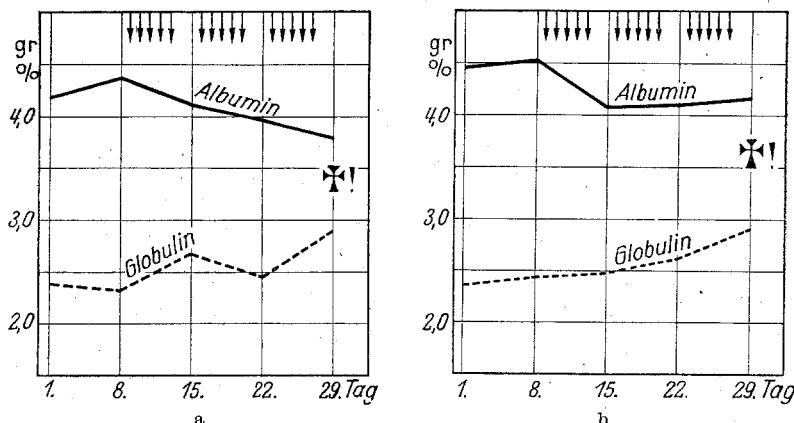


Abb. 1a u. b. Mittelwertkurven der laufenden Globulinbestimmung. a von 21 erkrankten Tieren; b von 12 nichterkrankten Tieren.

Dergestalt angestellte Beobachtungen lassen eine einwandfreie Verfolgung und Einschätzung des Spritzenerfolges zu. Es wurden insgesamt 33 Tiere in dieser Art laufend beobachtet, 21 davon wurden schwach bis stark amyloidkrank.

Schon die oberflächliche Betrachtung der Kurven amyloidbefallener Tiere zeigt deutliche Schwankungen der Globulinwerte nach einem anfänglichen recht erheblichen Anstieg dieser Komponente. Auffallend ist dabei ein fast regelmäßiger Albuminsturz, der bei den erkrankten Tieren im Gegensatz zu den nichterkrankten im Laufe der Behandlung nicht mehr aufgeholt wird. Der Globulingerhalt im Serum nicht erkrankender Tiere steigt durchweg langsamer an bis zu einem Höchstwert bei der Tötung. Der anfängliche Albuminsturz wird dabei im weiteren Verlauf des Versuches wieder fast völlig ausgeglichen. Um die Ergebnisse der laufenden Bestimmung an 33 Tieren in voller Breite auswerten zu können, wurden Mittelwertkurven jeweils für befallene und verschont gebliebene Tiere angelegt. Jeder Punkt dieser Kurven stellt den errechneten Mittelwert der betreffenden Tiere zu dem entsprechenden Untersuchungszeitpunkt dar. Abb. 1a und b

bringt weitgehende Bestätigungen der angestellten Einzelbeobachtungen. Das positive Tier zeigt demnach Störungen im Bluteiweißbild insofern, als der primäre Globulinanstieg unterbrochen wird von einem Abfall desselben oder einer Anstiegshemmung. In einer letzten Phase kann der Globulinanstieg wieder erscheinen und eventuell die alte Höhe erreichen. Es kommt also zu einer temporären Änderung des Globulinspiegels. Das Albumin sinkt dagegen während des Globulinanstiegs und bleibt im Falle der Erkrankung des Tieres dauernd niedriger als der Anfangswert oder sinkt sogar konstant weiter. Es kommt hier also zu einer fort dauernden Änderung. Das negative Tier reagiert mit einem etwas langsameren Globulinanstieg, ohne dabei die Fähigkeit zur Regeneration des abgefallenen Albumins zu verlieren.

Während die bisherigen Untersuchungen Tiere mit stabilem, wenn auch individuell verschiedenen hohen Globulinspiegel vor der Behandlung betrafen, führten andere Versuchsreihen zu interessanten Beobachtungen. Es fanden sich unter 20 Tieren 11 Tiere mit sehr starken Schwankungen der Globulinwerte in der Vorperiode. Nach der Behandlung zeigten sämtliche 11 Tiere starke Amyloidablagerungen in den Organen, von den restlichen 9 Tieren erkrankten nur 3 an mäßiger Amyloidose.

Tabelle 1 bringt das nach Amyloidstärkegraden in der Milz differenzierte Ergebnis dieser Versuche. Weitere Beobachtungen bestimmter Konstellationen in der Vorperiode lassen die Vermutung zu, daß Tiere mit deutlich überhöhten Globulinwerten *vor* der Behandlung schon von vornherein zur Amyloidose neigen.

Wie verhalten sich nun die Endbestimmungswerte bei Tieren mit und ohne Amyloid? Es liegt hierüber eine statistische Erfassung sämtlicher Endwerte von 106 Tieren vor. Von diesen haben 53 eine Amyloidose, während 53 nicht erkrankt sind.

Spalte I (Tabelle 2) zeigt bei der steigenden Anordnung der absoluten Globulinwerte eine Massierung der positiven Tiere zwischen 2,3—2,6 g-% und der negativen zwischen 2,7—2,9 g-% und um Werte bei 2,0 g-%. Die positiven Tiere haben also im allgemeinen niedrigere Globulinwerte als die negativen, eine Beobachtung, die LETTERER (1, S. 568) schon einmal machen konnte und die nun ihre Bestätigung findet. Spalte II zeigt keine besonderen Unterschiede zwischen positiven und negativen Tieren, sie liegen beide über die ganze Breite gleichmäßig verstreut.

Tabelle 1.

Tierzahl	Globulin-schwankungen in der Vorperiode	Amyloid-ergebnis
9	höchstens 12 %	6 ohne 2 (+) 1 +
11	11—42 %	1 (+) 6 + 4 ++

Tabelle 2.

I			II			III					
Absolute Globulinwerte			Absolute Gesamt- eiweißwerte			Relativer Globulingeinhalt bezogen auf Gesamteiweiß					
g- %	Tierzahl		g- %	Tierzahl		rel. %	Tierzahl		Ver- hältnis + : -		
	+	-		+	-		+	-			
> 2,0	4	6	> 5,6	9	10	27—30	3	3	1:1		
2,1	5	5	5,7	2	6	30—33	2	5	3:2		
2,2	3	2	5,8	2	4	33—36	10	3			
2,3	7	3	5,9	5	4	37—39	12	5	3:2		
2,4	9	5	6,0	6	4	40—42	10	10			
2,5	6	4	6,1	4	3	43—45	9	10			
2,6	8	3	6,2	3	4	46—49	2	10	5:8		
2,7	3	9	6,3	3	3	50—52	4	4			
2,8	0	5	6,4	5	3	52—55	1	3	1:3		
2,9	2	6	6,5	2	2						
3,0	1	1	6,6	2	2						
< 3,0	5	4	< 6,7	10	8						

In der Anordnung nach relativen Globulinprozenten bezogen auf das Gesamteiweiß wie sie Spalte III liefert, häufen sich die positiven Tiere um die mittleren Werte (33—45%), die auch dem Normalwert unbehandelter Tiere (38—40%) entsprechen. Tiere mit niederem oder sehr erhöhtem Globulingeinhalt bekamen also weniger Amyloid. In der letzten Säule der Spalte III steigt das Verhältnis der positiven zu den negativen Tieren in den geklammerten Gruppen bei steigenden relativen Prozenten bis zur mittleren Gruppe an, um dann wieder abzufallen.

Als Ergebnis dieser laufenden Bluteiweißbestimmungen an weißen Mäusen im Verlaufe einer amyloidkrankmachenden Behandlung erscheinen somit folgende Punkte wesentlich:

1. Im Zuge der Injektionen kommt es bei fast allen Tieren zu einer deutlichen Verschiebung der Bluteiweißkörper in die größer disperse Phase auf Kosten der feindispersen.
2. Tiere mit stark wechselndem Anfangsglobulinspiegel und solche mit hohen, unregelmäßigen Werten vor der Behandlung neigen besonders zur Amyloidose.
3. Nach mindestens 8—12 Injektionen ist der krankmachende Einfluß derselben so stark, daß das Amyloidtier Störungen in der Globulinvermehrung zeigt. Die anfängliche Vermehrung stoppt, sie fällt ab oder steigt nicht wesentlich weiter. Stets ist diese Störung von einem deutlichen Albuminsturz begleitet. Während das von der Krankheit verschont bleibende Tier seinen anfänglichen Albuminsturz bald ausgleichen kann, ist das erkrankende Tier dazu nicht in der Lage. Das Globulin kann unter Umständen wieder ansteigen, während das Albumin sich nicht mehr erhebt.

4. Am Schluß liegen die erkrankten Tiere in ihrem absoluten und relativen Globulinspiegel unter dem der verschont gebliebenen Tiere.

5. Zur Frage der Disposition eines Tieres zur Amyloidose, liefern schon alte Erfahrungen von LETTERER (1, S. 49 und 51) eine gute Parallelie. Während Tiere aus einwandfreier Aufzucht ohne einseitige Ernährung stets eine sehr massive Behandlung bis zur Erkrankung nötig haben, fiel schon immer die recht hohe Amyloidquote unter den Tieren auf, die bei schlechtem Allgemeinzustand in den Versuch genommen wurden. Sie erkranken häufiger und früher an Amyloidose. Diese Tiere sind zweifellos mit den hier beschriebenen mit unstabilem Anfangsspiegel identisch. Unter ihnen sind auch die Tiere zu suchen, die durch akzidentelle Infekte bedingt schon mit hohem Globulin gehalt des Blutes in den Versuch genommen wurden.

6. Die vorliegenden Versuchsergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Injektionsbehandlung bei der Maus zu einer stark erhöhten Anforderung an den Bluteiweißstoffwechsel führt. Diese Mehrleistung kann von einem Teil der Tiere nicht erfüllt werden und erzeugt Mängel in der Eiweißbildung, die eine Amyloidose bedeuten. Der amyloide Eiweißkörper ist also ein körpereigenes Produkt und das Symptom einer gestörten Eiweißsynthese, ohne daß vorerst über seine besonderen Qualitäten und Präcipitationsbedingungen Bestimmtes hier ausgesagt werden kann und soll.

#### Literatur.

BERGER: Z. exper. Med. 28, 15 (1922). — CENTANNI: Zbl. Bakter. usw. 35 (1904); 43 (1907). — KUCZYNSKI: Virchows Arch. 239, 300 (1922). — LETTERER (1): Beitr. path. Anat. 75 (1926). — (2) Virchows Arch. 293 (1934). — (3) Virchows Arch. 1948. — LÖSCHEK: Beitr. path. Anat. 77, 235 (1927). — RANDERATH: Virchows Arch. 314, 448 (1947). — SCHMIEDEBERG: Siehe LETTERER, Beitr. path. Anat. 75, 549 (1926). — SCHNEIDER: Z. phys. Chem. 283, H. 3 (1948).