

Aus dem Institut für physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. LANG)

Ablagerungen von Lipidmaterial in der Niere bei Ratten nach Verfütterung von autoxydierten Fetten

Von

W. GRIEM

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. April 1963)

In den letzten Jahren haben wir Fütterungsversuche mit Fetten durchgeführt, die bei 180° C autoxydiert worden sind. Die auffälligsten Befunde fanden wir bei den Versuchstieren an den Nieren, während die Nieren der Kontrolltiere keine pathologisch-histologischen Veränderungen aufwiesen. Durch histochemische Untersuchungen gelang es uns, die bei den Versuchstieren in den Nieren nachgewiesenen Ablagerungen als Kalk-Fett-Substanzen zu identifizieren. Über diese Untersuchungen wollen wir in der folgenden Arbeit berichten.

Methoden

Die Versuchsratten (Versuchsgruppen Sj V bis VIII und Kontrollgruppe Sj Kw) standen 8 Wochen im Versuch. Als Futter bekamen sie: 31 % Mondamin, 10 % Casein, 33,3 % Magermilchpulver, 0,7 % Salzmischung A (Hawk-Oser), 3 % Hefe, 2 % pulverisierte Cellulose und 20 % Sojaöl. Ferner wurden jedem Tier täglich 2 Tropfen Vitamin B-Komplex und 3 mg Vitamin E, sowie wöchentlich 30 I.E. Vitamin A verabreicht. Der 20 %ige Fettanteil bestand bei den Versuchstieren aus einem toxisch geblasenen Sojaöl. Dieses gewinnt man durch folgende Behandlung: Das Öl wird im Ölbad auf 180° C erhitzt. Gleichzeitig bläst man eine bestimmte Menge Luft, die durch eine Glasfritte fein verteilt wird, durch das Öl. So erzielt man bei den polyensäurereichen Ölen chemisch erfaßbare Veränderungen, die in der Tabelle 1 wiedergegeben sind. Die durch diese Behandlung autoxydierten Substanzen zeigen im Tierversuch mit zunehmender Blasintensität eine zunächst zunehmende Toxizität, die ein Maximum erreicht und dann wieder abnimmt. Dieser später zu beobachtende Toxizitätsabfall der stark geblasenen Öle ist nach unserer Ansicht dadurch bedingt, daß die für die Toxizität verantwortlichen Substanzen immer schlechter resorbiert werden. Die Toxizität der geblasenen Öle führen wir auf die bei dieser Behandlung entstehenden Oxypolymere zurück.

Nach der Versuchszeit wurden die Ratten durch Äther getötet. Die Anzahl der Todesfälle war in den einzelnen Gruppen unterschiedlich. Bei den männlichen Tieren wurden in der Kontrollgruppe und in der Versuchsgruppe Sj V keine Todesfälle beobachtet. In der Gruppe Sj VI betrugen sie 15 %, in der Gruppe Sj VII 50 % und in der Gruppe Sj VIII 35 %. Bei den Weibchen traten in der Kontrollgruppe und in den Gruppen Sj V und Sj VI keine vorzeitigen Todesfälle ein. Dagegen starben in der Gruppe Sj VII 20 % und in der Gruppe Sj VIII 15 % der Versuchstiere. Weitere Angaben über die Versuchsbedingungen, die physiologischen Untersuchungen der Versuchstiere und über die chemischen Veränderungen der toxisch geblasenen Fette finden sich in den Arbeiten von K. LANG u. Mitarb. und bei K. JAHR.

Von den Organen wurden die Herzen, die Lebern und die Nieren, sowie die Milzen histologisch untersucht.

Ergebnisse

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Organe sind an den *Lebern* und an den *Herzen* keine pathologischen Veränderungen nachzuweisen. Bei der histologischen Untersuchung der *Nieren* fallen sofort die starken, bei der HE-Färbung sich dunkelviolet anfarbenden Einlagerungen im Nierenparenchym auf.

Jedoch ist die Häufigkeit und die Größe der Einlagerungen bei den einzelnen Versuchstieren unterschiedlich. Während sich bei den Versuchstieren, die stark autoxydiertes Fett mit der Grundkost erhielten, in jedem histologischen Nierenpräparat Einlagerungen finden, lassen sich bei den Versuchstieren, die nur ein schwach autoxydiertes Fett als Beikost bekamen, etwa in 75 % der Nierenpräparate Einlagerungen nachweisen. Auch die Lokalisation ist unterschiedlich. In den Präparaten, in denen nur geringgradige Einlagerungen sind, finden sich diese vornehmlich in der Zona intermedia der Marksubstanz. Bei starken Einlagerungen sieht man sie auch in der Zona basalis des Nierenmarkes, und gelegentlich kann man sie auch in der Nierenrinde nachweisen (Abb. 1).

Die ersten Einlagerungen findet man als kleinste Körnchen im Protoplasma der Nierenepithelien. Sie liegen in der Regel an der der Basalmembran zugekehrten Seite der Zelle, färben sich bei der HE-Färbung meist dunkelviolett an und das Protoplasma in ihrer Umgebung ist vacuolig aufgelockert. An diesen Stellen kann man ferner

in der Regel auch eine Zerstörung der Basalmembran beobachten. Nehmen die Einlagerungen zu, so beginnen die Nierenepithelien in das Lumen des Tubulus zu wuchern (Abb. 2). Später gehen die basal gelegenen Nierenepithelien zugrunde. Daher sieht man in den mikroskopischen Präparaten die abgelagerten Massen zwischen dem interstitiellen Bindegewebe und den sich neu gebildeten Nierenepithelien liegen.

Tabelle 1. Die Kennzahlen der in den Fütterungsversuchen verwendeten geblasenen Sojaöle

	Sj Kw	Sj V	Sj VI	Sj VII	Sj VIII
Blasezeit Std . .	—	2,07	3,0	4,3	7,6
Luftmenge m ³ /kg	—	0,7	1,1	1,7	5,0
Jodzahl	130	110	96	75	70
Peroxydzahl . .	13,3	14,2	12,1	7,6	7,4
Säurezahl	0,0	1,6	2,4	2,8	3,7
Epoxydzahl . .	0,27	6,3	8,1	8,1	8,4
Hydroxylzahl . .	0,0	20,7	27,6	33,0	38,5
Verseifungszahl .	184	196	199	197	208

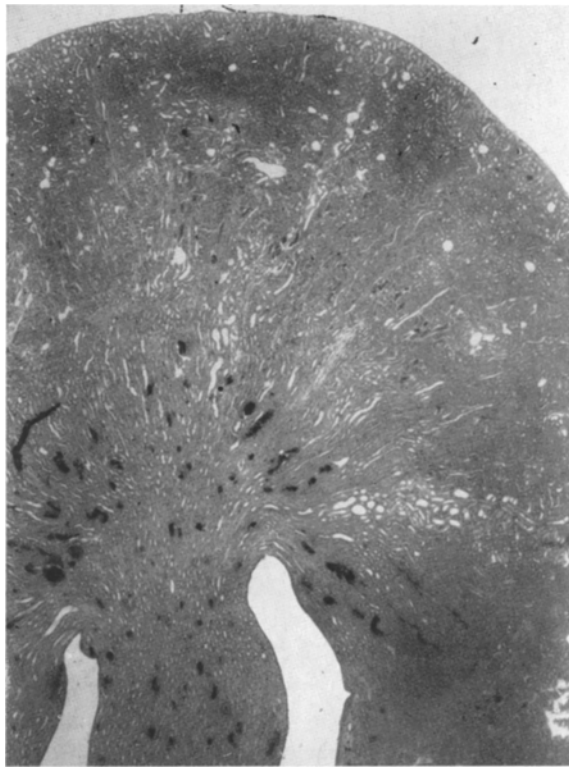


Abb. 1. Starke Einlagerungen in der Zona intermedia und in der Zona basalis des Nierenmarkes. Einige Ablagerungen befinden sich auch in der Nierenrinde. Übersicht, H.E.-Färbung; Vergr. etwa 15 ×

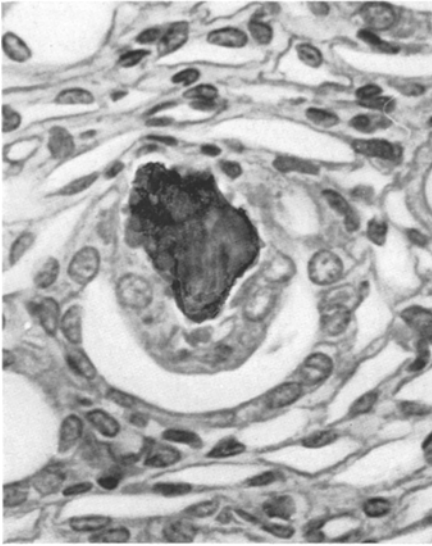


Abb. 2

Abb. 2. Die Nierenepithelien des Sammelrohrs beginnen in das Lumen zu wuchern. (H.E.-Färbung; Vergr. etwa 415 ×)

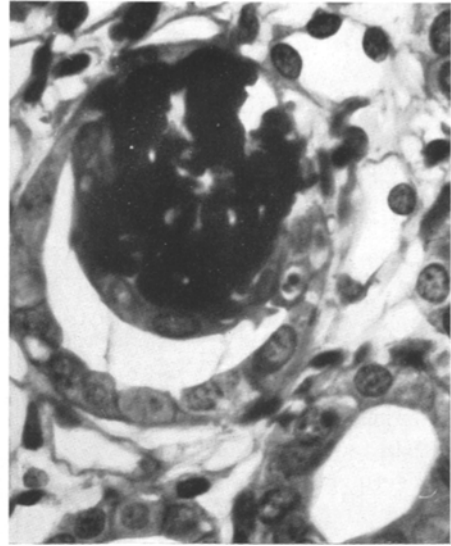


Abb. 3

Abb. 3. Stärkere Einlagerungen in den Epithelien eines Sammelrohrs. Die basal gelegenen Zellen sind zugrundegegangen. H.E.-Färbung; Vergrößerung etwa 400 ×

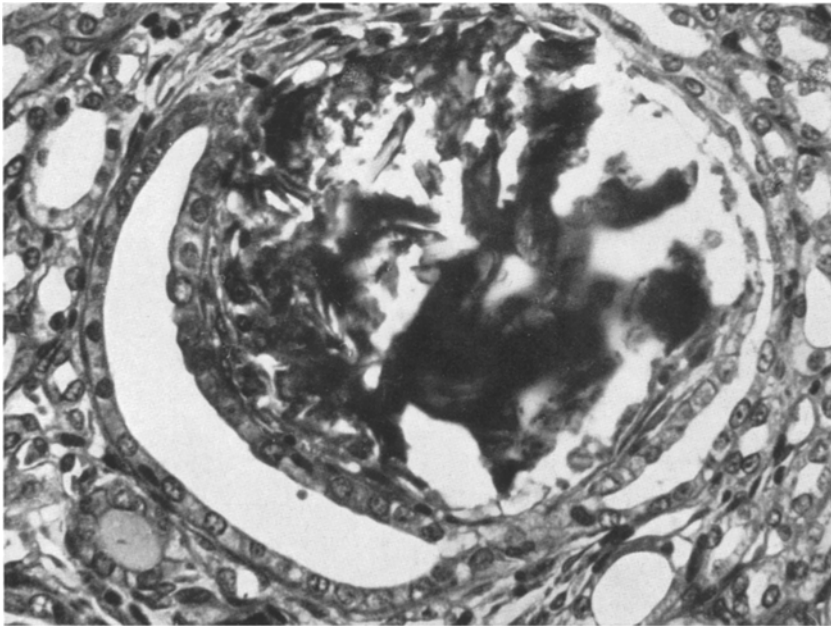


Abb. 4. Durch sehr starke Einlagerungen gehen die Zellen einer Henleschen Schleife zugrunde (rechts). Das links von den Einlagerungen gelegene Sammelrohr wird zusammengedrückt. H.E.-Färbung; Vergr. etwa 270 ×

Die Zellkerne dieser wuchernden Zellen zeigen häufig Mitosen. Ferner fällt auf, daß die Zellkerne größer sind als die Kerne der Nierenepithelien, die keine

Wucherungen aufweisen. Die abgelagerten Massen nehmen dann an Größe zu und drücken die neu gebildeten Zellen in das Lumen der Tubuli. Aus diesem Grunde ist das Lumen der Harnkanälchen an diesen Stellen nicht mehr kreisrund, sondern man sieht im mikroskopischen Präparat entweder nur noch einen schmalen Spalt oder das Tubuluslumen ist ganz verschlossen (Abb. 3). Werden die Einlagerungen im Laufe der Zeit stärker, so drücken sie das Nachbargewebe zur Seite, und die Nierenepithelien gehen durch die Druckatrophie zugrunde (Abb. 4). So gelangen die eingelagerten Substanzen in das Lumen der Harnkanälchen. Sie können nun entweder in das Lumen des Sammelrohrsystems oder der Henleschen Schleife kommen. Gelangen sie in das Sammelrohrsystem, so werden sie bald durch den Harnstrom in das Nierenbecken ausgeschwemmt, in dem sie in den histologischen Schnitten häufig nachgewiesen werden können. Gelangen jedoch die Substanzen in das Lumen der Henleschen Schleife, so werden sie durch den Harnstrom in die Tubuli recti II und in die Tubuli contorti II gespült. Da wir in der Nierenrinde die Einlagerungen nur in den Tubuli cont. II nachweisen konnten, ist anzunehmen, daß der Druck des Flüssigkeitsstromes nicht ausreicht, um die losgelösten Substanzen aus der Niere auszuschwemmen. Aus diesem Grunde bleiben sie in den Lumina der Tubuli contorti II als Ablage-

Tabelle 2. *Färberisches Verhalten und histochemische Eigenschaften der Einlagerungen in den Nieren*

Methode	Ergebnis
Eigenfarbe	hellbraun
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	dunkelviolett
Azan-Färbung	blau
van Gieson-Färbung	rot
Eigenfluoreszenz, UV-Licht	blaugrün
Eigenfluoreszenz, Blaulicht	gelbgrün
Untersuchung im polarisierten Licht	doppelbrechend
Untersuchung im polarisierten Licht mit Gipsrot I.	Vorzeichen + und -
Färbung mit Scharlachrot	Ø
Färbung mit Sudanschwarz am Gefrierschnitt	++
Färbung mit Sudanschwarz am Paraffinschnitt	+
Färbung mit Nilblausulfat	blau
Anfärbbarkeit mit Methylenblau (0,019%) bei p _H 5	+++
Anfärbbarkeit mit Methylenblau (0,019%) bei p _H 8	+++
PAS-Reaktion (Hotchkiss)	+++
PAS-Reaktion nach Acetylierung	+++
Anfärbbarkeit mit Osmiumtetroxyd	+
Nadi-Reaktion	++
Reaktion mit Schiffschem Reagens	++
Reaktion mit Schiffschem Reagens, Vorbehandlung mit Natriumbisulfat	Ø
Reaktion mit Schiffschem Reagens, Vorbehandlung mit Phenylhydrazin	Ø
Anfärbbarkeit mit alkalischem Silbernitrat	+
Ninhydrin-Schiff-Reaktion	Ø
Behandlung mit 0,62 n H ₂ SO ₄	Gipskristalle
Silbernitratmethode nach v. Kossa	+++
Turnbullblaureaktion	+++
Berliner Blau-Reaktion	+++
Reaktion mit Ferrieyankalium	Ø

Zeichenerklärung: +++ = starke positive Reaktion, bzw. gute Anfärbbarkeit; ++ = mittelgradige positive Reaktion, bzw. mittelmäßige Anfärbbarkeit; + = schwach positive Reaktion bzw. schlechte Anfärbbarkeit; Ø = negative Reaktion bzw. keine Anfärbbarkeit.

rungen liegen. Der größte Teil der Einlagerungen verbleibt in der Zona intermedia der Marksubstanz. Da die abgelagerten Massen in dieser Zone einen Durchmesser von 200 μ erreichen können, kann es in diesem Bereich zu einem vollständigen Verschluß der Tubuli kommen. Durch die damit verbundene Stauung des Primärharnes sieht man dann im Rindengewebe in den histologischen Schnitten schon bei kleiner Vergrößerung sektoral eine starke Erweiterung der Hauptstücke. Die Rückstauung geht auch auf die Nierenkörperchen über. Dies ist daran erkenntlich, daß der freie Raum der Bowmanschen Kapsel stark er-

Tabelle 3. Die Löslichkeit der Niereneinlagerungen in Säuren, Laugen und Fettlösungsmitteln

Lösungsmittel	Zeit in Std	Tempera- tur in °C	Ergebnis
1n HNO ₃	2	20	+
1n HNO ₃	18	20	++
1n HCL	24	20	0
2n HCL	24	20	+
3n HCL	24	20	++
3n CH ₃ COOH	24	20	0
Alkohol	24	60	0
Chloroform-Alkohol	24	60	0
Äther-Chloroform	24	60	0
Xylol	24	60	0
n/10 NaOH	2	20	0
n/10 KOH	2	20	0
2n HCL und n/10 NaOH	24 und 2	20	+
2n HCL und n/10 KOH	24 und 2	20	++
2n HCL und n/10 NaOH	24 und 24	20	++
2n HCL und n/10 KOH	24 und 24	20	+++
1n HNO ₃ und n/10 NaOH	24 und 2	20	+++
1n HNO ₃ und n/10 KOH	24 und 2	20	++++
2n HCL und Alkohol- Xylol	24 und 2	20	++++
1n HNO ₃ und Alkohol- Xylol	24 und 2	20	++++

Zeichenerklärung: Grad der Löslichkeit = + schlecht ↔
++++ gut; 0 unlöslich.

weitert ist, während in den nicht gestauten Bezirken dieser freie Raum nur als ein schmaler Spalt in Erscheinung tritt. In der Regel liegen die Einlagerungen reaktionslos im Parenchym. Teilweise sieht man jedoch eine beginnende Bindegewebsbildung. In einigen Präparaten findet man auch am Rande der Einlagerungen größere Haufen von neutrophilen Granulocyten. Gelegentlich können auch Einlagerungen in den Blutcapillaren nachgewiesen werden. Von diesen ist jedoch anzunehmen, daß sie erst nachdem die Gefäßwand druck-

atrophisch zerstört worden ist, in das Lumen der Capillaren gelangt sind. Anämische Infarkte oder hyperämische Bezirke sind in den histologischen Schnitten nicht nachgewiesen worden. In einigen Präparaten finden sich in der Nierenrinde vornehmlich um die Gefäße liegende lymphocytäre Zellinfiltrate.

Die eingelagerten Massen sind nicht von einheitlicher Substanz. So färben sich bei sämtlichen angewandten Färbungen und histochemischen Reaktionen die Einlagerungen niemals homogen an, sondern der Farbton ist stets unregelmäßig. Eine Übersicht über das färberische Verhalten und die histochemischen Reaktionen der Einlagerungen gibt die Tabelle 2 wieder. Ferner ist versucht worden, die Einlagerungen aus den histologischen Präparaten mit Hilfe von Säuren herauszulösen. Eine Übersicht über die Löslichkeit der Einlagerungen gibt die Tabelle 3 wieder.

Aus dem färberischen Verhalten und aus den Ergebnissen der histochemischen Reaktionen ist zu entnehmen, daß die Einlagerungen Lipide enthalten. Dafür spricht, daß die Substanzen sich mit Sudanschwarz anfärben lassen, und daß

sie im polarisierten Licht eine Doppelbrechung aufweisen, die durch Alkoholbehandlung gelöscht wird. Daß es sich bei den Einlagerungen nicht um einheitliche Substanzen handelt, zeigt die Anfärbbarkeit mit Methylenblau, die sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu möglich ist. Bestätigt wird diese Tatsache durch die Untersuchung im polarisierten Licht mit Gipsrot I. Nach Einführung von Gipsrot I in den Strahlengang des polarisierten Lichtes haben die Substanzen stellenweise ein positives, an anderen Stellen jedoch ein negatives Vorzeichen. Da die PAS-Reaktion nach der Acetylierung positiv und da eine Anfärbbarkeit mit Osmiumtetroxyd möglich ist, müssen die Substanzen ungesättigte Carbonsäuren enthalten. Ferner sind in den abgelagerten Brocken Peroxyde (positive Nadi-Reaktion) und Aldehydgruppen (positive Reaktion bei der Behandlung mit Schiffchem Reagens, negative Reaktion nach Vorbehandlung mit Natriumbisulfit und Phenylhydrazin; grauschwarze Niederschläge an den abgelagerten Massen nach einer Behandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung) enthalten. Ferner befinden sich in den Einlagerungen eiweißhaltige Substanzen (Fibrin, nekrotisches Gewebe). Der negative Ausfall der Ninhydrin-Schiff-Reaktion läßt darauf schließen, daß die Einlagerungen keine α -Aminosäuren und α -Aminosäuregruppen enthalten. Der anorganische Teil der Ablagerungen besteht nach unseren bisher durchgeführten Untersuchungen aus Eisen (positive Turnbullblaureaktion) und Kalk (Schwärzung der Einlagerungen bei der Silbernitratmethode nach von Kossa; Gipskristallbildung nach Schwefelsäurebehandlung).

Besprechung der Befunde

Aus den Untersuchungen ist zu entnehmen, daß die Einlagerungen aus Fettstoffen bestehen. Diese enthalten ungesättigte Carbonsäuren, Peroxyde und Aldehyde. Als anorganischen Anteil kann man in den Ablagerungen Kalk und Eisen nachweisen. Da die Einlagerungen sich durch Fettlösungsmittel auch nach längerer Behandlung nicht entfernen lassen, müssen die Fette im Nierengewebe in gebundener Form vorliegen. Aus diesem Grunde ist bei den Einlagerungen an unphysiologische, chemisch veränderte Fettsäuren zu denken. Diese verbinden sich sekundär mit den nachgewiesenen anorganischen Elementen Eisen und Calcium und dadurch erhalten die Einlagerungen eine chemische Ähnlichkeit wie Kalkseifen. Die Löslichkeit der Substanzen spricht für diese Tatsache. So zeigt eine Behandlung mit Säuren, Laugen oder Fettlösungsmitteln allein keinen Erfolg. Erst nach der Kombination der Extraktionsmittel gelingt es, die Substanzen aus dem Gewebe zu entfernen. Durch Säurebehandlung wird Calcium von den Fettanteilen gespalten und im Gewebe bleiben die Fettsäuren liegen, die sich dann mit Fettlösungsmitteln entfernen lassen. Die unterschiedliche Löslichkeit bei den einzelnen Säuren erklärt sich aus der Tatsache, daß z. B. 127 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O löslich sind, dagegen aber nur 74,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Bleibt man in der wäßrigen Phase und versucht nach der Säurebehandlung durch Laugenbehandlung die Fette in K-Seifen bzw. Na-Seifen zu überführen, um so die Substanzen aus dem Gewebe zu extrahieren, so kann man mit KOH bessere Resultate erzielen als durch NaOH. Vergleicht man die Löslichkeit dieser Salze miteinander, so findet man, daß die Wasserlöslichkeit der K-Salze besser ist als die der Na-Salze. So sind z. B. 25 g K-Oleat in 100 ml kaltem H_2O löslich,

dagegen aber nur 10 g Na-Oleat in 100 ml H₂O, das außerdem eine Temperatur von 12° C haben muß.

Zu den Kalkablagerungen ist zu sagen, daß sie wohl nachträglich in das nekrotische Gewebe eingelagert werden, da bei den ersten Ablagerungen keine Schwärzung mit der Silbernitratmethode nach v. KOSSA zu erzielen ist. Dagegen reagieren schon kleine Einlagerungen bei der Turnbullblaureaktion positiv, eine Tatsache, die noch weiterer Forschungsarbeiten bedarf, um hier Endgültiges zu sagen.

Abschließend möchten wir sagen, daß kein Zweifel darüber besteht, daß die Ablagerungen im Nierenparenchym auf die Verfütterung des autoxydierten Sojaöls zurückzuführen sind. Hierfür spricht die Tatsache, daß in den Einlagerungen ungesättigte Carbonsäuren nachweisbar sind. Ferner spricht dafür, daß die Größe und die Häufigkeit der abgelagerten Brocken mit der Stärke der Autoxydation des verfütterten Sojaöles parallel verläuft.

Zusammenfassung

Nach Verfütterung von autoxydierten Ölen traten bei Ratten im Nierenmark Ablagerungen auf, bei denen es sich nach ihren Reaktionen vorwiegend um Lipidmaterial handelt. Daneben enthielten sie noch Calcium und Eisen.

Fat-Calcium Deposits in the Rat Kidney after Feeding Auto-oxidized Fats

Summary

After feeding auto-oxidized oils to rats, deposits appeared in the renal medulla which according to their reactions were composed chiefly of lipids. In addition, the deposits contained calcium and iron.

Literatur

- JAHR, K.: Beiträge zur Ernährungsphysiologie oxydierter und bestrahlter Fette. Rer.-nat. Diss. Mainz 1961.
- LANG, K., W. KIECKEBUSCH, K. JAHR, G. CZOK, W. GRIEM, K. H. BÄSSLER u. C. H. HANNOVER: Physiologische Eigenschaften geblasener Öle, Fette und Seifen. Ernährungsindustrie **64**, 1154—1167.

Dr. W. GRIEM, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität,
65 Mainz a. Rh., Joh. Joachim Becher-Weg 15