

Die passive nephrotoxische Nephritis*

ARNOLD VOGT, LEO REICH und KUNIHIKO NAKANOIN **

Hygiene-Institut der Universität Freiburg i.Br. (Direktor: Prof. Dr. med. R. HAAS)

Eingegangen am 29. April 1966

Die enzymatische Spaltung von Kaninchen 7 S Antikörpern durch Papain ergibt drei Bruchstücke, die einen Sedimentationskoeffizienten von etwa 3,5 aufweisen. Die drei Antikörperfragmente (I, II und III) können durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose voneinander isoliert werden (PORTER, 1959). Die Fragmente I und II binden sich noch spezifisch an das Antigen, führen aber zu keiner Präcipitation oder Agglutination. Sie verhalten sich also wie monovalente Antikörper. Im Gegensatz zu intakten bivalenten Antikörpern sind sie aber nicht mehr fähig, Komplement zu binden. Das Fragment III ist ohne Antikörperaktivität.

Monovalente 3,5 S Antikörperfragmente (ANS-Fragmente), die durch Spaltung von 7 S Antikörpern eines Kaninchenantirattennierenserums gewonnen wurden, sind nicht mehr in der Lage, bei der Ratte eine Nephritis auszulösen (BAXTER und SMALL, 1963), obwohl sie sich noch spezifisch an die Niere binden (STELOS u. Mitarb., 1961).

Das Ausbleiben einer Nierenschädigung nach Injektion monovalenter ANS-Fragmente ermöglichte es, ein neues Nephritismodell zu entwickeln, das die Bearbeitung quantitativer Fragestellungen erlaubt.

Die in der glomerulären Basalmembran gebundenen monovalenten ANS-Fragmente verleihen dieser eine zusätzliche und nun genau bekannte Antigenität. Durch eine nachfolgende Injektion von Antikörpern, die gegen diese Fragmente gerichtet sind, ist es möglich, eine Nephritis auszulösen. Die zur Nephritis führende Antikörpermenge kann dabei in-vitro quantitativ exakt bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach vorheriger Sensibilisierung der Basalmembran mit monovalenten ANS-Fragmenten die passive nephrotoxische Nephritis (PNN) mit einem komplementbindenden Antikörper (von der Ratte) und mit einem nichtkomplementbindenden Antikörper (von der Ente) ausgelöst und die nephritisauslösende Antikörpermenge quantitativ bestimmt.

Material und Methoden

1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an 150—170 g schweren männlichen Wistar-Inzuchtratten (Fa. A. Krämer, Köln) durchgeführt. Die Tiere erhielten „Altromin-Rattenfutter“ ohne weitere Zusätze und Wasser ad libitum.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Jetzige Anschrift: Dept. Pathol. Publ. Health, Inst. of Kobe City, Japan.

2. Proteinbestimmung im Harn

Die Bestimmung der Proteinurie im Harn wurde, wie an anderer Stelle bereits eingehend beschrieben (NAKANOIN u. VOGT, 1965), quantitativ mit der Biuretmethode durchgeführt. Eine erhöhte Proteinurie wurde angenommen, wenn die Proteinausscheidung in 24 Std mindestens 15 mg betrug und über eine längere Zeit anhielt.

3. Antiseren

a) *Antirattennierenserien*. Die Methode der ANS-Gewinnung ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden (NAKANOIN und VOGT, 1965).

b) *Anti-Kaninchen 3,5 S Spaltprodukte*. Ratten und Enten erhielten wöchentlich einmal 3,5 S Kaninchen γ -Globulin-Fragmente (Fragment I und II) in inkomplettem Freundschen Adjuvans s.c. auf mehrere Körperstellen verteilt injiziert. Den Ratten wurde eine kleine Menge des Antigens außerdem abwechselnd in die linke und rechte Hinterpfote injiziert. Die Enten erhielten pro Injektion 5,0 mg, die Ratten 2,5 mg Antigen. Insgesamt erhielten die Ratten vier, die Enten neun Injektionen. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Enten aus der A. carotis, die Ratten aus der Bauchaorta entblutet. Die Seren wurden gepoolt, inaktiviert und bei -20°C aufgehoben.

c) *Antirattenkomplement* (Antiratten $\beta_{1\text{C}}$). Der immunhistologische Nachweis von gebundenem Rattenkomplement wurde mit einem markierten Antiratten $\beta_{1\text{C}}$ vom Kaninchen geführt, das in Anlehnung an die Angaben von UNANUE und DIXON (1964) hergestellt wurde. Antihumanalbumin vom Kaninchen und Humanalbumin ließen wir in der Äquivalenzzone zusammen mit frischem Rattenserum zunächst für 2 Std bei Zimmertemperatur, anschließend bei 4°C im Kühlraum über Nacht präcipitieren. Das abzentrifugierte Präcipitat wurde fünfmal in der Kälte mit Veronalpuffer, Ca- und Mg-Ionen enthaltend, gewaschen und in inkomplettem Freundschen Adjuvans aufgenommen. Immunisiert wurden Kaninchen einmal wöchentlich s.c. an mehreren Stellen der Rückenhaut. Pro Injektion wurde das Präcipitat von etwa 1 ml Antiserum injiziert, insgesamt wurde 10—12 mal immunisiert.

Durch Absorption der Antiseren mit 1:2000 verdünntem Rattenserum konnten Antikörper gegen andere Serumproteinfaktionen eliminiert werden, so daß in der Immunelektrophorese nur eine einzige kräftige Präcipitationslinie im $\beta_{1\text{C}}$ -Bereich blieb. Die Anti- $\beta_{1\text{C}}$ -Antikörper sind auch bei der Ratte spezifisch gegen Bestandteile der dritten Komplementkomponente gerichtet (UNANUE und DIXON, 1964). Kreuzreaktionen mit anderen Serumproteinen sind nicht vorhanden.

4. Immunfluorescenz

Die Globulinfraktionen der Antiseren, durch Fällung bei 50, 40 und 40 % Ammoniumsulfatsättigung gewonnen, wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) nach den Angaben von NAIRN (1962) gekuppelt. FITC war ein Produkt der Sylvana Comp. Orange, New Jersey, USA. Zur Entfernung der unspezifischen Fluorescenz wurden die markierten Globulinfraktionen über Sephadex G-25 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt) gelfiltriert und anschließend über DEAE-Cellulose stufenweise (0,02, 0,05 und 0,1 m Phosphatpuffer pH 8,0) chromatographiert. Die optimal markierten Portionen (gewöhnlich bis zu einer Elution von 0,05 m) wurden gepoolt.

Nativschnitte der Nieren wurden bei -20°C im Kryostaten (System Dittes-Duspiva, Heidelberg) angefertigt und die unfixierten 5 μ dicken Schnitte mit den FITC-markierten Antiseren bei Zimmertemperatur für 20 min bedeckt, zweimal in gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und in phosphatgepuffertem Glycerin pH 7,2 eingedeckt. Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop; Erregerfilter Ug 2, Sperrfilter 44 und 50, Quecksilberhochstdruckbrenner HBO 200. Aufnahmen wurden mit einem Agfa Isopan ISS-Film. 21 DIN, gemacht. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 2—5 min.

5. Immunelektrophoresen

wurden mit einem LKB-Elektrophoresegerät durchgeführt. Der Agar (Difco-Agar Noble) war 0,9 % ig, der Puffer ein Veronalnatriumpuffer pH 8,6, Ionenstärke 0,1.

6. Gewinnung von Kaninchen 3,5 S Spaltprodukten durch Spaltung von Kaninchen γ -Globulin mit Papain

Die γ -Globulinfraktionen aus gepoolten Kaninchen-ANS und aus normalem Kaninchen-serum wurden durch fünfmalige aufeinanderfolgende Fällung mit gesättigter Ammonium-sulfatlösung gewonnen. Die Fällungen wurden bei 50, 40, 37, 36 und 36% Ammoniumsulfat-sättigung durchgeführt. Damit erhielten wir fast reine 7 S γ -Globulinfraktionen. Eine geringe Verunreinigung mit 19 S γ -Globulinen war nicht von Bedeutung, da diese bei der Spaltung mit Papain zerstört werden. Die Spaltung wurde nach der Methode von PORTER (1959) durchgeführt, das verwendete Papain (zweimal kristallisiertes Papain), käuflich von der Fa. Sigma, Chemical Comp., USA, erworben.

Nach der Spaltung wurde in der Kälte gegen mehrfach gewechseltes Aqu. dest. dialysiert, wobei das Fragment III auskristallisierte. Das Fragment III wurde durch Zentrifugieren von den monovalenten Fragmenten I und II abgetrennt. Die monovalenten ANS-Fragmente dienten zur Sensibilisierung der glomerulären Basalmembran; zur Herstellung der spezifischen Antiseren gegen Fragment I und II wurden die monovalenten γ -Globulinfragmente benutzt, die durch Spaltung der normalen Kaninchen γ -Globulinfraktion gewonnen worden waren. Für die quantitative Antikörperbestimmung wurden Fragment I und II nach der Methode von PORTER (1959) durch Chromatographie über Carboxymethylcellulose isoliert. Die isolierten Fragmente wurden durch Einengen gegen Blaugel auf die gewünschte Konzentration gebracht.

7. Quantitative Antikörperbestimmung

Die quantitative Antikörperbestimmungen wurden mit den isolierten Kaninchen 3,5 S Fragmenten I und II als Antigen durchgeführt. Zu 0,2 ml oder 0,5 ml Antiserum wurden steigende Mengen Antigen zugefügt und mit 0,85%iger Kochsalzlösung (Antiserum von der Ratte) bzw. 10%iger Kochsalzlösung¹ (Antiserum von der Ente) auf 1,0 bzw. 2,5 ml aufgefüllt. Nach 1 Std bei Zimmertemperatur wurde das Reaktionsgemisch für 20 Std im Kühlraum bei 4° C belassen.

Danach wurden die Präcipitate abzentrifugiert (5000 U/min, 30 min) und zweimal in 0,5 bzw. 1,25 ml 0,85- bzw. 10%iger Kochsalzlösung gewaschen. Das gewaschene Präcipitat wurde anschließend in 3,0 ml 0,1 m NaOH gelöst und die Extinktion bei 280 m μ bestimmt.

Der N-Gehalt des Präcipitates wurde gegen die zugefügten Antigen-N-Menge aufgetragen und der Antikörper-N-Gehalt im Äquivalenzpunkt nach Abzug des zugefügten Antigen-N ermittelt. Mit dieser Methode konnte der Antikörpergehalt von Rattenantiseren hinreichend genau bestimmt werden, da im Äquivalenzpunkt praktisch alles zugefügte Antigen präcipitiert war. Bei den Antiseren von der Ente befindet sich jedoch im Äquivalenzpunkt noch ein beträchtlicher Anteil des Antigens in Lösung, so daß der Antikörpergehalt in Wirklichkeit stets höher als der ermittelte war.

8. Quantitative Komplementbestimmung

Die quantitative Komplementbestimmung wurde nach der Methode von BARBARO und BECKER (1962) durchgeführt. Das Einstellen der Erysuspension wie auch die Bestimmung der C'H₅₀ (50% Hämolyse-Einheiten) erfolgte nach den Angaben im KABAT-MAYER (1961).

Zu 0,2 ml des verdünnten Antiserums (10 und 20 γ Antikörper-N) und 0,1 ml unverdünntem frischem Rattenserum (Komplement) und 0,5 ml Puffer wurde 0,2 ml Antigen (Äquivalenzzone) gegeben und 1 Std bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Verdünnen mit eisgekühltem Puffer im Verhältnis 1:20 oder 1:10 gestoppt. Die verbliebene Komplementaktivität (C'H₅-Einheiten) wurde dann nach anschließendem einständigem Inkubieren bei 37° C mit sensibilisierten Hammelerythrocyten spektrophotometrisch bestimmt. Die Anzahl der C'H₅₀-Einheiten, die Antigen oder Antiserum allein banden, wurden von der Anzahl der im ganzen System gebundenen C'H₅₀-Einheiten abgezogen.

¹ Um bei Antiseren von Vögeln die präcipitierenden Antikörper quantitativ zu erfassen, ist eine Salzkonzentration von mindestens 8% erforderlich (GOODMAN, WOLFE und NORTON 1951).

9. Histologie

Fixierung in 10%igem Formalin.

Ergebnisse

1. Nachweis der gelungenen Spaltung von ANS γ -Globulinen

Nach elektrophoretischer Auf trennung der monovalenten ANS-Fragmente stellten sich mit dem spezifischen Antiserum zwei Präcipitationslinien dar (Abb. 1). Die ungespaltenen γ -Globuline zeigten dagegen die bekannte einheitliche und weit ausgezogene Präcipitationslinie. Immunelektrophoresen mit den isolierten Fragmenten I und II ergaben, daß es sich bei der schneller wandernden Fraktion um das Fragment I und bei der weiter kathodisch wandernden Komponente um das Fragment II handelt. Das immunelektrophoretische Bild (Abb. 1)

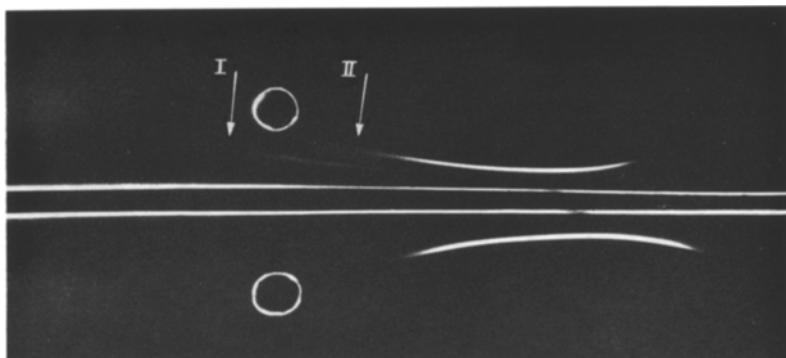


Abb. 1. Immunelektrophorese. Elektrophoretische Auf trennung der γ -Globulinfraktion eines Kaninchen-ANS (unten) und der aus ihr gewonnenen monovalenten Spaltprodukte (oben). In den Gruben (Mitte) wurde ein gegen monovalente Kaninchen γ -Globulinfragmente gerichtetes Antiserum von der Ratte gefüllt. I=Fragment I; II=Fragment II

wie auch der Befund in der analytischen Ultrazentrifuge sprachen für eine vollständige Spaltung der γ -Globuline. Ebenso ergab die Chromatographie an Carboxymethylcellulose keinen Anhalt für das Vorhandensein von Resten intakt gebliebener 7 S γ -Globuline. Bei einer unvollständigen Spaltung hätte man nach der Elution der einzelnen Fragmente noch einen weiteren Peak von 7 S γ -Globulinen erwarten müssen (PARKE u. AVIS, 1964). Das beobachteten wir jedoch in keinem Fall.

In diesem Zusammenhang ist noch auf folgendes hinzuweisen: In der Immunelektrophorese konnten die monovalenten Fragmente nur mit dem spezifischen Antiserum (gegen monovalente Kaninchen γ -Globulinfragmente gerichtet) dargestellt werden. Eine Präcipitationslinie kam dagegen nicht zustande, wenn ein Antikaninchen γ -Globulin verwendet wurde, ein Befund, der bereits von PORTER (1959) beschrieben wurde. Die Kaninchen γ -Globuline ließen sich dagegen mit dem gegen monovalente Fragmente gerichteten Antiserum darstellen (Abb. 1).

2. In-vivo Wirksamkeit der monovalenten ANS-Fragmente

Vor der Spaltung mit Papain wurde die ANS γ -Globulinfraktion auf einen Proteingehalt von 10 mg/ml eingestellt. 0,5 ml (5 mg) dieser Fraktion waren in der Lage, bei der Ratte eine sofortige Nephritis mit einer über Wochen anhalten-

den Proteinurie auszulösen. Die Proteinausscheidung lag bei diesen Tieren im Durchschnitt über 100 mg pro 24 Std. In über 40% der Fälle entwickelte sich eine auch histologisch nachweisbare chronische Nephritis (Abb. 2). Nach Spaltung mit Papain und Abtrennen des serologisch inaktiven Fragment III (letzteres machte etwas mehr als ein Drittel des Gesamtproteingehaltes aus) gelang es uns selbst dann nicht, eine Nephritis auszulösen, wenn wir 3,0 ml, also die sechsfache Menge der Erstinjektion, injizierten (Tabelle 3). Die Proteinausscheidung

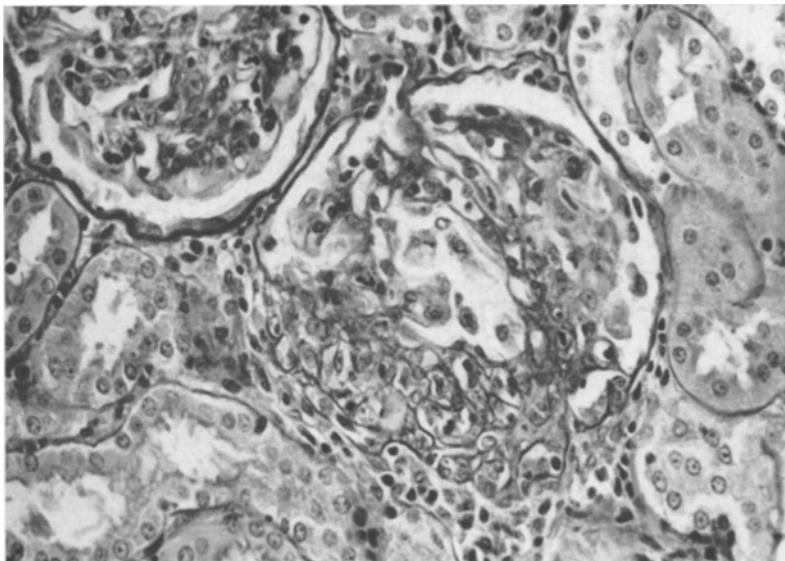


Abb. 2. Rattenniere, 4½ Monate nach Injektion von Kaninchenantirattennierenserum. Chronische Glomerulonephritis. Vergr. 300fach

lag nach Injektion monovalenter ANS-Fragmente innerhalb der ersten Wochen nicht nennenswert höher als bei Kontrallratten. Erst nach 4 und 8 Wochen stieg die Proteinausscheidung etwas an und erreichte bei einzelnen Tieren vorübergehend Werte von 10—20 mg pro 24 Std.

3. Passive nephrotoxische Nephritis

a) Nephritisverlauf. Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, war zur ausreichenden Sensibilisierung der Basalmembran durch ANS-Antikörperfragmente eine bestimmte Mindestmenge notwendig. Vorausgesetzt, daß anschließend eine genügend hohe Dosis von Antikörpern (gegen monovalente Kaninchen γ -Globulinfragmente gerichtet) verabreicht wurden, mußten mindestens 1,0 ml der monovalenten Spaltprodukte injiziert werden. Vor der Papainspaltung hatte 0,5 ml des Kaninchen-ANS genügt, um bei einer 160 g schweren Ratte eine sofortige Nephritis auszulösen. Zur Sensibilisierung der glomerulären Basalmembran waren 1—2 ml Spaltprodukte dieses Antiserums notwendig. Von anderen Untersuchungen wissen wir, daß durch die Spaltung mit Papain ein Verlust an Antikörperaktivität von 50—60% beobachtet werden kann (VOGT u. Mitarb., 1964). Das dürfte hiernach auch für die ANS-Spaltprodukte zutreffen.

Tabelle 1. Quantitative Antikörperbestimmung

Antiserum	Antigen	Antikörper-N/ml in mg
Ratte	Fragment I	0,29
Ente		0,17
Ratte	Fragment II	0,49
Ente		0,65

Tabelle 2. Quantitative Komplementbindung
(in der Äquivalenzzone mit Fragment II als
Antigen)

Antiserum	Antikörper-N*	Ge bundene $C' H_{50} E$
Ratte	10 γ	9,1
Ente	20 γ	< 1,0

* Gegen Fragment II gerichtete Antikörper.

Lag zwischen der sensibilisierenden Injektion (Verabfolgung der monovalenten ANS-Fragmente) und der nephritisauslösenden Injektion (Injektion der gegen monovalente Fragmente gerichteten Antikörper) mehr als 24 Std, so reichte die sensibilisierende Dosis von 1,0 ml Fragmenten nicht immer zur Auslösung einer Nephritis aus. Die ANS-Fragmente scheinen demnach recht schnell aus der Niere eliminiert zu werden.

Sowohl das von der Ratte als auch das von der Ente stammende Antiserum, mit denen wir die PNN auslösten, enthielten mit 0,78 bzw. 0,82 mg Ak-N/ml Serum etwa gleich viel Antikörper. Bei beiden Antiseren waren die Antikörper vorwiegend gegen das Fragment II gerichtet. Das war besonders beim Antiserum von der Ente ausgeprägt (Tabelle 1).

Man kann annehmen, daß die beiden Antiseren gleichwertig waren, daß beide Antikörper (Anti-I und Anti-II) gleichermaßen in der Lage waren, eine PNN auszulösen. Immunhistologisch konnten wir eine Bindung in der Basalmembran sowohl des isolierten Fragmentes I als auch des isolierten Fragmentes II nachweisen.

Tabelle 3. Anzahl der erkrankten Tiere und Beginn der Proteinurie im Verlauf der passiven nephrotoxischen Nephritis

Injizierte Menge in ml*		Anzahl der Tiere		Beginn der Proteinurie (Tage nach Injektion)	
Monovalente ANS-Fragmente I und II vom Kaninchen	Antiserum gegen monovalente Kaninchenglobulinfragmente I und II	von der Ratte	von der Ente	erkrankt	insgesamt
1,6—3,0	—	—	—	0	11
0,25—0,5	2,0	—	—	0	5
1,0	0,5	—	—	0	1
1,0	1,0—2,0	—	—	6	6
2,0	0,5—1,0	—	—	2	2
2,0	2,0	—	—	9	9
2,0—3,0**	2,0	—	—	2	5
1,0	—	0,5	—	0	1
1,0	—	1,0—2,0	—	3	3
2,0	—	0,5—1,0	—	3	3
2,0	—	2,0—4,0	—	4	4

* Die beiden Injektionen erfolgten im Abstand von 24 Std mit Ausnahme einer Versuchsguppe**, bei der das Antiserum gegen monovalente Spaltprodukte erst 96 Std nach der Verabfolgung der ANS-Fragmente injiziert wurde.

Deutliche Unterschiede wiesen die beiden Antiseren in ihrer Fähigkeit auf, Rattenkomplement zu binden. 10γ Ak-N des Rattenantikörpers banden nach Zugabe der entsprechenden Antigenmenge $9,1\text{ C}'\text{H}_{50}$ -Einheiten. Dagegen war beim Entenserum auch dann keine sichere Komplementbindung nachzuweisen, wenn die doppelte Antikörpermenge geprüft wurde (Tabelle 2).

Die gleiche Antikörpermenge von der Ratte und von der Ente war imstande, eine Nephritis auszulösen, wenn zuvor eine ausreichende Sensibilisierung der Basalmembran vorgenommen worden war. Jedoch führte der komplement-bindende Antikörper von der Ratte ausnahmslos zu einer sofortigen Nephritis; die Proteinurie nach Injektion des Entenantikörpers, der nicht in der Lage war, nennenswerte Komplementmengen zu binden, setzte dagegen stets nach einer Latenzzeit ein. Mit zunehmender Antikörpermenge schien zwar eine Verkürzung der Latenzzeit einherzugehen, eine Proteinurie war aber frühestens am 2. Tag nach der Injektion zu beobachten. Die höchste Dosis von $4,0\text{ ml}$, entsprechend $3,3\text{ mg}$ Ak-N, die wir vom Entenantikörper applizierten, bewirkte sogar eine Nephritis erst nach einer Latenzzeit von 14 Tagen.

Die Proteinausscheidung hielt bei einer Reihe von Tieren über Monate an. In über 50% der Fälle schieden die Tiere noch 5 Monate nach der Injektion mehr als 30 mg Protein in 24 Std aus. Bei einem beträchtlichen Prozentsatz der Tiere war die Nephritis zu diesem Zeitpunkt also noch nicht ausgeheilt.

Die histologischen Nierenveränderungen waren in der Regel nicht sehr stark und durchweg wesentlich geringer ausgeprägt als bei chronisch erkrankten nephrotoxischen Tieren, die also den intakten nephrotoxischen Antikörper injiziert bekommen hatten. Die vorherrschenden Veränderungen an den Glomerula bestanden in herdförmigen Hyalinisierungen einzelner Capillarschlingenbündel, vereinzelten Verklebungen mit der Bowmanschen Kapsel sowie in einer Verbreiterung des Mesangium (Abb. 3 und 4).

b) Immunhistologie. Die Bindung der monovalenten ANS-Fragmente entlang der glomerulären Capillarschlingen konnte immunhistologisch nachgewiesen werden (Abb. 5). Daß es sich dabei nicht um Reste intakt gebliebener 7 S Antikörper handelte, war folgenden Befunden zu entnehmen:

Eine intensive spezifische Fluorescenz war lediglich mit einem markierten Antiserum zu erzielen, das gegen die Fragmente I und II gerichtet war, nicht dagegen mit einem markierten Anti-Kaninchenglobulin. Letzteres Antiserum ergab lediglich eine angedeutete Fluorescenz.

Die Lokalisation der ANS-Fragmente unterschied sich nicht von der des ungespaltenen Antikörpers.

Ein unterschiedliches Verhalten war jedoch hinsichtlich der Komplementbeteiligung im Glomerulum festzustellen. Nach Injektion nephrotoxischer Antikörper vom Kaninchen findet man unmittelbar nach der intravenösen Injektion am Ort der Antikörper-Reaktion, d.h. entlang der glomerulären Capillarschlingen, auch Komplement des Versuchstieres gebunden (Abb. 6). Die Bindung der ANS-Fragmente an die Basalmembran hatte jedoch keine Anlagerung von Komplement zur Folge. Der immunhistologische Nachweis von Ratten β_{1C} (C' 3) war stets negativ. Es kam auch nicht, wie man es nach Injektion von Enten-ANS beobachten kann (Entenantikörper sind ebenfalls nicht in der Lage, nennenswerte

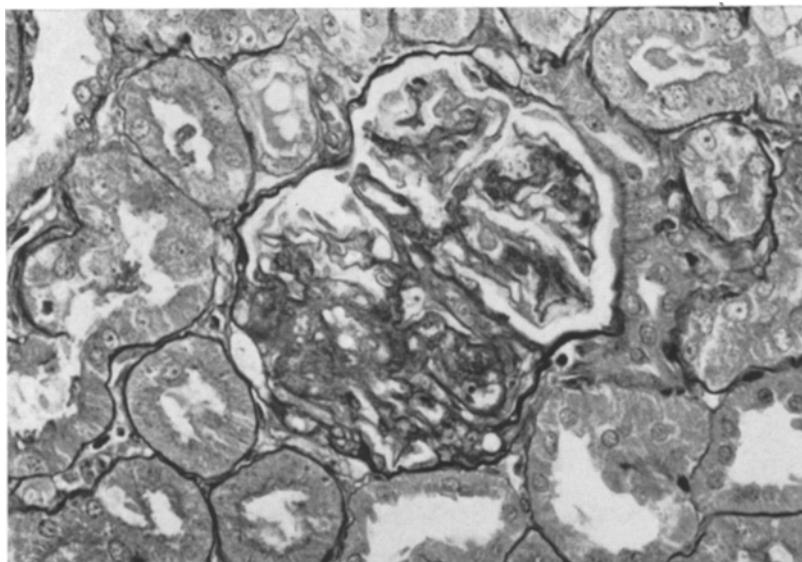


Abb. 3. Nierenveränderungen bei der passiven nephrotoxischen Nephritis der Ratte, 4 Monate nach Injektion des Antiserums von der Ratte, Hyalinisierung der Capillarschlingenbündel. Vergr. 300fach

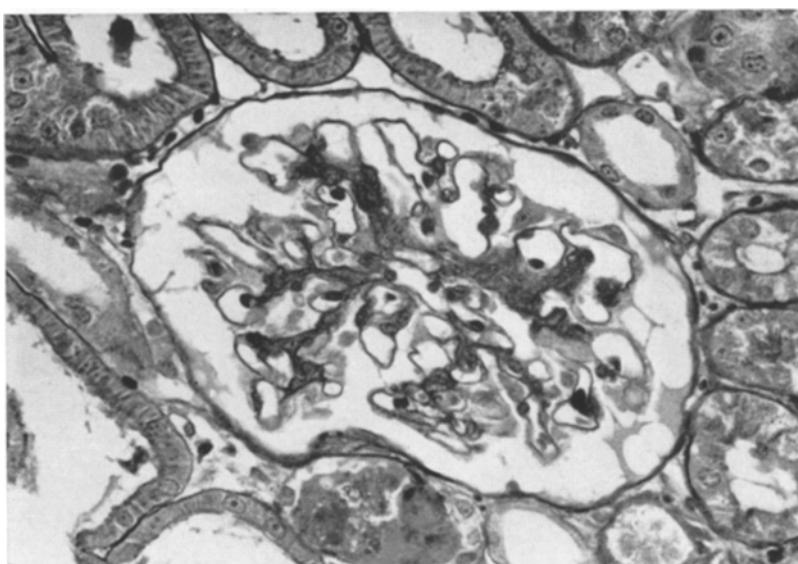


Abb. 4. Nierenveränderungen bei der passiven nephrotoxischen Nephritis der Ratte, 4 Monate nach Injektion des Antiserums von der Ratte. Plumpes Capillarschlingenbündel mit deutlich verbreitertem Mesangium. Vergr. 300fach

Mengen an Säugerkomplement zu binden) einige Tage nach der Injektion zu einer Komplementbeteiligung.

Eine Komplementbeteiligung in der Niere war erst dann immunhistologisch nachweisbar, wenn wir nachfolgend intakte Antikörper injiziert hatten, die mit der sensibilisierten glomerulären Basalmembran reagierten. Auch dabei war wie

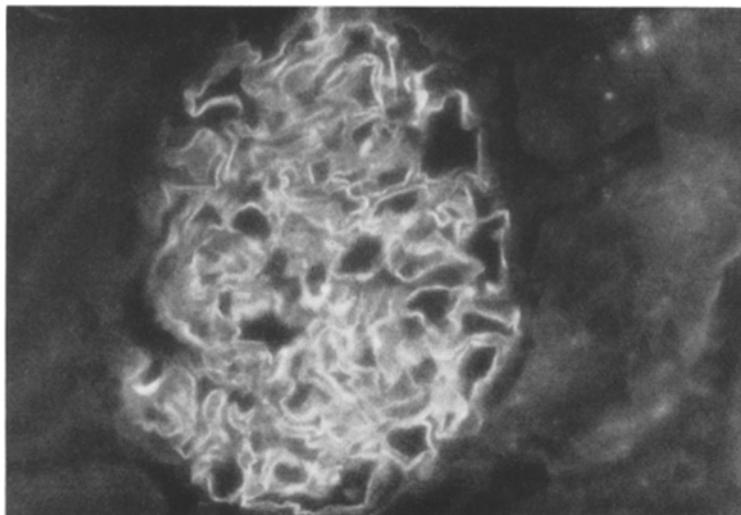


Abb. 5. Immunhistologischer Nachweis von Kaninchen γ -Globulinfragmenten in der Niere nach intravenöser Injektion von monovalenten ANS-Fragmenten. Vergr. 300fach

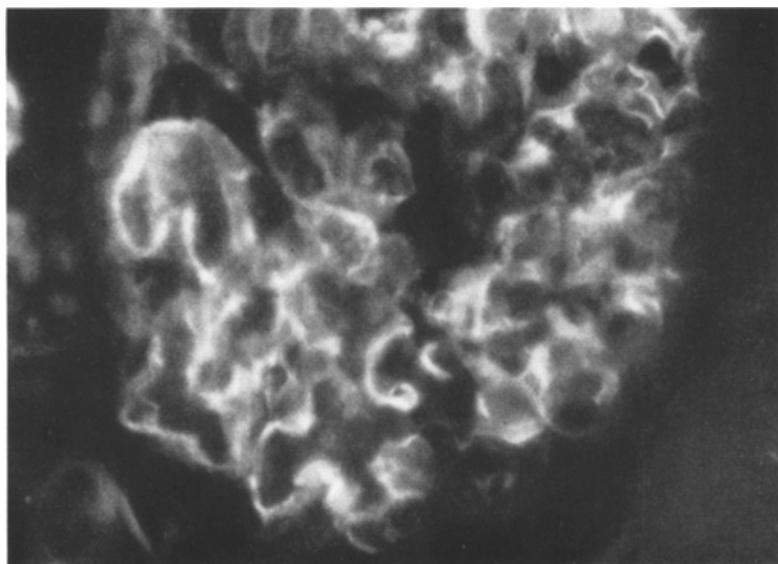


Abb. 6. Immunhistologischer Nachweis von Rattenkomplement (C'_3), 24 Std nach Injektion von Kaninchen-ANS. Vergr. 800fach

bei der nephrotoxischen Nephritis ein unterschiedliches Verhalten der Antikörper festzustellen. Die Bindung des passiv übertragenen Antikörpers von der Ratte hatte eine sofortige Anlagerung von Ratten β_{1c} zur Folge, während nach Injektion des Enten-Antikörpers frühestens 2 Tage, in den meisten Fällen erst nach dem 3. oder 4. Tage, eine Ansammlung von Komplement am Reaktionsort in der Basalmembran festzustellen war.

Diskussion

Die Sensibilisierung der glomerulären Basalmembran durch heterologe monovalente ANS-Fragmente scheint im Versuchstier selbst keine nennenswerte Immunreaktion zur Folge zu haben. Jedenfalls kann immunhistologisch weder vermehrtes Rattenglobulin noch eine Komplementbeteiligung in der Niere nach einmaliger Injektion von monovalenten ANS-Fragmenten nachgewiesen werden. Hiermit in Übereinstimmung bleibt die theoretisch nach einer Latenzzeit zu erwartende Nephritis (Phase II) aus. Zwei Eigenschaften der Antikörperfragmente bieten sich als Erklärung an: Die im Vergleich zu intakten Antikörpern weniger feste Bindung in der glomerulären Basalmembran (STELOS u. Mitarb., 1961) und die kurze biologische Halbwertzeit monovalenter Fragmente im Serum des Versuchstieres (SPIEGELBERG und WEIGLE, 1965). Die erste Eigenschaft könnte zur Folge haben, daß zum Zeitpunkt der endogenen Antikörperbildung nicht mehr genug ANS-Fragmente in der Basalmembran gebunden sind, die letztere, daß die Antikörperbildung im Versuchstier nicht oder nur in einem geringen Umfang zustande kommt.

Das Ausbleiben der sofortigen Nephritis (Phase I) nach Injektion monovalenter Spaltprodukte kann zwangsläufig mit dem Unvermögen der Antikörper-Fragmente erklärt werden, Komplement zu binden, wenn auch einschränkend darauf hingewiesen werden muß, daß sich die Fragmente von den intakten Antikörpern noch durch andere Eigenschaften z.B. der Molekülgröße unterscheiden (BAXTER und SMALL, 1963). Folgende weitere Befunde deuten darauf hin, daß das Komplement eine wichtige Rolle bei der durch Antikörper verursachten Nephritis spielt:

Eine vorübergehende Dekomplementierung der Versuchstiere zur Zeit der Injektion von Kaninchen-ANS hat ein Ausbleiben oder eine Verringerung der Proteinurie in den ersten Tagen der Nephritis (Phase I) zur Folge (KURTZ und DONNELL, 1962; HAMMER und DIXON, 1963). Ebenso verläuft die erste Phase der Nephritis abgeschwächt, wenn Kaninchenantikörper verabfolgt werden, deren Komplementbindungsähigkeit durch Behandlung mit Mercaptoäthanol stark reduziert wurde (UNANUE und DIXON, 1964). Alle diese Befunde bestätigen die alte bekannte Beobachtung, daß die Injektion komplementbindender Antikörperseren in der Regel eine sofortige Nephritis bewirken, während nach Injektion von nichtkomplementbindenden Antikörperseren (z.B. von der Ente) in der Regel eine Proteinurie erst nach einer Latenzzeit von einigen Tagen einsetzt (Literatur s. VOGT, 1965).

Auch die in einigen Fällen beschriebenen sofortigen Nephritiden nach Injektion von Enten-ANS können wohl nicht, wie SEEGAL u. Mitarb. (1963) versuchten, als Gegenbeweis angeführt werden. Denn KOZIMA u. Mitarb. (1966) konnten in letzter Zeit bei der sofortigen Nephritis der Ratte mit potenten Antiseren immunhistologisch regelmäßig schon innerhalb der ersten 24 Std am Reaktionsort des Entenantikörpers eine eindeutige, wenn auch nur schwach ausgeprägte, Anlagerung von Rattenkomplement (Ratten β_{1c}) nachweisen. Der Beginn der Proteinurie und die Komplementfixierung im Glomerulum scheint demnach auch bei der durch Entenantikörper verursachten Nephritis parallel zu gehen.

Die vorliegenden Befunde mit der passiven nephrotoxischen Nephritis unterstreichen die pathogenetische Bedeutung der Komplementbeteiligung. Wenn die Komplementbeteiligung unerheblich wäre, müßte dieselbe Antikörpermenge zu einer sofortigen Nephritis führen, unabhängig davon, ob die Antikörper Komplement zu binden vermögen oder nicht. Dem ist aber nicht so. Berücksichtigt man dazu noch, daß die quantitative Antikörperbestimmung für das Antiserum von der Ente sehr wahrscheinlich eher zu niedrige Werte ergeben hatte, da Enten-Antikörper im Äquivalenzpunkt nicht alles zugegebene Antigen präcipitieren (ARTKEN und MULLIGAN, 1960), so benötigten wir vom Entenantiserum mindestens eine gleiche, wenn nicht sogar eine höhere Dosis, um überhaupt eine Nephritis auszulösen, wobei die Proteinurie stets erst nach einer Latenzzeit einsetzte. In unseren Versuchen gelang es selbst mit der zwei- bis vierfach höheren Menge von Enten-Antikörpern nicht, eine sofortige Nephritis auszulösen. Die Komplementbeteiligung scheint demnach für die sofortige Nierenschädigung (Phase I) von Bedeutung zu sein.

Zu einer etwas anderen Vorstellung über die unterschiedliche Wirkungsweise von Enten- und Kaninchen-Antikörpern kommen UNANUE und DIXON (1965) in Versuchen, in denen sie die Globulin-Fraktionen von Antinierenserien mit ^{131}I markierten und die Menge der in der Niere lokalisierten Radioaktivität („kidney-fixing antibody“, KFAb) bestimmten, die zur Auslösung einer Nephritis notwendig war. Nach ihren Befunden müssen von Kaninchen-ANS etwa 175—200 γ KFAb mit beiden Nieren (Ratte als Versuchstier) reagiert haben, damit eine sofortige und anhaltende Proteinurie ausgelöst wird. Von der Ente führte eine gleiche Menge KFAb zu einer sofortigen, aber sich rasch wieder normalisierenden Proteinurie. Erst 250 γ KFAb oder mehr lösten eine auch anhaltende Proteinurie aus. Wir selbst haben bei ANS von der Ente nie beobachtet, daß sich eine sofortige Proteinurie innerhalb von wenigen Tagen normalisierte, es sei denn, das Antikörperserum war bakteriell verunreinigt. Sieht man von der sofort einsetzenden, aber nur kurz dauernden Proteinurie einmal ab und vergleicht Dosen, die etwa eine Nephritis vergleichbarer Stärke (in der Phase II) zu erzeugen imstande waren, so scheinen UNANUE und DIXON (1965) mehr KFAb von der Ente als vom Kaninchen benötigt zu haben.

Während UNANUE und DIXON (1965) schon mit 200—250 γ KFAb eine Nephritis bei der Ratte auslösen konnten, mußten wir pro Tier 400 γ Ak-N injizieren, damit eine passive nephrotoxische Nephritis zustande kam.

Das mag einmal mit der weniger stabilen Bindung der ANS-Fragmente in der glomerulären Basalmembran zusammenhängen, was natürlich auch eine schnellere Eliminierung des nachfolgend injizierten intakten Antikörpers aus der Niere zur Folge hat, zum anderen ist es denkbar, daß ein Teil der nachfolgend injizierten intakten Antikörper noch von im Blut kreisendem Antigen abgefangen wurde und die Reaktionsstellen in der Basalmembran nicht erreichte.

Auf die weniger feste Bindung der Fragmente und die damit verbundene geringere Verweildauer der Immunkomplexe in der glomerulären Basalmembran sind wahrscheinlich auch die vergleichsweise geringen histologischen Nierenveränderungen zurückzuführen. Die PNN scheint im Vergleich zur nephrotoxischen Nephritis eher auszuheilen. Trotz der großen Tendenz zur Spontanheilung hielt aber die Proteinurie bei einem recht beträchtlichen Prozentsatz unserer

Tiere über Monate an. Eigentümlicherweise normalisierte sich die Proteinausscheidung auch bei den Tieren nicht schneller, bei denen wir die Nephritis durch homologe Antikörper (Antikörper von der Ratte) ausgelöst hatten. Das hätte man eigentlich erwarten müssen. Es spricht nämlich einiges dafür, daß bei der chronischen Nephritis (Phase II der Nephritis) die endogen gegen das injizierte heterologe Globulin gebildeten Antikörper eine Rolle spielen. So normalisierte sich die anfängliche Proteinurie bald wieder, wenn Ratten ANS vom Kaninchen injiziert wurde, die gegen Kaninchen γ -Globulin immuntolerant waren (HAMMER und DIXON, 1963), die also nicht in der Lage waren, gegen das injizierte Fremdglobulin Antikörper zu bilden. Ist unsere Vorstellung richtig, daß die Einverleibung monovalenter Kaninchen-ANS-Fragmente keine nennenswerten Immunreaktionen im Versuchstier auslöst (ausbleibende Phase II), so spricht die durch homologe Antikörper ausgelöste über Monate anhaltende Proteinurie bei der passiven nephrotoxischen Nephritis dafür, daß eine einmalige Schädigung der Niere — wenn sie stark genug ist — zu einer chronischen Nephritis führen kann.

Zusammenfassung

Monovalente Fragmente I und II, die durch Papainspaltung der Globulinfraktion eines Kaninchen-Antinierenserums gewonnen wurden, binden sich zwar noch spezifisch an die glomeruläre Basalmembran, sind jedoch nicht mehr in der Lage, eine Nephritis auszulösen — auch nicht nach einer Latenzzeit.

Die für das Tier folgenlose Lokalisation der Antikörper-Fragmente in der glomerulären Basalmembran verleiht dieser eine zusätzliche und nun bekannte Antigenität, die es ermöglicht, die nephritisauslösende Antikörpermenge in-vitro quantitativ exakt zu bestimmen.

Eine Nephritis konnte bei den durch Ak-Fragmente optimal sensibilisierten Ratten ausgelöst werden, wenn 400 γ Ab-N oder mehr eines Antiserums injiziert wurde, das gegen die monovalenten Fragmente gerichtet war. Der komplement-bindende Antikörper von der Ratte verursachte dabei ausnahmslos eine sofortige Nephritis, während die Nephritis durch den von der Ente stammenden Antikörper, der keine nennenswerten Mengen an Rattenkomplement zu binden vermag, stets nach einer Latenzzeit einsetzte.

Die Befunde unterstützen die Hypothese nach der dem Komplement eine aktive Rolle beim Zustandekommen der durch Antikörper ausgelösten Nephritis zukommt.

Passive Nephrotoxic Nephritis Summary

Monovalent fragments I and II (papain digests) prepared from rabbit antirat-kidney γ -globulin still combine with the glomerular basement membrane. They are, however, no longer able to induce a nephritis — not even after a latent period.

With the inert fixation, the sensitized basement membrane is given a new and now known antigenicity by the fragments. From this antigenicity it is possible to determine in-vitro the exact amount of antibody needed to induce nephritis.

In optimally sensitized rats a nephritis could be initiated when about 400 γ Ab-N or more of an antiserum (directed against the monovalent fragments) was injected. The complement-fixing antibody from the rat induced immediately a

nephritis without exception, whereas the nephritis induced by duck antibody always appeared after a latent period. The duck antibody was not able to fix mentionable amounts of rat complement.

These results support the hypothesis, that complement plays an active part in the onset of experimental nephritis induced by antibodies.

Literatur

- AITKEN, I. D., and W. MULLIGAN: Quantitative precipitin studies on fowl antisera to bovine serum albumin and to bovine gammaglobulin. *Immunology* **5**, 295—305 (1960).
- BARBARO, J. F., and E. L. BECKER: Comparison of complement-fixing potency of antiserum from various species. *J. infect. Dis.* **111**, 175—183 (1962).
- BAXTER, J. H., and P. A. SMALL jr.: Antibody to rat kidney: In vivo effects of univalent and divalent fragments. *Science* **140**, 1406—1407 (1963).
- GOODMAN, M., H. R. WOLFE, and S. NORTON: Precipitin production in chickens VI. The effect of varying concentrations of NaCl on precipitate formation. *J. Immunol.* **66**, 225—236 (1951).
- HAMMER, D. K., and F. J. DIXON: Experimental glomerulonephritis. II. Immunologic events in the pathogenesis of nephrotoxic serum nephritis in the rat. *J. exp. Med.* **117**, 1019—1034 (1963).
- KABAT, E. A., and M. M. MAYER: Experimental immunochemistry, sec. ed. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1961.
- KOZIMA, K., K. NAKANOIN u. A. VOGT: Unveröffentlicht 1966.
- KURTZ, H. M., and G. N. DONNELL: The effect of depression of plasma complement on nephrotoxic renal disease in rats. *Bact. Proc.* **1962**, 87.
- NAIRN, R. C.: Fluorescent protein tracing. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone LTD. 1962.
- NAKANOIN, K., u. A. VOGT: Speciesbedingte Unterschiede im Ablauf der experimentellen Nephritis der Ratte nach Injektion von Kaninchen- und Enten-Antirattennierenserum. *Virchows Arch. path. Anat.* **340**, 177—184 (1965).
- PARKE, J. A. C., and P. J. AVIS: The effect of digestion with papain and pepsin upon the antitoxic activity of rabbit antibody. *Immunology* **7**, 248—260 (1964).
- PORTER, R. R.: The hydrolyses of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119—127 (1959).
- SEEGAL, B. C., K. C. HSU, and G. A. ANDRES: Specific nephrotoxic nephritis: Old facts and present concepts. In: *Immunopathology, IIIrd Internat. Symposium 1963*, p. 208—219. Basel: Benno Schwabe & Co. 1963.
- SPIEGELBERG, H. L., and W. O. WEIGLE: The catabolism of homologous and heterologous 7 S γ -globulin fragments. *J. exp. Med.* **121**, 323—338 (1965).
- STELOS, P., Y. YAGI, and D. PRESSMAN: Localization properties of radioiodinated fragments of antirat kidney antibody. *J. Immunol.* **87**, 106—109 (1961).
- UNANUE, E., and F. J. DIXON: Experimental glomerulonephritis IV. Participation of complement in nephrotoxic nephritis. *J. exp. Med.* **119**, 965—982 (1964).
- — Experimental glomerulonephritis V. Studies on the interaction of nephrotoxic antibodies with tissues of the rat. *J. exp. Med.* **121**, 697—714 (1965).
- VOGT, A.: Ein Beitrag zur Immunologie der Masugi-Nephritis. *Habil.-Schr. Universität Freiburg i. Br.* 1965.
- R. KOPP, G. MAASS, and L. REICH: Poliovirus type 1: Neutralization by papain-digested antibodies. *Science* **145**, 1447—1448 (1964).

Dozent Dr. A. VOGT
Hygiene-Institut
78 Freiburg i. Br., Hermann-Herder-Str. 11