

Experimentelle Glomerulonephritis und Glomerulonephrose bei der Maus nach wiederholten Ovalbumininjektionen

Eine licht-, fluorescenz- und elektronenoptische Untersuchung

J. MOPPERT* und K. O. FRESEN**

Ludwig Aschoff-Haus, Pathologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. H. U. ZOLLINGER)

Eingegangen am 13. März 1967

*Experimental Glomerulonephritis and Glomerulonephrosis in Mice Induced by
Repeated Injections of Egg Albumin*

A Light-, Fluorescence- and Electron-Microscopic Study

Summary. The types of glomerular alterations in mice after repeated intraperitoneal injections of egg albumin over several weeks are studied. The application of different amounts of this foreign protein results either in glomerulonephritis or glomerulonephrosis, antigen-antibody complexes apparently being in any case the leading pathogenic factor. The resulting glomerular alterations, in relation to presumably different compositions of the antigen-antibody complexes, are discussed. An incomplete immunologic unresponsiveness after great amounts of egg albumin seems to modify the composition of the antigen-antibody complexes in such a way that there appears the picture of a glomerulonephrosis.

Zusammenfassung. Tägliche intraperitoneale Injektionen von Ovalbumin über mehrere Wochen führen bei der Maus zu Glomerulumveränderungen, die — in Abhängigkeit von der Dosis des applizierten Fremdeiweißes —, einer Glomerulonephritis oder einer Glomerulonephrose entsprechen. Dabei scheinen zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe (AAK), die sich in den Glomerula niederschlagen, den pathogenetisch wichtigsten Faktor darzustellen. Das Spektrum der morphologischen Befunde dürfte durch Unterschiede in der Zusammensetzung der jeweiligen AAK bedingt sein. Diese wird nach Applikation relativ hoher Ovalbumindosen durch das Auftreten einer partiellen Immunparalyse offenbar soweit verändert, daß das Bild einer Glomerulonephrose resultiert.

Einleitung

Experimentelle Glomerulonephritiden, im Rahmen einer Serumkrankheit durch ein- oder mehrmalige Applikation eines Fremdeiweißes induziert, wurden in den letzten Jahren als eines der möglichen Modelle für die entsprechende Erkrankung des Menschen intensiv untersucht (MCCLUSKEY, 1965; MELLORS, 1966). Die morphologischen Veränderungen scheinen aber dabei nicht immer dem Befund einer echten Glomerulonephritis zu entsprechen (ZOLLINGER, 1966). Monatelange, zweimal wöchentliche Injektion großer Mengen nativen Schweineserums führten beim Kaninchen gar zum lichtoptischen Bild einer Glomerulonephrose (ZOLLINGER, 1945), also einer doppelseitigen, nicht vasculär und auch nicht eindeutig entzündlich bedingten Glomerulumalteration (ZOLLINGER, 1966). Da bisher nur Ergebnisse über glomeruläre Veränderungen im Rahmen einer Serumkrankheit beim Kaninchen vorliegen (MCCLUSKEY, 1965), führten wir entsprechende Untersuchungen

* Stipendiat der Forschungskommission der Universität Basel.

** Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit werden von Herrn FRESEN als Dissertation der medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. vorgelegt.

an einer anderen Tierspecies, der Maus, durch. Statt der meist verwandten Serumfraktionen des Rindes benützten wir Ovalbumin als Fremdeiweiß. Dieses applizierten wir wiederholt und bei den einzelnen Versuchsgruppen in unterschiedlicher Dosierung.

Material und Methodik

1. Versuchstiere: Männliche, 10 Wochen alte CFL-Mäuse, Gewicht: 35—45 g. Insgesamt standen 65 Tiere im Versuch. Berichtet wird hier nur über Beobachtungen an zwei Versuchsgruppen von je 10 Tieren und 10 Kontrollmäusen.

2. Injektionsgut: Kristallisiertes Ovalbumin (*Serva*, Heidelberg) in einer Konzentration von 1% (10 mg-Gruppe) resp. 5% (100 mg-Gruppe) in gepufferter, physiologischer steriler Kochsalzlösung. Beim Ansatz Filtration durch „*Millipore*“-Bakterienfilter. Sterile Aufbewahrung bei —20° C.

3. Injektionsart und -rhythmus, Versuchsgruppen: Intraperitoneal. 24 Injektionen über 4 Wochen verteilt (Détails s. Abb. 1). a) 10 mg-Gruppe: 10 mg Ovalbumin = 1 ml der 1%igen Lösung pro Dosis; b) 100 mg-Gruppe: 100 mg Ovalbumin = 2 ml der 5%igen Lösung pro Dosis; c) Kontrolltiere: Keinerlei intraperitoneale Injektionen.

4. Proteinbestimmungen im Harn: 1—2 mal pro Woche in Stoffwechselkäfigen für 24 Std. Bestimmung nach ESRACH. Statistische Auswertung der Resultate mit Hilfe des nonparametrischen *Walsh*-Tests. Zudem wurden Teile einzelner Proben eingeengt und mittels Agar Gel Elektrophorese auf Fraktionen hin untersucht.

5. Verarbeitung am Versuchsende: Dekapitation 48 Std nach letzter Ovalbumininjektion. a) Immunfluoreszenz. Antiseren: Fluoresceinisothiocyanatmarkierte Globulinfraktionen eines Antiseraums vom Kaninchen gegen Mausglobulin resp. gegen Ovalbumin. Die Seren wurden von der *Nutritional Biochemicals Corporation* (Cleveland, Ohio) bezogen und gegen 0,02 M Phosphatpuffer (4° C, pH 8, 16 Std) dialysiert, anschließend, zur Entfernung unspezifischer Fluoreszenz, stufenweise über *Deae*-Cellulose mit Phosphatpuffern verschiedener Molarität (0,02—0,15 M) chromatographiert. Die so gewonnenen einzelnen Fraktionen wurden an Nieren eines erkrankten Versuchstiers und einer Kontrolle getestet, bei Brauchbarkeit gepoolt und, in Einzelproben aufgeteilt, bei —20° C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Untersucht wurden acetonfixierte Kryostatschnitte von Nieren, Leber und Milz. Technik s. VOGT et al. (1966)¹. Zu Kontrollzwecken wurden auf zwei Versuchstiere jeweils ein Kontrolltier mitverarbeitet, ferner zusätzlich Kryostatschnitte sämtlicher Tiere mit einem markierten Antiserum vom Schaf gegen Kaninchenglobulin (Labor P. D. Dr. VOGT, Hygiene-Institut, Freiburg i. Br.) überschichtet und beurteilt. Diese Kontrollen waren stets negativ. b) Lichtmikroskopie: Formalinfixierte Paraffinschnitte von Nieren, Leber, Milz und Wirbelsäulenmark. Färbungen: HE, PAS, Chromotrop-Anilinblau (CAB), Mallory-PTAH. Berichtet wird lediglich über die Nierenbefunde. c) Semidünnsschnitte und Elektronenmikroskopie: Fixation kleiner Nierenrindenstückchen in 1%igem OsO₄ (Kalium-Phosphatpuffer, 4° C, pH 7,4, 2 Std). Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe, Einbettung in Epon. Färbung von Semidünnsschnitten (ca. 1 μ) für die Lichtmikroskopie mit Azur-Methylenblau oder Silber-Methenamin. Kontrastierung der Ultradünnsschnitte mit Bleihydroxyd oder kombiniert mit Uranylacetat und Bleicitrat. Elektronenmikroskop: Zeiss EM 9.

Ergebnisse

Die Darstellung der Befunde erfolgt für die beiden Versuchsgruppen getrennt. Auf Beobachtungen an Kontrolltieren wird nur eingegangen, wenn dies für die Diskussion unerlässlich scheint.

I. 10 mg-Gruppe

a) Proteinurie. Abgesehen von einem leichten, nicht signifikanten Anstieg nach der 1. Ovalbumininjektion bewegt sich die 24 Std-Proteinurie während

¹ Herrn Priv.-Dozent Dr. A. VOGT, Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br., sowie Herrn Dr. K. KOZIMA sind wir für Rat und vielfältige Hilfe zu größtem Dank verpflichtet.

20 Tagen des Versuches im Normalbereich. Danach tritt eine rasch progressive pathologische Eiweißausscheidung auf, die am Versuchsende bei über 60% der Tiere gegenüber der Norm signifikante Werte ($p \leq 0,01$) erreicht (Abb. 1). Elektrophoretisch scheint es sich dabei hauptsächlich um einen vermehrten Verlust wirtseigener Proteine zu handeln, während Ovalbumin nicht oder nur in kleinsten Spuren nachgewiesen werden kann.

b) Immunfluoreszenz. Bei sämtlichen Tieren finden sich immunhistologisch Ovalbumin und Mausglobulin in jeweils identischer Lokalisation und Ausdehnung im Bereich der Glomerula. Dabei ist stets das Mesangium diffus oder fleckförmig betroffen (Abb. 2a und b). Bei Tieren mit schwerer Proteinurie am Versuchsende

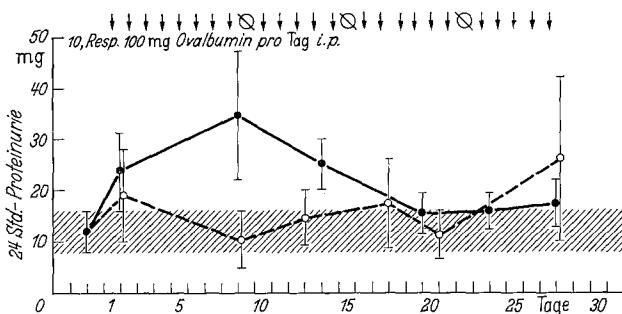


Abb. 1. Verlauf der (Gesamt-)Proteinurie (24 Std-Werte) in den beiden Versuchsgruppen. Aufgetragen sind Mittelwert und Standardabweichungen: 10 mg-Gruppe = gestrichelte Linie, Mittelwerte mit ○, 100 mg-Gruppe = ausgezogene Linie, Mittelwerte mit ● bezeichnet. Das graue Feld entspricht der Tagesproteinurie bei normalen männlichen Kontrollmäusen. Jeder Pfeil (am oberen Rand) entspricht einer intraperitonealen Injektion von 10 resp. 100 mg Ovalbumin

lassen sich Ovalbumin und Mausglobulin zudem auch in der Peripherie der Glomerulumschlingen nachweisen. Restliches Nierengewebe sowie Leber und Milz sind negativ.

c) Lichtmikroskopie (Paraffin- und Semidünnsschnitte). In den durchwegs vergrößerten Glomerula sämtlicher Tiere fällt eine herdförmige oder diffuse Verbreiterung der mesangialen Achsen auf (Abb. 2c). Diese Veränderung ist einerseits durch eine Schwellung und Vermehrung der intracapillären Elemente (= Endothel- und Mesangiumzellen), vor allem der Mesangiumzellen, bedingt, wobei da und dort auch polynukleäre Leukocyten anzutreffen sind. Andererseits lässt sich zwischen den Mesangiumzellen massenhaft silberpositives, filigranartig angeordnetes Material nachweisen, das sich rein färberisch von der üblichen mesangialen Matrix (m.M., Literatur und Synonyma s. ZOLLINGER, 1966) nicht unterscheidet (Abb. 2c). Bei Tieren mit deutlich pathologischer Proteinurie am Versuchsende erweist sich zudem auch die periphere Basalmembran als verändert. Sie verläuft streckenweise unregelmäßig gewellt und erscheint herdförmig verdickt (Abb. 2c). Daneben trifft man innerhalb der Capillarlumina bisweilen auf feine strichförmige Gebilde (Abb. 2c). Bei einem Tier ist die Mehrzahl der Glomerulumschlingen durch Fibrinmassen verlegt, wobei diese auch auf die mesangiale Achse übergreifen. In den übrigen Nephronabschnitten sind bei pathologischer Proteinurie Zylinder in den Lumina von Mittelstücken und Sammelrohren, ferner

vermehrt PAS-positive Tropfen im Bereich der Hauptstückepithelien zu sehen. Interstitium und Gefäße erscheinen nicht verändert.

d) Elektronenmikroskopie. Wiederum lassen sich Veränderungen im Bereich des Mesangiums, der peripheren Basalmembran und der Capillarlumina unterscheiden:

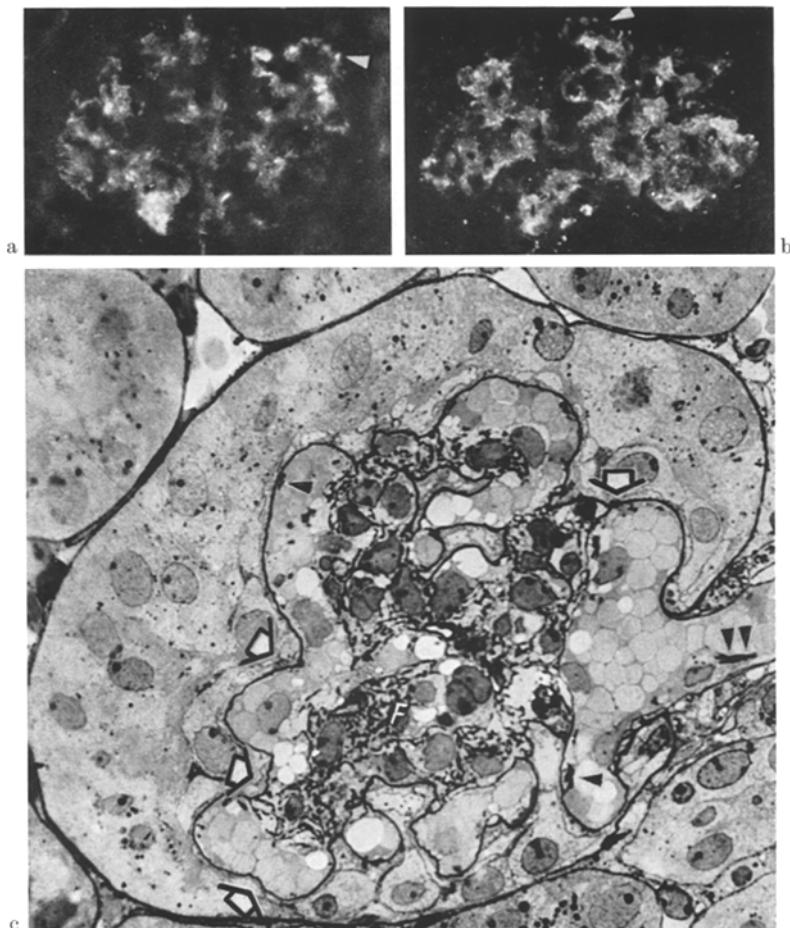


Abb. 2a—c. 10 mg-Gruppe. a Immunhistologischer Nachweis von Ovalbumin in einem Glomerulum. Vorwiegend mesangiale Lokalisation, an einer Stelle übergreifend auf die periphere Basalmembran (Pfeil) 200×. b Entsprechender Nachweis von Mausglobulin. Lokalisation wie a. c Semidünnabschnitt. Silberimprägnation. Schwellung und Proliferation der intracapillären Elemente, vor allem der Mesangiumzellen. Massenhaft filigranartiges Material (*F*) im Bereich der verbreiterten Lobulusachsen. Unregelmäßiger Verlauf und herdförmige Verdickung der peripheren Basalmembran (große Pfeile). Intracapillär: Vereinzelt strichförmiges Material = Fibrin (kleine Pfeile) 740×

Die Schwellung und Vermehrung der Mesangium- und Endothelzellen lassen sich bestätigen, ohne daß dabei ultrastrukturell wesentlich neue Befunde hervorzuheben wären. Die cytoplasmatische Schwellung der beiden Zelltypen äußert sich in einer Vermehrung relativ organellenarmer Bezirke und ist bei den Endothel-

zellen vor allem perinuklear ausgeprägt. Die zwischen den intracapillären Zellen infiltrierten polynukleären Leukocyten weisen oft Zeichen der Degradation in Form deutlich vergrößerter, teilweise auch unscharf begrenzter und aufgeheller Granula auf. Das im Bereich des Mesangium lichtoptisch gehäufte, filigranartig angeordnete Material entspricht elektronenoptisch prinzipiell einer vermehrten und verbreiterten m.M., die in typischer Weise gegenüber dem mesangialen

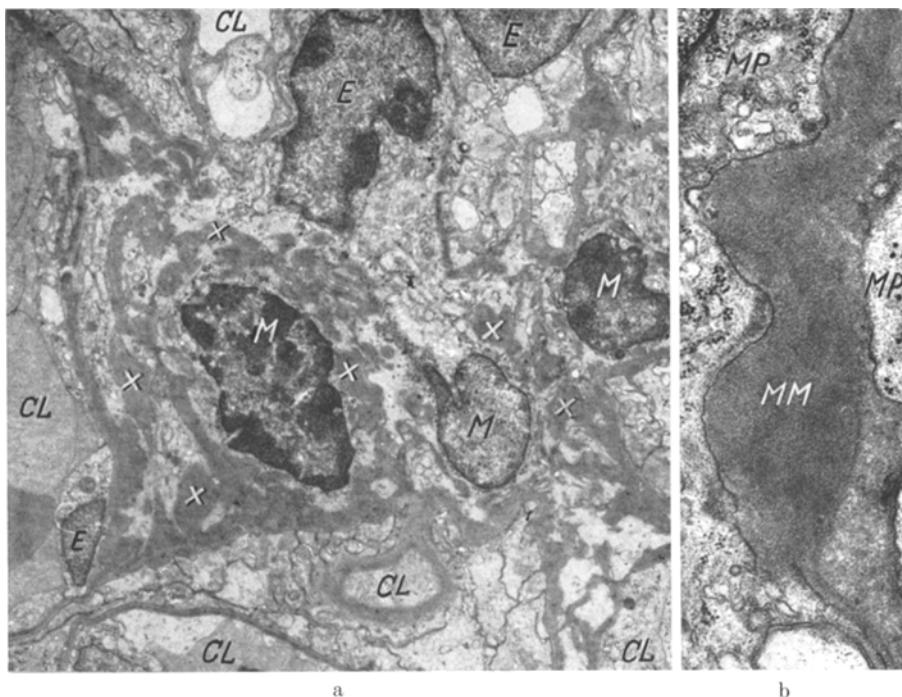


Abb. 3a u. b. 10 mg-Gruppe. a Lobulusachse mit Mesangiumzellen (*M*) und deutlicher Vermehrung der verdichtenen mesangialen Matrix (*X*), entsprechend dem filigranartigen Material in Abb. 2c. *E* Endothelzellekerne, *CL* Capillarlumen. $5100\times$. b Mesangiale Matrix (*MM*) mit feingranulärer Struktur und wechselnder Elektronendichte. Völlige Maskierung der Matrixfibrillen. *MP* Cytoplasma von Mesangiumzellen. $21800\times$

Cytoplasma von einer Membran begrenzt wird und andererseits unscharf in die Basalmembran des zugehörigen Glomerulumabschnittes übergeht (Abb. 3a). Ihre Struktur erweist sich bei höherer Auflösung als feingranular mit einzelnen unscharf begrenzten Aufhellungen (Abb. 3b). Ihre Dichte übertrifft nicht nur stets diejenige der Lamina rara interna, sondern oft auch der Lamina densa und weicht damit vom Bild der normalen m.M. ab. An den Organellen der Mesangiumzellen selbst sind keine Besonderheiten zu beobachten.

Die glomeruläre Basalmembran ist im Bereich der Schlingenperipherie, vor allem bei den Tieren mit ausgeprägter pathologischer Proteinurie, vielfältig verändert. Am häufigsten trifft man meist epithelwärts gerichtete, multiple, unregelmäßige Ausstülpungen, in deren Bereich die Lamina densa unterbrochen sein kann (Abb. 4a). Morphologisch finden sich dabei alle Übergänge zu meist einzeln

oder in kleinen Gruppen nachweisbaren, höcker- oder plateauförmigen, elektronendichten Depots, die der Lamina densa, oft auch der Lamina rara externa aufsitzen, gegenüber der benachbarten Epithelzelle aber stets durch eine Membran abgegrenzt sind (Abb. 4c). Diese Depots entsprechen dem Begriff des „hump“ der angelsächsischen Literatur (OSAWA et al., 1966). Material vergleichbarer Elektronendichte kann selten auch als unscharf begrenztes Depot subendothelial

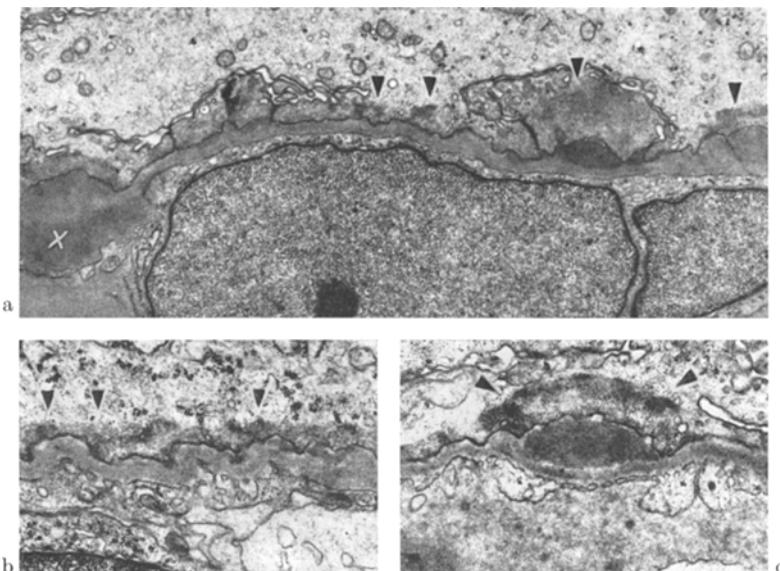


Abb. 4a—c. 10 mg-Gruppe. Verschiedene Veränderungstypen der peripheren Basalmembran. Epitheliale Seite jeweils oben. a Vorwiegend epithelwärts gerichtete, multiple Ausstülpungen verschiedener Elektronendichte, ganz links mit subendothelialem Depot (X) kombiniert. 8300 \times . b Mäanderartiger Verlauf der nicht verbreiterten Basalmembran. 8900 \times . c Isoliertes, elektronendichthes Depot („hump“), der Lamina rara externa aufsitzend. 11800 \times . Über sämtlichen Veränderungen sind die Fußfortsätze verschwunden, zudem erkennt man im epithelialen Cytoplasma ein elektronendichthes, feingranuläres Material (Pfeile)

oder innerhalb der Basalmembran beobachtet werden. Als dritter Veränderungstyp ist ein streckenweise mäanderartiger Verlauf der nicht verbreiterten Basalmembran zu nennen (Abb. 4b).

Die Epithelzellen liegen den betroffenen Basalmembranabschnitten unter Wegfall der füßchenförmigen Fortsätze flach auf. Dabei findet sich regelmäßig im aufgehellten epithelialen Grundcytoplasma über sämtlichen Veränderungen ein wolkiges, feingranuläres, elektronendichthes Material (Abb. 4a—c). Im übrigen weisen diese Zellen alle Zeichen der Aktivierung auf: Vermehrung von Vesikeln und Vacuolen, Vergrößerung der Golgiefelder, oft auch von Kern, Nucleolus und Ergastoplasm. Die periphere Zellmembran zeigt zudem oft zahlreiche mikrovilliartige Ausstülpungen in Richtung des Bowmannschen Raumes (Abb. 5). In Glomerula von Tieren, bei denen fluoreszenzoptisch Ovalbumin und Mausglobulin auch in der Schlingenperipherie nachgewiesen werden konnte, ist praktisch die gesamte Basalmembran in der geschilderten Weise alteriert.

Im Lumen der Glomerulumschlingen sowie einzelner intertubulärer Capillaren ist die Zahl der Thrombocyten gegenüber der Norm deutlich vermehrt. Die Plättchen, meist in der Einzahl, weisen dabei fast regelmäßig geblähte, pseudopodienartige Ausstülpungen des Grundcytoplasmas, bisweilen auch eine Vermehrung der großen Vesikel sowie eine Fusion der α -Granula zu verzweigten,



Abb. 5 a u. b. 10 mg-Gruppe. Peripherie einer Glomerulumschlinge. Im Lumen Fibrinwischer (*F*) in mehreren Gruppen (unten links: Fibrinbündel mit deutlicher Periodizität von 200 Å, 50700 \times), teilweise von einem wolkigen, elektronendichten Material (x) umgeben (= Fibrinoid). *E* Erythrocyt; *T* Thrombocyt; *L* Lymphocyt; *PL* polynuklearer Leukocyt; *D* subepitheliales Depot; *Ep* breit der Basalmembran aufliegende Epithelzellen mit zahlreichen Mikrovilli (*M*) in Richtung des Bowmannschen Raumes. 11200 \times

hantel- oder korallenstockähnlichen Gebilden auf. Ganz selten sind kleiblattförmig angeordnete Plättchengruppen mit Fusion der zentralen Cytoplasmabezirke und Zeichen ausgeprägter Degranulation (= visköse Metamorphose, VASSALLI et al., 1964b) anzutreffen. Große Plättchenaggregate dagegen sind in den Nieren nicht nachweisbar.

Das in versilberten Semidünnschnitten beobachtete intracapilläre, strichförmige Material stellt sich elektronenoptisch als dichte Bündel feinster Fasern dar, die bei höherer Auflösung eine Periodizität von durchschnittlich 200 Å erkennen

lassen (Abb. 5). Es handelt sich um intravasales Fibrin, das meist in kleineren Gruppen auftritt und dabei häufig von einer Wolke feingranulären Materials umgeben wird. Bei dem einen Tier mit massiver glomerulärer Thrombosierung findet sich Fibrin sowie das elektronendichte feingranuläre Material in großen Aggregaten in den Capillarlumina, daneben in kleineren Mengen auch innerhalb

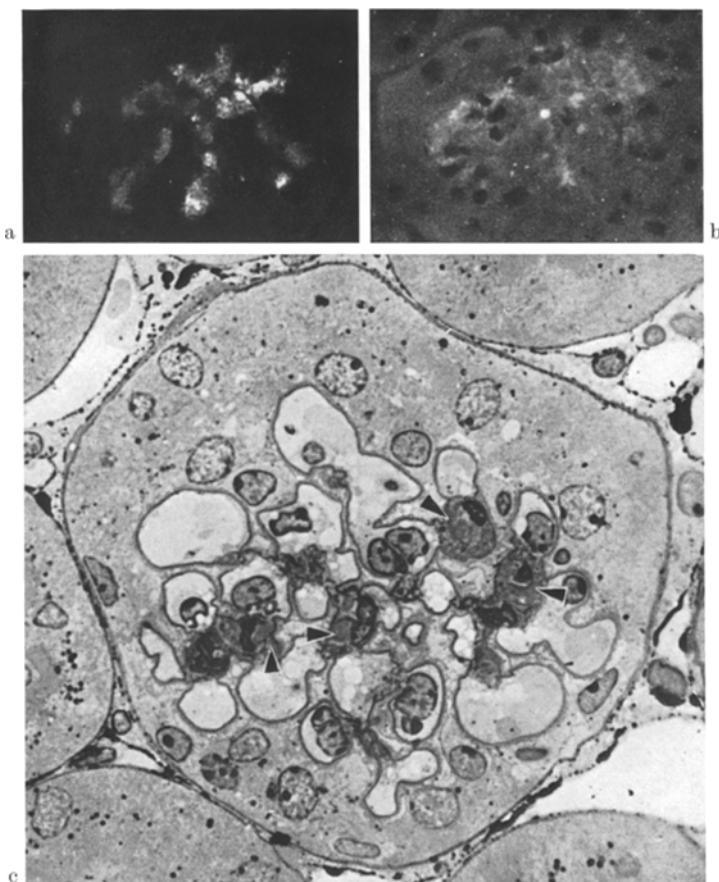


Abb. 6a—c. 100 mg-Gruppe. a Immunhistologischer Nachweis von Ovalbumin. Plump fingerförmige Fluoreszenz im mesangialen Bereich, aus einzelnen Herden aufgebaut. 200 \times . b Immunhistologischer Nachweis von Mausglobulin. Gegenüber Ovalbumin deutlich weniger ausgedehnte, ebenfalls mesangiale Lokalisation. 200 \times . c Semidünnsschnitt. Silberimprägnation. Einlagerung großer, scholliger Massen (Pfeile) ausschließlich im mesangialen Bereich. Keine Vermehrung der Glomerulumzellen, periphere Basalmembran glatt. 800 \times

von Vesikeln von Endothel- und Mesangiumzellen. Ferner imponieren große kompakte Depots, die vor allem zwischen den Mesangiumzellen liegen. Eine direkte topographische Beziehung zwischen Fibrin und Thrombocyten fehlt im Bereich der Nieren.

II. 100 mg-Gruppe

a) *Proteinurie.* Unmittelbar nach Versuchsbeginn entwickelt sich bei sämtlichen Tieren eine verstärkte Proteinurie, die nach 8 Tagen ein Maximum (Differenz

gegenüber der Norm: $p \leq 0,01$) erreicht und gegen Versuchsende wieder verschwindet (Abb. 1). Dieses vorübergehende Phänomen scheint, nach den Ergebnissen der Urinelektrophorese, hauptsächlich durch eine Ovalbuminurie bedingt zu sein, die bei 2 Tieren in geringem Ausmaße bis zuletzt andauert.

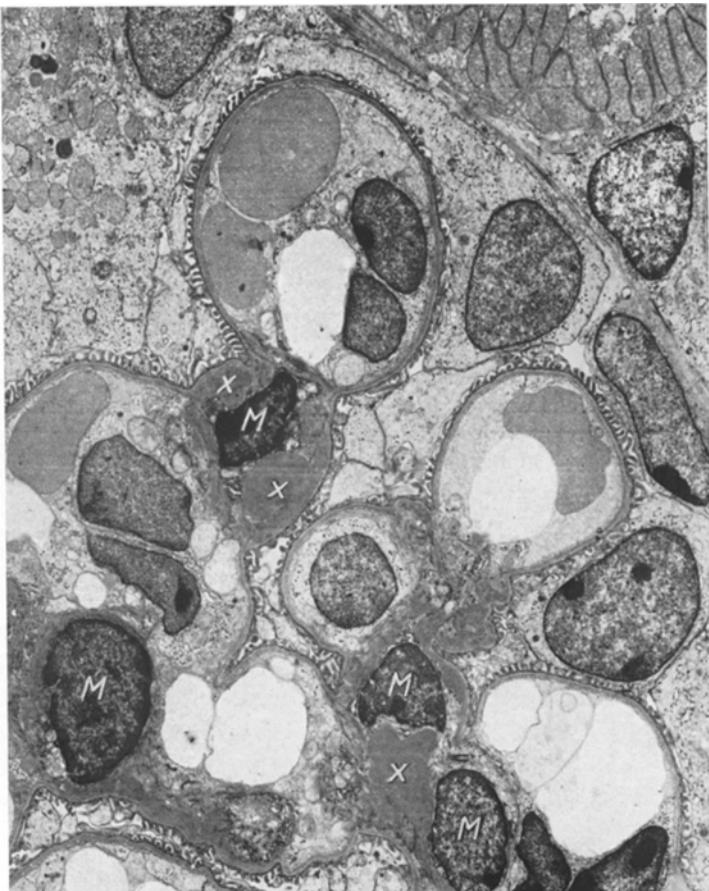


Abb. 7. 100 mg-Gruppe. Multiple, große, elektronendichte Depots (\times); streng auf den mesangialen Bereich begrenzt. Die Massen erscheinen als Einstülpungen der Basalmembran. Diese läuft aber über deren Basis hinweg. M Kerne der Mesangiumzellen. Die periphere Basalmembran, Endo- und Epithelzellen sind unauffällig. Die füßchenförmigen Fortsätze der letzteren durchwegs erhalten. $3400\times$

b) Immunfluorescenz. Nach Überschichtung mit markiertem Antiovalbumin wird, im Gegensatz zur 10 mg-Gruppe, ausschließlich im Mesangium der Nierenglomerula eine plump fingerförmige Fluorescenz sichtbar, die oft perl schnurartig aus einzelnen juxtanucleären Depots aufgebaut erscheint (Abb. 6a). Mausglobulin ist immunhistologisch stets in analoger Verteilung, jedoch in wesentlich geringerer Ausdehnung nachweisbar (Abb. 6b). Periphere Glomerulumabschnitte, das restliche Nierengewebe sowie Leber und Milz zeigen keine spezifische Fluorescenz. Bei den zwei Tieren mit bis zum Versuchsende persistierender Ovalbuminurie

fällt der Nachweis von Ovalbumin und Mausglobulin auch mesangial in sämtlichen Glomerula völlig negativ aus.

c) Lichtmikroskopie (Paraffin- und Semidünnsschnitte). Die mesangialen Achsen der Nierenglomerula werden durch schollige Massen herdförmig aufgetrieben

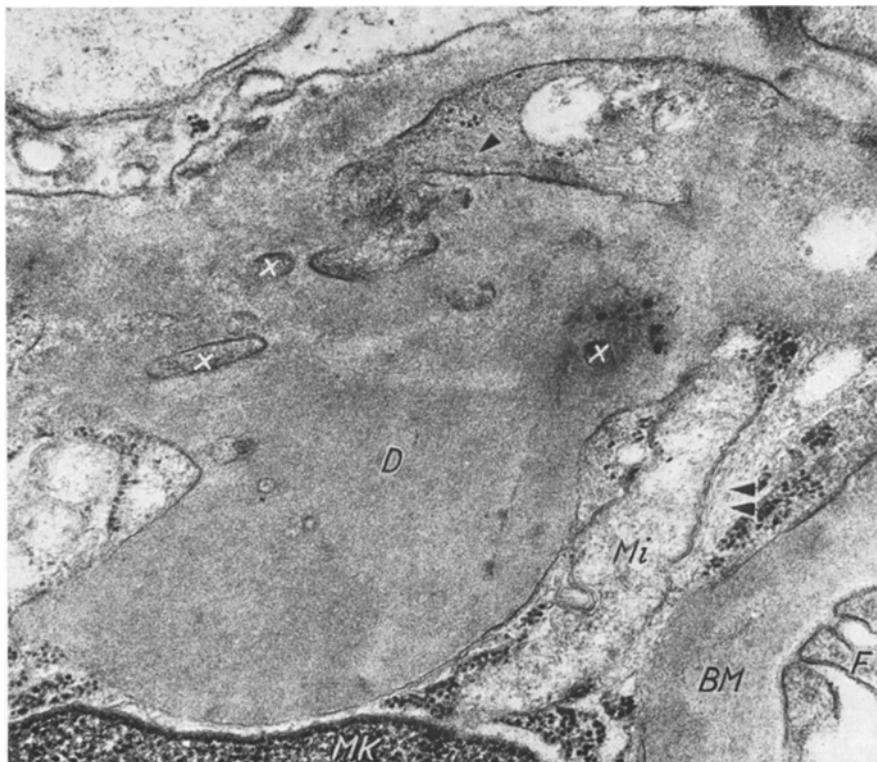


Abb. 8. 100 mg-Gruppe. Zu großem Depot (*D*) umgewandelte mesangiale Matrix mit feingranulärer Struktur wechselnder Elektronendichte, von feinen Ausläufern (X) der umgebenden Mesangiumzelle durchsetzt. *MK* Kern einer Mesangiumzelle, nebst Mitochondrium (*Mi*) und cytoplasmatischen Fibrillen (Pfeile). *BM* Basalmembran mit epithelialen Fußfortsätzen (*F*). 37100×

(Abb. 6c). Das eingelagerte Material tritt in Depots bis über Kerngröße auf, färbt sich mit CAB intensiv violett bis rosa und erscheint nach Silberimprägnation von Semidünnsschnitten in einem gegenüber der Basalmembran meist etwas helleren Braun. Selten sind die Mesangiumkerne leicht vermehrt. Häufigkeit und Ausdehnung der Depots gehen den fluoreszenzoptischen Befunden parallel: Die Veränderung konnte bei den beiden Tieren mit negativer Fluoreszenz trotz Durchmusterung zahlreicher Glomerula in Semidünnsschnitten nie gefunden werden. Bei allen Tieren sind die übrigen Elemente der Glomerula, vor allem die periphere Basalmembran, sowie Tubuli und Interstitium unverändert.

d) Elektronenmikroskopie. Die lichtoptisch beschriebenen Massen erscheinen ultrastrukturell als knollige, gegenseitig anastomosierende Einstülpungen der Basalmembran in den mesangialen Bereich (Abb. 7). Bei höherer Auflösung zeigt

sich jedoch, daß die Lamina basalis mit ihren drei Schichten über die Basis der Depots hinwegläuft. Einzig die Innenmembran der Lamina rara interna folgt der Oberfläche des eingelagerten Materials und schließt es so vom benachbarten mesangialen Cytoplasma ab. Die Depots zeigen eine feingranuläre Struktur und unterscheiden sich prinzipiell von der m.M. der Kontrolltiere lediglich durch ihre Masse sowie eine etwas erhöhte, leicht variierende Elektronendichte, die etwa derjenigen der Lamina densa entspricht (Abb. 8). Das eingelagerte Material wird häufig von feinen Cytoplasmatausläufern der mesangialen Zellen durchsetzt, die im übrigen elektronenoptisch keine Besonderheiten erkennen lassen. Auch die periphere Basalmembran sowie Endo- und Epithelzellen sind unauffällig (Abb. 7). Bei den zwei Tieren mit fluorescenz- und lichtoptisch negativem Befund konnten ultrastrukturell lediglich an einzelnen Stellen eine geringfügige Vermehrung der m.M. gefunden werden. Zeichen einer intravasalen Gerinnung fehlen bei allen Tieren der Versuchsgruppe.

Diskussion

I. Allgemeines

Nach parenteraler Applikation verteilt sich ein Fremdprotein im nicht immunisierten Wirtsorganismus zunächst gleichmäßig im Extracellulärraum. Gleichzeitig wird die Substanz teilweise vom reticulo-histiozytären System (RHS) phagocytiert und abgebaut (MEGO und MC QUEEN, 1965), ferner, je nach Molekulargewicht, renal ausgeschieden. Wirkt das Fremdeiweiß als Antigen (Ag), so gelangen nach einer Latenz von einigen Tagen vom Versuchstier gebildete Antikörper (Ak) in die Zirkulation und können sich dort mit dem Ag zu löslichen Komplexen vereinigen, sofern jenes zu diesem Zeitpunkt noch in genügender Menge frei vorhanden ist (MCCLUSKEY, 1965).

Bei der durch Applikation eines Fremdeiweißes induzierbaren Serumkrankheit des Kaninchens stellt die Glomerulonephritis den Hauptbefund dar (DIXON et al., 1961). Sie wird durch zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe (AAK) ausgelöst, wenn sich diese in den Glomerula niederschlagen (DIXON et al., 1958). Eine obligate Beteiligung von Komplement ist dabei noch umstritten (MCCLUSKEY, 1965). Ag oder Ak allein sind wirkungslos. Das applizierte Fremdeiweiß bleibt erst dann im Glomerulum haften, wenn zuvor die Bindung an den entsprechenden Ak erfolgt ist (DIXON et al., 1958). Immunologische Beziehungen zwischen Nierengewebe und Ag oder Ak bestehen dabei nicht. Durch ein- oder mehrmalige Antigengabe lassen sich morphologisch verschiedene Typen der Glomerulonephritis erzeugen, wobei das Ausmaß der Antikörpersynthese durch das Wirtstier eine wichtige Rolle spielt (DIXON et al., 1961). Analog wurde bei der Maus durch intravenöse Injektion von *in vitro* vorgeformten AAK das Auftreten einer Glomerulonephritis beobachtet (MCCLUSKEY, 1965).

Ovalbumin, mit einem Molekulargewicht von ca. 40000, wird vom nicht immunisierten Warmblüter renal durch die Glomerula rasch ausgeschieden. Bei der schnellen Passage durch das Ultrafilter ist seine Konzentration dabei so gering, daß es fluoreszenzoptisch zu keinem Zeitpunkt nach seiner Applikation in den Glomerula sicher faßbar wird (COONS et al., 1951). Nach 48 Std läßt es sich bei der Maus immunhistologisch in keinem Organ mehr nachweisen (COONS et al., 1951). Da die Bildung entsprechender Ak beim nicht immunisierten Tier mehr als 2 Tage in Anspruch nimmt, ist zur Induktion löslicher AAK mindestens eine zweite Ovalbumininjektion zu einem späteren Zeitpunkt nötig.

II. 10 mg-Gruppe

Die ca. 3 Wochen nach Versuchsbeginn auftretende pathologische Proteinurie zeigt, daß auch in unserem Versuch ein Faktor im Spiele ist, der erst nach einer gewissen Latenz wirksam wird. Dabei fällt eine rein kumulative Schädigung der Glomerula durch wiederholte Applikation von Ovalbumin, wie ein Vergleich mit der 100 mg-Gruppe ergibt, außer Betracht. Es kann sich somit nur um das Hinzutreten eines vom Wirtsorganismus produzierten Faktors handeln. Immunhistologisch findet sich am Versuchsende im Bereich der Glomerula neben Ovalbumin auch Mausglobulin in identischer Lokalisation und Ausdehnung. Dieser Befund, zusammen mit den licht- und elektronenoptischen Ergebnissen, steht mit den oben zitierten Beobachtungen von DIXON et al. (1961), McCLUSKEY (1965) und anderen in Einklang und erlaubt den Schluß, daß auch in unserer Versuchsanordnung AAK entstanden sind und sich im Bereich der Glomerula niedergeschlagen haben.

Die beschriebene intravasale Gerinnung spricht ebenfalls für das Auftreten von AAK, läßt sich doch das Shwartzman-Phänomen, nach Blockierung des RHS, statt mit Endotoxin auch mit AAK auslösen (LEE, 1963).

Ferner konnten DIXON et al. (1958) zeigen, daß freie, nicht an Ag gebundene Serumglobuline bei der Passage durch die Niere auch selbst in entzündlich veränderten Glomerula nicht hängenbleiben. Dies liefert ein weiteres Argument dafür, daß es sich bei dem fluoreszenzoptisch beobachteten Mausglobulin in den Glomerula überwiegend um gegen Ovalbumin gerichtete Ak handeln muß.

Die Intensität der funktionellen und morphologischen Nierenalteration ist bei den einzelnen Tieren der Versuchsgruppe verschieden. Regelmäßig finden sich dabei Veränderungen im Bereich der mesangialen Achse, wo sich auch stets Ovalbumin und Wirtsglobulin nachweisen lassen: Zirkulierende AAK werden, abgesehen vom RHS, offenbar selektiv von Endothel- und Mesangiumzellen phagocytiert (McCLUSKEY, 1965) und danach vorwiegend im Bereich der interzellulären Matrix deponiert (ANDRES et al., 1963; ANDRES et al., 1966). Die Schwellung und Proliferation der intracapillären Elemente sowie die Vermehrung und Umstrukturierung der m.M. können demnach mit der Absorption und Deponierung von AAK allein, oder in Kombination mit Fibrin oder dessen Abbauprodukten (VASSALLI und McCLUSKEY, 1964a), erklärt werden.

Die Menge der zirkulierenden AAK ist bei einer gegebenen Ag-Dosis vor allem von der Intensität der Ak-Produktion des Wirtsorganismus abhängig, die bei den einzelnen Individuen einer Versuchsgruppe stets erhebliche Unterschiede zeigt (DIXON et al., 1961; McCLUSKEY, 1965).

Ist die Serumkonzentration der zirkulierenden Immunkomplexe relativ gering, so werden diese im Glomerulum vor allem durch die intracapillären Zellen abgefangen. Größere Mengen scheinen die Endothelzellen zu lädieren (MELLORS, 1966) und setzen sich dann an der peripheren Basalmembran fest. Dabei kommt es zu einer Störung der Ultrafilterfunktion und damit zur pathologischen Proteinurie. Die gleichzeitig elektronenoptisch zu beobachtenden Veränderungen der peripheren Basalmembran, wie sie bei ca. 60 % unserer Tiere auftraten, werden heute allgemein als direkter Ausdruck der Anlagerung und des Durchtritts von Immunkomplexen aufgefaßt (FELDMANN et al., 1966 u.a.), wobei dieser Prozeß in seinen Einzelheiten noch völlig unklar ist.

Die morphologischen Befunde ähneln in frappanter Weise den Basalmembranläsionen bei der akuten Glomerulonephritis des Menschen (FELDMANN et al., 1966) und haben deshalb hier bereits zu weitgehenden Spekulationen Anlaß gegeben (OSAWA et al., 1966; vgl. dagegen ANDRES et al., 1966 sowie NEUSTEIN und DAVIS, 1965).

Auch die Deutung des regelmäßig über veränderten Abschnitten der Basalmembran im Bereich des epithelialen Cytoplasmas sichtbaren elektronendichten Materials (Abb. 4a—c) ist uneinheitlich. Es soll sich dabei um den Ausdruck lokal verstärkten Durchtritts von Serumproteinen oder um Abbauprodukte des abgelagerten AAK handeln.

Die Auslösung der intravasalen Gerinnung dürfte Folge der allgemeinen Endothelschädigung durch die zirkulierenden AAK sein. Diese Läsion braucht sich dabei nicht primär in den Glomerulumcapillaren selbst abzuspielen, da extrarenal im Kreislauf ausfallendes Fibrin, wohl in Folge der Ultrafilterfunktion, passiv in den Glomerula angehäuft wird, sofern der Organismus das erste Stadium der generalisierten Koagulation überlebt (LEE, 1963). Entsprechende Endothelveränderungen sind beim Arthusphänomen elektronenoptisch sichtbar (COCHRANE, 1965). Immunkomplexe lösen zudem, auch in Abwesenheit von Thrombin, eine visköse Metamorphose der Thrombocyten aus (BETTEX-GALLAND et al., 1963). Anderseits scheint die Gegenwart von Plättchen beim Shartzman-Phänomen nicht obligat zu sein (LEVIN und BECK, 1966), so daß die von uns beobachteten Thrombocytenalterationen eher als Begleitphänomen, nicht aber als Initialphase der intravasalen Koagulation zu deuten sind.

Bei den Tieren mit schweren Veränderungen finden sich regelmäßig auch einzelne, mesangial gelegene polynukleäre Leukocyten.

Die Morphologie der glomerulären Veränderungen bei der 10 mg-Gruppe entspricht also einer intracapillären, vorwiegend alterativen Herdglomerulitis, deren Intensität vor allem von der Menge der zirkulierenden AAK bestimmt zu werden scheint: Die Injektion höchster Dosen vorgeformter löslicher AAK führt bei der Maus gar zum Bild der echten diffusen Glomerulonephritis (McCLUSKEY, 1965).

III. 100 mg-Gruppe

Während der ersten Versuchshälfte entwickeln sämtliche Tiere eine schwere Proteinurie, die hauptsächlich durch die massive Ausscheidung von Ovalbumin bedingt zu sein scheint. Das Phänomen ist reversibel, was auf eine adaptiv gesteigerte Metabolisierung des zugeführten Antigens durch das RHS zurückzuführen ist (DIXON und MAURER, 1955b).

Am Versuchsende zeigen 8 von 10 Tieren im Urin nur noch Spuren von Ovalbumin bei normaler Gesamtproteinmenge. Diese Tiere weisen in den Glomerula die beschriebenen großen, mesangialen Depots auf, die fluoreszensoptisch hauptsächlich aus Ovalbumin bestehen, wobei aber immer in geringerer Ausdehnung, jedoch analoger Lokalisation, auch Mausglobulin nachzuweisen ist. Bei den zwei Tieren mit persistierender Ovalbuminurie bis zum Versuchsende sind die Glomerula licht-, fluoreszenz- und elektronenoptisch unverändert.

Versuche mit noch höheren täglichen Ovalbumindosen (120—140 mg) ergaben, daß dabei nur noch bei 20 % der Individuen einzelne mesangiale Depots zu finden sind, d.h., Tiere mit morphologisch durchwegs intakten Glomerula überwiegen.

Die Deutung dieser Ergebnisse wird durch das Faktum ermöglicht, daß die Applikation großer Dosen eines Ag auch bei einem erwachsenen, prinzipiell immunkompetenten Organismus zur sog. Immunparalyse (DIXON und MAURER, 1955a) führt. Bei den Tieren der 100 mg-Gruppe ist also nicht eine Steigerung, sondern eine Hemmung oder gar das Fehlen einer Antikörperantwort zu erwarten. Eine vollständige Hemmung der Antikörpersynthese ist bei einer Tagesdosis von 100 mg Ovalbumin offenbar erst bei 2 von 10 Tieren erreicht, bei 120—140 mg

dagegen bereits bei der Mehrzahl zu erzwingen. In diesem Zustand wird das nicht im RHS abgefangene Ag glomerulär filtriert, ohne einen morphologisch faßbaren Schaden an der Basalmembran oder dem Mesangium zu hinterlassen. Identische Befunde konnten DIXON et al. (1961) sowie ANDERS et al. (1963) trotz wochenlanger Ag-Injektion bei Kaninchen mit fehlender Ak-Antwort erheben. Bei den Tieren mit mesangialen Depots scheint dagegen die Immunparalyse inkomplett, die entstehenden AAK werden glomerulär phagocytiert und mesangial gestapelt.

Es fragt sich nun, weshalb bei diesen Tieren nie Schäden der peripheren Basalmembran auftreten. Dabei darf angenommen werden, daß die bei der 100 mg-Gruppe entstehenden Immunkomplexe in einem Milieu mit sog. „Antigen-Exzeß“ anfallen, wogegen bei der 10 mg-Gruppe eher die Zahl der Antikörpermoleküle überwiegen dürfte. Damit ist das Auftreten von jeweils unterschiedlich zusammengesetzten AAK bei den beiden Versuchsgruppen zu erwarten (Literatur s. ISHIZAKA, 1963; MCCCLUSKEY, 1965; MELLORS, 1966).

Die pathogenen Eigenschaften eines Immunkomplexes können nun je nach Ag-Ak-Verhältnis sehr verschieden sein (ISHIZAKA, 1963). Offenbar geht den bei der 100 mg-Gruppe auftretenden Verbindungen die Potenz zur Endothelläsion und Haftung an der peripheren Basalmembran weitgehend ab, während ihre stimulierende Wirkung auf phagocytierende Zellen erhalten ist. Auch das völlige Fehlen einer intravasalen Gerinnung bei allen Tieren dieser Gruppe weist in dieser Richtung.

Morphologisch entspricht die Veränderung der Glomerula bei den Tieren mit mesangialen Depots dem Begriff der Glomerulonephrose. Diese Alteration braucht dabei, wie auch unser Beispiel zeigt, nicht mit einem nephrotischen Syndrom einherzugehen. Bisher sind aus der menschlichen Pathologie keine Krankheiten bekannt, bei denen diese Veränderung ebenfalls durch die ausschließliche Ablagerung von AAK im mesangialen Bereich erklärt werden kann. Immerhin wird neuerdings ein solcher Mechanismus wenigstens als Tealfaktor bei der diabetischen Nephropathie diskutiert (MELLORS, 1966), während er bei der Amyloidose keine Gültigkeit mehr haben dürfte (COHEN, 1965).

Literatur

- ANDRES, G. A., B. C. SEEGAL, K. C. HSU, M. S. ROTHENBERG, and M. L. CHAPEAU: Electron microscopic studies of experimental nephritis with ferritin-conjugated antibody. *J. exp. Med.* **117**, 691—704 (1963).
- L. ACCINNI, K. C. HSU, J. B. ZABRISKIE, and B. C. SEEGAL: Electron microscopic studies of human glomerulonephritis with ferritin-conjugated antibody. *J. exp. Med.* **123**, 399—412 (1966).
- BETTEX-GALLAND, M., E. F. LÜSCHER, G. SIMON, and P. VASSALLI: Induction of viscous metamorphosis in human blood platelets by other means than by thrombin. *Nature (Lond.)* **200**, 1109—1110 (1963).
- COHEN, A. S.: The constitution and genesis of amyloid. In: International review of experimental pathology, vol. 4, p. 159—244 (G. W. RICHTER and M. A. EPSTEIN, eds.). New York and London: Academic Press 1965.
- COONS, A. H., E. H. LEDUC, and M. M. KAPLAN: Localization of antigens in tissue cells. VI. The fate of injected foreign proteins in the mouse. *J. exp. Med.* **93**, 173—188 (1951).
- DIXON, F. J., J. D. FELDMANN, and J. J. VAZQUEZ: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. exp. Med.* **113**, 899—920 (1961).

- DIXON, F. J., and P. H. MAURER: Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens. *J. exp. Med.* **101**, 245—258 (1955a).
- — Effects of large infusions of heterologous serum proteins on the serum protein metabolism of rabbits. *J. exp. Med.* **101**, 233—244 (1955b).
- J. J. VAZQUEZ, W. O. WEIGLE, and CH. G. COCHRANE: Pathogenesis of serum sickness. *Arch. Path.* **65**, 18—28 (1958).
- FELDMANN, J. D., M. R. MARDINEY, and S. E. SHULER: Immunology and morphology of acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Lab. Invest.* **15**, 283—301 (1966).
- ISHIZAKA, K.: Gammaglobulin and molecular mechanisms in hypersensitivity reactions. *Progr. Allergy*, vol. 7, p. 32—106 (P. KALLÓS and B. H. WAKSMAN, eds.). Basel and New York: S. KARGER 1963.
- LEE, L.: Antigen-antibody reaction in the pathogenesis of bilateral renal cortical necrosis. *J. exp. Med.* **117**, 365—376 (1963).
- LEVIN, J., and E. BECK: A re-appraisal of the role of blood coagulation and platelets in the generalized Shartzman phenomenon. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* (Stuttg.) **15**, 519—538 (1966).
- MCCCLUSKEY, R. T.: Experimental serum sickness. In: *The inflammatory process*, p. 649—684 (B. W. ZWEIFACH, L. GRANT, and R. T. MCCCLUSKEY, eds.). New York and London: Academic Press 1965.
- MEGO, J. L., and J. D. MCQUEEN: Further studies on the degradation of injected (¹³¹I) albumin by secondary lysosomes of mouse liver. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **111**, 166—173 (1965).
- MELLORS, R. C.: Glomerulonephritis in man and experimental animals: Immunologic mechanisms of renal injury. In: *The kidney*, p. 387—405 (F. K. MOSTOFF and D. E. SMITH, eds.). Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1966.
- NEUSTEIN, H. B., and W. DAVIS: Acute glomerulonephritis. A light and electron microscopy study of eight serial biopsies. *Amer. J. clin. Path.* **44**, 613—626 (1965).
- OSAWA, G., J. BERES, and P. KIMMELSTIEL: Glomerulonephritis. Observations by light and electron microscopy. *Amer. J. clin. Path.* **46**, 295—304 (1966).
- VASSALLI, P., and R. T. MCCCLUSKEY: The pathogenic role of the coagulation process in rabbit Masugi nephritis. *Amer. J. Path.* **45**, 653—678 (1964a).
- G. SIMON, and CH. ROUILLER: Ultrastructural study of platelet changes initiated in vivo by thrombin. *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 374—387 (1964b).
- VOGT, A., L. REICH und K. NAKANONI: Die passive nephrotoxische Nephritis. *Virchows Arch. path. Anat.* **341**, 224—236 (1966).
- ZOLLINGER, H. U.: Die spontane und experimentelle Glomerulonephrose. *Helv. med. Acta* **12**, 23—58 (1945).
- Niere und ableitende Harnwege. In: *Spezielle pathologische Anatomie*, Bd. 3 (W. DOERR und E. UEHLINGER, Hrsg.). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.

Dr. J. MOPPERT
Pathologisches Institut der Universität
7800 Freiburg i.Br., Albertstr. 19