

Untersuchungen über die Amyloidinduktion durch Chondroitinsulfat*

PAUL SCHMITZ-MOORMANN

Pathologisches Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk)

Eingegangen am 16. Juli 1969

Studies of the Induction of Amyloidosis by Chondroitin Sulphate

Summary. Chondroitin sulphate given to mice parenterally is excreted by the kidneys and phagocytized by the von Kupffer cells of the liver. It augments the pyroninophilic cells in liver and spleen and produces dysproteinemia. Furthermore, it induces a perifollicular amyloidosis of the spleen. If at all, however, only a slight amount of this chondroitin sulphate is bound within amyloid. An almost equal amount of chondroitin sulphate can be found in amyloid deposits induced by casein. Therefore it seems improbable that chondroitin sulphate of serum is important for the induction and formation of amyloid. Similar to casein, chondroitin sulphate causes an unspecific reaction that induces the formation of amyloid.

Zusammenfassung. 1. Parenteral zugeführtes Chondroitinsulfat wird bei Mäusen über die Nieren ausgeschieden und in den Sternzellen der Leber phagocytiert. Es führt zu einer Vermehrung der pyroninophilen Zellen in der Milz und — geringer — in der Leber sowie zu Serumweißveränderungen. Weiterhin induziert es in der Milz die Entstehung einer perifollikulären Amyloidose.

2. Eine nennenswerte Vermehrung des im Amyloid gebundenen Chondroitinsulfats lässt sich bei der Chondroitinsulfatinduzierten Amyloidose gegenüber der Casein-induzierten Amyloidose nicht nachweisen.

3. Es ist daher unwahrscheinlich, daß das Chondroitinsulfat des Serums eine wesentliche Rolle bei der Bildung des Amyloids spielt. Vielmehr scheint das parenteral zugeführte Chondroitinsulfat — ähnlich wie Casein — eine unspezifische Reaktion auszulösen, in deren weiteren Verlauf es zu Amyloidablagerungen kommt.

Die Frage nach der Struktur des Amyloid wurde in den letzten Jahren einer Lösung wesentlich näher gebracht, nachdem gezeigt werden konnte, daß die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Fibrillen die Primärstrukturen des Amyloids darstellen, zwischen welche sich sekundär zahlreiche Substanzen — Eiweiße, Fette, Kohlenhydrate, Pigmente — einlagern können (Cohen, 1965; Schneider, 1964). Demgegenüber konnte die formale Entstehung der Amyloidfibrillen und damit des Amyloids bisher nicht geklärt werden; vielmehr steht nach wie vor die Frage offen, ob das Amyloid intracellulär gebildet wird oder extracellulär entsteht (Teilum, 1964; Letterer, 1964; Cohen, 1965; Janigan und Druet, 1968).

Cessi und Serafini-Cessi gelang es 1959, bei Mäusen durch parenterale Zufuhr von Chondroitinsulfat eine Amyloidose zu erzeugen. In eigenen Untersuchungen (Schmitz-Moormann, 1965) konnte gezeigt werden, daß im Amyloid beträchtliche Mengen an sauren Mucopolysacchariden enthalten sind. Es stellte sich somit die Frage, ob bei der mit Chondroitinsulfat induzierten Amyloidose das saure Mucopolysaccharid lediglich eine unspezifische Reaktion auslöst, welche zur Entstehung

* Durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

von Amyloidablagerungen führt, oder ob das Chondroitinsulfat unmittelbar an der Amyloidbildung beteiligt und in den Amyloidfibrillen gebunden ist. Eine Klärung dieser Frage läßt über die spezielle Problemstellung hinaus weitere Aussagen zur formalen Genese des Amyloid zu; würde doch eine direkte Beteiligung des Chondroitinsulfates an der Amyloidbildung eine extracelluläre Entstehung der Amyloidfibrillen in hohem Maße wahrscheinlich machen.

Wir wiederholten daher die Versuche von Cessi und Serafini-Cessi mit Fluoresceinisothiocyanat-markiertem Chondroitinsulfat (FITC-Chs) und prüften, ob sich dieses Chondroitinsulfat in den Amyloidablagerungen wiederfinden ließ. Zudem untersuchten wir mit serologischen, histologischen und histochemischen Methoden die geweblichen und humoralen Veränderungen, die während der Amyloidinduktion auftraten.

Methodik

Die Untersuchung wurde an 25—35 g schweren Albino-Mäusen (Stamm A/J Han) durchgeführt. Das verwendete Chondroitinsulfat (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) enthielt neben anorganischen Salzen 70% Chondroitinsulfat, und zwar, wie eine chromatographische Prüfung (Methode nach Teller und Ziemann, 1966) ergab, zu etwa gleichen Teilen Chondroitinsulfat A und Chondroitinsulfat C.

Die erste Mäusegruppe erhielt fünfmal wöchentlich s.c. 0,5 ml einer 2%igen Lösung von Chondroitinsulfat in 0,9%igen NaCl, das nach Nairn (1962) mit FITC markiert worden war. Der zweiten Gruppe wurde die gleiche Dosis nicht markiertes Chondroitinsulfat injiziert. Die Mäuse der dritten Gruppe erhielten fünfmal wöchentlich 0,5 ml einer gesättigten FITC-Lösung (in 0,9%igen NaCl). Die Mäuse der vierten Gruppe dienten als Kontrolltiere. Bei einigen Mäusen wurde zudem eine Amyloidose durch eine parenterale Zufuhr von Casein hervorgerufen (5% Lösung pH 7—8, sechsmal wöchentlich 0,5 ml).

In der ersten und zweiten Gruppe töten wir unter Äthernarkose in 14tägigen Abständen je 4 Mäuse, in der dritten Gruppe je 3 Mäuse in vierwöchentlichen Abständen, in der vierten Gruppe je 1 oder 2 Mäuse in zweiwöchentlichen Abständen.

Unter der Narkose durch Herzpunktion gewonnenes Blut wurde einmal elektrophoretisch untersucht; zum andern prüften wir es mit der Agargelldiffusion nach Ouchterlony auf seinen Gehalt an Antikörpern gegen FITC-Chs und nicht markiertes Chondroitinsulfat. Leber, Milz und Nieren wurden gewogen. Sodann wurden Teilstücke dieser Organe sowie eine Gewebsprobe aus dem Injektionsbereich in 4%igem Formalin (mit einem Zusatz von 1% Cetylpyridiniumchlorid) fixiert, in Paraffin eingebettet und zu Feingewebschnitten aufgearbeitet. Folgende Färbungen wurden durchgeführt: HE, Alcianblau, Alcianblau-PAS, kolloidale Eisenreaktion nach Hale, Toluidinblau, Methylgrün-Pyronin und Kongorot (Methodik s. Gedigk und Totović, 1964). Dieselben Färbungen wurden an Kryostatschnitten durchgeführt, die 10 min in der gleichen Formalinlösung fixiert worden waren; die Fette wurden mit Sudanrot dargestellt. Bei jeder Gruppe behandelten wir einen Teil der Schnitte zuvor mit Hyaluronidase, Neuraminidase sowie Hyaluronidase + Neuraminidase und verglichen die Anfärbung mit entsprechenden Kontrollschnitten (Methodik s. Gedigk und Totović, 1964). Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendeten wir ungefärbte Kryostat- und Paraffinschnitte, die mit gepuffertem Glyzerin (pH 7,2) eingedeckt worden waren. Die Beurteilung erfolgte am Zeiss-Fluoreszenzmikroskop (Erregerfilter I, Sperrfilter 53).

Ergebnisse

Sowohl nach Gabe von FITC-Chs als auch von nicht markiertem Chondroitinsulfat ließen sich bei den Mäusen nach 12 Wochen in der Milz Amyloidablagerungen nachweisen. In der Leber und den Nieren wurde kein Amyloid gefunden. Bei den FITC-behandelten Tieren sowie den unbehandelten Mäusen trat während der gesamten Versuchsdauer (16 Wochen) kein Amyloid auf.

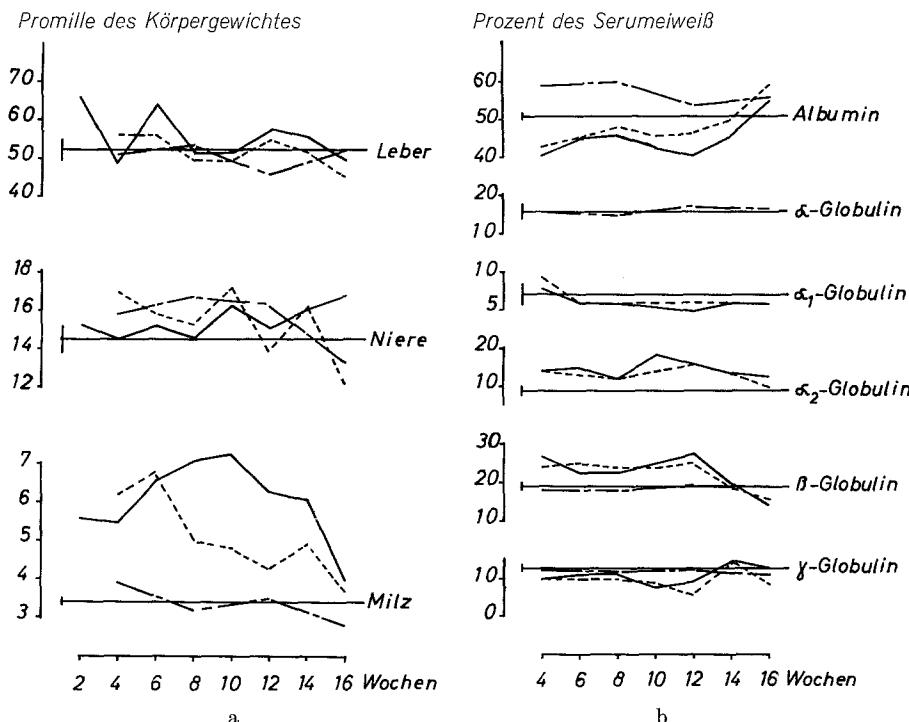


Abb. 1 a u. b. Verhalten des Leber-, Milz- und Nierengewichtes sowie des Serumweißes der Maus bei parenteraler Zufuhr von FITC-Chs (—), nichtmarkiertem Chondroitinsulfat (---) und FITC-Lösung (— · —). a Leber-, Nieren- und Milzgewicht; b Serumweiße. \longrightarrow : Mittelwert der Kontrollen

Das Milzgewicht stieg bei den Chondroitinsulfat-behandelten Mäusen in den ersten Wochen erheblich an und nahm in den folgenden Wochen weiter zu. Erst mit dem Auftreten von Amyloidablagerungen sank das Milzgewicht wieder etwas ab. An den übrigen Organen traten keine signifikanten Gewichtsveränderungen auf. Bei den FITC-behandelten Mäusen wies die Milz im Laufe des Versuches einen leichten Gewichtsverlust auf, während das Nierengewicht zunahm (Abb. 1 a).

Die elektrophoretischen Untersuchungen ergaben bei beiden Gruppen der Chondroitinsulfat-behandelten Mäuse in den ersten Wochen einen Anstieg der β -Globuline, später sanken diese Werte wieder zur Norm ab. In den letzten Wochen kam es zu einer Vermehrung der α_2 -Globuline. Die übrigen Serumkomponenten ließen gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Abweichungen erkennen. Bei den mit FITC-behandelten Tieren fanden sich keine derartigen Serumveränderungen (Abb. 1 b). Bei der Agargelldiffusion ließen sich keine gegen FITC-Chs oder nicht markiertes Chondroitinsulfat gerichtete Antikörper nachweisen.

Bei den Tieren, die FITC-markiertes Chondroitinsulfat erhielten, bestand in den Nieren während der ganzen Versuchsdauer eine leuchtende Grünfluoreszenz der Hauptstückepithelien; sie färbten sich jedoch mit Alcianblau oder der Hale-schen Reaktion nicht an (Abb. 2).

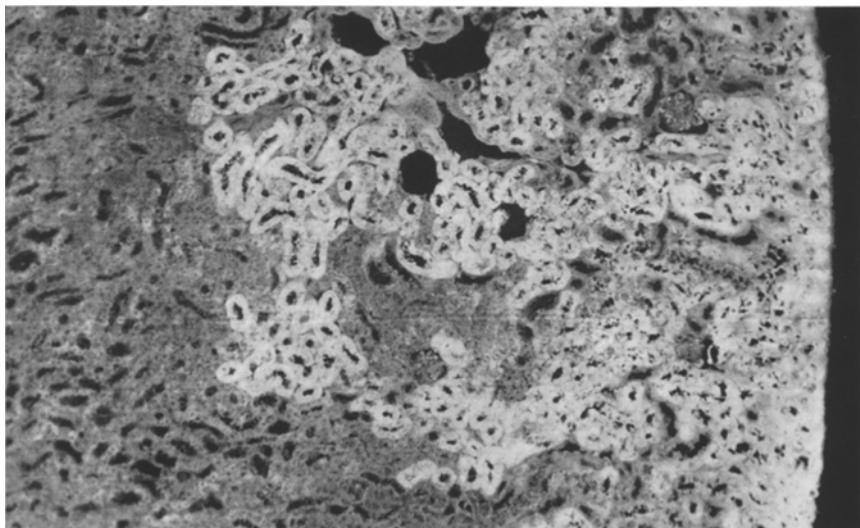


Abb. 2. Fluorescenz der Niere bei FITC-Chs-behandelten Mäusen (70fach)

In der *Leber* stellten sich bereits bei den Kontrollen in den Sternzellen mitunter schwach alcianophile Substanzen dar, die sich mit der kolloidalen Eisenreaktion sowie dem PAS-Reagens anfärbten und eine schwache grüne Eigenfluorescenz aufwiesen. Nach Zufuhr von FITC-Chs trat schon in den ersten Wochen eine erhebliche Zunahme und eine verstärkte Anfärbung der Alcianblau-, Hale- und PAS-positiven sowie grünfluoreszierenden Sternzellen auf. Zudem bildeten die Sternzellen von der 4. Woche an mehrkernige Riesenzellen, die sich stark mit Alcianblau, der kolloidalen Eisenreaktion sowie dem PAS-Reagens anfärbten und eine intensive Gelbgrün-Fluorescenz aufwiesen (Abb. 3). Weiterhin speicherten die Sternzellen und die Riesenzellen im weiteren Verlauf der Untersuchung in zunehmendem Maße ein bräunliches nicht fluoreszierendes Pigment. Schließlich fanden sich während der gesamten Versuchsdauer in den Acini herdförmige und in den periportalen Feldern diffuse Infiltrate, die sich überwiegend aus pyroninophilen Zellen aufbauten, daneben aber hin und wieder ein- und mehrkernige Makrophagen einschlossen, die gelbgrün fluoreszierende Alcianblau-, Hale sowie PAS-positive Einschlüsse enthielten.

Bei den Tieren, welche unmarkiertes Chondroitinsulfat erhielten, wiesen die Lebern ähnliche Veränderungen auf. Allerdings war die Fluorescenz der Stern- und Riesenzellen etwas weniger ausgeprägt; weiterhin fehlte in diesen Zellen das bräunliche Pigment, welches bei den mit FITC-Chs behandelten Tieren gefunden wurde.

Bei den FITC-behandelten Tieren kam es in den letzten Wochen zu einer geringen Hyperplasie der Sternzellen, die sodann auch eine leicht verstärkte Alcianophilie und Grünfluorescenz aufwiesen. Riesenzellen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die *Milz* zeigte bei den Chondroitinsulfat-behandelten Mäusen entsprechend der Gewichtszunahme eine Hyperplasie der roten Pulpa, die auf einer Vermehrung

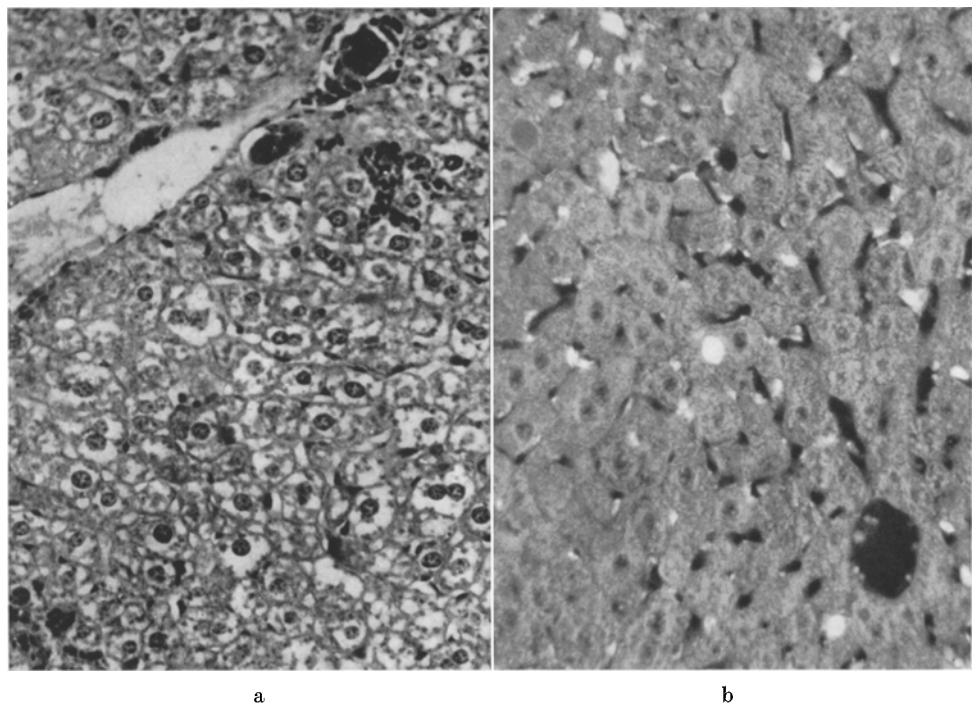


Abb. 3 a u. b. Speicherung des Chondroitinsulfates in den Sternzellen der Leber unter Ausbildung von Riesenzellen. a Kolloidale Eisenreaktion nach Hale (ca. 200fach). b Fluorescenz (ca. 200fach)

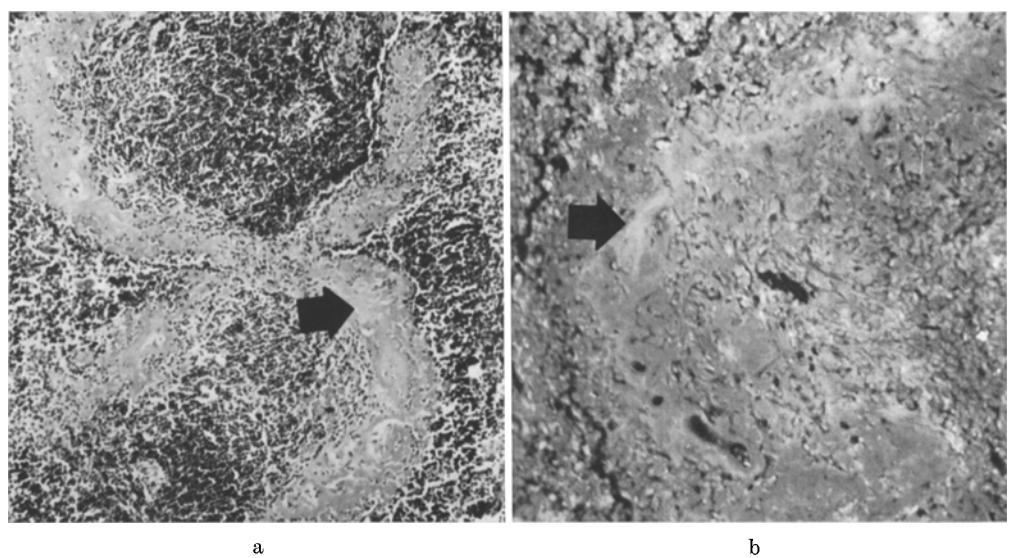


Abb. 4 a u. b. Farbreaktionen des Milzamyloid (Pfeil) bei FITC-Chs-behandelten Mäusen. a Kolloidale Eisenreaktion nach Hale (ca. 80fach). b Fluorescenz (ca. 140fach)

vorwiegend der pyroninophilen Zellen beruhte. Sowohl bei den Kontroll- wie den Versuchstieren fanden sich in der Milzpulpa Mastzellen, die eine starke gelbgrüne Fluorescenz aufwiesen und sich mit Alcianblau sowie der kolloidalen Eisenreaktion anfärbten. Zudem ließen sich vereinzelt Reticulumzellen nachweisen, die eine gleichartige Anfärbung und Fluorescenz zeigten. Eine Vermehrung dieser Zellen lag weder bei mit den FITC-Chs und unmarkierten Chondroitinsulfat noch bei den FITC-behandelten Tieren vor. Auch traten niemals weitere Alcianblau-positive, fluoreszierende Zellen auf. Schließlich fanden sich in gleicher Weise bei den Kontroll- und auf den Versuchstieren in der roten Pulpa Reticulumzellen, die ein gelbrot fluoreszierende, braunes Pigment enthielten, das sich mit Sudanrot und der Hale-Reaktion anfärbte.

Die Amyloidablagerungen entstanden perifollikulär. Sie färbten sich nicht oder schwach mit Alcianblau, leicht mit der kolloidalen Eisenreaktion und stark mit dem PAS-Reagens an. Bei den FITC-Chs behandelten Tieren wiesen sie in den zentralen Anteilen eine schwache gelbgrüne Fluorescenz auf, während sich die Randabschnitte im ultravioletten Licht nicht darstellten (Abb. 4).

Eine Behandlung der Schnittpräparate mit Hyaluronidase setzte die Färbbarkeit mit Alcianblau und der Hale-Reaktion sowohl in den Stern- und Riesenzellen der Leber als auch in den Amyloidablagerungen der Milz herab; in gleicher Weise wirkte Neuraminidase. Aber auch nach Inkubation mit Neuraminidase und Hyaluronidase wiesen die Schnitte noch eine, wenn auch erheblich verminderte Anfärbung mit Alcianblau und der kolloidalen Eisenreaktion sowie eine geringe Grünfluorescenz auf.

Ein gleichartiges Verhalten wiesen die Amyloidablagerungen auf, die durch eine parenterale Caseinzufuhr induziert wurden.

An den Injektionsstellen ließen sich niemals wesentliche entzündliche Veränderungen nachweisen, insbesondere traten niemals einschmelzende Prozesse auf.

Besprechung der Ergebnisse

Ebenso wie Cessi und Serafini-Cessi gelang es uns, bei Mäusen durch parenterale Zufuhr von Chondroitinsulfat eine Amyloidose hervorzurufen.

Während der gesamten Versuchsdauer sahen wir bei den FITC-Chs behandelten Mäusen eine intensive Grünfluorescenz der Nierenhauptstückepithelien. Weiterhin fand eine Phagocytose des Chondroitinsulfats in den Kupfferschen Sternzellen der Leber statt, wobei der FITC-Anteil des markierten Chondroitinsulfats zu einem bräunlichen, nicht fluoreszierenden Pigment abgebaut wurde. Demgegenüber ließ sich in der Milz keine Phagocytose von Chondroitinsulfat nachweisen.

Unsere Untersuchungen bestätigen also die Befunde von Boas (1965), nach denen parenteral zugeführtes Chondroitinsulfat zum Teil über die Nieren ausgeschieden wird. Zudem machen sie deutlich, daß überdies ein Abbau des Chondroitinsulfats im RES vornehmlich der Leber erfolgt.

Unter der Chondroitinsulfat-Behandlung kam es zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Milz, die im wesentlichen auf einer Hyperplasie der roten Pulpa mit einer Vermehrung der pyroninophilen Zellen beruhte. Auch in der

Leber ließen sich vermehrt pyroninophile Zellen nachweisen. Die Serumweiße wiesen zu Beginn eine Vermehrung der β -, später der α_2 -Globuline auf.

Bei unseren Untersuchungen traten also gleichartige Serum- und Organveränderungen auf, wie sie bei der experimentellen Amyloidose generell gesehen werden (Schneider, 1964; Cohen, 1965; Zschiesche, 1967).

Die Amyloidablagerungen enthielten geringe Mengen an sauren Mucoproteiden und wiesen bei den FITC-Chs-behandelten Mäusen eine leichte Grünfluoreszenz auf. Ein gleichartiges Verhalten boten aber Amyloidablagerungen, die bei Mäusen durch eine Behandlung mit Casein erzeugt wurden. Die histochemisch nachweisbaren sauren Mucoproteide waren vermindert, wenn die Schnitte mit Hyaluronidase oder/und Neuraminidase behandelt wurden, verschwanden aber nicht völlig. In gleicher Weise nahm die grüne Eigenfluoreszenz des Amyloid ab.

Im Amyloid sind also, wie bereits Battaglia und Matturi (1964) zeigen konnten, sowohl Sialoproteide als auch Hyaluronidase-empfindliche (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat A und C) und Hyaluronidase-resistente (Chondroitinsulfat B, Heparitinsulfat, Heparin, Chondroitin) saure Mucopolysaccharide gebunden.

Unsere Untersuchungen lassen erkennen, daß parenteral zugeführtes Chondroitinsulfat — wenn überhaupt — nur in kleiner Menge im Amyloid gebunden wird. Ein gleich großer Gehalt an sauren Mucopolysacchariden läßt sich jedoch in Amyloidablagerungen nachweisen, welche durch eine parenterale Caseinzufuhr induziert wurden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß das Chondroitinsulfat des Serums eine wesentliche Rolle bei der Bildung des Amyloids spielt. Vielmehr scheint das parenteral zugeführte Chondroitinsulfat — ähnlich wie das Casein — eine unspezifische Reaktion auszulösen, in deren Verlauf Amyloidablagerungen auftreten.

Eine extracelluläre Entstehung des Amyloids läßt sich aufgrund dieses Befundes nach wie vor nicht ausschließen. Zudem konnte Kennedy (1962) zeigen, daß die im Amyloid gebundenen sauren Mucoide aus den Endothelzellen stammen; auch scheint nach Untersuchungen von Bitter und Muir (1966) weniger dem Chondroitinsulfat als vielmehr dem Heparitinsulfat eine Bedeutung für die Entstehung des Amyloids zuzukommen.

Für technische Hilfe danke ich Frl. G. Büsing.

Literatur

- Battaglia, S., Matturi, L.: Istochemica della sostanza amiloide sperimentale. Riv. istoch. norm. pat. 10, 5—45 (1964).
- Bitter, Th., Muir, H.: Mucopolysaccharides of whole human spleens in generalised amyloidosis. J. clin. Invest. 45, 963—975 (1966).
- Boas, N. F.: Amino sugars-containing components in urine. In: E. A. Balazs and R. W. Jeanloz, the aminosugars, vol. IIa, p. 95—115. New York and London: Academic Press 1965.
- Cohen, A. S.: The constitution and genesis of amyloid. Int. Rev. exp. Path. 4, 159—243 (1965).
- Gedigk, P., Totović, V.: Biologische Strukturen. I. Histochemische Methoden, In: H. M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, 2 Aufl., Bd. 5. II, 437—494, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer, 1964.
- Janigan, D. T., Druet, R. L.: Experimental murine amyloidosis in X-irradiated recipients of spleen homogenates or serum from sensitized donors. Amer. J. Path. 52, 381—390 (1968).

- Kennedy, J. S.: Sulphur 35 in experimental amyloidosis. *J. Path. Bact.* **83**, 165—181 (1962).
- Letterer, E.: Zur Problematik der Amyloidose. *Path. et Microbiol. (Basel)* **27**, 782—791 (1964).
- Nairn, R. C.: Fluorescent protein tracing. Edinburgh and London: Livingstone, 1962.
- Schmitz-Moormann, P.: Zur Biochemie des Amyloid. *Virehows Arch. path. Anat.* **339**, 45—52 (1965).
- Schneider, G.: Über die Pathogenese der Amyloidose. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **44**, 1—102 (1964).
- Teilum, G.: Pathogenesis of amyloidosis: The two-phase cellular theory of local secretion. *Acta path. microbiol scand.* **61**, 21—45 (1964).
- Teller, W., Ziemann, A.: Die säulenchromatographische Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide im Harn. *Klin. Wschr.* **44**, 1142—1147 (1966).
- Zschiesche, W., Ghatak, S.: Stammesabhängige Unterschiede der experimentellen Amyloidose und ihrer Serumreaktionen bei der Maus. *Frankfurt Z. Path.* **75**, 164—171 (1966).

Priv.-Doz. Dr. med. P. Schmitz-Moormann
355 Marburg
Robert Koch-Str. 5
Pathologisches Institut