

Veränderungen an der glomerulären Basalmembran des Meerschweinchens durch Fremdinsulin und ihre Beziehung zur Höhe der Insulin-Bindungsfähigkeit des Serums* **

H. WEHNER, U. SCHADE und F. ASANTE

Pathologisches Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. A. Bohle)

Eingegangen am 29. Juli 1969

Changes at the Basement Membrane of the Glomerulus of the Guinea Pig Caused by Foreign Insulin; Their Relation to Size of Insulin-Binding-Capacity of Serum

Summary. In experiments with insulin-immunized guinea pigs deposits could be observed, on the epithelial side of the glomerular basement membrane that were directly related to the height of insulin antibody titer. These deposits resembled the "humps", that have been assumed to be pathognomonic for acute diffuse poststreptococcal glomerulonephritis.

Zusammenfassung. In Experimenten mit insulinimmunisierten Meerschweinchen wurden an der epithelialen Seite der glomerulären Basalmembran Depots beobachtet, die in deutlich erkennbarer Abhängigkeit zur Höhe des Insulinantikörpertiters standen. Diese Depots, die den „humps“ ähnlich sind, welche als pathognomonisch für die akute diffuse Poststreptokokkenglomerulonephritis gelten, werden für Antigen-Antikörperkomplexe gehalten.

Nach den Untersuchungen von Kimmelstiel und Beres (1962), Osawa, Beres und Kimmelstiel (1966) und Kimmelstiel, Osawa und Beres (1967) gelten Veränderungen an der epithelialen Seite der glomerulären Basalmembran in Form kleiner homogener elektronendichter Depots, sog. „humps“, als spezifisch für die akute diffuse Poststreptokokkenglomerulonephritis. Diese „humps“, die auch von anderen Autoren bei akuter diffuser Glomerulonephritis beobachtet worden sind (Movat u. Mitarb., 1962; McCluskey und Baldwin, 1963; Strunk u. Mitarb., 1964; Pirani und Pollak, 1967; Hamburger u. Mitarb., 1966; Jennings, 1967; Bohle und Wehner, 1968), sollen nach Kimmelstiel u. Mitarb. (1967) in fünf Variationen vorkommen.

In Untersuchungen an insulinimmunisierten Meerschweinchen, die anderen Fragestellungen galten, konnten wir an der Basalmembran bei lichtmikroskopischer Betrachtung Depots beobachten, die den „humps“ ähnlich waren. Da derartige Depots an der Basalmembran von anderen Autoren unter ähnlichen experimentellen Bedingungen nicht beschrieben worden sind (Goth u. Mitarb., 1959; Grieble, 1960; Mohos u. Mitarb., 1963; Ditscherlein u. Mitarb., 1967), in

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Mit technischer Assistenz von Fräulein S. Helber und Fräulein U. Lendzian.

** Nach einem Vortrag auf dem Gemeinsamen Symposium der deutschsprachigen und französisch sprechenden Gesellschaften für Nephrologie in Straßburg (Frankreich) 1969.

unseren Experimenten darüber hinaus Beziehungen zwischen der Höhe des Insulinantikörpertiters und der Entwicklung der „humps“ zu bestehen scheinen, seien die Ergebnisse kurz mitgeteilt.

Material und Methodik

50 männliche Meerschweinchen (Gewicht 350—500 g) wurden durch subcutane Injektion (2—4 E/Tag) mit reinem Rinderinsulin immunisiert. Amorphes Rinderinsulin (10 mg) war in 5 ml n/100 HCl aufgelöst und mit 6 ml m/15 Phosphatpuffer (pH 7,5) sowie 1,5 ml normalem Meerschweinchenserum neutralisiert worden (der Firma Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt, danken wir für die freundliche Überlassung des Insulins). Zur Vermeidung hypoglykämischer Zustände, die vor allem in den ersten Versuchstagen auftraten, bekamen die Meerschweinchen hochprozentige wässrige Glucoselösung zu trinken.

Der Antikörpertiter, ausgedrückt durch die apparetive Insulinbindungskapazität (IBC) des Serums, wurde bestimmt nach der Methode von Lohss und Kallee (1961) bzw. Kallee, Debiasi und D'Addabbo (1963) mit Agar-Gelektrophorese und Autoradiographie¹. Dabei wurden die Seren mit 10 mg ¹³¹I-Rinderinsulin (Farbwerke Hoechst) versetzt und nach der Elektrophorese mit einem Dünnenschicht-Scanner (LB 2721, Berthold, Wildbad) die Radioaktivitätsverteilung gemessen. Die Bestimmung der IBC erfolgte stets 14—16 Std nach der letzten Insulininjektion, um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen (Schade und Wehner, 1969). Wir verfolgten die Antikörperbildung über einen Zeitraum von maximal 100 Tagen. Die IBC jedes Meerschweinchens wurde mindestens einmal bestimmt (bei der Tötung), bei einigen Stichproben erfolgte eine Verlaufskontrolle durch Herzpunktion.

Um die Häufigkeit der glomerulären Basalmembrandepots und ihre Beziehungen zur IBC bestimmen zu können, untersuchten wir 50 Glomerula von jeweils 3—5 Meerschweinchen zu verschiedenen Zeitpunkten (16, 23, 25, 31, 33, 49, 52, 59 und 100 Tage) nach Beginn der Immunisierung. Als Kontrollen dienten Nieren von normalen Meerschweinchen und solchen, die nur das Insulinlösungsmedium erhalten hatten.

Die histologischen Untersuchungen wurden an 0,5 μ dicken, nach Movat versilberten Schnitten nach Einbettung in Methacrylat durchgeführt.

Ergebnisse

Neben einer Vermehrung ortständiger glomerulärer Zellen zeigen die Nieren der insulinimmunisierten Meerschweinchen bereits 16 Tage nach dem Immunisierungsbeginn z.T. pilzartige, z.T. strangförmige Depots an der äußeren Seite der Basalmembran, die in der Silberfärbung braunschwarz erscheinen. Diese Depots können sporadisch aber auch in größerer Anzahl entlang der Basalmembran auftreten. Ihre Größe variiert zwischen $0,6 \times 0,8 \mu$ und $1,5 \times 2,5 \mu$. Sie liegen zwischen den Epithelzellen und der Basalmembran, ohne von der Basalmembran abgrenzbar zu sein (Abb. 1). In Gebieten mit sog. „humps“ beobachteten wir gelegentlich Fragmente derartiger Depots im Cytoplasma der Epithelzellen (Abb. 2). Die beschriebenen Veränderungen konnten wir bei den Kontrolltieren nicht beobachten.

Im einzelnen fanden wir Depots 16 Tage nach Beginn der Immunisierung in 22% der Glomerula. Ihre Häufigkeit nimmt bis zum 60. Tag zu, später (nach dem 60. Tag) wieder ab. Am 100. Tag nach Immunisierungsbeginn sind sie nur noch in 4% der Glomerula zu finden (Abb. 3). Die Antikörper gegen das Fremdinsulin zeigen ein ähnliches Verhalten. Sie sind erstmals am 13. Versuchstag nachweisbar. Den höchsten Antikörpertiter beobachteten wir nach $3\frac{1}{2}$ Wochen (IBC von 7,6 μ g Insulin/ml) (Abb. 3). In den folgenden Wochen fiel der Antikörpertiter auf

¹ Wir danken Herrn Prof. Kallee, Isotopenabteilung der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, für zahlreiche Ratschläge.

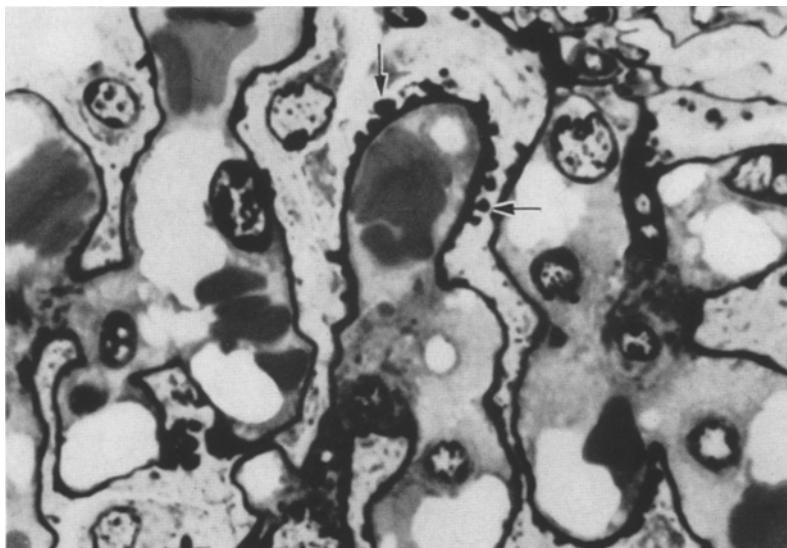


Abb. 1. Glomerulum aus der Niere eines mit Rinderinsulin über 25 Tage immunisierten Meerschweinchens. Zahlreiche „humps“-ähnliche Protuberanzen auf der Außenseite der Basalmembran, insbesondere in peripheren Gebieten (Pfeile). Dünnschnitt 0,5 μ . Silberfärbung nach Movat. 2200:1

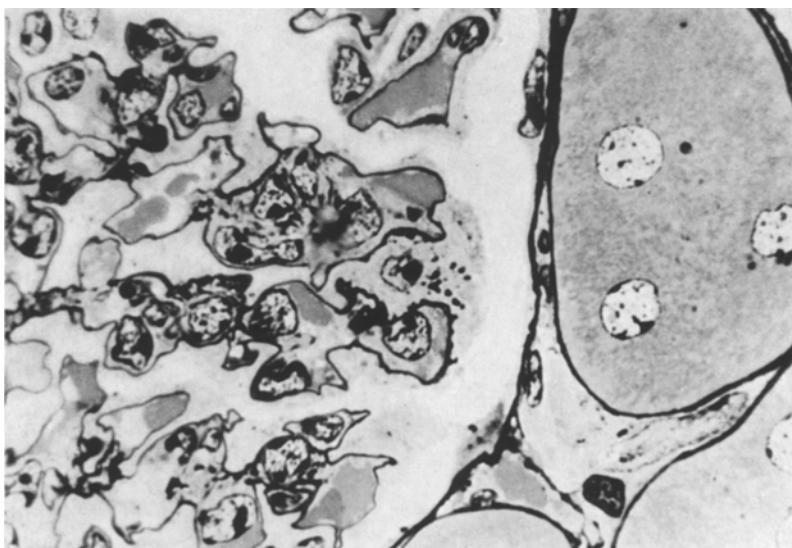


Abb. 2. Glomerulum aus der Niere eines über 59 Tage mit Rinderinsulin immunisierten Meerschweinchens. Im Cytoplasma einzelner Epithelzellen nahe der Depots dunkelbraunes Material (Depotfragmente). Dünnschnitt 0,5 μ . Silberfärbung nach Movat. 1400:1

eine IBC von etwa 0,5 μ g Insulin/ml ab (Abb. 3). Bei den Kontrolltieren beobachteten wir keine Insulinbindungsfähigkeit der Serumgammaglobuline.

Die Depots erscheinen somit in unseren Experimenten 3 Tage nach den ersten nachweisbaren Antikörpern und nehmen schnell an Häufigkeit zu, wenn eine

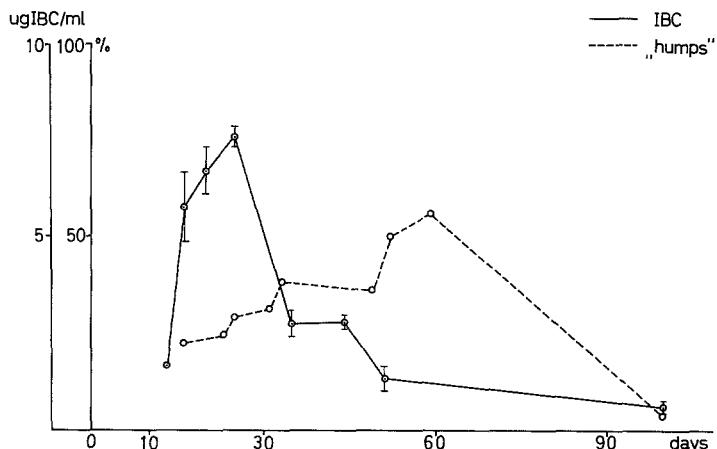


Abb. 3. Beziehung zwischen der Höhe der Insulinbindungs kapazität (IBC) des Serums und der Häufigkeit von Glomerula mit „humps“-ähnlichen Strukturen nach Immunisierung mit Rinderinsulin über verschiedene Zeitabschnitte. Die Mittelwerte der IBC ergaben sich durch die Bestimmung bei jeweils 5 getöteten Meerschweinchen. Die Standardabweichungen sind als vertikale Striche eingetragen

größere Menge zirkulierender Antikörper gebildet ist, so daß zwischen dem 35. und dem 60. Tag nach Beginn der Immunisierung bis über 50% der Glomerula diese Veränderungen aufweisen. Mit Abnahme der zirkulierenden Antikörper fällt andererseits die Zahl der „humps“ ab (Abb. 3).

Diskussion

Überblicken wir die Ergebnisse dieser Untersuchungen, so ergibt sich, daß in Abhängigkeit von der Antikörperbildung gegen Fremdinsulin an der epithelialen Seite der glomerulären Basalmembran von Meerschweinchen versilberbare Depots auftreten. Zwischen diesen Depots und den von Kimmelstiel u. Mitarb. beschriebenen „humps“ bestehen insofern Beziehungen, als sie wie letztere in zeitlicher Abhängigkeit von der Antikörperbildung entstehen (Andres u. Mitarb., 1963; Seegal u. Mitarb., 1965; Mellors, 1965, 1966; Michael u. Mitarb., 1966; Herdson u. Mitarb., 1966; Gallo u. Mitarb., 1968). Darüber hinaus handelt es sich bei den „humps“ wie bei den von uns beobachteten Depots um passagere Ablagerungen auf der Basalmembran der Glomerulumcapillaren im Gegensatz zu den Eiweißpräcipitaten bei der perimembranösen Glomerulonephritis. Ähnlichkeiten ergeben sich weiterhin hinsichtlich der Lokalisation (Feldmann, 1958; Strunk u. Mitarb., 1964; Dixon, 1967; Kimmelstiel u. Mitarb., 1967), der Größe (Jennings, 1967) und dem Zeitpunkt ihres Auftretens (Jennings, 1967). Wir möchten daraus schließen, daß es sich bei den von uns beobachteten Veränderungen wie bei den „humps“ um unlösliche Antigen-Antikörperkomplexe handelt. Die typischen „humps“ der akuten Glomerulonephritis erscheinen bei der von uns angewandten Färbung als mittelbraune, kleine, schmale Höcker an der Außenseite der glomerulären Basalmembran. Sie sind somit nicht so stark versilberbar wie die von uns beobachteten Depots. Es ist indessen möglich, daß dieses unterschiedliche farberische Verhalten durch speciesspezifische Eigenheiten der Eiweißstruktur

oder durch die Besonderheiten des verwendeten Antigens Insulin (Michielsen, 1969) bedingt ist.

Unsere Beobachtungen zeigen im übrigen große Ähnlichkeit mit Befunden von Miller und Bohle (1956) und Churg (1967), die derartige „humps“ beim Caseinamyloid der Maus bzw. bei der Lupusnephritis beobachtet haben.

Literatur

- Andres, G. A., Seegal, B. C., Hsu, K. C., Rothenberg, M. S., Chapeau, M. L.: Electron microscopic studies of experimental nephritis with ferritin-conjugated antibody. *J. exp. Med.* **117**, 691—704 (1963).
- Bohle, A., Wehner, H.: Versuch einer Systematik der Glomerulonephritis anhand von Nierenbiopsien. VI. Symp. der Ges. f. Nephrologie, Wien 1968, p. 335—369. Wien: Verl. d. Wiener med. Akademie 1969.
- Churg, J.: Disc. to Jennings, p. 128, in Metcoff: Acute glomerulonephritis. London: J. & A. Churchill Ltd. 1967.
- Ditscherlein, G., Marx, I., Dena, R.: Elektronenmikroskopische Befunde am Kaninchenglomerulum nach 1½—2jähriger Insulinmedikation. *Exp. Path.* **1**, 165—176 (1967).
- Dixon, F. J.: The pathogenesis of immunologically induced nephritis. Proc. 3rd int. Congr. Nephrol., Washington 1966, vol. 2, p. 97—112. Basel and New York: Karger 1967.
- Faith, G. C., Trump, B. F.: The glomerular capillary wall in human kidney disease: acute glomerulonephritis, systemic lupus erythematosus, and preeclampsia-eclampsia. Comparative electron microscopic observations and a review. *Lab. Invest.* **15**, 1682—1719 (1966).
- Feldman, J. D.: Electron microscopy of serum sickness nephritis. *J. exp. Med.* **108**, 957—962 (1958).
- Gallo, G. E., Herdson, P. B., Potter, E. V.: Immunofluorescent localization of globulin deposits in relation to human glomerular basement membranes. *Brit. J. exp. Path.* **49**, 272—276 (1968).
- Goth, A., Lengyel, L., Savely, C.: Nierenläsionen durch Insulin- und Glucoseverabreichung bei der Ratte. In: Diabetes mellitus, S. 194—197. III. Congr. int. Diabetes Fed. 1958. Stuttgart: Thieme 1959.
- Grieble, H. G.: Renal lesions induced by heterologous insulin: an example of foreign protein nephritis. *J. Lab. clin. Med.* **56**, 819—820 (1960).
- Hamburger, J., Richet, G., Crozier, J., Funck-Brentano, J. L., Antoine, B., Ducrot, H., Mery, J. P., Montera, H.: Néphrologie. In: Collection médico-chirurgicale à révision annuelle, p. 872—874. Paris: Flammarion 1966.
- Herdson, P. B., Jennings, R. B., Earle, D. P.: Glomerular fine structure in poststreptococcal acute glomerulonephritis. *Arch. Path.* **81**, 117—128 (1966).
- Jennings, R.: Pathology and natural history of acute glomerulonephritis, in: Acute glomerulonephritis by J. Metcoff, p. 101—121. London: J. & A. Churchill Ltd. 1967.
- Kallee, E., Debiasi, S., D'Addabbo, A.: Studies on ^{131}I -labelled insulin. VI. Immunological experiments on the binding of ^{131}I -insulin to serum proteins of normal, analbuminemic, and insulin-treated subjects. *Acta isotop.* **3**, 239 (1963).
- Kimmelstiel, P., Kim, O. J., Beres, J.: Studies on renal biopsy specimens with the aid of the electron microscopy. II. Glomerulonephritis and glomerulonephrosis. *Amer. J. clin. Path.* **38**, 280—296 (1962).
- Osawa, G., Beres, J.: Some glomerular changes by electron microscopy with predominant mesangial reaction. Proc. 3rd int. Congr. Nephrol., Washington 1966, vol. 2, p. 17—32. Basel and New York: Karger 1967.
- Lohss, F., Kallee, E.: Immunological detection of the binding of ^{59}Fe ascorbate, ^{131}I -thyroxine and ^{131}I -insulin to serum proteins. In: Protides of the biological fluids (H. Peeters, ed.). Proc. 8th Coll., Bruges 1960, p. 142—146. Amsterdam: Elsevier 1961.
- McCluskey, R. T., Baldwin, D. S.: Natural history of acute glomerulonephritis. *Amer. J. Med.* **35**, 213—230 (1963).
- McGiven, A. R., Lynraven, G. S.: Glomerular lesions in NZB/NZW mice. *Arch. Path.* **85**, 250—261 (1968).

- Mellors, R. C.: Autoimmune disease in NZB/BL mice. I. Pathology and pathogenesis of a model system of spontaneous glomerulonephritis. *J. exp. Med.* **122**, 25—40 (1965).
- Autoimmune disease in NZB/BL mice. III. Induction of membranous glomerulonephritis in young mice by the transplantation of spleen cells from old mice. *J. exp. Med.* **123**, 1025—1034 (1966).
- Michael, A. F., Drummond, K. N., Good, R. A., Vernier, R. L.: Acute poststreptococcal glomerulonephritis: immune deposit disease. *J. clin. Invest.* **45**, 237—248 (1966).
- Michelsen, P.: Persönliche Mitteilung, 1969.
- Miller, F., Bohle, A.: Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Basalmembran der Glomerulumkapillaren der Maus bei experimentellem Nierenamyloid. *Klin. Wschr.* **34**, 1204—1210 (1956).
- Mohos, S. C., Hennigar, G. R., Fogelman, J. A.: Insulin-induced glomerulosclerosis in the rabbit. *J. exp. Med.* **118**, 667—680 (1963).
- Movat, H. Z., Steiner, J. W., Huhn, D.: The fine structure of the glomerulus in acute glomerulonephritis. *Lab. Invest.* **11**, 117—135 (1962).
- Osawa, G., Beres, J., Kimmelstiel, P.: Glomerulonephritis. Observations by light and electron microscopy. *Amer. J. clin. Path.* **46**, 295—304 (1966).
- Pirani, C. L., Pollak, V. E.: Longitudinal studies of renal biopsies. Proc. 3rd int. Congr. Nephrol., Washington 1966, vol. 2, p. 212—224. Basel and New York: Karger 1967.
- Schade, U., Wehner, H.: Der Einfluß von Insulin auf die Insulinbindungskapazität des Serums insulinsensibilisierter Meerschweinchen. *Klin. Wschr.* **47**, 438—439 (1969).
- Seegal, B. C., Andres, G. A., Hsu, K. C., Zabriskie, J. C.: Studies on the pathogenesis of acute and progressive glomerulonephritis in man by immunofluorescein and immuno-ferritin techniques. *Fed. Proc.* **24**, 100—108 (1965).
- Strunk, S. W., Hammond, W. S., Benditt, E. P.: The resolution of acute glomerulonephritis. An electron microscopic study of four sequential biopsies. *Lab. Invest.* **13**, 401—429 (1964).

Dr. med. H. Wehner
Ursula Schade
Dr. med. F. Asante
Pathologisches Institut der Universität
74 Tübingen (Neckar), Liebermeisterstr. 8