

## Glomeruläre Veränderungen nach Immunisierung mit heterologem Insulin\* \*\*

H. WEHNER, U. SCHADE, E. LIEBERMEISTER und J. VEIGEL

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

Eingegangen am 22. Dezember 1969

### *Glomerular Changes Induced by Immunization with Heterologous Insulin*

**Summary.** In a blind-experiment with semi-thin sections we explored quantitatively the glomerular changes (mesangial volume, number of glomerular-cells, "index of diabetic glomerular lesions") in 35 guinea pigs after immunizing them with pure beef insulin for 24—150 days. We determined the proteinuria, the serum-levels of the antibody-titer against insulin (insulin-binding capacity) and the levels of cholesterol, urea and albumin. After prolonged immunization the mesangial cells increased 57%. We found a decrease of the epithelial cells, and an increase of the mesangial volume to 12.4%, sporadically of a nodular character. The "index of diabetic glomerular lesions" decreased. Antibodies against heterologous insulin were demonstrable in every phase of immunization. After initial changes the other serum levels (urea, albumin) returned to normal. The level of serum-cholesterol increased late in immunization.

The immunization with heterologous insulin resulted in a proliferation of glomerular cells like in a proliferative intercapillary glomerulonephritis. These changes resembled morphologically the lesions of nodular diabetic glomerulosclerosis and was caused by a functional disorder and injury of the mesangium.

**Zusammenfassung.** An 35 Meerschweinchen wurden nach Immunisierung mit reinem Rinderinsulin über 24—150 Tage die glomerulären Nierenveränderungen im Blindversuch an Semidünnschnitten quantitativ untersucht (Mesangiumvolumen, glomeruläre Zellzahl, „Index of diabetic glomerular lesions“) und, neben der Proteinurie, im Serum die Höhe des Antikörpertiters gegen Insulin (Insulinbindungskapazität) und der Cholesterin-, Harnstoff- und Albuminspiegel bestimmt. Mit zunehmender Dauer der Immunisierung kommt es zu einer Vermehrung der Mesangiumzellen um 57% gegenüber der Norm, zu einer Abnahme der Deckzellen, zu einer Verbreiterung des Mesangiums auf 12,4%, so daß stellenweise noduläre Mesangiumverbreiterungen beobachtet werden. Der IDGL nimmt gegenüber der Norm ab. Antikörper gegen das heterologe Insulin sind in jeder Phase der Immunisierung nachweisbar, während bei den übrigen Serumwerten (Harnstoff, Albumin) nach anfänglichen Veränderungen aller Werte eine spätere Normalisierung eintritt. Der Serumcholesterinspiegel ist auch in den Spätstadien der Immunisierung erhöht. Es kommt somit nach Immunisierung mit heterologem Insulin zu einer Proliferation ortsständiger glomerulärer Zellen im Sinne einer proliferativen intercapillären Glomerulonephritis, die morphologisch an die noduläre diabetische Glomerulosklerose erinnert und deren Ursache in einer Schädigung und funktionellen Störung des Mesangiums zu sehen ist.

Ätiologie und Pathogenese der diabetischen Glomerulumveränderungen sind auch heute noch unklar (Ditscherlein, 1969). Es ist zwar u.a. immer wieder diskutiert worden, ob im Rahmen der Pathogenese dieser Veränderungen

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Mit technischer Assistenz von Frl. S. Helber und Frl. R. Schnösenberg.

\*\* Nach einem Vortrag auf dem IVth International Congress of Nephrology, Stockholm, Schweden, 23. 6. 69.

immunologische Prozesse eine Rolle spielen (Bertram, 1947; Thiel, 1956; Freedman u. Mitarb., 1960; Farrant u. Shedd, 1965). Die Frage der Pathogenität des Insulins und seiner Antikörper ist indessen bis heute noch nicht ausreichend geklärt (Deckert, 1967; Pfeiffer u. Mitarb., 1969), obwohl einzelne licht-, elektronen- und immunfluoreszenzmikroskopische Befunde über glomeruläre Veränderungen nach Insulingabe vorliegen (Grieble, 1960; Mohos u. Mitarb., 1963; Blumenthal u. Mitarb., 1965; Ditscherlein u. Mitarb., 1967; Mancini u. Mitarb., 1969).

Da in diesen Untersuchungen auf eine genaue quantitative Analyse der morphologischen Veränderungen verzichtet wurde, die Fragwürdigkeit eindrucks-mäßiger Beurteilung vor allem diskreter Befunde aber bekannt ist, versuchten wir bei Meerschweinchen durch quantitative Analysen der glomerulären Veränderungen zu klären, welche morphologischen Schäden durch Insulin in den Glomerula entstehen.

### Material und Methodik

35 männliche Meerschweinchen (Gewicht 350—500 g) wurden durch subcutane Injektion (2—4 E/Tag) mit gelöstem reinem Rinderinsulin in früher beschriebener Weise immunisiert (Wehner u. Mitarb.<sup>1</sup> 1969). Die immunisierten Tiere entbluteten wir in Gruppen von 5—15, jeweils 24, 50, 80 und 150 Tage nach Beginn der Immunisierung, entnahmen die Nieren und bestimmten im Serum folgende Werte:

1. Den Insulinantikörpertiter, ausgedrückt durch die apparetive Insulinbindungskapazität (IBC) des Serums, nach der Methode von Lohss und Kallee (1961) bzw. Kallee, Debiasi und D'Addabbo (1963) mit Agar-Gelektrophorese und Autoradiographie (Schade und Wehner, 1969; Wehner u. Mitarb., 1969)<sup>2</sup>.

2. Die Höhe des Cholesterin-, Harnstoff- und Albumingehaltes im Serum mit dem Technicon SMA 12 (Med. Univ.-Klinik Tübingen).

Einen Tag vor der Tötung setzten wir die Tiere in Stoffwechselkäfige und untersuchten im 24 Std-Urin halbquantitativ die Höhe der Eiweißausscheidung.

Die Nieren der Versuchstiere wurden in gepuffertem, 4%igem Formalin fixiert, in Osmiumsäure nachfixiert und in Methacrylat eingebettet. An 0,5  $\mu$  dicken, nach Movat versilberten Schnitten führten wir folgende quantitative Untersuchungen durch:

1. Untersuchungen über das Mesangiumvolumen mit Hilfe des Punktzählverfahrens am Visopan Reichert (Objektiv 63/0,75 160/0,17; Maßstab 800:1, Punktabstand (Netzwert) 9,5  $\mu$ ) (Wehner, 1968).

2. Eine Zählung der glomerulären Zellen mit ihrer prozentualen Verteilung pro Glomerulumanschnitt.

3. Messungen zur Ermittlung des mittleren glomerulären Durchmessers, um einen Parameter für die Glomerulumgröße zu bekommen.

4. Berechnungen des sog. „Index of diabetic glomerular lesions“ (IDGL) nach Fukuhara (1968). Dieser Index ist der Quotient aus der absoluten Mesangiumzellzahl und der absoluten Mesangiumpunktzahl aus dem Punktzählverfahren. Letztere ist ein indirektes Flächenmaß, so daß der Quotient eine Aussage über die Zelldichte erlaubt.

Die obigen Untersuchungen wurden an 100 Glomerula eines jeden Meerschweinchens durchgeführt. Als Kontrollen (auch für die Serumbestimmungen) dienten fünf unbehandelte und 15 Meerschweinchen, die nur das Insulinlösungsmittel injiziert bekamen. Die morphometrischen Untersuchungen wurden in Blindversuchen durchgeführt. Die statistische Sicherung wichtiger Ergebnisse erfolgte mit dem *t*-Test und wo dieser nicht anwendbar war mit dem verteilungsfreien Rangtest von Wilcoxon. Als Grenzwert der Irrtumswahrscheinlichkeit benutzten wir  $2P = 0,05$  (5%).

<sup>1</sup> Der Firma Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt, danken wir für die freundliche Überlassung des Insulins.

<sup>2</sup> Wir danken Herrn Professor Kallee, Isotopenabteilung der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, für zahlreiche Ratschläge.

### Ergebnisse

Bereits am 24. Tag nach Immunisierungsbeginn ist eine geringgradige Vermehrung der Mesangiumzellen zu beobachten (Abb. 1). In späteren Stadien, am 50. Immunisierungstag fanden wir Veränderungen, die in einer diffusen Vermehrung des Mesangiums bestehen (Abb. 2). Bei den Tieren, die 80 Tage immunisiert wurden, treten in den Glomerula erstmals Mesangiumveränderungen auf, die angedeutet nodulären Charakter haben und die sich stellenweise in die Capillarlichtungen vorwölben (Abb. 3).

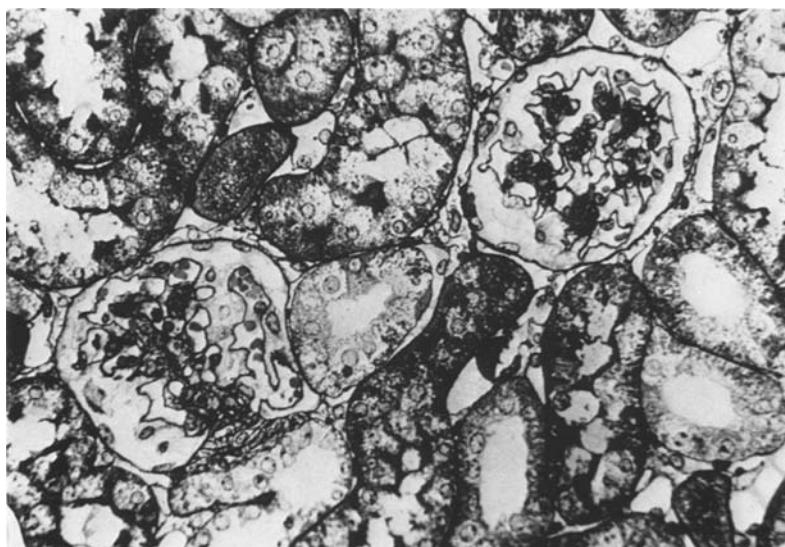


Abb. 1. Glomerula aus der Niere eines 25 Tage lang mit Rinderinsulin immunisierten Meerschweinchens mit intercapillärer Zellproliferation und geringgradiger Mesangiumverbreiterung. Dünnschnitt 0,5  $\mu$ . Versilberung nach Movat. Vergr. 350:1

Der Versuch, diese Befunde zu quantifizieren, ergab zunächst für die normalen Meerschweinchennieren folgende absolute Zellverteilung: im Mittel 13 Deckzellen, 11 Endothelzellen und 9 Mesangiumzellen in einem 0,5  $\mu$  dicken Glomerulumanschnitt (mittlerer Durchmesser 95  $\mu$ ). Diese Werte verändern sich für die Kontrolltiere, d.h. Tiere, die nur das Insulinlösungsmedium injiziert bekamen, nicht signifikant. Erst bei längerer Immunisierungsdauer treten Veränderungen auf, die statistisch zu sichernde Unterschiede darstellen. Es kommt nach 80 Immunisierungstagen zu einer Abnahme von Deckzellen und Endothelzellen auf 10 bzw. 8 Zellen, die Mesangiumzellen nehmen dagegen auf 13 Zellen pro Glomerulumanschnitt zu. Nach 150 Tagen ist diese Verteilung noch ausgeprägter: 10 Deckzellen, 8 Endothelzellen und 15 Mesangiumzellen im Mittel in einem Glomerulumanschnitt. Der mittlere glomeruläre Durchmesser ändert sich für die einzelnen Versuchsgruppen praktisch nicht. Der Unterschied zwischen dem normalen Mesangiumzellgehalt und dem Zellgehalt bei den immunisierten Tieren ab dem 50. Tag lässt sich statistisch eindeutig sichern (Tabelle 1).



Abb. 2. Glomerulum aus der Niere eines 50 Tage lang mit Rinderinsulin immunisierten Meerschweinchens mit deutlicher Zellvermehrung im Mesangium und diffuser Mesangiumverbreiterung. Dünnschnitt 0,5  $\mu$ . Versilberung nach Movat. Vergr. 720:1

Tabelle 1. Mittlerer absoluter Zellgehalt in einem 0,5  $\mu$  dicken Glomerulumanschnitt von mittlerem Durchmesser bei den verschiedenen Untersuchungsgruppen. Die Zahlen stellen Mittelwerte und deren Standardabweichungen von Zählungen bei mindestens 5 Tieren dar, wobei pro Tier 100 Glomerula ausgewertet wurden

	DZ	EZ	MZ	D
N	12,8 $\pm$ 1,0	10,6 $\pm$ 2,2	9,3 $\pm$ 2,8	95
K <sub>42</sub>	11,1 $\pm$ 1,2	10,3 $\pm$ 1,8	8,9 $\pm$ 2,8	94
J <sub>24</sub>	11,7 $\pm$ 1,0	10,1 $\pm$ 1,7	10,0 $\pm$ 3,1	100
J <sub>50</sub>	9,7 $\pm$ 1,3	10,9 $\pm$ 3,5	10,3 $\pm$ 2,9	99
J <sub>80</sub>	9,9 $\pm$ 1,1	8,2 $\pm$ 0,7	12,9 $\pm$ 1,5	101
J <sub>150</sub>	10,1 $\pm$ 0,9	8,1 $\pm$ 3,1	14,6 $\pm$ 1,7	102

N = Normaltiere. K<sub>42</sub> = Kontrollgruppe, 42 Tage mit Insulinlösungsmitte injiziert. J = immunisierte Tiere, wobei die Indices 24—150 die Immunisierungsdauer in Tagen angeben. DZ = Deckzellen. EZ = Endothelzellen. MZ = Mesangiumzellen. D = mittlerer glomerulärer Durchmesser aller pro Gruppe untersuchten Glomerula in  $\mu$ .

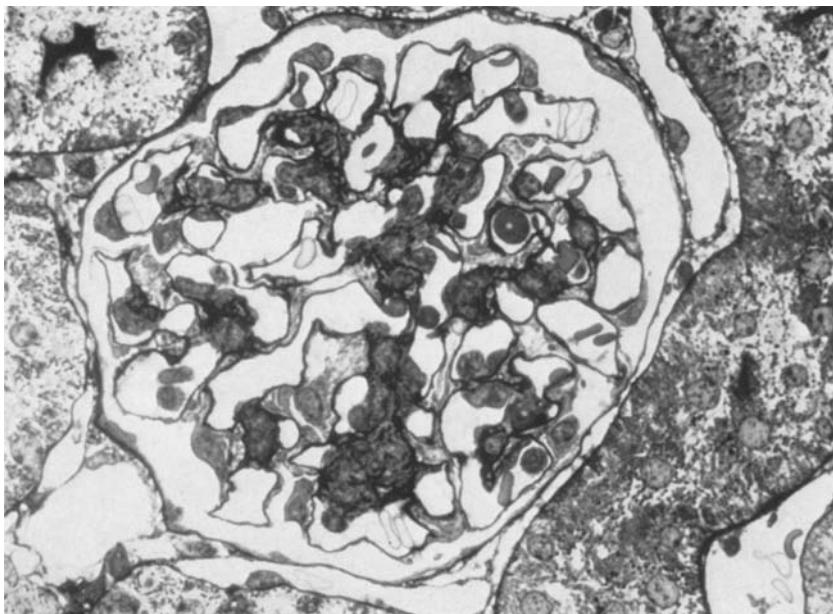


Abb. 3. Glomerulum aus der Niere eines 80 Tage mit Rinderinsulin immunisierten Meerschweinchens mit Veränderungen, die neben diffuser Mesangiumvermehrung angedeutet nodulären Charakter haben. Dünnschnitt 0,5  $\mu$ , Versilberung nach Movat. Vergr. 720:1

Betrachtet man die prozentuale Zellverteilung, dann resultiert für die normale Meerschweinchenniere: 40% Deckzellen, 32% Endothelzellen und 28% Mesangiumzellen im Mittel pro Glomerulumanschnitt. Bei den Kontrolltieren ist diese Verteilung praktisch unverändert. Mit zunehmender Immunisierungsdauer wird der schon beschriebene Abfall des Deckzellanteiles deutlicher, er fällt nach 24 Tagen auf 37% und nach 150 Tagen schließlich auf 31% ab. Auch die Endothelzellen nehmen geringgradig prozentual ab. Die deutlichsten Veränderungen zeigen auch bei der prozentualen Zellverteilung die Mesangiumzellen, die 24 Tage nach Immunisierungsbeginn 31%, nach 50 Tagen 33%, nach 80 Tagen 41% und nach 150 Tagen schließlich im Mittel 45% der gesamten Zellen in einem Glomerulumanschnitt ausmachen. Die Unterschiede zwischen der prozentualen Zellverteilung bei Normal- und Versuchstieren sind für die Deckzellen und für die Mesangiumzellen statistisch hoch signifikant (Tabelle 2).

Während der prozentuale Anteil des Mesangiums im normalen Meerschweinchenglomerulum im Mittel 6,3% ausmacht, ist er bereits nach 50-tägiger Versuchsdauer auf 10,5%, nach 80 Tagen auf 11,4% und 150 Tagen nach Beginn der Immunisierung auf 12,4% angestiegen, eine Zunahme, die sich auch statistisch eindeutig sichern lässt (Tabelle 3). Um die Zelldichte des Mesangiums beurteilen zu können, wurde der IDGL bestimmt. Er beträgt für die Normalniere 1,8, für die Versuchstiere ab dem 50. Immunisierungstag 1,2. Dieser Unterschied ist ebenfalls statistisch signifikant (Tabelle 3).

Tabelle 2. Mittlerer relativer Zellgehalt in einem 0,5  $\mu$  dicken Glomerulumanschnitt bei den verschiedenen Untersuchungsgruppen. Weitere Erläuterungen s. Legende Tabelle 1

	DZ (%)	EZ (%)	MZ (%)
N	40,0 $\pm$ 5,4	31,8 $\pm$ 3,2	28,2 $\pm$ 5,4
K <sub>42</sub>	40,6 $\pm$ 2,4	33,1 $\pm$ 2,5	26,3 $\pm$ 2,6
J <sub>24</sub>	37,3 $\pm$ 3,0	31,1 $\pm$ 4,0	31,2 $\pm$ 3,0
J <sub>50</sub>	31,4 $\pm$ 3,4	35,1 $\pm$ 4,9	33,4 $\pm$ 4,3
J <sub>80</sub>	31,9 $\pm$ 2,6	26,7 $\pm$ 1,7	41,4 $\pm$ 3,1
J <sub>150</sub>	31,0 $\pm$ 3,4	24,4 $\pm$ 6,7	44,6 $\pm$ 4,7

Tabelle 3. Mittlerer prozentualer Mesangiumanteil pro Glomerulum (Mes.-Vol.-%) und der „index of diabetic glomerular lesions“ nach Fukuhara (IDGL) bei den verschiedenen Untersuchungsgruppen

	Mes.-Vol.-%	IDGL
N	6,3 $\pm$ 2,1	1,8 $\pm$ 0,7
K <sub>42</sub>	7,8 $\pm$ 1,7	1,3 $\pm$ 0,2
J <sub>24</sub>	7,3 $\pm$ 2,0	1,5 $\pm$ 0,3
J <sub>50</sub>	10,5 $\pm$ 2,1	1,2 $\pm$ 0,1
J <sub>80</sub>	11,4 $\pm$ 1,3	1,2 $\pm$ 0,2
J <sub>150</sub>	12,4 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,1

Mit den beschriebenen quantitativ morphologischen Veränderungen in den Glomerula der insulinimmunisierten Meerschweinchen gehen auch verschiedene Veränderungen laborchemischer Art einher. Es lässt sich im Gegensatz zu den Normaltieren, die keine Insulinbindungsfähigkeit ihres Serums zeigen, nach 24 Tagen Immunisierungsdauer eine hohe Insulinbindungskapazität im Serum nachweisen als Ausdruck vorhandener Antikörper gegen das heterologe Insulin. Der Antikörpertiter ist 24 Tage nach Versuchsbeginn am höchsten, zu einem Zeitpunkt also, zu dem die ersten morphologischen Veränderungen an den Glomerula beobachtet werden. Der Antikörpertiter nimmt mit längerer Versuchsdauer wieder ab, ist aber in jedem Stadium des Immunisierungsprozesses nachweisbar (Tabelle 4). Als Ausdruck einer starken Proteinurie (semiquantitativ) lassen sich bereits 24 Tage nach Immunisierungsbeginn eine Erhöhung des Serumcholesterin- und Harnstoffspiegels sowie eine Hypalbuminämie nachweisen. Mit fortschreitender Dauer der Versuche normalisieren sich der Harn-

Tabelle 4. Serumwerte und Proteinurie zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunisierung

	$\mu$ g Insulin/ml (IBC)	Cholesterin (mg-%)	Harnstoff (mg-%)	Albumin (g-%)	Proteinurie
N		33,4 $\pm$ 2,7	36,2 $\pm$ 3,9	1,9 $\pm$ 0,1	-/(+)
J <sub>24</sub>	6,05 $\pm$ 2,4	51,0 $\pm$ 3,6	52,8 $\pm$ 4,6	1,7 $\pm$ 0,2	++/+++
J <sub>50</sub>	1,4 $\pm$ 0,3	46,2 $\pm$ 4,1	33,0 $\pm$ 4,1	2,0 $\pm$ 0,2	++
J <sub>150</sub>	1,82 $\pm$ 0,8	48,3 $\pm$ 3,5	35,6 $\pm$ 3,8	2,1 $\pm$ 0,3	+

Weitere Erläuterungen s. Legende Tabelle 1.

stoff- und Albuminspiegel im Serum, während der Serumcholesterinspiegel auch in späteren Versuchsphasen deutlich erhöht ist. Die Proteinurie wird in späteren Stadien der Immunisierung geringer (Tabelle 4).

### Diskussion

Überblicken wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen, so kommt es im Verlauf der Immunisierung mit heterologem Insulin bei Meerschweinchen mit zunehmender Dauer der Immunisierung

1. zu mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen, die zum Teil an nodulären Mesangiumverbreiterungen erinnern.
2. Zu einer signifikanten Zunahme der Mesangiumzellen um 57% gegenüber der Norm, so daß die Mesangiumzellen nach 150 Immunisierungstagen schließlich 45% der gesamten Zellen ausmachen. Die beiden anderen glomerulären Zelltypen nehmen geringgradig ab.
3. Zu einer Vermehrung des Mesangiums, das 150 Tage nach Versuchsbeginn auf 12,4% gegenüber 6,3% bei Normaltieren vermehrt ist.
4. Zu einer Abnahme des IDGL auf 1,2.
5. Zum Auftreten von Antikörpern gegen Fremdinsulin, die nach 24 Tagen den höchsten Titer erreichen und in späteren Stadien der Immunisierung nur noch in geringerer Höhe nachweisbar sind.
6. Zu einer Erhöhung der Serumharnstoff- und Cholesterinspiegel, während der Albumingehalt verringert ist. Diese Veränderungen sind 50 Tage nach Versuchsbeginn bis auf die Hypercholesterinämie zurückgebildet.
7. Zu einer zunächst (25.—50. Tag) erheblichen Proteinurie, die in späteren Versuchsstadien deutlich zurückgeht.

Die von uns lichtoptisch beschriebenen Veränderungen sind von anderen Autoren nach Immunisierung mit Fremdinsulin ebenfalls beobachtet worden (Grieble, 1960; Mohos u. Mitarb., 1963; Ditscherlein u. Mitarb., 1967), obwohl die proliferative Komponente dabei nicht immer in den Vordergrund gestellt wurde (Mancini u. Mitarb., 1969). Da nach eigener Erfahrung eine Zellproliferation von 50% gegenüber der Norm eindrucksmäßig sehr schwer zu erfassen ist, ist es durchaus verständlich, daß proliferative Veränderungen von obigen Autoren z.T. nicht beobachtet wurden. Die Erkennung der Mesangiumzellproliferation wird darüber hinaus durch die gleichzeitig bestehende Abnahme der anderen glomerulären Zellgruppen, insbesondere der Epithelzellen, erschwert, da die Gesamtzahl sich dadurch nur geringgradig ändert.

Neben der Zahl nimmt auch das Volumen des Mesangiums nach Insulinimmunisierung erheblich zu, wie das auch andere Autoren unter den gleichen Versuchsbedingungen beschrieben haben (Mancini u. Mitarb., 1969; u.a.). Die Abnahme des von Fukuhara (1968) eingeführten IDGL wird dadurch erklärt, daß die Mesangiumzellzunahme gegenüber der Mesangiumvolumenzunahme vergleichsweise gering ist. Daraus den Schluß zu ziehen, eine Vermehrung der Mesangiumzellen liege nicht vor (Fukuhara, 1968), ist nach unseren Untersuchungen nicht zulässig. Unsere morphologischen Befunde an den Glomerula von insulinimmunisierten Meerschweinchen sind somit gekennzeichnet durch die Zunahme des Mesangiumvolumens und des Mesangiumzellgehaltes sowie durch eine Ab-

nahme der Epithelzellen. Diese Befunde bestätigen hinsichtlich der formalen Genese die Theorie von Kimmelstiel (1968), daß der Nodulus das Resultat von mesangialer Proliferation und erhöhter Mesangiummatrixbildung ist.

Damit ergeben sich Parallelen zu Untersuchungen an menschlichen Diabetikern, bei denen gleichartige Verhältnisse nachgewiesen werden konnten (Fiaschi u. Mitarb., 1963; Kimmelstiel, 1968; Iidaka u. Mitarb., 1968; Wehner u. Anders, 1969), während Fukuhara (1968) lediglich eine Zunahme des Mesangiums beschreibt. Bei spontandiabetischen Tieren sind die Befunde allerdings unterschiedlich. So finden sich bei spontandiabetischen Hunden (Gepts u. Toussaint, 1967) keine Ähnlichkeiten zur nodulären diabetischen Glomerulosklerose, während bei genetisch-diabetischen KK-Mäusen (Treser u. Mitarb., 1968) und bei spontandiabetischen Hamstern (Shirai u. Mitarb., 1967) Mesangiumzunahme und Mesangiumzellvermehrung auch in typisch nodulärer Form beschrieben wurden. Darüber hinaus erinnern unsere Ergebnisse aber auch an die menschlichen intercapillären postakuten lobulären Glomerulonephritiden, worauf bereits Bell (1947, 1953) hingewiesen hat. Auch bei diesen glomerulären Erkrankungen sind es in erster Linie die Mesangiumzellen, die proliferieren und das Mesangium, welches an Volumen zunimmt (Bohle, u. Mitarb., 1969; Wehner u. Mitarb., 1969). Die von uns früher beschriebenen „humps“-ähnlichen Basalmembranprotuberanzen in den Frühstadien der Immunisierung mit Fremdinsulin weisen auf Ähnlichkeiten zur akuten proliferativen Glomerulonephritis hin (Wehner u. Mitarb., 1969).

Zu diesen morphologischen Veränderungen, die Parallelen zur intercapillären Glomerulonephritis aufwerfen, kommen die geschilderten Serumveränderungen nach Immunisierung mit Insulin. Nach drei Wochen Immunisierungsdauer sind im Serum hohe Antikörpertiter gegen das heterologe Insulin nachweisbar, die auch bei Progression der glomerulären Veränderungen immer nachweisbar bleiben. Die Erhöhung des Harnstoffspiegels, die Hypalbuminämie und Proteinurie nach 3 Wochen Immunisierung lassen an ein akutes Geschehen denken, das danach in ein postakutes Stadium mit Normalisierung der Werte und nur geringer Proteinurie übergeht. Damit liegt der Eindruck nahe, daß durch Immunisierung mit Insulin bei Meerschweinchen eine akute intercapilläre Glomerulonephritis erzeugt werden kann, die später in das postakute Stadium übergeht und schließlich in chronischen Phasen noduläre Veränderungen aufweisen kann.

Bestehen bleibt die Hypercholesterinämie, die nach Untersuchungen von Jecerniczky und Ambro (1968) eine Folge der Insulinverabreichung ist. Das Cholesterin soll andererseits in der Pathogenese von nodulären Mesangiumveränderungen nach French und Mitarb. (1967) eine Rolle spielen. Auch Fukuhara (1968) findet eine positive Korrelation der Serumlipide zu der Glomerulosklerose, während eigene Untersuchungen (Wehner u. Anders) keine Beziehung der glomerulären Veränderungen zum Serumcholesterinspiegel aufzeigen. Befunde von Fuchs u. Mitarb. (1968), die nach Pankreatektomie bei Hunden glomerulosklerotische Veränderungen in Zusammenhang mit der Lipämie bringen, können auch im Sinne der insulininduzierten Schäden betrachtet werden, da die Tiere mit heterologem Insulin behandelt wurden. Ähnlich können die Be-

funde bei Alloxandiabetes gewertet werden, da die Stoffwechselstörungen meist mit Insulin ausgeglichen wurden (Orskov u. Mitarb., 1965; Osterby-Hansen u. Mitarb., 1967).

Nach dem bisher Gesagten, liegt es nahe, dem Insulin eine ätiologische Rolle bei den experimentellen und menschlichen diabetischen glomerulären Veränderungen zukommen zu lassen, zumal das Insulin eine viertel Minute nach Injektion bereits in hoher Konzentration im Glomerulum gefunden wird (Beck u. Fedynski, 1967) und Befunde vorliegen, die für eine Insulinbindung im Nierengewebe an Substanzen ohne Antikörpercharakter sprechen (Pfeiffer u. Mitarb., 1969). Andererseits legen immunfluoreszenzoptische Befunde mit FITC-markiertem Insulin und Antiinsulinserum sowie der Nachweis von Gamma-globulin in nodulären Strukturen die Vermutung nahe, daß Antikörper gegen Insulin gleichfalls an der Genese beteiligt sind (Freedman u. Mitarb., 1960; Berns u. Mitarb., 1962; Coleman u. Mitarb., 1962; Burkholder, 1965; Farrant und Shedd, 1965; Mancini u. Mitarb., 1964, 1969). Damit wären Ansichten von Bornstein und Hyde (1959) bestätigt, die Insulininhibitoren für die diabetische Nephropathie verantwortlich machen. Daß die diabetische Stoffwechsellage keine Rolle spielen kann, wird durch Untersuchungen von Missmahl und Riemann (1968) glaubhaft, die schon bei latenter Diabetes in der Rectumschleimhaut typische diabetische Mikroangiopathien beschrieben haben. Es kann sich somit bei den diabetischen Glomerulumveränderungen um eine Form von Insulinüberempfindlichkeit handeln (Grieble, 1960), evtl. um einen Autoimmunprozeß, da Veränderungen solcher Art, wie Insulitis, idiopathische Nebenniereninsuffizienz und der Nachweis von Schilddrüsenantikörpern häufig mit Diabetes assoziiert sind (Deckert, 1967; Renold u. Mitarb., 1969). Freytag (1968) konnte bei insulinimmunisierten Meerschweinchen eine Mikroangiopathie der Inselkapillaren beobachten, ein Befund, der in die gleiche Richtung weist. Nimmt man darüber hinaus an, daß die Mesangiumzellen in der Lage sind Antigen-Antikörperkomplexe zu phagocytieren und im Experiment durch solche Immunkomplexe eine Proliferation der Mesangiumzellen erzeugt werden kann (Germuth u. Mitarb., 1968), dann ist es denkbar, daß nach Bindung von Insulinantikörpern mit Insulin an der Basalmembran oder nach intracapillärer Bindung von Antigen an spezifische Antikörper mit Produktion von Immunkomplexen im Mesangium (Mancini u. Mitarb., 1969) solche Prozesse ausgelöst werden können. Damit wäre die Theorie von Kimmelstiel (1968), daß die „Abnormalität des Mesangiums“ die Ursache der glomerulären Veränderungen bei Diabetes ist, bestätigt. Der Einwand, daß auch bei nicht mit Insulin behandelten Diabetikern und bei Nichtdiabetikern noduläre Glomerulosklerosen nachgewiesen werden konnten (Ellenberg, 1962; Kimmelstiel, 1968) spricht dann nicht gegen die insulinbedingte Genese, wenn Autoantikörper gegen körpereigenes Insulin nachgewiesen werden. Diese Möglichkeit wäre bei geringgradiger Modifikation der Molekularstruktur von speciespezifischen Komponenten des Insulins gegeben. Bislang steht dieser Nachweis allerdings aus.

Unsere Untersuchungen legen es im Vergleich mit Befunden bei menschlichem, tierischem und experimentellem Diabetes nahe, in der diabetischen Glomerulosklerose eine durch Insulin und seine Antikörper bedingte entzündliche glomeruläre Erkrankung zu sehen, obwohl die Diskussion über die Bedeutung

von Immunprozessen bei diabetischen Nierenveränderungen noch keineswegs abgeschlossen ist (Ditscherlein, 1969).

Neueste biochemische Untersuchungen, in denen eine Aggregation von reduziertem Insulin mit Komplement und Gammaglobulin nachgewiesen werden konnte, deuten darauf hin, daß im Rahmen der Entwicklung von Nierenveränderungen bei Diabetikern Insulinderivate, Gammaglobulin und Komplementkomponenten eine Rolle spielen können (Stroud u. Mitarb., 1969).

### Literatur

- Beck, L. V., Fedynskyi, N.: Evidence from combined immuno-assay and radioautography procedures that intact insulin-<sup>125</sup>I molecules are concentrated by mouse kidney proximal tubule cells. *Endocrinology* **81**, 475—485 (1967).
- Bell, E. T.: *Renal diseases*. Philadelphia 1946.
- Renal vascular disease in diabetes mellitus. *Diabetes* **2**, 376—389 (1953).
- Berms, A. W., Owens, C. T., Hirata, Y., Blumenthal, H. T.: The pathogenesis of diabetic glomerulosclerosis. II. A demonstration of insulin-binding capacity of the various histopathological components of the disease by fluorescence microscopy. *Diabetes* **11**, 308—317 (1962).
- Bertram, F.: *Die Zuckerkrankheit*, III. Aufl. Stuttgart: Thieme 1947.
- Blumenthal, H. T., Goldenberg, S., Berms, A. W.: The pathology and pathogenesis of the disseminated angiopathy of diabetes mellitus. *Diabetes* **14**, 309—310 (1965).
- Bohle, A., Buchborn, E., Edel, H. H., Renner, E., Wehner, H.: Zur pathologischen Anatomie und Klinik der Glomerulonephritis. I. Die akuten und perakuten Glomerulonephritiden. *Klin. Wschr.* **47**, 733—742 (1969).
- Bornstein, J., Hyde, D.: Insulin antagonists in blood of juvenile diabetics with arterial diseases. *Diabetes* **8**, 92—93 (1959).
- Burkholder, P. M.: Immunohistopathological study of localized plasma proteins and fixation of guinea pig complement in renal lesions of diabetic glomerulosclerosis. *Diabetes* **14**, 755—770 (1965).
- Coleman, S. L., Becker, B., Canaan, S., Rosenbaum, L.: Fluorescent insulin staining of the diabetic eye. *Diabetes* **11**, 375—377 (1962).
- Deckert, T.: Autoimmunological aspects of diabetes mellitus. *Acta med. scand., Suppl.* **476**, 29—41 (1967).
- Dieterle, P.: Pathogenese und Therapie der diabetischen Angiopathie. *Med. Klin.* **64**, 55—59 (1969).
- Ditscherlein, G.: *Nierenveränderungen bei Diabetikern*. Jena: G. Fischer 1969.
- Marx, I., Dena, R.: Elektronenmikroskopische Befunde am Kaninchenglomerulum nach 1½ bis 2jähriger Insulinmedikation. *Exp. Path.* **1**, 165—176 (1967).
- Ellenberg, M.: Diabetic nephropathy without manifest diabetes. *Diabetes* **11**, 197—201 (1962).
- Farrant, P. C., Shedd, W. J. H.: Observations in the uptake of insulin conjugated with fluoresceinisothiocyanate by diabetic kidney tissue. *Diabetes* **14**, 274—278 (1965).
- Fiaschi, E., Seuro, E., Naccarato, L. A., Monti, R., Serpi, G., Sirigu, F. G.: Intorno alle prime alterazioni morfologiche del rene nel diabete giovanile recente. *Minerva nefrol.* **10**, 95—108 (1963).
- Freedman, P., Peters, J. H., Kark, R. M.: Localization of gammaglobulin in the diseased kidney. *Arch. intern. Med.* **105**, 524 (1960).
- French, S. W., Yamanaka, W., Ostwald, R.: Dietary induced glomerulosclerosis in the guinea pig. *Arch. Path.* **83**, 204—210 (1967).
- Freytag, G.: Histologische und autoradiographische Untersuchungen am Inselsystem der Maus beim Insulin-Antikörper-Diabetes. *Beitr. path. Anat.* **137**, 121—148 (1968).
- Fuchs, U., Moritz, V., Timm, G., Scharnweber, W.: Blutgefäßveränderungen beim experimentellen Langzeitdiabetes des Hundes. *Virchows Arch. path. Anat.* **343**, 286—296 (1968).

- Fukuhara, N.: Histometrical studies on the kidneys in diabetes mellitus. *Tohoku J. exp. Med.* **95**, 15—33 (1968).
- Gepts, W., Toussaint, D.: Spontaneous diabetes in dogs and cats. A pathological study. *Diabetologia* **3**, 249—265 (1967).
- Germuth, F. G., Valdes, A. J., Senterift, L. B., Pollack, A. D.: A unique influence of cortisone on the transit of specific macromolecules across vascular walls in immune complex disease. *Johns Hopkins med. J.* **122**, 137—153 (1968).
- Grieble, H. G.: Renal lesions induced by heterologous insulin: an example of foreign protein nephritis. *J. Lab. clin. Med.* **56**, 819—820 (1960).
- Iidaka, K., McCoy, J., Kimmelstiel, P.: The glomerular mesangium. A quantitative analysis. *Lab. Invest.* **19**, 573—579 (1968).
- Jezericzky, J., Ambro, I.: Serum lipid level in diabetic children. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* **9**, 219—228 (1968).
- Kallee, E., Debiasi, S., D'Addabbo, A.: Studies on  $^{131}\text{I}$ -labelled insulin. VI. Immunological experiments on the binding of  $^{131}\text{I}$ -insulin to serum proteins of normal, albuminemic, and insulin-treated subjects. *Acta isotop.* **3**, 239 (1963).
- Kimmelstiel, P.: Diabetic nephropathy. In: *Structural basis of renal disease* (ed. by Becker, E. L.). New York: Harper & Row 1968.
- Diabetische Glomerulosklerose. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **74**, 95—102 (1968).
- Lohss, F., Kallee, E.: Immunological detection of the binding of  $^{59}\text{Fe}$  ascorbate,  $^{131}\text{I}$ -thyroxine, and  $^{131}\text{I}$ -insulin to serum proteins. In: *Protides of the biological fluids* (ed. by Peeters, H.). Proc. 8th Coll., Bruges 1960, p. 142—146. Amsterdam: Elsevier 1961.
- Mancini, A. M., Constanzi, G., Zampa, G. A.: Human insulin antibodies detected by immunofluorescence techniques. *Lancet* **1964**, I, 726.
- Zampa, G. A., Geminiani, G. D., Vecchi, A.: Experimental nodular "diabetic like" glomerulosclerosis in guinea pigs following long-acting, heterologous insulin immunization. *Diabetologia* **5**, 155—166 (1969).
- Missmahl, H., Riemann, J.: Einfacher Nachweis der Mikroangiopathie an den Capillaren der Rectumschleimhaut bei Diabetikern. *Klin. Wschr.* **46**, 374—376 (1968).
- Mohos, S. C., Hennigar, G. R., Fogelman, J. A.: Insulin-induced glomerulosclerosis in the rabbit. *J. exp. Med.* **118**, 667—680 (1963).
- Orskov, H., Steen Olsen, T., Nielsen, K., Rafaelsen, O. J., Lundbaek, K.: Kidney lesions in rats with several long-term alloxan diabetes. I. Influence of age, alloxan damage, and insulin administration. *Diabetologia* **1**, 172—179 (1965).
- Osterby-Hansen, R., Lundbaek, K., Steen-Olsen, T., Orskov, H.: Kidney lesions in rats with severe long-term alloxan diabetes. III. Glomerular ultrastructure. *Lab. Invest.* **17**, 675—692 (1967).
- Pfeiffer, E. F., Ditschuneit, H., Federlin, K.: Die Inselzellhormone: Die Immunologie des Insulins. In: *Handbuch des Diabetes mellitus*, Bd. I, S. 155—201. München: J. F. Lehmann 1969.
- Renold, A. E., Gonet, A. E., Vecchio, D.: Immunopathology of the endocrine pancreas. In: *Textbook of immunopathology*, vol. II, p. 595—601 (ed. by Miescher, P. A. and H. J. Müller-Eberhard). New York-London: Grune & Stratton 1969.
- Schade, U., Wehner, H.: Der Einfluß von Insulin auf die Insulinbindungs Kapazität des Serums insulinsensibilisierter Meerschweinchen. *Klin. Wschr.* **47**, 438—439 (1969).
- Shirai, T., Welsh, G. W., Sims, E. A. H.: Diabetes mellitus in the Chinese hamster. II. The evolution of renal glomerulopathy. *Diabetologia* **3**, 266—286 (1967).
- Stroud, R. M., Cantrell, J. W., Pruitt, K. M.: Interaction of aggregates of reduced insulin with gammaglobulin and complement: A pathogenetic hypothesis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* **130**, 501—504 (1969).
- Thiel, R.: Der Diabetes mellitus ein Gefäßproblem? Ein ophthalmologischer Beitrag zur Entstehung und Art des diabetischen Gefäßschadens. Stuttgart: Enke 1956.
- Thomsen, A. C.: The kidney in diabetes mellitus. Copenhagen: Munksgaard 1965.
- Treser, G., Oppermann, W., Ehrenreich, T., Lange, K., Levine, R., Camerini-Davalos, R. A.: Glomerular lesions in a strain of genetically diabetic mice. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **129**, 820—823 (1968).

- Wehner, H.: Stereologische Untersuchungen am Mesangium normaler menschlicher Nieren. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. **344**, 286—294 (1968).
- Anders, E.: Quantitativ-morphologische Befunde an den Glomerula in Nieren von Diabetikern. Verh. dtsch. Ges. Path. **53**, 380—383 (1969).
- — Quantitative Analyse glomerulärer Veränderungen bei Diabetikern. (In Vorbereitung.)
- Renner, E., Edel, H. H., Buchborn, E., Bohle, A.: Zur pathologischen Anatomie und Klinik der Glomerulonephritis. II. Die postakuten und chronischen Glomerulonephritiden. Klin. Wschr. **47**, 742—752 (1969).
- Schade, U., Asante, F.: Veränderungen an der glomerulären Basalmembran des Meerschweinchens durch Fremdinulin und ihre Beziehung zur Höhe der Insulin-Bindungsfähigkeit des Serums. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. **348**, 164—169 (1969).

Dr. H. Wehner  
Pathologisches Institut  
der Universität  
D-7400 Tübingen  
Liebermeisterstr. 8