

Der Einfluß der Autolyse auf die immunhistologische Darstellbarkeit gewebegebundener Immunglobuline in der Niere

H. P. Seelig, R. Seelig und M. Drescher

Institut für Immunologie (Prof. K. Rother)
und Institut für Pathologie (Prof. W. Doerr) der Universität Heidelberg

Eingegangen am 29. April 1974

Influence of Autolysis on the Immunohistology of Tissue-Bound Immunglobulins in the Kidney

Summary. The influence of autolysis on the immunohistological detectability and the immunological properties of tissue-bound basement membrane antibodies were investigated in the rat kidney. The immunohistological demonstration of antibodies was not affected up to 3 days post mortem. The disturbing autofluorescence of the autolytic tissue can be avoided by using peroxylase labeled antibodies. Basement-membrane antibodies that were eluted from the kidneys after an autolysis period of 2 days showed a homogenous linear deposition in kidney basement membrane after reinjection into normal rats. Their antibody properties were not affected.

Key words: Autolysis — Peroxylase-Labeled Antibodies — Glomerular Basement Membrane — Autofluorescence.

Zusammenfassung. Der Einfluß der Autolyse auf die immunhistologische Darstellbarkeit und die immunologischen Eigenschaften gewebegebundener Basalmembranantikörper an Rattennieren wurde untersucht. Der immunhistologische Nachweis der Antikörper war bis zu einem Zeitpunkt von 3 Tagen nach Eintritt des Todes nicht beeinträchtigt. Durch die Verwendung peroxylasemarkierter Antiseren konnte die störende Autofluoreszenz des autolytischen Gewebes umgangen werden. Die nach 2tägiger Autolyse aus den Nieren eluierten Basalmembranantikörper lagerten sich nach Reinjektion wiederum in homogen-linearem Muster an der glomerulären Basalmembran ab, ihre Antikörpereigenschaften waren nicht beeinträchtigt.

Aufgrund der üblicherweise eingehaltenen Frist von 12 Std zwischen dem Eintritt des Todes und einer Obduktion werden immunhistologische Untersuchungen von Leichenorganen in der Regel als unergiebig betrachtet und deshalb nicht vorgenommen. Im angelsächsischen Schrifttum werden mehrfach immunhistologische Untersuchungen auf gewebegebundene Ablagerungen von Immunglobulinen erwähnt (Koffler, Agnello, Carr und Kunkel, 1973; Kouvalainen, 1963; Hoyer, Michael, Good und Vernier, 1967; Wilson und Dixon, 1973), Angaben über den Zeitpunkt der Gewebeatnahme post mortem, sowie über die mögliche Beeinträchtigung der immunhistologischen Darstellbarkeit der Immunglobuline durch die Autolyse liegen jedoch nicht vor. Es erscheint daher gerechtfertigt, die Beeinträchtigung der immunhistologischen Darstellbarkeit und der immunologischen Eigenschaften von gewebegebundenen Immunglobulinen durch die Autolyse zu untersuchen. Im folgenden soll anhand experimenteller Unter-

suchungen an Rattennieren gezeigt werden, daß Immunglobuline an der Basalmembran auch nach mehrtägiger Autolyse immunhistologisch darstellbar bleiben.

Material und Methodik

1. *Ratten-Basalmembran-Antikörper* wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Anti-Basalmembran-Antigen aus Rattenlungen erhalten (Methode: Willoughby und Dixon, 1970). Die Immunglobuline wurden mit 40% Ammoniumsulfat gefällt und nach ausgiebiger Dialyse gegen Leitungswasser und aqua dest. lyophilisiert.

Zur Prüfung der nephritogenen Eigenschaften des Antiserums erhielten 7 männliche Ratten (250 g Körpergewicht) je 1,0 ml Antiserum i.v. 2 Ratten wurden 90 min nach der Injektion getötet und die Nieren histologisch und immunhistologisch untersucht. Bei 5 Ratten wurde vor und 3 Tage nach der Injektion des Antiserums die tägliche Proteinausscheidung im Urin gemessen. Danach wurden die Nieren histologisch und immunhistologisch untersucht.

2. *Autolyseversuche.* a) 13 Ratten (250 g Körpergewicht) erhielten intravenös je 10 mg Antibasalmembranglobulin in 1 ml 0,9 NaCl. 48 Std später wurden die Tiere getötet, durch einen dorsalen Paravertebralschnitt eine Niere entnommen und ein kleines Gewebestück sofort in N₂-gekühltem Isopentan eingefroren. Das restliche Nierengewebe wurde in feuchten Kammern bei +4° C, +20° C und +33° C zwischen 4 Std und 5 Tagen gelagert. Die Kadaver mit der verbliebenen Niere wurden bei diesen Temperaturen über den gleichen Zeitraum gehalten. Am Ende der jeweiligen Autolysezeit wurden die Nierengewebe für histologische und immunhistologische Untersuchungen asserviert.

b) Die Nieren zweier Ratten wurden 19 Tage nach intravenöser Applikation von je 10 mg Antibasalmembranglobulin entnommen und auf Nadelbiopsiegröße zugeschnitten. Ein Teil des Gewebes wurde sofort tiefgefroren, das Restmaterial in Tissue Tec (Ames) eingebettet, bei Zimmertemperatur zwischen 6 Std und 4 Tagen gelagert und anschließend tiefgefroren sowie in Formalin fixiert.

c) 8 Ratten erhielten je 8 mg Antibasalmembranglobulin, 16 Ratten je 10 mg i.v. 20 min nach der Injektion wurden alle Tiere getötet und die Kadaver 48 Std bei +20° C gelagert. Danach wurden die Nieren entnommen, 5 min im Eisbad mit dem doppelten Volumen 0,9% NaCl homogenisiert (Ultraturrax). Das aus dem Zentrifugat (2. 500 UPM) gewonnene, mehrfach mit 0,9% NaCl gewaschene Sediment wurde zur Elution der basalmembranfixierten Antikörper mit dem 10fachen Sedimentvolumen Citratpuffer pH 3,2 bei 37° C 2 Std unter stetem Schütteln inkubiert. Das mit NaOH neutralisierte Eluat wurde durch Unterdruckdialyse auf 1,6 ml eingengt.

Einer unilateral nephrektomierten Ratte wurde das eingengte Eluat aus den Nieren der 8 Ratten (8 mg Antikörper injiziert) oberhalb des Abgangs der Nierenarterie in die Aorta injiziert. Nach 20 min wurde die Niere zur immunhistologischen Untersuchung entnommen.

Das Niereneluat der 16 mit je 10 mg Antikörper injizierten Ratten wurde einer Ratte i.v. injiziert. 3 Tage später wurden beide Nieren zur histologischen und immunhistologischen Untersuchung entnommen. Als Kontrolle diente eine Ratte, der das eingengte Eluat aus 16 Kadavernieren nicht vorbehandelter Tiere intravenös injiziert wurde.

3. *Immunhistologische Untersuchungen.* Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden folgende Antiseren verwandt: Anti-Kaninchen-IgG (Fluoreszenzmarkiert, Behringwerke) sowie Ratten-7S-Globulin (Fluoreszenzmarkiert, Hyland).

Peroxydasemarkiertes Anti-Kaninchen-IgG: Aus Anti-Kaninchen-IgG-Serum von der Ziege (Behringwerke) wurde mittels Immunadsorption die Immunglobulinfraktion isoliert (Methode: Jungfer und Tremper 1972) und mit Peroxydase Reinheitsgrad I (Boehringer, Mannheim) in Anlehnung an die von Avrameas und Ternynck (1969) angegebene Methode markiert.

Für immunhistologische Untersuchungen wurden 4 µ dicke acetoxifizierte Kryostat-schnitte bei Zimmertemperatur mit den angegebenen Antiseren 30 min inkubiert, in phosphatgepufferter 0,9% NaCl-Lösung (PBS) gewaschen und in Glycerin-PBS (1:9 Vol/Vol) eingedeckt. Kontrollschnitte wurden zuerst mit nicht fluoreszenzmarkiertem Antiserum und nach 3 × 10 min Waschen in PBS mit fluoreszenzmarkiertem Antiserum inkubiert. Peroxydasemarkierte Antikörper wurden durch eine 30 min dauernde Inkubation in einer Lösung

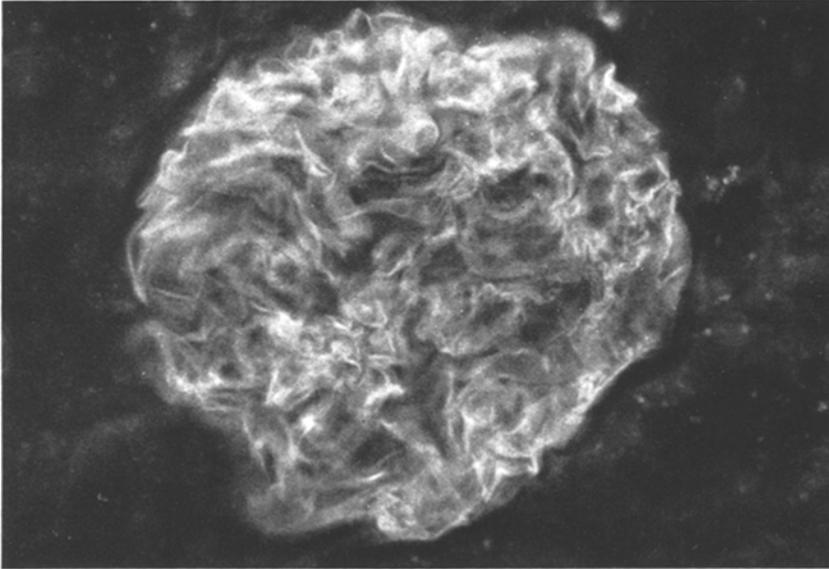


Abb. 1. Rattenniere, 90 min nach intravenöser Applikation von 1 ml Anti-Basalmembranserum vom Kaninchen. Homogen-lineare Ablagerungen von Kaninchen-IgG entlang der glomerulären Basalmembran (fluoreszenzmarkiertes Anti-Kaninchen-IgG). Mikroskopvergrößerung 312,5fach

von 25 mg 3,3'—4,4'-Diphenyltetramin-Tetrahydrochlorid + 0,001% H_2O_2 in 100 ml 0,05 M Tris-Puffer pH 7,6 dargestellt.

Für histologische Untersuchungen wurden die Gewebe in 10% gepuffertem Formalin fixiert, Paraffinschnitte wurden mit HE, PAS und der Chloracetatesterase-Reaktion gefärbt.

Ergebnisse

1. Nephritogene Eigenschaften des Antiserums

90 min nach der Injektion von 1 ml Antibasalmembranserum konnte immunhistologisch eine homogen-lineare Ablagerung von Kaninchen-IgG entlang der glomerulären Basalmembran der Rattenniere sowie eine vermehrte intrakapilläre Leukocytose nachgewiesen werden (Abb. 1, 2a). Die tägliche Proteinausscheidung im Urin stieg nach Applikation des Antiserums innerhalb von 3 Tagen von durchschnittlich 7,6 mg auf 35,7 mg an. Eine Schwellung der Endothel- und Mesangiumzellen sowie ein vermehrter Zellgehalt der Glomeruli prägten das morphologische Bild (Abb. 2b).

2. Einfluß der Autolyse auf die Darstellbarkeit der Immunglobuline

Die unmittelbar nach der Entnahme tiefgefrorenen Nieren sämtlicher mit 10 mg Antibasalmembranglobulin injizierter Versuchstiere zeigten homogen-lineare Ablagerungen von Kaninchen-IgG entlang der Basalmembran der Glomerulus-



capillaren. Eine 3tägige Lagerung der Kadaver bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. der Nierengewebe-
stücke in feuchten Kammern bei $+4^{\circ}\text{C}$ beeinträchtigte nicht den Nachweis des
homogen-linear entlang der Basalmembran abgelagerten Kaninchen-IgG. Ein
Unterschied im immunhistologischen Bild gegenüber sofort eingefrorenen Gewe-
ben bestand nicht. Die gleichen Ergebnisse wurden nach Lagerung bei 20°C
erhalten.

Nach Lagerung bei 33°C in feuchten Kammern konnten die Immunglobuline

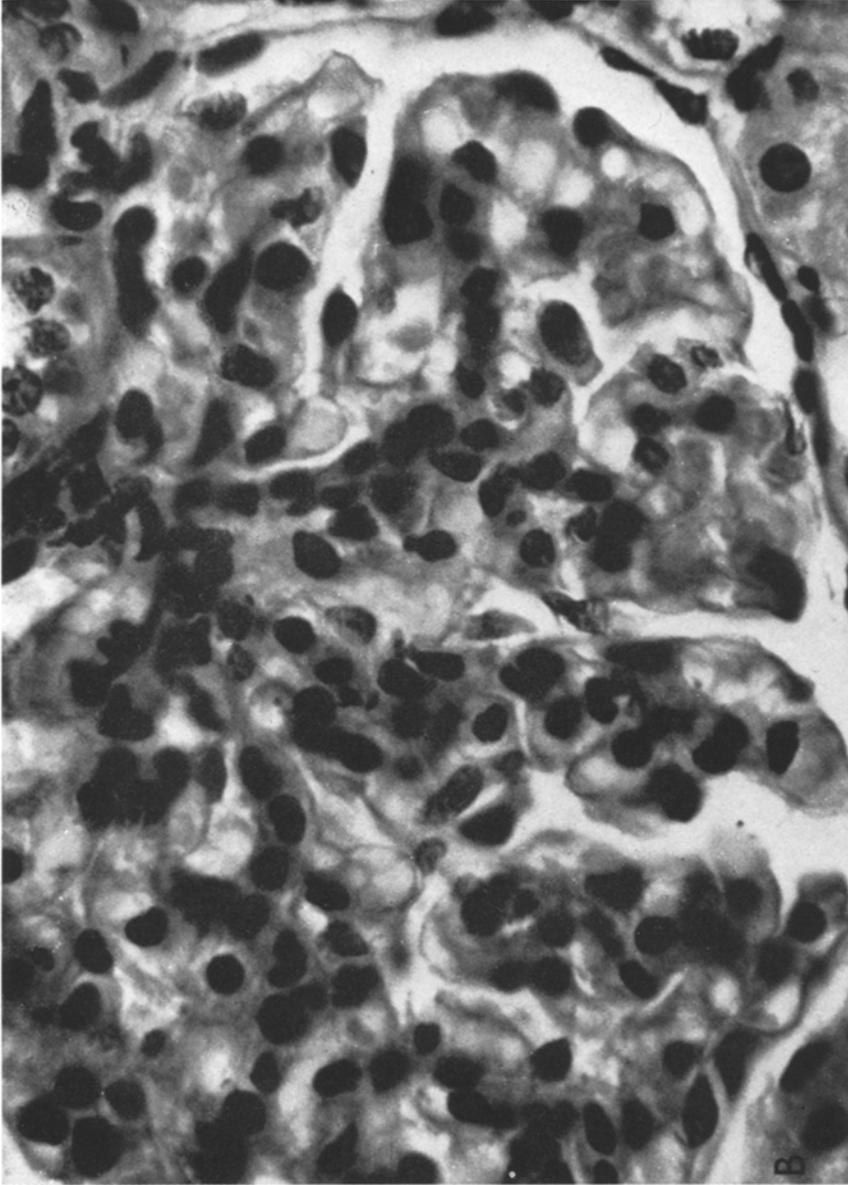


Abb. 2. (A) Rattenniere, 90 min nach intravenöser Applikation von 1 ml Anti-Basalmembranserum vom Kaninchen. Intracapilläre Leukozytose (→). Formalin, Paraffin, Chloracetateserereaktion, (B) Rattenniere, 3 Tage nach intravenöser Applikation von 1 ml Anti-Basalmembranserum vom Kaninchen. Vermehrte Zellgehalt des Glomerulus, Endothelzellschwellung. Formalin, Paraffin, H.E. (A, B) Mikroskopvergrößerung 312,5fach

bis zu 3 Tagen in homogen-linearer Form an der Basalmembran nachgewiesen werden. Die Autofluoreszenz des Tubulusepithels nahm nach 2—3 Tagen jedoch stark zu. Dieser störende Effekt konnte durch die Verwendung peroxydasemarkierter Antikörper zur Darstellung der Immunglobuline umgangen werden. Die in den Kadavern belassenen Nieren erlaubten sogar nach 5tägiger Lagerung bei 33° C eine gute Darstellung der Immunglobuline (Abb. 3). Entsprechende mit PBS inkubierte Kontrollschnitte zeigten eine homogen-lineare Autofluoreszenz

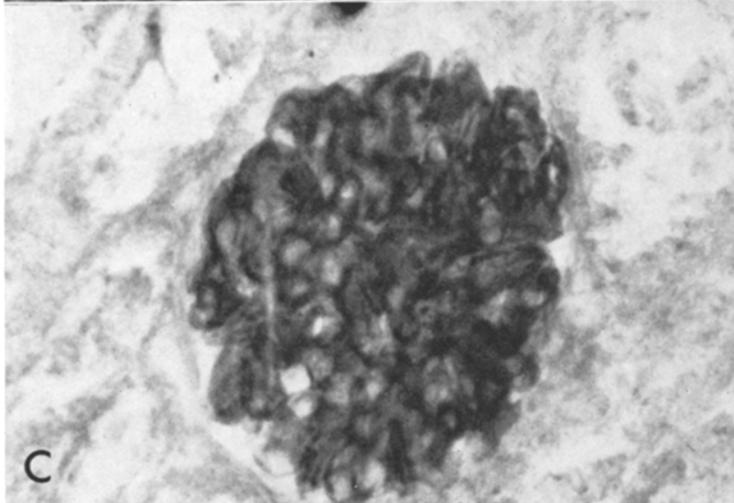
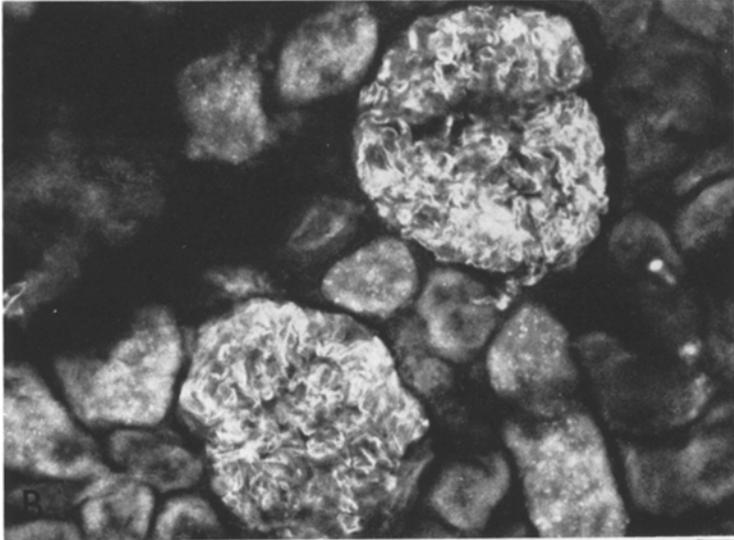
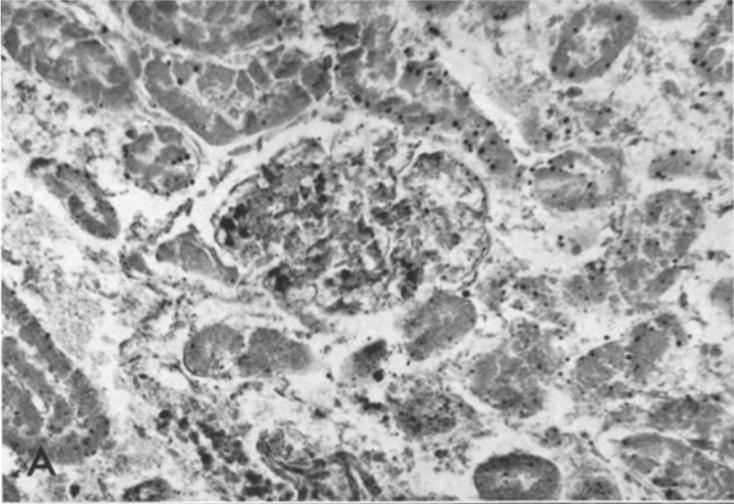


Abb. 3 A—C

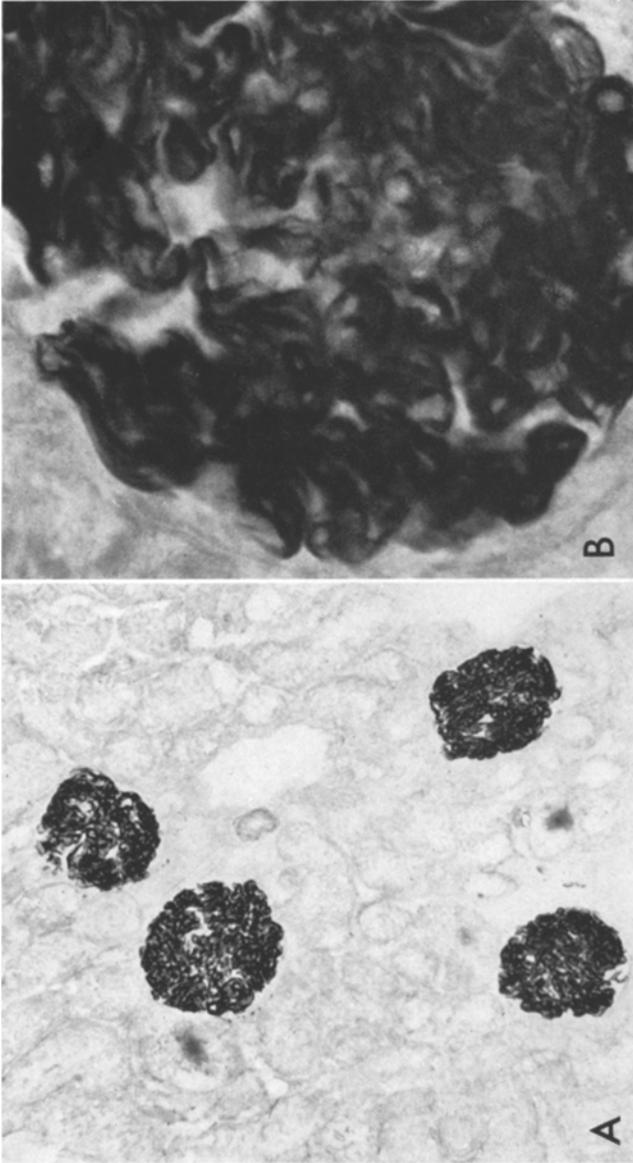


Abb. 4 A u. B. Ratteniere, intraarterielle Applikation eines Eluats aus 2 Tage alten mit Anti-Basalmembranglobulin vorbehandelten Kadavern. Homogen-lineare Ablagerungen der Anti-Basalmembranglobuline entlang der glomerulären Basalmembran (peroxydasemankiertes Anti-Kaninchen-IgG). (A) Mikroskopvergrößerung 50fach. (B) Mikroskopvergrößerung 312,5fach

Abb. 3A—C. Ratteniere nach Applikation von 10 mg Anti-Basalmembranglobulin i.v. 5 Tage Autolyse im Kadaver bei 33° C. (A) Weit fortgeschrittene Autolyse des Gewebes Formalin, Paraffin, HE. (B und C) Basalmembranständige homogen-lineare Immunglobulinablagerungen mit fluorescenz (B) — und peroxydase (C) — markiertem Anti-Kaninchen-IgG noch deutlich nachweisbar. Starke Autofluorescenz des autolytischen Tubulusgewebes. (A, B, C) Mikroskopvergrößerung 125fach

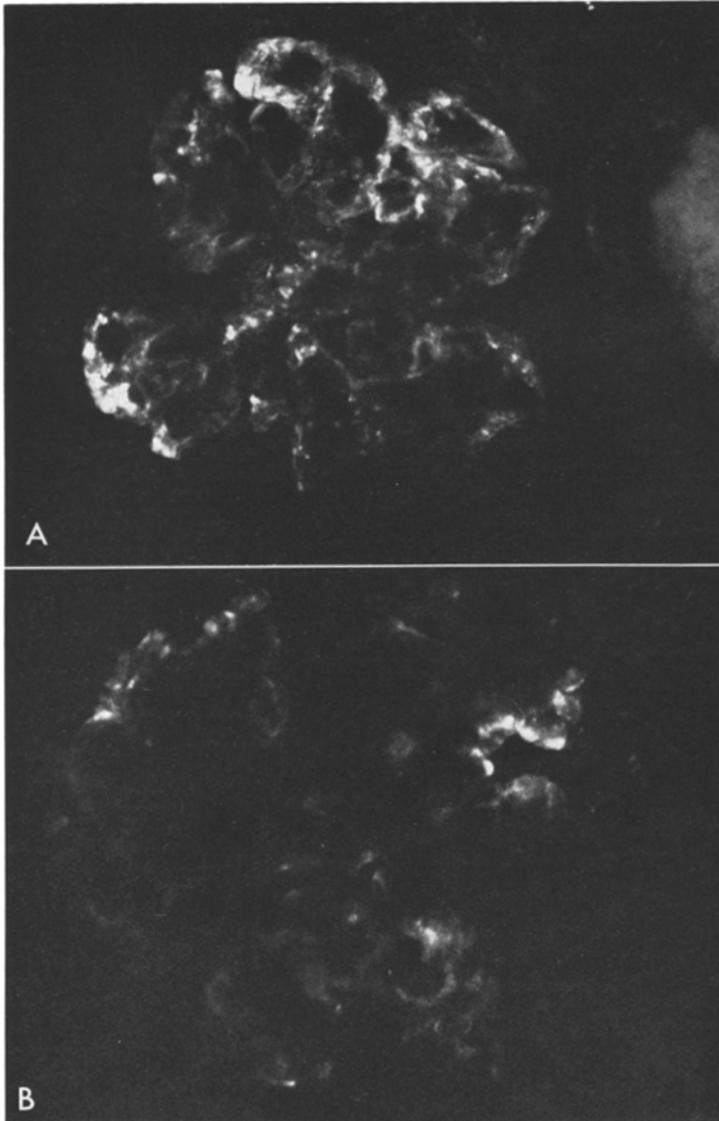


Abb. 5 A—D. Niere, 13 Monate altes Mädchen, mesangiale Sklerose. Fokale segmentale bis generalisierte basalmembranständige granuläre Ablagerungen von IgM (A) und C_3 (B). (C) 24 Std post mortem entnommene Niere 3 Wochen nach der Punktion. Granuläre IgM Ablagerungen an der Basalmembran sowie im Mesangium. (D) Starke Verbreiterung und Sklerosierung des Mesangium (Formalin, Paraffin, PAS). (A, B, C und D) Mikroskopvergrößerung 125fach

der Basalmembran, die jedoch wesentlich schwächer und sowohl im Farbton als auch in der Brillanz anders geartet war als die spezifische Fluoreszenz der mit markiertem Antiserum behandelten Schnitte.

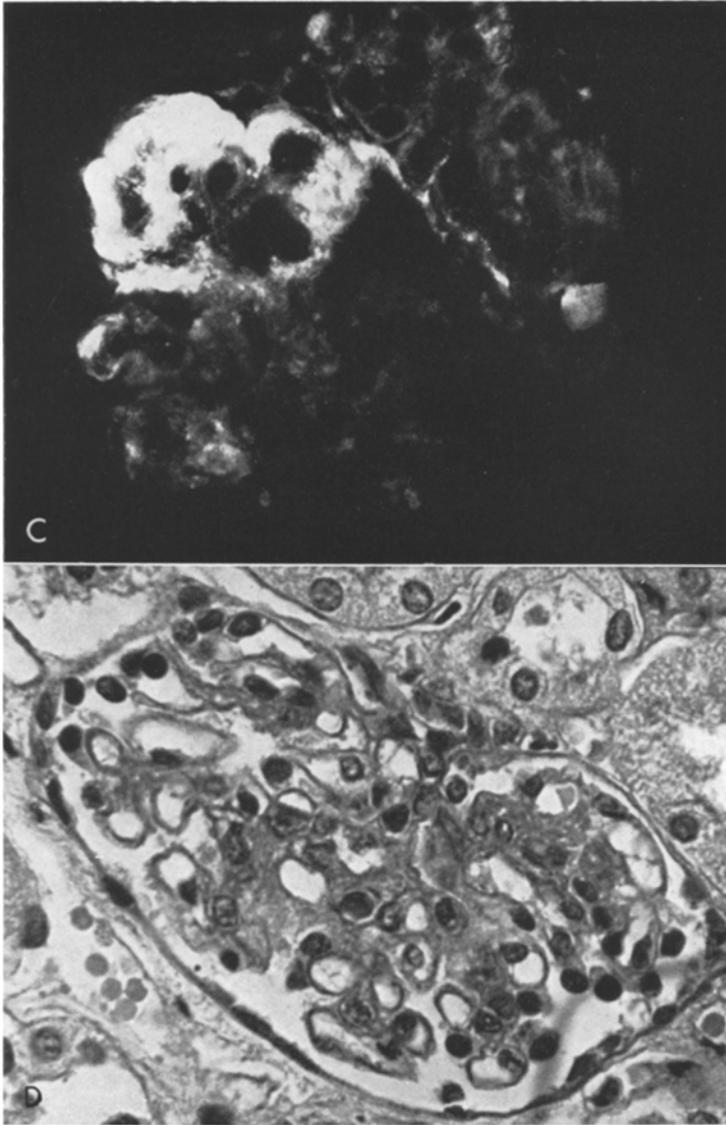


Abb. 5 C—D

Das in Tissue Tec eingebettete, auf Biopsiegröße zugeschnittene Nierengewebe zeigte bei einer Lagerung bis zu 3 Tagen bei 20° C keine wesentlichen Unterschiede gegenüber sofort eingefrorenem Material. Die Autofluoreszenz des autolytischen Tubulusepithels stieg proportional der Lagerungszeit an, störte jedoch bis zu einem Zeitpunkt von 3 Tagen nicht den Nachweis der Immunglobuline im Glomerulus. Da bei den Tieren dieser Versuchsserie schon eine Immunglobulinproduktion gegen das artfremde Kaninchen-IgG eingetreten war

(Injektion des Anti-Basalmembranglobulins 19 Tage vor Entnahme der Niere), stellten sich auch Rattenimmunglobuline entlang der Basalmembran in homogen-linearem Ablagerungsmuster dar. Auch nach 4tägiger Lagerung in Tissue Tee bei 20° C ließ sich Kaninchen-IgG und Ratten-IgG an der Glomerulusbasalmembran noch nachweisen, das homogen-lineare Ablagerungsmuster war jedoch beeinträchtigt. Zu diesem Zeitpunkt störte die vermehrte Autofluoreszenz des autolytischen Gewebes die Beurteilung.

3. Basalmembranfixierung der eluierten Antikörper

8 Ratten erhielten vor der Tötung je 8 mg Antibasalmembranglobulin i. v. Nach 2tägiger Autolyse bei 20° C wurden die Antikörper aus den Nieren eluiert und das eingeeengte Eluat einer unilateral nephrektomierten Ratte injiziert. 20 min nach der Injektion des Eluats konnten an der Rattenniere homogen entlang der Basalmembran abgelagerte Kaninchen-Immunglobuline nachgewiesen werden (Abb. 4). Die Injektion eines eingeeengten Eluats aus 32 autolytischen Nieren von 16 Tieren, die je 10 mg Antibasalmembranglobulin erhalten hatten, führte ebenfalls zu einer typischen homogen-linearen Ablagerung von Kaninchen-Immunglobulinen entlang der Basalmembran, die nach Injektion eines Eluats aus autolytischen Kontrollnieren nicht eintrat.

Diskussion

An der Glomerulusbasalmembran abgelagerte Immunglobuline können auch nach mehrtägiger Autolyse, zu einem Zeitpunkt an dem die histologische Befundung des Gewebes unergiebig wird, dargestellt werden. Selbst nach 5 Tagen Lagerung bei einer Temperatur von 33° C gelang der Nachweis von Basalmembran fixierten Antikörpern in Kadavernieren. Durch die Verwendung peroxydase-markierter Antiseren wurde eine die Immunglobulinablagerungen vortäuschende unspezifische Fluoreszenz der autolytischen Basalmembran ausgeschlossen. Da nach 2tägiger Autolyse aus den Kadavernieren Kaninchen-Immunglobuline eluiert wurden, deren Bindungsfähigkeit an die glomeruläre Basalmembran erhalten blieb, liegt eine unspezifische Bindung der zum immunhistologischen Nachweis verwandten markierten Antikörper nicht vor.

Immunhistologische Untersuchungen an nicht lebensfrisch gewonnenem Gewebe erscheinen nach den vorliegenden Ergebnissen möglich und sinnvoll. So zeigte z.B. der Vergleich einer 3 Wochen vor dem Tode entnommenen Nierenbiopsie mit dem 24 Std post mortem erhaltenen Nierengewebe eines Kindes mit mesangialer Sklerose ein identisches Muster der Immunglobulinablagerungen (Abb. 5). Auch bei Biopsiematerial können ausgezeichnete immunhistologische Resultate noch nach längerer Lagerung erzielt werden, sofern eine Austrocknung des Gewebes verhindert wurde. Immunhistologische Untersuchungen an Biopsiematerial, das von auswärtigen Kliniken versandt, über mehrere Stunden zwischen mit physiologischer NaCl getränkten Kompressen gelagert wurde, werden regelmäßig mit gutem Erfolg durchgeführt.

Obwohl die unmittelbar nach der Gewebeentnahme durchgeführte Tieffrierung bei -120° C für immunhistologische Untersuchungen die optimale Behandlung

darstellt, ist eine mehrstündige Lagerung der feuchtgehaltenen Biopsie einem unsachgemäßen gewebezerstörenden Einfrieren bei -20°C vorzuziehen.

Literatur

- Avrameas, S., Ternynck, T.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* **6**, 53 (1969)
- Hoyer, J. R., Michael, A. F., Good, R. A., Vernier, R. L.: The nephrotic syndrome of infancy: clinical, morphologic and immunologic studies of four infants. *Pediatrics* **40**, 233 (1967)
- Jungfer, H., Tremper, R.: Isolierung der gruppenspezifischen Komponente (Gc) des Humanserums durch Immunadsorption. *Z. Immun.-Forsch.* **143**, 6 (1972)
- Koffler, D., Agnello, U., Carr, R. I., Kunkel, H. G.: Variable patterns of immunglobulin and complement deposition in the kidney of patients with systemic lupus erythematosus. *Amer. J. Path.* **56**, 305 (1969)
- Kouvalainen, K.: Immunological features in the congenital nephrotic syndrome. *Ann. Paediat. Fenn.* **9**, Suppl. 22, 1 (1963)
- Willoughby, W. F., Dixon, F. J.: Experimental hemorrhagic pneumonitis produced by heterologous anti-lung-antibody. *J. Immunol.* **104**, 28 (1970)

PD Dr. H. P. Seelig
Institut für Immunologie
D-6900 Heidelberg 1
Voßstr. 2
Bundesrepublik Deutschland