

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 409—412, Juli 1970

Die therapeutische Beeinflussung einer experimentellen Nephritis durch homologe Nierenmitochondrien¹⁾

Von H. SARRE und E. VONEND

Medizinische Poliklinik der Universität Freiburg im Breisgau

(Eingegangen am 9. Februar 1970)

Ratten, in denen durch Anti-Nieren-Serum eine „Masugi“-Nephritis erzeugt worden war, wurden mit verschiedenen Zellpartikelfrak-tionen intravenös bzw. intraperitoneal behandelt. Als quantitative Erfolgskriterien dienten vor allem die Verminderung der Proteinurie und des Serum-Reststickstoffs sowie die Normalisierung des Serumproteins. Günstige Wirkungen wurden nach intravenöser Applikation intakter, homologer Nierenmitochondrien, aber auch mit ultraschallbehandelten Mitochondriendispersionen erzielt. Die anderen Fraktionen waren bei intravenöser Injektion immunologisch unverträglich, bei intraperitonealer Applikation gänzlich oder nahezu wirkungslos.

The therapeutic effect of homologous kidney mitochondria in experimental nephritis

„Masugi“-nephritis was produced in rats by treatment with antikidney serum. The animals were then treated with various cell particle fractions by intravenous and intraperitoneal injection respectively. The therapeutic effects were quantized by measurements of proteinuria, and the non-protein nitrogen and total protein of serum. Favourable results were obtained by intact homologous kidney mitochondria as well as by mitochondrial sonicates applied intravenously. The other particulate cell fractions, when injected intravenously, showed immunologic intolerance and were rather ineffective when applied intraperitoneally.

Die durch heterologe nephrotrope Antikörper erzeugte Glomerulo-Nephritis-Nephrose („Masugi-Nephritis“) entspricht sowohl klinisch als auch histologisch weitgehend der menschlichen Glomerulonephritis (vgl. FAHR (1)) und stellt deshalb ein gutes tierexperimentelles Modell für pathogenetische, funktionelle und therapeutische Studien dar. Anknüpfend an Ergebnisse von HÖRZL, LAUDAHN und LÜDERS (2—10), die durch Behandlung mit homologen Lebermitochondrien eine klinische und histologische Besserung der durch Tetrachlorkohlenstoff erzeugten Leberschädigung sahen, wurde versucht, „Masugi“-Nephritiden mit homologen Nierenmitochondrien zu behandeln. SCHNELLBACHER (11) und KÖPP (12) aus unserem Arbeitskreis hatten hierbei bereits positive Ergebnisse erzielt. In dieser Arbeit werden diese erweitert und auf andere Zellfraktionen sowie auf Ultraschall behandelnde Mitochondrien ausgedehnt.

Material und Methoden

In allen Versuchen wurden männliche Inzuchtratten (WISTAR, 100—200 g) verwandt, die in Stoffwechsellkäfigen gehalten und täglich mit einer definierten Menge Standarddiät (Firma LÄTZ, Buskirchen), zur Vermeidung diätabhängiger Proteinurierschwankungen (13), gefüttert wurden.

Anti-Rattennieren-Serum wurde aus Kaninchen nach der Methode von ROTHER (14) gewonnen. 0,4—0,5 ml Anti-Rattennieren-Serum/100 g Körpergewicht führten zu einer deutlichen Nephritis. Die Aktivität des Antiserums sank auch in tiefgefrorenem Zustand in einem Zeitraum von einigen Monaten allmählich ab und mußte vor Wiederverwendung neu bestimmt werden.

Protein wurde nach der Biuret-Methode nach I. C. (15), Reststickstoff im Serum nach KJELDAHL (modifiziert von KLINGMÜLLER (16) bestimmt.

Die Zellfraktionen wurden aus den dekapulierten Nieren frisch getöteter Ratten gewonnen: die zerkleinerten Organe wurden

in 0,25 M Saccharose-Lösung (0,25 M Tris-HCl-Puffer pH 7, 4 enthaltend) nach POTTER und ELVEHJEM (17) homogenisiert und dann nach der Methode von SCHNEIDER und HOGEBOM (18) in einer Sorvall-RC2-B-Zentrifuge fraktioniert. Die sahnigelbe Auflage-rung des bei 700 g (10 Min.) sedimentierten und mit gleichem Medium gewaschenen Niederschlags wird im folgenden als „Zell-trümmerfraktion“ bezeichnet; elektronenoptisch ließen sich darin neben einigen Mitochondrien Kernfragmente und Faserlemente erkennen. Die bei 5000 g (10 Min.) sedimentierte und 2mal bei 24000 g (19 Min.) rezentrifugierte Fraktion besteht aus elektronenmikroskopisch fast reinen Mitochondrien („Mitochondrienfraktion“). Die Überstände der Mitochondriensedimente wurden 2mal je 1 Std. bei 41000 g zentrifugiert; das Sediment enthielt neben Mikrosomen vorwiegend Ergastoplasma-Elemente und Zellmembranen („Membranfraktion“). Alle partikulären Fraktionen wurden im genannten Medium im Verhältnis 1:8 suspendiert und umgehend in die Tierversuche eingesetzt.

Ein Teil der frischbereiteten Mitochondriensuspension wurde insgesamt 10 Min. lang unter Wasserkühlung ultrabeschallt¹⁾, wobei die Beschallung jeweils nach 30 Sek. für 30 Sek. unterbrochen wurde. Es resultierte eine klare, braune Dispersion.

Die Mitochondriensuspensionen wurden nach der Methode von BERNATH und SINGER (19) nach ihrem Gehalt an Succinat-Dehydrogenase und an Protein standardisiert. Die Bestimmung von Succinat-Dehydrogenase erfolgte im Warburg-Apparat mit Phenazin-methosulfat. Die Einstellung der Mitochondriensuspensionen entspricht der von SCHNELLBACHER (11), KÖPP (12) und KUHL (24). Diese Autoren geben als Aktivitätseinheit für Succinat-Dehydrogenase das Volumen an Mitochondriensuspension an, das 1 µl O₂/Min. veratmet. Bezogen auf mg Protein ergibt sich daraus die spezifische Aktivität, die durchschnittlich bei 7—14 lag. Wie SCHNELLBACHER und KÖPP (12) nachweisen konnten, liegt die Dosis für den besten therapeutischen Effekt der Mitochondriensuspension auf die experimentelle Rattennephritis bei 2,5—5,0 Aktivitätseinheiten entsprechend 0,36 mg Protein. Wir verdünnten die Mitochondriensuspensionen mit isotoner Saccharoselösung so, daß die angegebenen Aktivitätseinheiten in 0,2 ml Lösung enthalten waren. Die Lösung hatte dann einen Proteingehalt von 1,8 mg/ml und enthielt 2,5—5,0 Aktivitätseinheiten Succinat-Dehydrogenase pro 0,2 ml. SADAYOSHI, HASHIMOTO und Mitarbeiter (26) führten ähnliche Versuche mit Mitochondrien-

¹⁾ Mit Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

¹⁾ Schoeller & Co., Frankfurt, 20 kHz, 750 W, 0,6 A Betriebsstärke.

suspensionen durch, deren Proteingehalt 1,5 mg/ml betrug. Da die Succinat-Dehydrogenase-Aktivitätsmessungen sehr aufwendig sind, standardisierten wir die Suspensionen später nach dem Eiweißgehalt, der auch dabei 1,8 mg/ml betrug. Die übrigen Zellfraktionen wurden auf den gleichen Eiweißgehalt eingestellt. Daneben führten wir Aktivitätsmessungen der Cytochrom-c-Oxydase nach DALLNER und Mitarbeiter (20) durch, um sicherzustellen, daß wir intakte Mitochondrien verwendeten. Die Messungen erfolgten jedoch wegen der Trübung der Mitochondriensuspensionen nur qualitativ. Die Signifikanzberechnungen wurden nach FISCHER-STUDENT mit Hilfe der Geigy-Tabellen durchgeführt.

Ergebnisse

Die Wirkung verschiedener Zellfraktionen auf „Masugi“-nephritische Ratten wurde in zwei Versuchsreihen geprüft. Als quantitative Parameter eines Therapieerfolges wurden herangezogen: die wöchentliche Gewichts-differenz der Tiere, die tägliche Urinmenge und der Urinproteingehalt und (am Ende des Versuchs) der Reststickstoff im Serum und das Gesamtprotein des Serums. Diese Werte wurden verglichen mit denen von Kontrolltieren, deren gleichzeitig erzeugte „Masugi“-Nephritis unbehandelt blieb.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung intraperitoneal applizierter „Membranfraktionen“ und „Zelltrümmerfraktionen“ sowie intravenös injizierter Mitochondrien untersucht. 72 Ratten wurde je 0,4 ml Anti-Rattennieren-Serum/100 g Tier intravenös in die Schwanzvene injiziert. Dies führte bei allen Tieren zu einer mittelschweren Nephritis-Nephrose, die bei den Kontrollen ihren Höhepunkt am 8. Tag mit einer mittleren Proteinurie von 168 mg/Tag erreichte. Die Tiere wurden in 4 gleiche Kollektive aufgeteilt, deren eines als Kontrolle diente; einem zweiten wurde die Mitochondrien-Suspension (5 Aktivitätseinheiten Succinat-Dehydrogenase) in die Schwanzvene injiziert, die dritte und vierte Gruppe erhielt jeweils die gleiche Menge (auf Proteingehalt bezogen) an „Zelltrümmer“- bzw. „Zellmembran“-Fraktion intraperitoneal. Versuche an Normalratten hatten ergeben (11, 12), daß die intravenöse Applikation von Nierenmitochondrien von den Tieren gut vertragen wurden, also weder eine toxische noch eine immunologische Reaktion zu befürchten ist. Dagegen führten die beiden anderen Zellfraktionen zu schweren Schockzuständen und zum Tod der Tiere, so daß hier nur die intraperitoneale Verabfolgung möglich war. Aus der Abbildung 1 sowie den Tabellen 1 und 2 ist zu ersehen, daß die Behandlung mit Mitochondrien-Sus-

pension zu einer signifikanten Erniedrigung der Proteinurie, zu einer Normalisierung der Serumproteinwerte und zu einer deutlichen Verringerung des Serum-Reststickstoffes gegenüber der Kontrollgruppe führte. Auch hinsichtlich der äußeren Symptome, wie Ödembildung,

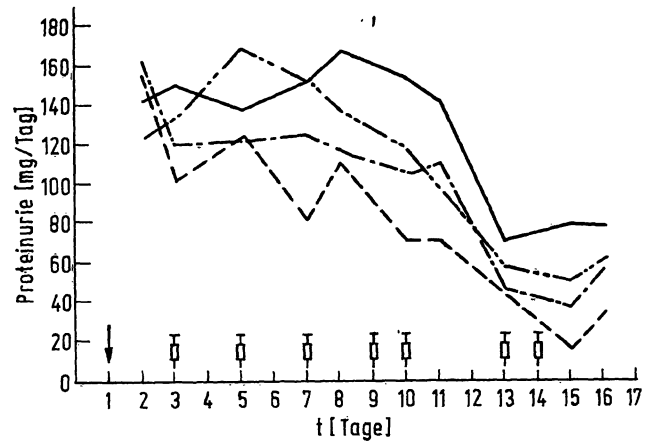


Abb. 1
Mittlere Proteinurie von vier Gruppen von Ratten mit „Masugi“-Nephritis (je 17—19 Tiere), I. Hauptserie. Die mit Injektionsspritzen markierten Tage geben die Behandlungstage an. Injiziert wurden jeweils 0,4 ml Anti-Rattennieren-Serum am 1. Tag (Pfeil)
Behandlung: ohne: ———
Zellmembran-Fraktion i. p. ······
Zelltrümmer-Fraktion i. p. - · - ·
Mitochondrien-Fraktion i. v. - - - -

Tab. 1
Ergebnisse der Signifikanz-Berechnungen

I. Versuchsserie		
1. Mitochondrien-Gruppe—Kontrollgruppe		
Proteinurie/Tag	5. Tag P: 0,60—0,50 11. Tag P: 0,01—0,001 15. Tag P: 0,01—0,001 16. Tag P: 0,001	nicht signifikant signifikant signifikant hochsignifikant
Gesamt-Eiweiß im Serum	P: 0,001	hochsignifikant
Rest-Stickstoff im Serum	P: 0,001	hochsignifikant
2. Zelltrümmer-Gruppe—Kontrollgruppe		
Proteinurie/Tag	5. Tag P: 0,50—0,40 11. Tag P: 0,01—0,20 15. Tag P: 0,01—0,001 16. Tag P: 0,05—0,02	nicht signifikant nicht signifikant signifikant signifikant
Gesamt-Eiweiß im Serum	P: 0,001	hochsignifikant
Rest-Stickstoff im Serum	P: 0,001	hochsignifikant
3. Zellmembranen-Gruppe—Kontrollgruppe		
Proteinurie/Tag	5. Tag P: 0,20—0,10 11. Tag P: 0,10—0,05 15. Tag P: 0,20—0,10 16. Tag P: 0,20—0,10	nicht signifikant nicht signifikant nicht signifikant nicht signifikant
Gesamt-Eiweiß im Serum	P: 0,01—0,001	hochsignifikant
Rest-Stickstoff im Serum	P: 0,001	hochsignifikant

Tab. 2
Ergebnis der I. Versuchsserie

Gruppe	Applikation	Sterblichkeit	Körpergewicht, Mittelwerte		verringerte Proteinurie P signifikant	Gesamteiweiß im Serum Mittelwerte		Rest-Stickstoff im Serum, Mittelwerte	
			zu Beginn	am Ende		P	P		
Mitochondrien-Tiere (n = 18)	intra-venös	2 Tiere	133 g	132 g	ab 11. Tag	6,5 g/100 ml	0,001	44,5 mg/100 ml	0,001
Zelltrümmer-Tiere (n = 18)	intra-peri-toneal	1 Tier	126 g	131 g	ab 15. Tag	6,1 g/100 ml	0,001	43,7 mg/100 ml	0,001
Zellmembranen-Tiere (n = 17)	intra-peri-toneal	1 Tier	132 g	130 g	nicht signifikant	5,1 g/100 ml	0,01—0,001	50,0 mg/100 ml	0,001
Kontroll-Tiere (n = 19)	—	2 Tiere	126 g	124 g	—	4,5 g/100 ml	—	63,7 mg/100 ml	—

Fellbeschaffenheit und Freßlust, zeigten die behandelten Tiere einen deutlich verbesserten Zustand.

Die mit der „Zelltrümmerfraktion“ behandelten Nephritis-Tiere zeigten nur hinsichtlich der Serumwerte und des äußeren Eindrucks eine Verbesserung, die Verringerung der mittleren Proteinurie war kaum signifikant.

Der Effekt der „Membranfraktion“ war wesentlich geringer, sowohl in bezug auf das Serumprotein als auch auf den Reststickstoff und den äußeren Eindruck.

Die 2. Versuchsserie (Abb. 2, Tab. 3 und 4) umfaßte 73 Tiere, die jeweils 0,5 ml/ Anti-Rattennieren-Serum/ 100 g Tiergewicht einer weniger aktiven Charge Anti-Rattennieren-Serum intravenös erhielten; sie zeigten

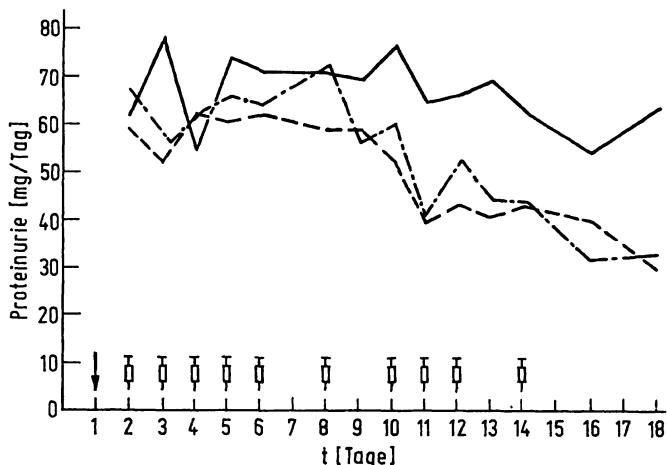


Abb. 2

Mittlere Proteinurie von drei Gruppen von Ratten mit „Masugi“-Nephritis (je 24 bis 25 Tiere), II. Hauptserie. Die mit Injektions-spritzen markierten Tage geben die Behandlungstage an. Injiziert wurden jeweils 0,5 ml Anti-Rattennieren-Serum am 1. Tag.

Behandlung: ohne ———
Mitochondrienfraktion i. v. - - - -
Mitochondrienfraktion, ultraschallt i. v. - . . .

Tab. 3
Ergebnisse der Signifikanz-Berechnungen

II. Versuchsserie		
1. Mitochondrien-Gruppe—Kontrollgruppe		
Proteinurie/Tag	6. Tag P: 0,50—0,40 11. Tag P: 0,001 16. Tag P: 0,05—0,02	nicht signifikant hochsignifikant signifikant
Gesamt-Eiweiß im Serum	P: 0,001	hochsignifikant
Rest-Stickstoff im Serum	P: 0,10—0,05	nicht signifikant
2. Mitochondrien-Gruppe-ultraschallt—Kontrollgruppe		
Proteinurie/Tag	6. Tag P: 0,70—0,60 11. Tag P: 0,01—0,001 16. Tag P: 0,001	nicht signifikant signifikant hochsignifikant
Gesamt-Eiweiß im Serum	P: 0,001	hochsignifikant
Rest-Stickstoff im Serum	P: 0,90—0,80	nicht signifikant

Tab. 4
Ergebnisse der II. Versuchsserie

Gruppe	Applikation	Sterblichkeit	Körpergewicht Mittelwerte		verringerte Proteinurie P signifikant	Gesamteiweiß im Serum Mittelwerte P		Rest-Stickstoff im Serum Mittelwerte P	
			zu Beginn	am Ende			P		P
Mitochondrien-Tiere (n = 24)	intra-venös	3 Tiere	152 g	161 g	ab 11. Tag	6,1 g/100 ml	0,001	40,4 mg/100 ml	nicht signif.
Mitochondrien-Tiere (n = 24) (ultraschallt)	intra-venös	kein Tier	148 g	152 g	ab 11. Tag	6,3 g/100 ml	0,001	34,3 mg/100 ml	nicht signif.
Kontroll-Tiere (n = 25)	—	6 Tiere	148 g	123 g	—	4,7 g/100 ml	—	34,7 mg/100 ml	—

durchweg eine leichtere Verlaufsform der Nephritis (Proteinurie am 3. Tag: 78,5 mg Protein/Tag). 25 Tiere dienten als Kontrollgruppe; 24 Ratten wurde intravenös eine Mitochondrien-Suspension (5 Aktivitätseinheiten Succinat-Dehydrogenase), weiteren 24 Tieren in gleicher Weise eine ultraschallte Mitochondrien-Suspension gleichen Proteingehalts injiziert. In beiden Versuchsgruppen fiel die Proteinurie erst in der zweiten Behandlungswoche signifikant gegenüber den Kontrollen ab. Die Serumproteinwerte am Ende des Versuchs waren gegenüber den Kontrollen erhöht und im Bereich der Norm. Die unbehandelten Nephritis-Tiere zeigten hinsichtlich ihres Körpergewichts, ihres äußeren Zustands und ihrer Mortalität einen deutlich schlechteren Zustand als die behandelten Tiere.

Diskussion

Der Therapieerfolg an der „Masugi“-Nephritis der Ratte mit homologen Nierenmitochondrien wurde durch quantifizierbare klinisch-chemische Untersuchungen bestimmt und seine Signifikanz gegenüber unbehandelten Masugi-Nephritis-Tieren festgelegt. Hinsichtlich aller der für eine Nephritis charakteristischen Parameter erwies sich die Behandlung mit einer Mitochondrien-Suspension als erfolgversprechend. Erstaunlicherweise tritt der gleiche Effekt auch ein, wenn anstelle intakter Nierenmitochondrien ultraschallte Mitochondrienpräparate verwendet werden. Die strukturelle oder funktionelle Integrität dieser Zellpartikeln scheint demnach für die therapeutische Wirkung nicht entscheidend zu sein; damit verliert auch eine geäußerte Vermutung (9), daß geschädigte Mitochondrien in den Leberzellen durch die Mitochondrieninfusion ersetzt werden könnten, an Wahrscheinlichkeit. Es ist weiteren Untersuchungen vorbehalten, zu entscheiden, ob der therapeutische Effekt auf submitochondriale Partikel oder molekulare Komponenten der Mitochondrien zurückzuführen ist.

Die Untersuchungen von HÖTZL, LAUDAHN und LÜDERS (2—10) hatten gezeigt, daß durch die intravenöse Applikation von homologen Mitochondrien die Wiederherstellung einer Tetrachlorkohlenstoff-geschädigten Leber beschleunigt werden kann. Aus diesen Versuchen konnte weiterhin entnommen werden (7), daß eine gewisse Organaffinität zwischen den applizierten Mitochondrien und ihrem Muttergewebe besteht und die Organaffinität verstärkt wird, wenn eine Schädigung des korrespondierenden Gewebes vorhanden ist. Leistungsverbesserung

rungen geschädigter Herzmuskeln waren bei der Behandlung mit Herzmuskelmitochondrien beobachtet worden (21—23). Andererseits erwiesen sich, nach Befunden unseres Arbeitskreises (11, 12, 24), intraperitoneal injizierte Lebermitochondrien als wirkungslos bei der „Masugi“-Nephritis. Versuche von KUHLE (24) sprechen dafür, daß jedoch auch heterologe Nierenmitochondrien einen günstigen Effekt haben.

Ebenso, wie auch von LAUDAHN und LÜDERS hinsichtlich der Lebermitochondrien beschrieben, spielt die Dosierung bei diesen Therapieversuchen eine wesentliche Rolle. Eine optimale Mitochondrien-Dosis, entsprechend 2,5—5 Succinat-Dehydrogenase-Einheiten, war von SCHNELLBACHER (11) und KÖPP (12) ermittelt worden; niedrigere hatten entsprechend geringere, höhere jedoch bereits schädliche Wirkungen auf die Nephritis-Tiere.

Ein entscheidendes Problem bei der therapeutischen i. v. Applikation von Zellpartikeln ist die immunologische Verträglichkeit. Während sowohl die bei 750 g sedimentierte als auch die „Membranfraktion“ zu starken anaphylaktischen Prozessen führen, sind Mitochondrien auch intravasal sehr gut verträglich (25). Die Tatsache, daß sowohl die „Zelltrümmerfraktion“ als auch die „Membranfraktion“ bei intraperitonealer Applikation relativ gut vertragen werden, erhebt die Frage, wie rasch und in welchem Zustand diese Partikel in die allgemeine Zirkulation resorbiert werden; insofern ist ein Vergleich mit der Wirkung i. v. applizierter Mitochondrien-Suspensionen nicht ohne weiteres möglich.

Herrn Dr. P. ROHR, jetzt Pathologisches Institut der Universität Basel, danken wir für die Durchführung der elektronen-optischen Kontrollen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

1. FAHR, TH., *Klin. Wschr.*, 15, 505 (1936). — 2. HÖTZL, H. A. und G. LAUDAHN, *Ärztl. Wschr.* 11, 634 (1956). — 3. LAUDAHN, G., *Ärztl. Forsch.* 10, 513 (1956). — 4. LAUDAHN, G. und C. J. LÜDERS, I. Mitteilung; *Virchow's Arch.* 329, 581 (1957). — 5. H. A. HÖTZL, G. LAUDAHN und C. J. LÜDERS, *Berlin Med. Hefte* 10, 187 (1960). — 6. HÖTZL, H. A., *Münch. med. Wschr.* 102, 1670 (1960). — 7. LAUDAHN, G., C. J. LÜDERS und W. SCHUMACHER, *Zbl. exper. Med.* 133, 328 (1960). — 8. LAUDAHN, G. und C. J. LÜDERS, II. Mitteilung; *Arzneimittel-Forsch., Aulendorf* 10, 781 (1960). — 9. LAUDAHN, G. und C. J. LÜDERS, *Arzneimittel-Forsch., Aulendorf* 10, 978 (1960). — 10. HÖTZL, H. A., *Therapiewoche, Karlsruhe* 11, 506 (1961). — 11. SCHNELLBACHER, E., *Inaugural-Diss., Freiburg i. Br.*, (1966). — 12. KÖPP, P.: *Inaugural-Diss., Freiburg i. Br.*, (1967). — 13. SMADEL, J. E. und L. E. FARR, *J. Exper. Med.* 70, 615 (1939). — 14. ROTHER, K., „Experimentelle Nierenkrankheiten“ in: *Handbuch d. Exper. Pharm. New Series*. Herausg. O. EICHLER, A. FARAH, H. HERKEN und A. WELCH., Vol. XVI, Teil 4: Niere, Nierenbecken, Blase. Springer-Verl. Heidelberg 1965, p. 1. — 15. FRANK, H. und PH. KÖCHER, *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 197, 181 (1950). — 16. KLINGMÜLLER, Z. *analyt. Chem.* 131, 17 (1950). — 17. POTTER, V. R., E. A. ELVEHJEM, *J. biol. Chemistry* 114, 495 (1936). — 18. SCHNEIDER, W. C. und G. H. HOGEBOOM, *J. biol. Chemistry* 183, 123 (1949). — 19. BERNATH P. und T. P. SINGER, *Methods in Enzymol.* 5, 597 (1962). — 20. DALLNER, G., P. SIEKEVITZ und G. E. PALADE, *J. Cell Biol.* 30, 97 (1966). — 21. NÜSSGEN, W. und H. STOBOY, *Berl. Med.* 7, 364 (1956). — 22. SAUERTEIG, E., *Im Sitzungsbericht d. Berliner Pathologen-Vereinigung* v. 25. 6. 1957; *Zbl. allg. Path.* 97, 205 (1957/58). — 23. REISKY, P., *Berl. Med.* 11, 170 (1960). — 24. KUHLE, U., *Inaugural-Diss., Freiburg i. Br.* (1970). — 25. HENLE, W., L. A. CHAMBERS und V. GROUPE, *J. Exper. Med.* 74, 495 (1914). — 26. SADAYOSHI HASHIMOTO, S. KOMATSU und R. A. COWLEY, *Amer. Surgeon* 32, 231 (1966).

Prof. Dr. H. Sarre
Med. Poliklinik
78 Freiburg/i. Br.
Hermann-Herder-Str. 6