

Aus der I. Universitäts-Augenklinik Wien (Vorstand: Prof. Dr. A. PILLAT)

**Untersuchungen über den Antikörpergehalt (Präcipitine)
der Hornhaut nach gleichzeitiger Einverleibung
verschiedener Antigene**

Ein Beitrag zur Frage der lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut

Von

F. SCHWAB

Mit 9 Textabbildungen

Der Antikörpergehalt eines Gewebes ist nicht nur für die Widerstandsfähigkeit gegen Infektionen sondern auch für das Auftreten lokaler anaphylaktischer Phänomene von Bedeutung, da wie man heute allgemein annimmt, die Symptome anaphylaktischer Reaktionen auf den Folgen in vivo ablaufender Antigen-Antikörperreaktionen beruhen.

Die Immunitätsverhältnisse der gefäßlosen Hornhaut, sowie das Studium anaphylaktischer Erscheinungen und ihrer Folgezustände im durchsichtigen Hornhautparenchym sind nicht nur von theoretischem Interesse, sondern auch von großem praktischen Wert, da fast jede Erkrankung des Hornhautstromas zur Narbenbildung und damit zu einer dauernden Schädigung des Sehvermögens führen kann.

Die Ergebnisse tierexperimenteller Immunitätsforschung am Auge von F. LÖFFLER (1881), P. RÖMER (1902), S. MIYASHITA (1911), H. GEBB (1910, 1911), W. GRÜTER (1910, 1912), M. ZADE (1912), Z. BRÜCKNER (1929) und zahlreicher anderer Autoren haben schon frühzeitig für eine Reihe bakterieller Antigene und Toxine, Virus-Antigene sowie die verschiedensten Serumeiweißkörper, rote Blutkörperchen und anderer antigenen Substanzen gezeigt, daß die Hornhaut bei Entwicklung einer allgemeinen Immunität nicht nur an den aktiven sondern auch an den passiven Immunisierungsvorgängen des Gesamtorganismus teilnimmt.

Der auf dem Wege einer Immunisierung des Gesamtorganismus erreichte Immunitätsgrad der Hornhaut war aber meist so gering, daß sich die Hoffnungen, die Hornhaut durch aktive Immunisierung oder durch Einverleibung von Antisera vor einer Infektion zu schützen, nicht erfüllt haben (s. zusammenfassende Arbeiten L. POLEFF 1926, H. GASTEIGER 1928 u. a.).

Diese Tatsache sowie die Ergebnisse der bekannten Versuche über lokale Anaphylaxie der Hornhaut von K. WESSELY (1911), A. v. SZILY (1913, 1914) u. a. ließen das Problem örtliche Immunität der Hornhaut, Antikörpergehalt der Hornhaut, Beeinflussung des Antikörpergehaltes durch die verschiedensten Faktoren, Art und Spezifität der Antikörper und anderes immer mehr in den Vordergrund treten.

So hat sich schon W. GRÜTER (1910, 1912) bei seinen ausgedehnten tierexperimentellen Studien über die Beteiligung des Auges an der allgemeinen Vaccine-Immunität auch mit der Frage der lokalen Immunität der Hornhaut beschäftigt. Er konnte zeigen, daß nach Infektion der Hornhaut je nach Stärke der verwendeten Lymphe und Größe der primären Infektion eine regionäre oder eine Immunität der ganzen Hornhaut auftreten kann. Die übrigen Teile des infizierten Auges, sowie das andere nicht infizierte Auge und die Hautdecke nahmen an der Immunität nicht teil.

O. KUFFLER (zit. bei H. GASTEIGER 1928), Y. YAMADA (1930) u. a. konnten diese Befunde bestätigen, wobei KUFFLER im Gegensatz zu GRÜTER zeigen konnte, daß die Infektion einer Hornhaut auch die Hornhaut des anderen Auges gegen eine Ansteckung schützen kann. Wird nach einer primären Infektion der Hornhaut mit Variola-Vaccine die intracutane Nachimpfung der Hautdecke mit verdünnter Lymphe vorgenommen, so läßt sich auch eine Immunität der Hautdecke nachweisen (T. KURODA 1926).

Über ähnliche Befunde an der Kaninchenhornhaut — Auftreten einer regionären und spezifischen Immunität der Hornhaut nach Impferpes — berichten W. GRÜTER (1920), A. LÖWENSTEIN (1920), R. DOERR und K. VÖCHTING (1921) u. a.

Der Nachweis, daß beim Kaninchen nach Überstehen einer primären herpetischen Keratitis auch im Serum Antikörper auftreten können, gelang A. L. FLORMANN und S. W. TRADER (1947) sowie R. HALL, R. G. MAC KNESON und L. ORMSBY (1955).

Die Angaben über den Grad der erreichten Hornhautimmunität in diesen sowie in den Arbeiten zahlreicher anderer Autoren (s. zusammenfassende Darstellung A. C. WOODS, 1933) sind aber untereinander schwer vergleichbar, da mit wenigen Ausnahmen die Immunität der Hornhaut nur nach dem klinischen Bild der Hornhautveränderungen beim Immuntier im Vergleich zum Kontrolltier festgestellt worden war.

Untersuchungen, die nach lokaler intracornealer Einverleibung des Antigens den Antikörpergehalt der Hornhaut mit serologischen Methoden zu erfassen suchten, liegen von S. MIYASHITA (1911), G. BURSUK (1928) sowie R. THOMPSON u. Mitarb. (1936, 1937, 1950, 1954) vor.

S. MIYASHITA konnte nach Impfung der Hornhaut mit Hammelblut weder im Hornhautextrakt noch im Serum Hämolyse nachweisen. Nach intraperitonealer Immunisierung konnte der hämolytische Amboceptor sowohl im Serum als auch in der Cornea regelmäßig nachgewiesen werden. Der negative Befund nach Cornealimpfung ist allerdings kaum zu verwerten, da diese Versuche nur an 2 Kaninchen durchgeführt worden waren.

Die Ergebnisse der Arbeiten von BURSUK und THOMPSON u. Mitarb. hingegen zeigen eindeutig, daß nach künstlicher örtlicher Antigeneinverleibung in die Hornhaut (Typhusbacillenemulsion, Staphylokokken-Vaccine, kristallisierte Eiweißkörper) im Hornhautextrakt oder Preßsaft der Hornhaut spezifische Antikörper (Agglutinine, Opsonine, Bakteriolyse und Präcipitine) nachweisbar sind, die den Antikörpergehalt des Serums mengenmäßig in der Regel übertrafen.

Diese Tatsache sowie eine Reihe anderer Faktoren wie früheres Auftreten des Antikörpers in der Hornhaut als im Serum, Nachweis des Antikörpers in der Hornhaut, wenn er im Serum anscheinend nicht mehr vorhanden war, Beeinflussung des Antikörpergehaltes der Hornhaut durch lokale Maßnahmen wie Cortisonapplikation, Bucky-Bestrahlung u. a. ließen BURSUK sowie THOMPSON u. Mitarb. sogar an die Möglichkeit einer lokalen Antikörperproduktion in der Hornhaut denken.

Der in diesen Arbeiten geführte Nachweis des Antikörpers im Hornhautextrakt oder Preßsaft der Hornhaut mit exakten serologischen Methoden bestätigt nicht nur die Ergebnisse jener Autoren, die die örtliche Immunität der Hornhaut nur nach dem klinischen Bild der Hornhautveränderungen beim Immuntier im Vergleich zum nicht immunisierten Tier feststellten, sondern gibt uns auch die Möglichkeit, weiter in Probleme einzudringen, die für die Klinik, Pathologie und Therapie zahlreicher Erkrankungen der Hornhaut wichtig scheinen.

Hiezu gehört unter anderem: Die Frage der Beeinflussbarkeit des Antikörpergehaltes der Hornhaut durch verschiedene therapeutische Maßnahmen, die Abhängigkeit der Art des Antikörpers von der Art des einverleibten Antigens, das Verhalten der Antikörper der Hornhaut nach gleichzeitiger mehrfacher Immunisierung mit verschiedenen Antigenen und nicht zuletzt die bis heute noch ungeklärte Frage, ob nach örtlicher Antigeninjektion in die Hornhaut eine örtliche Antikörperbildung in der Hornhaut stattfindet.

Eigene Untersuchungen

In einer früheren Arbeit (F. SCHWAB 1957) wurde versucht die Frage zu klären, ob der Antikörpergehalt der Hornhaut bei sonst unter gleichen Bedingungen immunisierten Kaninchen durch lokale Cortison- oder Hyaluronidase-Applikation bzw. Röntgenbestrahlung des Auges — therapeutische Maßnahmen, wie sie in der augenärztlichen Praxis täglich bei einer Reihe von Erkrankungen durchgeführt werden — verändert wird.

Die Tiere wurden über beide Hornhäute mit Typhusvaccine bzw. Rinderserumalbumin immunisiert und erhielten gleichzeitig mit der Antigeninjektion auf einem Auge subconjunktival Cortison, Hyaluronidase bzw. 5 Std vor der letzten Antigeninjektion eine Röntgenbestrahlung von 200 r auf ein Auge.

Bei den mit Cortison behandelten Tieren war der Agglutiningehalt beider Hornhäute signifikant herabgesetzt; Präcipitine konnten weder in den Hornhäuten der mit Cortison behandelten Augen noch in den Hornhäuten der nicht mit Cortison behandelten Augen nachgewiesen werden.

Der Agglutinin- bzw. Präcipitingehalt des Serums dieser Tiere war im Vergleich zu den entsprechenden Werten bei sonst unter gleichen Bedingungen immunisierten aber nicht weiter behandelten Tieren ebenfalls deutlich vermindert.

Die lokale Hyaluronidase-Applikation bzw. die Röntgenbestrahlung eines Auges hatte weder auf den Agglutinin- bzw. Präcipitingehalt beider Hornhäute noch auf den des Serums im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe einen signifikanten Einfluß.

Weiters konnte gezeigt werden (F. SCHWAB 1957), daß der Agglutiningehalt der Hornhaut und des Serums bei mit Typhusvaccine über beide Hornhäute immunisierten Kaninchen durch intramuskuläre Milchinjektionen gesteigert werden kann, wobei die Steigerung um so deutlicher ausgeprägt war, je weniger das Tier auf die ursprüngliche Immunisierung allein angesprochen hatte.

In den erwähnten Arbeiten wurde zum Nachweis der Agglutinine im Serum und im Hornhautextrakt die Agglutinationsprobe nach WIDAL angewandt und der Agglutiningehalt in Titerwerten angegeben.

Die Bestimmung der Präcipitine erfolgte mit der von J. OUDIN ausgearbeiteten Gel-Präcipitationsmethode, wobei der Präcipitingehalt der Hornhaut und des Serums mittels einer vergleichenden quantitativen Methode bestimmt wurde.

Da es aus den Ergebnissen der allgemeinen Immunitätsforschung (s. zusammenfassende Darstellung H. SCHMIDT, 1955) bekannt ist, daß die Art des Antigens wie auch die Art seiner Einverleibung weitgehend die Art und Menge des gebildeten Antikörpers beeinflußt und es bei gleichzeitiger Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene zu einer gegenseitig hemmenden oder fördernden Wirkung auf die Antikörperbildung kommen kann, wurden zur weiteren Klärung der Immunitätsverhältnisse der Hornhaut in dieser Arbeit folgende Fragestellungen, die gleichzeitig auch gewisse Rückschlüsse auf eine mögliche Antikörperbildung in der Hornhaut gestatten, untersucht.

Versuchsreihen

I. Quantitatives Verhältnis des Antikörpergehaltes der Hornhaut bzw. des Serums nach intravenöser (Gruppe A) und intracornealer Immunisierung (Gruppe B).

II. Qualitatives und quantitatives Verhältnis des Antikörpergehaltes der Hornhaut und des Serums nach gleichzeitiger intravenöser (Gruppe

A 2, A 3) bzw. intracornealer (Gruppe B 2, B 3) Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene.

III. Qualitatives und quantitatives Verhalten der Antikörper in beiden Hornhäuten und im Serum nach intracornealer Einverleibung verschiedener Antigene in je eine Hornhaut (Gruppe C, D, E).

Um den Effekt der gleichzeitigen Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene unter möglichst einfachen Bedingungen zu studieren, wurden zur Immunisierung Antigengemische aus einfachen, möglichst reinen Eiweiß-Antigenen verwendet. Zum Nachweis der Präcipitine in Hornhautextrakt und Serum wurde die Gel-Präcipitationsmethode angewandt, die es gestattet auch mit nur sehr geringen Mengen Untersuchungsflüssigkeit eine qualitative Antigen-Antikörperanalyse durchzuführen, wie es J. OUDIN, Ö. OUCHTERLONY, S. ELEK (s. zusammenfassende Darstellung bei J. OUDIN¹) bei ihren Untersuchungen zur immunochemischen Analyse von natürlich vorkommenden Antigengemischen wiederholt zeigen konnten.

Material und Methode

Antigen. Als Antigen wurde in allen 3 Versuchsreihen Serumalbumin vom Rind trocken-, „reinst“ Behringwerke (Molekulargewicht 69000, N-Gehalt 16%), γ -Globulin vom Rind trocken-, „reinst“ Behringwerke (Molekulargewicht etwa 150000, N-Gehalt 15,9%) und Humanalbumin Behringwerke trocken-, „reinst“ (Molekulargewicht 70000 N-Gehalt 16%) gelöst in physiologischer NaCl verwendet.

Immunisierung. Als Versuchstiere dienten ausgewachsene Kaninchen von etwa 3500 g Körpergewicht. Bei der intravenösen Immunisierung wurde die Antigenlösung in die Ohrvene injiziert, bei der intracornealen Immunisierung wurde nach Oberflächenanaesthesie mit 0,4%igem Novesin die Antigenlösung mit einer auf 0,01 ml graduierten Tuberkulinspritze, die mit einer feinen Nadel versehen war, intralamellär möglichst in die Mitte der Hornhaut injiziert. Die Konzentration der jeweils verwendeten Antigenlösung bzw. des Antigengemisches, die Einzeldosis sowie das Intervall zwischen den Injektionen sind in jeder Versuchsreihe angegeben. Das Gewicht der Tiere wurde während der ganzen Versuchsdauer ständig kontrolliert. Die Tötung der Tiere erfolgte 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion durch Nackenschlag.

Gewinnung des Serums und Herstellung des Hornhautextraktes. Bei jedem Tier wurde nur einmal vor Beginn der Immunisierung und knapp vor der Tötung Blut zur Gewinnung des Serums aus der Ohrvene entnommen. Die Hornhaut wurde sofort nach der Tötung des Tieres mit einer Schere 1 mm innerhalb des Limbus vom übrigen Bulbus abgetrennt und mehrmals mit steriler physiologischer NaCl abgespült. Dann wurde die Hornhaut in ein steriles vorher gewogenes Fläschchen gebracht und 0,5 ml steriler physiologischer NaCl zugesetzt, gewogen und bei +4° im Eiskasten aufbewahrt. Nach 24 Std wurde die Hornhaut aus dem Fläschchen in ein Glasschälchen gegeben und mit einer feinen Schere in kleinste Teilchen zerschnitten. Die zerschnittenen Hornhautteilchen sowie die restliche Flüssigkeit aus dem Wägefläschchen wurden in ein Wassermannröhrchen gebracht und neuerlich 0,9 ml physiologischer NaCl zugesetzt. Nach neuerlichem 48stündigen Aufbewahren

¹ OUDIN, J.: Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. Meth. med. Res. 5, 335—378 (1952).

im Eisschrank und darauffolgendem 3—4stündigen Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden die Wassermannröhrchen mit dem Hornhautextrakt $\frac{1}{2}$ Std lang zentrifugiert und die wasserklare, überstehende Flüssigkeit zum Ansetzen des Versuches abgenommen.

Serologischer Test (qualitative und quantitative Auswertung s. auch S. 607). Der Nachweis der Präcipitine im Hornhautextrakt und im Serum wurde wie bereits erwähnt mit der von J. OUDIN (1948, 1949, 1952) ausgearbeiteten Gel-Präcipitierungsmethode im Röhrchen durchgeführt.

Wie bei früheren Versuchen (F. SCHWAB 1957) wurde die antikörperhaltige Flüssigkeit (Hornhautextrakt, Serum) mit dem geschmolzenen Agar bei einer Temperatur von 45—48° C gemischt, in das Teströhrchen abgefüllt und nach Erstarren des Agar-Flüssigkeitsgemisches mit der Antigenlösung überschichtet.

Die verwendeten Teströhrchen hatten eine Länge von 10 cm und eine lichte Weite von 4 mm.

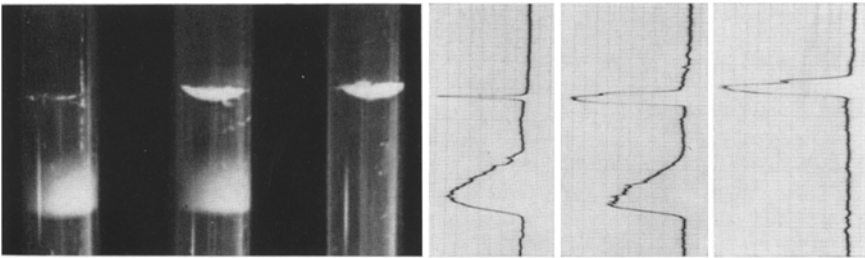


Abb. 1. Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumalbumin (RSA) (Hornhautextrakt, Versuchsreihe I, Gruppe B)

Für alle Untersuchungen wurde eine 0,6%ige Agarlösung (Agar gelöst in physiologischer NaCl) verwendet und mit dem gleichen Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeiten gemischt. In jedes Teströhrchen wurde 1,0 ml der Mischung abgefüllt: 0,5 ml Agar + 0,5 ml zu untersuchende Flüssigkeit. Bei der Untersuchung der Hornhautextrakte, die zu rein qualitativen Testversuchen bestimmt waren, konnten meist nur 0,8 ml der Mischung (0,4 ml Agar + 0,4 ml Hornhautextrakt) für ein Röhrchen verwendet werden um genügend Untersuchungsflüssigkeit zum Ansetzen von Kontrollröhrchen zur Verfügung zu haben.

Nach dem Erstarren der Agar-Antikörperschichte wurde je Röhrchen 0,5 ml der entsprechenden 2,5%igen Antigenlösung bzw. 0,5 ml eines Antigengemisches zugegeben. Die Antigenmischung bestand jeweils aus gleichen Teilen der 2,5%igen Antigenlösungen.

Um ein Verdunsten zu vermeiden, wurden die Röhrchen mit einem Gummipfropfen verschlossen und während der ganzen Versuchsdauer im Brutschrank bei einer Temperatur von 28° C aufbewahrt und nur zum Ablesen der *h*-Werte für kurze Zeit aus dem Brutschrank genommen, um jeden länger dauernden Temperaturwechsel zu vermeiden.

Um für den qualitativen Nachweis der verschiedenen Präcipitine (Antikörper gegen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin) eine genügende Kontrolle zu haben, wurde wenn möglich jede Probe in 3 verschiedenen Teströhrchen durchgeführt und jedem Röhrchen ein anderes Antigen — Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin oder Humanalbumin bzw. eine Mischung dieser Antigene zugegeben.

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf *Antikörper gegen Rinderserumalbumin* ist aus Abb. 1 (Hornhautextrakt, Versuchsreihe I, Gruppe B) ersichtlich. In das

linke Teströhrchen wurde nur Rinderserumalbumin, in das mittlere ein Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin und in das rechte nur Rinderserumglobulin zu dem Agar-Hornhautextraktgemisch als Antigen zugegeben.

Photographie der Röhrchen am 2. Tag nach Ansetzen des Versuches.

Das linke und mittlere Röhrchen zeigte eine deutliche Präcipitationsbande, das rechte Röhrchen zeigte keine Zeichen einer Präcipitation in der Agar-Hornhautextraktschicht.

Der Abstand h (Verschiebung bzw. Wanderung der Präcipitationszone gemessen in Millimeter) zwischen dem unteren scharfen Präcipitatsrand und der Agar-Flüssigkeitstrennungslinie, ist ebenso wie die Dichte des Präcipitates im linken und mittleren positiven Röhrchen annähernd gleich.

Wie die photometrische Auswertung der photographischen Positive der Röhrchen zeigt, geht die Kurve, die die Dichte des Präcipitates darstellt, sowohl im linken als auch im mittleren Röhrchen nur durch ein Maximum, das etwas oberhalb des scharfen Präcipitatrandes liegt¹. Eine Forderung, die nach J. OUDIN für eine einfache Antigen-Antikörperreaktion im Agar-Gel charakteristisch ist.

Im linken und mittleren Teströhrchen reagierten die im Hornhautextrakt gegen Rinderserumalbumin vorhandenen Antikörper mit dem homologen Antigen Rinderserumalbumin. Das im mittleren Teströhrchen gleichzeitig als Antigen zugegebene Rinderserumglobulin (0,25 ml 2,5%iges Rinderserumalbumin + 0,25 ml 2,5%iges Rinderserumglobulin) hatte auf den Ausfall der Reaktion keinen Einfluß. Im rechten Kontrollröhrchen, dem nur Rinderserumglobulin als Antigen zugesetzt worden war, kam es wie zu erwarten zu keiner Präcipitation.

Die annähernd gleiche Dichte des Präcipitates und derselbe h/vt -Wert im linken und mittleren Röhrchen, obgleich im mittleren Röhrchen nur die halbe homologe Antigenmenge Rinderserumalbumin zugesetzt worden war, bestätigten die Erfahrungen J. OUDINS bei seinen Versuchen mit anderen Eiweiß-Antieiweißsystemen, daß die Anfangskonzentration des Antigens auf die Dichte des Präcipitates keinen signifikanten Einfluß hat.

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf *Antikörper gegen Rinderserumglobulin* ist aus Abb. 2 (Hornhautextrakt, Versuchsreihe I, Gruppe B) ersichtlich.

In das linke Teströhrchen wurde wieder nur Rinderserumalbumin, in das mittlere ein Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin und in das rechte nur Rinderserumglobulin als Antigen zugegeben.

Photographie der Röhrchen am 2. Tag nach Ansetzen des Versuches.

Das mittlere und rechte Röhrchen zeigte eine deutliche Präcipitationsbande, im linken Röhrchen ist in der Agar-Hornhautextraktschicht keine Präcipitation nachweisbar.

Wie auch die rechts von den Röhrchen abgebildeten Photometerkurven zeigen ist der h -Wert und die Dichte des Präcipitates im mittleren und rechten positiven Röhrchen annähernd gleich. Beide Kurven der positiven Röhrchen gehen durch ein Maximum als Zeichen einer einfachen Antigen-Antikörperreaktion.

Im mittleren und rechten Röhrchen reagierten die im Hornhautextrakt gegen Rinderserumglobulin vorhandenen Antikörper mit dem homologen Antigen Rinderserumglobulin. Das im mittleren Röhrchen gleichzeitig vorhandene Antigen Rinderserumalbumin hatte auch hier keinen Einfluß auf den Ausfall der Reaktion. Im

¹ Die steilen Zacken in der Photometerkurve bei allen 3 Röhrchen in der Höhe der Agar-Flüssigkeitstrennungslinie sind durch das teilweise aus der Lösung ausgefallene Antigen bedingt und waren beim Antigen Rinderserumglobulin meist am stärksten ausgeprägt.

linken Kontrollröhrchen in dem nur Rinderserumalbumin als Antigen zugesetzt worden war, kam es zu keiner Präcipitation.

Ein Vergleich des Präcipitationsbildes im Rinderserumalbumin — Anti-Rinderserumalbumin-System mit dem Rinderserumglobulin — Anti-Rinderserumglobulin-System zeigte nahezu bei allen Versuchen, daß die Verschiebung bzw. Wanderung der Präcipitationszone im Rinderserumglobulin — Anti-Rinderserumglobulin-System wesentlich langsamer war. Die Dichte des Präcipitates war im System Rinderserumglobulin-Anti-Rinderserumglobulin meist stärker ausgeprägt als im System Rinderserumalbumin — Anti-Rinderserumalbumin oder bei beiden Systemen annähernd gleich (s. auch Abb. 1 und 2).

Die Messung des h -Wertes und die Dichte des Präcipitates sowie die Kenntnis der Beeinflussung dieser Werte durch verschiedene Faktoren ist nicht nur für die

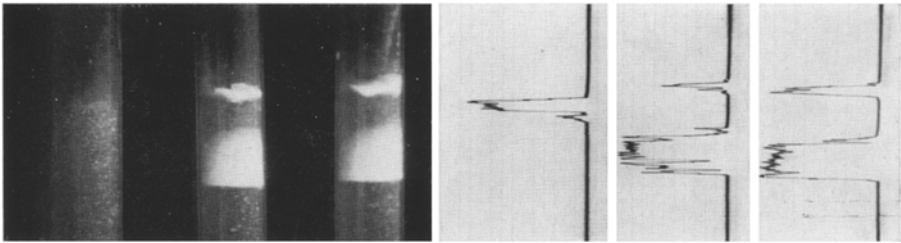


Abb. 2. Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumglobulin (RSG) (Hornhautextrakt, Versuchsreihe I, Gruppe B)

quantitative Bestimmung der Antikörperkonzentration sondern auch für die qualitative Beurteilung der Reaktion vor allem zum Studium mehrerer, gleichzeitig im Agar-Gel ablaufender Antigen-Antikörperreaktionen notwendig.

Faktoren, die den h -Wert beeinflussen

Zeit. Die Verschiebung bzw. Wanderung der Präcipitationszone im Agar-Gel = h stellt eine lineare Funktion der Quadratwurzel der Zeit dar.

$$h = \text{proportional } \sqrt{t} \quad (1)$$

h = Verschiebung bzw. Wanderung der Präcipitationszone, gemessen in Millimetern als Abstand zwischen der Agar-Flüssigkeitstrennungslinie und dem unteren scharfen Präcipitatsrand.

t = Diffusionsdauer.

Konzentration von Antigen und Antikörper. Der Einfluß der Antigen- bzw. Antikörperkonzentration auf die Verschiebung der Präcipitationszone im Agar-Gel ist nach J. OUDIN durch die folgenden, an einfachen Systemen empirisch gefundenen Beziehungen gegeben.

Für jeden gegebenen Wert der Anfangskonzentration des Antigen (g) gilt:

$$h/\sqrt{t} = \alpha \log. (a/a_0) \quad (2)$$

a = Anfangskonzentration des Antikörpers;

a_0 = extrapoliertes Wert von a , für welchen gilt: $h/\sqrt{t} = 0$;

α = Konstante < 0 (Dimension $\text{mm}/\text{min}^{1/2}$) abhängig von Natur des Antigen.

Für jeden gegebenen Wert der Anfangskonzentration des Antikörpers (a) gilt:

$$h/\sqrt{t} = \gamma \log (g/g_0) \quad (3)$$

g = Anfangskonzentration des Antigen;
 g_0 = extrapoliertes Wert von g , für welchen gilt: $h/\sqrt{t} = 0$;
 γ = Konstante > 0 , abhängig von Natur des Antigen.

Aus den oben angeführten Gleichungen (2, 3) geht hervor, daß für eine bestimmte Antigen-Antikörperkonzentration $h/\sqrt{t} = k$ konstant ist. Der Wert h/\sqrt{t} variiert in derselben Richtung wie g und umgekehrt wie a .

Temperatur, Agar-Konzentration und andere Faktoren. Erhöhte Aufbewahrungstemperatur der Röhren bewirkt eine Zunahme, höhere Agarkonzentration eine Verminderung der h/\sqrt{t} -Werte. Außerdem kann der h/\sqrt{t} -Wert auch durch Verunreinigungen in der antigen- oder antikörperhaltigen Lösung im Sinne einer Erhöhung oder Erniedrigung beeinflußt werden.

Faktoren, welche die Dichte des Präcipitates beeinflussen

Zeit. Die maximale Dichte des Präcipitates in einem gegebenen System ändert sich nur gering mit der Zeit während der Verschiebung der Präcipitationszone im Agar-Gel.

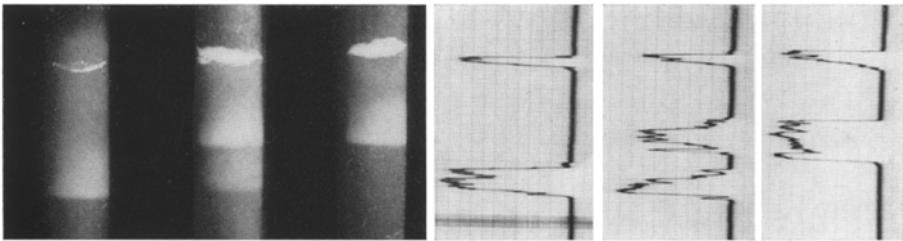


Abb. 3. Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumalbumin (RSA) und Rinderserumglobulin (RSG). (Hornhautextrakt, Versuchsreihe II, Gruppe B/2)

Konzentration von Antigen und Antikörper. Die Anfangskonzentration des Antigens als diffundierender Bestandteil (diffusing reactant) hat wie bereits erwähnt keinen signifikanten Einfluß auf die Dichte des Präcipitates.

Die Konzentration des Antikörpers hingegen hat einen wesentlichen Einfluß auf die Dichte des Präcipitates und ist wie J. OUDIN an Hand von Photometerkurven zeigen konnte, in gewissen Grenzen der Konzentration des Antikörpers proportional, das heißt, man kann in einem gegebenen System (bei gleichbleibendem Wert der Anfangskonzentration des Antigens) ähnlich wie durch Messung der h/\sqrt{t} -Werte auch durch Vergleich der Präcipitationsdichten Rückschlüsse auf den Antikörpergehalt der einzelnen Proben ziehen.

Die praktische Anwendung dieser Methode stößt aber bei der Auswertung eines größeren Materials auf Schwierigkeiten, da es meist nicht möglich ist alle Teströhren unter vollkommen gleichen Bedingungen zu photographieren und bei der hohen Empfindlichkeit der Photometer bereits die kleinste Abweichung bei der Photographie der Röhren (geänderte Beleuchtung, Belichtung, Fehler bei der Film-entwicklung, Glasfarbe der Röhren u. a.) eine beträchtliche Fehlerquelle darstellt.

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf *Antikörper* gegen *Rinderserumalbumin* und *Rinderserumglobulin* ist aus Abb. 3 (Hornhautextrakt, Versuchsreihe II, Gruppe B/2) ersichtlich.

In das linke Teströhrchen wurde nur Rinderserumalbumin, in das mittlere ein Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin, und in das rechte nur Rinderserumglobulin als Antigen zugegeben.

Photographie der Röhren am 2. Tag nach Ansetzen des Versuches.

Das linke und rechte Röhrechen zeigt eine, das mittlere Röhrechen zwei deutlich voneinander getrennte Präcipitationsbanden. Der h -Wert der Präcipitationsbande im linken Röhrechen ist gleich dem h -Wert der unteren Präcipitationsbande im mittleren Röhrechen, der h -Wert der Präcipitationsbande im rechten Röhrechen entspricht im mittleren Röhrechen dem h -Wert der oberen Präcipitationsbande.

Die Dichte des Präcipitates im linken Röhrechen ist annähernd gleich der Dichte der unteren, die Dichte des Präcipitates im rechten Röhrechen annähernd gleich der Dichte der oberen Präcipitationszone im mittleren Röhrechen.

Wie die rechts von den Röhrechen abgebildeten Photometerkurven zeigen, geht die Kurve des linken und rechten Röhrechens durch ein Maximum, die Kurve des mittleren Röhrechens zeigt 2 Maxima.

Das mittlere Röhrechen zeigt das charakteristische Bild einer mehrfachen Antigen-Antikörperreaktion im Agar-Gel.

Im linken Röhrechen reagierten die im Hornhautextrakt gegen Rinderserumalbumin vorhandenen Antikörper mit dem homologen Antigen Rinderserumalbumin, im rechten die in Hornhautextrakt gegen Rinderserumglobulin vorhandenen mit dem homologen Antigen Rinderserumglobulin. Die in beiden Hornhautextrakten gleichzeitig noch vorhandenen Antikörper (gegen Rinderserumglobulin im linken Röhrechen bzw. Rinderserumalbumin im rechten Röhrechen) hatten auf den Ausfall der Reaktion keinen ersichtlichen Einfluß.

Im mittleren Röhrechen, dem ein Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin als Antigen zugegeben worden war, reagierten unabhängig voneinander die im Hornhautextrakt vorhandenen Antikörper gegen Rinderserumalbumin mit ihrem homologen Antigen Rinderserumalbumin und die Antikörper gegen Rinderserumglobulin mit ihrem homologen Antigen Rinderserumglobulin.

Das Bild des mittleren Röhrechens könnte man sich auch so entstanden denken, als ob das linke und rechte Röhrechen übereinander kopiert worden wären.

Wie J. OUDIN bei seinen Untersuchungen zur immunochemischen Analyse von natürlich vorkommenden Antigenmischungen zeigen konnte, reagieren alle Antigene, welche nicht „Überkreuz“ reagieren, unabhängig voneinander, d.h. jedes Antigen reagiert mit seinem korrespondierenden Antikörper so als wären die anderen Antigene nicht vorhanden.

Die Anzahl der Antigene in einer gegebenen Lösung ist innerhalb gewisser Grenzen immer größer oder gleich der Zahl der Präcipitationsbanden bzw. der Zahl der Maxima der Dichte des Präcipitates.

Am Anfang des Versuches sind die einzelnen Präcipitationsbanden noch nicht voneinander zu trennen. Im Laufe von Stunden oder Tagen werden sie aber immer mehr auseinandergesogen und deutlich unterscheidbar. Da die Verschiebung jeder einzelnen Präcipitationszone von der Agar-Flüssigkeitstrennungslinie (h -Wert, Abstand des unteren scharfen Präcipitatsrandes von der Agar-Flüssigkeitstrennungslinie) proportional der Quadratwurzel der Zeit ist, bleibt das Verhältnis der Distanzen zwischen den einzelnen Präcipitationszonen unabhängig von der Zeit immer gleich.

Es kann natürlich vorkommen, daß eine wenig ausgeprägte Präcipitationszone von dichteren Zonen mit rascherer Wanderungsgeschwindigkeit (h/\sqrt{t} -Wert) überlagert wird oder daß Präcipitationszonen mit annähernd gleichem h/\sqrt{t} -Wert so nahe beisammenliegen, daß sie nicht zu trennen sind (s. auch Abb. 5, Versuch zum gleichzeitigen Nachweis von Antikörpern gegen Rinderserumalbumin und Humanalbumin).

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf *Antikörper gegen Humanalbumin* ist aus Abb. 4 (Hornhautextrakt, Versuchsreihe I, Gruppe B) ersichtlich.

In das linke Teströhrchen wurde nur Rinderserumalbumin, in das mittlere ein Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin und Humanalbumin und in das rechte nur Humanalbumin als Antigen zugegeben.

Photographie der Röhrchen am 2. Tag nach Ansetzen des Versuches.

Das rechte und mittlere Röhrchen zeigt eine deutliche Präcipitationsbande; das linke Röhrchen zeigt keine Zeichen einer Präcipitation. Im rechten und mittleren Teströhrchen reagierten die im Hornhautextrakt gegen Humanalbumin vorhandenen Antikörper mit dem homologen Antigen Humanalbumin. Das im mittleren Teströhrchen gleichzeitig zugegebene Rinderserumalbumin hatte auf den Ausfall der Reaktion keinen Einfluß. Die h/\sqrt{t} -Werte und die Dichte des Präcipitates waren in beiden positiven Röhrchen annähernd gleich und bei den meisten

Versuchen ähnlich den gefundenen Werten im System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin.

Daß die Antikörper gegen Humanalbumin mit dem Antigen Rinderserumalbumin keine „Überkreuz“-Reaktion geben zeigt der negative Befund im linken Röhrchen, dem als Antigen nur Rinderserumalbumin zugegeben worden war.

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumalbumin und Humanalbumin ist aus Abb. 5 (Serum, Versuchsreihe III, Gruppe D) ersichtlich.

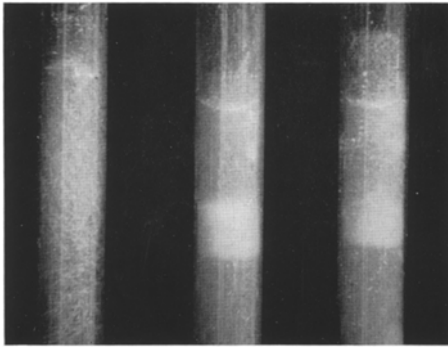


Abb. 4. Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Humanalbumin (HA). (Hornhautextrakt, Versuchsreihe I, Gruppe B)

In das linke Teströhrchen wurde nur Rinderserumalbumin, in das

mittlere ein Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin und Humanalbumin und in das rechte nur Humanalbumin als Antigen zugegeben.

Photographie der Röhrchen am 3. Tag nach Ansetzen des Versuches.

Bei den meisten Versuchen zeigten alle 3 Röhrchen wie in Abb. 5 nur eine Präcipitationsbande mit annähernd gleichem h/\sqrt{t} -Wert und gleicher Dichte des Präcipitates. Nur in einigen Fällen konnten meist erst am 5.—6. Tag nach Ansetzen des Versuches im mittleren Teströhrchen zwei sehr nahe beieinanderliegende Präcipitationsbänder festgestellt werden.

Im linken Röhrchen reagierten die im Serum gegen Rinderserumalbumin vorhandenen Antikörper mit ihrem homologen Antigen Rinderserumalbumin, im rechten die gegen Humanalbumin vorhandenen mit ihrem homologen Antigen Humanalbumin.

Da im Serum sowohl Antikörper gegen Rinderserumalbumin und Humanalbumin vorhanden sein müssen, wie die positive Reaktion im linken bzw. im rechten Teströhrchen zeigte, waren im mittleren Teströhrchen, dem eine Mischung von Rinderserumalbumin und Humanalbumin als Antigen zugegeben worden war, eigentlich bei allen Fällen 2 Präcipitationsbänder zu erwarten.

Der bei den meisten Fällen annähernd gleiche h/\sqrt{t} -Wert im System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin und Humanalbumin—Anti-Humanalbumin scheint aber oft zu einer Überlagerung der Präcipitationszonen geführt zu haben, so daß eine Trennung der beiden Präcipitationsbänder meist nicht möglich war (s. auch S. 601).

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf *Antikörper* gegen *Rinderserumalbumin*, *Rinderserumglobulin* und *Humanalbumin* ist aus Abb. 6 (Hornhautextrakt, Versuchsreihe II, Gruppe B/3) ersichtlich.

Da für die Untersuchung der Hornhautextrakte immer nur höchstens 3 Röhrchen angesetzt werden konnten, wurde bei diesen Versuchen von einem Zusatz der Antigenmischungen abgesehen und in das linke Teströhrchen nur Rinderserumalbumin, in das mittlere nur Rinderserumglobulin, und in das rechte nur Humanalbumin als Antigen zugegeben.

Photographie der Röhrchen am 2. Tag nach Ansetzen des Versuches.

Alle 3 Röhrchen zeigten eine deutliche Präcipitationsbande. Im linken Röhrchen reagierten die im Hornhautextrakt gegen Rinderserumalbumin, im mittleren

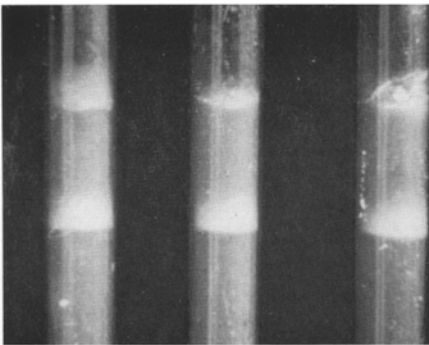


Abb. 5. Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumalbumin (RSA) und Humanalbumin (HA) (Serum, Versuchsreihe III, Gruppe D)

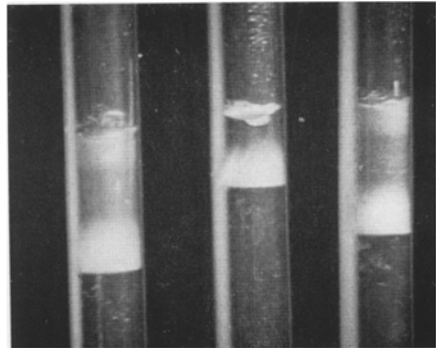


Abb. 6. Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumalbumin (RSA), Rinderserumglobulin (RSG) und Humanalbumin (HA) (Hornhautextrakt, Versuchsreihe II, Gruppe B/3)

die gegen Rinderserumglobulin und im rechten die gegen Humanalbumin vorhandenen Antikörper mit ihrem homologen Antigen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin. Die zwei anderen in jedem Röhrchen noch zusätzlich vorhandenen Antikörper hatten auf den Ausfall der Reaktion keinen Einfluß.

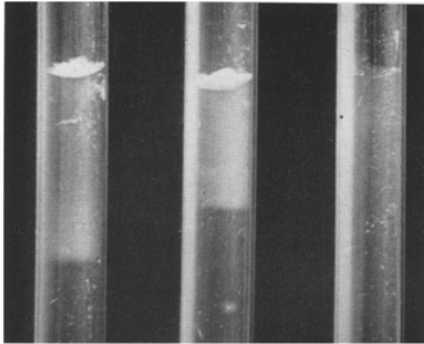
Die Dichte des Präcipitates war im mittleren Röhrchen (System Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin) meist stärker ausgeprägt oder in allen 3 Röhrchen annähernd gleich. Der h/\sqrt{t} -Wert war wie bei unseren früheren Versuchen im System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin und Humanalbumin—Anti-Humanalbumin annähernd gleich, im System Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin wesentlich kleiner.

Ein positiver Ausfall der Reaktion auf *Antikörper* gegen *Rinderserumalbumin* und *Rinderserumglobulin* bzw. *Rinderserumglobulin* und *Humanalbumin* ist aus Abb. 7a bzw. b ersichtlich.

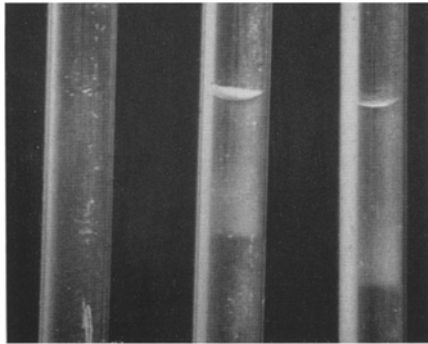
Abb. 7a zeigt das Versuchsergebnis mit dem Hornhautextrakt aus der rechten, Abb. 7b mit dem Hornhautextrakt aus der linken Hornhaut eines Kaninchens, das durch intracorneale Injektion eines Gemisches von Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin in die rechte und durch intracorneale Injektion eines Gemisches von Humanalbumin und Rinderserumglobulin in die linke Hornhaut immunisiert worden war (Versuchsreihe III, Gruppe E).

Rechte Hornhaut, Abb. 7a: In das linke Teströhrchen wurde nur Rinderserumalbumin, in das mittlere nur Rinderserumglobulin und in das rechte nur Humanalbumin als Antigen zugegeben.

Das linke und mittlere Teströhrchen zeigt eine Präcipitationszone, im rechten Teströhrchen ist keine Präcipitation nachweisbar.



a



b

Abb. 7. a Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumalbumin (RSA) und Rinderserumglobulin (RSG) (Hornhautextrakt des rechten Auges, desselben Tieres wie in b, Versuchsreihe III, Gruppe E). b Positiver Ausfall der Reaktion auf Antikörper gegen Rinderserumglobulin (RSG) und Humanalbumin (HA). (Hornhautextrakt des linken Auges desselben Tieres wie in a, Versuchsreihe III, Gruppe E)

Anti-Rinderserumglobulin) etwas stärker ausgeprägt als im rechten (System Humanalbumin—Anti-Humanalbumin), der h -Wert war im System Humanalbumin—Anti-Humanalbumin wieder größer als im System Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin.

Im Serum dieses Tieres fanden sich Antikörper gegen alle 3 Antigene Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin und Humanalbumin (s. Ergebnisse).

Im linken Röhrchen reagierten die gegen Rinderserumalbumin vorhandenen Antikörper mit ihrem homologen Antigen Rinderserumalbumin, im mittleren die gegen Rinderserumglobulin vorhandenen mit ihrem homologen Antigen Rinderserumglobulin. Die Dichte des Präcipitates war im mittleren Teströhrchen (System Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin) stärker ausgeprägt als im linken (System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin). Der h -Wert war im System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin wie bei unseren früheren Versuchen größer als im System Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin.

Linke Hornhaut, Abb. 7b: in das linke Röhrchen wurde nur Rinderserumalbumin, in das mittlere nur Rinderserumglobulin und in das rechte nur Humanalbumin als Antigen zugegeben.

Das rechte und mittlere Röhrchen zeigt eine Präcipitationszone, im linken ist keine Präcipitation nachweisbar.

Im rechten Röhrchen reagierten die gegen Humanalbumin vorhandenen Antikörper mit ihrem homologen Antigen Humanalbumin, im mittleren die gegen Rinderserumglobulin vorhandenen mit ihrem homologen Antigen Rinderserumglobulin.

Die Dichte des Präcipitates war auch hier im mittleren Röhrchen (System Rinderserumglobulin—

Ergebnisse

Die Ergebnisse sämtlicher Versuchsreihen und Gruppen sind in der Tabelle auf Seite 606 dargestellt.

Versuchsreihe I (s. Tabelle)

Gruppe A: Immunisierung intravenös, Gruppe B: Immunisierung intracorneal.

Antigen: Serumalbumin vom Rind trocken-, „reinst“ (RSA), γ -Globulin vom Rind trocken-, „reinst“ (RSG), Humanalbumin trocken-, „reinst“ (HA).

Der Zweck dieser Versuchsreihe war:

1. den positiven Ausfall der Präcipitationsreaktion auf Antikörper gegen Rinderserumglobulin (RSG) bzw. Humanalbumin (HA) im Vergleich zu dem uns schon bekannten System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin zu studieren.

2. das quantitative Verhältnis des Antikörpergehaltes der Hornhaut bzw. des Serums nach intravenöser und intracornealer Immunisierung zu bestimmen.

Da der Antikörpergehalt der Körperflüssigkeiten und Gewebe weitgehend vom Immunisierungsmodus (Dosis, Intervall zwischen den Injektionen u. a.) und von dem verwendeten Antigen (Reinheitsgrad, Stabilität der Lösung, Verwendung von Adjuvantien u. a.) abhängig ist (M. COHN 1953, H. SCHMIDT 1955 u. a.) mußte in einer Reihe von Vorversuchen für jedes verwendete Antigen der Immunisierungsmodus gefunden werden, der einen genügend hohen Präcipitingehalt der Hornhaut ergibt.

Die 3 in Pulverform zur Verfügung stehenden hochgereinigten Eiweißantigene Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin und Humanalbumin ließen sich relativ leicht in physiologischer NaCl lösen, so daß von jedem Antigen eine 20%ige Stammlösung hergestellt werden konnte, die sich ohne auszufallen einige Tage im Kühlschrank bei einer Temperatur von + 4° aufbewahren ließ.

Die Auswertung der Vorversuche ergab, daß die intravenöse Injektion (Ohrvene) von 1,0 ml einer 10%igen Antigenlösung jeden 2. Tag, im ganzen 5 Injektionen, genügte, 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion einen genügend hohen Präcipitingehalt der Hornhaut zu erzielen. Die massive Dosis von 500 mg Antigen je Kaninchen wurde von den meisten Tieren ohne Gewichtsabnahme gut vertragen; anaphylaktische Erscheinungen wurden während der ganzen Versuchsdauer nicht beobachtet. Tötung der Tiere am 15. Tag nach der letzten Antigeninjektion.

Da wie bei früheren Versuchen festgestellt werden konnte, die intracorneale Injektion von 0,05 ml einer 20%igen Rinderserumalbuminlösung jeden 2. Tag, im ganzen 3 Injektionen bei relativ geringer Reizung des Auges 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion einen genügend hohen Präcipitingehalt der Hornhaut ergab, wurde derselbe Immuni-

Tabelle
Versuchsreihe I

| | | | | | | |
|--------------------------|--|---|-------------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| Gruppe A | | Gruppe B Ag: RSA (RSG) (HA) | | | | |
| | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA (RSG) (HA)</div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA (RSG) (HA)</div> | 0,299 = 23 0,199 = 26 0,292 | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA (RSG) (HA)</div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA (RSG) (HA)</div> | 0,226 = 100 0,148 = 100 0,228 |
| Ag: RSA (RSG) (HA) | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto;">RSA (RSG) (HA)</div> | | 0,112 = 310 0,058 = 380 0,114 | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto;">RSA (RSG) (HA)</div> | | 0,169 = 100 0,108 = 100 0,172 |

Versuchsreihe II

| | | | | | | |
|--------------------|--|---|-------------------------|--|---|-------------------------|
| Gruppe A/2 | | Gruppe B/2 Ag: RSA + RSG | | | | |
| | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> | 0,293 0,192 | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> | 0,228 0,145 |
| Ag: RSA + RSG | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> | | 0,110 0,060 | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> | | 0,170 0,105 |
| Gruppe A/3 | | Gruppe B/3 Ag: RSA + RSG + HA | | | | |
| | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG HA</div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG HA</div> | 0,291 0,190 0,283 | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG HA</div> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG HA</div> | 0,222 0,142 0,226 |
| Ag: RSA + RSG + HA | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto;">RSA RSG HA</div> | | 0,108 0,056 0,110 | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto;">RSA RSG HA</div> | | 0,163 0,102 0,161 |

Versuchsreihe III

| | | | |
|-----|---|--|--|
| Ag: | Gruppe C RSA RSG ↓ ↓ <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSG</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto; margin-top: 10px;">RSA RSG</div> | Gruppe D RSA HA ↓ ↓ <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">HA</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto; margin-top: 10px;">RSA HA</div> | Gruppe E RSA + RSG HA + RSG ↓ ↓ <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">RSA RSG</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; margin: 0 auto;">HA RSG</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 120px; margin: 0 auto; margin-top: 10px;">RSA HA RSG</div> |
|-----|---|--|--|

RSA = Rinderserumalbumin, RSG = Rinderserumglobulin, HA = Humanalbumin, Ag = Antigen. Der Pfeil gibt den jeweiligen Immunisierungsweg (intravenös, intracorneal) an. Die beiden oberen Quadrate bedeuten rechte und linke Hornhaut, das untere Quadrat Blut. In den Quadraten sind die jeweils in der Hornhaut bzw. im Serum gefundenen Antikörper eingetragen, z. B. RSA = Antikörper gegen Rinderserumalbumin. Die in Versuchsreihe I und II rechts von den Quadraten angegebenen Zahlen z. B. 0,299 entsprechen den gefundenen $\sqrt[4]{\bar{v}}$ -Werten (Mittelwerten). Diese gelten nur für das jeweilige System, z. B. RSA — Anti-RSA weiters sind nur Hornhautwerte mit Hornhautwerten und Serumwerte mit Serumwerten zu vergleichen. Die in Versuchsreihe I, Gruppe A im System RSA — Anti-RSA bzw. RSG — Anti-RSG rechts vom $\sqrt[4]{\bar{v}}$ -Wert noch zusätzlich eingetragenen Zahlen ergeben die Antikörperkonzentration der Hornhaut und des Serums der intravenös immunisierten Tiere bezogen auf die als Konzentration = 100 angenommenen Mittelwerte der Antikörperkonzentration (100 für Hornhaut, 100 für Serum) der intracorneal immunisierten Kaninchen (Gruppe B).

sierungsmodus auch bei den Tieren, die mit Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin immunisiert wurden, angewandt. Jedes intracorneal immunisierte Tier erhielt somit 60 mg (30 mg rechte Hornhaut, 30 mg linke Hornhaut) des entsprechenden Antigens.

Gruppe A. In dieser Gruppe wurden je 12 Kaninchen mit Rinderserumalbumin (RSA), Rinderserumglobulin (RSG) bzw. Humanalbumin (HA) durch mehrere intravenöse Injektionen immunisiert.

Präcipitintest. Wie aus der Tabelle (Versuchsreihe I, Gruppe A) ersichtlich, waren bei allen Tieren 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion im Blutserum und in den Hornhautextrakten beider Augen jeweils die entsprechenden präcipitierenden Antikörper nachweisbar.

Quantitative Auswertung im System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin s. S. 607.

Gruppe B. In dieser Gruppe wurden je 16 Kaninchen mit Rinderserumalbumin (RSA), Rinderserumglobulin (RSG) bzw. Humanalbumin (HA) durch intracorneale Antigeninjektionen in beide Hornhäute immunisiert.

Klinisches Bild. Bei allen 3 verwendeten Antigenen zeigte die Hornhaut nach der Injektion dasselbe Bild. Die nach der intralamellären Antigeninjektion entstandene, bläulichweiße, blasenartige Vorwölbung war bereits nach einigen Stunden nicht mehr sichtbar. Erst nach der 2. Antigeninjektion (nach etwa 24—48 Std) kam es zu einer leichten Mattigkeit der Hornhaut und dem Auftreten einer eigenartig gesprengelt aussehenden Trübung in den tieferen Schichten des Parenchyms, die nach der 3. Antigeninjektion noch etwas an Ausdehnung zunahm. Nach einigen Tagen war fast bei allen Tieren die Hornhauttrübung weniger opak und 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion kaum noch sichtbar.

Eine lokale anaphylaktische Reaktion der Hornhaut an Stelle der erstmaligen Antigeninjektion — wie sie K. WESSELY (1911) in seinen klassischen Versuchen etwa 12—14 Tage nach einmaliger intracornealer Pferdeseruminjektion beim normergischen Kaninchen beobachten konnte — sahen wir nur bei einigen Tieren, die aus der Versuchsserie ausgeschieden wurden.

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren im Hornhautextrakt beider Augen und im Blutserum die jeweils entsprechenden präcipitierenden Antikörper nachweisbar (s. Tabelle, Versuchsreihe I, Gruppe B).

Bestimmung des quantitativen Verhältnisses der Antikörperkonzentration der Hornhaut bzw. des Serums nach intracornealer (Gruppe B) und intravenöser (Gruppe A) Immunisierung mit Rinderserumalbumin bzw. Rinderserumglobulin

Die Bestimmung der Konzentration des Antikörpers bei gleichbleibendem Wert der Anfangskonzentration des Antigens ist nach

J. OUDIN (s. Methode S. 599) durch Auswertung der Formel

$$h/\sqrt{t} = \alpha \log(a/a_0) \quad (2)$$

gegeben.

Da Formel (2) auch in Form: $h/\sqrt{t} = \alpha \log a - \alpha \log a_0$ geschrieben werden kann, ist h/\sqrt{t} eine lineare Funktion von $\log a$.

Werden die für ein unverdünntes Immuneserum und seiner entsprechenden geometrischen Verdünnungsreihen 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 usw. gefundenen h/\sqrt{t} -Werte auf ein Einfach-Logarithmenpapier *linear* aufgetragen (Abszisse) und die entsprechende Antikörperkonzentration a *logarithmisch* (Ordinate), so ergibt die Verbindungslinie der Meßpunkte eine Gerade, da h/\sqrt{t} eine lineare Funktion von Logarythmus a ist. Die Neigung der Geraden entspricht der Konstanten α .

Es kann somit in einem gegebenen System für eine beliebige Konzentration des Antikörpers die sich nicht mit einem Wert der geometrischen Verdünnungsreihe deckt, durch Bestimmung des Wertes h/\sqrt{t} die zugehörige Konzentration bezogen auf das gegebene unverdünnte Immuneserum durch Interpolation graphisch ermittelt werden. Da bei der graphischen Darstellung der Abhängigkeit der Größe h/\sqrt{t} von der Antikörperkonzentration a die Neigung der Geraden der Konstante α entspricht und α von der Natur des Antigens abhängig ist, gilt die gefundene Beziehung — h/\sqrt{t} -Wert-Antikörperkonzentration — nur für das entsprechende System z. B. Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin.

Es wurden daher eine große Anzahl Verdünnungsreihen von Immunesera (bis 1:16) und Hornhautextrakten (bis 1:8) hergestellt und die Abhängigkeit der Größe h/\sqrt{t} von der Antikörperkonzentration a in beiden Systemen Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin graphisch ermittelt.

Um die Konzentration und die Zusammensetzung der nichtspezifischen kolloiden und kristalloiden Substanzen des Serums und des Hornhautextraktes nicht zu verändern, wurden die Verdünnungen der Halbierungsreihen der Immunesera mit dem Serum und die Verdünnungen der Halbierungsreihen der Hornhautextrakte mit dem Hornhautextrakt nichtimmunisierter Kaninchen vorgenommen. Die verwendete Agar-Konzentration betrug bei allen Versuchen 0,6%.

Ähnlich wie bei unseren früheren Versuchen (System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin) wurde wie bereits erwähnt für alle Verdünnungsreihen von Immunesera (bis 1:16) und Hornhautextrakten (bis 1:8) festgestellt, daß sie alle auf parallelen Geraden liegen¹; die Neigung der Geraden war entsprechend den für Albumin und

¹ Die bei früheren Versuchen im System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin (F. SCHWAB 1957) bei einer Serumverdünnung unter 1/4 manchmal festgestellte geringe Abweichung von der Geraden wurde bei diesen Versuchen nicht mehr beobachtet und scheint durch die damals durch die Agarlösung vorgenommene Herstellung der Halbierungsreihen bedingt gewesen zu sein.

Globulin verschiedenen Werten der Konstante α in beiden Systemen verschieden.

Da es für unsere Fragestellung — Verhältnis der Antikörperkonzentration des Serums bzw. der Hornhaut nach intracornealer bzw. intravenöser Immunisierung — nicht nötig war absolute Werte der Antikörperkonzentration zu ermitteln, wurde in beiden Systemen der Mittelwert der Antikörperkonzentration des Serums bzw. der Hornhaut der über beide Hornhäute immunisierten Kaninchen als Konzentration = 100 (100 für das Serum, bzw. 100 für die Hornhaut) angenommen und die gefundenen

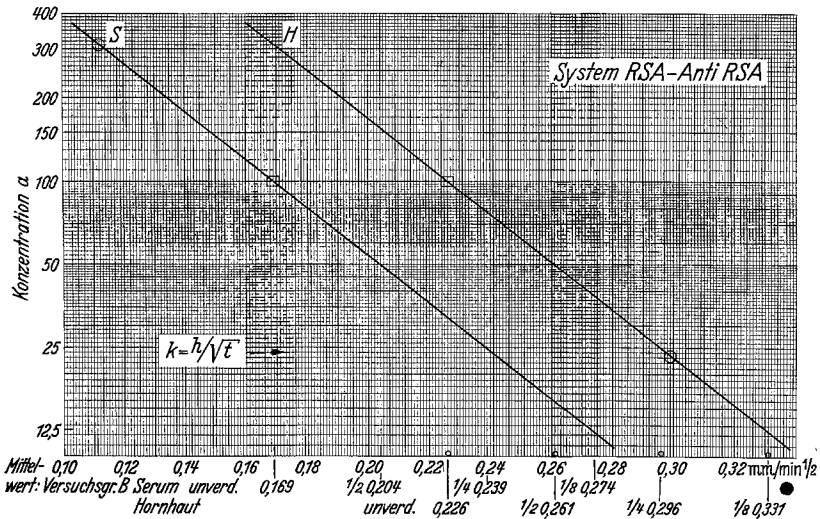


Abb. 8. Beziehung zwischen den Werten $h/\sqrt{t} = k$ und der Antikörperkonzentration a im System RSA—Anti-RSA für das Serum S und die Hornhaut H der intracorneal immunisierten Kaninchen (Versuchsreihe I, Gruppe B). Die Mittelwerte der Antikörperkonzentration der Hornhaut und des Serums dieser Tiere wurde als Konzentration = 100 \square angenommen. Graphische Interpolation der Mittelwerte der Antikörperkonzentration der Hornhaut und des Serums der intravenös immunisierten Kaninchen \circ (Versuchsreihe I, Gruppe A)

Mittelwerte der Antikörperkonzentration des Serums bzw. der Hornhaut sämtlicher intravenös immunisierter Kaninchen auf diese Werte bezogen.

System Rinderserumalbumin—Anti-Rinderserumalbumin (s. Abb. 8). Die Gerade S stellt die Beziehung zwischen dem Wert $h/\sqrt{t} = k$ (konstant) und der Konzentration a des Antikörpers für das Serum, die Gerade H für die Hornhaut dar.

Dabei wurde als Konzentration = 100 (für das Serum) der Mittelwert der Antikörperkonzentration der unverdünnten Immunsera sämtlicher über beide Hornhäute immunisierter Kaninchen ($k = 0,169$)¹ angenommen und die entsprechenden Mittelwerte für die geometrischen

¹ Der im Vergleich zu früheren Versuchen (F. SCHWAB 1957) im Durchschnitt etwas höhere Antikörpergehalt des Serums und der Hornhäute dieser Tiere scheint durch die günstigeren jahreszeitlichen Bedingungen bei der Immunisierung erklärt.

Verdünnungsreihen der Sera (bis 1:16) als Konzentration 50 ($k=0,204$), 25 ($k=0,239$), 12,5 ($k=0,274$), 6,25 ($k=0,309$) eingetragen.

Der Mittelwert der Antikörperkonzentration von 20^1 unverdünnten Hornhautextrakten dieser Kaninchen ($k=0,226$) wurde als Konzentration = 100 (für die Hornhaut) angenommen und die entsprechenden Werte für die geometrischen Verdünnungsreihen der Hornhautextrakte

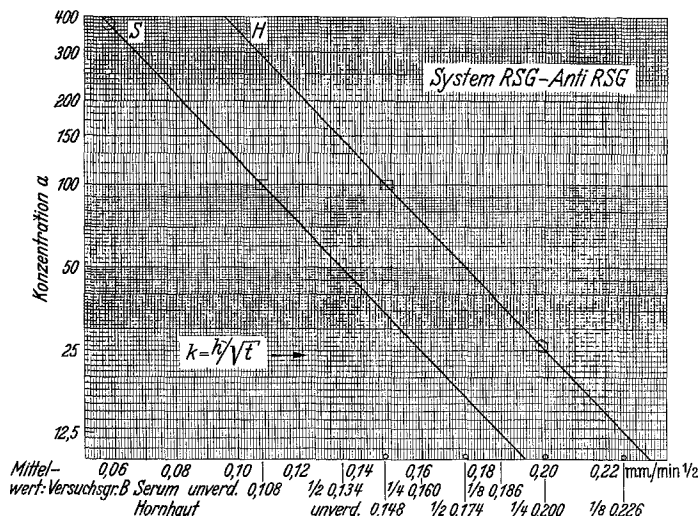


Abb. 9. Beziehung zwischen den Werten $h/\sqrt{t} = k$ und der Antikörperkonzentration a im System RSG—Anti-RSG für das Serum S und die Hornhaut H der intracorneal immunisierten Kaninchen (Versuchsreihe I, Gruppe B). Die Mittelwerte der Antikörperkonzentration der Hornhaut und des Serums dieser Tiere wurde als Konzentration = 100 \square angenommen. Graphische Interpolation der Mittelwerte der Antikörperkonzentration der Hornhaut und des Serums der intravenös immunisierten Kaninchen \circ (Versuchsreihe I, Gruppe A)

als Konzentration 50 ($k=0,261$), 25 ($k=0,296$) bzw. 12,5 ($k=0,331$) eingetragen.

Die graphische Interpolation der Mittelwerte der Antikörperkonzentration der unverdünnten ImmunsERA der intravenös immunisierten Kaninchen ($k=0,112$) in die Gerade S ergibt den Wert 310, die graphische Interpolation der entsprechenden Hornhautmittelwerte ($k=0,299$) in die Gerade H den Wert 23.

Wenn auch ein direkter Vergleich des Antikörpergehaltes des Serums mit dem Antikörpergehalt der Hornhaut bei der gewählten Versuchsanordnung nicht möglich ist, da der Hornhautextrakt relativ hoch verdünnt verwendet wurde, so zeigt der Vergleich beider Serum- bzw. Hornhautwerte untereinander eindeutig, daß bei Immunisierung über die Hornhaut der Antikörpergehalt der Hornhaut wesentlich größer ist als

¹ Die übrigen Hornhäute der 16 Tiere dieser Gruppe wurden zu rein qualitativen Vergleichsuntersuchungen verwendet.

bei intravenöser Allgemeinimmunisierung. Obwohl zur intravenösen Immunisierung eine wesentlich größere Antigenmenge verwendet worden war und der Antikörpergehalt des Serums etwa 3mal so hoch war als bei der intracornealen Immunisierung (310/100) betrug die Antikörperkonzentration der Hornhaut nur etwa $\frac{1}{4}$ der Antikörperkonzentration der Hornhäute der intracorneal immunisierten Tiere (23/100).

System Rinderserumglobulin—Anti-Rinderserumglobulin (s. Abb. 9). Die entsprechenden Werte für die mit Rinderserumglobulin immunisierten Tiere sind aus der Abb. 9 ersichtlich. Auch hier war die Antikörperkonzentration des Serums nach intravenöser Immunisierung ($k=0,058$) etwa 4mal so hoch (380/100) als nach intracornealer Immunisierung ($k=0,108$). Der Antikörpergehalt der Hornhaut war nach intravenöser Immunisierung ($k=0,199$) um etwa $\frac{1}{4}$ (26/100) geringer als nach intracornealer ($k=0,148$), d. h. nach Immunisierung über die Hornhaut ist der Antikörpergehalt der Hornhaut wesentlich höher als bei Allgemeinimmunisierung.

Epikrise

Nach intravenöser Einverleibung von hochgereinigten Eiweißkörpern wie Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin konnten 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion im Serum und im Hornhautextrakt des nicht gereizten Auges die entsprechenden präcipitierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von M. ZADE 1912 (für Menschenserum bzw. Pferdeserum) und R. THOMPSON u. Mitarb. 1936 (für kristallisiertes Eialbumin) und zeigen, daß bei entsprechend vorbehandelten Kaninchen auch bei Allgemeinimmunisierung die normale Hornhaut am Auftreten von Präcipitinen teilnimmt.

Ähnliche Befunde nach intravenöser Immunisierung mit Cholera-bacillen und Hammelblutkörperchen mit Nachweis der Agglutinine bzw. Hämolysine im Hornhautextrakt liegen von S. MIYASHITA (1911), M. ZADE (1912) sowie Z. BRUCKNER (1929) vor.

Nach intracornealer Einverleibung von Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin konnten 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion im Serum und im Hornhautextrakt beider Augen ebenfalls die entsprechenden präcipitierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Wie quantitative Vergleichsuntersuchungen zeigten, war der Antikörpergehalt der Hornhaut nach intracornealer Immunisierung (Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin) etwa 4mal so hoch als nach intravenöser Immunisierung; der Antikörpergehalt des Serums hingegen betrug nach intracornealer Immunisierung nur etwa $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ des Wertes nach intravenöser Immunisierung.

Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von G. BURSUK (1928) für Agglutinine, Opsonine bzw. Bakteriolysine und THOMPSON u. Mitarb. (1936) für Präcipitine und zeigen eindeutig, daß nach intracornealer Antigeneinverleibung der Antikörpergehalt der Hornhaut wesentlich höher ist als nach intravenöser Immunisierung, obwohl wie bei unseren Versuchen die Gesamtantigenmenge pro Tier bei der intravenösen Immunisierung etwa 8mal höher war als bei der intracornealen (500 mg/60 mg).

Versuchsreihe II (s. Tabelle)

Gruppe A/2, A/3. Gleichzeitige intravenöse Immunisierung mit 2 bzw. 3 verschiedenen Antigenen.

Gruppe B/2, B/3. Gleichzeitige intracorneale Immunisierung mit 2 bzw. 3 verschiedenen Antigenen.

Antigen: Serumalbumin vom Rind trocken-, „reinst“ (RSA), γ -Globulin vom Rind trocken-, „reinst“ (RSG), Humanalbumin trocken-, „reinst“ (HA).

Qualitatives und quantitatives Verhältnis des Antikörpergehaltes der Hornhaut und des Serums nach gleichzeitiger intravenöser bzw. intracornealer Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene.

Gruppe A/2. In dieser Gruppe wurden 8 Kaninchen mit einem Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin (RSA) und Rinderserumglobulin (RSG) durch wiederholte intravenöse Injektionen immunisiert (Gesamtantigenmenge je Kaninchen 250 mg Rinderserumalbumin + 250 mg Rinderserumglobulin).

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren im Blutserum und in den Hornhautextrakten beider Augen Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin nachweisbar.

Wenn im Teströhrchen dem Agar-Antikörpergemisch gleichzeitig Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin als Antigen zugesetzt worden war, zeigte der Präcipitationsversuch mit allen Hornhautextrakten und Sera das charakteristische Bild einer mehrfachen Antigen-Antikörperreaktion im Agar-Gel (vgl. Abb. 3).

Die h/\sqrt{t} -Werte der den Antikörper gegen Rinderserumalbumin entsprechenden Präcipitationsbanden und die h/\sqrt{t} -Werte der den Antikörper gegen Rinderserumglobulin entsprechenden Präcipitationsbanden waren bei den meisten Hornhautextrakten und Sera gleich oder sogar niedriger als die entsprechenden Werte der Tiere, die nur mit Rinderserumalbumin bzw. Rinderserumglobulin allein immunisiert worden waren, obwohl in dieser Gruppe von jedem Antigen nur die halbe Dosis zur Immunisierung verwendet worden war.

Gruppe A/3. In dieser Gruppe wurden 8 Kaninchen mit einem Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin (RSA), Rinderserumglobulin (RSG) und Humanalbumin (HA) durch wiederholte intravenöse Injektionen immunisiert (Gesamtantigenmenge je Kaninchen etwa 165 mg Rinderserumalbumin + 165 mg Rinderserumglobulin + 165 mg Humanalbumin).

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren im Blutserum und in den Hornhautextrakten beider Augen Präcipitine gegen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin und Humanalbumin nachweisbar.

Da die Trennung von Antikörpern gegen Rinderserumalbumin und Humanalbumin wegen der ähnlichen Penetrationsgeschwindigkeit der Präcipitationszone (h/\sqrt{t} -Wert) in beiden Systemen in einem Röhrchen meist nicht möglich war, wurden bei der Testung der Hornhautextrakte in jedes der Röhrchen nur ein Antigen (Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin) zugegeben, so daß in jedem Röhrchen nur das Bild einer einfachen Antigen-Antikörperreaktion zustande kam (vgl. Abb. 6).

Die h/\sqrt{t} -Werte der den Antikörper gegen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin entsprechenden Präcipitationsbanden waren bei den meisten Hornhautextrakten und Sera etwas niedriger — d. h. Antikörpergehalt größer — als die entsprechenden Werte der Tiere, die nur mit Rinderserumalbumin bzw. Rinderserumglobulin oder Humanalbumin allein immunisiert worden waren.

Gruppe B/2. In dieser Gruppe wurden je 8 Kaninchen mit einem Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin (RSA) und Rinderserumglobulin (RSG) durch mehrere intracorneale Antigeninjektionen in beide Hornhäute immunisiert (Gesamtantigenmenge je Kaninchen 30 mg Rinderserumalbumin + 30 mg Rinderserumglobulin).

Klinisches Bild. Die Hornhautveränderungen nach der intracornealen Injektion des Antigengemisches (Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin) waren dieselben wie in Versuchsreihe I Gruppe B.

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren in den Hornhautextrakten beider Augen und im Serum Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin nachweisbar.

Die h/\sqrt{t} -Werte der dem Antikörper gegen Rinderserumalbumin bzw. Rinderserumglobulin entsprechenden Präcipitationsbanden waren bei den meisten Hornhautextrakten und Sera annähernd gleich oder sogar niedriger als die entsprechenden Werte der Tiere, die nur mit Rinderserumalbumin bzw. mit Rinderserumglobulin allein immunisiert worden waren (Versuchsreihe I, Gruppe B).

Der Vergleich der h/\sqrt{t} -Werte der Hornhaut und der Sera mit den entsprechenden Hornhaut- und Serumwerten der intravenös immunisierten Kaninchen (Gruppe A/2) zeigte auch hier, daß bei intracornealer Immunisierung der Präcipitingehalt der Hornhaut größer ist als bei intravenöser Immunisierung.

Gruppe/B 3. In dieser Gruppe wurden je 8 Kaninchen mit einem Gemisch von gleichen Teilen Rinderserumalbumin (RSA), Rinderserumglobulin (RSG) und Humanalbumin (HA) durch mehrere intracorneale Antigeninjektionen in beide Hornhäute immunisiert (Gesamtantigenmenge je Kaninchen 20 mg Rinderserumalbumin + 20 mg Rinderserumglobulin + 20 mg Humanalbumin).

Klinisches Bild. Die Hornhautveränderungen nach der intracornealen Injektion des Antigengemisches (Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin + Humanalbumin) waren dieselben wie nach der intracornealen Injektion eines einfachen Antigens (Versuchsreihe I, Gruppe B).

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren in den Hornhautextrakten beider Augen und im Serum Präcipitine gegen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin und Humanalbumin nachweisbar.

Die h/\sqrt{t} -Werte der dem Antikörper gegen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin entsprechenden Präcipitationsbanden waren auch hier bei den meisten Hornhautextrakten und Sera niedriger als die entsprechenden Werte der Tiere, die nur mit Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin bzw. Humanalbumin allein immunisiert worden waren (Versuchsreihe I, Gruppe B).

Der Vergleich der h/\sqrt{t} -Werte der Hornhaut und des Serums mit den entsprechenden Hornhaut- und Serumwerten der mit mehreren Antigenen gleichzeitig aber intravenös immunisierten Kaninchen (Gruppe A/3) zeigte auch hier wieder, daß bei intracornealer Immunisierung der Präcipitingehalt der Hornhaut größer ist als nach intravenöser Immunisierung.

Epikrise

Nach gleichzeitiger intravenöser Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene (Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin + Humanalbumin) fanden sich 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion nicht nur im Serum sondern auch im Hornhautextrakt des nichtgereizten Auges alle entsprechenden Präcipitine (Gruppe A/2, A/3).

Nach gleichzeitiger intracornealer Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene (Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin + Humanalbumin) fanden sich 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion ähnlich wie bei den intravenös immunisierten Tieren im Serum und im Hornhautextrakt beider Augen alle entsprechenden Präcipitine (Gruppe B/2, B/3).

Die Ergebnisse nach intravenöser Immunisierung (Gruppe A/2, A/3) bestätigen die Befunde von L. HEKTOEN und A. K. BOOR (1931), die beim Kaninchen zeigen konnten, daß die gleichzeitig intravenöse Einverleibung verschiedener hochgereinigter Eiweiß-Antigene die gleichzeitige Bildung aller entsprechenden Präcipitine bewirken kann.

Untersuchungen über den Antikörpergehalt der Hornhaut nach gleichzeitiger intravenöser oder intracornealer Immunisierung mit mehreren verschiedenen Antigenen liegen soweit aus der uns zugänglichen Literatur ersichtlich nicht vor.

Die erhobenen Befunde zeigen eindeutig, daß nach gleichzeitiger Immunisierung mit mehreren verschiedenen Antigenen unabhängig vom Immunisierungsweg die gefäßlose Hornhaut bezüglich der qualitativen Verteilung der Präcipitine gegenüber dem Blut keine Sonderstellung einnimmt.

Wie der Vergleich der entsprechenden h/\sqrt{t} -Werte zeigte, war auch das quantitative Verhältnis der einzelnen Präcipitine zueinander im Blut und in der Hornhaut annähernd gleich; der Antikörpergehalt der Hornhaut hingegen ähnlich wie bei der Immunisierung mit nur einem Antigen nach intracornealer gleichzeitiger Mehrfachimmunisierung mit verschiedenen Antigenen wesentlich höher als nach intravenöser Immunisierung.

Die sogenannte „Konkurrenz“ der Antigene, Hemmung der Antikörperbildung gegen ein oder gegen mehrere Teilantigene durch gewisse Antigene des Antigengemisches bei gleichzeitiger Mehrfachimmunisierung scheint bei den bei uns verwendeten Antigenen keinen Einfluß auf die Antikörperbildung gehabt zu haben. Die im Vergleich zu den bei Immunisierung mit nur einem Antigen (Versuchsreihe I) bei gleichzeitiger Mehrfachimmunisierung (Versuchsreihe II) gefundenen gleichen oder sogar kleineren h/\sqrt{t} -Werte sprechen dafür, daß bei den mit einem Antigengemisch immunisierten Tieren der Antikörpergehalt der Hornhaut und des Serums gegen jedes Teilantigen größer war als bei Immunisierung mit jedem einzelnen Antigen allein.

Die fördernde oder synergistische Wirkung auf die Antikörperproduktion bei gleichzeitiger Immunisierung mit mehreren Antigenen ist aus der Praxis der Mischvaccinen schon lange bekannt (Lit. s. bei H. SCHMIDT 1955) und konnte bei unseren Versuchen sowohl bei den intravenös als auch bei den über die Hornhaut immunisierten Kaninchen beobachtet werden.

Versuchsreihe III (s. Tabelle) Gruppe C, D, E

Qualitatives und quantitatives Verhalten der Antikörper in beiden Hornhäuten und im Serum nach intracornealer Einverleibung verschiedener Antigene in je eine Hornhaut.

Antigen: Serumalbumin vom Rind trocken-, „reinst“ (RSA), γ -Globulin vom Rind trocken-, „reinst“ (RSG), Humanalbumin trocken-, „reinst“ (HA).

Gruppe C. In dieser Gruppe wurden je 8 Kaninchen durch intracorneale Injektion von Rinderserumalbumin (RSA) in die rechte und durch intracorneale Injektion von Rinderserumglobulin (RSG) in die linke Hornhaut immunisiert. In jede Hornhaut wurden 0,05 ml der entsprechenden 20%igen Antigenlösung jeden 2. Tag, im ganzen 3 Injektionen injiziert. Jedes Tier erhielt somit als Gesamtdosis in die rechte Hornhaut 30 mg Rinderserumalbumin und in die linke Hornhaut 30 mg Rinderserumglobulin.

Klinisches Bild. Die Hornhautveränderungen nach der intracornealen Antigeninjektion waren dieselben wie in Versuchsreihe I/B bzw. II/B/2 und B/3.

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren im Hornhautextrakt des rechten Auges nur Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und im Hornhautextrakt des linken Auges nur Präcipitine gegen Rinderserumglobulin nachweisbar; im Serum fanden sich Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin.

Gruppe D. In dieser Gruppe wurden je 8 Kaninchen durch intracorneale Injektion von Rinderserumalbumin (RSA) in die rechte und durch intracorneale Injektion von Humanalbumin (HA) in die linke Hornhaut immunisiert. In jede Hornhaut wurden wieder 0,05 ml der entsprechenden 20%igen Antigenlösung jeden 2. Tag, im ganzen 3 Injektionen injiziert (Gesamtdosis rechte Hornhaut 30 mg Rinderserumalbumin, linke Hornhaut 30 mg Humanalbumin).

Klinisches Bild. Die Hornhautveränderungen nach der intracornealen Antigeninjektion waren dieselben wie in Versuchsreihe I/B bzw. II/B/2 und B/3.

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren im Hornhautextrakt des rechten Auges nur Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und im Hornhautextrakt des linken Auges nur Präcipitine gegen Humanalbumin nachweisbar; im Serum fanden sich Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und Humanalbumin.

Gruppe E. In dieser Gruppe wurden je 8 Kaninchen durch intracorneale Injektion eines Gemisches von gleichen Teilen Rinderserumalbumin (RSA) und Rinderserumglobulin (RSG) in die rechte und durch intracorneale Injektion eines Gemisches von gleichen Teilen Humanalbumin (HA) und Rinderserumglobulin (RSG) in die linke Hornhaut immunisiert.

In jede Hornhaut wurden 0,05 ml des entsprechenden Antigen-gemisches (0,025 ml 20%iges Rinderserumglobulin und 0,025 ml 20%iges Rinderserumalbumin bzw. 0,025 ml 20%iges Humanalbumin und

0,025 ml 20%iges Rinderserumglobulin) jeden 2. Tag, im ganzen 3 Injektionen injiziert. Jedes Tier erhielt somit als Gesamtdosis in die rechte Hornhaut 15 mg Rinderserumalbumin + 15 mg Rinderserumglobulin und in die linke Hornhaut 15 mg Humanalbumin + 15 mg Rinderserumglobulin.

Klinisches Bild. Die Hornhautveränderungen nach der intracornealen Injektion des Antigengemisches waren dieselben wie in Versuchsreihe I/B bzw. II/B2 und B/3.

Präcipitintest. 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion waren bei allen Tieren im Hornhautextrakt des rechten Auges nur Präcipitine gegen Rinderserumalbumin und Rinderserumglobulin und im Hornhautextrakt des linken Auges nur Präcipitine gegen Humanalbumin und Rinderserumglobulin nachweisbar. Im Serum fanden sich Präcipitine gegen Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin und Humanalbumin.

Epikrise

Wurde in jede Hornhaut ein verschiedenes Antigen (rechts Rinderserumalbumin, links Rinderserumglobulin, Gruppe C, bzw. rechts Rinderserumalbumin, links Humanalbumin, Gruppe D) intracorneal injiziert, so fanden sich 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion in der Hornhaut nur die homologen Antikörper, im Serum hingegen konnten alle Antikörper nachgewiesen werden.

Wurde in jede Hornhaut je ein verschiedenes und je ein gleiches Antigen (rechts Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin, links Humanalbumin + Rinderserumglobulin, Gruppe E) intracorneal injiziert, so fanden sich 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion in der Hornhaut wieder nur die homologen Antikörper; im Serum konnten sämtliche Antikörper nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sind ebenso wie die Tatsache, daß nach lokaler intracornealer Antigeninjektion der Antikörpergehalt der Hornhaut wesentlich höher ist als nach intravenöser Allgemeinimmunisierung (Versuchsreihe I) nur durch die *Annahme einer lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut selbst zu erklären.*

Würde die traumatische Reaktion auf den Reiz des Nadelstiches bei der intracornealen Antigeneinverleibung oder das Antigen selbst als fremdes Eiweiß eine Anziehung bzw. Konzentration von irgendwo im Körper gebildeten Antikörpern in der Hornhaut bewirken, so müßten ähnlich wie im Blut in beiden Hornhäuten beide Antikörper annähernd im gleichen Verhältnis vorhanden sein.

Die von THOMPSON u. Mitarb. (1950, 1951) bei ähnlichen Versuchen gemachte Beobachtung, daß manchmal auch der nichthomologe Antikörper in der Hornhaut gefunden werden kann — wobei aber die Konzentration des homologen Antikörpers immer wesentlich höher war —

ist ohne weiteres verständlich, da sämtliche Antikörper im Serum vorhanden sind und wie unsere Versuche bei der gleichzeitigen intravenösen Immunisierung mit mehreren verschiedenen Antigenen zeigten, auch schon in der Hornhaut eines nichtgereizten Auges ähnlich wie im Blut sämtliche Präcipitine nachgewiesen werden konnten.

Die *höhere* Konzentration des homologen Antikörpers am Injektionsort (bei unseren Versuchen war die Konzentration des nichthomologen Antikörpers gleich Null) ist aber wie bereits erwähnt nur durch eine lokale Antikörperbildung zu erklären oder man müßte annehmen, daß das Antigen gerade nur auf den homologen, irgendwo im Körper gebildeten Antikörper eine „spezifische“ Anziehung ausübt und somit zu einer Konzentration nur der homologen Antikörper in der Hornhaut führt, während der nichthomologe Antikörper unbeeinflusst erscheint.

Daß die höhere Konzentration des homologen Antikörpers am Injektionsort von der Art und dem Molekulargewicht der verwendeten Antigene weitgehend unabhängig ist, zeigen die übereinstimmenden Ergebnisse in Versuchsgruppe C (Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin, Molekulargewichtsverhältnis etwa 1:2) in Gruppe D (Rinderserumalbumin, Humanalbumin, Molekulargewichtsverhältnis etwa 1:1) und Gruppe E (Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin, Molekulargewichtsverhältnis 1:2 bzw. Humanalbumin + Rinderserumglobulin, Molekulargewichtsverhältnis ebenfalls 1:2).

Die Frage der lokalen Antikörperbildung in der gefäßlosen Hornhaut ist ein Problem, das für die Klinik und Pathologie der Erkrankungen der Hornhaut äußerst wichtig erscheint, bis jetzt aber keineswegs gelöst ist.

Auf Grund der von uns erhobenen Befunde müssen wir ähnlich wie BURSUK und THOMPSON u. Mitarb. eine lokale Antikörperbildung am Injektionsort annehmen.

Die Annahme einer Anziehung und Konzentration irgendwo im Körper gebildeter Antikörper durch das in der Hornhaut vorhandene Antigen — eine Möglichkeit, die THOMPSON noch als Erklärung für den höheren Antikörpergehalt der Hornhaut nicht völlig auszuschließen glaubt, gegen das Konzentrationsgefälle Hornhaut—Blut wäre schwer verständlich.

Einen endgültigen Beweis zugunsten der Theorie der örtlichen Antikörperbildung am Auge speziell an der Hornhaut glaubte L. POLEFF bereits 1928 durch seine Untersuchungen mit Gewebskulturen erbracht zu haben. Er untersuchte die Antikörperbildung im Explantat der Hornhaut und der Milz (Hühnerembryo) und konnte in den Hornhaut- und Milzkulturen sowohl eine Antitoxinbildung (gegen Abrintoxin, Nachweis biologisch am Kaninchenaug) als auch eine Agglutininbildung (gegen Paratyphuskulturen, Nachweis Agglutininintest) nachweisen. Wenn auch

die Antikörperbildung in der Hornhautkultur weniger demonstrative Resultate als im Gewebe des klassischen Antikörperbildners, der Milz, zeigte, so waren die Ergebnisse nach POLEFF doch eindeutig im positiven Sinn zu werten.

Trotz dieser Tatsachen erschien die Annahme einer örtlichen Antikörperbildung in der Hornhaut, solange die Theorie vom „Reticuloendothel“ als einzige Antikörperbildungsstätte allgemein Gültigkeit hatte, von vornherein undiskutabel.

Neuere Erkenntnisse über die antikörperbildenden Zellen, über die Verteilung des einverleibten Antigens und damit auch über den Ort der Antikörperbildung sowie grundsätzlich neue Einblicke in die mannigfaltigen Funktionen und Aufgaben der Zellen des weichen Bindegewebes, die über den ganzen Körper ausgebreitet sind, lassen heute die Annahme einer lokalen Antikörperproduktion in der Hornhaut in einem völlig anderen Licht erscheinen.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, auf die zahlreichen experimentellen und morphologischen Untersuchungen sowie klinischen Beobachtungen, die allein in den letzten Jahren über diese Fragestellungen veröffentlicht wurden, im einzelnen einzugehen.

Es muß hier auf die neueren zusammenfassenden Darstellungen von H. SCHMIDT „Fortschritte der Serologie“ (Verlag von Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1955), „Entzündung und Immunität“, bearbeitet von R. BIELING, W. EHRICH, E. LETTERER und F. ROULET (im Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Bd. 7/1, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956), K. HANSEN, „Allergie“ (Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1957), und ähnliche Werke über dieses Gebiet hingewiesen werden.

Die Theorie der Antikörperbildung im RES wurde durch die lymphocytäre und diese wieder durch die plasmacelluläre Lehre, die heute fast allgemein anerkannt wird, ersetzt (M. BJORNEBOE u. Mitarb. 1941, 1943, 1947; A. FAGRAEUS 1946, 1947, 1948; spätere Arbeiten von W. EHRICH u. Mitarb. 1949 u. a.).

Die von A. H. COONS und M. H. KAPLAN (1942, 1950) entwickelte Methode, mit Hilfe fluoreszierender Antikörper die Verteilung des einverleibten Antigens im Gewebsschnitt bis in die einzelnen Zellen zu verfolgen, gestattete einen weiteren Einblick in das Schicksal des einverleibten Antigens und damit auch in den Antikörperbildungsort. Wie COONS u. Mitarb. mit dieser Methode in einer Reihe von Arbeiten (1950, 1951) unter anderem zeigen konnten werden bakterielle Polysaccharide (Pneumokokkenpolysaccharide Typ II und III) und Eiweißantigene (kristallisiertes Hühnereialbumin, Rinderserumalbumin und Menschen- γ -Globulin) nach intravenöser Injektion nicht nur in den Zellen des reticuloendothelialen Systems, sondern auch konstant und in auffallend

hoher Konzentration in den gewöhnlichen Capillarendothelien und Fibroblasten des ganzen Körpers abgelagert.

Durch Ausbau der Methode (Zweistufenverfahren) gelang es A. H. COONS u. Mitarb. (1955) auch die Zellen, die spezifische Antikörper gebildet hatten, im Gewebe histologisch nachzuweisen, wobei ihnen auch der eindeutige Nachweis der Antikörperbildung in den Zellen der plasmacellulären Serie gelang. Auf Grund ihrer Untersuchungen über die Antikörperbildung bei allgemein immunisierten (intravenös) und örtlich immunisierten (Fußpfote) Kaninchen kommen COONS und LEDUC sowie CONOLLY (1955) zum Schluß, daß der Hauptsitz der Antikörperbildung eine Familie von Zellen ist, die erst auf einen antigenen Reiz hin in Erscheinung treten, wobei erst durch diesen Reiz die Vermehrung und Differenzierung der Zellen mit gleichzeitiger Antikörper-Globulin-Synthese einsetzt. Die ausgereifte Zelle dieser Familie ist die Plasmazelle. Bei ihren Versuchen fanden sich nach intravenöser Injektion des löslichen Antigens die antikörperbildenden Zellen nicht nur in der roten Milzpulpa, in den Markfeldern der Lymphknoten und der Submucosa des Ileums, sondern auch im portalen Bindegewebe der Leber. Nach Injektion des Antigens in die Fußpfote fanden sich die antikörperbildenden Zellen zuerst in den Markfeldern der Lymphknoten der Poplitea auf der Injektionsseite des Antigens.

Bei einem sekundären immunisatorischen Reiz zeigten sich ähnliche Verhältnisse, nur waren die antikörperbildenden Zellen in wesentlich größerer Anzahl nachzuweisen.

Weitere Untersuchungen mit dieser Methode über die lokale Antikörperbildung in Granulomen nach subcutaner Injektion von mit Aluminiumphosphat präzipitiertem Hühnereiweiß oder Diphtherietoxoid zeigten (R. WHITE u. Mitarb. 1955), daß die Antikörperbildung nicht nur in den regionären Lymphknoten sondern auch im Granulationsgewebe um den Injektionsort, welches ebenfalls antikörperbildende Plasmazellen enthielt, gebildet werden.

Bei ihren Untersuchungen über die lokale Bildung von Antikörpern konnten C. L. OAKLEY u. Mitarb. (1949, 1951, 1954, s. auch hier Lit. über lokale Antikörperbildung) unter anderem zeigen, daß beim Kaninchen oder Meerschweinchen nach einem sekundären immunisatorischen Reiz durch Injektion von Diphtherie- oder Tetanustoxoid in die Haut, das Fettgewebe oder in den quergestreiften Muskel, spezifische Antitoxine am Injektionsort gebildet werden können, wobei Verfasser annehmen, daß die Antitoxine in den Bindegewebszellen oder in den Zellen des Granuloms, welches sich rasch um den Injektionsort entwickelt hatte, gebildet werden.

Die Transplantation des Fett- oder Muskelgewebes solcher sekundär stimulierter Kaninchen auf normale Kaninchen führte ebenso wie die

Transplantation der Lymphdrüsen der Poplitea von am zugehörigen Fuß inoculierten Tieren zur Weiterbildung von Antitoxin, wie wenn die betreffenden Gewebe im Spendertier verblieben wären.

In einer neueren Arbeit habe sich C. L. OAKLEY u. Mitarb. (1955) auch mit der Frage der Antikörperbildung in der sekundär stimulierten Kaninchen hornhaut befaßt: Primär subcutan mit Diphtherie- und Tetanustoxoid immunisierte Kaninchen wurden einige Wochen später einem sekundär immunisatorischen Reiz durch neuerliche subcutane Diphtherie- und Tetanustoxoidinjektion mit gleichzeitiger Diphtherie- oder Tetanustoxoidinjektion in die Hornhaut ausgesetzt und 10 Tage später das Antitoxinverhältnis (Te-Antitoxin/Di-Antitoxin) im Serum und im Hornhautextrakt bestimmt. Die jeweils im Vergleich zum Serum-Antitoxinverhältnis in der Hornhaut gefundene höhere Konzentration des homologen Antikörpers ist nach Ansicht der Verfasser nur durch eine lokale Antikörperbildung in der Hornhaut zu erklären.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden allgemein mit Diphtherietoxoid immunisierten Kaninchen einem sekundären immunisatorischen Reiz durch intracorneale Diphtherieinjektion unterzogen. Nach 3 bzw. 10 Tagen wurden die Hornhäute ausgeschnitten und halbiert. Eine Hälfte wurde auf ihren Antitoxintiter untersucht, die zweite in das Omentum nicht vorbehandelter Kaninchen eingepflanzt und die Serumantitoxintiterkurven der Empfängertiere bestimmt. Bei allen Tieren war das Maximum der Serumantitoxintiterkurve höher als das zu erwartende Maximum bei passiver Übertragung der Antitoxine des Transplantates — ein Befund, welcher für eine weitere Antikörperbildung in der injizierten Hornhaut nach ihrer Transplantation in das Empfängertier spricht.

Diese wenigen, nur kurz geschilderten Ergebnisse aus der allgemeinen Immunitätsforschung ergeben für die Frage der lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut eine Reihe wichtiger Hinweise:

1. Die antikörperbildende Zelle ist die Plasmazelle, die nach unseren *heutigen* Kenntnissen von der entzündlichen Proliferation nicht durch Einwanderung aus dem Blut, sondern durch örtliche Neubildung entsteht (W. EHRICH 1956).

2. Der Ort der Antikörperbildung hängt weitgehend von der Verteilung des Antigens, d. h. von der Art der Einverleibung des Antigens ab. Bleibt das Antigen am Injektionsort weitgehend lokalisiert, wie z. B. in Granulomen, ist die Antikörperbildung überwiegend lokal. Wird das Antigen rasch vom Lymphstrom abgeführt, findet die Antikörperbildung vorwiegend in den regionären Lymphknoten, bei intravenöser Einverleibung vorwiegend in der Milz statt.

3. Antikörperbildung kann auch im weichen, lockeren Bindegewebe (Haut, Fett, Muskel, portales Bindegewebe der Leber u. a.) stattfinden.

Die neuartige histologische Untersuchungsmethode FEYRTERS — die Einschlußfärbung nativer Gefrierschnitte mit Ehrlichschem saurem Hämatoxylin — ergab ungeahnte Einblicke in die geweblichen Zusammenhänge sowie in die mannigfaltigen Funktionen des Zellbestandes im weichen Bindegewebe.

Wie A. FEYTER im Darm und an der Uterusschleimhaut (1951, 1957), A. PISCHINGER in Lymphknoten, Milz und Tonsillen (1951—1954), A. PIRINGER-KUCHINKA im roten Knochenmark und in den Tonsillen (1951, 1954) u. a. mit dieser und anderen Untersuchungstechniken zeigen konnten, findet sich im weichen, lockeren Bindegewebe überall das gleiche morphologische Bild des Zellbestandes — 2 Arten von fixen Reticulumzellen, die miteinander syncytial in Verbindung stehen — mit nur lokal bzw. funktionell bedingten quantitativen Unterschieden.

Diese Zellen sind über den ganzen Körper ausgebreitet und zeichnen sich von den Zellen aller übrigen Binde- und Stützgewebe durch ihre Aktivität und mannigfaltigen, für den Körper wichtigen Funktionen aus. So konnte unter anderem der Nachweis erbracht werden, daß der Lymphocyt die losgelöste Erscheinungsform der kleinen Reticulumzelle darstellt und wie die anderen freien Zellen sich auch Plasmazellen aus dem Reticulum differenzieren können (A. PIRINGER-KUCHINKA 1954, A. PISCHINGER 1954).

Diese neuen wichtigen Erkenntnisse auf histologisch-morphologischem Gebiet schließen somit den Kreis und bringen die experimentell bewiesene Tatsache der lokalen Antikörperbildung im lockeren, weichen Bindegewebe unserem Verständnis näher.

Die für eine örtliche Antikörperbildung im Bindegewebe notwendige Voraussetzung — weitgehend langes Lokalisiertbleiben des einverleibten Antigens am Injektionsort — ist in der Hornhaut durch ihre Gefäßlosigkeit und durch das Fehlen von präformierten Lymphbahnen allein schon durch den anatomischen Bau gegeben und experimentell durch die Untersuchungen von R. THOMPSON und H. OLSON (1950), die intracorneal einverleibtes Antigen noch nach etwa 190 Std nachweisen konnten, erwiesen.

Wenn auch die straffe Faseranordnung und der Mangel an Capillaren einem Vergleich der Hornhaut mit dem lockeren oder weichen Bindegewebe zunächst zu widersprechen scheint, so ist doch die Hornhaut durch ihren *zelligen Aufbau* und *den Gehalt an vegetativen Nervenformationen* dem weichen Bindegewebe weitgehend ähnlich. Die versorgenden Capillaren sind nur aus der Hornhaut herausgerückt, der Stoffaustausch erfolgt jedoch ebenso wie beim lockeren Bindegewebe in der interfibrillären Substanz nur auf längere Strecken.

Es scheint daher die Annahme einer lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut nach intracornealer Antigeneinverleibung von anatomisch-morphologischer Seite nicht ausgeschlossen.

Die in Zusammenarbeit mit dem histologisch-embryologischen Institut der Universität Wien (Vorstand Prof. Dr. A. PISCHINGER) begonnenen ersten orientierenden Untersuchungen ergaben nach intracornealer Immunisierung, angefangen vom 10. Tag mit Höhepunkt am 15. Tag eine lebhafte Beteiligung der fixen Hornhautzellen. Es besteht also eine Koinzidenz zwischen dem Antikörpergehalt der Hornhaut und der Zellvermehrung. Die Beteiligung der Zellen am Geschehen drückt sich nicht nur in Zellneubildung, sondern auch in einer Differenzierung verschiedenster reticulärer und freier Formen von Bindegewebszellen aus dem fixen Bestand der orthoklonen Zellen aus. Diese Materie soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

Zur Klärung der örtlichen Immunitätsverhältnisse der Hornhaut wurden folgende Versuche, die gleichzeitig auch gewisse Rückschlüsse auf eine mögliche Antikörperbildung in der Hornhaut gestatten, durchgeführt.

Versuchsreihe I: Quantitatives Verhältnis des Antikörpergehaltes der Hornhaut bzw. des Serums nach intravenöser und intracornealer Immunisierung.

Versuchsreihe II: Qualitatives und quantitatives Verhältnis des Antikörpergehaltes der Hornhaut und des Serums nach gleichzeitiger intravenöser bzw. intracornealer Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene.

Versuchsreihe III: Qualitatives und quantitatives Verhalten der Antikörper in beiden Hornhäuten und im Serum nach intracornealer Einverleibung verschiedener Antigene in je eine Hornhaut.

Als Antigen wurde hochgereinigtes Rinderserumalbumin, Rinderserumglobulin und Humanalbumin bzw. Mischungen aus diesen Antigenen verwendet.

Der Nachweis der Präcipitine in Hornhautextrakt und Serum erfolgte qualitativ und quantitativ mit der von J. OUDIN ausgearbeiteten Gel-Präcipitationsmethode.

Der Präcipitingehalt der Hornhaut bzw. des Serums der intravenös immunisierten Tiere wurde mittels einer vergleichenden quantitativen Methode auf den Mittelwert der Antikörperkonzentration der Hornhaut bzw. des Serums der intracorneal immunisierten Tiere bezogen (Versuchsreihe I).

Wie die quantitativen Vergleichsuntersuchungen mit Rinderserumalbumin bzw. Rinderserumglobulin immunisierten Kaninchen zeigten, war der Antikörpergehalt der Hornhaut nach intracornealer Immunisierung etwa 4mal so hoch als nach intravenöser Immunisierung; der Antikörpergehalt des Serums hingegen betrug nach intracornealer

Immunisierung nur etwa $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ des Wertes nach intravenöser Immunisierung, d. h. nach *intracornealer* Immunisierung ist der *Antikörpergehalt der Hornhaut* wesentlich *höher* als nach *intravenöser* Immunisierung.

Nach gleichzeitiger intravenöser bzw. intracornealer Einverleibung mehrerer verschiedener Antigene (Rinderserumalbumin + Rinderserumglobulin + Humanalbumin) fanden sich 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion alle entsprechenden Präcipitine im Hornhautextrakt beider Augen und im Serum.

Die erhobenen Befunde zeigen, daß nach *gleichzeitiger* Immunisierung mit mehreren *verschiedenen* Antigenen unabhängig vom Immunisierungsweg die *gefäßlose Hornhaut* bezüglich der *qualitativen* Verteilung der Präcipitine *gegenüber dem Blut keine Sonderstellung* einnimmt.

Der Antikörpergehalt der Hornhaut war ähnlich wie bei Immunisierung mit nur einem Antigen auch bei intracornealer, gleichzeitiger Immunisierung mit mehreren verschiedenen Antigenen wesentlich höher als nach gleichzeitiger intravenöser Mehrfachimmunisierung.

Wurde in jede Hornhaut je ein *verschiedenes* bzw. je ein *verschiedenes* und je ein *gleiches* Antigen *intracorneal* injiziert, so fanden sich 15 Tage nach der letzten Antigeninjektion in der *Hornhaut* nur die *homologen Antikörper*, im *Serum* hingegen konnten immer *sämtliche Antikörper* nachgewiesen werden.

Dieses auffallende Ergebnis ist ebenso wie die Tatsache, daß nach örtlicher intracornealer Antigeninjektion der Antikörpergehalt der Hornhaut wesentlich höher ist als nach intravenöser Immunisierung nur durch die Annahme einer *lokalen Antikörperbildung* in der *Hornhaut* selbst zu erklären.

Es wird die Meinung vertreten, daß die neueren Erkenntnisse über die antikörperbildenden Zellen, über die Verteilung des einverleibten Antigens sowie über den Ort der Antikörperbildung zusammen mit den grundsätzlich neuen Einblicken in die mannigfaltigen Funktionen und Aufgaben der Zellen des weichen Bindegewebes die Annahme einer lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut nach intracornealer Antigeninjektion sehr wahrscheinlich machen.

Mittels der von uns gewählten Versuchsanordnung, die darin bestand, daß mehrere Antigene gleichzeitig in verschiedenen Kombinationen intracorneal bzw. intravenös injiziert wurden, war es möglich, zur Frage der lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut weitere Aussagen zu machen.

Literatur

BJORNEBOE, M., u. H. GORMSEN: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmazellen bei experimenteller Hyperglobulinämie beim Kaninchen. *Klin. Wschr.* **20**, 314—316 (1941). — Experimental studies on role of plasma cells as antibody producers. *Acta path. microbiol. scand.* Cit. by C. L. OAKLEY,

G. H. WARRACK and I. BATTY, Sites of antibody production *J. Path. Bact.* **61**, 179—194 (1949). — BJORNEBOE, M., H. GORMSEN and S. LUNDQUIST: Further experimental studies on role of plasma cells as antibody producers. *J. Immunol.* **55**, 121 (1947). Cit. by C. L. OAKLEY, G. H. WARRACK and I. BATTY, Sites of antibody production. *J. Path. Bact.* **61**, 179—194 (1949). — BRUCKNER, Z.: Contribution à la connaissance des conditions d'immunité de l'œil: influence de l'hypotension oculaire sur la quantité d'hémolysines existant dans la cornée (dans l'humeur aqueuse et le corps vitré) chez les lapins normaux et immunisés. *Ann. Oculist. (Paris)* **166**, 106—130 (1929). Ref. Zbl. ges. Ophthal. **21**, 776—777 (1929). — BURSUK, G.: antikörperbildung bei örtlicher Immunisierung der Cornea. *Arch. Oftal.* **4**, 333—354 (1928) [Russisch]. Ref. Zbl. ges. Ophthal. **20**, 789 (1928). — COHN, M.: Production of Antibodies in experimental animals. *Meth. med. Res.* **5**, 271—283 (1952). — COONS, A. H., H. J. CREECH, R. N. JONES and E. BERLINER: *J. Immunol.* **45**, 159 (1942). Zit. bei H. SCHMIDT, Fortschritte der Serologie. 2. Aufl. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1955. — COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exper. Med.* **91**, 1—113 (1950). — COONS, A. H., E. H. LEDUC and J. M. CONNOLLY: Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. exp. Med.* **102**, 49—59 (1955). — COONS, A. H., E. H. LEDUC and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. VI. The fate of injected foreign proteins in the mouse *J. exp. Med.* **93**, 173—188 (1951). — DOERR, R.: Ergebnisse der neueren experimentellen Forschungen über die Ätiologie des Herpes simplex und des Zoster. *Zbl. ges. Ophthal.* **14**, 705—735, 833—865 (1925); **15**, 1—19, 313—343, 537—573 (1926). — DOERR, R., et K. VÖCHTING: Études sur le virus de l'herpès febrile. *Rev. gén. Ophthal. (Paris)* **34**, 409—421 (1921). Ref. Zbl. ges. Ophthal. **4**, 405—406 (1921). — EHRLICH, W. E.: Die Entzündung. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. 7/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — EHRLICH, W. E., D. L. DRABKIN and C. FORMAN: Nucleic acids and production of antibody by plasma cells. *J. exp. Med.* **90**, 157—167 (1949). — ELEK, S. D.: Cit. by J. OUDIN, Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. *Meth. med. Res.* **5**, 335—378 (1952). — FAGRAEUS, A.: Den plasmacelluläre reaktionem vid antikroppsbildning. *Nord. Med.* **30**, 1381—1385 (1946). — The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J. Immunol.* **58**, 1—13 (1948). — Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *Nature (Lond.)* **159**, 499 (1947). Cit. by C. L. OAKLEY, G. H. WARRACK and I. BATTY, Sites of antibody production. *J. Path. Bact.* **61**, 179—194 (1949). — FEYRTER, F.: Über die Pathologie der vegetativen nervösen Peripherie und ihrer ganglionären Regulationsstätten. Wilhelm Maudrich 1951. — Über den zelligen Bestand des Stroma der menschlichen Corneamucosa. *Arch. Gynäk.* **190**, 47—82 (1957). — FLORMAN, A. L., and F. W. TRADER: Cit. by R. L. HALL, R. G. MAC KNESON and H. L. ORMSBY, Studies of immunity in experimental herpetic Keratitis in rabbits. — GASTEIGER, H.: Zur Frage der lokalen Immunisierung des Auges. *Arch. Augenheilk.* **99**, 219—234 (1928). — GEBB, H.: Über die Frage der Anteilnahme der Cornea an der aktiven und passiven Immunisierung. Bericht 36. Verslg Dtsch. Ophthalm. Ges. Heidelberg, 1910, S. 23—30. — Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung großer Serummengen bei Hornhautinfektionen und über die Anteilnahme der Cornea an der aktiven Immunisierung. *Arch. Augenheilk.* **69**, 77—96, 137—160 (1911). — GRÜTER, W.: Über den Anteil der Kaninchencornea an der allgemeinen Vaccine-Immunität. Bericht 36. Verslg Dtsch. Ophthalm. Ges. Heidelberg, 1910, S. 31—36. — Kritische und

experimentelle Studien über die Vaccine-Immunität des Auges und ihre Beziehungen zum Gesamtorganismus. Arch. Augenheilk. **70**, 241—282, 359—392 (1912). — Experimentelle und klinische Untersuchungen über den sog. Herpes cornæ. Bericht 42. Verslg Dtsch. Ophthalm. Ges. Heidelberg, 1920, S. 162—167. — HALL, R. L., R. G. MAC KNESEON and H. L. ORMSBY: Studies of immunity in experimental herpetic Keratitis in rabbits. Amer. J. Ophthal. **39**, 226—233 (1955). — HEKTOEN, L., and A. K. BOOR: Simultaneous multiple immunization. J. infect. Dis. **48**, 588—594 (1931). — KAPLAN, M. H., A. H. COONS u. H. W. DEANE: Localization of antigen in tissue cells. III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse J. exp. Med. **91**, 15—29 (1950). — KUFFLER, O.: Zit. bei H. GASTEIGER, Zur Frage der lokalen Immunisierung des Auges. Arch. Augenheilk. **99**, 219—234 (1928). — KURODA, T.: Experimentelle Studie über die Vaccineimmunität der Hornhaut. I. Mitt. Über das Vorkommen der viruliciden Stoffe im Serum nach der Corneaimpfung. Jap. J. Derm. **26**, 633—665 u. dtsch. Zus.fass. 38—39 (1926). Ref. Zbl. ges. Ophthal. **17**, 829 (1927). — LEDUC, E. H., A. H. COONS and J. M. CONNOLLY: Studies on antibody production II the primary and secondary responses in the popliteal lymphnode of the rabbit. J. exp. Med. **102**, 61—71 (1955). — LÖFFLER, F.: Zur Immunitätsfrage. Mitt. ksl. Gesdh.amt Berl. **1**, 134—187 (1881). — LÖWENSTEIN, A.: Neuere Ergebnisse der Herpesforschung. Bericht 42. Verslg Dtsch. Ophthalm. Ges. Heidelberg, 1920, S. 167—171. — Übertragungsversuche mit dem Virus des fieberhaften Herpes. Klin. Mbl. Augenheilk. **64**, 15—30 (1920). — MIYASHITA, S.: Die Immunitätsverhältnisse der Hornhaut. Z. Immun.-Forsch. **9**, 541—556 (1911). — OAKLEY, C. L., I. BATTY and G. H. WARRACK: Local production of antibodies. J. Path. Bact. **63**, 33—44 (1951). — Antibody production in the rabbit cornea. J. Path. Bact. **70**, 349—354 (1955). — OAKLEY, C. L., and G. H. WARRACK: Antibody production in transplants. J. Path. Bact. **67**, 485—505 (1954). — OAKLEY, C. L., G. H. WARRACK and I BATTY: Sites of antibody production. J. Path. Bact. **61**, 179—194 (1949). — OUCHTERLONY, Ö.: Cit. by J. OUDIN, Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. Meth. Res. med. **5**, 335—378 (1952). — OUDIN, J.: L'analyse immunochemique qualitative: Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsèrum précipitant gélosé; première partie. Ann. Inst. Pasteur **75**, 30—51 (1948). — L'analyse l'immunochemique qualitative: Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsèrum précipitant gélosé; deuxième partie. Ann. Inst. Pasteur **75**, 109—129 (1948). — La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues. Étude quantitative des trois principales variables. C. R. Acad. Sci. (Paris) **228**, 1890—1892 (1949). — Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. Meth. med. Res. **5**, 335—378 (1952). — PIRINGER-KUCHINKA, A.: Zum Bauplan des Knochenmarkgewebes. Verh. Dtsch. path. Ges. (35. Tagg) 193 (1951). — Zur Kenntnis des Bauplanes und der Zellvermehrung im Knochenmarkgewebe. Wien. klin. Wschr. **63**, 909—911 (1951). — Zur Histologie und Biologie der Gaumenmandel. Verh. path. dtsch. Ges. (37. Tagg), 186—189 (1954). — PISCHINGER, A.: Über den Bau des lymphoreticulären Gewebes und die Genese der Lymphocyten. Verh. anat. Ges. (Heidelberg) (49. Verslg). Anat. Anzeiger Erghtft zu Bd 98, 49—53 (1951). — Bau des Lymphsystems und Genese der Lymphocyten. Zbl. allg. path. Anat. **87**, 372 (1951). — Über die rote Pulpa der Milz, nebst Bemerkungen über das unspezifische Bindegewebe im allgemeinen. Z. mikr.-anat. Forsch. **59**, 286—299 (1952). — Über den Bau des Lymphgewebes und die Vermehrung der Lymphocyten. Z. Zellforsch. **40**, 101—116 (1954). — Über das Wesen der Kupfferschen Sternzellen. Z. Zellforsch. **40**, 605—611

(1954). — Über die Zellen des weichen Bindegewebes. Wien. klin. Wschr. **1958** (in Druck). — POLEFF, L.: Neuaussichten in der Erforschung der Immunitätsverhältnisse des Auges. Arch. Augenheilk. **97**, 259—277 (1926). — Zur Antikörperbildung im Explantat der Hornhaut. Arch. Augenheilk. **99**, 515—522 (1928). — RÖMER, P.: Experimentelle Grundlagen für klinische Versuche einer Serumtherapie des Ulcus corneae serpens nach Untersuchungen über Pneumokokkenimmunität. Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal. **54**, 99—200 (1902). — SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie, 2. Aufl. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1955. — SCHWAB, F.: Untersuchungen über den Antikörpergehalt der Hornhaut unter verschiedenen Bedingungen. Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal. **159**, 1—44 (1947). — Zur Frage des Agglutiningehaltes der Hornhaut nach Milchinjektion. 1957 (in Druck). — SZILY, A. v.: Über die Bedeutung der Anaphylaxie in der Augenheilkunde. Klin. Mbl. Augenheilk., N. F. **15**, 164—181 (1913). — Die Anaphylaxie in der Augenheilkunde. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914. — THOMPSON, R., E. GALLARDO and D. KHORAZO: Precipitins in the ocular tissues of rabbits generally and locally immunized with crystalline egg albumin. Amer. J. Ophthal. **19**, 852—858 (1936). — THOMPSON, R., and V. M. HARRISON: Factors affecting antibody production in the rabbit cornea. Fed. Proc. **13**, 515—516 (1954). — THOMPSON, R., and H. OHLSON: Antibody production in the rabbit's cornea. J. Immunol. **65**, 633—651 (1950). — THOMPSON, R., R. PFEIFFER and E. GALLARDO: Stimulation of local antibody formation in cornea by Grenz Rays. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **36**, 179—182 (1937). — WESSELY, K.: Über anaphylaktische Erscheinungen an der Hornhaut (experimentelle Erzeugung einer parenchymatösen Keratitis durch artfremdes Serum). Münch. med. Wschr. **58**, 1713—1714 (1911). — WHITE, R. G., A. H. COONS and W. M. CONNOLLY: Studies on antibody production. III. The Alumn Granuloma. J. exp. Med. **112**, 73—92 (1955). — WOODS, A. C.: Allergy and Immunity in Ophthalmologie. Baltimore: John Hopkins Press 1933. — YAMADA, Y.: Experimentelle Studien über die Lokalimmunität der Cornea. Acta soc. ophthal. jap. **34**, 1281—1305 (1930). Ref. Zbl. ges. Ophthal. **24**, 720 (1931). — ZADE, M.: Über die Antikörper der Hornhaut. Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal. **82**, 183—214 (1912).

Dr. F. SCHWAB, I. Universitäts-Augenklinik, Wien IX, Alserstr. 4