

## Fermenthistochemische und enzyelektrophoretische Untersuchungen an Rattenhoden in den ersten 48 Stunden experimenteller Cadmiumintoxikation\*

G. DIMOW

Klinik für Berufskrankheiten (Chefarzt: Prof. Dr. med. habil. Zw. ALEXIEWA)  
am Institut für Arbeitsschutz und Berufskrankheiten, Sofia  
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. M. LUKANOW)

D. KNORRE

Pathologisch-Bakteriologisches Institut am Krankenhaus St. Georg, Leipzig  
(Leiter: Prosektor Dr. med. habil. H. ECK)

Eingegangen am 23. Januar 1967

### *Enzyme Histochemical and Enzyme Electrophoretic Studies of Rat Testes During the First 48 Hours of Experimental Cadmium Poisoning*

*Summary.* Necrobiosis of the rat testis experimentally induced by one subcutaneous injection of cadmium chloride is associated with early changes of enzyme activities some hours before histological damage becomes apparent. It was previously believed the cadmium primarily attacked the interstitial vessels and secondarily damaged the germinal epithelium. The enzyme studies presented, however, strongly suggest the cadmium ion acts directly as a toxin on the germinal epithelium, too.

*Zusammenfassung.* Eine experimentelle Nekrobiose des Hodens durch einmalige subcutane Cadmiumchlorid-Injektion an der Ratte geht mit frühen Enzymaktivitätsveränderungen einher, noch Stunden bevor es zu histologisch erkennbaren Schäden gekommen ist. Während diese bisher für einen primären Angriffspunkt des Cadmium an den Gefäßen des Interstitiums und eine sekundäre Schädigung des Keimepithels sprachen, machen die vorliegenden enzymatischen Untersuchungen eine toxische Wirkung des Cadmiumions auch unmittelbar auf die Zellen des Keimepithels wahrscheinlich.

Cadmium (Cd) zeigt im Tierexperiment eine besondere Affinität zu den Hoden. Nach einmaliger subcutaner oder intraperitonealer Injektion einer Lösung von durchschnittlich 5,5 mg Cadmiumchlorid ( $\text{Cd Cl}_2$ )/kg Körpergewicht kommt es zur akuten Hodennekrose. Dies wurde von PAŘÍZEK und ZÁHOŘ 1956 an der Albinoratte nachgewiesen und von einer Reihe Autoren auch an anderen Laboratoriums-Säugetieren bestätigt. Doch besitzt anscheinend nur die Albinoratte eine konstante Empfindlichkeit gegenüber einer subcutanen Injektion (CHIQUEINE und SUNTZEFF, 1965).

Über den primären Angriffspunkt des Cd am Hoden besteht bisher noch keine Übereinstimmung. Eine speziell auf die Arteria spermatica interna (A. testicularis) und ihre Äste sowie auf den Plexus pampiniformis (GUNN u. Mitarb., 1961, 1963) gerichtete Wirkung mit Zirkulationsstörungen und nachfolgender Hodennekrose wird jedoch von der Mehrzahl der Untersucher angenommen.

\* Auszugsweise vorgetragen auf der 6. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Morphologie vom 14.—16. 10. 66 in Erfurt.

Da aber Cd als starkes Cytoplasmagift auch entfernt von Applikationsort auf dem Blutweg eine *unmittelbare* toxische Wirkung auf das Keimepithel entfalten könnte, erschien es uns naheliegend, enzymatische Untersuchungen im Frühstadium der Cd-Intoxikation vorzunehmen.

### Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangten 40 männliche 12 Wochen alte und 220–250 g schwere geschlechtsreife Albinoratten vom Wistarstamm. Die Tiere erhielten über der linken Hüftgegend eine einmalige subcutane Injektion von 0,2 ml/100 g Körpergewicht einer 0,015 M Lösung von  $\text{Cd Cl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in sterilem Aqua dest. (entsprechend 0,03 mM Cd  $\text{Cl}_2$ /kg Körpergewicht). Sie wurden 1, 3, 6, 12, 24 bzw. 48 Std post injectionem getötet.

Zur Orientierung wurden zunächst die Hoden einer Untersuchungsreihe konventionellen histologischen Methoden unterworfen. Um optimale Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten, wurden weiter für die *fermenthistochemischen* Untersuchungen Gruppen zu je drei Ratten gebildet, worunter immer ein Kontrolltier war. Die Tiere wurden nach einem zwischen den einzelnen Gruppen verzahnten Zeitplan injiziert. Jeweils eine Gruppe wurde zur gleichen Zeit getötet. Unter gleichbleibenden Untersuchungsbedingungen wurden deren Hoden rasch tief eingefroren und in *einem* Arbeitsgang im Kryostaten geschnitten. An den Schnittserien von gleicher Dicke wurden folgende Fermente nachgewiesen: Alkalische Phosphatase mit  $\alpha$ -Naphthylphosphat, unspezifische Esterase mit Naphthol-AS-Acetat, als Diazoniumsalze dienten Echtblau BB bzw. Echtblau RR; Succinodehydrogenase, Lactatdehydrogenase und DPN-Diaphorase mit Nitro-BT.

Die unspezifische Esterase sowie die Lactatdehydrogenase wurden außerdem in ihren *Isoenzymfraktionen* untersucht. Hierzu wurden Hodengewebshomogenate einer Versuchsreihe (Tötung 1–48 Std post injectionem wie oben) hergestellt und durch Agarelektrophorese in ihre Isoenzymfraktionen aufgetrennt. Die Isoenzyme der unspezifischen Esterase wurden dann mit  $\beta$ -Naphthylacetat, die der Lactatdehydrogenase mit Nitro-BT nachgewiesen. Die semiquantitative Auswertung der Isoenzymfraktionen erfolgte photometrisch mit einem Extinktionsschreiber (Densitometer Eri 10 der Firma Carl Zeiß, Jena, mit Zusatz für Agar-auswertung) und durch anschließende Planimetrie.

### Ergebnisse

#### 1. Konventionelle histologische und histochemische Methoden

In den ersten 3 Std nach der Cd-Injektion zeigten sich an den Hoden der getöteten Ratten mit histologischer Routinetechnik und histochemischen Methoden noch keine auffälligen Veränderungen. Nach 6 Std war es im Hodeninterstitium zur Capillarerweiterung mit Hyperämie gekommen, zu der sich nach 12 Std ein interstitielles Ödem gesellte, das reich an PAS-positiven Substanzen war. Erst zu diesem Zeitpunkt fiel auch eine Schädigung der Hodenkanälchen in Form einer Kernpyknose und Vermehrung PAS-positiven Materials im Protoplasma des Keimepithels auf. Nach 24 Std kam es an den Tubuli zur Ablösung der Epithelzellen sowie zur Karyorrhexis und Karyolysis, während am Hodenzwischengewebe Auflösungserscheinungen mit Diapedesisblutungen auffielen. Die schweren vasculären und tubulären Schäden mit Nekrobiose waren nach 48 Std noch wesentlich fortgeschritten.

#### 2. Fermenthistochemische Untersuchungen

Durch den Nachweis einiger Hydrolasen und Oxydoreductasen gelang es uns, die Schädigung am Hodeninterstitium und am Keimepithel noch um Stunden früher zu erfassen, wie aus der Tabelle hervorgeht. Sie gibt über die Aktivitätsänderungen der untersuchten Enzyme zwischen der 1. und 48. Std nach der Cd-Injektion im Vergleich zu den Kontrolltieren Auskunft.

Tabelle  
Enzymaktivitätsänderungen an den Hoden 1—48 Std nach subcutaner Cadmiumchlorid-Injektion

	Kon- trolle	1 Std	3 Std	6 Std	12 Std	24 Std	48 Std
Alkalische Phosphatase	+++	+++	++++	+++++	+++(+)	++(+)	+(+)
Unspezifische Esterase	+++	+++(+)	++++	++++	+++	++(+)	++
Succino- dehydrogenase	++++	++++	++++	+++	++	+(+)	(+)
Lactat- dehydrogenase	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
DPN- Diaphorase	++++	++++	+++(+)	+++	++	+(+)	(+)

#### a) Hydrolasen

Bei den Kontrolltieren besteht eine ausgeprägte Aktivität der *alkalischen Phosphatase* in den Gefäßwänden, weniger in den Leydigischen Zellen des Hodeninterstitiums, während das Keimepithel keine Aktivität besitzt. Schon 3 Std nach der Cd-Injektion ist eine Aktivitätssteigerung in den Gefäßwänden, dagegen kaum in den Leydigischen Zellen nachweisbar. Nach 6 Std hat die Aktivität an den Gefäßen des Interstitiums weiter zugenommen, aber auch die Leydigzellen lassen eine Aktivitätssteigerung erkennen. Von der 12. Std post injectionem an ist ein fortschreitendes Absinken der Enzymaktivität festzustellen, die nach 48 Std wesentlich unter der Aktivität bei den Kontrolltieren liegt (Tabelle).

Die *unspezifische Esterase* zeigt bei den Kontrolltieren ebenfalls eine ausgeprägte Aktivität im Interstitium (Gefäßwände und Leydigische Zellen), weniger in den Tubuli. 3 Std post injectionem ist ein deutlicher Aktivitätsanstieg, auch am Keimepithel erkennbar. Nach 12 Std sinkt die Aktivität bis zur 48. Std des Experimentes laufend ab (Tabelle).

#### b) Oxydoreductasen

Auch bei den untersuchten Fermenten dieser Gruppe fällt eine fortschreitende Aktivitätsminderung auf, wobei nur die Lactatdehydrogenase einen vorübergehenden Aktivitätsanstieg erkennen läßt.

Bei der *Succinodehydrogenase* hat 6 Std post injectionem die Aktivität im Hodenzwischengewebe und in den Tubuli deutlich abgenommen und sinkt in den nachfolgenden Stunden weiter ab (Tabelle).

Bei der *Lactatdehydrogenase* findet sich nach 3 Std zunächst ein Aktivitätsanstieg am Keimepithel und im Interstitium, der nach 6 Std wieder etwas zurückgegangen ist. Dann kommt es zu einem fortschreitenden Aktivitätsabfall bis zur 48. Std der Untersuchung (Tabelle).

Die *DPN-Diaphorase* zeigt schon nach 3 Std einen Rückgang, nach 12 Std eine wesentliche Verminderung ihrer Aktivität, die nach 48 Std weitgehend geschwunden ist (Tabelle).

## 3. Isoenzyme

An Hodengeweobshomogenaten, die der Agar-Elektrophorese unterworfen wurden, ist bei den Kontrolltieren die unspezifische Esterase durch drei Fraktionen mit nur schwacher Aktivität der 1. Fraktion, die Lactatdehydrogenase durch fünf Fraktionen gekennzeichnet, von denen LDH<sub>4</sub> und LDH<sub>5</sub> die stärkste Aktivität zeigen (Abb. 1a).

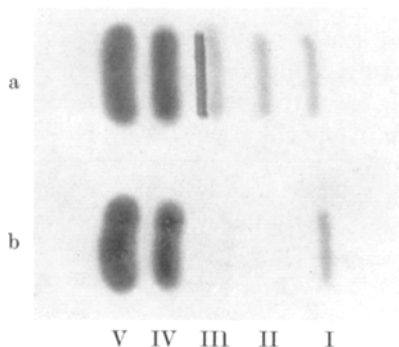


Abb. 1

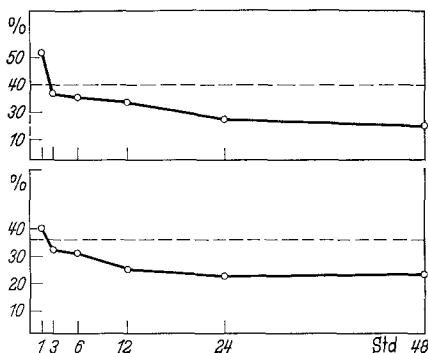


Abb. 2

Abb. 1. a Lactatdehydrogenase (LDH) mit fünf Isoenzymfraktionen (Kontrolltier). Zwischen III und IV Auftragungsspalt. b Weitgehender Aktivitätsverlust der 2. und 3. Fraktion 1 Std nach subcutaner Cadmiumchlorid-Injektion

Abb. 2. Änderungen der Isoenzymaktivitäten 1–48 Std post injectionem (Gesamtaktivität aller Fraktionen = 100%). Unten LDH<sub>4</sub>, oben LDH<sub>5</sub>. — — — Kontrolle

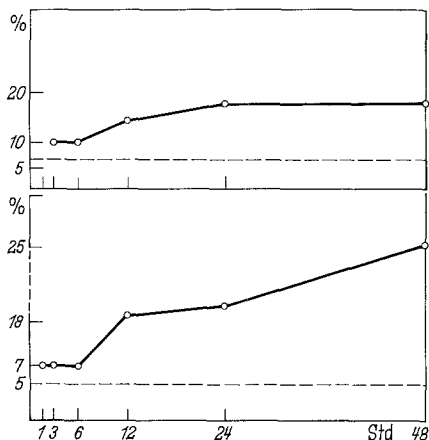


Abb. 3

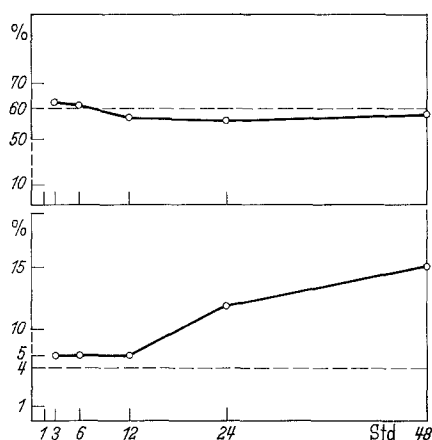


Abb. 4

Abb. 3. Unten LDH<sub>1</sub>, oben LDH<sub>2</sub> 1–48 Std post injectionem. — — — Kontrolle

Abb. 4. Unspezifische Esterase. Unten 1. Fraktion, oben 3. Fraktion 1–48 Std post injectionem. — — — Kontrolle

Schon 1 Std nach der Cd-Injektion ist bei der *Lactatdehydrogenase* die Aktivität der 2. und 3. Fraktion sehr stark abgesunken und kaum noch nachweisbar (Abb. 1b); hingegen steigt die Aktivität der 4. und 5. Fraktion gegenüber den Kontrolltieren zunächst an, wie aus den durch Photometrie und anschließende Planimetrie gewonnenen Diagrammen hervorgeht (Abb. 2).

3 Std nach der Injektion liegt die Aktivität der  $\text{LDH}_4$  und  $\text{LDH}_5$  aber bereits wieder unter dem Kontrollwert und nimmt bei der  $\text{LDH}_5$  bis zur 48. Std laufend ab, während sie bei der  $\text{LDH}_4$  schon nach 24 Std ihren vorläufig niedrigsten Wert erreicht hat (Abb. 2). Die Aktivität der  $\text{LDH}_1$  nimmt dagegen mit großer Stufe zwischen 6. und 12. Std bis zur untersuchten 48. Std fortschreitend zu, während die  $\text{LDH}_2$  bei flacherem Anstieg ihren höchsten Wert schon nach 24 Std erreicht (Abb. 3).

Die Isoenzyme der *unspezifischen Esterase* lassen bei der 3. Fraktion nach einem in der 3. Std nachweisbaren geringgradigen Aktivitätsanstieg ein langsames Absinken bis zur 24. Std erkennen, danach steigt die Aktivität bis zur 48. Std nur sehr wenig an, wobei sie unter dem Kontrollwert bleibt (Abb. 4). Die 1. Fraktion zeigt nach einer von der 3. bis zur 12. Std gleichbleibenden geringen Erhöhung einen erheblichen fortschreitenden Aktivitätsanstieg, der zwischen der 12. und 24. Std am steilsten ist (Abb. 4). Auch bei der hier nicht dargestellten 2. Fraktion ist eine ähnliche Zunahme der Enzymaktivität zu verzeichnen.

### Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen an der Ratte lassen erkennen, daß eine bis zur totalen Nekrose fortschreitende Hodenschädigung nach subcutaner  $\text{Cd Cl}_2$ -Injektion mit frühzeitigen tiefgreifenden Enzymveränderungen einhergeht. Bis zur 48. Std nach der Injektion ist die Aktivität aller am Kryostatschnitt untersuchten Fermente wesentlich abgesunken. Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase und der unspezifischen Esterase zeigen teils einen Anstieg, teils ein Absinken ihrer Aktivität.

Bereits 1 Std post injectionem kommt es bei den Isoenzymen der Lactatdehydrogenase zu einem vorübergehenden fast vollständigen Aktivitätsverlust der 2. und 3. und zu einer kurzfristigen Aktivitätssteigerung der 4. und 5. Fraktion, während die Gesamtaktivität an den Kryostatschnitten erst nach 3 Std einen vorübergehenden Anstieg zeigt. Bei der alkalischen Phosphatase ist ebenfalls schon nach 3 Std ein Aktivitätsanstieg, wenn auch zunächst nur an den Gefäßen des Interstitiums nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt lassen die übrigen untersuchten Enzyme aber auch am *Keimepithel* meist schon deutlich ausgeprägte Aktivitätsveränderungen erkennen.

Während bisher mit histologischen Routinemethoden eine Cd-Schädigung des Interstitiums, besonders der darin verlaufenden Gefäße als das Primäre, die erst nach 12 Std erkennbare Tubulusschädigung hingegen als sekundär angesehen wurde (GUNN u. Mitarb., 1963), zeigen unsere enzymatischen Untersuchungen, daß die Schädigung des Keimepithels neben der des Interstitiums schon sehr früh einsetzt, was eine unmittelbare toxische Wirkung des mit dem Blutstrom herangeführten Cd-Ions auf die Samenzellen wahrscheinlich macht. Die nachfolgende Nekrobiose des gesamten Hodens dürfte jedoch eher Folge der gleichzeitig wirkenden zusätzlichen Gefäßschädigung sein.

Die Verfolgung der Aktivitätsverschiebungen über den Zeitraum von 48 Std hinaus soll weiteren Untersuchungsreihen vorbehalten bleiben.

### Literatur

- CHIQUOINE, A. D., and V. SUNTZEFF: Sensitivity of mammals to cadmium necrosis of the testis. *J. Reprod. Fertil.* **10**, 455 (1965).
- GUNN, S. A., T. C. GOULD, and W. A. D. ANDERSON: Zinc protection against cadmium injury to rat testis. *Arch. Path.* **71**, 274 (1961).
- — — The selective injurious response of testicular and epididymal blood vessels to cadmium and its prevention by zinc. *Amer. J. Path.* **42**, 685 (1963).
- PAŘÍZEK, J., and Z. ZÁHOŘ: Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature (Lond.)* **177**, 1036 (1956).

Oberarzt Dr. med. DIETER KNORRE  
Pathologisch-Bakteriologisches Institut am Krankenhaus St. Georg  
X 7021 Leipzig, Str. d. DSF 141