

## Enzymatische Untersuchungen an Rattenhoden innerhalb 30 Tagen nach Cadmium-induzierter Nekrose\*

DIETER KNORRE

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

Eingegangen am 11. Mai 1968

### *Enzymatic Studies of Rat Testes during 30 Days after Cadmium Induced Necrosis*

*Summary.* An acute necrosis of the rat testis, induced by one subcutaneous injection of cadmium chloride, is followed by inflammation and repair. Regeneration begins in the tunica albuginea and spreads into the interstitium towards the centre. It is associated with a return of the activity of hydrolytic and oxidative enzymes that are greatly reduced in the necrotic testis. The revival of the enzymatic activities is caused by the proliferating tissue, but is not a specific quality of the testicular tissue, as is obvious from the markedly changed isoenzymatic fractions. The necrotic germinal epithelium shows no attempt to regenerate. This supports the former suggestion that cadmium ion acts directly as a toxin on the germinal epithelium.

*Zusammenfassung.* Einer akuten Hodennekrose bei der Ratte, hervorgerufen durch eine einmalige subcutane Injektion von Cadmiumchlorid, folgt eine reparatorische Entzündung, die von der Hodenkapsel ausgeht und sich im Interstitium zentralwärts ausbreitet. Sie ist mit einem Wiederanstiegen der im nekrotischen Hoden stark abgesunkenen Aktivität hydrolytischer und oxydativer Enzyme verbunden. Das Wiederaufleben der Enzymaktivitäten ist durch das Granulationsgewebe bedingt und nicht mehr eine spezifische Eigenschaft des Hodengewebes. Dies kommt auch durch die stark veränderten Isoenzymfraktionen zum Ausdruck. Das nekrotische Keimepithel zeigt keinerlei Ansatz zur Regeneration. Das kann die frühere Annahme einer unmittelbaren toxischen Schädigung des Keimepithels durch das Cd-Ion noch unterstützen.

Eine bei der Albinoratte durch Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) hervorgerufene akute Hodennekrose geht mit frühzeitigen tiefgreifenden Enzymveränderungen (DIMOW und KNORRE, 1967) einher. Sie sprechen für eine unmittelbare toxische Wirkung des auf dem Blutweg herangeführten Cd-Ions auf die Samenzellen. Hingegen läßt sich die nachfolgende Nekrobiose des gesamten Hodens auf die gleichzeitig wirksame Gefäßschädigung zurückführen.

Die folgenden Untersuchungen betreffen die weiteren Vorgänge am Hoden bis zu 30 Tagen nach einmaliger subcutaner  $\text{CdCl}_2$ -Injektion.

### Material und Methoden

Für die Versuche wurden 24 männliche etwa 12 Wochen alte, 180—230 g schwere geschlechtsreife Albinoratten vom Wistarstamm verwendet. Hinzu kommen 12 gleichartige Kontrolltiere. Es wurden drei Untersuchungsgruppen zu je 8 Versuchs- und 4 Kontrolltieren gebildet. Jede Gruppe diente für einen anderen Untersuchungszeitraum (7, 14 bzw. 30 Tage).

Einmalige subcutane Injektion in der linken Hüftgegend und angewandte Dosis (0,03 mM  $\text{CdCl}_2/\text{kg}$  Körpergewicht) entsprechen genau der Durchführung bei den vorangegangenen

\* In memoriam G. DIMOW, Sofia, 4. 2. 1924 bis 26. 9. 1967.

Experimenten (DIMOW und KNORRE, 1967). Die  $\text{CdCl}_2$ -Injektion erfolgte wieder nach einem vorher festgelegten Zeitplan, der eine gleichzeitige Untersuchung von Einzeltieren dieser drei Gruppen ermöglichte. Tötung durch Nackenschlag, sofortiges Einfrieren der entnommenen Hoden bei  $-70^\circ\text{C}$ , Kryostatschnitt-Technik, angewandte Methoden zum Nachweis hydrolytischer und oxydativer Enzyme, auch der Isoenzymnachweis stimmen mit dem bisherigen Vorgehen überein.

Im einzelnen wurden an den jeweils  $10\ \mu$  dicken Kryostatschnitten folgende Hydrolasen und Oxydoreduktasen nachgewiesen: Alkalische Phosphatase nach MANHEIMER und SELIGMAN mit  $\alpha$ -Naphthylphosphat und Echtblausalz BB (Inkubationsdauer 25 min bei  $37^\circ\text{C}$ ), unspezifische Esterase nach BURSTONE mit Naphthol-AS-Acetat und Echtblausalz RR (Inkubation für 20 min bei  $37^\circ\text{C}$ ); Succinodehydrogenase, Lactatdehydrogenase und  $\text{NADH}_2$ -Diaphorase nach NACHLAS u. Mitarb. mit Nitro-BT als Acceptor (Inkubationsdauer für die Succinodehydrogenase 20 min, für die Lactatdehydrogenase 5 min und für die  $\text{NADH}_2$ -Diaphorase 10 min bei  $37^\circ\text{C}$ ).

Außerdem wurden die unspezifische Esterase und die Lactatdehydrogenase hinsichtlich ihrer Isoenzyme untersucht. Dazu wurden Hodengewebehomogenate einer jeden Untersuchungsgruppe hergestellt und der Agar-Gel-Elektrophorese (WIEME, 1965) unterworfen. Bei der unspezifischen Esterase erfolgte die Visualisation der Isoenzymfraktionen nach UREL (1960) mit  $\beta$ -Naphthylacetat und Echtblausalz B (Inkubationsdauer 20 min bei  $37^\circ\text{C}$ ), bei der Lactatdehydrogenase nach VAN DER HELM (1961) mit Nitro-BT als Acceptor (Inkubation für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ ). Die Isoenzymfraktionen wurden dann mit einem Extinktionschreiber photometriert. Die semiquantitative Auswertung der Extinktionskurven erfolgte durch Planimetrie.

Die Isoenzym-Diagramme ergeben sich aus den errechneten Mittelwerten der Isoenzymfraktionen der Tiere einer jeweiligen Untersuchungsgruppe. Die Kontrollwerte stellen die Mittelwerte der Isoenzymfraktionen sämtlicher Kontrolltiere dar, wobei im Untersuchungszeitraum von 7 bis zu 30 Tagen nur geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren bestehen.

## Ergebnisse

### 1. Makroskopischer Befund

7 Tage nach der  $\text{CdCl}_2$ -Injektion sind die Hoden gegenüber 48 Std (DIMOW und KNORRE, 1967) bereits kleiner und härter geworden. Nach 14 Tagen ist die Hodenkapsel fleckförmig getrübt und läßt rostartige oder lehmgelbe Felder bei nekrotischer Schnittfläche durchscheinen. Nach 30 Tagen sind die Hoden noch mehr geschrumpft, und ihr Gewicht ist auf weniger als die Hälfte der Norm zurückgegangen.

### 2. Histologische und ergänzende histochemische Untersuchungen

Nach 7 Tagen sind die schweren Schäden im Interstitium und an den Tubuli noch recht ausgeprägt (Abb. 1). Leydigische Zellen lassen sich nicht mehr unterscheiden. Das Tubulusepithel ist durchweg nekrotisch. Die Spermien sind meist zerfallen, die Spermienchwänze hyperchromatisch und in Resten noch bis zum Ende der Beobachtungszeit nachweisbar.

Nach 14 Tagen ist es an der Innenseite der verbreiterten Tunica albuginea und subcapsulär zu einer starken Zellproliferation gekommen. Zwischen den Zellwucherungen und Capillarsprossen sind reichlich PAS-positive Substanzen nachweisbar, ebenso in den Gefäßwänden bei verbreitertem adventitiellem Bindegewebe. Subcapsulär und auch im Interstitium finden sich Siderophagen. Die zentraleren Abschnitte des Interstitiums sind noch völlig nekrotisch. Der Zellschutt in den untergegangenen Tubuli enthält reichlich Lipide, auch stellenweise ein eisenhaltiges Pigment.

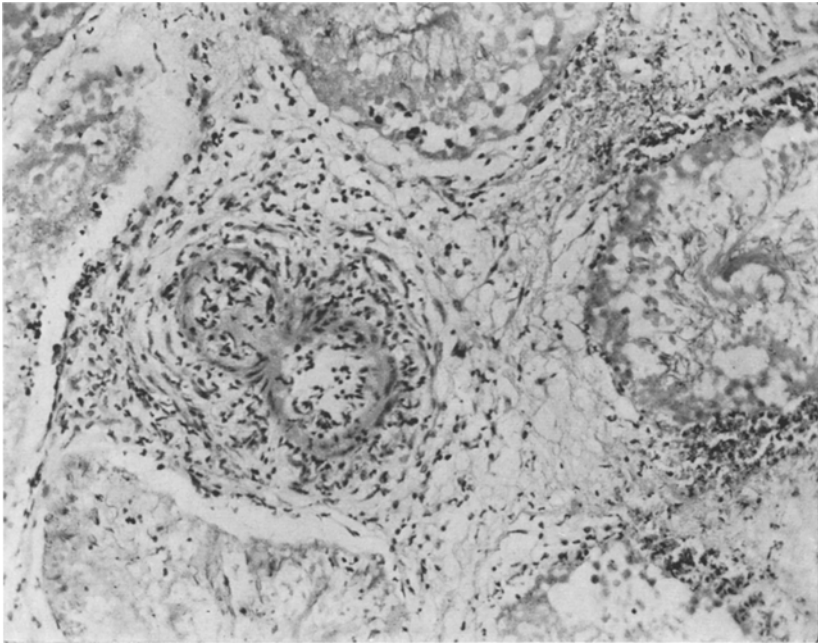


Abb. 1. Hoden 7 Tage nach subcutaner Cadmiumchlorid-Injektion: Kerntrümmer in nekrotischen Abschnitten des ödematösen Interstitiums und lockere, perivascular dichtere Rundzell- und Leukocyteninfiltrate; Wucherung der Adventitialzellen und Gefäßendothelien. Totale Nekrose der Samenkanälchen mit Spermienresten. HE, Vergr. 150:1

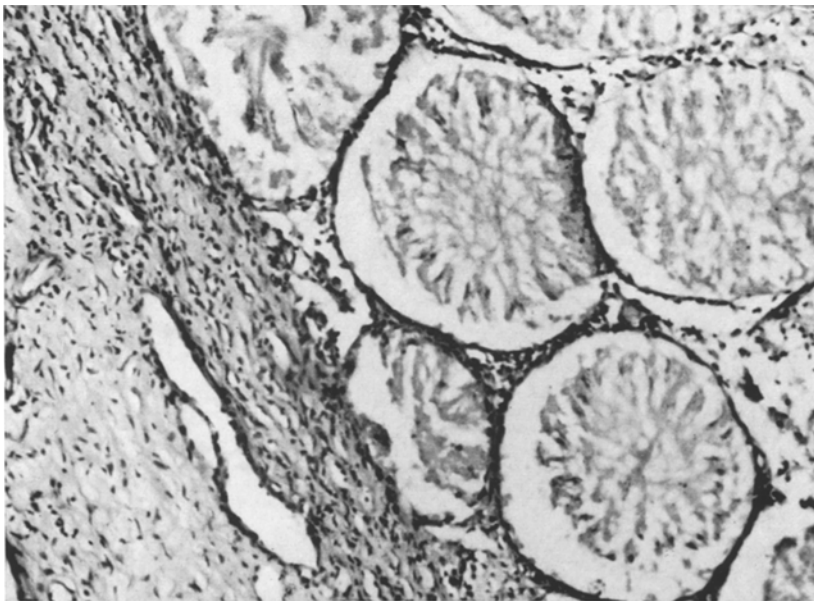


Abb. 2. Hoden 30 Tage nach subcutaner Cadmiumchlorid-Injektion: Bindegewebige Verbreiterung der Tunica albuginea mit chronischer granulierender und vernarbender Entzündung im inneren Drittel und im Interstitium zwischen den nekrotischen Tubuli. HE, Vergr. 120:1

Nach 30 Tagen fällt eine beträchtliche Kapselverdickung (Abb. 2) und eine Vermehrung des subcapsulären Bindegewebes auf, das die peripheren Zweidrittel des Hodenparenchyms durchdringt und neben vermehrten Capillaren reichlich Fibroblasten bzw. Fibrocyten und Rundzellansammlungen enthält. Die Wände der Arterien und Arteriolen sind meist verdickt, ihre Lumina eingeengt.

### 3. Fermenthistochemische Untersuchungen

a) *Hydrolasen*. Bei der *alkalischen Phosphatase* ist 7 Tage nach der  $\text{CdCl}_2$ -Injektion die Aktivität gegenüber 48 Std wieder angestiegen, vor allem in den Capillarwänden. Eine starke Aktivität findet sich auch in den meist perivaskulären Rundzellansammlungen des Interstitiums und saumartig um die nekrotischen Tubuli.

Mit der proliferativen Reaktion (14 Tage) nimmt die Fermentaktivität bis zum Ende der Beobachtungszeit weiter zu (Tabelle), besonders an der Innenseite der Tunica albuginea sowie in den von hier vordringenden Zellsprossungen (Abb. 3) und neugebildeten Capillaren, auch in den Wänden kapselnaher Gefäße (Abb. 4).

Die *unspezifische Esterase* zeigt ein entsprechendes Verhalten mit Aktivitätszunahme besonders im subcapsulären Interstitium und schwächerer Aktivität in den verschiedenen Zellgruppen der zentraleren Hodenabschnitte.

Mit der Zellproliferation steigt die Fermentaktivität vor allem in der Peripherie, bis zum Ende der Beobachtungszeit auch in den Zellen des übrigen Interstitiums weiter an (Tabelle).

b) *Oxydoreduktasen*. 7 Tage post injectionem zeigen die untersuchten Enzyme dieser Gruppe in den Wandungen größerer Arterien und Venen in Kapselnähe noch keine sichere Zunahme der Aktivität. Sie ist nur in den Endothelien einzelner Capillaren, auch in Infiltratzellen des Interstitiums in Kapselnähe stärker. Im Tubulusepithel ist gegenüber 48 Std die Aktivität so gut wie vollständig geschwunden, was sich bis zum Ende der Beobachtungszeit nicht mehr ändert (Tabelle).

Nach 14 Tagen findet sich bei den Oxydoreduktasen eine Aktivitätszunahme im Interstitium, wobei die Aktivität aber hinter den hydrolytischen Enzymen zurückbleibt.

Bei der  *$\text{NADH}_2$ -Diaphorase* und der *Lactatdehydrogenase* ist zu diesem Zeitpunkt ein wesentlicher Anstieg der Enzymaktivität mit annähernd gleicher Lokalisation wie bei den hydrolytischen Enzymen zu verzeichnen: An der Innenseite der Tunica albuginea, in den Wänden kapselnaher Arterien, im Bereich von perivaskulären Rundzellansammlungen, recht ausgeprägt auch in den kleinen Arterien, Arteriolen und neugebildeten Capillaren des Interstitiums. In den völlig nekrotischen zentraleren Abschnitten des Zwischengewebes fehlt die Aktivität noch.

Nach 30 Tagen hat die Fermentaktivität in den Gefäßwänden und in den durch Sprossung vermehrten Capillaren auch zentralwärts weiter zugenommen (Abb. 5).

Die *Succinodehydrogenase* ist bei gleicher Lokalisation im gesamten Beobachtungszeitraum wesentlich schwächer nachweisbar (Tabelle).

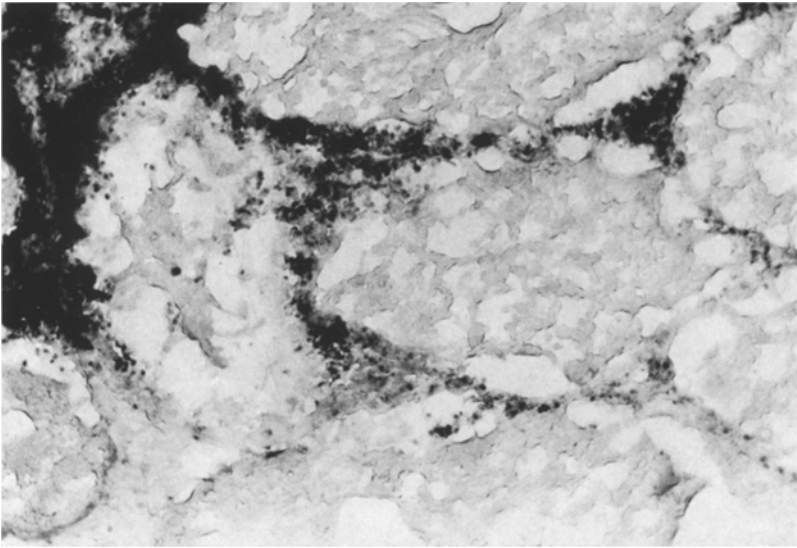


Abb. 3. Alkalische Phosphatase mit starker Aktivität entzündlich-proliferativer Zellelemente des Hodeninterstitiums (bei Totalnekrose der Tubuli) 30 Tage post injectionem. Vergr. 190:1

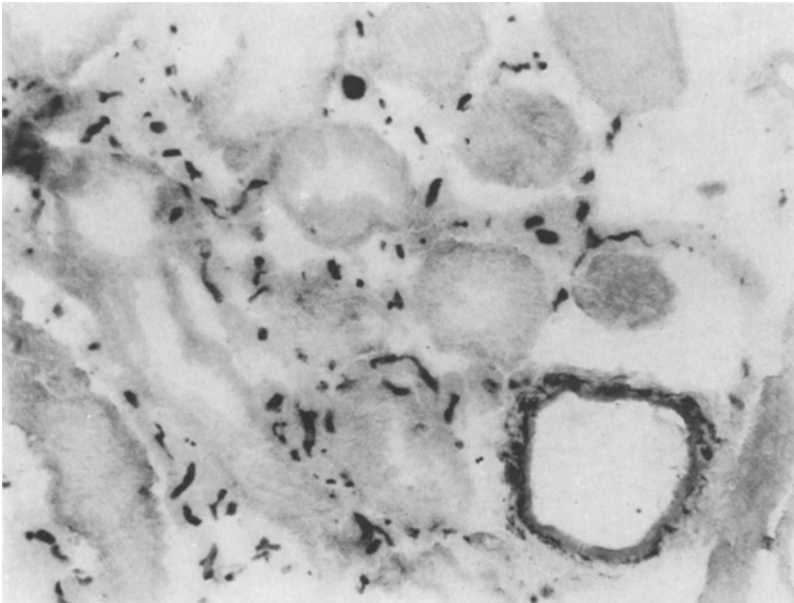


Abb. 4. Alkalische Phosphatase in den neugebildeten Capillaren bzw. Capillarsprossungen des kapselnahen Interstitiums sowie in der Wand eines subkapsulären Gefäßes 30 Tage post injectionem. Vergr. 150:1

#### 4. Isoenzyme

Bei den Isoenzymfraktionen der *Lactatdehydrogenase* (LDH) zeigt sich 7 Tage nach der  $\text{CdCl}_2$ -Injektion gegenüber den Kontrollwerten eine (auf die aktuelle Gesamtaktivität = 100 bezogene) starke Verminderung der 5. und 4. (Abb. 6),

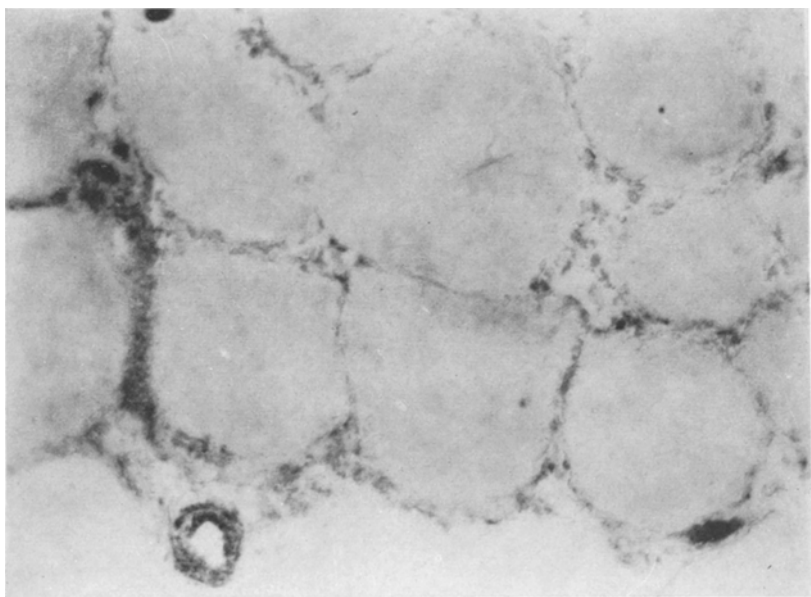


Abb. 5. NADH<sub>2</sub>-Diaphorase mit unterschiedlicher Aktivität im Interstitium, am deutlichsten in Capillaren und in der Wand einer Arteriole 30 Tage post injectionem. Vergr. 120:1

Tabelle. *Enzymaktivitätsanstieg im Hodeninterstitium (Kryostatschnitte) 7–30 Tage nach Cadmium-induzierter Nekrose (Stärke der Aktivität visuell geschätzt). Aktivitätsminimum im Interstitium (I) nach 48 Std, in den Tubuli (T) nach 7 Tagen erreicht (in den Tubuli kein Wiederauftreten der Aktivität)*

	Kontrolle		48 Std		7 Tage		14 Tage		30 Tage	
	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
Alkalische Phosphatase	+++	—	+(+)	—	++	—	+++	—	++++	—
Unspezifische Esterase	+++	++	+	(+)	++(+)	—	+++	—	+++	—
Succino-dehydrogenase	++	+++	(+)	(+)	+	—	+	—	+(+)	—
Lactat-dehydrogenase	++++	++	+	(+)	+	—	++	—	+++	—
NADH <sub>2</sub> -Diaphorase	++++	++(+)	+	(+)	+	—	++	—	+++	—

auch der 3. Fraktion, wobei die LDH<sub>4</sub> sogar fast bis auf ein Drittel abgenommen hat, gleichzeitig sind die LDH<sub>2</sub> und LDH<sub>1</sub> prozentual etwa um das Vier- bzw. Zwölfwache angestiegen (Abb. 7). Nach 14 Tagen ist ein deutlicher Anstieg der 5. und 4. (Abb. 6), auch der 3. Fraktion auf Kosten einer erheblichen Erniedrigung der 1., weniger der 2. Fraktion zu verzeichnen (Abb. 7). Die LDH-Fractionen ändern sich dann bis zum Ende der Beobachtungszeit nur gering (Abb. 6 und 7).

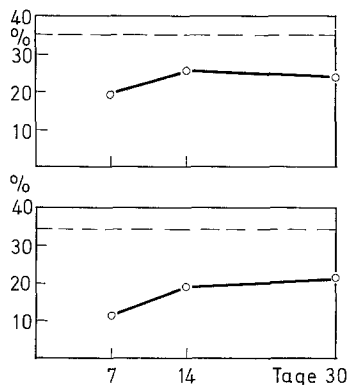


Abb. 6

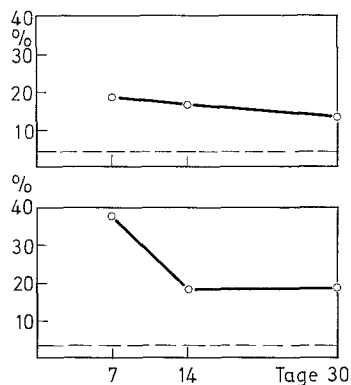


Abb. 7

Abb. 6. Wandel der Isoenzymaktivitäten der Lactatdehydrogenase (LDH) 7—30 Tage nach subcutaner  $\text{CdCl}_2$ -Injektion (jeweilige Gesamtaktivität aller Fraktionen = 100%). Unten  $\text{LDH}_4$ , oben  $\text{LDH}_5$ . — Kontrolle

Abb. 7. Unten  $\text{LDH}_1$ , oben  $\text{LDH}_2$  7—30 Tage post injectionem. — Kontrolle

Bei den 4 Isoenzymen der *unspezifischen Esterase* sind die 3. und 4. Fraktion meist verschmolzen. Im Vergleich mit den Kontrollwerten liegt nach 7 Tagen ein relativer Anstieg der 3. und 4. Fraktion bei einer bedeutenden Abnahme der 1. Fraktion vor (Abb. 8). Nach 14 Tagen haben sich die 3. und 4. Fraktion wieder dem Kontrollwert prozentual genähert, während die 2. Fraktion einen relativen Anstieg zeigt. Nach 30 Tagen hat die 1. Fraktion auf Kosten der 2. zugenommen, während sich die 3. und 4. Fraktion prozentual nicht mehr verändert hat (Abb. 8).

### Besprechung

Die reaktiv-entzündliche Proliferation beginnt schon einige Tage nach der Cd-induzierten Hodennekrose. Sie erreicht 14 Tage nach der  $\text{CdCl}_2$ -Injektion einen Höhepunkt und schreitet bis zum Ende der Beobachtungszeit zentralwärts fort. Die Zellwucherungen und Capillarsprossungen gehen von der vasculären Schicht der Tunica albuginea aus und dringen zunächst in die subkapsulären Abschnitte des ödematös-nekrotischen Hodeninterstitiums ein. Das junge Granulationsgewebe ist reich an hydrolytischen und oxydativen Enzymen.

Durch den Reichtum der Capillarwände an alkalischer Phosphatase läßt sich das Vordringen der Capillarwucherungen bis in die zentraleren Abschnitte des

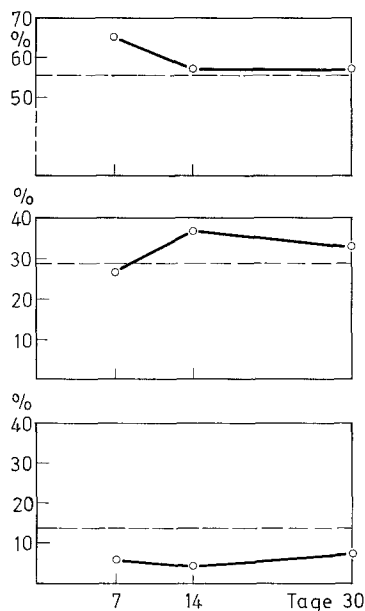


Abb. 8. Unspezifische Esterase. Unten 1. Fraktion, Mitte 2. Fraktion, oben 3. + 4. Fraktion 7—30 Tage post injectionem. — Kontrolle

Zwischengewebes gut verfolgen. Eine ausgeprägte Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigen ferner die wuchernden Zellelemente, vor allem Fibroblasten, histiocytäre und lymphoide Zellen. Dieser Befund steht in Einklang mit den Untersuchungen von FELL und DANIELLI (1943) über die Heilungsvorgänge an experimentell gesetzten Wunden.

PETZOLD und STÖHR (1959) bringen eine Aktivitätsvermehrung der alkalischen Phosphatase mit dem Fettstoffwechsel, besonders mit einem erhöhten Fetttransport in Zusammenhang. Dies könnte auch für die vorliegenden Untersuchungen von Bedeutung sein, da nach KAR und DAS (1960) bei der experimentellen Hodennekrose die Lipidkonzentration in den Fibroblastenwucherungen nach 30 Tagen eindeutig zunimmt.

In den proliferierenden Zellen des Hodeninterstitiums fällt auch eine erhebliche Aktivität der unspezifischen Esterase auf, was auf eine enge Beziehung dieses im Cytoplasma vorkommenden Enzyms zum Ausmaß der Proliferation hinweist (SHISHKIN, 1963).

In dem Granulationsgewebe, das sich zwischen den nekrotischen Samenanälchen ausbreitet, liegt gleichzeitig eine Aktivitätssteigerung aller untersuchten Oxydoreduktasen vor, an der die  $\text{NADH}_2$ -Diaphorase und die Lactatdehydrogenase am stärksten beteiligt sind. Die Aktivitätszunahme der Oxydoreduktasen spricht für einen gesteigerten Energiestoffwechsel in den Zellen des Proliferationsgewebes.

Auch DAS, KRISHNA MURTI und KAR (1961) konnten eine Störung des oxydativen Stoffwechsels der Rattengonaden nach einmaliger subcutaner  $\text{CdCl}_2$ -Injektion durch Messung der Succinoxidaseaktivität an Homogenaten feststellen. Beim Hoden kam es nach maximaler Inhibition am 16. Versuchstag mit der Regeneration im Interstitium zu einer relativen Zunahme der Enzymaktivität.

Die Aktivität der hydrolytischen und oxydativen Enzyme nimmt bis zum Ende der Beobachtungszeit (30 Tage) mit dem Vordringen des Granulationsgewebes in die zentraleren Hodenabschnitte noch zu, während in der Peripherie bereits die Fibrosierung überwiegt.

Die im Proliferationsstadium ermittelte prozentuale Verteilung der Isoenzymfraktionen (unspezifische Esterase und Lactatdehydrogenase) läßt bei starken Schwankungen zwischen 7 und 14 Tagen keine Ähnlichkeit mit den Isoenzymen des normalen Hodens mehr erkennen, denn die Isoenzyme stellen jetzt die Molekularfraktionen eines Granulationsgewebes dar.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kommt es somit im Anschluß an eine Cd-induzierte Hodennekrose zu einer von der Hodenkapsel ausgehenden reparatorischen Entzündung. Diese ist bei zunehmender Ausbreitung im Interstitium mit einem erneuten Anstieg der im nekrobiotischen Hoden stark abgesunkenen Aktivität hydrolytischer und oxydativer Enzyme verbunden. Die stark veränderten Isoenzymfraktionen bringen zum Ausdruck, daß es sich um ein Ersatzgewebe handelt, während das Keimepithel der Nekrose anheimgefallen ist. Das völlige Ausbleiben einer Regeneration des Keimepithels könnte die Annahme einer unmittelbaren Cd-Schädigung der Keimzellen neben einer den gesamten Hoden betreffenden Gefäßwirkung (DIMOW und KNORRE, 1967) noch bekräftigen.

Zur Frage einer späteren Regeneration der Zwischenzellen (GUNN u. Mitarb., 1963) sind weitere enzymatische Untersuchungen vorgesehen.



### Literatur

- DAS, R. P., C. R. KRISHNA MURTI, and A. B. KAR: Succinooxydase activity in rat gonads after cadmium chloride administration. *J. Sci. industr. Res. (New Delhi)* **20C**, 259—261 (1961).
- DIMOW, G., u. D. KNORRE: Fermenthistochemische und enzymelektrophoretische Untersuchungen an Rattenhoden in den ersten 48 Std experimenteller Cadmiumintoxikation. *Virchows Arch. path. Anat.* **342**, 252—257 (1967).
- FELL, H. B., and J. F. DANIELLI: The enzymes of healing wounds. I. The distribution of alkaline phosphomonoesterase in experimental wounds and burns in the rat. *Brit. J. exp. Path.* **24**, 196—203 (1943).
- GUNN, S. A., T. C. GOULD, and W. A. D. ANDERSON: Cadmium-induced interstitial cell tumors in rats and mice and their prevention by zinc. *J. nat. Cancer Inst.* **31**, 745—759 (1963).
- HELM, H. J. VAN DER: Simple method of demonstrating lactic acid dehydrogenase isoenzymes. *Lancet* **1961III**, 108—109.
- KAR, A. B., and R. P. DAS: Testicular changes in rats after treatment with cadmium chloride. *Acta biol. med. germ.* **5**, 153—173 (1960).
- PETZOLD, H., u. K. STÖHR: Die Wirkung von N-(4-Aminobenzol-sulfonyl)-N'-n-butylharnstoff (Oranil, Invenol) auf die Tetrachlorkohlenstofffibrose des Kaninchens. *Z. ges. inn. Med.* **14**, 853—858 (1959).
- SHISHKIN, G. S.: Histochemistry of carboxylic esterases in cells of fibroblastic series at various stages of their differentiation. *Fol. histochem. cytochem. (Kraków)* **1**, 481—487 (1963).
- URIEL, J.: Les réactions de caractérisation. In P. GRABAR et P. BURTIN, *Analyse immuno-électrophorétique*, p. 33. Paris: Masson & Cie. 1960.
- WIEME, R. J.: Agar gel electrophoresis. Amsterdam-London-New York: Elsevier Publ. Comp. 1965.

Dr. med. habil. DIETER KNORRE  
Oberarzt am Pathologisch-Bakteriologischen Institut  
des Bezirkskrankenhauses St. Georg, Leipzig  
X7021 Leipzig, Straße der DSF 141