

Morphologische Veränderungen der Extraorbitaldrüsen weisser Ratten nach Kupfermangelernährung

Während die Bedeutung des Kupfers für die Erythropoese seit langem bekannt ist (A. H. MÜLLER¹, HEILMEYER und BEGEMANN²) und zur Physiologie des Kupferstoffwechsels bereits mehrere Befunde existieren (KEIDERLING und REISSNER³), finden sich in der Literatur mit Ausnahme des Blut- und Knochengewebes keine Angaben über histologische oder histochemische Untersuchungen an Organen von Kupfermangeltieren, obwohl die bei Cu-Defizit verminderte Aktivität der Zellhämiline (COHEN und ELVEHJEM⁴; SCHULTZE^{5,6}; KEIDERLING und REISSNER³) neben funktionellen Störungen auch morphologische Veränderungen an anderen Organen erwarten lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Extraorbitaldrüsen von 20 Wistarratten (10 ♀ und 10 ♂) untersucht, die nach der Säugeperiode (21. Lebenstag) weiter auf Milchdiät, das heisst Cu-Mangel-Ernährung (ELVEHJEM und KEMMERER⁷; COHEN und ELVEHJEM⁴), gehalten wurden. Sie erhielten unverdünnte Kondensmilch⁸, der bis auf Kupfer sämtliche Spurenelemente und Vitamine in ausreichender Menge zugesetzt wurden. Der Kontrolle dienten Geschwistertiere (10 ♀ und 10 ♂), denen die gleiche Milchkost, jedoch mit Kupferzusatz (0,5 mg/100 ml) verabreicht wurde (Kontrollgruppe A), sowie weitere Geschwister (10 ♀ und 10 ♂), die nach der 3. Lebenswoche pelletierte Standarddiät (Altromin-R) und Leitungswasser ad libitum erhielten (Kontrollgruppe B). Je 4 Tiere der Versuchsreihe und beider Kontrollgruppen wurden im Alter von 4, 5, 7, 10 und 13 Wochen getötet.

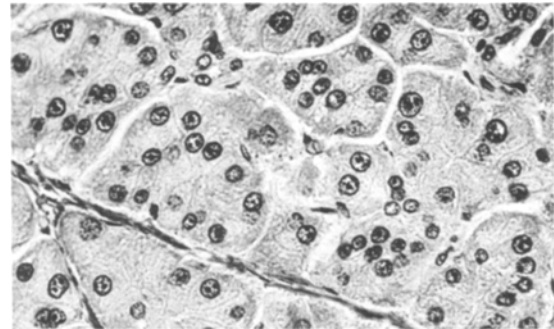
Bei *vollwertiger Milchkost* (Kontrollgruppe A) lassen die Drüsen während der gesamten Beobachtungszeit keine oder nur geringgradige Veränderungen gegenüber denen der normal ernährten Kontrollgruppe B erkennen (Figuren 1a und 1b).

Das gleiche gilt für *Kupfermangeltiere* bis zur 7. Lebenswoche. Lediglich in einem Fall war die Aktivität der Zytochromoxydase bereits in diesem Alter leicht vermindert. Bei 10 und 13 Wochen alten Ratten – insbesondere bei *männlichen Tieren* – ist die Drüse dagegen kaum noch als Extraorbitaldrüse zu erkennen (Figur 1c): Sie besteht zum grössten Teil aus regellos angeordneten Zellen unterschiedlicher Grösse und Dichte, zwischen denen ausführgangähnliche Gebilde liegen. Die Abgrenzung einzelner Endstücke ist nur selten möglich. Zahlreiche Zellen werden von grossen Fetttropfen (Sudan III) durchsetzt, die an Paraffinschnitten als Vakuolen imponieren (Figur 1c) und häufig die gesamte Zelle ausfüllen, so dass der Kern schüssel- oder sichelartig deformiert ist. Daneben finden sich Zellen oder Zellgruppen mit feinwabig strukturiertem Zytoplasma, die an Hardsche Drüsenzellen erinnern. Wie diese enthalten sie feine Fetttropfen und besitzen eine hohe Laktatdehydrogenase- und Sukzinatdehydrogenase-Aktivität. Die Zellkerne weisen extreme Grössenunterschiede auf (Figur 1c), die bei den gleichaltrigen Kontrolltieren bedeutend schwächer ausgeprägt sind (Figuren 1a und 1b) und nach den Befunden WALKER'S⁹ normalerweise erst bei alten Männchen deutlich hervortreten.

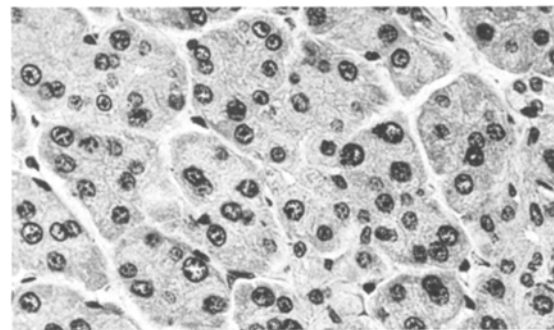
Die Reaktion auf Zytochromoxydase fällt bei Cu-Mangel-Tieren negativ oder nur schwach positiv aus. Dagegen lässt sich eine höhere LDH- und SDH-Aktivität als bei Kontrolltieren nachweisen. Die Aktivität der Adenosintriphosphatase, der alkalischen und sauren Phosphatase ist bei Versuchs- und Kontrolltieren etwa gleich kräftig.

Das Drüsenbild *weiblicher Tiere* unterscheidet sich fermenthistochemisch kaum von dem der Männchen. Dagegen finden sich in den histologischen Präparaten

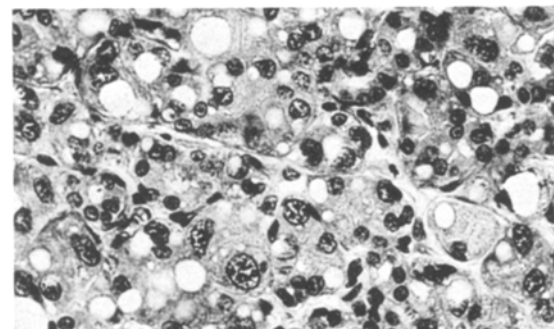
lediglich Schrumpfung und dichtere Strukturierung der Endstückzellen, während vakuolisierte Zellen nur stellenweise vorkommen. Wie der für Ratten und andere



1a



1b



1c

Fig. 1a–c. Gl. extraorbitalis, ♂ Ratte, 10 Wochen alt. Bouin-fixiert, Azan-Färbung. $\times 350$. a) Pelletierte Standarddiät; b) Milchkost mit Cu-Zusatz; c) Milchkost ohne Cu-Zusatz.

¹ A. H. MÜLLER, *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 48, 444 (1935).

² L. HEILMEYER und H. BEGEMANN, in *Handbuch der inneren Medizin* (Eds. G. v. BERGMANN, W. FREY und H. SCHWIEGK; Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1951), Vol. 2, p. 246.

³ W. KEIDERLING und I. REISSNER, in *Klinik der Gegenwart* (Eds. R. COBET, K. GUTZEIT, H. E. BOCK und F. HARTMANN; Urban und Schwarzenberg, München, Berlin 1960), Vol. 10, p. 147.

⁴ E. COHEN und C. A. ELVEHJEM, *J. biol. Chem.* 107, 97 (1934).

⁵ M. O. SCHULTZE, *J. biol. Chem.* 129, 729 (1939).

⁶ M. O. SCHULTZE, *J. biol. Chem.* 138, 219 (1941).

⁷ C. A. ELVEHJEM und A. R. KEMMERER, *J. biol. Chem.* 93, 189 (1931).

⁸ Die Kondensmilch (Fettgehalt: 7,54%; Gesamttrockenmasse: 25,26%) wurde dankenswerterweise von der Glücksklee Milchgesellschaft mbH, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

⁹ R. WALKER, *Anat. Rec.* 132, 49 (1958).

Spezies beschriebene Sexualdimorphismus der Gl. extraorbitalis (WALKER⁹; BAQUICHE¹⁰; KITTEL¹¹) könnte auch die unterschiedliche Reaktion des Drüsengewebes auf Kupfermangel geschlechtsspezifische Aufgaben der Extraorbitaldrüse andeuten, von der KITTEL¹¹ annimmt, dass sie beim Goldhamster bestimmte Duftstoffe, bei der Ratte Markierungsstoffe produziert.

In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, ob die beschriebenen Veränderungen des Drüsenbildes Folge einer fehlenden spezifischen Kupferwirkung auf die Gl. extraorbitalis sind oder ob sie infolge der verminderten Aktivität der Zytochromoxydase und anderer Zellhämone auftreten, deren Synthese an das Vorhandensein von Kupfer gebunden ist. Ausserdem müssten die Befunde SCHMIDT's¹² an den Extraorbitaldrüsen erwachsener Ratten nach Milchnahrung ohne Zusatz von Spurenelementen und Vitaminen überprüft werden, da die von ihm beschriebenen Veränderungen möglicherweise nicht allein Folge der flüssigen Kostform sind, sondern eventuell Kupfermangelschäden darstellen¹³.

Summary. Copper deficiency of the rat leads to a reduction of the histochemically demonstrable cytochrome oxidase activity of the glandula extraorbitalis, and to atrophy and fatty degeneration of the glandular cells. The histological alterations are more pronounced in the male than in the female.

H. B. MÜLLER

Anatomisches Institut der Universität,
D-355 Marburg an der Lahn (Deutschland),
24. Januar 1969.

¹⁰ M. BAQUICHE, Acta anat. 36, 247 (1959).

¹¹ R. KITTEL, Morph. Jb. 103, 484 (1962).

¹² E. S. G. SCHMIDT, Z. mikrosk.-anat. Forsch. 65, 377 (1959).

¹³ Fräulein G. BRAUNROTH und Fräulein R. Boos danke ich für die sorgfältige technische Mitarbeit.

Carboxypeptidase A, Ionic Strength, and the Enhancement of Guinea-Pig Complement

Carboxypeptidase A enhances the formation of EAC 1, 4, 2 by guinea-pig complement (gp C) and sensitized sheep cells¹. It has been reported that low ionic strength buffers in immune hemolysis prevent the dissociation of C1 from SAC1, promoting the eventual conversion of SAC1, 4 → SAC1, 4, 2². Since carboxypeptidase A and low ionic strength exert similar effects on the immune hemolytic reaction, it was of interest to titrate gp C, by the method of MAYER³, at varying ionic strengths in the presence and absence of the enzyme. Kinetic studies were also performed to determine the effect of time of introduction of low ionic strength and carboxypeptidase A on the immune hemolytic reaction.

Veronal buffers for the titrations were prepared according to the method of IBE and WARDLAW⁴. Low ionic strength buffers for the kinetic experiments were made by combining equal volumes of buffers ($\mu = 0.15$ and $\mu = 0.004$) to give a final ionic strength of $\mu = 0.077$. The sera from freshly drawn blood of healthy guinea-pigs were pooled, stored at -52°C , and used as a source of gp C. Hemolysin was obtained by i.v. injection of rabbits with boiled stromata of sheep erythrocytes. Preparation of suspensions of sensitized erythrocytes is that described by MAYER³.

Guinea-pig complement (2 ml) was diluted with 8.0 ml of buffer ($\mu = 0.15$). An additional aliquot of gp C (2 ml) was diluted with 8.0 ml of the same buffer containing carboxypeptidase A (Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, Lot No. COA-DFP-6129) at a concentration of 8–10 $\mu\text{g/ml}$. These 2 samples were pre-incubated for 10 min at 37°C ⁵ and then tested for complement activity by titration in buffers of varying ionic strength (Table). Enhancement by carboxypeptidase A was demonstrated at all ionic strengths tested, but was minimal at the optimum ionic strength (0.085). This optimum ionic strength is a higher value than previously reported⁶ and may be a result of inadequate predilution of gp C in veronal buffer ($\mu = 0.15$) or possibly to the sugar, dextrose (Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo., USA), used to maintain isotonicity. RAPP and BORSOS⁶ have noted that the nature of nonelectrolyte used to maintain isotonicity does affect the activity of gp C.

The additional increase of $\text{C}'\text{H}_{50}$ by carboxypeptidase A at the optimum ionic strength suggests that the enzyme either exerts a greater effect on components enhanced by low ionic strength, or affects, in addition, other components of complement.

The effect of time of introduction of low ionic strength or of carboxypeptidase A into the immune hemolytic reaction was studied in the following manner. Basic reaction mixtures of 5.0 ml of sensitized cells ($\text{EA } 5 \times 10^9$ cells/ml) and 1.0 ml of guinea-pig complement (diluted 1:57) were placed in a 37°C bath at zero time. At timed intervals, aliquots (6.0 ml) of veronal buffer ($\mu = 0.15$), containing carboxypeptidase A (8–10 $\mu\text{g/ml}$), or low ionic strength buffer ($\mu = 0.004$) were added to the reaction mixtures. Incubation was continued to 100 min, and the

Effect of carboxypeptidase A on guinea-pig complement at varying ionic strengths

$\text{C}'\text{H}_{50}$ Ionic strength	No enzyme	With enzyme	Enhancement (%)
0.15	218	278	27.4
0.10	358	419	17.0
0.085	393	455	15.3
0.075	386	455	17.8
0.050	192	242	26.0

¹ K. AMIRAIAN, O. J. PLESCIA and M. HEIDELBERGER, Z. Immunitätsforsch. 118, 289 (1959).

² H. R. COLTEN, T. BORSOS and H. J. RAPP, J. Immunol. 100, 799 (1968).

³ E. A. KABAT and M. M. MAYER, *Experimental Immunochemistry*, 2nd edn (Thomas, Springfield, Illinois 1961), p. 149.

⁴ E. C. IBE and A. C. WARDLAW, Immunology 7, 586 (1964).

⁵ K. AMIRAIAN and E. J. LEIKHIM, Z. Immunitätsforsch. 130, 105 (1966).

⁶ H. J. RAPP and T. BORSOS, J. Immunol. 91, 826 (1963).