

## Nervenfaser in Tubuluswänden des Hodens bei Patienten mit Klinefelter-Syndrom

### Elektronenmikroskopische und elektronenmikroskopisch- enzymhistochemische Untersuchungen \* \*\*

U. Leuschner, K. H. Usadel, U. Schwedes und K. Schöffling

Zentrum der Inneren Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt a. Main, Abteilung für Endokrinologie (Leiter: Prof. Dr. K. Schöffling)  
und Abteilung für Gastroenterologie (Leiter: Prof. Dr. W. Siede)

Eingegangen am 6. September 1972

### Nerve Fibres in the Tubulus Walls of Testis in Patients with Klinefelter's Syndrome

#### Electron Microscopic and Enzyme-Histochemical Investigations

*Summary.* Light microscopy revealed cholinesterase-positive fibres in the tubulus walls of testis of postpuberal patients with Klinefelter's syndrome. These fibres disappeared when sclerothyalinosis was complete. In this report we describe the electron microscopic and enzyme-histochemical findings, which showed, that the fibres were non-myelinated nerve-fibres. They were localized in the tubulus wall and never perforated the basement membrane. Nerve-fibres were not detected in the tubulus walls of testes of normal subjects or prepuberal patients with Klinefelter's syndrome.

*Zusammenfassung.* Bei lichtmikroskopischen Untersuchungen fanden wir in der Tubuluswand des postpuberalen Klinefelter-Hodens, jedoch vor Ausbildung der totalen Sklerohyalinose, Cholinesterase-positive Fasern. Die hier beschriebenen elektronenmikroskopischen und enzymhistochemischen Untersuchungen zeigten uns, daß es sich dabei um marklose Nervenfaser handelt, die alle Schichten der Tubuluswand durchsetzten und bis unter die Basalmembran reichten. Ein Durchtritt durch die Basalmembran konnte nie beobachtet werden. Im präpuberalen Hoden von Klinefelter-Patienten sowie bei völliger Sklerohyalinose war dieser Befund nicht zu erheben, desgleichen ließen sich in der Tunica propria des normalen Hodens Nervenfaser nicht nachweisen.

Bei lichtmikroskopischen und lichtmikroskopisch-enzymhistochemischen Untersuchungen konnten wir in den Tubuluswänden des Hodens von Klinefelter-Patienten Cholinesterase-positive und versilberbare Fasern nachweisen (Usadel *et al.*, 1972). Dieser Befund war weder beim Gesunden noch im präpuberalen Hoden von Klinefelter-Patienten zu erheben, sondern fand sich ausschließlich im postpuberalen Hoden vor Ausbildung der Sklerohyalinose. Wegen des zu geringen Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes konnte zunächst nicht geklärt werden, um welche Strukturen es sich hierbei handelt. Bei vorläufigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden wir zahlreiche marklose

\* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft sowie die Harry und Peter Fuld-Stiftung durchgeführt.

\*\* Auszugsweise vorgetragen auf dem VIII. Welt-Kongreß für Pathologische Anatomie und Laboratoriumsmedizin vom 12.—16. 9. 1972 in München.

Nervenfaseren, die mit den Cholinesterase-positiven Fasern identisch waren. In der vorliegenden Arbeit soll über die erhobenen elektronenmikroskopischen und elektronenmikroskopisch-enzymhistochemischen Befunde genauer berichtet werden.

### Material und Methode

Wir untersuchten biptisch entnommenes Hodengewebe von Patienten mit chromosomenanalytisch gesichertem Klinefelter-Syndrom. Dabei handelte es sich um 2 Patienten im präpuberalen (12 und 13 Jahre) und 10 im postpuberalen Alter (17—52 Jahre). Zum Vergleich untersuchten wir 4 Personen mit histologisch normalem Hoden (Hydrocele testis). Das Gewebe wurde für die Elektronenmikroskopie wie folgt präpariert:

a) *Elektronenmikroskopische Präparation.* Das entnommene Material wurde zunächst in eiskühlem, gepufferten 2,5%igen Glutaraldehyd (Soerensen-Puffer, pH 7,2) fixiert (1 Std) und 24 Std in 0,25 M Saccharose-Merthiolat-Lösung gespült. Kontrastierung in 1%igem Osmiumtetroxyd. Während der Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe (70, 90, 100%) erfolgte die Zwischenkontrastierung in Phosphorwolframsäure (1%) — Uranylacetat (0,5%). Die in Durcupan-ACM eingebetteten Präparate wurden mit dem Ultramikrotom OmU<sub>2</sub> der Firma Reichert geschnitten und mit Blei-II-Oxyd nachkontrastiert.

b) *Enzymnachweis.* Zum Nachweis der Cholinesterase wurde das Gewebe nach einstündiger Fixation in gepuffertem 2,5%igen Glutaraldehyd (Soerensen-Puffer, pH 7,2) 18 Std in 0,25 M Saccharose-Merthiolat-Lösung gespült. 20  $\mu$  dicke Gefrierschnitte wurden in Saccharose gewaschen und 40 min schwimmend bei Zimmertemperatur und im Dunkeln im Inkubationsmedium nach Karnovsky und Roots (1964) inkubiert (pH 6,0). Als Substrat diente uns Acetylthiocholinjodid. Nach dem Waschen in 0,25 M Saccharose-Merthiolat-Lösung erfolgte die weitere Präparation wie unter a.

Kontrollen: 1. Inkubation des Gewebes ohne Substrat,

2. Vorbehandlung des Gewebes mit Eserin (Physostigmin); Konzentration:  $10^{-15}$  M; 15 min bei Zimmertemperatur. Weitere Behandlung des Gewebes wie unter a und b.

Die Beurteilung der Schnitte und die Herstellung der Abbildungen erfolgte mit dem Elektronenmikroskop EM 9 S der Firma Zeiss.

### Ergebnisse

#### 1. Postpuberaler Hoden bei Klinefelter-Syndrom

Im postpuberalen Hoden von Patienten mit Klinefelter-Syndrom fanden sich neben regelrecht strukturierten und völlig sklerotisierten Tubuli auch solche Hodenkanälchen, die einer zunehmenden Sklerosierung unterlagen. Hier konnten wir bei allen Patienten lichtmikroskopisch Cholinesterase-positive Fasern nachweisen (Abb. 1). Die im folgenden beschriebenen elektronenmikroskopischen Befunde beziehen sich auf derartige Kanälchen.

Mit der Übersichtsvergrößerung (1800 $\times$ ) fanden wir zahlreiche, nur teilweise sklerotisierte Tubuli contorti, die zum Lumen hin von einer schwach osmiophilen Basalmembran begrenzt wurden. Diese Basalmembran war gleichmäßig dick und ließ in keinem der untersuchten Präparate Spalten oder Öffnungen erkennen, die eine Verbindung zwischen dem Lumen des Hodenkanälchens und der Wand oder dem Interstitium zuließen. Die Tubuluswände bestanden aus Bündeln zirkulär verlaufender kollagener Fasern, zwischen denen Histiocyten und Fibrocyten mit ihren langen Zellausläufern nachweisbar waren (Abb. 2). Die an ihrer typischen Querstreifung erkennbaren Kollagenfasern durchsetzten die ganze Wand und reichten bis unmittelbar unter die Basalmembran. Vereinzelt fanden sich Faserzüge, die von der Tubuluswand in das Interstitium ausstrahlten.



Abb. 1. 260 $\times$ . Cholinesterase-Nachweis nach Karnovsky u. Roots ohne Gegenfärbung. Tubuluswände des postpuberalen Klinefelter Hodens. Cholinesterase-positive Fasern ziehen vom Interstitium in die Tunica propria und durchsetzen diese zirkulär sowie senkrecht zur Basalmembran

Bei stärkerer Vergrößerung stellten sich neben den beschriebenen Strukturen marklose Nervenfasern dar, die die Tubuluswand, wie sich aufgrund zahlreicher longitudinaler und transversaler Anschnitte vermuten ließ, geflechtartig durchsetzten (Abb. 2). Die von einer eigenen Basalmembran umgebenen Schwannschen Zellen (Abb. 3, 4) enthielten ein oder mehrere Axone, in denen Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum und Neurotubuli nachweisbar waren. Die Nervenfasern lagen in allen Schichten der Tunica propria und reichten gelegentlich bis unmittelbar unter die Basalmembran, ohne diese jedoch zu durchbrechen. An dieser Stelle war die Basalmembran gegen das Tubuslumen vorgebuckelt (Abb. 4). Nervenendigungen, bei denen die Umhüllung durch die Schwannsche Zelle normalerweise fehlt, fanden wir in unserem Material nicht. Im Inneren der Hodenkanälchen waren Nervenfasern nie nachweisbar, dagegen konnte gelegentlich der Übertritt einer Nervenfaser vom Interstitium in die Tubuluswand beobachtet werden.

Zur Klärung der Frage, ob die lichtmikroskopisch Cholinesterase-positiven Fasern in den Tubuluswänden mit den elektronenmikroskopisch nachgewiesenen marklosen Nervenfasern identisch sind, führten wir den Enzymnachweis auch elektronenmikroskopisch durch. Dabei fanden wir das Reaktionsprodukt ausschließlich in marklosen Nervenfasern, wo es in Form von schwarzen Körnchen im Spaltraum zwischen Schwannscher Zelle und Axon (Abb. 5) und gelegentlich



Abb. 2.  $6300\times$ . Tangentialschnitt durch eine Tubuluswand des Klinefelter-Hodens. *N* Marklose Nervenfasern; *F* Fibrocyten und ihre Ausläufer (Pfeile); *K* Kollagenfasern

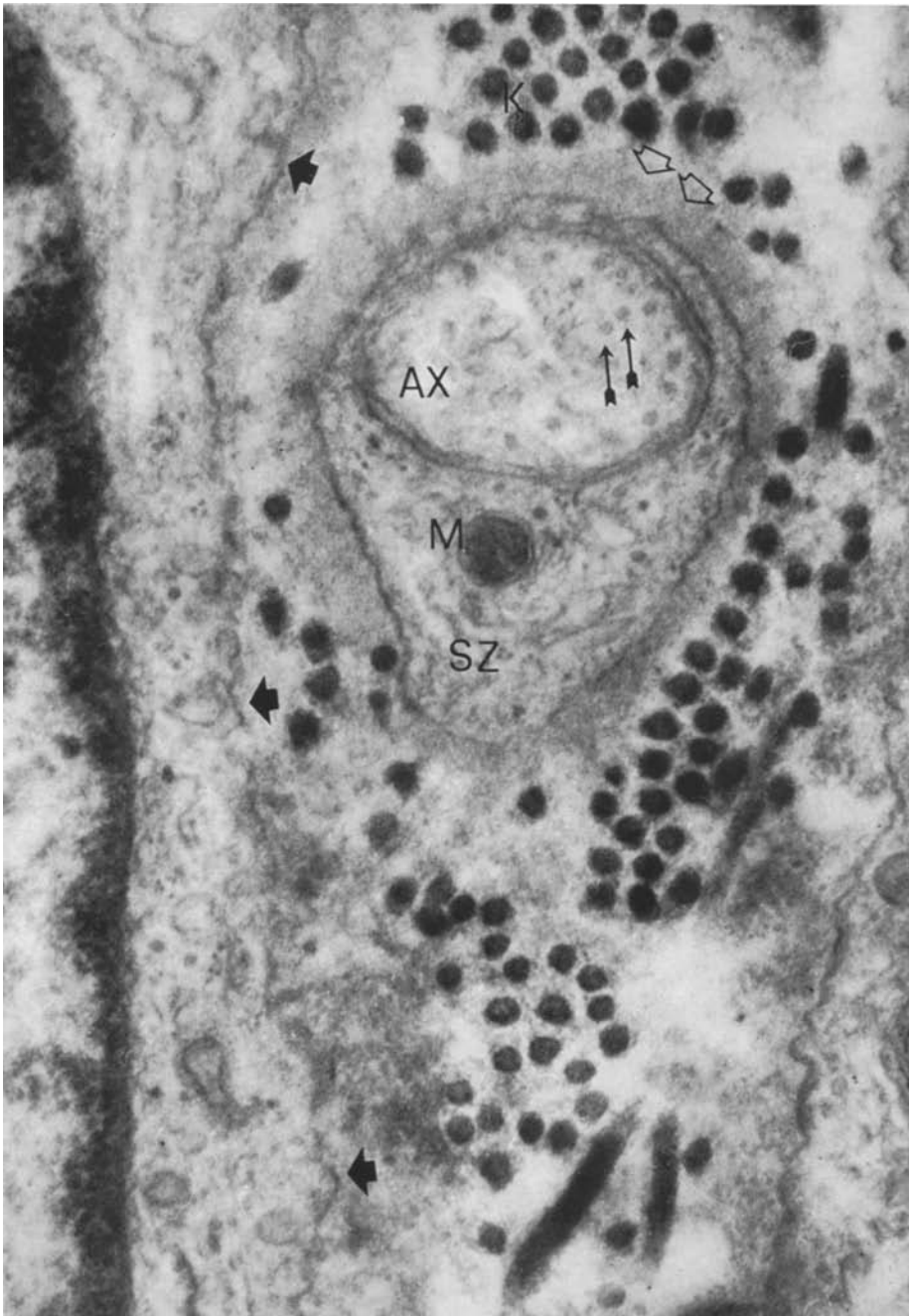


Abb. 3. 78000 $\times$ . In der Mitte der Tubuluswand gelegene Schwannsche Zelle (SZ) mit Axon (AX). Die Zelle wird von einer eigenen Basalmembran umgeben (durchbrochene Pfeile). M Mitochondrion; schmale Pfeile: Neurotubuli; die breiten Pfeile markieren die Zellmembran einer Bindegewebszelle; K Kollagenfasern



Abb. 4.  $32000\times$ . Unmittelbar unter der Basalmembran (BM) befindet sich eine Schwannsche Zelle mit fünf Axonen (AX), deren Mesaxone durch Pfeile markiert sind. Die Schwannsche Zelle besitzt eine eigene Basalmembran (durchbrochener Pfeil), die in die Basalmembran des Tubulus übergeht. SE Sertolizelle

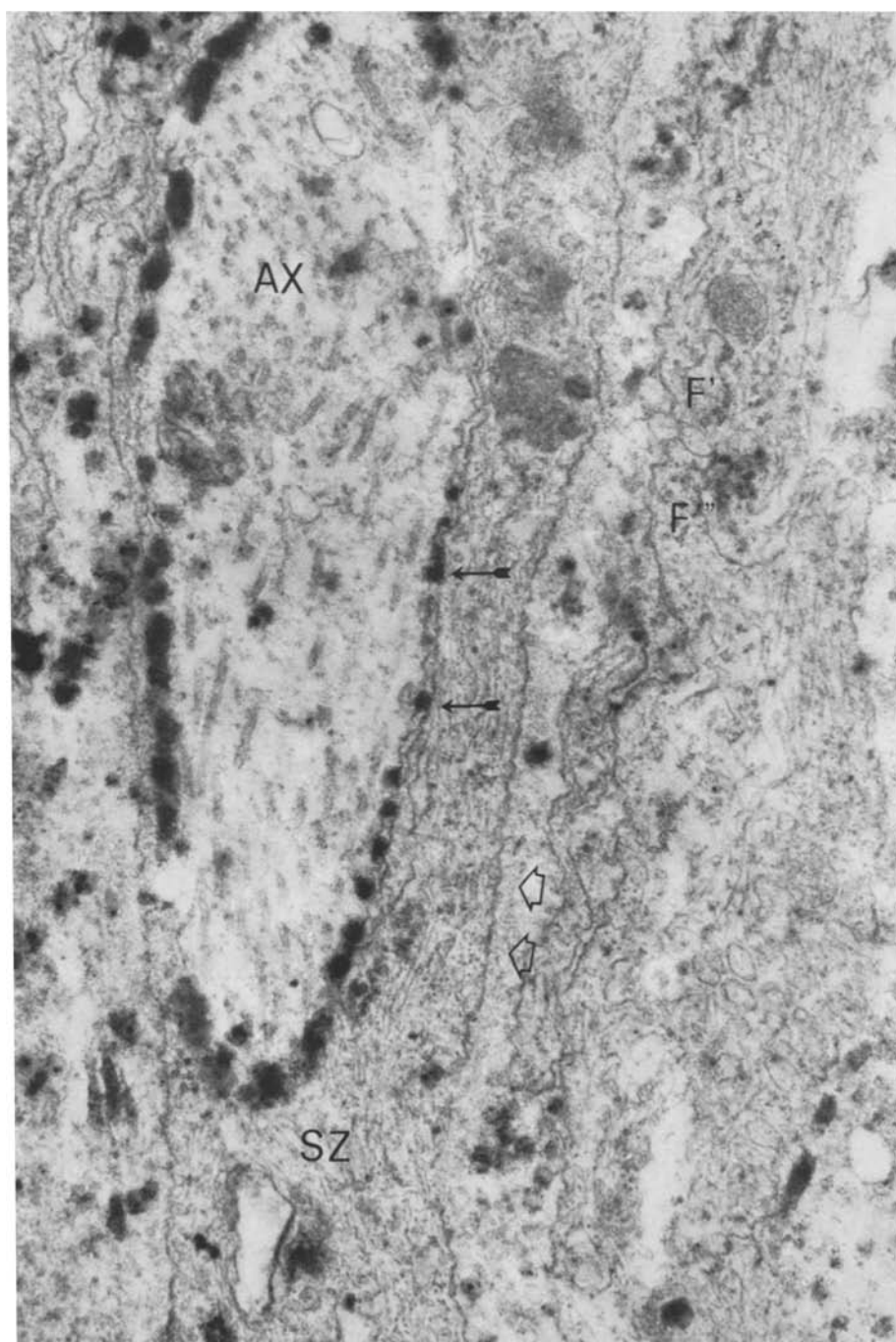


Abb. 5. 60000 $\times$ . Enzymnachweis. SZ Schwannsche Zelle; durchbrochene Pfeile: Basalmembran der Schwannschen Zelle; AX Axon mit zahlreichen Neurotubuli; Im Spaltraum zwischen Axon und Schwannscher Zelle findet sich das Reaktionsprodukt (Pfeile); F' u. F'' Fibrocytenausläufer



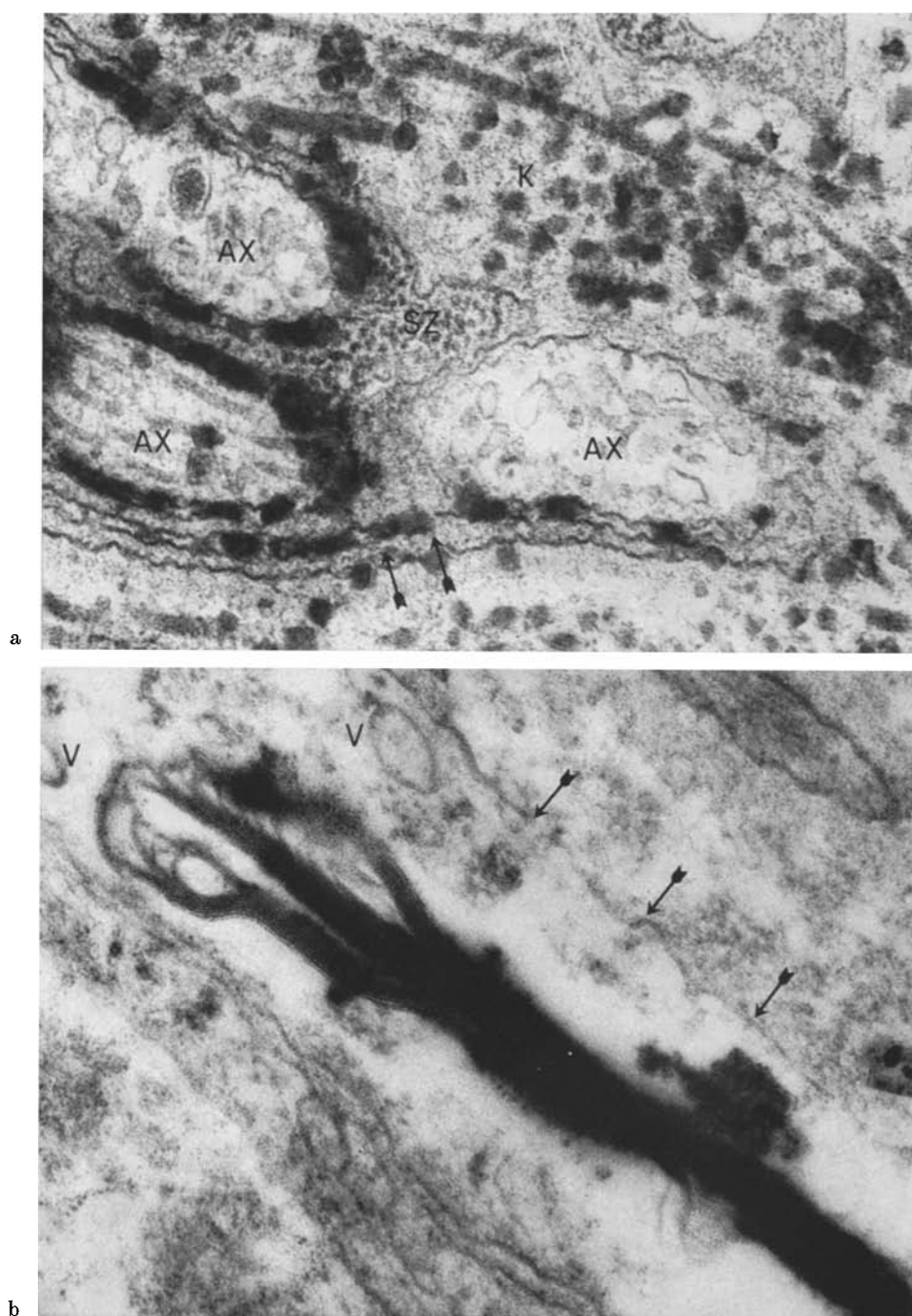


Abb. 6. a  $60000\times$ . Enzymnachweis. Schwannsche Zelle (SZ) mit drei Axonen (AX). Das Reaktionsprodukt findet sich im Spaltraum zwischen Axon und Schwannscher Zelle sowie im Mesaxon (Pfeile); K Kollagenfasern. b  $120000\times$ . Myelinstrukturen in der Tubuluswand bei fortgeschrittener Sklerohyalinose. Im umgebenden Hof finden sich vereinzelt Vesikel (V). Dieser Bezirk wird im gesamten Verlauf durch eine Membran (Pfeile) umschlossen



im Mesaxon ausgefallen war (Abb. 6a). Alle anderen Strukturen waren Cholinesterase-negativ, artefizielle Ablagerungen fehlten fast völlig.

Bei vollständiger Sklerohyalinose bestand die Tubuluswand meist nur noch aus dicken Bündeln kollagener Fasern, in denen nur vereinzelt Fibrocyten, dafür aber reichlich Reste degenerierter Zellen anzutreffen waren. Intakte Nervenfasern fehlten hier immer. Hin und wieder stellten sich myelinartig veränderte, stark osmiophile Strukturen dar, die in ihrem gesamten Verlauf von einem transparenten Hof umgeben wurden, in dem sich vereinzelt membranöse und vesiculäre Gebilde fanden (Abb. 6b). Diese Myelinfiguren hatten in der Tubuluswand etwa die gleiche Ausdehnung und Anordnung wie die oben beschriebenen marklosen Nervenfasern. Der Enzymnachweis gelang nicht.

## 2. Präpuberaler Hoden bei Klinefelter-Syndrom und normaler Hoden

In den Tubuluswänden des normalen (Hydrocele testis) und des präpuberalen Hodens bei Klinefelter-Patienten konnten mit den angegebenen Untersuchungsmethoden Nervenfasern nicht nachgewiesen werden.

## Diskussion

Wie wir mit Hilfe lichtmikroskopischer Untersuchungsmethoden erstmals zeigen konnten, treten bei chromosomenanalytisch gesicherten Patienten mit Klinefelter-Syndrom in den Tubuluswänden des Hodens Cholinesterase-positive Fasern auf. Elektronenmikroskopisch-enzymhistochemische Untersuchungen zeigten uns dabei, daß es sich um marklose Nervenfasern handelt (Usadel *et al.*, 1972). Die Ablagerung des durch die Cholinesterase-Aktivität entstandenen Reaktionsproduktes entsprach den aus der Literatur bekannten Befunden am Nervensystem (Bogart, 1971; Reale *et al.*, 1971; Brzin *et al.*, 1966). Dabei ist interessant, daß dieser Befund nur im postpuberalen Hoden, jedoch vor der Ausbildung der totalen Sklerohyalinose zu erheben war. Vergleichbare Ergebnisse konnten wir in der Literatur nicht finden.

Über das Vorkommen von Nervenfasern in der Tunica propria der Tubuli contorti des normalen Hodens wurde gelegentlich berichtet, doch konnte mit den angegebenen Methoden nie geklärt werden, ob Nervenfasern nur an die Tubuluswand herantreten, in sie eindringen oder sie durchbohren (Letzterich, 1893; Retzius, 1893; Timofeew, 1894; Pines u. Maiman, 1927; Wein, 1939; Okkels u. Sand, 1939; Yamashita, 1939; Gray, 1947; Peters, 1957). Nach Peters (1957) sollen die als Nervenfasern angesehenen Strukturen die Basalmembran durchbrechen und sogar zwischen und in das Keimepithel eindringen können. Ähnliche Befunde, bei denen es sich offensichtlich um Artefakte handelt, konnten wir gelegentlich nach Anwendung von Versilberungsmethoden lichtmikroskopisch erheben. Elektronenoptisch und lichtmikroskopisch-enzymhistochemisch fanden wir bei Gesunden niemals Nervenfasern, bei Patienten mit Klinefelter-Syndrom konnten wir ihren Durchtritt durch die Basalmembran in keinem Fall beobachten. Auch Kollagenfasern und Fibrocytenausläufer fanden wir nie im Inneren der Hodenkanälchen.

Auf welche Weise marklose Nervenfasern in die Tubuluswände des Hodens gelangen ist unbekannt. Da wir im präpuberalen Hoden der Klinefelter-Patienten

und im histologisch normalen Hoden Nervenfasern nur perivascular und im Interstitium fanden, ist denkbar, daß interstitiell gelegene Nerven entweder bei der Ausbildung des sog. Tubulusschattens durch Apposition weiterer Kollagenfasern in die Tubuluswand eingemauert wurden oder daß sie in diese eingesproßt sind. Gegen die Einmauerung der Fasern spricht ihr senkrecht zur Basalmembran gerichteter Verlauf.

Die im postpuberalen Hoden mit fortgeschrittener Sklerosierung beschriebenen myelinartigen Strukturen halten wir für degenerierte Nervenfasern, da sie diesen sowohl im Verlauf als auch in der Anordnung in der Tunica propria glichen. Der sie begleitende transparente Hof könnte dem Zelleib der untergehenden Schwannschen Zelle entsprechen. Übergänge zwischen intakten Fasern und Myelinfiguren waren bei uns nicht nachweisbar. Lee (1963) konnte noch am 21. Tag nach Durchtrennung einer marklosen Nervenfaser alle Organellen und am 28. Tag noch Reste des endoplasmatischen Reticulums nachweisen. Ein Teil der degenerierten Axone wurde von der Schwannschen Zelle ausgestoßen, der Rest verblieb im Cytoplasma. In unserem Material hatten wir den Eindruck, daß Schwannsche Zelle und Axon gleichzeitig degenerierten, so daß eine aktive Leistung der Schwannschen Zelle, wie von Lee beschrieben, während der Axondegeneration nicht mehr zu erwarten war. Myelinfiguren wurden auch in anderen Organen als Abbauprodukt beschrieben (David u. Hecht, 1967) und sind nicht etwa auf das Nervensystem beschränkt. Besonders häufig findet man sie beim Abbau cellularer Membranen. Daß bei fortgeschrittener Sklerohyalinose alle Zellen und Zellausläufer in der Tubuluswand zugrunde gingen ließ sich deutlich an der verminderten Zahl von Fibrocyten und den dafür häufiger zu beobachtenden Zellresten erkennen. Im Endstadium der Sklerohyalinose fanden wir weder Nervenfasern noch myelinartige Strukturen.

Welche Bedeutung marklosen Nervenfasern in der Tunica propria der Hodenkanälchen bei o.g. Patienten zukommt, wissen wir nicht.

Frl. S. Linnenkohl und Frl. I. Obert danken wir für ihre technische Assistenz.

### Literatur

- Bogart, B. I.: The fine structural localization of acetylcholin-esterase activity in the rat parotid and sublingual glands. *Amer. J. Anat.* **132**, 259—266 (1971).
- Brzin, M., Tennyson, V. M., Duffy, P. E.: Acetylcholinesterase in frog sympathetic and dorsal root ganglia. A study by electron microscope cytochemistry and microgasometric analyses with the magnetic diver. *J. Cell Biol.* **31**, 215—242 (1966).
- David, H., Hecht, A.: The necrosis. In: *Subcellular pathology*, ed. by J. W. Steiner, H. Z. Movat a. A. C. Ritchie. New York: Hoeber Med. Div. 1967.
- Gray, D. J.: The intrinsic nerves of the testis. *Anat. Rec.* **98**, 325—335 (1947).
- Karnovsky, M. J., Roots, L.: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219—221 (1964).
- Lee, J. C.: Electron microscopy of Wallerian degeneration. *J. comp. Neurol.* **120**, 65—79 (1963).
- Letzterich, L.: Über die Endigungsweise der Nerven in den Hoden der Säugetiere und des Menschen. *Virchows Arch. path. Anat.* **42**, 570—575 (1893).
- Okkels, H., Sand, K.: Nerfs du testicule interstitielle. *Bull. histol. appl.* **16**, 205—214 (1939).
- Peters, H.: Über die feinere Innervation des Hodens, insbesondere des interstitiellen Gewebes und der Hodenkanälchen beim Menschen. *Acta neuroveg. (Wien)* **15**, 234—242 (1957).

- Pines, L., Maiman, R.: Über die Innervation der Hoden der Säugetiere. *Jb. Morph. mikrosk. Anat.* **12**, 199—218 (1927).
- Reale, E., Luciano, L., Spitznas, M.: The fine structural localization of acetylcholinesterase activity in the retina and optic nerve of rabbits. *J. Histochem. Cytochem.* **19**, 85—96 (1971).
- Retzius, G.: Über die Nerven der Ovarien und Hoden. *Biol. Untersuch., N.F.* 31—34 (1893).
- Timofeew, D.: Zur Kenntnis der Nervenendigungen in den männlichen Geschlechtsorganen der Säuger. *Anat. Anz. Jena* **9**, 342—348 (1894).
- Usadel, K. H., Leuschner, U., Schwedes, U., Schade, Ch., Schöffling, K.: Über das Auftreten cholinergischer Nervenfasern in den Tubuluswänden des Hodens bei primärem Hypogonadismus (Klinefelter-Syndrom, Kryptorchismus). *Klin. Wschr.* (im Druck).
- Yamashita, K.: Histologische Studien zur Innervation des Hodens und des Nebenhodens beim Menschen. *J. Orient. Med., Dairen* **30**, 150—152 (1939).

Dr. U. Leuschner  
Dr. K. H. Usadel  
Dr. U. Schwedes  
Prof. Dr. K. Schöffling  
Zentrum der Inneren Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
D-6000 Frankfurt a. Main  
Theodor-Stern-Kai 7  
Bundesrepublik Deutschland