**ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI
ARTIFIZIEL ERZEUGTEM KRYPTORCHISMUS AN
DER RATTE NACH BEHANDLUNG
MIT PEROXYDASE***

HARUMICHI SEGUCHI** UND FARUK HADZISELIMOVIC

*II. Anatomische Abteilung der Medizinischen Fakultät der Universität Kobe,
Kusunoki-cho, 7-chome, Ikuta-ku, Kobe 650, und Chirurgische
Abteilung der Universität-Kinderklinik, Römeggasse 8,
CH-4005 Basel, Schweiz*

Received for publication February 2, 1977

Unilateral orchidopexy was performed on 20 normal adult rats. Ten rats were sham-operated as controls. After 10 to 80 days they were sacrificed. Two hours before sacrifice 30 mg of horseradish peroxidase (HRP) dissolved in 1 ml of 0.9% NaCl solution was injected intraperitoneally. After the sacrifice testes were excised and investigated electron microscopically. Permeability of the Tunica propria and the basal membrane of the seminiferous tubule in cryptorchid testis showed no significant difference for HRP compared with that in testis of control rats and in contralateral scrotal testis of experimental rats. The Tunica propria of the seminiferous tubule in cryptorchid testis was thickened by a progressive fibrosis with an increase in both cells and extracellular fibers. The seminiferous tubule consisted of Sertoli cells only. The contralateral scrotal testis revealed morphologically no significant difference from normal testis. HRP was found adhering to the cells of the seminiferous tubule not only in normal and scrotal testis but also in cryptorchid testis. HRP was not observed in intercellular space deeper than the spermatogonia and in the lumen of the seminiferous tubule, while it was found in the intercellular space between the spermatogonia and Sertoli cells. The surface cells of the seminiferous tubule took up HRP actively by micropinocytosis. This activity was more marked in normal and contralateral scrotal testis than in cryptorchid testis. The function of blood-testis barrier remained in cryptorchid testis, but the active transport through the micropinocytosis was extremely reduced.

Bisher sind verschiedentlich lichtmikroskopische Untersuchungen über künstlich erzeugten Kryptorchismus bei verschiedenen Tieren veröffentlicht worden. Elektronenmikroskopische Studien haben Nagano (1963) und Leeson u. Leeson (1970) an der Ratte sowie Plöen (1972) am Kaninchen durchgeführt.

* Diese Arbeit wurde z.T. anlässlich der gemeinsamen Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Pädiatrie und der Schweizerischen Gesellschaft für Kinderchirurgie in Genf, Juni 1973, vorgetragen.

** Gegenwärtige Adresse: Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kyoto University, Konoe-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

Nagano und Plöen haben frühzeitige Spermiendegeneration bei experimentellem Kryptorchismus beschrieben; Veränderungen an der Tunica propria wurde nur geringe Beachtung geschenkt. Über diese Vorgänge haben Leeson u. Leeson berichtet. Diese Autoren fanden 20 Tagen nach experimenteller Erzeugung des Kryptorchismus eine deutliche Fibrosierung und Verdickung der Tunica propria. Diese pathologischen Manifestationen haben wir auch bei nicht descendierten Kinderhoden beobachtet (Hadziselimovic u. Seguchi, 1973a, 1973b; Seguchi u. Hadziselimovic, 1976). Schon bei zweijährigen, nicht descendierten Hoden ist eine Kollagenisierung der Tunica propria nachweisbar. Die Tunica propria wird mit steigendem Alter breiter, und die Spermatogonienzahl nimmt ab. Es ist möglich, daß sich die Spermatogonienzahl als Folge der schlechteren Diffusion durch die verdickte Tunica propria vermindert. Um das zu prüfen, erzeugten wir künstlich bei Ratten einen einseitigen Kryptorchismus und injizierten diesen Tieren intraperitoneal Meerrettich-Peroxydase. Die Meerrettich-Peroxydase hat ein Molekulargewicht von 44,000. Wegen ihrer enzymatischen Aktivität ist sie leicht nachweisbar und wird in verschiedenen Organen als Modell für den Eiweißtransport, also als Tracer, verwendet.

MATERIAL UND METHODE

Dreißig Ratten von 150–200g Gewicht wurden zur Untersuchung verwendet; 10 Tiere dienten als Kontrolle, 20 Tiere haben wir unter Äthernarkose operiert. Das Skrotum wurde eröffnet und der linke Hoden mitsamt dem Nebenhoden durch den Inguinalkanal mit einer Naht durch den unteren Pol der Tunica albuginea an der vorderen Bauchwand befestigt. Der Inguinalkanal wurde zugenäht und der Hautschnitt geschlossen. Während der Operation haben wir darauf geachtet, daß die Nerven und die Blutgefäße sowie der Ductus deferens intakt blieben. Die experimentell verlagerten Hoden wurden 10, 24, 30, 37 und 80 Tage nach der Operation entnommen. Jede der fünf Gruppen umfasst vier operierte und zwei nicht operierte Tiere. Drei der operierten und einem der nicht operierten Tiere wurde zwei Stunden vor der Hodenentnahme 30 mg Meerrettich-Peroxydase intraperitoneal appliziert. Die Reaktion der Peroxydaseaktivität wurde nach der Methode von Graham u. Karnovsky (1966) durchgeführt. Je eines der operierten und der nicht operierten Tiere diente als Kontrolle ohne Peroxydasebehandlung. Nach Fixierung mit 3%igem Glutaraldehyd und Nachfixierung mit 1%igem OsO_4 wurde das Material in Epon eingebettet. Die Schnitte wurden nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat am Siemens Elmiskop I und am Hitachi HS-8 untersucht.

BEFUNDE

Die Tunica propria der Hoden von Kontrolltieren besteht von innen nach aussen: 1. der Basalmembran des Tubulus seminiferus, 2. dem inneren Zwischenraum, 3. dem inneren Blatt der Basalmembran der kontraktile Zelle, 4. der kontraktile Zelle, 5. dem äusseren Blatt der Basalmembran der kontraktile Zelle, 6. dem äusseren Zwischenraum und 7. dem Endothelium der intertubulären lymphatischen Sinusoiden (Fawcett u.a., 1969, 1973) (Abb. 1A und 1C).

Achtzig Tage nach der Operation sind starke Veränderungen der Tunica propria zu sehen (Abb. 3). Die Basalmembran des Tubulus seminiferus ist nicht mehr glatt, sondern sehr stark gefaltet. Der innere Zwischenraum ist verbreitert und enthält vermehrt kollagene Fasern. Die beiden Blätter der Basalmembran der kontraktilen Zellen sind ebenfalls wie die Basalmembran des Tubulus seminiferus gewellt und mehrschichtig geworden. Die kontraktilen Zellen haben ihre deutlich konzentrisch geschichtete Anordnung verloren. Es sind nur noch unzusammenhängende Teile davon um den Tubulus seminiferus herum zu beobachten (Abb. 3). Wahrscheinlich ist somit die Fähigkeit des Tubulus seminiferus zur Kontraktion gestört. Der äussere Zwischenraum weist gleich wie der innere vermehrt kollagene Fasern auf und besitzt manchmal Fibroblasten in ein- bis zweischichtiger Lage (Abb. 3). Der lumenlose Tubulus seminiferus enthält fast nur Sertolizellen. Sehr

ABB. 1. A. Peripherer Abschnitt des Tubulus seminiferus im Hoden vom Kontrolltier ohne Peroxydase-Behandlung. Die Tunica propria (TP) zeigt den typischen Schichtenbau. Zwischen zwei Sertolizellen (SZ) ist eine spezielle Zellverbindung zu sehen. Spermatocyt I. Ordnung (SI). $\times 6,000$

B. Spezielle Zellverbindung zwischen zwei Sertolizellen (SZ) im Hoden vom Kontrolltier. Der interzelluläre Raum ist schmal. Im Bereich der Zellmembran sind zahlreiche Bündel von Filamenten zu finden. $\times 30,000$

C. Tunica propria des Tubulus seminiferus (T) im Hoden vom Kontrolltier. Kollagenfasern (KF) sind nur spärlich im inneren (IZ) und äusseren Zwischenraum (AZ) vorhanden. $\times 30,000$

ABB. 2. Kryptorcher Hoden von Ratten 10 Tage nach der Operation ohne Peroxydase-Behandlung. Die Tunica propria (TP) ist durch vermehrte Kollagenfaserbildung (KF) im inneren Zwischenraum (IZ) verbreitert. Die Basalmembran (BM) des Tubulus seminiferus (T) und die der kontraktilen Zellen (KZ) sind gefaltet und teilweise zweischichtig. $\times 12,000$

ABB. 3. Kryptorcher Hoden von Ratten 80 Tage nach der Operation ohne Peroxydase-Behandlung. Die Kollagenisierung (KF) in der Tunica propria (TP) ist deutlich. Die Basalmembran (BM) des Tubulus seminiferus (T) und die der kontraktilen Zellen (KZ) sind stark gefaltet und geschichtet. $\times 15,000$

ABB. 4. Kontralateraler skrotaler Hoden von Ratten 80 Tage nach der Operation ohne Peroxydase-Behandlung. Die Tunica propria (TP) zeigt den typischen Aufbau wie im Hoden von Kontrolltieren. Der Tubulus seminiferus (T) enthält viele Spermatogonien (SP) und weitere Stadien der spermatogenetischen Zellen. Spermatocyt I. Ordnung (SI). $\times 9,000$

ABB. 5. Hoden von Kontrolltieren nach Behandlung mit Peroxydase. Die Reaktion der Peroxydase ist in der Tunica propria (TP) und im Interstitium (I) zu finden. Der interzelluläre Raum zwischen Sertolizellen (SZ) und Spermatocyten I. Ordnung (SI) ist frei von Peroxydase (Pfeil). Die Peroxydase dringt bis an die Zellgrenze zur Basalmembran (BM) des Tubulus seminiferus vor. $\times 16,000$

ABB. 6. Peripherer Abschnitt des Hodens von Kontrolltieren nach Peroxydase-Behandlung. Die Peroxydase-Reaktion im Tubulus seminiferus ist nur im interzellulären Raum um die Spermatogonien (SP) zu sehen (Pfeile). $\times 9,000$

ABB. 7. Kryptorcher Hoden von Ratten 37 Tage nach der Operation nach Peroxydase-Behandlung. Die Peroxydase dringt bis an die Zellgrenze zur Basalmembran des Tubulus seminiferus vor wie beim Hoden von Kontrolltieren. Die Mikropinocytose ist im kryptorchen Hoden stark reduziert. $\times 12,000$

ABB. 8. Kryptorcher Hoden von Ratten 10 Tage nach der Operation nach Peroxydase-Behandlung. Peroxydase ist in der Tunica propria (TP) und im Interstitium (I) nachweisbar. $\times 12,000$

ABB. 9. Kontralateraler skrotaler Hoden von Ratten 37 Tage nach der Operation und nach Peroxydase-Behandlung. Die Zellen des Tubulus seminiferus (T) nehmen Peroxydase aktiv durch Mikropinocytose auf (Pfeile). $\times 30,000$

selten sind an der Basalmembran Spermatogonien zu beobachten. Die Sertolizellen weisen einen vermehrten Lipoidgehalt auf. Die Lipoidgranula sind vor allem in der Nähe des Kerns lokalisiert. Die beschriebenen pathologischen Veränderungen sind progredient. Sie sind bereits 10 Tage nach der Operation angedeutet (Abb. 2).

Der kontralaterale skrotale Hoden weist beim experimentellen Kryptorchismus keine morphologisch signifikanten Veränderungen auf (Abb. 4). Die Tunica propria ist hier gleich schmal wie bei Hoden von Kontrolltieren. Im Tubulus seminiferus des skrotalen Hodens sind alle Stadien der Spermatogenese zu beobachten (Abb. 4).

Die Peroxydase ist bei Hoden von Kontrolltieren (Abb. 5 und 6), kryptorchen (Abb. 7 und 8) und bei skrotalen Hoden der einseitig operierten Tiere (Abb. 9) sehr gut im Interstitium und in der Tunica propria nachweisbar. In der Tunica propria ist die elektronendichte Peroxydase im äusseren und im inneren Zwischenraum anzutreffen. Die Peroxydase wird sowohl in den Endothelzellen als auch in den kontraktilen Zellen aktiv durch Mikropinocytose aufgenommen (Abb. 6 und 8). Die Basalmembran des Tubulus seminiferus besteht beim normalen Rattenhoden aus zwei Blätter: einem hellen inneren und einem elektronendichten äusseren Blatt. Nach der Behandlung mit Peroxydase ist diese Trennung in zwei Blätter bei den drei untersuchten Hoden nicht mehr nachweisbar (Abb. 5, 6 und 7). Das bedeutet, daß die Peroxydase bis an die Zellgrenze zur Basalmembran des Tubulus seminiferus vordringt. Die Zellen im Tubulus seminiferus nehmen die Peroxydase aktiv durch Mikropinocytose auf. Das Vorhandensein einer Blut-Hoden-Schranke wird durch die Tatsache bewiesen, daß die Peroxydase nicht frei diffundieren kann und entsprechend im interzellulären Raum und im Lumen des Tubulus seminiferus nicht nachweisbar ist; lediglich der interzelluläre Raum um die Spermatogonien enthält Peroxydase (Abb. 5 und 6).

Dieser Schrankeneffekt bleibt auch beim kryptorchen Hoden bestehen (Abb. 7 und 8). Die mikropinocytotische Aufnahme der Peroxydase ist bei Hoden von Kontrolltieren und skrotalen Hoden der operierten Tiere ausgeprägter als bei kryptorchen Hoden. Je länger ein Kryptorchismus besteht, desto stärker ist der aktive Stofftransport vermindert (Abb. 7 und 8).

DISKUSSION

Der experimentelle Kryptorchismus bei der Ratte ruft starke Veränderungen im Hoden hervor. Diese Veränderungen werden sowohl im Tubulus seminiferus als auch in der Tunica propria des Tubulus seminiferus beobachtet. Die Tunica propria ist durch Fibroblastenvermehrung und durch vermehrte Kollagenfaserbildung verdickt. Die Basalmembran des Tubulus seminiferus und die der kontraktilen Zellen sind gefaltet und mehrschichtig geworden (Leeson u. Leeson, 1970). Der Tubulus seminiferus enthält fast nur Sertolizellen, die einen vermehrten Lipoidgehalt haben.

Die oben erwähnten Veränderungen sind schon 10 Tage nach der Operation angedeutet und werden mit zunehmender Zeit ausgeprägter.

Shirai u.a. (1966) beobachteten bei experimentell erzeugtem einseitigem Kryptorchismus an Hunden Veränderungen im kontralateralen skrotalen Hoden. In unserem Material haben wir ähnlich wie Leeson u. Leeson (1970) am kontralateralen Hoden elektronenmikroskopisch an der Tunica propria sowie im Tubulus

seminiferus keine morphologisch signifikanten Veränderungen feststellen können.

Beim kindlichen Kryptorchismus haben wir ähnliche Veränderungen wie beim experimentellen Kryptorchismus festgestellt (Hadziselimovic u. Seguchi, 1973a, 1973b; Seguchi u. Hadziselimovic, 1976): 1. eine Verdickung, Kollagenisierung und Fibrosierung der Tunica propria, 2. die mit der Zeit fortschreitende Abnahme der Spermatogonienzahl, die soweit gehen kann, daß man im Tubulus seminiferus nur noch Sertolizellen antrifft. Daß derartige pathologische Veränderungen der Tunica propria bei kryptorchen Hoden zu Diffusionsschwierigkeiten führt, haben wir bei der Ratte durch Peroxydase-Applikation nachgewiesen.

Fawcett u.a. (1969) zeigten, daß die kontraktile Zellschicht in der Tunica propria ein wichtiges Element der Blut-Hoden-Schranke ist, da die Eiweißausfällung, die in der Lymphe und im extravaskulären Raum vorhanden ist, in der Tiefe der kontraktilen Zellschicht, d.h. im inneren Zwischenraum, nicht beobachtet wird.

Fawcett u.a. (1970) berichteten beim Peroxydaseversuch am Meerschweinchen, daß die Peroxydase im inneren Zwischenraum sowie im interzellulären Raum zwischen Spermatogonien und Sertolizellen eine Stunde nach der Applikation nachweisbar ist (Abb. 6), während sie im äusseren Zwischenraum schon nach 30 Minuten vorhanden ist.

Die Peroxydase ist an Hoden der Kontrolltiere, kryptorchen und skrotalen Hoden der operierten Tiere gut im Interstitium nachweisbar. In der Tunica propria dringt sie bei allen drei Hodentypen nach zwei Stunden bis an die Zellgrenze zur Basalmembran des Tubulus seminiferus vor. Die Zellen im Tubulus seminiferus nehmen die Peroxydase aktiv durch Mikropinocytose auf. Die mikropinocytotische Aufnahme der Peroxydase ist bei normalen und skrotalen Hoden ausgeprägter als bei kryptorchen Hoden.

Die Tatsache, daß die Peroxydase in den Tubulus seminiferus nicht frei diffundieren kann, zeigt, daß eine Blut-Hoden-Schranke vorhanden ist. Die morphologische Basis der Blut-Hoden-Schranke ist in einer speziellen Zellverbindung der Sertolizellen zu suchen (Fawcett u.a., 1970, Dym u. Fawcett 1970, Dym, 1973) (Abb. 1b).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Durchlässigkeit der verdickten Tunica propria beim kryptorchen Hoden in bezug auf die Peroxydase keinen Unterschied zum normalen Hoden zeigt. Die Funktion der Blut-Hoden-Schranke bleibt beim kryptorchen Hoden somit hinsichtlich der passiven Stoffdurchlässigkeit erhalten. Der aktive Stofftransport durch Mikropinocytose ist jedoch stark vermindert.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei 20 Ratten wurde operativ einseitig ein Kryptorchismus erzeugt. 10 weitere Ratten dienten als Kontrolltiere. Nach 10–80 Tage wurden die Hoden exstirpiert; zwei Stunden zuvor wurde 30 mg Meerrettich-Peroxydase pro Tier intraperitoneal injiziert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, daß die Durchlässigkeit der Tunica propria und der Basalmembran des Tubulus seminiferus für Peroxydase keinen signifikanten Unterschied bei Hoden von Kontrolltieren und dem Skrotalhoden der einseitig operierten Tiere zeigt. Der kryptorche Hoden weist dagegen eine Verdickung, Fibrosierung und Kollagenisierung der Tunica propria auf. Das Tubulus seminiferus enthält fast nur Sertolizellen. Der kon-

tralaterale skrotale Hoden zeigt keine morphologisch signifikanten Veränderungen gegenüber den Hoden der Normaltiere. Die Peroxydase dringt bei kryptorchen, bei skrotalen Hoden und bei den Hoden der Kontrolltiere bis an die Zellgrenze in den Bereich der Basalmembran vor, ist dagegen im interzellulären Raum und im Lumen des Tubulus seminiferus nicht nachweisbar; lediglich der interzelluläre Raum um die Spermatogonien enthält Peroxydase. Die Zellen im Tubulus seminiferus nehmen die Peroxydase aktiv durch Mikropinocytose auf. Diese Aufnahme ist am Hoden der Kontrolltiere und am skrotalen Hoden ausgeprägter als bei kryptorchen Hoden. Die Funktion der Blut-Hoden-Schranke bleibt beim kryptorchen Hoden hinsichtlich der passiven Stoffdurchlässigkeit erhalten, der aktive Stofftransport durch Mikropinocytose ist stark vermindert.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Manfred Ueck möchten wir für die sprachliche Korrektur dieses Manuskriptes herzlich danken.

LITERATUR

1. Dym, M. and Fawcett, D. W.: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3; 308–326, 1970.
2. Dym, M.: The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat. Rec.* 175; 639–656, 1973.
3. Fawcett, D. W., Heidger, P. M. and Leak, L. V.: Lymph vascular system of the interstitial tissue of the testis as revealed by electron microscopy. *J. Reprod. Fert.* 19; 109–119, 1969.
4. Fawcett, D. W., Leak, L. V. and Heidger, P. M.: Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 10; 105–112, 1970.
5. Fawcett, D. W., Neaves, W. S. and Flores, M. N.: Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9; 500–532, 1973.
6. Graham, R. C. and Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14; 291–312, 1966.
7. Hadziselimovic, F. und Seguchi, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen beim Kryptorchismus. *Z. Kinderchir.* 12; 376–381, 1973a.
8. Hadziselimovic, F. und Seguchi, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Kinderhoden bei unvollständigem Descensus. *Acta Anat.* 86; 474–484, 1973b.
9. Leeson, T. S. and Leeson, C. R.: Experimental cryptorchidism in the rat. A light and electron microscope study. *Invest. Urol.* 8; 127–144, 1970.
10. Nagano, T.: Fine structural changes in the flagellum of the spermatid in experimental cryptorchidism of the rat. *J. Cell Biol.* 18; 337–344, 1963.
11. Plöen, L.: An electron microscope study of the immediate effects on spermatogenesis of a short-time experimental cryptorchidism in the rabbit. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 10; 293–309, 1972.
12. Seguchi, H. and Hadziselimovic, F.: Electron microscopical observations on the cryptorchid testes of children. (Japanese). *J. Jap. Soc. Pediat. Surg.* 12; 351–356, 1976.
13. Shirai, M., Matsushita, S., Kagayama, M., Ichijo, S. and Takeuchi, M.: Histological changes of the scrotal testis in unilateral cryptorchidism. *Tohoku J. Exp. Med.* 90; 363–373, 1966.