

Badania kariometryczne komórek kanalika jądra u mężczyzn z azoospermią

Karyometric evaluations of the seminal tubule cells in men with azoospermia

Rogoza Andrzej, Wojtylak Szymon, Banach Piotr

Katedra i Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy jest potwierdzenie tezy, że badania kariometryczne komórek kanalika jądra u mężczyzn z azoospermią wskazują na pobudzający wpływ komórek Leydiga i testosteronu na czynność komórek Sertoliego, a gonadotropina LH może wywoływać zmiany wsteczne w ścianie kanalika jądra.

Materiał i metody: U 75 mężczyzn z azoospermią wykonano chirurgiczną biopsję jednego lub obu jąder, po uprzednim oznaczeniu poziomów LH i testosteronu we krwi. U wszystkich mężczyzn wykazano hipospermatogenezę. Oceniano nabłonek plemnikotwórczy, błonę podstawną kanalika, komórki mioidalne ściany kanalika i komórki Sertoliego. W celu zbadania stanu czynnościowego komórek wykonano pomiary kariometryczne w różnych komórkach kanalika jądra.

Wyniki: Wykazano, że wielkość jąder komórkowych komórek Sertoliego jest znamienne wyższa przy hipospermatogenezie z hiperplazją komórek Leydiga niż bez hiperplazji ($p=0,01$). Analiza regresji wykazała dodatnie korelacje pomiędzy poziomem testosteronu a wielkością jąder komórek Sertoliego ($p=0,02$), pomiędzy wielkością jąder komórek Sertoliego a spermatogonią i pomiędzy wielkością jąder komórek mioidalnych a spermatogonią ($p=0,0001$). Poziom LH we krwi dodatnio korelował z grubością ściany kanalika ($p=0,01$).

Wnioski: Hiperplazja komórek Leydiga i wydzielany przez nie testosteron wykazuje pobudzający wpływ na czynność komórek Sertoliego, a komórki Sertoliego wywołują aktywację spermatogonią. Czynność komórek Sertoliego jest wzajemnie dodatnio powiązana z czynnością komórek mioidalnych ściany kanalika jądra. Nadmiar LH może być przyczyną pogrubienia ściany kanalików jądra.

Słowa kluczowe: **nabłonek plemnikotwórczy – histologia / jądro – patomorfologia / azoospermia / kariometria**

Abstract

Objectives: The aim of the study is to confirm that karyometric evaluations of the seminal tubule cells in men with azoospermia indicate stimulating influence of the Leydig cell and testosterone on the functions of Sertoli cells, whereas serum LH concentration may in fact lead to regressive changes in the wall of the seminal tubule.

Material and methods: Material consists of 75 patients with azoospermia and hypospermatogenesis. In all patients surgical biopsy of the testes was done, prior to an assessment of serum LH and testosterone levels. In histopathology, spermatogonia, basal membrane, myoid cells of the tubular wall and interstitial cells have been examined. Karyometry in Sertoli cells, spermatogonia and myoid cells was performed. Also, the thickness of the tubular wall was assessed quantitatively.

Adres do korespondencji:

Andrzej Rogoza
Katedra i Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej
Akademii Medycznej w Gdańsku
80-402 Gdańsk, ul. Kliniczna 1A
e-mail: rogoza@poczta.fm

Otrzymano: 26.07.2006
Zaakceptowano do druku: 18.01.2007

Rogoza A, et al.

Results: The size of Sertoli cells nuclei was significantly bigger in hypospermatogenesis associated with hyperplasia of Leydig cells than in hypospermatogenesis alone ($p=0,01$). Regression analysis revealed positive correlations between serum testosterone and the size of Sertoli cells nuclei ($p=0,02$), between the size of Sertoli cell nuclei and of spermatogonia and between nuclear size of myoid cells and spermatogonia ($p=0,0001$). Serum LH correlated positively with the thickness of tubular wall ($p=0,01$).

Conclusions: Leydig cell hyperplasia and testosterone stimulate the functions of Sertoli cells whereas Sertoli cells activate spermatogonia. The Sertoli cell function is positively interrelated with the function of myoid cells. There is a close interrelationship between LH and the thickness of tubular wall, which may suggest that hypersecretion of LH causes the enlarged thickness of tubular wall, observed in hipergonadotropizm.

Key words: **leydig cells – pathology / karyometry / azospermia / testis – pathology / seminiferous epithelium – pathology**

Wstęp

Na podstawie danych klinicznych wyróżnia się jądrowe i pozajądrowe przyczyny azospermii. Do jądrowych należą: zespół samych komórek Sertoliego (SCO), hipospermatogeneza (ilościowe zubożenie komórek plemnikotwórczych) i zatrzymanie spermatogenezy na różnych jej etapach [1]. Przyczyny pozajądrowe to niedrożność nasieniowodów, stany zapalne dróg wyprowadzających nasienie i zapalenie gruczołu krokowego. Przy jądrowych przyczynach azospermii obserwuje się przerost gruczołu śródmiąższowego, tj. komórek Leydiga oraz nadmierne wydzielanie gonadotropin LH i FSH [2, 3, 4, 5]. Inną spotykaną patologią w azospermii pochodzenia jądrowego jest hialinizacja błony podstawnej kanalika lub całego jądra. Szczególne zainteresowanie budzą stany hipospermatogenezy [6, 7, 1, 3, 4, 8, 9].

Biopsja jądra odgrywa ważną rolę w prognozowaniu efektów leczenia niepłodnej pary [10, 11] ale jej ocena wymaga wysokiego stopnia doświadczenia i zwykle prowadzona jest nieprecyzyjnie. Dokładna ocena biopsji wykracza poza rutynę histopatologiczną i powinna zawierać elementy morfometryczne [2, 12, 13, 1, 3, 14, 15]. Według Baak i Oort [16, 17] wielkość jądra komórkowego wskazuje na stan czynnościowy komórki. Jądro komórkowe powiększa się w czasie nasilonej transkrypcji DNA i przed podziałem komórkowym, kiedy to występuje w jego obrębie kumulacja wody. W niniejszej pracy zastosowaliśmy analizę morfometryczną do pomiaru jąder komórkowych (kariometrię) różnych komórek kanalików jądra, a wyniki poddaliśmy analizie statystycznej i analizie korelacji z poziomami LH i testosteronu we krwi.

Cel pracy

Celem pracy jest potwierdzenie tezy, że badania kariometryczne komórek kanalika jądra u mężczyzn z azospermią wskazują na pobudzający wpływ komórek Leydiga i testosteronu na czynność komórek Sertoliego, a gonadotropina LH może wywoływać zmiany wsteczne w ścianie kanalika jądra.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowili mężczyźni kierowani do Poradni Andrologicznej Kliniki Ginekologii Akademii Medycznej w Gdańsku z powodu niepłodności małżeńskiej. Wybrano grupę pacjentów, u których w trzykrotnym badaniu nasienia stwierdzono azospermię.

Wykluczono z oceny statystycznej pacjentów z SCO. Ocena poziomu LH i testosteronu w surowicy krwi wykonano metodą RIA.

U wszystkich mężczyzn wykonano biopsję chirurgiczną obu jąder, a w niektórych przypadkach jednego jądra. Uzyskany materiał utrwalono w odczynniku Mouricarda o podobnym składzie do płynu Bouina (96% alkohol – 80ml, 40% formalina – 15ml, kwas octowy lodowy – 5ml). Tkanki zatapiano w parafinie. Skrawki o grubości 5µm barwiono hematoxyliną i eozyną.

W badaniu histopatologicznym w mikroskopie świetlnym analizowano: kanaliki plemnikotwórcze pod względem obecności ich światła, a także grubości błony podstawnej i ilości komórek mioidalnych w błonie podstawnej.

W zależności od rozpoznań histopatologicznych całą populację mężczyzn podzielono na 3 grupy:

Tabela I. Wyniki pomiarów pola powierzchni przekroju jądra komórkowego (µm²) różnych komórek kanalika jądra i oznaczeń testosteronu (T) oraz LH w surowicy krwi.

Zmienna	Grupa I (N-22) mediana	Odchylenie stand.	Błąd stand.	Grupa II (N-10) mediana	Odchylenie stand.	Błąd stand.	Grupa III (N-43) mediana	Odchylenie stand.	Błąd stand.
Kom. Sertoliego	36,05	3,3	0,69	39,23	3,61	1,14	37,77	4,05	0,61
Spermatogonie	44,13	6,17	1,31	51,31	7,77	2,45	48,65	8,19	1,25
Kom. mioidalne	12,84	1,87	0,39	15,63	3,31	1,04	13,93	2,37	0,36
T (ng/dl) 705,00	394,27	84,05	660,00	385,69	121,96	678,00	317,68	48,44	18,42
LH (IU/L)	13,00	25,51	5,43	11,00	7,86	2,48	12,00	31,83	4,85

Grupa I – z obrazem mikroskopowym hipospermatogenezy (*microscopic hipospermatogenesis*)

Grupa II – z obrazem mikroskopowym hipospermatogenezy i hiperplazji komórek Leydiga (*microscopic hipospermatogenesis of hiperplasia of Leydig cells*)

Grupa III – z obrazem mikroskopowym hipospermatogenezy i hialinizacji w błonie podstawnej (n=43) (*microscopic hipospermatogenesis and hialinisation of basal lamina of seminiferous tubule*).

Badania kariometryczne komórek kanaliką jądra u mężczyzn z azoospermią.

- I. z hipospermatogenezą (H) (n=22),
- II. z hipospermatogenezą i hiperplazją komórek Leydiga (HL) (n=10),
- III. z hipospermatogenezą i hialinizacją w błonie podstawnej ściany kanaliką (HLI) (n=43).

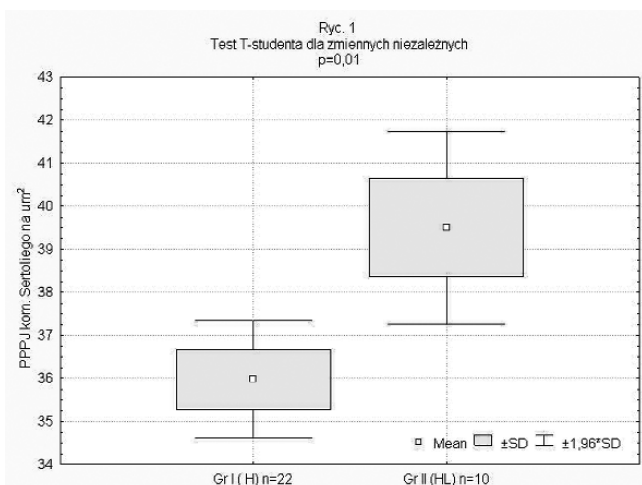
Ocena morfometryczna dotyczyła pola powierzchni przekroju jąder komórkowych (PPPJ), z wykorzystaniem pomiarów obwodu, osi długiej, osi krótkiej oraz stosunku obu osi jąder w komórkach Sertoliego, spermatogoniach i komórkach mioidalnych ściany kanalików jądra. Pomiarów dokonywano w dziesięciu przypadkowych polach widzenia. Pomiarów dotyczyły co najmniej 100 jąder komórkowych każdego typu komórek u jednego pacjenta. Zastosowano system komputerowej analizy obrazu mikroskopowego typu MOP Videoplan, przy powiększeniu 1000 razy [17]. Wyniki pomiarów liniowych wyrażano w μm , a powierzchniowych w μm^2 . Wyniki badań hormonalnych i wartości pomiarów morfometrycznych poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statistica 6.0. Przeprowadzono też analizę regresji pomiędzy różnymi parametrami w różnych grupach pacjentów.

Wyniki

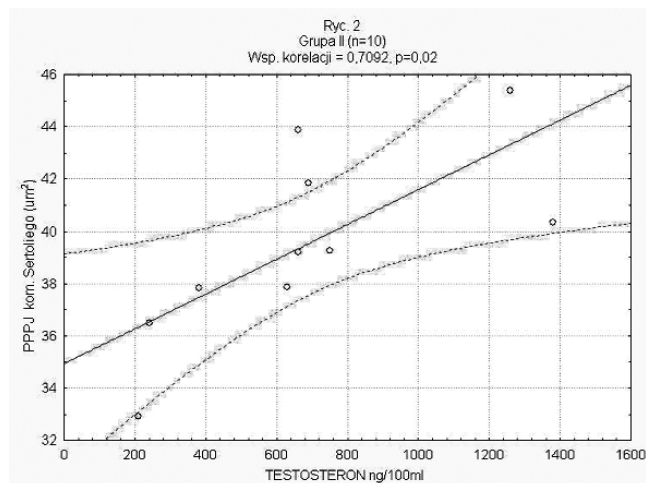
Wyniki pomiarów morfometrycznych i poziomów hormonów podano w tabeli I. Rycina 1 pokazuje, że przy hiperplazji komórek Leydiga, PPPJ komórek Sertoliego było znacznie wyższe niż przy hipospermatogenezie bez hiperplazji. Przy hiperplazji komórek Leydiga, PPPJ komórek Sertoliego dodatkowo korelował z PPPJ spermatogonii ($r=0,78$, $p=0,008$), a poziom testosteronu we krwi dodatkowo korelował z PPPJ komórek Sertoliego zarówno przy hipospermatogenezie ($r=0,45$; $p=0,036$), jak i przy hipospermatogenezie z hiperplazją komórek Leydiga ($r=0,71$; $p=0,02$ (Rycina 2).

Stwierdzono także dodatnie korelacje pomiędzy poziomem LH w surowicy krwi a grubością błony podstawnej kanaliką nasiennego w grupie I ($r=0,65$; $p=0,01$) (Rycina 3).

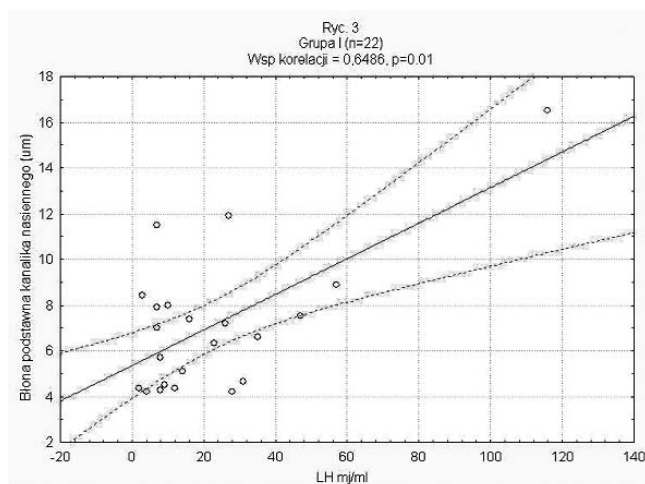
W całej populacji mężczyzn stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy PPPJ komórek mioidalnych a PPPJ spermatogonii ($r=0,63$; $p=0,0001$), (Rycina 4).



Rycina 1. Porównanie średniego pola powierzchni przekroju jądra komórkowego (PPPJ) komórek Sertoliego przy hipospermatogenezie (Gr I) i przy hipospermatogenezie z hiperplazją komórek Leydiga (Gr II)



Rycina 2. Korelacja pomiędzy poziomem testosteronu we krwi a polem powierzchni przekroju komórki Sertoliego przy hipospermatogenezie z hiperplazją komórek Leydiga.

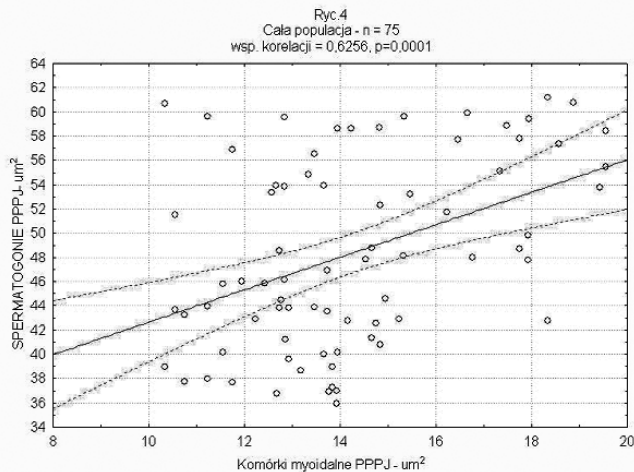


Rycina 3. Korelacja pomiędzy poziomem LH we krwi a grubością ściany kanaliką plemnikotwórczego przy hipospermatogenezie.

Dyskusja

Zależności pomiędzy poziomami hormonów osi przysadka – jądro w surowicy krwi a stanem nabłonka plemnikotwórczego opracowywane są najczęściej na modelach szczurzych [7, 18]. Nieliczne badania kliniczne prowadzone były między innymi przez Babłoka i wsp. [2] oraz Kulę i wsp. [1, 3]. W 1991 roku Kula [3] wykazał, że nadmierne wydzielanie FSH i LH u nieplodnych mężczyzn z opisanym wcześniej [1] częściowym zatrzymaniem spermatogenezy na poziomie mejozy, jest odpowiedzialne za podwyższoną aktywność podziałową spermatogonii, a nie jak dotychczas uważano, jest jedynie wtórne do uszkodzenia całej spermatogenezy. W badaniach na szczurach wykazano, że wielkość jąder komórek mioidalnych koreluje z liczebnością komórek Leydiga [19], czego nie stwierdziliśmy w niniejszych badaniach.

Rogoza A, et al.



Rycina 4. Korelacja pomiędzy polem powierzchni przekroju (PPPJ) komórek mioidalnych a PPPJ spermatogonii.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują jednak na istotne związki między czynnością komórek mioidalnych a aktywacją spermatogonii w całej badanej populacji pacjentów z azoospermia. Fakt ten nie był dotychczas publikowany, ale pozostaje w zgodności z hipotezami Bruninga i wsp. [7], Menga i wsp. [20] i Nistala i wsp. [10]. Różnice PPPJ komórek Sertoliego pomiędzy grupą z hipospermatogenezą a grupą z hipospermatogenezą i hiperplazją komórek Leydiga nie były dotychczas obserwowane [21, 22, 23]. Nasze wyniki wykazują, że hiperplazja komórek Leydiga i wydzielany przez nie testosteron prowadzą do wzmożonej czynności komórek Sertoliego, a co za tym idzie do nasilenia innych parakrynych zależności pomiędzy obu typami komórek. Konsekwentnie, w grupie z hipospermatogenezą i hiperplazją komórek Leydiga wykazaliśmy dodatnią zależność między poziomem testosteronu w surowicy krwi a PPPJ komórek Sertoliego. Badania Russella i wsp. [9] i Regadera i wsp. [24] wydają się potwierdzać tę obserwację.

W grupie pacjentów z hiperplazją komórek Leydiga obserwowano wyższe wewnątrzjądrowe stężenie testosteronu, który może mieć pobudzający wpływ na komórki Sertoliego. Poza naszymi danymi takiego związku nie wykazywano jednak wcześniej. Dalsze wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują także na ścisły dodatni związek pomiędzy poziomem LH w surowicy krwi a grubością błony podstawnej kanalika jądra w grupie z hipospermatogenezą. Fakt ten sugeruje, że hipergonadotropizm może nie tylko być zjawiskiem wtórnym do uszkodzenia jądra, ale nadmiar LH może być przyczyną zmian wstecznych w obrębie gonady męskiej. Pogrubienie ściany kanalika jądra obserwowane jest w większości przypadków hipogonadyzmu hipergonadotropowego.

Poszukiwania związku pomiędzy grubością błony podstawnej kanalika nasiennego a budową nabłonka plemnikotwórczego u mężczyzn nie dały jednak do tej pory rezultatów [12]. W badaniach na szczurach wykazano jednak, że grubość błony podstawnej i właściwej ma ścisły związek z barierą krew – jądro, czyli jest w powiązaniu z funkcją komórki Sertoliego [25, 26, 27].

Wykazano natomiast, że u mężczyzn, zarówno nadmiar LH jak i FSH z powodu pierwotnego uszkodzenia jąder (niepłodność pochodzenia jądrowego) może mieć znaczenie reparacyjne dla gonady męskiej. U mężczyzn z częściowym zatrzymaniem spermatogenezy na poziomie mejozy, podwyższone poziomy FSH i LH korelują dodatnio z liczebnością spermatogonii, co wskazuje na reparacyjny wpływ obu gonadotropin na czynność nabłonka plemnikotwórczego [3]. Dostrzeżone różnice w wielkości jąder komórkowych komórek kanalika plemnikotwórczego w wydzielonych grupach histopatologicznych nie były opisywane dotąd w literaturze, jednak były obserwowane ujemne zależności pomiędzy liczbą komórek mioidalnych ściany kanalika a liczbą komórek Sertoliego i spermatogonii [1, 21].

W naszym materiale wykazano dodatnią korelację między wielkością jąder komórek Sertoliego a wielkością jąder spermatogonii, co wskazuje, że wzrost PPPJ spermatogonii może odzwierciedlać aktywację spermatogonii przez komórki Sertoliego.

Wnioski

1. Hiperplazja komórek Leydiga i wydzielany przez nie testosteron wykazują pobudzający wpływ na czynność komórek Sertoliego, a wzmożona czynność komórek Sertoliego wywołuje aktywację spermatogonii.
2. Czynność komórek Sertoliego jest wzajemnie dodatnio powiązana z czynnością komórek mioidalnych ściany kanalika jądra.
3. Istnieje ścisły związek pomiędzy grubością błony podstawnej kanalika jądra a poziomem LH w surowicy krwi, co może wskazywać, że to nadmiar LH jest przyczyną pogrubienia ścian kanalików jądra.

Piśmiennictwo

1. Kula K, Rodriguez-Rigau L, Włodarczyk W, [et al.]. Three principal types of spermatogenic activity in men as determined by quantitative analysis of the seminiferous epithelium: partial meiotic spermatogenic arrest is associated with accumulation of spermatocytes. In: Frajese G. International Symposium on Oligozoospermia. Oligozoospermia – recent progress in andrology. New York Raven Press, 1981:55-64
2. Bablok L, Janczewski Z, Kwiatkowska Z, [et al.]. The relationship between plasma FSH, testosterone levels and testicular histology in males azoospermia. *Andrologia*. 1978, 1, 502-505
3. Kula K. Hyperactivation of early steps of spermatogenesis compromises meiotic insufficiency in men with hypergonadotropism. A possible quantitative assay for high FSH/low testosterone availabilities. *Andrologia*. 1991, 23, 127-133.
4. Rogoza A. Ocena morfologiczna jąder u mężczyzn z małżeństw bezdzietnych w świetle badań hormonalnych, Gdańsk: AM, 1991.
5. Yaman O, Özdliler E, Seckiner I, [et al.]. Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int Urol Nephrol*. 1999; 31, 519-523.
6. Bablok L. Biopsja jądra: *Andrologia*. Pod red. Semczuk M, Kurpisz M. Warszawa: PZWL, 1998, 198-207
7. Brunning G, Dierichs R, Stumpel C, [et al.]. Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia*. 1993, 25, 311-316
8. Rosenlund B, Kvist U, Ploen L, [et al.]. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod*. 1998, 13, 1266-1271.
9. Russell L, Bartke A, Goh J. Postnatal development of Sertoli cell barrier, tubular lumen and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat*. 1989, 184, 179-189
10. Nistal M, De Mora J, Paniagua R. Classification of several types of maturational arrest of spermatogonia according to Sertoli cell morphology: an approach to aetiology. *Int J Androl*. 1998, 21, 317-326.
11. Uygun M, Arık I, Erol D, [et al.]. Quantitative evaluation of biopsy gun testis needle biopsy. Correlation between biopsy score of varicocele-bearing testis and sperm count. *J Reprod Med*. 1999, 44, 445-449.

Badania kariometryczne komórek kanalikula jądra u mężczyzn z azoospermią.

12. Foresta C, Ferlin A, Bettella A, [et al.]. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clin Endocrinol.* 1995, 43, 537-543.
13. Hikim A, Amador A, Klemcke H, [et al.]. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology.* 1989, 125, 1829-1843.
14. Kurohmaru M, Sinha Hikim A, Mayerhofer [et al.]. Golden hamster myoid cells during active and inactive states of spermatogenesis: correlation of testosterone levels with structure. *Am J Anat.* 1990, 188, 319-327.
15. Tesarik J, Mendoza C, Anniballo R, [et al.]. In-vitro differentiation of germ cells frozen testicular biopsy specimens. *Hum Reprod.* 2000, 5, 1713-1716.
16. Baak J. Basic point in and practical aspects of the application of diagnostic morphometry. *Pathol Res Pract.* 1984, 79, 93-199.
17. Baak J, Oort J. A manual of morphometry in diagnostics pathology. Berlin: Springer-Verlag, 1983:12-14
18. Hondo E, Kurohmaru M, Senkiti S, [et al.]. Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biol Reprod.* 1995, 52, 1284-1290.
19. Hikim A, Amador A, Bartke A, [et al.]. Structure/function relationships in active and inactive hamster Leydig cells: a correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 1989, 125, 1844-1856.
20. Meng M, Cha I, Ljung B, [et al.]. Relationship between classic histological pattern and sperm findings on fine needle aspiration map in infertile men. *Hum Reprod.* 2000, 15, 1973-1977.
21. Hilscher B, Engemann A. Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during human prespermatogenesis. *Andrologia.* 1992, 24, 7-10
22. Pesce C, Reale A. Testis morphometry in varicocele. *Arch Androl.* 1985, 15, 193-197.
23. Russell L, de Franca L, Hess R, [et al.]. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue Cell.* 1995, 27, 105-128.
24. Regadera J, Martinez-Garcia F, Paniagua R, [et al.]. Androgen insensitivity syndrome. an immunohistochemical, ultrastructural, and morphometric study. *Arch Pathol Lab Med.* 1999, 123, 182-187.
25. Steger K, Rey R, Louis F, [et al.]. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod.* 1999, 14, 136-143.
26. Weber J, Russell L, Wong V, [et al.]. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships. *Am J Anat.* 1983, 167, 163-179.
27. Weber J, Turner T, Tung K, [et al.]. Effects of cytocholasin D on the integrity of the Sertoli cell (blood-testis) barrier. *Am J Anat.* 1988, 182, 130-147.