

Morfometrijska analiza promjera jezgara Leydigovih stanica i sjemenskih kanalića kod kriptorhičnih testisa u mladim muškaraca

Jagić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:621493>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Anamarija Jagić

**Morfometrijska analiza promjera jezgara Leydigovih stanica i
sjemenskih kanalića kod kriptorhičnih testisa u mladim muškaraca**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, pod vodstvom Prof. dr. sc. Ljerke Banek, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja: profesor biologije i kemije.

Zahvaljujem u prvom redu svojoj obitelji na podršci koju su mi pružili tijekom čitavog studija, a posebice tijekom izrade diplomskog rada.

Isto tako, mnogo zahvaljujem voditeljici svog diplomskog rada, Prof.dr.sc. Ljerki Banek na njezinom vodstvu od početka do kraja izrade diplomskog rada. Posebice sam zahvalna na zajedničkoj suradnji, na velikom strpljenju i ljubaznosti.

Srdačno se zahvaljujem Prof. dr. sc. Gordani Lacković – Venturin što me preporučila voditeljici moga rada, Prof. dr. sc. Ljerki Banek te s povjerenjem uputila k njoj.

Zahvaljujem se Biološkom odsjeku na prekrasnom studiju kroz proteklih sedam godina. Ponuđeni kolegiji su bili zanimljivi i poticali su na razmišljanje.

Posebno se zahvaljujem gospođama iz ureda za studente na njihovoj pristupačnosti i ljubaznosti te na korisnim informacijama tijekom studija.

Zahvaljujem svojim kolegama koji su mi bili podrška i velika pomoć u spremanju ispita tijekom studija.

Puno hvala i mojoj prijateljici Ivani Čukelj koja je slike iz diplomskog rada najprije uredila u Adobe Photoshopu, te potom prebacila u rad.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

MORFOMETRIJSKA ANALIZA PROMJERA JEZGARA LEYDIGOVIH STANICA I SJEMENSKIH KANALIĆA KOD KRIPTORHIČNIH TESTISA U MLADIH MUŠKARACA

ANAMARIJA JAGIĆ

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet
Zavod za histologiju i embriologiju

Leydigove stanice smještene su u intersticijskom tkivu testisa između sjemenskih kanalića. Istraživanje je obuhvatilo biopsije kriptorhičnih testisa petnaestorice muškaraca (18 do 27 god). Kao kontrola poslužili su uzorci tkiva testisa dvojice muškaraca (28 i 29 god) dobivenih obdukcijom nakon prometne nesreće.

Cilj rada bio je istražiti da li se u biopsijama kriptorhičnih testisa mladih muškaraca mijenjaju promjeri jezgara Leydigovih stanica te sjemenskih kanalića u odnosu na kontrolnu skupinu.

Načinjena je kvantitativna analiza primjenom morfometrije koja je uključivala usporedbu kontrolnih uzoraka i uzoraka sjemenika kriptorhičnih muškaraca s obzirom na promjere sjemenskih kanalića te jezgre Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće i krvne kapilare.

Rezultati istraživanja pokazuju značajno smanjenje promjera jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće kao i uz krvne žile kod kriptorhičnih testisa u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0.01$). Također, promjer sjemenskih kanalića bio je značajno smanjen kod kriptorhičnih testisa u odnosu na kontrolu ($P < 0.01$).

(33 stranice, 8 slika, 4 tablice, 3 grafikona, 24 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb.

Ključne riječi: jezgre Leydigovih stanica/ sjemenski kanalići/ kriptorhizam/ morfometrija

Voditelj: Prof. dr.sc. Ljerka Banek

Ocjenjivači: Prof.dr.sc. Ljerka Banek, Prof. dr.sc. G. Lacković – Venturin, Prof. dr. sc. Ines Radanović, Prof. Dr. sc. Draginja Mrvoš – Sermek, Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Rad prihvaćen: 11. ožujka 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of science
Department of Biology

Graduation Thesis

MORFOMETRICAL ANALYSIS OF DIAMETERS OF LEYDIG CELLS NUCLEI AND SEMINIFEROUS TUBULES AT CRYPTORCHID TESTES OF YOUNG MALES

ANAMARIJA JAGIĆ

University of Zagreb
Medical Faculty
Department of histology and embryology

Leydig cells are placed inside the interstitium tissue between seminiferous tubules. The research included biopsies of cryptorchid testes of 15 men (aged 18 - 27). As controls, samples of biopsies of two patients (aged 28 and 29) who had a car accident, were used.

The aim of this thesis was to investigate possible changes in diameters of Leydig cells nuclei and seminiferous tubules according to controls.

A quantitative analysis was done by methods of morfometry and included comparison of the control samples and samples of testicles of infertile men in connection with the diameters of seminiferous tubules and and of Leydig cells nuclei beside seminiferous tubules and blood vessels.

The results of this research show lower values for diameter of Leydig cells nuclei by seminiferous tubules and also along with blood vessels at cryptorchid testes according to controls ($P < 0.01$). Also, diameter of seminiferous tubules was significantly lower at cryptorchid testes related to controls ($P < 0.01$).

(33 pages, 8 figures, 4 tables, 3 charts, 24 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Library of Faculty of Science, Department of Biology, Roosevelt's square 6, 10 000 Zagreb

Key words: nuclei of Leydig cells/ seminiferous tubules/ cryptorchidism/ morfometry

Supervisor: Dr. Ljerka Banek, Prof.

Rewievers: Dr. Ljerka Banek, Prof., Dr. G. Lacković – Venturin, Prof., Dr. Ines Radanović, Prof., Dr. Draginja Mrvoš – Sermek, Prof., Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.

Thesis accepted: 03 - 11 - 2009

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. SMJEŠTAJ I MORFOLOGIJA LEYDIGOVIH STANICA U TESTISU.....	1
1.2. ULTRASTRUKTURA LEYDIGOVIH STANICA	
1.2.1. ULTRASTRUKTURA LEYDIGOVIH STANICA BEZ POREMEĆAJA SPUŠTANJA TESTISA.....	2
1.2.2. ULTRASTRUKTURA LEYDIGOVIH STANICA S POREMEĆAJEM SPUŠTANJA TESTISA.....	3
1.3. STEROIDOGENIČNA AKTIVNOST LEYDIGOVIH STANICA	
1.3.1. BIOSINTEZA I NAČIN SEKRECIJE TESTOSTERONA.....	6
1.3.2. REGULACIJA STERIDOGENEZE MUŠKARACA OD NOVOROĐENAČKE DOBI DO STAROSTI.....	7
1.4. BIOKEMIJSKA SVOJSTVA I KEMIJSKA STRUKTURA TESTOSTERONA.....	9
1.5. UTJECAJ VELIČINE JEZGRE STANICE NA STANIČNU FUNKCIJU.....	10

2. CILJ RADA.....11

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA TESTISA.....	12
3.2. PRIPREMANJE TKIVA TESTISA ZA HISTOLOŠKE ANALIZE.....	12
3.3. MORFOMETRIJSKA ANALIZA UZORAKA TESTISA.....	12
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	13

4. REZULTATI

4.1. DUŽINE JEZGARA LEYDIGOVIH STANICA UZ KRVNE ŽILE I SJEMENSKE KANALIĆE.....	14
4.2. ŠIRINE JAZGARA LEYDIGOVIH STANICA UZ KRVNE ŽILE I SJEMENSKE KANALIĆE.....	16
4.3. DUŽI I KRAĆI PROMJER SJEMENSKIH KANALIĆA.....	18

5. RASPRAVA.....22

6. ZAKLJUČAK.....25

7. POPIS LITERATURE.....26

POPIS KRATICA

X – aritmetička sredina
s – standardna devijacija
SE – standardna pogreška
RSE – relativna standardna pogreška
P – vjerojatnost
t – vrijednost t – testa
n – veličina uzorka

Dvz – dužina jezgara Leydigovih stanica uz krvne žile kod zdravih muškaraca

Dtz – dužina jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće (tubule) kod zdravih muškaraca

Dvk – dužina jezgara Leydigovih stanica uz krvne žile kod muškaraca s kriptorhizmom

Dtk – dužina jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće (tubule) kod muškaraca s kriptorhizmom

Švz – širina jezgara Leydigovih stanica uz krvne žile kod zdravih muškaraca

Štz – širina jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće (tubule) kod zdravih muškaraca

Švk – širina jezgara Leydigovih stanica uz krvne žile kod muškaraca s kriptorhizmom

Štk – širina jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće (tubule) kod muškaraca s kriptorhizmom

Dz – duži promjer sjemenskih kanalića kod zdravih muškaraca

Dk – duži promjer sjemenskih kanalića kod muškaraca s kriptorhizmom

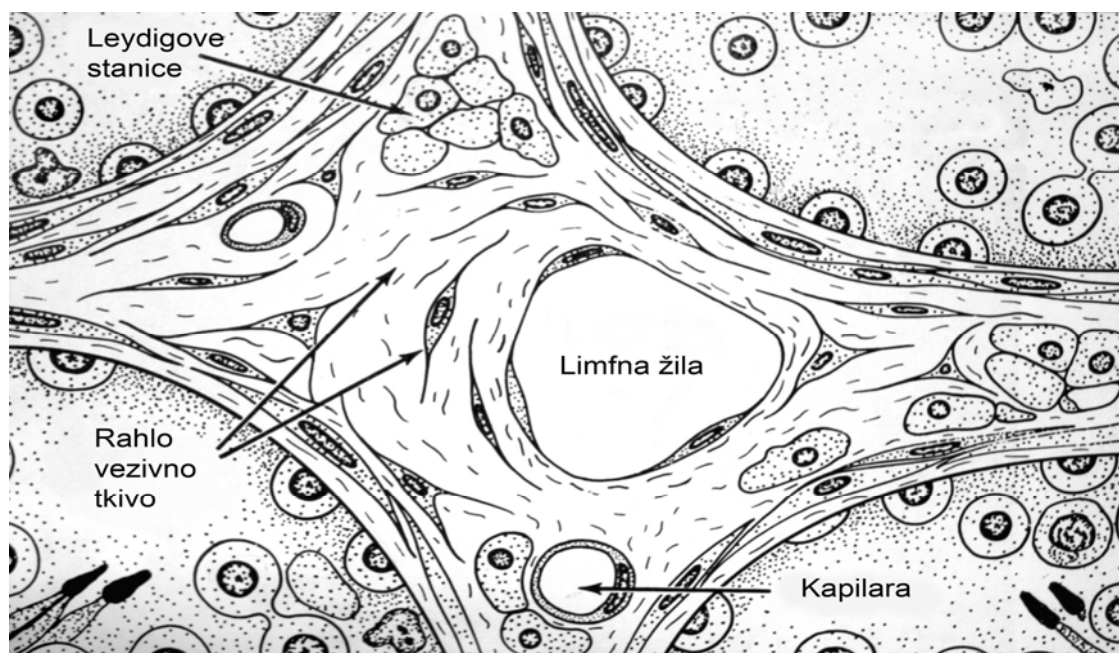
dz – kraći promjer sjemenskih kanalića kod zdravih muškaraca

dk – kraći promjer sjemenskih kanalića kod muškaraca s kriptorhizmom

1. UVOD

1.1. SMJEŠTAJ I MORFOLOGIJA LEYDIGOVIH STANICA U TESTISU

Leydigove stanice smještene su u intersticijskom tkivu testisa. Tu se nalaze Leydigove stanice u nakupinama ili pojedinačno. U intersticijskom tkivu testisa (Sl. 1-1) nalaze se još i stanice rahlog vezivnog tkiva te krvne i limfne žile, kao i makrofagi i masne stanice (Fawcett 1973).



Sl. 1-1. Prikaz opće organizacije intersticijskog tkiva testisa u sisavaca.

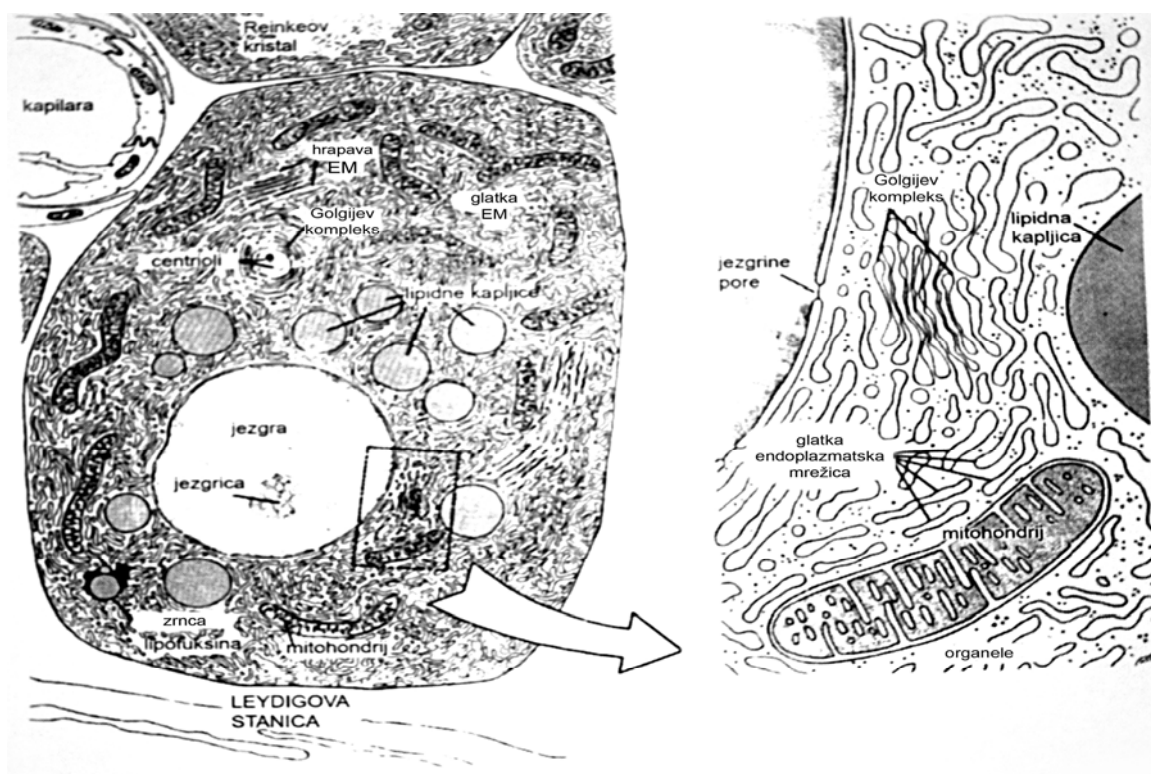
Leydigove stanice zauzimaju 5 do 12 % ukupnog volumena testisa čovjeka (Christensen 1975).

Karakteriziraju ih kao okrugle ili poligonalne stanice koje posjeduju okruglu jezgru s jezgrićom (Kaler i Neaves 1978).

1.2. ULTRASTRUKTURA LEYDIGOVIH STANICA

1.2.1. ULTRASTRUKTURA LEYDIGOVIH STANICA BEZ POREMEĆAJA SPUŠTANJA TESTISA

Leydigove stanice zdravih muškaraca najčešće su u skupinama. Jezgra im je okrugla i eukromatična s brojnim porama. Citoplazma im je gotovo u potpunosti ispunjena glatkom endoplazmatskom mrežicom i u njoj su prisutne lipidne inkluzije, zrnca lipofuksina, kao i primarni te sekundarni lizosomi. Mitohondriji su veliki i brojni. Golgijev kompleks je slabo razvijen. Hrapava endoplazmatska mrežica je rijetka. Većina ovih stanica posjeduje po jedan Reinkeov kristal s jednom ili nekoliko podjedinica. Neke stanice koje ne posjeduju Reinkeove kristale imaju parakristalne inkluzije (Paniagua i sur. 1985).

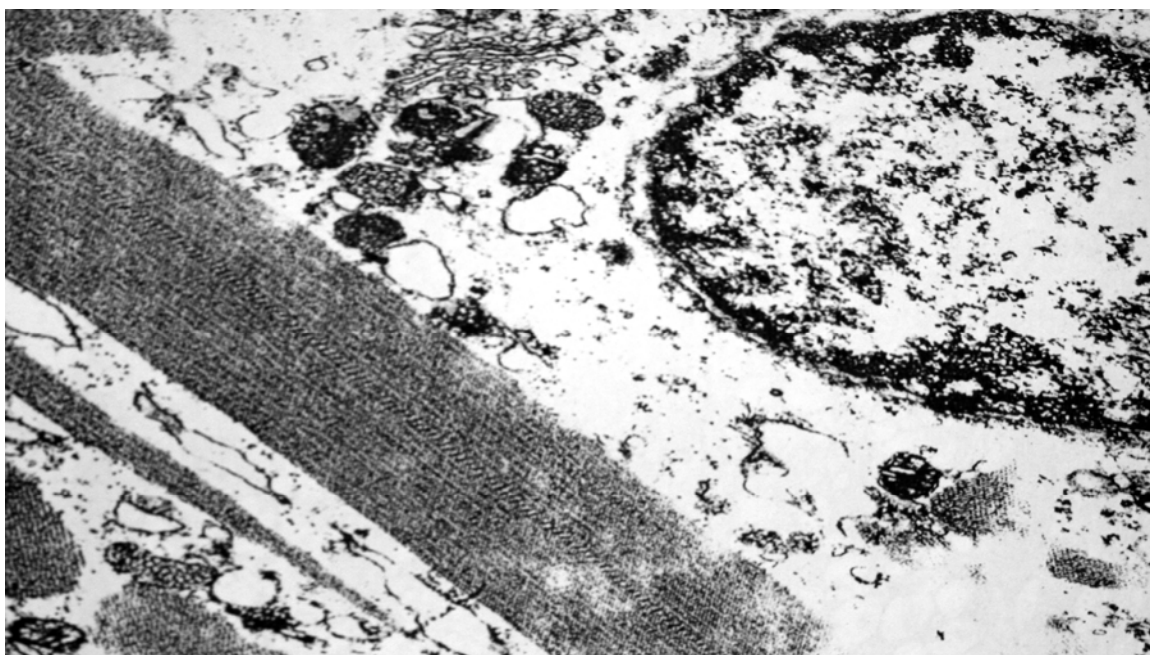


Sl. 1-2. Ultrastruktura Leydigove stanice s dobro razvijenom glatkom endoplazmatskom mrežicom i drugim organelama u citoplazmi.

1.2.2. ULTRASTRUKTURA LEYDIGOVIH STANICA S POREMEĆAJEM SPUŠTANJA TESTISA

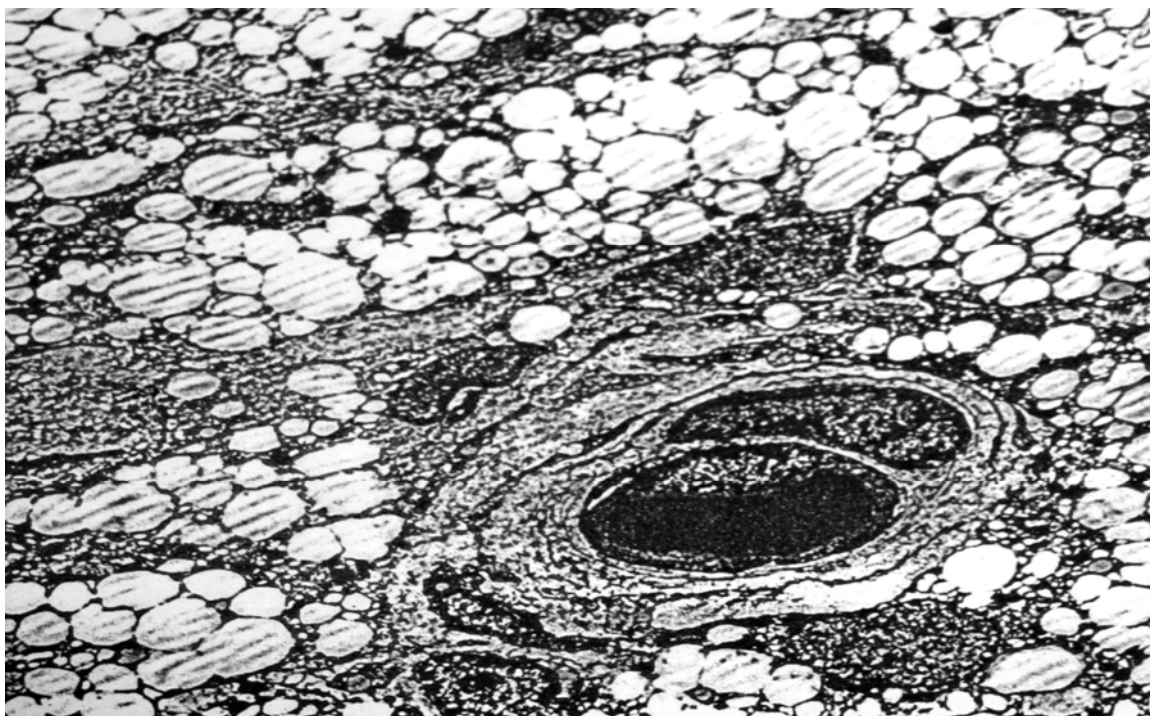
U testisima starih muškaraca treće dobi i u onih s poremećajem spuštanja testisa spermatogeneza je zaustavljena na pojedinim stadijima što dovodi do neplodnosti. Tunika proprija sjemenskih kanalića je zadebljala. Ultrastruktura Leydigovih stanica je vidljivo promijenjena.

Do sada su pronađena četiri patološka tipa Leydigovih stanica (Paniagua i sur. 1985). Najčešće su to dediferencirane Leydigove stanice sa slabo razvijenom endoplazmatskom mrežicom i mitohondrijima (Sl. 1-3). Kod ovog oblika stanica stvaranje steroidogenih hormona je znatno smanjeno.



Sl. 1-3. Dio Leydigove stanice s brojnim Reinkeovim kristalima i slabo razvijenom glatkom endoplazmatskom mrežicom i mitohondrijima kod muškarca starosti 72 godine. Slikano pod povećanjem 22000 x.

Slijedeći često rasprostranjen oblik promijenjenih Leydigovih stanica su jako vakuolizirane Leydigove stanice obogaćene lipidima (Sl. 1-4). Bogato skladištenje lipida nije u cilju proizvodnje testosterona i nastaje zato što kolesterol napušta glatku endoplazmatsku mrežicu, esterificira se i u takvom obliku puni lipidne vrećice (Aoki i Massa 1975). To je pokazatelj slabe funkcionalnosti ovih stanica (Schulze 1984).



Sl. 1-4. Jako vakuolizirane, lipidnim vrećicama obogaćene Leydigove stanice muškarca starosti 84 godine. Slikano pod povećanjem 3350 x.

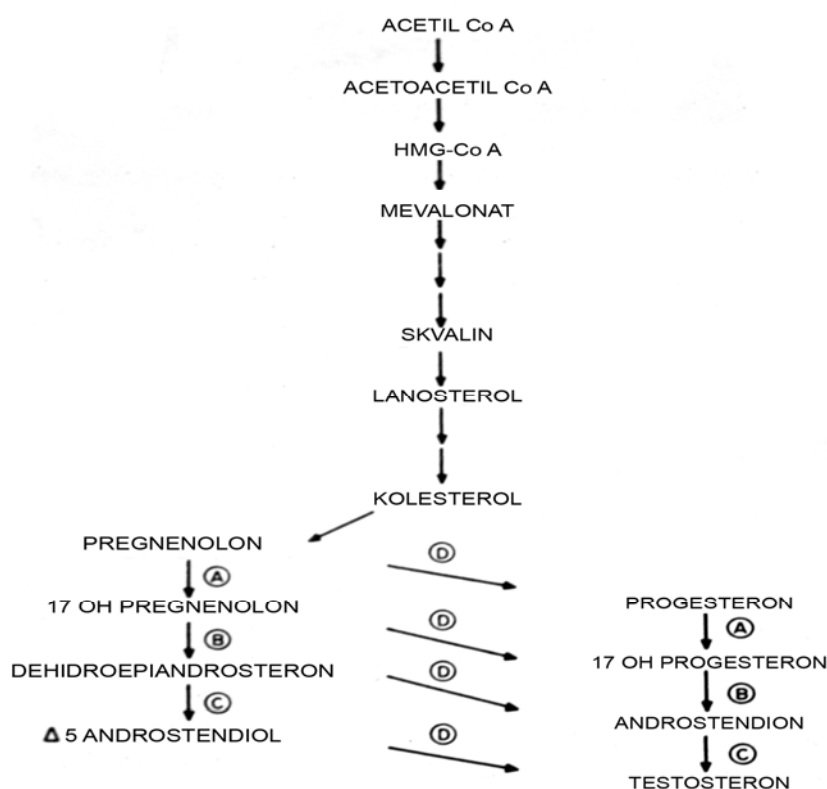
Treći patološki oblik su Leydigove stanice s dvije ili tri jezgre u normalnoj ili dediferenciranoj citoplazmi. Pojava većeg broja jezgara u stanicama testisa muškaraca starije dobi nije karakteristična samo za Leydigove stanice, nego i za Sertolijeve stanice (Schulze i Schulze 1981) i za stanice zametka (Holstein i Hubmann 1980). Uzroci ove pojave još nisu poznati.

Najrjeđi patološki oblik Leydigovih stanica čine stanice s mnogobrojnim citoplazmatskim ili intranuklearnim Reinkeovim kristalima ili parakristalnim inkluzijama. Ove strukture se nalaze prije svega u kriptorhičnim testisima i u testisima muškaraca starije dobi. Ipak, pronađene su i kod nekih primarnih oštećenja testisa, poput Klinefelterovog sindroma (Nistal i Paniagua 1984), ali i kod normalnih testisa muškaraca mlađe dobi (Payer 1980). Neki autori smatraju da porast u broju Reinkeovih kristala i parakristalnih inkluzija kod muškaraca starije dobi ukazuje da su te strukture degenerativni proizvodi, a ne sastojine bitne za proizvodnju testosterona normalnih testisa (Mori i sur. 1978).

1.3. STERIDOGENIČNA AKTIVNOST LEYDIGOVIH STANICA

1.3.1. BIOSINTEZA I NAČIN SEKRECIJE TESTOSTERONA

Biosinteza testosterona Leydigovih stanica provodi se u nekoliko koraka. Počinje acetiliranjem acetil koenzima A, a završava pretvorbom nekoliko različitih intermedijarnih produkata sinteze u testosteron (Sl .1-5).



Sl. 1-5. Shema puteva nastajanja testosterona.

Putevi pretvorbe različitih intermedijarnih produkata biosinteze testosterona prostorno su odvojeni. Lipidne kapljice pohranjuju esterificirani kolesterol za daljnju proizvodnju testosterona. U mitohondrijima se odvija pretvorba kolesterola u pregnenolon. Glatka endoplazmatska mrežica posjeduje enzime ključne za pretvorbu pregnenolona u androgene (Christensen 1975).

U svakom slučaju, najvažniji produkt steroidogene aktivnosti testisa je testosteron. Osim testosterona, testisi proizvode C21 progestin, C19 androgen i C18 estrogen (Ewing i sur. 1977). U skladu s problematikom rada razmatranje je ograničeno na proizvodnju testosterona.

O načinu sekrecije testosterona u proteklim desetljećima dosta se raspravljalo sve do otkrića olakšane difuzije kao jedinog za stanicu isplativog puta sekrecije (Ewing i sur. 1977). On se sastoji u tome da postoji proteinski nosač za testosteron pomoću kojeg testosteron difundira brže i lakše do ciljane stanice ili krvne žile. Proteinski nosač građen je od albumina, a nalazi se u staničnim, izvanstaničnim i kapilarnim prostorima.

1.3.2. REGULACIJA STERIDOGENEZE MUŠKARACA OD NOVOROĐENAČKE DO STAROSNE DOBI

U prethodnom poglavlju napomenuto je da su mjesta biosinteze testosterona prostorno odvojena. No, ona su odvojena i vremenski čime se omogućuje regulacija aktivnosti biosinteze testosterona. Red u prostornoj i vremenskoj odvojenosti postiže se: a) utjecajem regulacijskih molekula, b) različitim izvanstaničnim i unutarstaničnim položajima enzima specifičnih za taj proces, c) vremenskom kontrolom diferencijacije Leydigovih stanica.

Embrionalno razdoblje muškog djeteta obilježeno je diferenciranjem Leydigovih stanica i čitavog muškog spolnog sustava pod djelovanjem testosterona (Ewing i sur. 1980).

Proizvodnja testosterona promatrana od novorođenačke dobi pa sve do predpuberteta dostiže svoj maksimum u 2. mjesecu starosti djeteta (Winter i sur. 1976). Nije dokazano, no pretpostavlja se da testosteron u tom razdoblju djeluje na markiranje određenih tkiva čovjeka za signale testosterona u odrasloj dobi i na razvoj prostate.

U pubertetu, testosteron djeluje na diferencijaciju Leydigovih stanica u intersticiju,

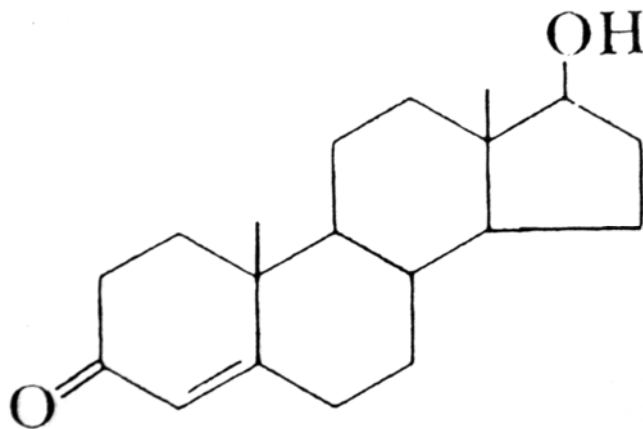
na ispoljavanje sekundarnih spolnih karakteristika, i na spermatogenezu. Maksimum u proizvodnji testosterona nalazi se u dobi od 12 do 17 godine. Testisi muškaraca tijekom faze zrelosti imaju pak maksimum proizvodnje testosterona u trećoj dekadi života (August i sur. 1972).

1.4. BIOKEMIJSKA SVOJSTVA TESTOSTERONA I KEMIJSKA STRUKTURA TESTOSTERONA

Sve vrste somatskih stanica odgovaraju na signalne molekule u izvanvanstaničnoj okolini pomoću receptorskih bjelančevina, i to strogo specifično. Kako u izvanstanični prostor dospijeva mnogo različitih liganda, važno je postojanje morfološke podudarnosti liganda i receptorske molekule, te velikog afiniteta vezanja liganda na receptorsku molekulu.

Testosteron pripada skupini hidrofobnih signalnih molekula koje se razlikuju od hidrofilnih signalnih molekula po topljivosti u vodi. Kao steroidna molekula (Sl.1-6), lako prolazi kroz lipidnu membranu procesom difuzije nakon čega aktivira receptorske bjelančevine unutar stanice (Junqueira, 2005).

Kemijska i fizikalna svojstva ovog hormona su: bijela boja, pri sobnoj temperaturi dolazi u obliku kristala, topljiv je u alkoholu (Pine, 1994).

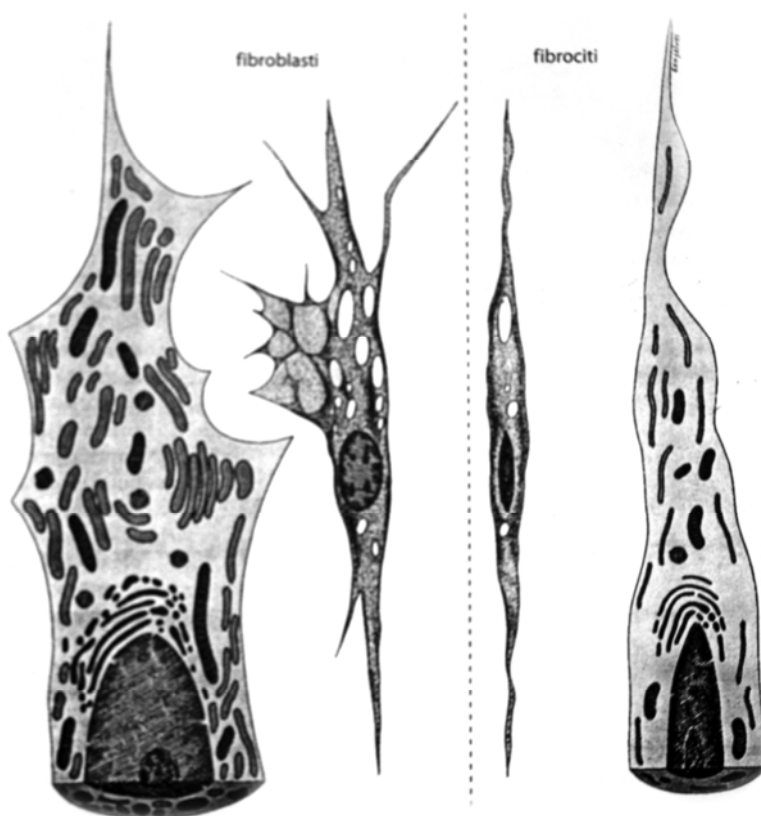


Sl. 1-6. Kemijska struktura testosterona.

1.5. UTJECAJ VELIČINE JEZGRE STANICE NA STANIČNU FUNKCIJU

Da bi se povezao utjecaj veličine jezgre s razinom stanične aktivnosti, uzeti ćemo primjer fibrocita odnosno fibroblasta (Sl.1-6).

To su stanice koje se nalaze u vezivnom tkivu, a uloga im je sinteza kolagena, elastina i ostalih sastojaka međustanične tvari. Nalaze se u dva stadija aktivnosti. U aktivnoj fazi nazivaju se fibroblastima, a jezgre su im ovalne, velike i boje se blijedo te imaju fino raspršeni kromatin i dobro vidljivu jezgricu. Kada su ove stanice u fazi mirovanja jezgre su im izdužene, vretenaste, te manje i tamnije nego kod fibroblasta, a nazivaju se fibrociti (Junqueira, 2005).



Sl. 1-6. Shema fibroblasta i fibrocita.

1.6. TERMINOLOGIJA, OBLICI I UČESTALOST KRIPTORHIZMA

Naziv kriptorhizam izveden je iz grčke riječi "crypto" (skriven) i "orchid" (testis), a upotrebljava se za pojavu nespuštanja testisa (Cortes 1998).

Sve do prve polovice 20. st. pojam kriptorhizam odnosio se na kompletno zaostajanje testisa u abdomenu koje je nemoguće palpirati, tj. laganim potisnućem prema dolje vratiti natrag u skrotum. U drugoj polovici 20. st. kriptorhizam postaje mnogo širi pojam tako da u sebi obuhvaća pet oblika nespuštanja testisa, pa čak i one oblike koje je moguće palpirati. To su: pravi kriptorhizam, nepotpuno funkcionalno spuštanje testisa, nepotpuno spuštanje radi anatomskih razloga, pseudoretencija, te ektopija (Hellinga 1976).

Pravi kriptorhizam je oblik nespuštanja testisa kod kojeg dolazi do potpunog zaostajanja jednog testisa (unilateralni kriptorhizam) ili dva testisa (bilateralni kriptorhizam) unutar abdomena. U oba slučaja nemoguće je palpirati, tj. laganim potisnućem prema dolje vratiti testise u skrotum.

Pseudoretencija je pojava kad nabor peritoneuma ostaje otvoren, a testis nije čvrsto vezan za skrotum. Takav testis lako se vrati u abdomen pomoću refleksa mišića (*musculus cremaster*). Palpiranjem se vraća natrag u skrotum.

Nepotpuno funkcionalno spuštanje testisa događa se kada za to ne postoje anatomske razlozi. Palpiranje se provodi uspješno.

Nepotpuno spuštanje testisa zbog anatomskih razloga javlja se kada testis ne može proći kroz ingvinalni kanal jer je funiculus spermaticus prekratak.

Ektopični testisi se nalaze uz bazu penisa, na perineumu, ili najčešće između kože i vanjskog kosog trbušnog mišića. Nije ih moguće palpirati.

Neka istraživanja pokazuju da je učestalost kriptorhizma kod novorođenčadi 2 – 4%, a kod djece stare jednu godinu oko 1%. Unilateralni kriptorhizam češće je zastupljen (77%) od bilateralnog kriptorhizma kojeg ima 23% muške djece (Barthold i Gonzáles 2004).

Velika je povezanost između kriptorhizma i neplodnosti muškaraca. Nađeno je da je među kriptorhičnim muškarcima njih 3.3 – 8.3 % neplodno (Cortes 1998).

2. CILJ RADA

Kako je kod kriptorhičnih testisa mladih muškaraca često prisutna niža razina testosterona u krvi, a nespušteni testisi nalaze se na višoj temperaturi od one u skrotumu, to je cilj ovog rada bio istražiti slijedeće hipoteze:

- 1) da li kod mladih muškaraca s poremećajem spuštanja testisa dolazi do promjena u veličini jezgara Leydigovih stanica,
- 2) da li se kod muškaraca s poremećajem spuštanja testisa mijenja promjer sjemenskih kanalića.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA TESTISA

Prikupljeni su uzorci biopsija kriptorhičnih testisa petnaestorice muškaraca u dobi od 18 do 27 godina. Kontrolni uzorci tkiva testisa uzeti su od dvojice muškaraca u dobi od 28 i 29 godina koji su poginuli u prometnoj nesreći.

Preparati potječu iz Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. PRIPREMANJE TKIVA TESTISA ZA HISTOLOŠKE ANALIZE

Histološka priprema uzoraka biopsije testisa napravljena je u laboratoriju Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prvo je izvršena fiksacija tkiva u Gendreu, a potom uklapanje u parafin. Debljina rezova histološkog materijala iznosila je 7 μm . Rezovi su obojani hemalaun – eozinom.

3.3. MORFOMETRIJSKA ANALIZA UZORAKA TESTISA

Morfometrijska analiza bioptičkih uzoraka izvršena je na svjetlosnom, binokularnom mikroskopu tvrtke Carl Zeiss pomoću okulara s ugrađenom mikrometarskom skalom.

Mjerenje promjera jezgara Leydigovih stanica izvršeno je s okularom povećanja 10 x te imerzionim objektivom 100/1.25, uz ukupno povećanje od 1000 x .

Promjer sjemenskih kanalića mjeren je pri povećanju objektiva 40/0.25 te ukupnom povećanju 400 x.

Kod svakog pacijenta izmjerena je dužina i širina 40 jezgara Leydigovih stanica. Ukupno je izmjereno 600 jezgara Leydigovih stanica kriptorhičnih testisa. Od toga 300 jezgara obuhvaćalo je promjere jezgara Leydigovih stanica **smještenih uz sjemenske**

kanaliće, dok je 300 jezgara Leydigovih stanica bilo smješteno uz **krvne kapilare** intersticija testisa (tj. podalje od sjemenskih kanalića).

U kontrolnoj skupini izmjereno je ukupno 80 jezgara Leydigovih stanica. Od toga 40 ih je bilo smješteno uz **sjemenske kanaliće**, a 40 podalje od kanalića uz **krvne kapilare**.

Nadalje kod kriptorhičnih testisa izmjeren je duži i kraći promjer kod ukupno 150 sjemenskih kanalića. Kod kontrolne skupine izmjereni su duži i kraći promjer kod 20 sjemenskih kanalića.

3.4. BAŽDARENJE OKULARNOG MIKROMETRA

Okularni mikrometar potrebno je baždariti kako bi se dobivene vrijednosti promjera jezgara Leydigovih stanica i promjera sjemenskih kanalića izrazile u mikrometrima (μm).

Postoje objektni i okularni mikrometar. Objektni mikrometar sadržava na predmetnom staklu ucrtanu duljinu 2 mm, koja je podijeljena na 200 dijelova.

Jedan dio te skale odgovara duljini 10 μm . Okularni mikrometar ucrtan je na staklenoj pločici koju treba uložiti u okular. Na njoj je određena udaljenost podijeljena na manje dijelove.

Baždarenje se provodi tako što se ljestvica objektnog i okularnog mikrometra namjestite tako da se pokrivaju. Zatim se očitavaju dijelovi na skali objektnog mikrometra (a), i izbroji se koliko djelića okularnog mikrometra (b) odgovara broju jedinica objektnog mikrometra. Duljina jednog dijela skale objektnog mikrometra iznosi 10 μm (c). Mjerenje se vrši za svako povećanje mikroskopa posebno.

Vrijednost jedne jedinice u skali okularnog mikrometra (m) računa se prema formuli:

$$m = a \times c / b$$

Prema prethodno navedenoj formuli računaju se vrijednosti m kod pojedinih povećanja:

1. povećanje 3.2 x pred imerzijom

$$a = 5$$

$$b = 5$$

$$c = 10$$

$$m = 10 \times 10 / 5 = 20$$

2. povećanje 10 x pred imerzijom

$$a = 7$$

$$b = 25$$

$$c = 10$$

$$m = 6 \times 10 / 6 = 10$$

3. povećanje 40 x pred imerzijom

$$a = 3$$

$$b = 21$$

$$c = 10$$

$$m = 7 \times 10 / 25 = 2.8$$

4. povećanje 100 x na imerziji

$$a = 3$$

$$b = 21$$

$$c = 10$$

$$m = 3 \times 10 / 21 = 1.4$$

Vrijednosti promjera jezgara Leydigovih stanica prije baždarenja okularnog mikrometra iskazane su u milimetrima. Množenjem tih vrijednosti sa vrijednošću m kod povećanja 100 x na imerziji, dobivaju se vrijednosti promjera jezgara Leydigovih stanica iskazane u mikrometrima (μm).

Vrijednosti promjera sjemenskih kanalića prije baždarenja okularnog mikrometra također su iskazane u milimetrima. Množenjem tih vrijednosti sa vrijednošću m kod povećanja 40 x pred imerzijom, dobivaju se vrijednosti promjera sjemenskih kanalića iskazane u mikrometrima (μm).

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sve dobivene vrijednosti obrađene su statistički. Izračunata je aritmetička sredina ($\bar{X}$), standardna devijacija (s), standardna pogreška (SE) te relativna standardna pogreška (RSE).

Razina značajnosti između dobivenih vrijednosti istraživane i kontrolne skupine određena je Studentovim t – testom.

4. REZULTATI

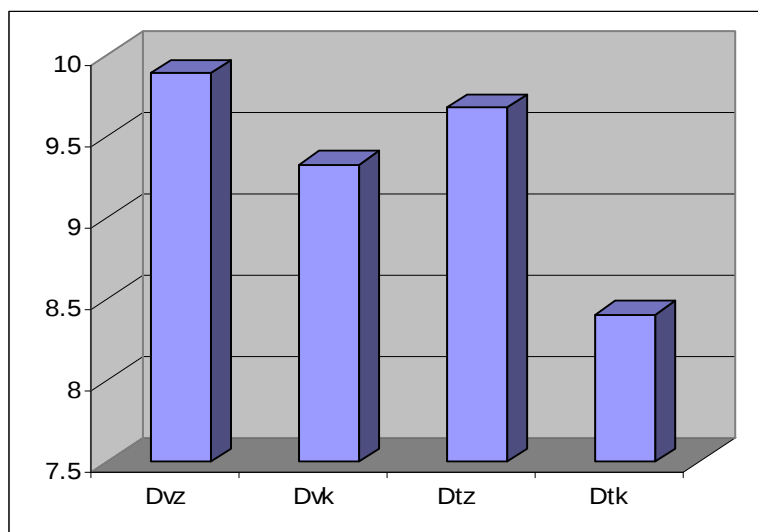
4.1. DUŽINE JEZGARA LEYDIGOVIH STANICA UZ KRVNE ŽILE I UZ SJEMENSKE KANALIĆE

Kod **kriptorhičnih** testisa *dužine jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** (Dvk) bile su značajno manje u odnosu na **zdrave** testise, uz $P < 0.01$ (grafikon 1, tablica 4).

Isto tako *dužina jezgara* Leydigovih stanica **kriptorhičnih** testisa uz **sjemenske kanaliće** (Dtk) bila je također značajno manja od istih vrijednosti **kontrolnih** testisa, $P < 0.01$ (grafikon 1, tablica 4).

Pri tome je najzanimljivije da je *dužina jezgara* Leydigovih stanica **kriptorhičnih** testisa uz **sjemenske kanaliće** (Dtk) bila značajno manja od *dužine jezgara* ovih stanica uz **krvne žile** (Dvk), uz $P < 0.01$ (grafikon 1, tablica 4).

U **kontrolnoj** skupini *dužina jezgara* Leydigovih stanica uz **sjemenske kanaliće** (Dtz) bila je također nešto manja nego *dužina jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** (Dvz). Ova razlika međutim nije bila statistički značajna, $P > 0.05$ (grafikon 1, tablica 4).



Grafikon 1. *Dužine jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** i uz **sjemenske kanaliće** kod **kriptorhičnih** (Dvk i Dtk) te **zdravih** (Dvz i Dtz) testisa.

Tablica 1. Pregled vrijednosti *dužine jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** i uz **sjemenske kanaliće kriptorhičnih testisa** (Dvk i Dtk) u odnosu na **zdrave** ljude (Dvz i Dtz).

	KONTROLA n = 2		KRIPTORHIČNI n = 15	
PARAMETAR	Dvz	Dtz	Dvk	Dtk
X	9.89	9.68	9.33	8.40
s	0.17	0.17	0.55	0.55
SE	0.12	0.12	0.14	0.14
RSE	0.01	0.01	0.02	0.02

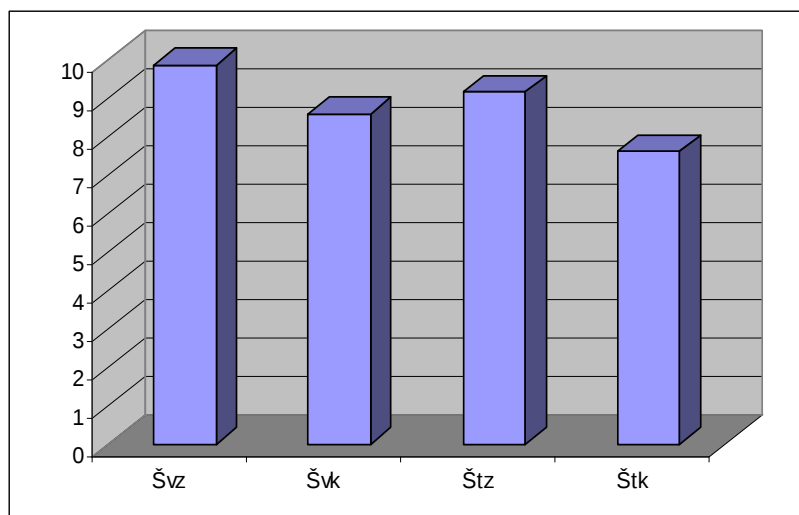
4.2. ŠIRINE JEZGARA LEYDIGOVIH STANICA UZ KRVNE ŽILE I UZ SJEMENSKE KANALIĆE

Kod kriptorhičnih testisa *širine jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** (Švk) bile su značajno manje u odnosu na zdrave testise (Švz), uz $P < 0.01$ (grafikon 2, tablica 4).

Širine jezgara Leydigovih stanica kriptorhičnih testisa uz **sjemenske kanaliće** (Štk) također su bile značajno manje nego kod zdravih testisa (Štz), $P < 0.01$ (grafikon 2, tablica 4).

Širine jezgara Leydigovih stanica uz **sjemenske kanaliće** kriptorhičnih testisa (Štk) bile su značajno manje u odnosu na isti parametar Leydigovih stanica uz **krvne kapilare** (Švk), uz $P < 0.01$ (grafikon 2, tablica 4).

U kontrolnoj skupini *širina jezgara* Leydigovih stanica uz **sjemenske kanaliće** (Štz) bila je također manja nego kod Leydigovih stanica uz **krvne žile** (Švz). Ova razlika je statistički značajna, $P < 0.01$ (grafikon 2, tablica 4).



Grafikon 2. *Širine jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** i uz **sjemenske kanaliće** kod kriptorhičnih (Švk i Štk) te zdravih (Švz i Štz) testisa.

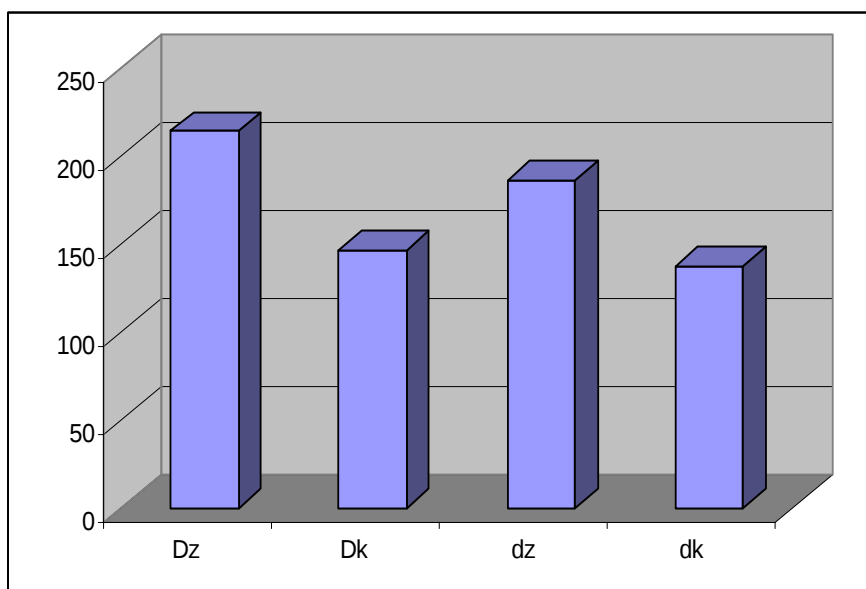
Tablica 2. Pregled vrijednosti *širine jezgara* Leydigovih stanica uz **krvne žile** i uz **sjemenske kanaliće kriptorhičnih testisa** (Švk i Štk) u odnosu na **zdrave** ljude (Švz i Štz).

	KONTROLA n = 2		KRIPTORHIČNI n = 15	
PARAMETAR	Švz	Štz	Švk	Štk
X	9.87	9.16	8.59	7.60
s	0.40	0.12	0.47	0.58
SE	0.28	0.09	0.12	0.15
RSE	0.02	0.01	0.01	0.02

4.3. DUŽI I KRAĆI PROMJER SJEMENSKIH KANALIĆA

Duži promjer sjemenskih kanalića kriptorhičnih testisa (Dk) bio je značajno manji u odnosu na zdrave testise (Dz), uz $P < 0.01$ (grafikon 3, tablica 4).

Također, **kraći promjer sjemenskih kanalića** kod kriptorhičnih testisa (dk) bio je značajno manji u odnosu na zdrave testise (dz), $P < 0.01$ (grafikon 3, tablica 4).



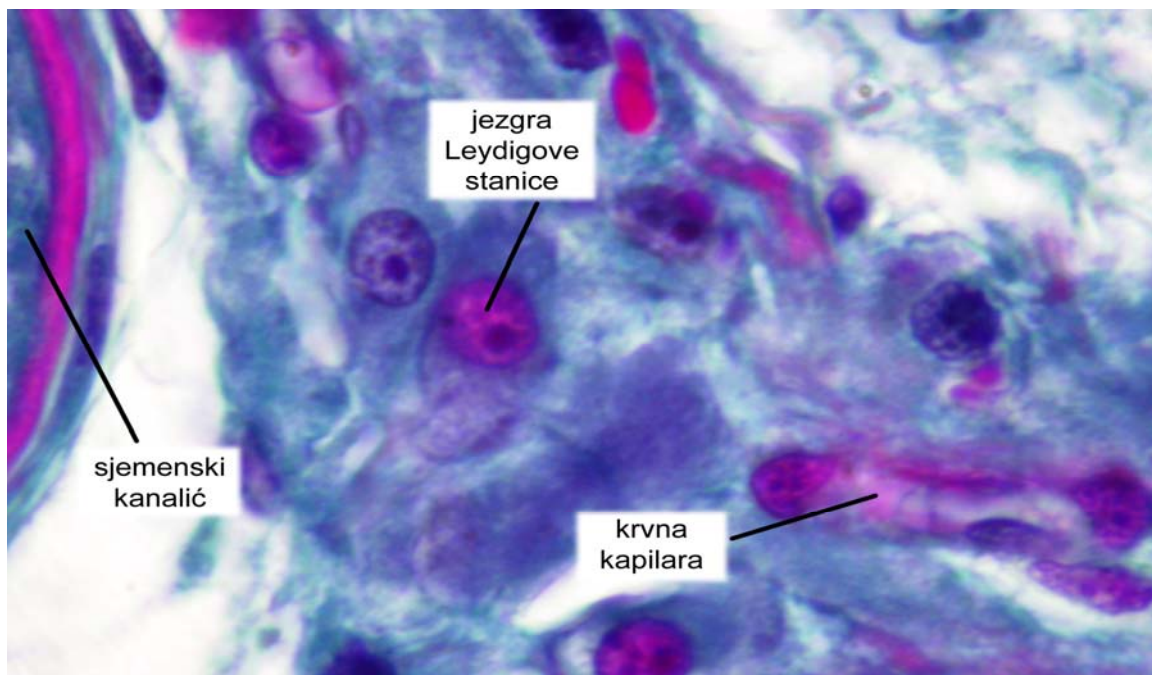
Grafikon 3. **Duži i kraći promjer sjemenskih kanalića** kod kriptorhičnih (Dk i dk) i zdravih testisa (Dz i dz).

Tablica 3. Pregled vrijednosti *dužeg* i *kraćeg promjera* sjemenskih kanalića kod **kriptorhičnih** (Dk i dk) i **zdravih** testisa (Dz i dz).

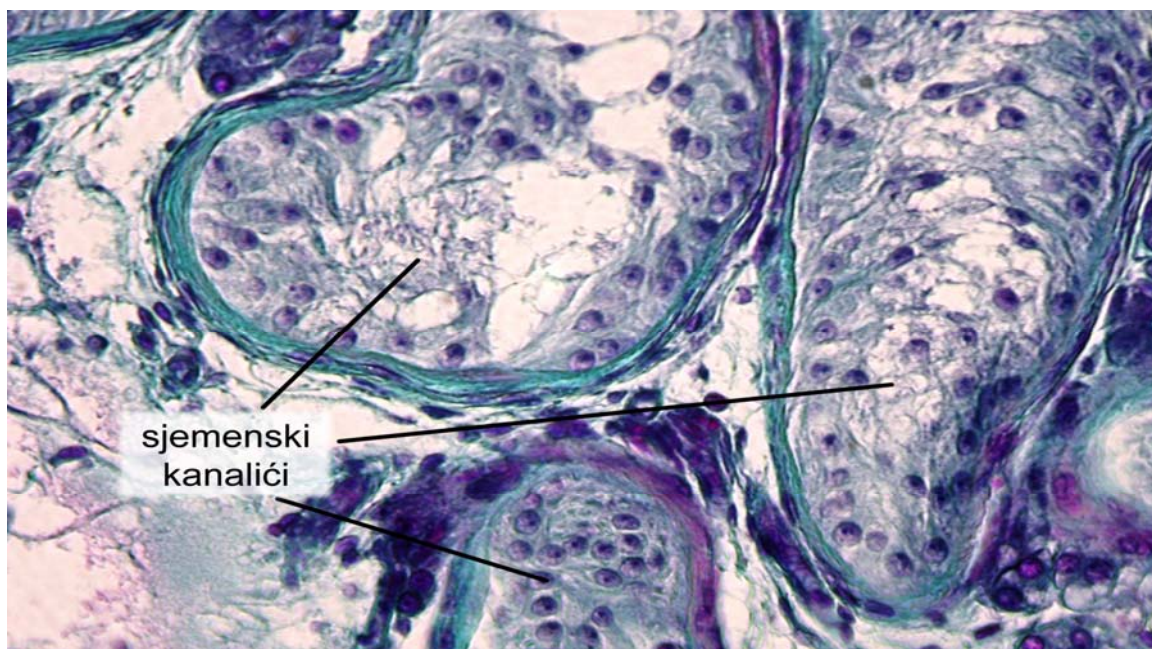
	KONTROLA n = 2		KRIPTORHIČNI n = 15	
PARAMETAR	Dz	dz	Dk	dk
X	214.38	186.1	146.35	137.20
s	4.16	3.70	3.31	6.56
SE	2.94	2.61	0.86	1.69
RSE	0.014	0.014	0.01	0.44

Tablica 4. Pregled razlika aritmetičkih sredina relativnih **morfometrijskih parametara** **kriptorhičnih** testisa prema **kontrolnoj** skupini (**t** - vrijednost **t** – testa, **P** – vjerojatnost).

MORFOMETRIJSKI PARAMETRI	t	P	ZNAČAJNOST RAZLIKE
Dvz u odnosu na Dvk	3.01	< 0.01	značajna
Dtz u odnosu na Dtk	6.86	< 0.01	značajna
Dvk u odnosu na Dtk	4.61	< 0.01	značajna
Dvz u odnosu na Dtz	1.23	> 0.05	nije značajna
Švz u odnosu na Švk	4.17	< 0.01	značajna
Štz u odnosu na Štk	8.91	< 0.01	značajna
Švk u odnosu na Štk	5.08	< 0.01	značajna
Švz u odnosu na Štz	2.46	< 0.01	značajna
Dz u odnosu na Dk	22.23	< 0.01	značajna
dz u odnosu na dk	15.72	< 0.01	značajna



Sl. 4 – 1. Leydigove stanice kod kriptorhičnih testisa uz krvne kapilare. Slikano pod povećanjem 1000 x.



Sl. 4 – 2. Sjemenski kanalići kod kriptorhičnih testisa. Slikano pod povećanjem 1000 x.

5. RASPRAVA

Spuštanje testisa kontrolirano je različitim hormonima ovisno o razdoblju života muškarca. Prva faza ovog procesa je spuštanje unutar abdomena (tzv. transabdominalna migracija). Nastaje tijekom 10 – 15 tjedna trudnoće, a kontrolirana je anti - Müllerovim hormonom (Hutson i sur. 1994). U razdoblju od 26 - 35 tjedna trudnoće dolazi do druge faze spuštanja testisa kroz preponski (ingvinalni) prsten u skrotum (tzv. ingvinoskrotalna migracija) koja je regulirana androgenim hormonima (Hutson i sur. 1994). Smanjenje obje vrste hormona može izazvati kriptorhizam (Hutson i sur. 1994).

Nađeno je također da delecije gena AZT na Y kromosomu mogu biti uzrokom kriptorhizma, dok delecije DAZ gena nemaju ulogu kod pojave kriptorhizma nego izazivaju poremećaj plodnosti muškarca (Ferlin i sur. 2004).

U našem istraživanju ustanovili smo da je došlo do smanjenja promjera jezgara Leydigovih stanica kod kriptorhičnih testisa u mladih muškaraca. Jednaki rezultat kod ljudi sa smanjenjem promjera ovih stanica nađen je do sada samo u testisima muškaraca treće dobi kod kojih je proces starenja doveo do promjena u testisima (Paniagua i sur. 1985).

Studija na ovnovima s bilateralnim kriptorhizmom također je pokazala da se u kriptorhičnim testisima smanjuju promjeri jezgara Leydigovih stanica (Lunstra i Schanbacher 1988).

Već je dugo poznato da Leydigove stanice izlučuju testosteron u krvne kapilare. Odatle ovaj hormon putem krvotoka dolazi do ciljnih organa u cijelom tijelu muškarca. To je endokrina sekrecija Leydigovih stanica. Može se pretpostaviti da spomenuti testosteron izlučuju prije svega Leydigove stanice koje se nalaze u neposrednoj blizini navedenih krvnih kapilara.

Za razliku od toga dio Leydigovih stanica smješten je uz same sjemenske kanaliće. Poznato je da Leydigove stanice dio testosterona koji proizvode predaju sjemenskim kanalićima odnosno Sertolijevim stanicama sjemenskog epitela. To je parakrina sekrecija ovih stanica. Može se pretpostaviti da su upravo te Leydigove stanice uz sjemenski kanalić one koje izlučuju i predaju testosteron Sertolijevim stanicama.

U dosadašnjim istraživanjima promjera jezgara Leydigovih stanica kod kriptorhizma nisu zasebno analizirane ove stanice u odnosu na njihov smještaj uz krvne kapilare odnosno uz

sjemenski kanalić. Kako različito smještene Leydigove stanice imaju različitu funkciju, moguće je pretpostaviti da će njihovo oštećenje kod kriptorhizma biti različito.

U našem istraživanju su po prvi puta zasebno proučavani promjeri jezgara Leydigovih stanica uz sjemenski kanalić u odnosu na ove stanice smještene uz krvne kapilare intersticija. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su promjeri jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće značajno smanjeni u odnosu na isti parameter ovih stanica uz krvne žile. To pokazuje da je funkcija ovih stanica uz sjemenski kanalić jače poremećena u odnosu na iste stanice uz krvne kapilare. To bi značilo da je kod kriptorhičnih testisa mladih muškaraca značajno poremećena parakrina funkcija Leydigovih stanica dok je njihova endokrina funkcija relativno bolje očuvana.

Uzrok smanjenja promjera jezgara Leydigovih stanica kod kriptorhičnih testisa najvjerojatnije je njihovo smanjeno izlučivanje testosterona. Možemo pretpostaviti da upravo zbog njihove smanjene aktivnosti sekrecije dolazi do smanjenja veličine njihove jezgre, pa tako i njezina promjera. Sličnu pojavu nalazimo i kod jezgara drugih vrsta stanica koje su u različitom funkcionalnom stanju npr. fibrociti u odnosu na aktivne fibroblaste. Zanimljivo je da je testosteron pored toga što je sekretni produkt Leydigovih stanica ujedno i signalna molekula koja potiče sintezu toga hormona (Hadžiselimović 1977).

Naša morfometrijska mjerenja pokazala su smanjenje promjera sjemenskih kanalića kod kriptorhičnih testisa. I drugi autori također su našli da kod 83% odraslih muškaraca s kriptorhizmom sjemenski kanalići imaju oštećenu spermatogenezu koju prati i znatno smanjenje njihova promjera. Za razliku od toga, u 17 % bolesnika spermatogeneza je normalna uz neznatno smanjenje promjera sjemenskih kanalića (Guminska i sur. 2007).

Spomenuto smanjenje promjera sjemenskih kanalića izazvano je previsokom temperaturom kod kriptorhičnih testisa u odnosu na normalnu temperaturu testisa koji se nalazi u skrotumu. Pri povišenoj temperaturi spermatogeneza je gotovo zaustavljena, tj. proces spermatogeneze završava stvaranjem spermatogonija. Kao posljedica ovog izrazito smanjenog broja stanica sjemenskog epitela, smanjuje se i promjer sjemenskih kanalića.

6. ZAKLJUČAK

Morfometrijskom metodom mogu se precizno odrediti kvantitativne razlike promjera jezgara Leydigovih stanica i sjemenskih kanalića zdravih te kriptorhičnih testisa. Upotrebom ove metode ustanovljeno je slijedeće:

- kod kriptorhičnih testisa u odnosu na zdrave ljude značajno se smanjuje promjer jezgara Leydigovih stanica uz krvne žile ($P < 0.01$)
- pri tom je kod istraživane skupine promjer jezgara Leydigovih stanica uz sjemenske kanaliće značajno manji od promjera jezgara onih stanica uz krvne žile ($P < 0.01$)
- kod kriptorhičnih testisa promjer sjemenskih kanalića je značajno smanjen u odnosu na testise zdravih ljudi ($P < 0.01$)

7. POPIS LITERATURE

Aoki A., Massa E. M. (1975): Subcellular compartmentation of free and sterified cholesterol in the interstitial cells of the mouse testis. *Cell Tiss Res.* 165: 49 – 62.

August G. P., Grumbach M. M., Kaplan S. L. (1972): Hormonal changes in puberty: III. Correlation of plasma testosterone , LH, FSH, testicular size and bone age with male pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 319.

Barthold J., Gonzáles R. (2003): The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchiopexy. *J. of Urol.* 6: 2396 – 2401.

Cortes D. (1998): Aspects of pathogenesis, histology, and treatment of chryptorchidism. *J. Urol. Nephrol. Suppl.* 3: 1 – 54.

Christensen A. K. (1975): Leydig cells. U: Greep R. O., Astwood E. B. *Handbook of Physiology. Endocrinology.* Washington D.C., V American Physiological Society, str. 57.

Ewing L. L., Brown B. L. (1977): Testicular steroidogenesis. U: Johnson A. D., Gomes W. R. *The testis.* New York, Academic Press, str. 239.

Fawcett D. W. (1973): Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Adv. Biosci.* 10: 83.

Ferlin A., Foresta C., Moro E., Gavolla A., Onista M. (1999): Y Chromosome Microdeletions in Cryptorchidism and Idiopathic Infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 : 3660 – 3665.

Guminska A., Slowikowska – Hilcer, Kuzanski W., Sosnowski M., Ozukowska E., Marchlevska K., Walczak – Jedrzejowska, Niedzielski J., Kula K. (2007): Features of impaired seminiferous tubule differentiation are associated with germ cell neoplasia in adult men surgically treated in childhood because of cryptorchidism. *Folia Histochem. Cytob.* 45: 163 – 168.

- Hadžiselimović F., Girard J. (1977): Pathogenesis of cryptorchidism. *Horm. Res.* 8 : 76 – 83.
- Hellinga G. (1976): Clinical andrology. William Heineman Medical Books LTD, London, str. 233.
- Holstein A. F., Hubmann R. (1980): Spermatogonia in old age. *Adv. in Androl.* 7: 77.
- Hutson J., Baker M., Terada M., Zhou B., Paxtru G. (1994): Hormonal control of testicular descent and the cause of cryptorchidism. *Reprod., Fertil., Devel.* 6: 151 – 156.
- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelly R. O. (2005): Osnove histologije. Školska knjiga, Zagreb.
- Kaler L. W., Neaves W. B. (1978): Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat. Rec.* 192: 513.
- Lunstra D. D., Schanbacher B. D. (1988): Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long – term bilaterally cryptorchid rams. *Biol. of Reprod.* 38: 211 – 220.
- Mori H., Fukunishi R., Fujii M., Hataji K., Shiraishi T., Matsumoto, K. (1978): Stereological analysis of Reinke's crystals in human Leydig cells. *Virchows Archiv* 380: 1 -9.
- Nistal M., Paniagua R. (1984): Hypogonadism due to primary testicular failure. U: *Testicular and Epididymal Pathology*. New York, Thieme – Stratton Inc., str. 145 – 167.
- Paniagua R., Amat P., Nistal M., Martin A. (1986): Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes, *J. Anat.* 146: 173 – 183.
- Payer A. F. (1980): Ultrastructural classification of paracrystalline inclusions untreated and estrogen treated human Leydig cells. *Anat. Rec.* 198: 175 – 182.
- Pine C. (1994): Organska kemija. Školska knjiga, Zagreb.
- Schulze C. (1984): Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv. in Anat., Embriol., Cell Biol.* 88: 1 – 104.

Schulze W., Schulze C. (1981): Multinucleate Sertoli cells in aged human testis. *Cell Tiss Res.* 217: 259 – 266.

Winter J. S. D., Hughes I. A., Reyes F. I., Faiman C. (1976): Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42: 679.