Archive of SID

مقاله پژوهشی

بررسی فیلامان‌های ویمنتین سلول‌های سرتولی در بیماران نابارور مرد بوسیله روش‌های ایمونوهیستوشیمی

دکتر مجتبی کریمی پور [1]، دکتر مهرداد بختیاری [2]، دکتر مسعود عزت آبادی پور [3]

چکیده

پیش زمینه و هدف: فیلامان حد واسط ویمنتین در سلول‌های سرتولی بالغ به‌عنوان جزء اصلی اسکلت سلولی است. بررسی کیفیت و نحوهٔ توزیع آن در داخل سلول‌های سرتولی در بیماران نابارور می‌تواند نشان دهنده وضعیت بلوغ و عملکرد طبیعی این سلول‌ها برای فرآیند اسپرم سازی باشد. بنابراین در این تحقیق وضعیت فیلامان‌های ویمنتین در سلول‌های سرتولی بیماران نابارور آزواسپرمی غیر انسدادی به‌وسیله روش‌های ایمونوهیستوشیمی مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰ نمونه از بیوپسی بافت بیضه از بیماران نابارور آزواسپرمی غیرانسدادی مراجعه کننده به پژوهشکده رویان به‌عنوان گروه بیماران و تعداد ۵ نمونه بافت بیضه طبیعی از بیماران مبتلا به کانسر پروستات مراجعه کننده به بخش‌های ارولوژی بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. پس از انجام مراحل پردازش بافتی، بلوک‌هایی از پارافین تهیه و فیلامان حد واسط ویمنتین در سلول‌های سرتولی به‌وسیله روش‌های ایمونوهیستو شیمی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: به‌طورکلی واکنش سلول‌های سرتولی به آنتی ویمنتین در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد از شدت بیشتری برخوردار بود و محل تجمع آنها بیشتر در قسمت قاعده سلول در زیر هسته سلول سرتولی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که نحوه توزیع فیلامان‌های ویمنتین در سلول‌های سرتولی تمامی بیماران مورد مطالعه متفاوت از حالت طبیعی است، که موید یک سلول سرتولی نابالغ غیر طبیعی است که خود می‌تواند توجیه کننده اختلالات اسپرم‌سازی در بیماران مورد مطالعه باشد.

گل‌واژگان: سلول سرتولی، ویمنتین، آزواسپرمی غیر انسدادی، ایمونوهیستو شیمی

مجله پزشکی ارومیه ، سال چهاردهم ، شماره اول ، ص ۱۹ - ۱۳ ، بهار ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی ارومیه – دانشکده پزشکی – گروه علوم تشریح - دکترمجتبی کریمی پور

۱- استادیار گروه علوم تشرح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۲- استادیار گروه علوم تشرح دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۳ – استادیار گروه علوم تشرح، دانشگاه علم پزشکی کرمان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اعتقاد بر این است که سلول‌های سرتولی[1] دارای یک نقش کلیدی در تنظیم فرآیند اسپرماتوژنسیس[2] هستند. تغییرات فوق ساختمانی متعددی در رابطه با اختلال در اسپرم‌سازی در سلول‌های سرتولی گزارش شده است. تغییرات شکل هسته مانند کاهش چین‌خوردگی آن که در توقف اسپرماتوژنسیس[3] و یا سندرم وجود سلول سرتولی به‌تنهائی[4] دیده می‌شود، نمونه آن می‌باشد (۱و۲).

در سلول‌های سرتولی انسان و رت پیش از بلوغ، پروتئین‌های فیلامان‌های حد واسط[5] ویمنتین[6] و سایتوکراتین[7] هر دو دیده می‌شود. در رت فیلامان سایتوکراتین تا ۱۴ روز بعد از تولد دیده می‌شود ولی انسان در طی تکامل پیش از بلوغ ناپدید و فیلامان حد واسط اصلی در این سلول‌ها در افراد بزرگسال ویمنتین خواهد بود. واکنش سیتوکراتین مثبت سلول‌های سرتولی در افراد بالغ در اختلالاتی نظیر توقف اسپرم سازی در سطح اسپرماتوگونی گزارش شده است که بیان کننده یک سرتولی تمایز نیافته است (۳و۴).

نقش اسکلت سلولی در تعیین و حفظ شکل سلول مهم به‌نظر می‌رسد علاوه بر آن اسکلت سلولی سلول سرتولی دارای یک نقش مهم در فرآیند اسپرم سازی است (۵).

مطالعات انجام شده بر روی اسکلت سلولی سلول‌های سرتولی عمدتاً بررسی اکتین بوده است، در حالی‌که جزء اصلی این اسکلت در این سلول‌ها در افراد بالغ ویمنتین است (۶). گزارشات متعددی دال بر وجود این نوع فیلامان در سلول‌های سرتولی انسان، رت و خوک وجود دارد که نشان‌دهنده منشاء مزانشیمی این سلول‌ها است (۷).

با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی برای ویمنتین می‌توان شکل سلول سرتولی و نحوه توزیع آن را ارزیابی کرد. مطالعات نشان داده که سلول‌های مذکور محتوی فیلامان‌های حد واسط با اندازه ۱۱ – ۷ نانومتر هستند که تشکیل یک شبکه را می‌دهند که در سرتاسر سیتوپلاسم گسترش یافته‌اند (۸).

تاکنون مطالعات اندکی بر روی محتوی فیلامان‌های حد واسط سلول‌های سرتولی در انسان انجام شده است. در یک مطالعه، توزیع ویمنتین در افراد طبیعی و بیماران با سندرم وجود سلول سرتولی به تنهائی و بیماران با نقص در بلوغ اسپرماتید انجام شده و نتایج حاصل از مطالعه مذکور نشان می‌دهد که سلول سرتولی، تنها سلولی است که با آنتی‌ویمنتین واکنش نشان می‌دهد به‌طوریکه واکنش آن شدیدتر است و شدت واکنش ویمنتین در سلول نسبت مستقیم با ضخامت غشاء پایه دارد (۹).

از مطالعات دیگردر این‌خصوص مطالعه استگر[8] وهمکاران درسال۱۹۹۶ است که مارکرهای ایمونوهیستوشیمی ویمنتین و سیتوکراتین را برای تشخیص سلول‌های سرتولی نابالغ بکار بردند و نتایج حاصله از آنها، تا حدود زیادی مشابه با مطالعه قبلی است (۷).

نکته قابل توجه در مطالعات انجام شده قبلی این است که اولاً نمونه‌های مورد بررسی نمونه‌های حیوانی بوده است و در نمونه‌های انسانی بیماران مورد مطالعه بیمارانی بوده‌اند که وجود اسپرم در بافت بیضه آنها مد نظر نبوده است. لذا با توجه به مطالب فوق و عدم انجام مطالعات ایمونوهیستوشیمی کافی، سلول‌های سرتولی در افراد نابارور آزواسپرمی غیر انسدادی[9] که وجود اسپرم در بافت بیضه آن محرز باشد بر آن شدیم تا وضعیت بلوغ و تمایز سلول‌های فوق و همچنین چگونگی توزیع فیلامان‌های

1 . Sertoli
2 . Spetmatogenesis
3 . Spetrmatogenesis arrest
4 . Sertoli cell only
5 . Intermediat Filament
6 . Vimentin
7 . Cytokeratin
8 . Steger
9 . Non – Obstructive Azoospermia

www.SID.ir

Archive of SID

ویمنتین موجود در این سلول‌ها را مورد بررسی قرار دهیم و با بافت‌های طبیعی مورد مقایسه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بافت بیضه مورد بررسی در این مطالعه از تعداد ۱۰ نفر مردان نابارور با تشخیص آزواسپرمی غیر انسدادی مراجعه کننده به درمانگاه ناباروری پژوهشکده رویان وابسته به جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران تهیه شد. علت مراجعه این بیماران انجام TESE[1] و ICSI [2] برای درمان ناباروری بوده است. قبل از انجام درمان، آزمایش‌های هورمونی و آنالیز مایع منی برای آنها انجام می شد و تشخیص آزواسپرمی غیر انسدادی محرز می‌شد. در ضمن نمونه‌های بافتی تهیه شده، نمونه هایی بودند که برای فرآیند درمان ناباروری افراد مراجعه کننده بود و باقی مانده آن پس از درمان، برای مطالعه در نظر گرفته می شد و قبل از انجام مطالعه نیز اجازه لازمه از بیماران کسب می شد.

برای تهیه نمونه‌های بافت بیضه طبیعی، با بخش ارولوژی بیمارستان‌های وابسته به‌دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی هماهنگی لازم به‌عمل آمد تا از نمونه بیضه‌برداری[3] بیماران کانسر پروستات، نمونه لازم تهیه شود. لازم به تذکر است که نمونه بافت طبیعی از افرادی تهیه می‌شد که در بافت بیضه آنها هیچگونه مشکلی نداشتند بلکه بیضه‌برداری آنها تنها بدلیل کانسر پروستات وابسته به آندوژن بود. برای حصول اطمینان از طبیعی بودن بافت فوق ابتدا از نمونه‌های تهیه شده، لام‌هایی با رنگ آمیزی H&E تهیه و طبیعی بودن اسپرم سازی در آنها مورد تائید قرار می‌گرفت. بعد از تهیه نمونه از دو گروه (افراد طبیعی و بیماران) آنها را در داخل ماده فیکساتیو بوئن قرار داده و بعد از مراحل پردازش بافتی، بلوک‌های پارافینی تهیّه شد و برشهائی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و روی لام‌های مخصوص که دارای چسب لیزین بود قرار داده شد. بعد از تهیه لام مورد نظر، مراحل ایمونوهیستو شیمی برای مطالعه فیلامان حد واسط ویمنتین موجود در سلول سرتولی انجام شد. آنتی بادی و سایر مواد لازم جهت انجام مراحل ایمونوهیستوشیمی از شرکت داکو[4] ساخت کشور آمریکا بود. پروتکل مراحل انجام مطالعه از بروشور کتابچهٔ شرکت سازنده مواد استخراج شد که این مراحل به ترتیب زیر بود. محل انجام مراحل ایمونوهیستوشیمی بخش پاتولوژی بیمارستان بقیه‌الله (عج) بود. قبل از انجام مراحل هفت‌گانه، ابتدا لام‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در فور ۳۷ درجه سانتیگراد نگه‌داری می‌شد و سپس با استفاده از گزیلل و الکل اتانل به‌ترتیب پارافین‌زدائی و آبدهی انجام شد.

مرحله اول: ریختن مقدار کافی هیدروژن پروکسید ۳٪ (H_2O_2) بر روی سطح نمونه به‌طوریکه تمامی سطح نمونه را بپوشاند به‌مدت ۳۰ دقیقه و بعد به آرامی با بافر PBS شستشو انجام شد. در هنگام شستشو بایستی دقت کرد که بافر مستقیماً بر روی سطح نمونه ریخته نشود چون سبب کنده شدن آن می‌گردد.

مرحله دوم: ریختن مقدار کافی (۳۰ میکرو لیتر) آنتی‌بادی اولیه (آنتی ویمنتین) بر روی نمونه به‌طوریکه تمامی‌سطح نمونه را بپوشاند و به‌مدت ۶۰ – ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و بعد شستشو با بافر.

مرحله سوم: استفاده از بیوتینیلیتید لینک[5] است که به‌صورت ریختن مقدار لازم لینک آنتی‌بادی[6] زرد رنگ بر روی نمونه، که به‌مدت ۳۰ – ۱۰ دقیقه است و بعد شستشو با بافر.

مرحله چهارم: استفاده از استرپتاویدین -HRP[7] قرمز رنگ بر روی نمونه به‌مدت ۳۰- ۱۰ دقیقه و بعد شستشو با بافر.

1. Testicular sperm Extraction
2. Intracytoplasmic sperm injection
3. Orchidectomy

4. Dako
5. Biotinylated Link
6. Link Antibody
7. Sterptavidin - HRP

www.SID.ir

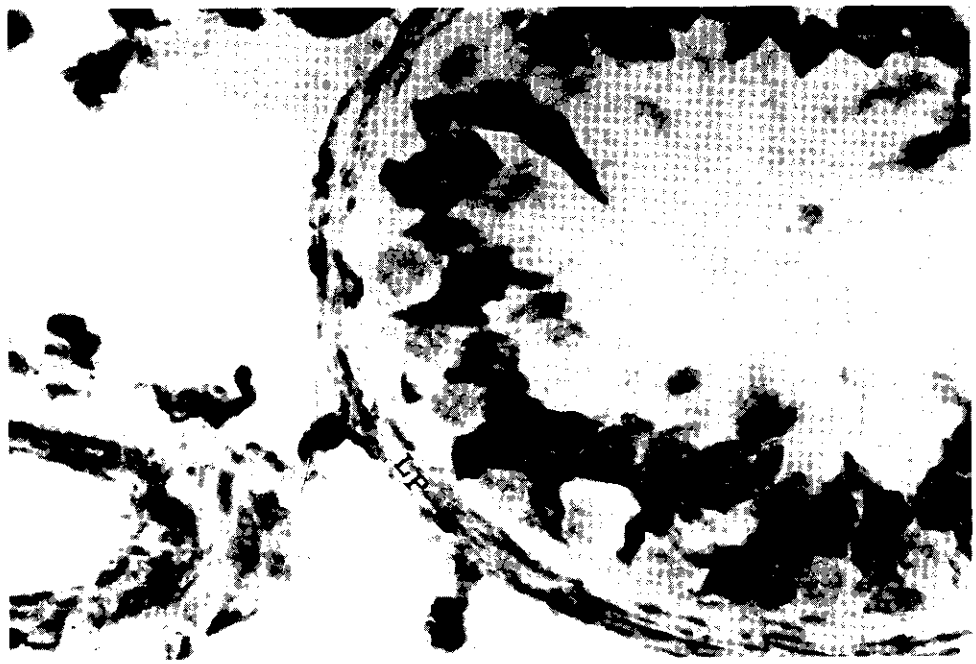
Archive of SID

تصویر شماره ۱: واکنش سلول‌های سرتولی به آنتی‌ویمنتین در یک نمونه نرمال که به‌صورت نواحی تیره مشخص شده است. بزرگنمایی ۱۰۰ ×

تصویر شماره ۲: واکنش سلول‌های سرتولی به آنتی‌ویمنتین در یک نمونه بیمار. شدت واکنش نسبتاً زیاد شده است. بزرگنمایی اصلی ۱۰۰×

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۳: مقطع یک لوله منی ساز در یک‌نمونه بیمار که فیلامان‌های ویمنتین بیشتر در قسمت قاعده هسته سلولی سرتولی تجمع یافته‌اند. بزرگنمایی اصلی ۴۰۰ ×

مرحله پنجم: ریختن مقدار کافی محلول کروموژن بود (این محلول را بایستی در حرارت ۸ – ۲ درجه سانتیگراد نگه‌داری کرد) که به‌مدت ۱۰ دقیقه بود و بعد از آن شستشو با آب مقطر.

مرحله ششم: رنگ‌آمیزی زمینه با استفاده از هماتوکسیلین به‌مدت ۵ – ۲ دقیقه و بعد شستشو با آب مقطر.

مرحله هفتم: مونتیگ[1] است که با استفاده از داکوگلیسروژل[2] یا داکو فارامونت[3] انجام می شد.

نتایج

در گروه شاهد سلول های سرتولی موجود در لوله‌های منی‌ساز به آنتی ویمنتین واکنش نشان دادند و نقاط واکنش به‌رنگ قهوه‌ای تیره بود (تصویر شماره ۱). در گروه بیماران مورد مطالعه، واکنش سلول‌های سرتولی به آنتی ویمنتین نیز به‌صورت مناطق تیره رنگ بود (تصویر شماره ۲). ولی تفاوتی که با گروه کنترل داشت در شدت واکنش و محل توزیع آن بود، به‌طوریکه این واکنش در گروه بیماران شدیدتر از گروه کنترل بود و محل توزیع و تجمع آنها در اطراف هسته و هم‌چنین در ناحیه زیر هسته سرتولی بود . (تصویر شماره ۳).

بحث

سلول‌های سرتولی عملکردهای متفاوت و مهمی را انجام می‌دهند. این سلول‌ها با ایجاد یک حمایت تغذیه‌ای و مکانیکی برای سلول‌های اسپرماتوژنیک و هم‌چنین مسئولیت اصلی در حفظ و تشکیل سد خونی - بیضه‌ای، به‌عنوان سلول اصلی در

1. Mounting
2. Dako Glycerogel
3 . Dako Faramount

www.SID.ir

Archive of SID

فیزیولوژی طبیعی بیضه است. بنابراین مطالعه جنبه‌های مختلف بافت شناسی آن امری مهم تلقی می‌شود (۱۰ و ۱۱).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج بسیاری از مطالعات قبلی همسوئی دارد. امولر[1] و همکاران در سال ۱۹۸۸ گزارش دادند که فیلامان ویمنتین در اطراف هسته تمرکز بیشتری دارد آنها هم‌چنین عنوان کردند که مطالعات ایمونوهیستوشیمی برای ویمنتین در سلول‌های سرتولی می‌تواند به‌عنوان یک مارکر قابل اعتماد در توصیف شکل سلول سرتولی باشد (۱۲). مطابق مطالعات لی - زو[2] و همکاران، فیلامان‌های ویمنتین علاوه بر اطراف هسته در قسمت قاعده سلول نیز تجمع دارند که در لنگر انداختن سلول بر روی دیواره لوله‌های منی ساز نقش دارند. محققین مذکور عنوان کردند که فیلامان‌های موجود در قسمت راس سلول ممکن است در حمایت اسپرماتیدها نقش داشته باشند (۱۳).

نحوه توزیع فیلامان‌های ویمنتین در مطالعه حاضر به‌صورت تجمع در قسمت قاعده سلول بدون توزیع طبیعی در اطراف هسته بود و شدت واکنش نیز افزایش یافته بود که با نتایج مطالعه ترادا[3] و همکاران در سال ۱۹۹۱ مطابقت می‌نماید. محققین مذکور نحوه توزیع ویمنتین را در بیماران سندرم وجود سلول سرتولی به تنهایی را مورد مطالعه قرار داده بودند و عنوان کردند که توزیع ویمنتین در این بیماران محدود به قسمت بازال در زیر هسته است. این نحوه توزیع ویمنتین مشخصه سلول‌های نابالغ جنینی است. بنابراین شاید بتوان اختلالات اسپرم سازی بیماران مورد مطالعه را به سلول‌های سرتولی آنها نسبت داد. مطالعات فوق ساختمانی سلول‌های فوق به‌وسیله میکروسکوپ الکترونیکی در قسمت دیگر تحقیق نشان داد که سلول‌های مذکور از نظر شکل ظاهر هسته و هستک خصوصیت یک سلولی سرتولی نابالغ قبل از بلوغ را داشتند (۱٤). علاوه بر آن ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز بیماران مورد مطالعه کاملاً ضخیم شده بود (۱۵). برخی از محققین عنوان کرده‌اند که شدت واکنش سلول‌های سرتولی به ویمنتین نسبت مستقیم با ضخامت غشاء پایه آنها دارد (۱٦).

مطالعات انجام شده بوسیله تونگ[4] و همکاران در سال ۱۹۸۰ نشان داد که شکل سرتولی رشد یافته در محیط کشت، وابسته به‌حضور مادهٔ زمینه‌ای خارج سلولی است و سلول‌های سرتولی رشد داده شده در اینویترو[5] در عدم حضور ماده زمینه‌ای خارج سلولی هرگز به‌صورت یک سلول منشوری شکل طبیعی نبودند بلکه شکل سلول به‌صورت یک سلول پهن و پلی‌گونال[6] بود و محتوی ویمنتین آنها فاقد نظم معمول بود (۱۷). ممکن است اختلالات در ماده زمینه‌ای خارج سلولی بافت بیضه افراد نابارور مورد مطالعه در این تحقیق باعث توزیع غیرطبیعی ویمنتین شده است. لازم به‌تذکر است که اختلال در ماده زمینه‌ای خارج سلولی بافت بیضه در افراد مورد مطالعه در یک مطالعه دیگر به‌وسیله نویسندگان مقاله حاضر نشان داده شده (۱۵).

این نحوه توزیع فیلامان‌های ویمنتین در سلول‌های سرتولی مورد مطالعه همراه با سایر تغییرات فوق ساختمانی آن، همگی می‌توانند دلیل اختلالات اسپرم سازی در بیماران نابارور مورد مطالعه باشد.

نکته دیگر اینکه، در مطالعات دیگر، علاوه بر مطالعه ویمنتین، فیلامان‌های سایتوکراتین را در سلول‌های سرتولی به‌وسیله روش‌های ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار داده‌اند و عدم واکنش سلول‌های مذکور به این آنتی‌بادی نیز می‌تواند مؤید یک سلول سرتولی بالغ و طبیعی باشد. ولی متاسفانه

1. Aumuller
2. Li - Zhu
3. Terada
4. Tung
5. In - vitro
6. Polygonal

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دلیل عدم دسترسی به این آنتی‌بادی، انجام آن میسر نشد. بنابراین ما پیشنهاد می‌کنیم تا محتوی سایتوکراتینی این سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان به‌طور قاطع در مورد وضعیت بلوغ و تمایز سلول‌های سرتولی اظهارنظر کرد.

Referneces:

1. Shira MB, Paz G, Elliot DJ: Maturation phenotype of sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. Human Reprud, 2000, 15(7): 1533-1542.
2. Terada T, Hatakeyama S: Morphological evidence for two types of idiopathaic sertoli – cell – only syndrome. J Androl, 1991, 14: 117-126.
3. Bergman M, Kliesch S: The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular biopsies of infertile men. Anat Embryol, 1994, 190: 515-520.
4. Paranko JM, Kallajoki M, Virtanen J: Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat sertoli cells. Dev Biol, 1986, 117:35-44.
5. Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A: Altered distribution of sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. J Pediatr Surg, 2002, 37(4): 648-652.
6. Stosiek P, Kasper M, Karsten U: Expression of cytokeratins 8 and 18 in human sertoli cells of immature and atrophic seminiferons tubules. Differentiation, 1990, 43: 66-70.
7. Steger. K: Immunohistochemical detection of immature sertoli cell markers in testicular tissue of adult men. J Androl, 1994: 122-128.
8. Frank W, Grund C: Intermediate sized filaments present in sertoli cells are of the vimentin type. Eur J cell Biol, 1979, 19: 269-275.
9. Aumuller G: Distribution of vimentin type intermediate filaments in sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. Anat Embryol, 1988, 178: 129-136.
10. Skinner MK: Cell-cell intractions in the testis. Endocrine Reviews, 1991, 12: 45-77.
11. Schulze Cornelia: Sertoli cell and leydig cell in man. Second Edition, New York Chapman and Hall, 1994: 768-798.
12. Aumuller G, Viebahn C: Intermediate filaments in sertoli cells. Microsc Res Tech, 1992, 20(1): 50-72.
13. Li Z, Shu Dz, David M: Changes in the distribution of intermediate filaments in rat sertoli cells during the seminiferous epithelium cycle and postnatal development. Anat Rec, 1997, 248: 391-405.
14. Karimipour M, Hosseini A, Rezazadeh M: Ultrastructural analysis of sertoli and myoid cells in non – obstructive azoospermia men admitted to TESE – ICSI. Yakhteh Med J, ,2002, 4(10): 125-220.
15. کریمی پور مجتبی و همکاران: بررسی فرا ساختار غشاء پایه لوله‌های سمی نفروس بافت بیضه در بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی. مجله یاخته، ۱۳۸۰، سال سوم، شماره ۱۲، صفحات ۲۰۲ – ۱۹۷.
16. Gulkesen KH, Erdogru T, sargin CF: Expression of ECM proteins and vimentin in testes of azoospermic man. Asian j Androl, 2002, 4(1): 55-60.
17. Tung PS, Fritz IB: Interactions of sertoli cells with myoid cells in vitro. Biol Reprod, 1980,57: 207-215.

www.SID.ir