

SPERMATOGENEZİN OBJEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ: DNA FLOW SİTOMETRİNİN TESTİS BİOPSİSİ İLE KIYASLANMASI

OBJECTIVE ASSESSMENT OF SPERMATONOGENESIS: COMPARISON OF DNA FLOW CYTOMETRY TO TESTICULAR BIOPSY

Alıcı, B., Özkara, H., Akkuş, E., Hattat, H.

Özet

Azoospermik hastalar infertilite vakalarının %5-8'ini oluşturlar. Gonadotropin seviyesi normal ve normal boyutlarda testisleri olan hastalarda spermatogenezin değerlendirilmesi için standart yaklaşım testis biopsisi yapmaktır. Testis biopsisi invazif bir yöntemdir ve patolojik değerlendirme kalitatif ve subjektiftir. DNA flow sitometri hızlı, kantitatif ve objektif bir yöntem olarak spermatogenezin değerlendirilmesi için önerilmektedir.

Çalışmamızda, kliniğimizde azoospermi nedeni ile testis biopsisi yapılan 19 hastadan DNA flow sitometri için örnekler alınarak her iki yöntem birbiri ile kıyaslanmıştır. Histolojik değerlendirme ve flow sitometri ayrı ayrı laboratuvarlarda yapılmıştır.

Normal histolojiye sahip 8 vakanın flow sitometrisinde 7 hastada normal histogram, 1 hastada orta derecede anormal histogram tesbit edilmiştir. Sertoli Cell Only sendromu tesbit edilen 4 hastanın histogramlarında diploidi hakimiyeti mevcuttu ve bunlar belirgin derecede anormal kabul edildiler. Histolojik olarak intermediate grupta sayılan, çoğunlukla maturasyon arresti gösteren 7 hastanın ikisinde normal histogram, ikisinde orta derecede anormal histogram ve üçünde ise ileri derecede anormal histogram saptandı.

Normal morfolojiye sahip 8 hastanın biri hariç 7'si ile Sertoli Cell Only tesbit edilen 4 hastanın hepsinde histolojik tanı ile histogram sonuçları tam uyum göstermiştir. Maturasyon arresti kabul edilen 7 hastanın ikisinde normal histogram bulunmuştur.

Testis biopsisi halen spermatogenezin değerlendirilmesinde standart olarak kullanılan bir tekniktir, ancak, özellikle son yıllarda hücrelerin tanımlanması için geliştirilen yeni yöntemlerle DNA flow sitometrinin testis biopsisine nazaran daha az invazif, hızlı uygulanabilen, güvenilir ve objektif bir yöntem olduğu söylenebilir.

Summary

Five to eight percent of men seen in male infertility clinics have azoospermia. In men

with normal levels of gonadotrophins and normal testicular size, the standart approach is testis biopsy to differentiate ductal obstruction from testicular failure. Routine testicular biopsy is invazif and histologic evaluation is qualitative and subjective. DNA flow cytometry is a rapid, quantitative and objective method.

The study group consisted of 19 azoospermic men who underwent open testicular biopsy and specimens for DNA flow cytometry were also obtained to compare both methods. Histologic evaluation and flow cytometry were done in separate laboratoires.

The flow cytometric analysis for the 8 cases with normal pathologic evaluation indicated that 7 had normal histograms while one had moderately abnormal histogram. The histologic finding for 4 patients were sertoli-cell-only syndrome and the cells in the histograms were predominantly diploid and considered to be markedly abnormal. The pathological evaluation of seven patients were in the intermediate group, mostly representing maturational arrest. In two of these patients the histograms were normal while in another two patients it was moderately abnormal and three patients represented markedly abnormal ploidy classes.

Almost all patients (except one) with normal morphology and all patients with Sertoli-Cell-Only syndrome correlated well with DNA histograms. Two of 7 patients in the intermediate group had normal histogram pattern.

Testicular biopsy is still the standart approach to evaluate spermatogenesis, but with the recent advances in the techniques which are developed for identification of cells, DNA flow cytometry may be used as a less invasive, rapid and objective method than testicular biopsy.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Spermatogenez, Testis biopsisi, DNA flow sitometri

Key words: Infertility, Spermatogenesis, Testicular biopsy, DNA flow cytometry

Giriş

Erkek infertilitesi vakalarının %5-8'inde azoospermi mevcuttur. Testiküler atrofinin olmadığı, gonadotropin seviyelerinin normal olduğu veya FSH değerinin normal değerlerin iki mislinden fazla olmadığı, ejakülatta fruktoz mevcut olduğu durumlarda standart yöntem duktal obstruksiyon ve testiküler yetersizliğin ayırıcı tanısı için testis biopsisi yapılmasıdır. Testis biopsisi özellikle azoospermik vakalarda histolojik olarak spermatogenezini incelemek için kullanılan en direkt tanı metodlarındandır. Kalitatif bir yöntem olan testis biopsisi yeterli olmakla birlikte repro-

duktif araştırmalarda objektif ve standardize metodlara ihtiyaç olduğu kabul edilmektedir.

Kantitatif olarak spermatogenezin değerlendirilmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında geç spermatidlerin tübüler konsantrasyon ortalaması⁽¹⁾, Testiküler parankim ünitesi başına günlük sperm üretimi⁽²⁾ ve her seminifer tubulus başına düşen spermatid/sertoli hücresi oranı⁽³⁾ sayılabilir. Bu tip kantitatif yöntemler spermatogenezin objektif değerlendirilmesi için yeterli standartlara sahip oldukları halde çok zaman alıcı ve oldukça zor, emek isteyen metodlardır. Bunlara alternatif, spermatogenezin kantitatif değerlendir-

mesi için hızlı, objektif bir teknik olarak DNA flow sitometri analizi önerilmektedir. Doku alımının ince iğne aspirasyonu ile yapılabilmesi bu yöntemi daha az invazif ve ucuz bir yöntem olarak ön plana çıkarmaktadır.

Flow sitometrinin rutin klinik değerlendirmeler için kullanılabilmesi amacı ile bu yöntem halen spermatogenezin kalitatif değerlendirilmesinin standardı olan açık testis biopsisi ile kıyaslanmıştır.

Materyal Ve Metod

Azoospermisi mevcut 19 infertilite hastası çalışma grubuna alınmıştır. Bilateral açık testis biopsisi uygulanan bu hastalardan alınan örnekler Bouin solüsyonuna konularak patoloji laboratuvarına, alınan ikinci örnek ise phosphate buffered saline (PBS) içine konularak flow sitometri yapılmak üzere bir başka patoloji laboratuvarına gönderildi. Histolojik değerlendirme flow sitometrik değerlendirmeden bağımsız olarak yapıldı.

Standart morfoloji için gönderilen örneklerden hazırlanan parafin kesitleri hematoxylin-eosin ve trichrome boyalarla boyandı. Spermatozit, spermatid ve spermatozoaların birbirlerine oranlarına özellikle dikkat edildi. Histogram için her hastanın preparatında en az 10 yuvarlak seminifer tubulus seçilerek incelendi.

DNA histogramları otomatik flow sitometri cihazı ile örneğin laboratuara gittiği aynı günde yapıldı. Sitometriye hazırlık için örnekler önce mekanik olarak hücrelere ayrıldı, 300 g ile 10 dakika santrifüje edildi ve süpernatant atılarak pellet sitrat tampon solüsyonu ile karıştırıldı. Ribonükleik asitlerin elimine edilmesi için örnekler ribonükleaz eklenerek bir ila iki saat oda sıcaklığında bekletildi. Karışım 74 µ kalınlığındaki naylon mesh'ten süzülerek flow sitometri cihazında 488 nm argon laser ışığı kullanılarak 250 mW ile en az 10000 hücre sayıldı. Propidium iodid'in kırmızı floresan-

sı analiz edilerek DNA histogramları Coulter Profile flow cytometry (Coulter electronics, Florida) cihazı ile haploid (1C), diploid (2C) ve tetraploid (4C) pikleri şeklinde sınıflandı.

Histopatolojik değerlendirmede üç kategori kullanıldı.

1. Normal: Spermatogenez, intersitisyum ve membran yapısı norma. Johnsen skoru: 8.5-10

2. İntermediate (hiposermatogenez veya maturasyon arresti): Spermatogenez kısmen mevcut veya belli bir aşamada kalmış, normal veya hafif bozulmuş intersitisyum, hafif kalınlamış bazal membran. Johnsen skoru: 2-8.5

3. Sertoli Cell Only: İntersitisyum ve bazal membran normal ancak germinal hücre yok. Sertoli hücresi mevcut. Johnsen skoru: 2

Testis dokusu DNA histogramı şu piklerden oluşur:

1. Haploid hücre piki (1C): Sec. Spermatozitler, Spermatidler, spermatozoa.

2. Diploid hücre piki (2C): Sertoli hüce., Leydig hüce., G1/G0 spermatogonia.

3. Tetraploid hücre piki (4C): Primary spermatozitleri içerir.

Eğer sonuçta $1N > 2N > 4N$ ise normal, $2N > 4N > 1N$ veya $2N > 1N > 4N$ ise orta derecede anormal veya $2N >> 4N$, $1N$ ise belirgin derecede anormal kabul edildi.

Hasta grubunun küçük oluşu nedeni ile istatistik çalışma yapılmamıştır.

Bulgular

Patolojik değerlendirme ve ploidi sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre normal kabul edilen 8 hastanın 7'sinde DNA flow sitometri normal histogram, birinde orta derecede anormal histogram göstermiştir. Patolojik değerlendirmede maturasyon arresti olarak tanımlanan ve intermediate grup olarak kabul edilen 7 hastanın yapılan DNA flow sitometrik

Tablo 1: Histopatoloji ve ploidi sınıflarına göre hasta dağılımı:

	Ploidi		
	Normal	Orta derecede anormal	Belirgin anormal
Normal (n=8)	7	1	0
Intermediate (n=7)	2	2	3
Sertoli Cell Only (n=4)	0	0	4

analizinde 2 hastada normal histogram, 2 hastada haploid hücrelerin azalarak tetraploidlerin artış gösterdiği, orta derecede anormal histogram ve 3 hastada belirgin derecede anormal histogram saptandı.

4 hastanın patolojik değerlendirmesi Sertoli Cell Only sendromu idi ve histogramları da predominant olarak diploid hücrelerin hakimiyetini gösteriyordu ve belirgin derecede anormal gruptaydı.

Normal morfoloji gösteren 8 hasta ve Sertoli Cell Only Sendromu olan 4 hastadan sadece birinde orta derecede anormal histogram saptanmış ve 11 hastanın patolojisi ile histogramları tam uyum göstermiştir. Intermediate gruptaki 7 hastadan ikisinde normal histogram tesbit edilmiştir.

Tartışma

Azoospermik hastalarda duktus obstrüksiyonu ile testiküler yetmezliği ayırmada standart yaklaşım testis biopsisi yapmaktır. Rutin patolojik değerlendirme zaman alıcı, subjektif ve kalitatiftir. Patologlar arasında anormalliklerin derecesini tesbitte farklılıklar olmaktadır. Testis biopsisinin invazif bir yöntem oluşu nedeni ile son yıllarda testiküler aspirasyon örneklerinin histolojik değerlendirilmesine çalışılmaktadır^(4,5). Alınan materyalin çok küçük oluşu nedeni ile ince iğne aspiratlarının histolojik değerlendirilmesi tatmin edici olamamaktadır.

Spermatogenezin değerlendirilmesi için

hızlı, kolay ve objektif sonuç alınabilen DNA flow sitometrinin kullanımı pek çok araştırmacı tarafından önerilmiştir^(6,9). Haploid, diploid ve tetraploid hücre kompartmanlarının birbirlerine oranı spermatogenezin değişik evreleri ile koreledir⁽⁶⁾. Primer spermatositler tetraploid kompartmanda, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoalar haploid kompartmanda, Sertoli ve Leydig hücreleri ile G1/G0 spermatogonialar diploid kompartmanda yer almaktadırlar.

Patolojik değerlendirmede normal morfolojiye sahip hastaların histogramları da normal sınırlarda çıkmıştır. Bir hastada orta derecede anormallik saptanmış ve bu hastanın kronik epididimit geçirdiği anamnezinden tesbit edilmiştir. Normal morfolojiye sahip bu hastada muhtemelen epididimal fonksiyon bozukluğuna bağlı ploidi değişikliği olduğu düşünülebilir. Patolojik olarak Sertoli Cell Only tanısı konulan 4 hastanın histogramları birbiri ile tam uyum göstermiştir.

Intermediate grupta olan ve maturasyon arresti olan hastaların histogramlarında farklılıklar saptanmıştır. Intermediate gruptaki hastalar değerlendirilmesi en güç olan hastalardır. Bunlara daha objektif bir yaklaşım flow sitometri ile sağlanabilir. Haploid grup içerisinde spermatozoaların yanısıra spermatid ve spermatositlerin mevcudiyeti ve bu hücrelerin birbirinden ayırtılmasındaki güçlük spermatogenezin tam değerlendirilmesinde bir handikap olarak görülüyordu. Ancak germinal

hücrelerin DNA'larının değişik boyanabilirlik özellikleri nedeni ile yeni boyama teknikleri spermatidler ve olgun spermilerin birbirinden ayırtedilebilmesini sağlamıştır. Örneğin, propidium iodide ile boyanan insan testis hücreleri yuvarlak ve uzamış spermatidler ve olgun spermiler olarak kolayca ayrılabilir⁽¹⁰⁾. Daha da gelişmiş bir teknikte DNA ve RNA'ların acridine orange ile boyanması ile haploid grup yuvarlak, uzayan ve uzamış spermatidler ve olgun spermiler olarak sınıflanabilmektedir⁽¹¹⁾. Acridine orange DNA ve RNA'ları boyarken eğer çift sarmallı DNA mevcutsa yeşil floresans vermekte, tek sarmal RNA veya DNA mevcutsa kırmızı floresans vermektedir⁽¹²⁾. Spermatogenezin erken dönemlerinde kırmızı floresans yoğunluğu artmaktadır.

Işık mikroskobu ile boyama teknikleri kullanılmadan semen örneklerinde lökosit ve spermatid ayırımı yapılması çok güçtür. Aynı acridine orange boyama tekniği ile semen örneklerinde yuvarlak spermatidler ile lökositlerin ayırımı kolayca yapılabilir^(11,13).

Çalışmamızda bu gelişmiş boyama teknikleri ile haploid grubun detaylı incelemesi yapılamamış olmasına rağmen elde edilen sonuçlar DNA flow sitometri ile kantitatif testis biopsisi arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık çalışması çalışma grubunun küçük oluşundan yapılmamıştır.

Hücrelerin tanınması ve alt grupların gösterilebilmesi için geliştirilen teknikler ve gerek diğer araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar^(8,14-18), gerekse bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar DNA flow sitometrinin güvenilir, az invazif ve objektif bir metod olarak spermatogenezin değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç

Testis biopsisi halen spermatogenezin değerlendirilmesinde standart olarak kullanılan

bir tekniktir, ancak hücrelerin tanımlanması için yeni geliştirilen yöntemlerle DNA flow sitometrinin testis biopsisine nazaran daha az invazif, hızlı uygulanabilen, güvenilir ve objektif bir yöntem olduğu söylenebilir.

Kaynaklar

1. Steinberger, E. and Tjioe, D.Y.: A method for quantitative analysis of human seminiferous epithelium. *Fertil. Steril.*, 19: 959, 1968.
2. Johnson, L., Petty, S.C. and Neaves, W.B.: A Comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biol. Reprod.*, 22: 1233, 1980.
3. Rowley, M.J. and Heller, C.G.: Quantitation of the cells of the seminiferous epithelium of the human testis employing the Sertoli cell as a constant. *Mikrosk. Anat.*, 115: 461, 1971.
4. Nseyo, U.O., Englander, L.S., Huben, R.P. and Pontes, J.P.: Aspiration biopsy of the testis: another method method for histologic examination. *Fertil. Steril.*, 42: 281, 1984.
5. Cohen, M.S. and Warner, R.S.: Needle biopsy of testis: a safe outpatient procedure. *Urology.*, 29: 279, 1987.
6. Pfitzer, P., Gilbert, P., Rolz, G. and Wyska, K.: Flow cytometry of human testicular tissue. *Cytometry.*, 3: 116, 1982.
7. Chan, S.L., Lipshultz, L.I. and Schwartzendruber, D.: DNA flow cytometry: a new modality for quantitative analysis of testicular biopsies. *Fertil. Steril.*, 41: 485, 1984.
8. Kaufman, D.G. and Nagler, H.M.: Aspiration flow cytometry of the testes in the evaluation of the spermatogenesis in the infertile male. *Fertil. Steril.*, 48: 287, 1987.

9. **Hellstrom, W.J.C., Deitch, A.D. and de Vere White, R.W.:** Evaluation of vasovasostomy candidates by DNA flow cytometry of testicular aspirates. *Fertil. Steril.*, 51: 546, 1989.
10. **Zimmermann, A. and Truss, F.:** The prognostic power of flow trough cytophotometric DNA determinations for testicular diseases. *Anal. Quant. Cytol.*, 2: 247, 1980.
11. **Everson, D.P. and Melamed, M.R.:** Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, Suppl. 1A, 31: 248, 1983.
12. **Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M.R.:** Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA. *Cytometry*, 2: 201, 1982.
13. **Kaspar, J.V., Holmes, R.P., Wallen, C.A. and Jarow, J.P.:** Identification and quantification of seminal leukocytes by flow cytometry. *J. Urol.*, part 2, 145: 327A abstract 458, 1991.
14. **Abyholm, T. and Clausen, O.P.F.:** Clinical evaluation of DNA flow cytometry of fine needle aspirates from testes of infertile men *Int. J. Androl.*, 4: 505, 1981.
15. **Hellstrom, W.J.G., Stone, A.R., Deitch, A.D. and de Vere White, R.W.:** The clinical application of aspiration deoxyribonucleic acid flow cytometry to neurologically impaired men entering an electroejaculation program. *J. Urol.*, 142: 309, 1989.
16. **Hirsch, I.H., Kulp-Hugues, D., McCue, P., Flanigan, M., Sedor, J., Stevenson, A. and Staas, W.E.:** The value of quantitative testicular biopsy and deoxyribonucleic acid flow cytometry in predicting sperm recovery from electrostimulated ejaculates. *J. Urol.*, part 2, 149: 1345, 1993.
17. **Hellstrom, W.J.G., Tesluk, H., Deitch, A.D. and de Vere White R.W.:** Comparison of flow cytometry to routine testicular biopsy in male infertility. *Urology*, 35: 321, 1990.
18. **Hirsch, I.H., McCue, P., Kulp-Hugues, D., Sedor, J. and Flanigan M.:** Validation of flow cytometry analysis in the objective assessment of spermatogenesis Comparison to the quantitative testicular biopsy. *J. Urol.*, 150: 342, 1993.