

SPERMATOGENEZİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE TESTİS İNCE İĞNE ASPIRASYON BİYOPSİSİ

RATLARDA DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

Dr. Fatih TARHAN (*), Dr. Füsün PEREMECİ (**), Dr. Kürşat YILDIZ (***), Doç. Dr. Uğur KUYUMCUOĞLU (****)

ÖZET: Bu çalışmada testis ince iğne aspirasyon biyopsisinin (İİAB) spermatogenezi değerlendirmedeki yeri ve farklı uygulama yöntemleri arasında üstünlük olup olmadığı bir hayvan modelinde araştırılmıştır. 10'u kontrol ve 7'si Streptozotocinle diabetes mellitus oluşturulan 17 erkek Wistar albino ratlara anestezi altında bilateral testis İİAB yapıldı. Her iki testise üç ayrı doğrultuda ince iğne ile girilirken sağ testislere aspirasyon öncesinde 0.2 ml % 0.8 NaCl verildi. İİAB sonrası bilateral orşiektomi uygulandı. Testis ağırlığı, histopatolojik tanı ve Johnsen skoru belirlendi. Aspirasyon materyali direkt yayma ve sitosantrifüj ile incelenerek sertoli indeksi ve spermatogonik hücrelerin sayısal oranları saptandı. Diabetik grubun ele aldığımız her üç morfolojik ve sitolojik parametreler bakımından kontrol grubuna göre anlamlı fark gösterdiği görüldü. Aspirasyon yöntemleri arasında ise anlamlı bir fark görülmedi.

Spermatogenetik aktiviteyi değerlendirmek için uygulanan testis İİAB, kullanılan sitolojik parametreler bakımından histopatolojik tanı ile uyumlu sonuçlar vermektedir.

ANAHTAR KELİMELE: Testis, İİAB, Erkek infertilitesi, Rat

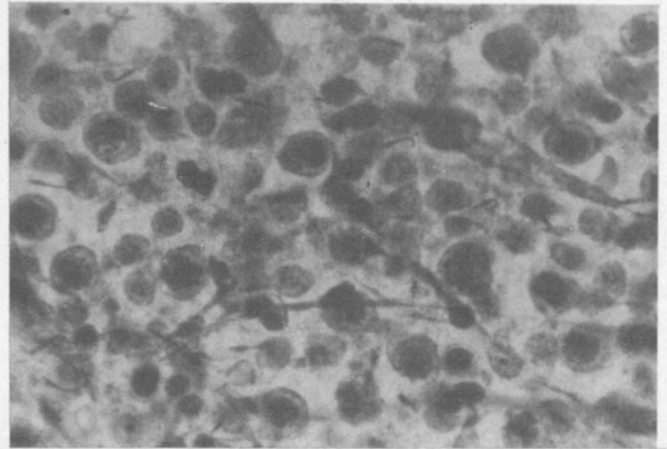
SUMMARY: In this study we investigated the role of the fine needle aspiration biopsy (FNAB) for estimation of spermatogenesis and compared the different procedures in a rat model. We performed FNAB to both testes of each 17 male Wistar albino rats under general anesthesia. 10 of them were gathered as a control group and 7 of them as diabetes mellitus group which became diabetic with intraperitoneal administration of streptozotocin. We performed FNAB to each testis in three different directions and injected 0.2 ml. 0.9 % NaCl to the right testes before aspiration. After FNAB, bilateral orchidectomy were performed to all rats. Testicular weights, histopathologic diagnosis and Johnsen scores were determined. We examined aspiration material by smear and cytocentrifuge then determined the sertoli index (SI) and ratio of the spermatogenic cells. The diabetic group showed significant difference from the control group for all morphologic and cytologic parameters. There was no statistically significant difference between the aspiration methods. The FNAB of testis performed for the estimation of spermatogenetic activity, correlated with the histopathologic diagnosis for the cytologic parameters.

KEY WORDS: Testis, FNAB, Male infertility, Rat.

GİRİŞ

Evli çiftlerde erkek faktörü infertiliteden % 35-40 oranında sorumludur. İnferil erkeklerde, özellikle azospermik hastalarda serum FSH düzeyi azosperminin nedeni konusunda fikir verse de invaziv bir yöntem olan testis biyopsisi tanıda halen önemini korumaktadır. Günümüzde kullanım sahası oldukça genişleyen ince iğne aspirasyon biyopsisinin (İİAB) testiste kullanımı yapılan çalışmalarla güncelleşmiştir (1,2,3). İİAB materyaline flow cytometry uygulaması bu konuda yeni gelişen bir yöntemdir (4). Ancak maliyeti yüksektir ve her yerde yapılamaması söz konusudur. Diğer biyopsi yöntemlerine göre İİAB'nin daha az invaziv, kolay, tekrarlanabilir, hızlı sonuç alıcı ve ucuz olması başlıca avantajlarıdır. Ancak seminifer tubulus duvarı ve interstisiyel doku hakkında bilgi sahibi olunamaması gibi dezavantajları vardır. Buna rağmen özellikle son zamanlarda önerilen kantitatif değerlendirme yöntemiyle spermatogenez hakkında en az diğer yöntemler kadar ilgi sağlamak mümkün olmaktadır (5,6).

Diabetik ratlarda hipergliseminin fertilité potansiyelini azalttığı daha önceden gösterilmiştir (7). Bu deneysel çalışmada diabetik rat modeli kullanılarak normal ve bozulmuş spermatogenetik aktiviteleri olan testislerde İİAB ve açık biyopsi sonuçlarının karşılaştırılması, basitleştirmiş olduğumuz kantitatif İİAB değerlendirme yöntemiyle aspirasyon



Resim 1 : Testis İİAB'de saptanan normal spermatogenez örneği. PAPx400

metodlarının tanı bakımından farklı sonuç verip vermediğinin saptanması ve İİAB'nin tanı değerini belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza 10'u normal ve 7'si üç ay önce intraperitoneal 60 mg/kg Streptozotocin (Sigma) verilerek diabetes mellitus oluşturulmuş toplam 17 erkek erişkin Wistar albino rat (250-300 gm.) alındı. İntraperitoneal 10 mg/kg ketamine (Parke-Davis, Eczacıbaşı) anestezisi altında 10 cc'lik enjektöre konnekte edilmiş 23 G iğne ile ratların her iki testisine İİAB uygulandı. Sağ testislere işlemiden önce 0.2 cc % 0.9 NaCl enjekte edildi. Her iki testise epididime göre paralel, vertikal ve oblik olacak şekilde girildikten (Şekil 1) Sonra

* Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği Uzmanı, İstanbul

** Haydarpaşa Numune Hastanesi Patoloji Laboratuvarı Asistanı, İstanbul

*** Haydarpaşa Numune Hastanesi Patoloji Laboratuvarı Uzmanı, İstanbul

**** Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği Şefi, İstanbul

TABLO 1 : İİAB UYGULANAN RATLARIN MORFOLOJİK BULGULARI

	no	Testis Ağırlığı (gm)		Johnsen Skoru		Histopatolojik Tanı	
		Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol
Kontrol	10	2.7±0.3	2.8±0.3	9.8±0.3	9.4±0.3	Normal Spermatogenesis	
Streptozotocin	7	0.7±0.6	0.8±0.7	4.7±0.7	2.9±0.6		

(sertoli, spermatogonia, spermatosit, spermatid ve spermatozoa) sayılarak kaydedildi (Resim 1). Sertoli indeksi (Sİ: sertoli hücre/spermatogonik hücre x 100) ve spermatogonik hücrelerin yüzdesel dağılımları saptandı. Bütün doku ve aspirasyon örnekleri aynı patolojik

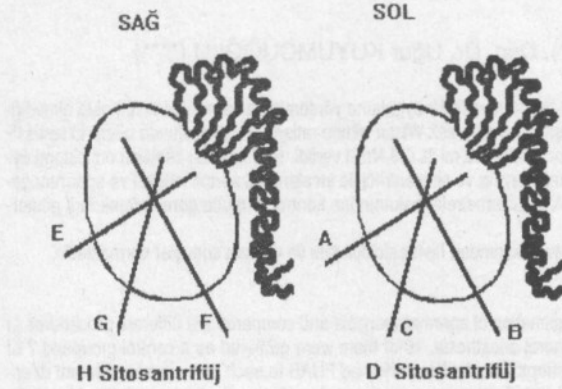
tarafından değerlendirildi.

A-H grupları, sağ-sol testisler arasında belirtilen parametreler açısından fark olup olmadığı ve spermatogenez ile İİAB sonuçları arasındaki ilişki araştırıldı. Sonuçlar "ortalama ± standart hata" olarak verildi. İstatistiksel önemlilik testi olarak varyans analizi (ANOVA) ve t testi kullanıldı.

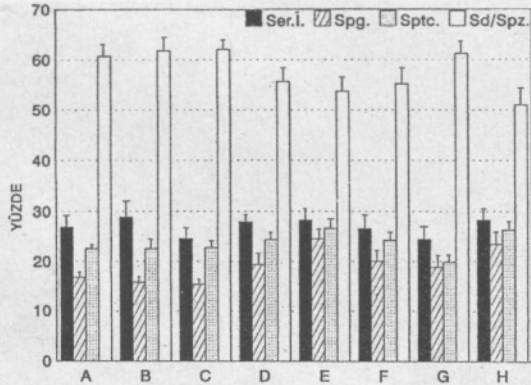
SONUÇLAR

Testis ağırlıkları ve Johnsen skoru diabetik grupta normal ratlara göre önemli oranda azalmıştı ($p < 0.05$). Kontrol grubundaki 10 ratta histopatolojik olarak normal spermatogenez, diabetik 7 ratın beşinde inkomplet maturasyonarrest, ikisinde ise komplet maturasyon arresti saptandı (Tablo 1).

Normal spermatogenez saptanan kontrol grubu ratlarının İİAB'de A-H grupları (Şekil2) ve sağ-sol testisler arasında Sİ ve spermogonik hücre dağılımları açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Maturas-



Şekil 1 : Testis İİAB yöntemlerinin şematizasyonu. (A,E:Epididime vertikal B,F: Epididime paralel, C,G: Epididime oblik, D,H: Sitosantrifüj).

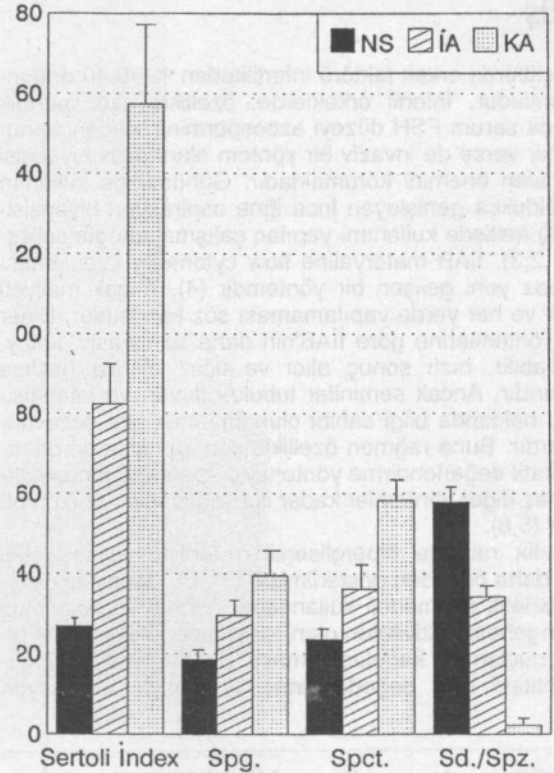


Şekil 2 : Normal spermatogenez saptanan ratlarda sertoli indeksi ve spermatogonik hücre yüzdeleri (Ser. İ.:Sertoli İndeksi, Spg: Spermatogonia, Sptc.: Spermatozit, Sd.: Spermatid, Spz.: Spermatozoa).

enjektörün pistonu geriye çekilerek oluşturulan negatif basınç bozulmadan iğne aynı doğrultuda hareket ettirildi. İğne testisten çıkarılmadan hemen önce negatif basınç sona erdirilerek testisten çıkarıldı. Alınan materyal lamlara püskürtülerek yayıldı. Enjektörlere 2 ml ringer laktat çekilerek sitosantrifüj yapıldıktan sonra yayma yapıldı. Testis İİAB'leri Şekil 1'de görüldüğü gibi A'dan H kadar gruplandırıldı. Alkolde fikse edildikten sonra PAP yöntemi ile boyandı.

İİAB takiben skrotal insizyonla bilateral orşidektomi uygulanarak testis ağırlıkları ölçüldü. Materyaller Bouin solüsyonunda fikse edildi. Parafin bloklardan alınan 5 µ kalınlığındaki kesitler hematoksilin eozinle boyandı. Histopatolojik tanı (8) ve Johnson skoru (9) saptandı.

İİAB materyalinde hücreden zengin rastgele 5 sahadaki hücreler 200 hücreden az olmamak kaydıyla tiplerine göre



Şekil 3 : Histopatolojik tanı ile İİAB sonuçlarının karşılaştırılması. (NS: Normal spermatogenez, İA: İnkompakt maturasyon arresti, KA: Komplet maturasyon arresti, Spg.: Spermatogonia, Sptc.: Spermatozit, Sd.: Spermatid, Spz.: Spermatozoa.)

yon arresti olan ratlarda da A-D ve E-H gruplarında arasında Sİ ve spermatogenik hücre dağılımları açılarından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

İnkomplet ve komplet maturasyon arresti olan ratların Sİ ve spermatogenik hücre dağılımları normal spermatogenezli olanlara göre farklılık gösteriyordu (Şekil 3). Sİ inkomplet (82.4 ± 1.2) ve komplet maturasyon arresti (157 ± 28.6) olan ratlarda normal spermatogenezli (26.9 ± 1.9) olanlara göre belirgin olarak yüksekti ($p<0.01$). Spermatogonia ve spermatosit oranları komplet maturasyon arresti (39.5 ± 6.7 ve 58.3 ± 5.1) olanlar ile normal spermatogenezliler (18.6 ± 1.1 ve 23.6 ± 1.2) arasında farklılık gösteriyordu ($p<0.01$). Spermatid, spermatozoa dağılımlarıysa inkomplet (34.2 ± 4.0) ve komplet maturasyon arresti (2.2 ± 0.2) olanlarda normal spermatogenezli (57.8 ± 1.9) olan ratlara göre belirgin olarak düşüktü ($p<0.05$ ve $p<0.01$).

TARTIŞMA

Testis ince iğne aspirasyonu ilk kez 1904 yılında yaymada spermatozoa varlığı veya yokluğunun tespiti için kullanıldı (1). Ancak daha sonraları testis doku biyopsisinin histolojik incelemesi tercih edildi. Testis İİAB'nin tanısal önemi ortaya çıkarılmış olmasına rağmen rutin kullanıma girmedir (3). Son zamanlarda testis doku biyopsilerinden yapılan yaymalar da kantitatif olarak değerlendirilmiştir (1,2). Foresta ve ark. oligospermik ve azospermik infertil hastalarda testis İİAB'nde spermatogenez kantitatif olarak değerlendirecek tanısal önemini vurgulamışlardır (5,6).

Diabetin spermatogenezde olan olumsuz etkileri daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmişti (7). Testis ağırlığı, Johnsen skoru ve histopatolojik tanı ile yaptığımız İİAB değerlendirmede bizde diabetli grupta spermatogenezde maturasyon arresti şeklinde bozukluk saptadık.

İİAB de yeterli materyal elde edilememesi ve materyalin değerlendirme için kötü boyanması önemli teknik problemlerdir. Çalışmamızın sonuçları iğne yönünün ve aspirasyon yönteminin veya sitosantrifüj kullanımının tanı konulmasında önemli olmadığına işaret etmektedir. Ancak teknik hatayı en aza indirmek için İİAB tekniğine uygun olarak yapılmalı, tespit edilmeli ve fazla sayıda yayma yapılmalıdır.

Daha önce yapılan çalışmalarda İİAB sonuçları histopatolojik tanılarıyla paralellik göstermiştir. Biz kullanılan bu yöntemi rutin çalışmaya sokmak amacıyla kantitatif değer-

lendirmeyi sadeleştirdik ve benzer şekilde doku tanılarıyla İİAB sonuçları arasında paralellik saptadık.

Sertoli hücreleri seminifer tubulusta postpubertal dönemde spermatogenik hücrelerle belirli oranda bulunmaktadır (10). Sİ'nin yüksek bulunması bu oranın bozulduğuna işaret etmektedir. Ayrıca spermatogenik hücrelerin orantısız dağılımının değişmesi de direk olarak spermatogenezdeki bozukluğu yansıtmaktadır. Arrest durumunda yüksek Sİ'ne ilave olarak etkilenen hücre grubundan önceki hücre gruplarının oranı artmaktadır. Diğer araştırmacılar hipospermatogenezde Sİ artışıyla birlikte spermatogenik hücrelerde azalma saptamışlardır (5,6). Germinal aplazide ise yaymada sertoli hücresi dışında hücre saptanamamaktadır (2,5,6). Obstruktif azospermide ise yüksek Sİ ve intratubuler matür hücre stazı gözlenmektedir (5).

Sonuç olarak testis İİAB, infertilite tanısında spermatogenik aktivitenin kantitatif ve kalitatif değerlendirilmesinde daha noninvaziv bir teknik olarak doku biyopsilerine alternatif olabilir.

KAYNAKLAR

1. Schenk U, Schill W B: Cytology of the human seminiferous epithelium. *Acta Cytol* 1988; 32: 689-696.
2. Papic Z, Katona G, Skrabalo Z: The cytologic identification and quantification of testicular cell subtypes. *Acta Cytol* 1988; 32: 697-706.
3. Nseyo UO, Englander LS, Huben RP, Pontes JE: Aspiration biopsy of testis: Another method for histologic examination. *Fertil Steril* 1984; 42: 281-284.
4. Kaufman DG, Nagler HM: Aspiration flow cytometry of the testes in the evaluation of spermatogenesis in the infertile male. *Fertil Steril* 1987; 43: 287-291.
5. Foresta C, Varotto A: Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the oligospermic subject. *Fertil Steril*. 1992; 58: 1028-1033.
6. Foresta C, Varotto A, Scandellari: Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azospermic subject. *Fertil Steril* 1992; 57: 858-865.
7. Cameron DF, Rountree J, Schultz RE, Repetta D, Murray FT: Sustained hyperglycemia results in testicular dysfunction and reduced fertility potential in BBWOR diabetic rats. *Am J Physiol* 1990; 259: E881-889.
8. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 7th ed. St. Louis: Mosby Co., 1989: pp. 950-953.
9. Johnsen SG: Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970; 1: 2-25.
10. Berndtson WE, Igboeli G, Parker WG: The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. *Biol Reprod* 1987; 37: 60-67.