Ratlardaki Spermatogenetik Aktivitenin Değerlendirilmesinde Sitolojik ve Histolojik Yöntemlerin Karşılaştırılması*

Dr. Neşe Çallı[1], Dr. Zafer Aybek[2], Dr. Hatice Bayramoğlu[1], Dr. Ender Düzcan[1]

ÖZET

Bu çalışmada deneysel olarak; açık testis biopsisi, Tru-Cut biopsisi, Touch imprint ve İİAB yöntemlerinin spermatogenetik aktiviteyi değerlendirmedeki yararlılığı araştırılmıştır. Etyolojik araştırma için deneysel varikosel oluşturulan 22 adet Sprague Dawley erkek rattan aynı zamanda, dört farklı metodla doku ve hücre örneği alınmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. İİAB ile açık testis biopsisinde olduğu gibi histopatolojik tanı koyma olanağı olmamakla birlikte yaymaların %95.45'inde matür spermatozoa varlığı izlenmiştir. Touch imprint ile elde edilen materyalin kalitesi İİAB ile elde edilen materyalinki kadar iyi bulunmamıştır. Sonuç olarak İİAB'nin azospermili hastaların değerlendirilmesinde, alternatif bir tanı yöntemi olabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler : Spermatogenezis, İİAB, Touch imprint, Açık biopsi, Tru-Cut biopsi.

SUMMARY

In this study, the adequacy of open testicular biopsy, Tru-Cut biopsy, Touch imprint and FNA methods for the evaluation of spermatogenesis were investigated experimentally. Testicular specimens obtained by four different methods from 22 Sprague Dawley male rats with experimentally induced varicocele were compared with each other. Although it was not possible to give a detailed pathological diagnosis by FNA, mature spermatozoa were observed in 95.45% of the samples with FNA. The quality of the material obtained by touch imprint method was not as satisfactory as FNA. Consequently, FNA method can be used in the evaluation of azospermic patients alternatively.

Key words : Spermatogenesis, FNA, Touch imprint, open biopsy, Tru-Cut biopsy.

GİRİŞ

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde, son yıllarda testis biopsisisine alternatif olarak daha az invaziv perkütan biopsi yöntemlerinin araştırılmasına gidilmektedir. Ayrıca son yıllarda mikrocerrahi tekniklerin gelişmesi ve İVF-ET için mikroepididimal sperm aspirasyonundaki gelişmeler cerrahi girişimden önce normal spermatogenezisin varlığını minimal invaziv yöntemlerle doğrulama gereğini doğurmaktadır[1]. İğne biopsileri bu durumda açık biopsiye alternatif olmaktadır. Geniş core iğneleri (ör. Tru-Cut, Biopty gun, Vim Silbermann) de deride insizyon, yatak istirahati ile antibiotik kullanımını gerektirmektedir. Anestezisiz ve hızlı uygulanabilen ince iğne aspirasyon biopsisi (İİAB) ise daha kolay ve az travmatik bir metoddur. Bu avantajlarına rağmen doku yerine sadece hücre elde edilmesi histolojik bulguların değerlendirilmesine izin vermemekle birlikte, spermatogenezis varlığı hakkında bilgi vermekte ve flow cytometry, immünohistokimya ve elektron mikroskopik araştırma olanağı sağlamaktadır. Bu amaçla çalışmamızda ratlarda İİAB, Touch İmprint, Tru-Cut ve Açık biopsi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmış ve uygulanabilirlikleri tartışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Etyolojik araştırma için deneysel varikosel oluşturulan 22 adet Sprague Dawley erkek ratta aynı zamanda bilateral testiküler İİAB ve Tru-Cut biopsisi uygulandı. İİAB için 20 cc'lik 22 gauge iğneli enjektör kullanıldı. Tru-Cut biopsisi ise 18 gauge iğne ile yapıldı. Aynı ratlarda operasyon sonunda bilateral açık testis biopsisi veTouch imprint örnekleri alındı. Elde edilen doku örnekleri Bouin solüsyonunda fikse edildikten sonra parafine gömüldü, 5 mikronluk kesitler alınarak H-E ile boyandı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi. Aspirasyon materyalleri direk lama yayılır yayılmaz Touch imprint örnekleri içeren lamlarla birlikte hemen %95'lik alkol fiksasyonuna alınarak 15 dakika bekletildi ve Pap boyası ile boyandıktan sonra sitolojik değerlendirmeye alındı. Ayrıca her denekten bilateral epididimal sperm aspirasyonu yapıldı. Taze örnekler ışık mikroskobunda x200 büyütmede; sperm varlığı, morfolojisi ve hareketliliği açısından incelendi.

BULGULAR

Sperm aspirasyonu sonunda 21 ratta normal sayı ve harekette spermatozoa saptanırken, 1 ratta her iki testisde azospermi görüldü. İİAB ve Touch imprint'den elde edilen

* Bu çalışma 23-26 Ekim 1996 tarihleri arasında Marmara 14. Ulusal Üroloji Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.

1 Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD
2 Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD

yaymaların ikisinde de 42/44 oranında spermatozoa saptandı. (Resim 1, 2). Ancak Touch imprint örnekleri İİAB örneklerine göre daha az sayıda değerlendirilebilen hücre içeriyordu. Dört yöntemle elde edilen bütün preparatların; kanamalı zemin, kötü fiksasyon ve boyama gibi artefaksal değişiklikler yanısıra, yetersiz hücre içermesi göz önünen alınarak "kısıtlı yeterlilik" oranları saptandı. Touch imprint'de 44 örneğin 23'ü kısıtlı yeterli iken, İİAB'de 13 kısıtlı yeterli preparat vardı. Tablo I'de sağ ve sol testisten her dört yöntemle elde edilen örneklerin sonuçları görülmektedir. Her iki testisler karşılaştırıldığında dağılımda anlamlı bir farklılık görülmedi. Histolojik değerlendirmenin yapıldığı açık biopsi ve Tru-Cut biopsi materyalleri karşılaştırıldığında; açık biopsi ile elde edilen örneklerin tamamı değerlendirilebilirken Tru-Cut'ın ancak 22/44 oranında yeterli materyal içerdiği görüldü(Resim 3). Yeterli materyal elde edilen Tru-Cut örneklerinin ise histopatolojik görünümü açık biopsi örneklerinden bir farklılık göstermedi. Hepsinde, normal spermatogenezis ve tübüller izlendi. Azospermi'li olan bir denekte bilateral testiküler atrofi saptandı(Resim 4,5).

TARTIŞMA

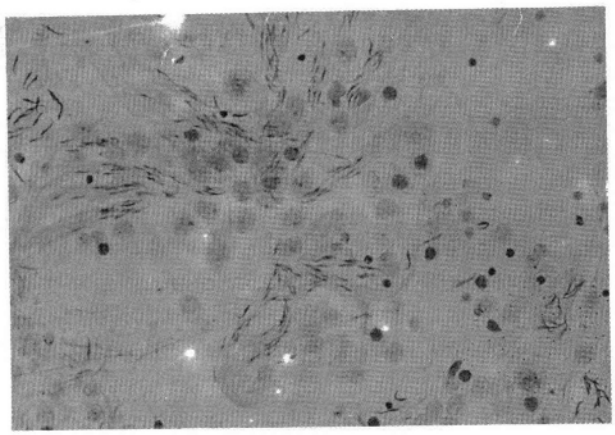
Semen analizinde azoospermi veya ciddi oligospermi saptanan ancak FSH'u normal sınırlarda olan infertil erkek hastalarda parsiyal obstrüksiyon veya olası testiküler patolojiyi

	Açık biopsi		Tru-Cut biopsi		İİAB		Touch İmprint	
Sol Testis	22Y*	0KY**	11 Y	11KY	16 Y	6KY	10Y	12KY
Sağ Testis	22Y	0KY	11 Y	11KY	15Y	7KY	11Y	11KY
Toplam	44Y	0KY	22Y	22KY	31 Y	13KY	21Y	23KY

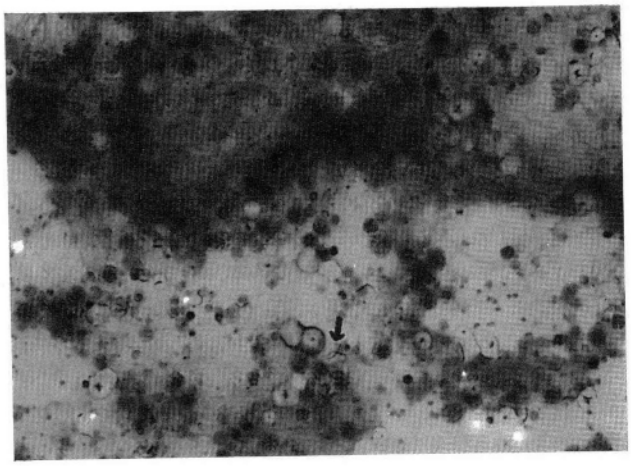
*Y : Yeterli, **KY : Kısıtlı yeterli.

Tablo 1 : Açık biopsi, Tru-Cut biopsi, İİAB ve Touch İmprint yöntemlerinin sonuçları.

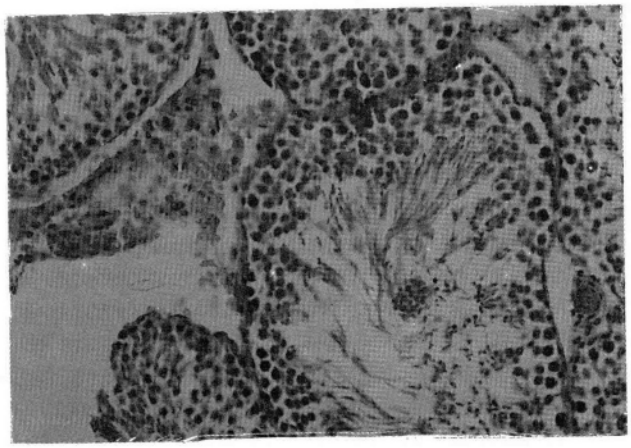
ortaya çıkarmak amacıyla 1940'lardan beri açık biopsi tekniği uygulanmaktadır. Ancak bu yöntem ameliyathane koşullarında testise cerrahi insizyonla girilmesini gerektirmektedir. Oysa perkütan iğne biopsisi daha basit, ucuz ve daha az komplikasyonu olan bir yöntemdir. Bu yüzden bir çok araştırmacı değişik metodlarda en uygun perkütan iğne biopsisini geliştirme yoluna gitmişlerdir[1,2]. Mallidis 5 cm uzunluğundaki Menghini ve Turner iğneleri ile yapılan perkütan biopsilerinin en iyi materyali sağladığı kanısına varmıştır. Aynı araştırmacı histolojik inceleme ve diğer ileri araştırmalar için yeterli doku sağlamak amacıyla farklı bir iğne biopsisi yöntemi



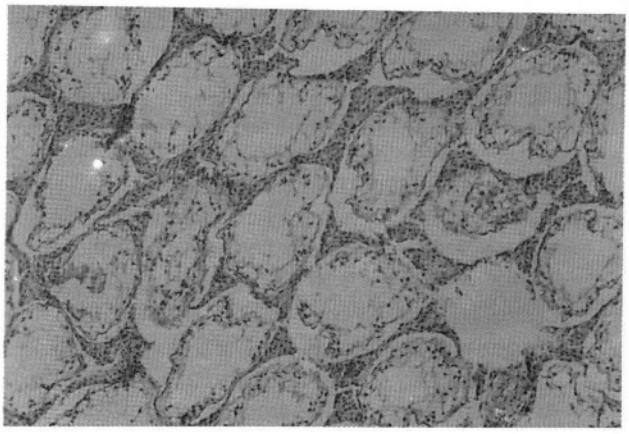
Resim 1 : İİAB'de normal spermatogenezis PAP, x400.



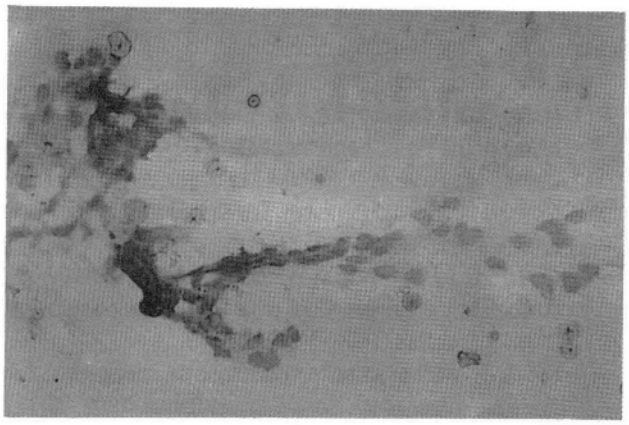
Resim 2 : Touch imprintte hücre plakarları arasında rahat seçilemeyen normal spermatogenezis PAP, x200.



Resim 3 : Tru - Cut biopsisi parafin kesitlerinde normal testis tübülleri H-E, x200.



Resim 4 : Açık biopsi parafin kesitlerinde atrofik testis tübülleri H-E, x40.



Resim 5 : İİAB'de matür spermatogenezis olmaksızın sadece eritrosit ve Sertoli hücre varlığı PAP, x200.

geliştirmiştir. Ancak bu yöntem çok pratik ve efektif görünmemektedir. Çünkü dokunun fiksasyon öncesi agar solüsyonunda alınıp santifüje edilerek hazırlanması gerekmektedir. Ayrıca bu yöntemle bile bütün doku örneklerinde %45 oranında boyama ve fiksasyon artefaktlarına bağlı seminifer tübül yapılarında bozulma, dokuda şekil bozukluğu gibi değişiklikler görülmüştür. Bir ratlarda uyguladığımız Tru-Cut biopsisi ile 22/44 (%50) oranında yeterli doku elde edebildik. Oranın nispeten düşük olması nedenleri arasında rat testis boyutuna oranla kullanılan iğnenin kalın gelebileceği dolayısıyla manipülasyon olduğunu düşünüyoruz. Bu yüzden aynı yöntemin insan testisine daha başarılı sonuçlar vermesi bizi şaşırtmamaktadır. Mallidis'in çalışmasında 26 olguda açık biopsi ile iğne biopsisi karşılaştırılmış ve %56 tam uyum, %38 hipospermatogenezis'in derecesinde farklılık ve %11 oranında da uyumsuzluk saptanmıştır. Bizim sonuçlarımızda %100 uyumun nedeni çalışma grubunun hemen hemen homojen bulgular içermesi olabilir (42 normal spermatogenezis ve 2 testiküler atrofi).

İğne biopsisi sırasında uygulanan aspirasyonun materyalin miktarı üzerine etkisi araştırıldığında; Lallidis aspirasyonun olumlu etkisini saptarken, Akhtar ve ark. ları bir fark bulamamışlardır[3]. Buna karşılık Kreula örnekleme tekniğinin ve aspirasyonun örnek yeterliliğinde çok etkili olduğunu belirtmektedir[3,4,5,6]. Biz ince iğne biopsisi sırasında aspirasyon uygulamanın ve 22 gauge iğne kullanmanın yararlılığına inanıyoruz.

Testisin sitopatolojik incelemesine gelince, şimdiye kadar bu konumun üzerinde çok fazla durulmamıştır. Oysa non invaziv ve daha kolay uygulanabilen bir yöntem olan İİAB spermatogenezisin varlığı hakkında bilgi verebilmesi yanısıra, flow cytometry, elekton mikroskopi gibi ileri araştırma yöntemleri için yeterli materyal sağlaması açısından da değerli bir yöntemdir. Kessaris perkütan ve açık biopsi metodlarına bir de Touch imprint'le elde ettiği örnekleri eklemiş ve sitolojik ve histolojik bulguları karşılaştırmıştır[7]. Sonuç olarak bu farklı teknikler arasında %95 korelasyon saptamıştır. Biz de histolojik kesitlerde 42/44 oranında normal spermatogenezis gördüğümüz ratlarda, İİAB ve Touch imprint yaymalarında da aynı oranda spermotazoa saptadık(%100 uyum). Ancak Touch imprint'le elde edilen örneklerin 23/44'ünde boyama, fiksasyon artefaktları ve hemorajiye bağlı değişiklikler görüldü. Testisin frajil bir doku olması nedeniyle bu tekniğin iyi sonuç vermediğini düşünüyoruz. Kessaris'in çalışmasında, Touch imprint perkütan biopsinin histolojik değerlendirme için yeterli kalitede doku sağlayamadığı durumlarda yararlı görülmüştür. Ancak yöntemler karşılaştırılırken İİAB yapılmadığı için onun Touch imprinte üstünlüğü tartışılamamıştır. Bizim bulgularımıza göre İİAB örneklerinin kalitesi Touch imprint'den çok daha iyi bulundu. Ayrıca Touch imprint ancak açık veya perkütan biopsi eşliğinde yapılabileceği için pratik açıdan çok fazla yararlı bir yöntem gibi görünmemektedir.

Ali M.A ve ark.ları 272 infertil hasta uygulanan İİAB'den elde ettiği sadece %11'i yetersiz bulmuşlardır[8]. Ayrıca sitolojik olarak aktif spermatogenezis, hipospermatogenezis, "Sertoli Cell Only", atrofi, matürasyon arresti tanılarının konulabileceğini göstermişlerdir. Bizim denek grubunda spermatogenetik aktivite açısından çok çeşitlilik olmadığı için İİAB'nin spermatogenezis'in derecesi hakkında ne kadar bilgi verebileceğini saptayamadık. Ama obstrüktif azospermik hastalarda smear'de matür spermatozoa varlığını saptamak bile çok değerli bir bulgu olarak düşünülmektedir. Bu yüzden biz de İİAB'nin yararlılığına inanıyoruz. Hatta yaymalarda; çeşitli hücre kombinasyonları ile histolojik tanı terimlerinin bile kullanılabileceğini savunanlar vardır[9,10,11]. Belki usulüne uygun ve tecrübe ile yapılan İİAB, spermatogenezis hakkında ayrıntılı bilgi de verebilir. Özet olarak, bu konuda daha fazla deneyim kazanmak için, erkek infertilitesini değerlendirilmesinde uygulanan açık biopsiye İİAB'nin de eşlik etmesinin yararlı olacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Mallidis C., Baker HWG. Fine needle tissue aspiration biopsi of the testis. Fertil Steril 1994; 61(2) : 367-375.
2. Dayanç M., Erduran D., Özteke M., Özgök Y., Peker A. Açık biopsiye alternatif: Perkutan Tru-Cut iğne biopsisi. Gata Bülteni 1991; 33:347-352.
3. Akhtar M., Ali MA., Huq M., Faulkner C. Fine-needle biopsy: comparison o cellular yield with and without aspiration. Diagn Cytopathol. 1989; 5(2): 162-165.
4. Kreula J. Effect of sampling technique on specimen size in fine needle aspiration. biopsy. Invest Radiol. 1990; 25(12): 1294-1299.
5. Kreula J. A new method for investigating the sampling technique of fine needle aspiration biopsy. Invest Radiol. 1990; 25(3): 245-249.
6. Kreula J., Virkkunen P., Bondestam S. Effect of suction on specimen size in fine needle aspiration biopsy. Invest Radiol. 1990; 25(11): 1175-1181.
7. Kessaris DN., Wasserman P., Mellinger BC. Histopathological and cytopathological correlations of percutenuos testis biopsy and open testis biopsy in infertile men. J Urol 1995; 153: 1151-1155.
8. Ali MA., Akhtar M., Woodhouse N., Burgess A., Faulkner C., Huq M.Role of testicular fine needle aspiration in the evaluation of male infertility: cytologic and histologic correlation. Diagn Cytopathol. 1991; 7(2): 128-131.
9. Rajwanshi a., İndudhara R., Goswami AK., Radhika S., Das A., Sharma SK., Vaidyanathan S., Datta BN. Fine-needle aspiration cytology in azoospermic males. Diagn Cytopathol. 1991; 7(1): 3-6.
10. Stampfli M., Hadziselimovic F. The effect of needle biopsy procedure on prepubertal rat testis. Eur J Pediatr Surg. 1991; 1(1): 36-39.
11. Dayanç M., Gökalp N., İmirzalioğlu., Göktaş S., Karademir K. Azospermik hastaları perkütan Tru-Cut testiküler iğne biopsisi ile hormonal ve sitogenetik bulgulara göre değerlendirilmesi. Üroloji Bülteni. 1994; 5: 95-98.