

Testis biyopsilerinde spermatogenezisin kantitatif değerlendirmesi

Tansu SALMAN , Stan E. ADKINS , Eric W.FONKALSRUD

*İstanbul Tıp Fakóltesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul
UCLA, Çocuk Cerrahisi Bölümü, Los Angeles, CA*

Özet

Bu çalışma testis biyopsilerinde tubular biyopsi derecelendirme metodunun (TBD) değerini araştırmak amacıyla düzenlenmiş ve bunu vurulamak için deneysel inmemiş testis oluşturulan fareler model olarak kullanılmıştır. Doksan farede, testislerden biri karın ön duvarına tespit edilerek deneysel abdominal testis oluşturuldu. Kontrol amacıyla 60 fareye de "sham" işlemi uygulandı. Germinal epitelyumdaki değişiklikler, abdominal ve skrotal testislerde histolojik olarak derecelendirildi. Bu amaçla modifiye Johnsen testis biyopsi derecelendirme metodu uygulandı. Her tubul kesitine, germ hücrelerinin olup olmaması ve görünümüne göre 1'den 10'a kadar bir derece vererek spermatogenezis değerlendirildi. TBD metodunun, çeşitli testis patolojilerinde ve farklı olgunlaşma evrelerinde, testis biyopsilerindeki değişikliklerin kantitatif olarak gösterilmesinde güvenilir bir yol olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler Testis, inmemiş testis, spermatogenezis

Summary

Quantitative evaluation of spermatogenesis in testicular biopsies.

The purpose of this study is to investigate the value of tubular biopsy scoring system in testicular biopsies by using an experimental model of cryptorchid mice. In 90 mice experimental cryptorchidism was produced by suturing one of the testes to the inner abdominal wall. A sham operation was performed on the testicles of 60 control mice. The germinal epithelium maturity of scrotal and abdominal testes was graded histologically by using a modified Johnsen testicular biopsy score. By giving a score to each tubular section, from 1 to 10 according to the presence or absence as well as appearance of all germ cells, spermatogenesis was evaluated. Tubular biopsy scoring system appears to provide a reliable method for quantitating the changes in testicular biopsies from various disorders of the testes at different stages of maturation.

Key words: Testis, undescended testis, spermatogenesis.

Giriş

Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda, testislerdeki histopatolojik çalışmalar sadece spermatogonyum sayısına veya spermatozoaların

olup olmamasına göre değerlendirilmiştir^(1,2,3). Spermatogenez olayından sorumlu germ hücreleri, embriyodan puberteye kadar bir dizi farklılaşma gösterdiğinden tubuluslardaki hücrelerin hepsinin (Sertoli hücresi, spermatogonya, spermatozoid, spermatid ve spermatozoa) değerlendirme kapsamı içine alınmasının daha güvenilir bir yol olduğu düşünölmektedir^(4,5,6). Johnsen, tüm germ hücrelerini ve Sertoli hü-

Adres: Dr. Tansu Salman, İstanbul Tıp Fakóltesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

relerini olup olmamalarına göre, tubulusları derecelendirerek kantitatif bir metod tarif etmiştir⁽⁷⁾. Biz bu çalışmamızda Johnsen'in yöntemini modifiye ederek, farelerin skrotal ve abdominal testislerinin histopatolojik değerlendirmesini tubular biyopsi derecelendirme (TBD) metoduna göre yaptık ve bu kantitatif metodun güvenilirliğini gösterme çalıştık.

Gereç ve yöntem

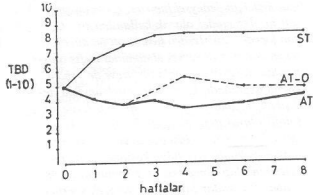
UCLA Cerrahi bölümü hayvan laboratuvarında, 10-12 gram ağırlığındaki 21 günlük erkek BALB/c ByJ farelere methoxyflurane ile genel anestezi verilerek laparotomi yapıldı. Doksan farenin sol testisleri karın ön duvarına tespit edildi (AT). Başka 60 farenin sol testislerine de sadece dikiş konularak skrotumda bırakıldı (ST). Abdominal testisli farelerin 30 tanesine 2 haf-

ta sonra orşiopeksi yapılarak testisler tekrar skrotuma indirildi (AT-O). Bu fareler 2,4 ve 6 hafta sonra öldürüldü. AT ve ST grubundaki farelerde ameliyattan 1,2,3,4,6 ve 8'inci haftalarda öldürüldüler. Bütün farelerin müdahale edilen sol testisleri biyopsi için hazırlandı. Her hafta her gruptan 10 biyopsi alınmış oluyordu. Biyopsilerin tümü kör metotla bir araştırmacı tarafından değerlendirildi. TBD metoduna göre germinal epitelyum şu şekilde derecelendirildi: 1) Işık mikroskopunda 25x mercekle kullanılarak çalışıldı, 2) Bir kesitte 25-50 tubulus değerlendirildi, 3) Her tubulus Tablo 1'de gösterildiği gibi 1'den 10'a kadar dereceler verildi, 4) Derecelendirilen tubulusların ortalaması alınarak her testis için TBD hesap edildi (Tablo 1).

TABLO I: Tubular biyopsi derecelendirmesi (TBD)

Derece	Germinal epitelyumun değerlendirilmesi*
10	Birçok spermatozoa (Tam spermatogenezis)
9	Spermatozoa sayısı az (5/tubülüs'den az)
8	Olgunlaşmış spermatozoa yok. Geç tip spermatidler mevcut (Spermatozoa'ya geçiş safhası)
7	Spermatid sayısı çok (5/tubülüs'den fazla), ancak farklılaşma belirtisi yok
6	Spermatid sayısı az (5/tubülüs'den az)
5	Birçok spermatozoa mevcut (5/tubülüs'den fazla)
4	Spermatozoa sayısı az (5/tubülüs'den az)
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonya var
2	Germ hücreleri yok; Sertoli hücreleri var
1	Tubülüslerde hiç hücre yok
0	Tubuluslar belirgin değil, nekroz var

* Eğer germinal epitelyumda belirgin bir düzen bozukluğu varsa veya lümen daralmışsa bir alt derece verilir.



Şekil 1: Üç haftalık farelerde deneysel abdominal testis (AT) oluşturulduktan sonra, Tubular Biyopsi Derecelendirmesi (TBD) değerlerinin kontrol grubu skrotal testislerle (ST) karşılaştırılması. Orşiopeksi yapılan farelerde (AT-O) TBD değerlerinin normalin altında olduğu görülmektedir. Deneğin 3. haftasından (Fareler 6 haftalık, puberte) sonra TBD değerlerinin değişmeden seyrettiği dikkati çekmektedir.

TABLO II. Skrotal ve abdominal testislerin TBD değerleri*

Deney takvimi (Hafta)	Farenin yaşı (Hafta)	ST	AT	AT-O
0	3	5.00±0.25		
1	4	6.89±0.63	4.22±0.87	
2	5	7.68±0.17	3.81±0.54	
3	6	8.28±0.25	4.06±0.44	
4	7	8.40±0.26	3.52±0.32	5.54±0.92
6	9	8.39±0.10	3.81±0.57	4.99±0.88
8	11	8.40±0.14	4.41±0.60	4.85±0.81

Değerler "Ortalama değer ± SH" olarak alınmıştır.

ST: Skrotal testis, fareler 3 haftalıkken kontrol amacıyla testislerine dikiş konularak "sham" işlemi yapıldı.

AT: Abdominal testis, fareler 3 haftalıkken testisler karın ön duvarına tespit edildi.

AT-O: Bu grubunda; deneğin 2. haftasında bir grup AT'ye orşiopeksi uygulandı.

*: Her hafta her grupta n=10; Her hafta ST ve AT karşılaştırmalarında P<0.001

Bulgular

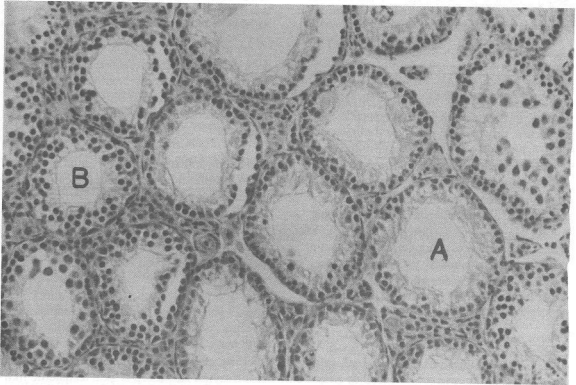
Bütün testislerde (AT, ST, AT-O), biyopsi sırasında vasküler dolanım iyiydi. Abdominal testislerin bütün haftalardaki TBD değerleri, skrotal testislerden önemli derecede düşüklük gösterdi ($p < 0.001$) (Tablo 2). AT ve ST grupları arasındaki bu fark ilk haftada ortaya çıktı ve fark ameliyat sonrası 3'üncü haftaya kadar artmaya devam etti (Şekil 1). Farelerin yaşının 6 hafta olduğu bu zamandan sonra, yani puberteden sonra hem AT hem de ST grubu testislerin TBD değerlerinde önemli bir değişiklik olmadı, ancak AT ve ST farkı çalışmanın son haftasına kadar devam etti. ST testislerine kıyasla AT testislerinde tubuluslarda daralmanın ve germ hücrelerindeki şekil bozukluğunun daha fazla olduğu dikkati çekti (Şekil 2 ve 3). Abdominal veya skrotal testislerin hiç birinde sellüler infiltrasyon görülmedi.

İlk girişimden 2 hafta sonra orşiopeksi yapılan

AT-O testislerinde TBD değerleri 4'üncü hafta AT değerlerinden yüksek olsa da, ST değerlerinden oldukça düşüktü (Tablo 2) (Şekil 1). Daha sonraki haftalarda da AT-O testislerin TBD değerlerinde hafif bir düşüş kaydedildi. Deney öncesi 3 haftalık farelerin testislerinin incelenmesinde, ortalama TBD değeri, 5.00 bulunmuştu ($SD \pm 0.25$, $n: 10$).

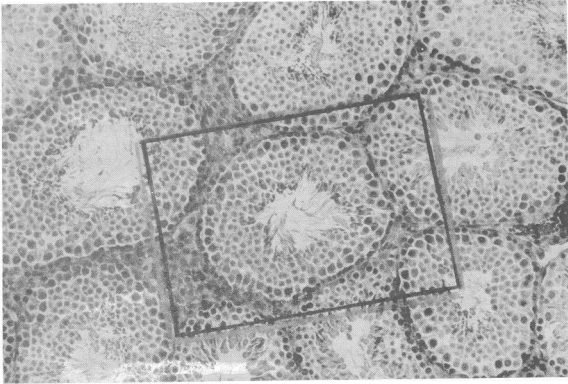
Tartışma

Normal gelişmekte olan testislerin ve patolojik testislerin üç önemli özelliği vardır. Birincisi, testis dokusunda genellikle homojen bir görünüm yoktur. Tam gelişmiş bir tubülüs ile gelişmesini tamamlamamış veya dejenere olmuş bir tubülüs yan yana bulunabilir. Böyle heterojen bir görünüm puberte öncesi gelişmekte olan bir testiste veya dejenerasyon olan patolojik bir testiste daha sık görülür. Gelişmesini tamamlamış normal testislerde de heterojen görünüme rastlanılabılır. İkincisi, gelişme saf-



Şekil 2: Deneyin 4. haftasında abdominal testisin ışık mikroskopunda incelenmesinde germinal epitelyumun gelişme-

sinin durmuş olduğu görülüyor. "A" tubülüsünde TBD:3, "B" tubülüsünde TBD:5. Orjinal büyüme X250, Hx E.



Şekil 3: Deneyin 4. haftasında, kontrol grubu testislerde germinal epitelyumun normal gelişmesi görülmekte. Kutu içindeki tubulusta her safhadaki germ hücreleri mevcuttur.

cut. Bu tubulüste spermatogenez tam ve TBD:10 olmasına rağmen aynı kesitte 8-10 TBD değerinde tubulların varlığı da dikkati çekmekte. Orijinal büyütmeye X250, Hx6.

hasında, germinal epitelyumun olgunlaşması, belli bir sıra içinde olmaktadır. Önce spermatogonyaya gelişir, sonra bunu sırasıyla spermatositler, spermatidler ve spermatozoa takip eder. Üçüncüsü, progresif dejenerasyon durumlarında da gelişimin aksi yönde bir sıra görülür. Önce en gelişmiş hücre olan spermatozoa kaybolur, bunu spermatidler, spermatositler ve spermatogonyalar takip eder. En son Sertoli hücreleri kaybolur^(7,8). Böyle heterojen bir dokunun histolojik değerlendirilmesinin kantitatif bir yöntemle ve bütün germ hücrelerini değerlendirmek için alınarak yapılmasını Johnsen önermiş ve 335 hastadan oluşan klinik çalışmasında testikular biyopsi derecelendirme yöntemini tarif etmiştir⁽⁷⁾.

İnmemiş testis, torsiyone testis ve hipogonadizm gibi testis patolojilerinde histopatolojik çalışma testisin durumunun incelenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Patoloğlar testis biyopsilerini detaylı tariflerle değerlendirmek-

tedirler. Literatürde, bu şekilde çalışma oldukça fazladır, fakat belli bir ölçü olmadığı için bu çalışmalarda bulguları birbirleriyle karşılaştırmak ve değerlendirmek çok zor olmaktadır^(9,10).

Genellikle kalitatif çalışmalar yapılmasına karşın, seminifer tubullerin çapının ölçülmesi, tubullerde spermatogonyum veya spermatozoa sayılması gibi kantitatif yöntemler de tarif edilmiştir^(7,2,3). Seminifer tubulus çapının ölçülmesi tubullerin büyüklüğü hakkında bilgi verir, ancak spermatogenezin olup olmadığını göstermede güvenilir bir yol olduğunu söylemek zordur. Spermatogonyum sayımı ise, ancak germinal epitelyumun gelişiminin ilk safhalarında yardımcı olabilir. Gelişimin ileri safhalarında, ağır testis patolojilerinde bile normal sayıda spermatogonyum bulunabilir (Şekil 2). Spermatozoa sayımı ise sadece erişkin testislerde fikir verebilecektir, çünkü germinal epitelyumun normal gelişiminin ilk safhalarında zaten sper-

matozoalar yoktur. Spermatogenez olayından sorumlu germ hücreleri embriyodan puberteye kadar bir dizi farklılaşma gösterdiklerine göre, gelişmekte olan bir testisin incelenmesinde spermatogony ve spermatozoa yanında, spermatosit ve spermatid gibi diğer germ hücrelerinin de değerlendirilmesi uygun olacaktır. Tarif edilen TBD yönteminde, tüm germ hücreleri değerlendirme kapsamına alındığından gelişmekte olan bir germinal epitelyumun değerlendirilmesinde daha güvenilir bir yol olacağı düşünülmektedir^(4,6,7).

Işık ve elektron mikroskobu çalışmalarında, hayvanlardaki spermatik tubullerdeki dejeneratif değişikliklerin insanlardaki gibi olduğu gösterilmiştir^(9,11,12,13,14). Kriptorşidizmde en belirgin şekilde etkilenen hücrelerin germinal hücreler olduğu, ancak Sertoli ve Leydig hücrelerinin de etkilenebileceği bu çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmamızda farelerdeki abdominal testislerin TBD değerleri, kontrol grubu skrotal testislerin TBD değerleri ile karşılaştırılarak, TBD yönteminin klinikte de gerektiği zaman kullanılabilceği vurgulanmak istenmiştir.

Şekil 1'de görüldüğü gibi, skrotal testisteki germinal epitelyumun yaşla paralel olarak olgunlaştığı, farelerde genellikle 6'ncı hafta olan puberteden sonra değişmeden kaldığı TBD değerleri ile gösterilmiştir. Abdominal testislerde ise spermatogenezin puberteden sonra yetersiz kaldığı yine TBD yöntemi ile gösterilebilmektedir. Deneysel inmemiş testis olgularına orşiopeksi yapılarak skrotuma indirilen testislerde ise TBD değerlerine göre spermatogenezis abdominal testislerden daha iyi olmasına rağmen, kontrol grubu değerlerinin çok altındadır. Bu orşiopeksinin erken devrede yapılmamış olmasına bağlanabilir. Her ne kadar bu deneysel çalışmada orşiopeksi ile TBD değerlerinde düzelleme gösterilmemişse de, TBD yöntemi ile klinikte orşiopeksi sonrası spermatogenezis değerlendirilmesinin mümkün olabileceği düşünülebilir.

Unilateral inmemiş testisin, kontralateral testise olabilecek etkilerinin gösterildiği diğer çalışmalarımızda da seminifer tubülüs çapının öl-

çülmesi yanında TBD yöntemi de kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kontralateral testiste spermatogenezide azalma olduğu TBD yöntemi ile kantitatif olarak gösterilmiştir^(4,5). Testisin vasküler yapısı ve kolleteralleriyle ilgili bir çalışmamızda da testisin durumu TBD yöntemi ile değerlendirilmiştir⁽¹⁵⁾.

Sonuç olarak, gelişmekte olan germinal epitelyumun incelenmesi ve spermatogenezisin kantitatif olarak değerlendirilmesinde TBD metodunun, spermatogonyum ve spermatozoa sayımından daha güvenilir bir yol olacağına inanmaktayız.

Çalışmalarımızda yardımcı olan başta Mr. Bonifacio Renard olmak üzere tüm UCLA Cerrahi hayvan laboratuvarı personeline teşekkür ederiz.)

Kaynaklar

1. Mengel W, Zimmerman FA: Immunologic aspects of cryptorchidism. Fonkalsrud EW, Mengel W (Ed) "The Undescended Testis", Chicago, Yearbook, Med, 1981, s:184.
2. Nagler HM, White RD: The effect of testicular torsion on the contralateral testis. J Urol 128:1343, 1982.
3. York JP, Drago JR: Torsion and the contralateral testicle. J Urol 133:294, 1985.
4. Salman FT, Adkins ES, Fonkalsrud EW: Morphological effects of unilateral cryptorchidism on the contralateral descended testis. Surg Forum 38:639, 1987.
5. Salman FT, Adkins ES, Fonkalsrud EW: Morphological effects of orchiopexy or orchiectomy on the contralateral testis in experimental unilateral cryptorchidism. Surgery, 1988 (Baskıda).
6. Frankenhuus MT, Wiegerinck MAHM, Schoorl M, Kremer J, Wensing CJG: The prevention of orchiopexy-induced testicular lesions in the pig. Eur J Pediatr 138,26, 1982.
7. Johnsen GJ: Testicular biopsy score count-A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1:2, 1970.
8. Kelly DE, Wood RL, Enders AC: Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy. 18. baskı, Baltimore, 1984, s:687.

9. Numanoglu I, Kockturk I, Mutaf O: Light and electron microscopic examinations of undescended testicles. J Pediatr Surg 4:614, 1969.
10. Molnar D, Leb J, Hidvegi J, Papp G: Follow-up examination of patients with undescended testicles. Acta Paediatr Acad Sci Hung 22:177, 1981.
11. Jones TM, Anderson W, Fang VS, Landau RL, Rosenfield RL: Experimental cryptorchidism in adult male rats: Histological and hormonal sequelae. Anat Rec 189:1, 1977.
12. Kiesewetter WB, Kalayoglu M, Sachs B: The effect of abnormal position scrotal repositioning and human gonadotropic hormone on the developing puppy testis. J Pediatr Surg 8:739, 1973.
13. Hadziselimovic F: Histology and ultrastructure of normal and cryptorchid testes. Hadziselimovic F (Ed) "Cryptorchidism" Berlin, Springer-Verlag, 1983, s:35.
14. Salman T, Gilholly P, Erbeni T: Tek taraflı inmemiş testis oluşturulan sıçanların sağ ve sol testislerinde ultrastruktür bulguları. İst Tıp Fak Mec 50:641, 1987.
15. Salman T, Adkins ES, Fonkalsrud EW: Yüksek inmemiş testis tedavisinde Fowler-Stephens yöntemi güvenilir bir yol mu? VII Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresinde sunulmuştur. Kayseri, Eylül 1987, Bildiri özetleri Kitabı.