

## NONOBSTRÜKTİF AZOOSPERMİ OLGULARINDA MİKROTESE SIRASINDA SEMİNİFER TUBÜL MORFOLOJİSİNİN KLİNİK ÖNEMİ

AH HALİLOĞLU, MAKAND, Ö YAMAN, Kaan AYDOS

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kısırlık Araştırma ve Uygulama Teşhis ve Tedavi Merkezi;  
ve Üroloji Anabilim Dalı

### ÖZET

**Objektif:** TESE ile matür spermatozoa bulma oranları sıklıkla %20 ile %95 arasında değişmektedir. Çalışmalar, tek biyopsi şeklinde çıkarılan testis dokusunda hücre bulma şansının çoklu biyopsilerde daha arttığını, mikrocerrahi yöntemle yapılan TESE'lerde ise en üst seviyeye ulaştığını ortaya koymuştur.

**Planlama:** Klinik çalışma.

**Ortam:** Ankara Üniversitesi Kısırlık Uygulama ve Araştırma Merkezi; Üroloji Anabilim Dalı

**Hastalar:** 65 nonobstrüktif azoospermi (NOA) olgusu.

**Girişim:** TESE ameliyatı sırasında seminifer tubüllerin mikroskopik görünimleri kaydedildi. Diğerlerinden farklı, en dolgun ve opak-beyaz olan tubüller çıkarılmaya çalışıldı. Bu özelliklerde tubül ayırt edilemediği zaman randomize biyopsiler alındı. Çıkarılan dokular androloji laboratuvarında stereomikroskop altında mekanik, arkasından enzimatik ayrıştırma işlemine alındı. X32 inversiyon mikroskobu büyütme alanında spermatozoa arandı.

**Değerlendirme parametreleri:** Optik büyütme altında seminifer tubüllerin görünimleri, spermatozoa elde etme oranları ve histolojik bulgular karşılaştırıldı.

**Sonuç:** Sertoli cell-only sendromu (SCOS), maturasyon duraklaması, hipospermatogenez ve fokal spermatogenez bulunan olgularda sırasıyla %37, %52, %100 ve %63 oranlarında TESE neticesi en az bir adet matür spermatozoa elde edildi. Ameliyat sırasında seminifer tubüllerin homojen olarak dolgun görünümde olduğu olguların tamamında histolojik değerlendirim hipospermatogenez, homojen olarak ince, şeffaf olduğu olguların ise %90'unda SCOS, %10'unda maturasyon duraklaması bulunduğu saptandı. Homojen-dolgun olması durumunda mikroTESE ile %100'ünde hücre bulunabilirken, homojen-ince tubül gözlenenlerin hiç birisinde matür spermatozoa elde edilemedi.

**Yorum:** Bu sonuçlar, mikroTESE sırasında testiste tüm tubüllerin homojen görünümde olduğu ve farklı yapıda başka tubül seçilemediği durumlarda, çıkarılacak tubüllerin belirlenmesinde mikroskop kullanılmasının bir üstünlük sağlamadığını, randomize alınacak biyopsilerin de yeterli olabileceğini ortaya koymuştur. MikroTESE, seminifer tubüllerin heterojen yapıda dağılım gösterdiği NOA olgularında spermatozoa bulunmasında başarıyı artırmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** mikroTESE, nonobstrüktif azoospermi, testis biyopsisi

### SUMMARY

#### Clinical Importance of Morphological Appearance of Seminiferous Tubules During MicroTESE in NOA Cases

**Objective:** Mature spermatozoa recovery rates of TESE differ usually from 20% to 95%. Studies revealed that multiple biopsies increase germ cell recovery rate with respect to single biopsy, but microsurgical TESE increases this chance to top.

**Corresponding Author:** Kaan AYDOS. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kısırlık Araştırma ve Uygulama Teşhis ve Tedavi Merkezi

Tel: (0312) 362 30 30 / 6815

Faks: (0312) 362 60 05

e.mail:ksaydos@superonline.com

Alındığı tarih: 22. 09. 2005, kabul tarihi: 17. 10. 2005

**Design:** Clinical study.

**Setting:** Research Center on Infertility, Ankara University; and Urology Department.

**Patients:** 65 men with nonobstructive azoospermia (NOA).

**Interventions:** Microscopical appearance of seminiferous tubules was recorded during TESE surgery. Differing from others, the largest opaque-white in color tubules were cut and removed. When all the tubules have no discriminating appearance, randomized biopsies were obtained. Removed tissue pieces were subjected to mechanical mincing under the stereomicroscope and then enzymatic digestion processes. Using inversion microscope (x32 magnification) spermatozoa were searched.

**Main Outcome Measures:** Morphological appearance of seminiferous tubules under optical magnification, spermatozoa recovery rates and histopathological findings were compared.

**Results:** In cases of Sertoli cell-only syndrome (SCOS), maturation arrest, hypospermatogenesis and focal spermatogenesis TESE yielded at least one spermatozoon in 37%, 52%, 100% and 63% of the cases, respectively. When all the seminiferous tubules were homogenously swollen, histopathological diagnosis was hypospermatogenesis in 100% of the cases. Homogenously thin and transparent tubules corresponded to SCOS or maturation arrest in 90% and 10% of the cases, respectively. Mature spermatozoa recovery rates were 100% and zero in homogenously-swollen observed and homogenously-thin observed tubules, respectively.

**Conclusions:** Present data indicate that in cases of all tubules are homogenous in appearance and none of them can be discriminated from others, using microscope has no advantage in selection of the tubuli to be removed, but randomizely selection would also be sufficient. MicroTESE significantly increases the success in NOA cases with seminiferous tubules dispersed heterogeneously.

**Key words:** microTESE, nonobstructive azoospermia, testicular biopsy

## GİRİŞ

Mikrocerrahi teknikle testislerden sperm eldesi (mikroTESE) nonobstrüktif azoospermik (NOA) hastalarda çocuk sahibi olma şansı vermiştir. TESE ile sperm elde etme oranları ortalama %50 civarında olmakla birlikte, sperm bulma şansını önceden tahmin ettirmede günümüzde kullanılan noninvaziv yöntemler yeterli değildir. Dolayısıyla intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ICSI'de kullanılmak üzere spermatozoa bulma başarısı büyük oranda cerrahi girişime kalmıştır. Gerçekten de ameliyat sırasında mikroskop kullanılması sperm elde etme başarısını anlamlı ölçüde artırır<sup>(1)</sup>. Optik büyütme altında farklı morfolojik görünüm ortaya koyan seminifer tubüllerin spermatozoa bulundurma oranları da değişmektedir. Bununla birlikte, benzer morfolojiye sahip tubüllerin germ hücre içerikleri her zaman doğru olarak tahmin edilemeyebilir. Tümü de normal kabul edilebilecek büyüklük ve renkte olan tubüller de bile ancak %72 oranında spermatozoa elde edilebildiği gösterilmiştir<sup>(2)</sup>.

Bu çalışmada, NOA tanısıyla mikroTESE yapılan bir grup infertil erkekte optik büyütme altında seminifer tubül morfolojilerinin klinik önemleri analiz edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

İnfertilite nedeniyle merkezimize başvuran, klinik ve laboratuvar tetkikleri neticesi NOA bulunduğu saptanarak mikroTESE yapılmasına karar verilen 65 erkek çalışma grubunu oluşturdu. Ortalama yaşları 35 olup, 23 ile 43 arasında değişmekteydi. Olgularda azoospermi tanısı, WHO kriterlerinde tanımlandığı şekilde konuldu<sup>(3)</sup>. NOA tanısı konulurken her olguda ayrıntılı tıbbi ve üreme hikayeleri alındı, fizik muayeneleri yapıldı. Testis boyutları ve ekojenitesi renkli Doppler ultrasonografi ile değerlendirildi. Serum FSH, LH ve testosteron (T) ölçümleri yapıldı (Vitros Immunodiagnostic Products, Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, UK). Vazal obstrüksiyon varlığı skrotal eksplorasyon sırasında elimine edildi. NOA tanısı; azoospermik erkekte testis volümlerinin normalin altında olması ve/veya FSH seviyesinin yükselmesi, obstrüksiyon bulunmaması durumlarında konuldu. Her olguda karyotip analizi istendi.

MikroTESE yöntemi kadında oosit toplanması ile eş zamanlı olarak planlandı. Doku örnekleri daha önce tanımlandığı şekilde mikroTESE yöntemiyle yapıldı<sup>(4)</sup>. Kısaca, optik büyütme kullanılarak (x8) avasküler alanda tunika albuginea üzerinden testisin volümüne uygun olarak 1.0-2.0 cm'lik transvers bir kesi ile girildi. Daha sonra x20 büyütme geçilerek testis parankimi

incelendi. Diğerlerinden daha dilate ve dolgun olduğu gözlenen opak-beyaz renkli seminifer tubüller ayırt edildi ve mikrocerrahi penset yardımıyla tutulduktan sonra makas ile kesildi. Normal tubül görülemediği durumunda daha geniş alanlarda aramaya devam edildi. Eğer hiç normal tubül seçilemediyse, diğerlerinden daha geniş olanlar çıkarıldı. Bütün tubüllerin aynı olduğu olgularda ise testisin üst-alt-sağ-sol taraflarından randomize olarak geniş doku parçaları alındı. Tunika albuginea 5-0 vicryl sütür ile kapatıldı.

Çıkarılan doku parçaları, içinde HEPES'li modifiye Eagle's MEM solusyonu bulunan petri kutularına alındı (5). Gerekli olgularda görüş alanını netleştirmek için eritrosit eritici solüsyon (ELB) kullanıldı(6). Önce stereo mikroskop altında mekanik teknikle doku ayrıştırması yapıldı ve inversiyon mikroskobu ile spermatozoa varlığı araştırıldı(7). Spermatozoa bulunan olgularda doğrudan ICSI'ye geçildi. ICSI uygulaması daha önce tarif edildiği şekilde yapıldı(8). 30 dakika süreyle aramaya rağmen spermatozoa bulunamaması durumunda ise doku süspansiyonu enzimatik ayrıştırma işlemine alındı ve bunu takiben ICSI yapıldı(7).

Her olguda aynı zamanda testis biyopsisi yapılmak üzere küçük bir doku parçası da çıkarılarak, Boin's solüsyonuna konuldu. Biyopsiler tek taraflı olarak, mekanik ayrıştırma sırasında spermatozoa bulunan lokalizasyonlardan seçildi. Eğer spermatozoa bulunamadıysa randomize alanlardan örnek alındı. Testis histolojileri hipospermatogenez (her seviyede spermatogenezin bulunduğu ama kantitatif olarak azalma görülmesi); maturasyon duraklaması (spermatogonium, spermatosit ya da spermatid seviyesinde maturasyonun ilerlememesi); ya da Sertoli cell-only (Seminifer tubüllerde hiç germ hücresi görülmemesi, SCOS) şeklinde sınıflandırıldı(9). Maturasyon duraklaması ya da Sertoli cell-only bulunan örneklerde aynı zamanda spermatogenez odaklarının da bulunması durumu fokal spermatogenez olarak değerlendirildi.

## SONUÇLAR

NOA saptanan olgularda klinik tanıları tablo 1'de gösterilmiştir. Enfeksiyon bulunan erkeklerde obstrüksiyon gelişmediği ortaya kondu. Karyotip anomalileri bir olguda markır kromozom 46,XY,t(9;15), bir olguda klasik Klinefelter's sendromu (47,XXY) ve ikisinde de 47,XXY/46,XY mozaik form olarak

gözlemlendi. Testis dışı neoplazm bir olguda Hodgkin's diğerinde ise lösemi şeklinde olup, daha önce siklofosfamid içeren kemoterapi uygulanmıştı.

**Tablo I:** 65 NOA olgusunda klinik değerlendirme sonuçları.

	Hasta sayısı (%)
İnmemiş/retraktıl testis	15 (24)a
Nontestiküler neoplazm	2 (3)
Geçirilmiş genital enfeksiyon	19 (30)
Sistemik lupus eritomatozis	1 (1)
X-ışınına maruziyet	2 (3)
Testiküler travma	3 (4)
Kabakulak orşiti	1 (1)
Nonspesifik orşit	3 (4)
Karyotip anomalisi	4 (6)
İdiyopatik	15 (24)
Toplam	65

a Tek taraflı (n = 4); bilateral (n = 1); bilateral retraktıl (n = 2); tek taraflı retraktıl (n = 7); tek taraf inmemiş + karşı taraf retraktıl (n = 1).

MikroTESE sırasında x20 büyütme altında tubüller incelendiğinde, tamamının dolgun ve büyük olarak bulunduğu olguların hepsinde de histolojik sonuç hipospermatogenez gelirken, tamamının ince ve olasılıkla boş olarak görülmesi durumunda ise %90'ında SCOS bulunmaktaydı. Heterojen dağılımda görünüm veren tubüllerde ise histolojik değerlendirim, geri kalan oranlarda dağılım ortaya koymaktaydı (Tablo II). Bunlarda heterojen alanlarda seçilen tubülün dolgun ya da ince olması ile histolojik incelenim sonuçları benzer tutarlılık oranları vermiştir. Bu nedenle fokal spermatogenez için tubül seçim kriterleri ayrı bir değerlendirmeye alınmamıştır.

**Tablo II:** Ameliyat sırasında dolgun ve büyük tubüller ya da ince, boş tubüllerin seçilmesine göre histolojik sonuçların karşılaştırılması.

Tabloda sadece tüm görüş alanlarında tubüllerin homojen olarak aynı görünümde olduğu olgular gösterilmiştir.

Ameliyat sırasında görünüm	Histolojik sonuç		
	No.	SCOS	Hipospermatogenez
Homojen-dolgun	3		3 (%100)
Homojen-ince	19	17 (%90)	2 (%10)

Optik büyütme altında homojen-dolgun seçilen tubüllerin tamamında matür spermatozoa elde edilebilirken, homojen-ince tubüllerin hakim olduğu olguların hiç birisinde ise spermatozoa elde edilemedi. Olguların doku histolojilerine göre mikroTESE ile en az bir motil spermatozoa elde etme oranları hesaplandığında ise toplam 65 NOA olgusunun

%57'sinde hücre elde edilebilmiştir (Tablo III).

**Tablo III:** Testis biyopsilerine göre spermatozoa bulma oranları.

Histoloji	Hasta sayısı	Spermatozoa bulunma oranı, n (%)
Sertoli cell-only	30	11 (37)
Hipospermatogenez	3	3 (100)
Maturasyon duraklaması	19	10 (52)
Fokal spermatogenez	13	8 (63)
Total	65	37 (57)

## TARTIŞMA

MikroTESE sırasında tubül seçim kriterleri yaygın olarak kabul edilmiş durumdadır. İlk defa Schlegel bu tekniği tanımlarken, içerisinde gelişmiş germ hücre sayısı fazla olan tubüllerin diğerlerinden farklı olarak daha geniş ve daha opak olduklarını ortaya koymuştur (10). Buna dayanarak da mikroskop altında yapılan TESE'lerde spermatozoa bulma oranlarının %45'den %63'e çıktığını göstermiştir. Başka araştırmacılar da mikroTESE ile spermatozoa elde etme oranının (%51) çoklu biyopsilemeden (%37) anlamı ölçüde yüksek bulunabileceğini bildirmiştir<sup>(1)</sup>.

Ancak, bu teknikte tubül seçimi esasen diğer tubüllere göre rölatif değişikliklere dayanmaktadır. Diğerlerinden daha geniş bir tubülün daha çok sayıda spermatogenez basamağı içermesi beklenir. Gerçekten de bu çalışmamızda, diğer tubüllerden bariz geniş ve opak görünümde tubüllerin gerek histolojik değerlendiriminde gerekse doku ekstraksiyonu sonrasında belirgin oranda yüksek spermatozoa gösterdiği ortaya konmuştur. Fokal spermatogenez saptanan, heterojen yapıda tubül dağılımı gösteren testislerde spermatozoa içeren tubülleri seçme oranları da bununla paralel olarak atılmıştır. Benzer şekilde, seminifer tubüllerde tubül başına düşen spermatid sayısındaki artışın, ekstraksiyon sonrasında spermatozoa elde etme oranlarını da yükselttiği gösterilmiştir. Bu sayı 5'in üzerindeyse sperm bulma oranları %100 iken, 4'ün altına indiği hipospermatogenez olgularında %81'e düşmektedir. Pür SCOS'da ise %25 olmaktadır<sup>(11)</sup>. Morfolojik yapıya bakılarak beş ya da 4 spermatid içeren tubüllerin ayrımı her zaman kolay olmayabilir. Her ne kadar çalışmamızda tüm dolgun tubüller hipospermatogenez sonucu vermiş olsa da, bunu kural olarak kabul etmek doğru olmaz. Seminal sıvıda spermatid çıkacak kadar fazla germ hücre üretimi olan olguların TESE sonuçlarında da başarının arttığı başka

çalışmalarda önerilmektedir<sup>(12)</sup>. Zaten, akım sitometrisi (flow cytometry-FCM) yöntemi ile seminal sıvıda haploid hücrelerin çıkma oranlarındaki artışa bakıldığında, TESE ile spermatozoa bulma oranlarındaki artışla paralellik gösterdiği anlaşılabilir<sup>(13)</sup>. Heterojen doku yapısı ile karşılaştığımız SCOS olgularımızdan ikisinde (2/13; %15) mikroskop altında dolgun ve opak tubüller seçmemize rağmen, ekstraksiyon sonrasında spermatozoa elde edemedik. Burada birçok faktör etken olabilir. Örneğin ödem nedeniyle tubüller yanıtıcı olarak dolgun görülmüş olabilirler. Ya da spermatid seviyesinde bir maturasyon duraklaması bulunmaktayken, yakınından aldığımız biyopsi örneklerinin histopatolojik incelenmesi aynı morfolojiyi yakalayamamış olabilir. Benzer şekilde, daha geniş ve opak tubüllerin seçilmesine rağmen olguların ancak %72'sinde spermatozoaya rastlanabileceği başka çalışmalarda da bildirilmiştir<sup>(2)</sup>. Yine de bulgularımıza göre, SCOS olgularında sperm varlığını ya da yokluğunu öngörmeye tubül morfolojisi yaklaşık %97 oranında tutarlı sonuç vermektedir.

Sonuç olarak, optik büyütme altında TESE yapılırken eğer tüm tubüller homojen olarak aynı yapıda seçiliyorsa bunların histolojik yapıları büyük oranda tahmin edilebilir. Her iki grupta da hücre elde etme oranlarının tam tutarlılık göstermesi nedeniyle, randomize doku çıkarılması yeterli olabilecektir. Ancak, hipospermatogenez saptanan olgu sayısının azlığı bu grupta kesin bir kanıya varmayı güçleştirmektedir. Her hipospermatogenez olgusunda mutlaka normal görünümlü tubüllerin bulunması kural değildir. Bunlarda normalden daha ince ve şeffaf tubüller de beklenebilir. Bu durumda spermatozoa elde etme oranları bakımından kesin öngörüle bulunmak her zaman mümkün olmayabilir. Tam bir yorum yapabilmek için daha geniş serilere ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Aydos K. Testiküler sperm ekstraksiyonu ile spermatozoa elde etmede mikrocerrahi yöntem ve çoklu biyopsi alma yönteminin karşılaştırılması. Üroloji Bülteni 2001;12:181-184.
2. Kamal A, Fahmy I, Mansour RT, Abou-Setta AM, Serour GI, Aboulghar MA. Selection of individual testicular tubules from biopsied testicular tissue with a stereomicroscope improves sperm retrieval rate. J Androl 2004;25:123-127.

3. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
4. Aydos K, Yaman Ö. Miro-Testiküler sperm ekstraksiyonu tekniği. Üroloji Bülteni 2005;16:5-10.
5. Islam I and Fishel S. Short-term in-vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in-vitro conception. Hum Reprod 1998;13:634-638.
6. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H et al. An improved treatment procedure for testicular biopsy specimens offers more efficient sperm recovery: case series. Fertil Steril 1997;68:376-379.
7. Aydos K, Demirel LC, Baltacı V, Unlu C. Enzymatic digestion plus mechanical searching improves testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia cases. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005;120:80-86.
8. Al-Hasani S, Demirel LC, Schopper B et al. Pregnancies achieved after frozen-thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissues from non-obstructive azoospermic men. Hum Reprod 1999;14:2031-2035.
9. Ezech U, Moore H, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. Hum Reprod 1998;13:3066-3074.
10. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod 1999;14:131-135.
11. Colpi GM, Piediferro G, Nerva F, Giacchetta D, Colpi EM, Piatti E. Sperm retrieval for intra-cytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. Minerva Urol Nefrol 2005; 57:99-107.
12. Ezech UI, Martin M, Cooke ID, Moore HD. Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. Hum Reprod 1998;13:3061-3065.
13. Koscinski I, Wittemer C, Rigot JM, De Almeida M, Hermant E, Defossez A. Seminal haploid cell detection by flow cytometry in non-obstructive azoospermia: a good predictive parameter for testicular sperm extraction. Hum Reprod 2005;20:1915-1920.