

AZOOSPERMİK HASTALARDA PELLET ANALİZİNİN ÖNEMİ

THE IMPORTANCE OF PELLET ANALYSIS IN AZOOSPERMIC PATIENTS

ARMAĞAN A., KÖKSAL İ.T., EROL H., TEFEKLİ A.H., USTA M., KADIOĞLU A.
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Son yıllarda mikromanipülasyon yöntemlerinden ICSI'nin erkek infertilitesinde uygulama alanı bulmasıyla azoospermimin sanal (pellet pozitif) ve gerçek (pellet negatif) olarak iki gruba ayrılması gündeme gelmiştir. ICSI sırasında kadından elde edilen ovum sayısı 6-10 arasında değiştiği için pellette sperm sayısı 5'ten fazla olan hastalar ICSI'ye yönlendirilebilirler. Bu çalışmanın amacı nedene yönelik cerrahi tedavi (varikosektomi, TUR-ED) düşünülmeyen azoospermik hastalarda ICSI adaylarını belirlemede pellet analizinin önemini ortaya koymaktır.

Ocak 1997-Kasım 1998 tarihleri arasında Androloji laboratuvarımızda 683 azoospermi saptandı. Pellet analizinde bu olguların 85'inde spermatozoa saptanmış olup kliniğimizde değerlendirilen 25 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalarda yaş, infertilite tipi ve süresi tespit edildi. Tüm hastalara fizik muayene ile beraber en az iki kez semen analizi yapılarak bir kez de hormon profili (FSH, LH ve serbest testosteron) bakıldı. Testis biyopsisi ve touch imprint 13 olguya uygulandı. Pellet analizinde sayı, hareket, morfoloji ve bazı olgularda vitaliteye bakıldı.

Hastaların ortalama yaşı 30.28 ± 6.1 (19-47), infertilite süreleri ortalama 5.0 ± 3.7 yıl (2-12 yıl)'dır. Serum FSH düzeyi 9 (%36) hastada normal sınırlarda iken, 16 (%64) hastada yüksek olarak bulundu. Biyopsi yapılan hastaların 4'ünde (%31) normal spermatogenez, 2'sinde hafif hipospermatogenez, 2'sinde orta hipospermatogenez ve 5'inde ağır hipospermatogenez tespit edildi. Pellet analizinde sperm sayısı 12 (%48) hastada 0-5 arasında, 13 (%52) hastada 5'den fazla bulundu.

Nedene yönelik tedavi düşünülmeyen azoospermik hastalarda pellet analizi yapılmalı ve toplam vital sperm sayısı 5'in üzerinde olan kişiler ICSI'ye yönlendirilmelidirler.

Anahtar Kelimeler: Azoospermi, pellet analizi, ICSI, infertilite

ABSTRACT

Recently, with the introduction of micromanipulation technique ICSI to the treatment of male infertility, there have been a tendency toward classifying azoospermia as virtual (pellet negative) and absolute (pellet positive). Because of oocyte number that can be harvested in an ICSI cycle is between 6 to 10, infertile men with more than 5 viable sperm cells in pellet can be referred to ICSI. The aim of this study is to determine the importance of pellet analysis in patients who are candidates for ICSI and not for specific treatment (e.g. Varicocele, TUR-ED).

Between January 1997 to November 1998, in our andrology laboratory, 683 patients were defined as having azoospermia. Spermatozoa were identified on pellet analysis in 85 out of 683 patients. Twenty-five of this patients evaluated in our clinic were enrolled into the study. Patients age, type and duration of infertility were recorded. Physical examination, semen analysis (at least 2x), hormone profile (FSH, LH, free testosterone) were obtained in all patients and 13 patients underwent testicular biopsy and touch imprint. In pellet analysis sperm count, motility, morphology and in some cases vitality were assessed.

The mean patient age was 30.28 ± 6.1 years (range 19-47), and the mean duration of infertility was 5.0 ± 3.7 years (range 2-12). Serum FSH level was within normal limits in 9 (36%) patients and was elevated in 16 (64%) patients. Histopathological analysis of testis biopsies revealed normal spermatogenesis in 4 patients, mild hypospermatogenesis in 2, moderate hypospermatogenesis in 2, and severe hypospermatogenesis in 5 patients. On pellet analysis more than 5 sperm was present in 13 (%52), 0-5 sperm was present in 12 (48%) patients. There was no correlation between testicular biopsy findings and number of sperm in pellet.

In azoospermic patient who are not candidates for causal therapy, pellet analysis should be performed and infertile men with more than 5 viable sperm in pellet should be referred to ICSI.

Key Words: Azoospermi, pellet analysis, ICSI, infertility

GİRİŞ:

Son yıllarda mikromanuplasyon yöntemlerinden ICSI (intracytoplazmic sperm injection) sayesinde tek bir matür spermatozoa ile gebeliğin sağlanabilmesi, eskiden evlat edinmeleri önerilen kişilerde çocuk sahibi olma imkanı sağlamıştır¹⁻⁴.

ICSI için tek bir matür spermatozoa'nın yeterli olması nedeniyle, rutin semen analizinde spermatozoa tespit edilemeyen ejakülatta yapılan pellet incelemesinde spermatozoa'nın bulunmasına göre azospermimin, gerçek (pellet negatif) ve sanal (pellet pozitif) azospermi olarak değerlendirilmesi gündeme gelmiştir⁵⁻⁷. ICSI sırasında kadından elde edilen ovum sayısının 6 ile 10 arasında değiştiği için canlı sperm sayısının 5'in üzerinde olması arzu edilmektedir⁸⁻¹¹. Spermatozoa'nın ejakülattan daha kolay ve non-invazif olarak elde edilebilmesi nedeniyle invazif sperm elde etme yöntemlerine başvurulmadan önce azospermik kişilerde pellet analizi yapılmalı ve yeterli sayıda canlı sperm tespit edilenler ICSI adayı olarak belirlenmelidirler¹²⁻¹⁴.

Bu çalışmanın amacı varikosektomi, TUR-ED gibi patolojiye spesifik cerrahi tedavi düşünülmeyen pellet pozitif azospermili hastalarda ICSI adaylarını belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 1997-Kasım 1998 tarihleri arasında Androloji laboratuvarımızda 4740 hastanın yapılan rutin semen analizinde 598'i (%88) pellet negatif, 85'i (%12) ise pellet pozitif olmak üzere toplam 683 (%14) azospermi tespit edildi. Pellet pozitif olduğu tespit edilen 85 hastanın 25'i infertilite polikliniğimizde değerlendirilirken, diğer 60 hasta merkezimiz dışında değerlendirilen fakat semen analizleri Androloji laboratuvarımızda yapılan hastalardır.

Infertilite polikliniğimizde değerlendirilen 25 pellet pozitif hastanın ayrıntılı anamnezi, yaşı, infertilite şekli (primer veya sekonder) ve süresi belirlendi. Her hastaya tam bir fizik muayene yapıldı. Tüm hastalara en az iki kez semen analizi yapılarak bir kez de hormon profili (FSH, LH ve serbest testosteron) bakıldı¹⁵. Varikoselden şüphelenilen hastalara renkli Doppler ultrasonografi yapıldı. Endikasyonu olan hastalara testis biyopsisi ve touch imprint yapıp histopatolojik olarak normal spermatogenez, hipospermatoge-

nez (hafif, orta, ağır), maturasyon arresti (erken, geç), germ hücre aplazisi + fokal spermatogenez ve germ hücre aplazisi şeklinde sınıflandırıldı¹⁶.

Pellet analizi

Rutin semen analizinde spermatozoa saptanmayan hastalarda tüm ejakülat 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek dipte oluşan çökeltiye (pellet) zarar vermeden 0.2 cc kalana kadar üsteki seminal sıvı atıldı ve pelletin tümü lam üzerine yayılarak 400x büyütme ile soldan-sağa, sağdan sola ve zigzag olarak tüm lamda spermatozoa arandı.

Pellet analizinde sayı, motilite (a motil: Hızlı ileri hareketli, b motil: Yavaş ileri hareketli, c motil: Yerde hareketli, d motil: Hareketsiz), morfoloji ve gerektiğinde vitalite bakıldı.

BULGULAR

Ocak 1997-Kasım 1998 tarihleri arasında infertilite polikliniğimizde değerlendirilen pellet pozitif 25 hastanın yaşları 19 ile 47 arasında değişmekte olup, ortalama 30.28 ± 6.1 'dir. Bu hastaların infertilite süreleri ortalama 5.0 ± 3.7 yıl olup 2 ile 12 yıl arasında değişmektedir.

Bu hastaların 23'ü (%92) primer infertil olup diğer 2'si (%8) ise sekonder infertildir. Hastaların 18'inde (%72) varikosel (9'u sol varikosel, 9'u bilateral varikosel) tespit edilirken, 4'ünde (%12) obstrüksiyon, 2'sinde (%8) primer testiküler yetersizlik ve 1'inde (%4) AML'ye bağlı gonadotoksik ilaç kullanımı saptandı.

Rutin semen analizinde bütün hastalar azospermik olup yapılan pellet analizinde sperm sayısı 12 (%48) hastada 0-5 arasında olup bunların 3'ünde sperm hareketli (a+b+c motil) iken, diğer 9'unda sperm hareketsizdi (d motil). Sperm sayısı 13 (%52) hastada 5'den fazla olup bunların 11'inde sperm hareketli (a+b+c motil) iken, diğer 2'sinde sperm hareketsizdi (d motil) (Tablo 1).

	Pellet sperm sayısı	
	≤5	>5
Hasta sayısı	12	13
a+b+c motil	3	11
Yalnız d motil	9	2

Tablo 1: Pellet değerlendirilmesi

Hastaların 16'sında (%64) FSH normalden yüksek (27.08 ± 25.24) olup 12 ile 113 mIU/ml arasında değişmektedir. Diğer 9 (%36) hastanın

FSH değerleri normal (2-10 mIU/ml) sınırlarda olup 4.7 ile 9.8 (6.1±2.3) arasında değişmektedir. FSH değeri normal ve yüksek olan hastaların testis volümleri ile FSH değerleri arasındaki ilişki tablo 2'de gösterilmiştir.

	n	sağ/sol	Testiküler volüm (cc)
Yüksek FHS	16	sağ sol	15.68 ± 5.57 (4-25) 15.37 ± 4.44 (4-22)
Normal FHS	9	sağ sol	20.22 ± 2.1 (16-25) 18.44 ± 2.6 (14-22)

Tablo 2: FSH değerleri ile testis volümleri arasındaki ilişki

On üç (%52) hastaya testis biyopsisi ve touch imprint yapıldı. Bu hastaların 9'unun (%69) FSH değerleri yüksek iken, 4'ünün (%31) ise FSH değerleri normal (2-10 mIU/ml) sınırlardadır. Bu hastaların 4'ünde (%31) normal spermatogenez tespit edilirken, diğer 9 (%69) hastada hipospermatogenez (2'si hafif hipospermatogenez, 2'si orta hipospermatogenez, 5'i ağır hipospermatogenez) tespit edildi. Pellet ile testis biyopsi bulguları arasındaki ilişki tablo 3'de gösterilmiştir.

Pellet sperm sayısı			
	n	≤5	>5
Normal spermatogenez	4	1(5)	3(7,8,12)
Hipospermatogenez			
Hafif	2	2(5,2)	-
Orta	2	2(5,2)	-
Ağır	5	3(2,2,3)	2(6,10)

Tablo 3: Pellet ile testis biopsisi bulguları arasındaki ilişki

TARTIŞMA

İnfertilite nedeniyle tetkik edilen erkeklerin yaklaşık olarak %5-20'sinde azoospermi tespit edilmekte olup bu oran bizim çalışmamızda %14 olarak bulunmuştur^{16,17}. Daha önce yardımcı üreme teknikleri ile dahi çocuk sahibi olma şansı bulunmayan kişilerde ICSI ile tek bir sperm kullanılarak gebeliğin sağlanabilmesi bu kişilere çocuk sahibi olma şansı vermiştir¹⁻⁴.

Kim ve ark.'ları FSH değerleri en az 3 kat yüksek ve testis atrofi olan azoospermik hastaların testis biyopsilerinde %30 oranında matür sperm tespit etmiş olup bu sonuç, primer testiküler yetersizlikte ejakülatta intermittan olarak ya da çok düşük konsantrasyonlarda sperm bulunabileceğinin bir göstergesidir¹⁸. Bizim çalışmamızda bulunan FSH değeri 113 mIU/ml ve testis volümleri 4'er cc olan bir hastanın yapılan pellet

analizinde sperm tespit edilmesi bu duruma iyi bir örnek oluşturmaktadır. Bundan dolayı rutin semen analizi sonrasında azoospermi tespit edilen hastalarda yapılan pellet analizinde sperm saptanabilmesi bu kavramı gerçek (pellet negatif) azoospermi ve sanal (pellet pozitif) azoospermi olarak değiştirmiştir⁵⁻⁷. Jaffe ve arkadaşları, pellet analizi ile non-obstruktif azoospermide %22.8 oranında, obstruktif azoospermide ise %18.6 oranında motil yada non-motil sperm tespit etmiştir¹⁹. Bizim laboratuvarımızda azoospermik hastalarda yapılan pellet analizinde %12 oranında motil ve non-motil sperm tespit edilmiştir. Bu hastalar içinde kendi kliniğimizde değerlendirilen 25 hastanın 12'sinde (%48) sperm sayısı 5 veya daha az iken, diğer 13'ünde (%52) ise sperm sayısı 5'den fazla olarak bulunmuştur. Sperm sayısı 5 veya daha az olan hastaların %25'inde sperm motil iken %75'inde ise non-motil olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık sperm sayısı 5'den fazla olan hastaların %85'inde sperm motil iken, %15'inde ise non-motil olarak tespit edilmiştir. ICSI'de motil sperm ile gebelik oranı non-motil sperme göre daha yüksek olarak bildirilmiştir^{11,20}. Bu çalışmada testis biyopsisi yapılan 13 (%52) hasta tubuluslardaki sperm sayısına göre ağır, orta, hafif hipospermatogenez ve normal spermatogenez olarak gruplara ayrılmış olup normal spermatogenez pellet analizi sonunda %75 oranında 5'den fazla sperm saptanırken, bu oran ağır hipospermatogenezde %40 olarak tespit edilmiştir. Pellet analizi sonucunda hafif ve orta hipospermatogenezde 5'in üzerinde sperm tespit edilmemiştir. Tournaye ve arkadaşları, ICSI için değerlendirdikleri azoospermik hastalarda ejakülatta normal spermatogenezde %19 oranında sperm saptarken bu oran hipospermatogenezde %27'dir. Aynı çalışmada ICSI ile gebelik oranı normal spermatogenezde %43.5, hipospermatogenezde ise %60'tır⁷.

ICSI için sperm ejakülata dışında testis ve epididimden de (TESA, MESA) sağlanabilmesine rağmen ejakülattan elde edilen sperm ile elde edilen başarı diğerlerine oranla daha yüksek olarak bildirilmektedir^{10,21}. Sperm ejakülattan elde edilmesinin bir diğer avantajı da non-invaziv olmasıdır^{10-14,21}. Jarow, testiküler arterlerin submikroskopik olarak ilerlediği ve end-arterler olduğunu bundan dolayı da biyopsi sırasında bu arterlerin yaralanması ile bir bölgenin devaskülarize olabile-

leceğini hatta major bir arterin yaralanmasıyla komplet devaskülarizasyon olabileceğini bildirmiştir²². Diğer bir risk intratestiküler kanama olup bunun açık biyopside görülme oranı %29 olup bu oran perkütan testis biyopsisinde %7'dir¹³. Tüm bu risklere karşı TESA ile non-obstruktif azospermide %38 oranında sperm elde edilememektedir²³. Pellet analizinin dezavantajı santrifuj sırasında serbest oksijen radikallerinin (SOR) yapımının artmasıdır²⁴. Serbest oksijen radikalleri özellikle doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Spermatozoa, plazma membranındaki fazla sayıdaki doymamış yağ asitleri nedeniyle serbest oksijen radikallerinin etkisine son derece duyarlıdır²⁵. İnfertil kişilerin semeninde SOR düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir²⁶. Testis dokusunda lipid peroksidasyonunun araştırıldığı çok az çalışma vardır. Kadioğlu ve arkadaşları, infertilite nedeniyle tetkik edilen hastalarda SOR düzeyinin indirekt göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyini normal spermatogenezde en düşük tespit ederken, en yüksek maturasyon arrestinde bulmuşlardır. Aynı çalışmada hipospermatogenez, germ hücre aplazisi + fokal spermatogenez, germ hücre aplazisi grubunda da MDA düzeyi normal spermatogeneze göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır²⁷.

ICSI'de bir canlı sperm ile gebelik sağlanabilmesine rağmen her siklüste elde edilen ovum sayısının 6 ile 10 arasında değişmesi nedeniyle bir siklüsteki gebelik başarısını arttırmak için pellette canlı sperm sayısı 5'in üzerinde olan kişiler ICSI için yönlendirilmelidirler⁸⁻¹¹. Bizim çalışmamızda yapılan pellet analizinde hastaların %52'sinde sperm sayısı 5'den fazla bulunmaktadır.

Sonuç olarak pellet analizinde sperm bulunan azospermik (sanal azospermi) hastalar ICSI'ye yönlendirilmeden önce varikosektomi ve TUR-ED gibi spesifik tedavilerden fayda görmediği tespit edilmelidirler. Bu nedenle ağır oligospermi veya sanal azospermiye neden olacak patolojiler dikkatlice gözden geçirilip patolojiye spesifik cerrahi tedavi düşünülmeyen pellet pozitif azospermili hastalar ICSI'ye yönlendirilmelidirler.

KAYNAKLAR

- 1- **Palermo G, Joris H, Devroey P, et al:** Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340: 17, 1992.
- 2- **Tournaye H, Devroey P, Liu J, et al:** Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril*, 61: 1045, 1994.
- 3- **Schlegel PN:** Micromanipulation of gametes for male factor infertility. *Urol Clin North Am*, 21: 477, 1994.
- 4- **Schlegel PN, Berkeley AS, Goldstein M, et al:** Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable azospermia. *Fertil Steril*, 61: 895, 1994.
- 5- **Kim ED, Leibman BB, Dimitri DM, et al:** Varicocele repair improves semen parameters in azospermic men with spermatogenic failure. *J Urol*, 162: 737, 1999.
- 6- **Matthews GJ, Matthews ED, and Goldstein M:** Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azospermia and severe oligoasthenospermia. *Fertil Steril*, 70: 71, 1998.
- 7- **Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, et al:** Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, 11: 127, 1996.
- 8- **Sherins RJ, Thorsell LP, Dorfmann A, et al:** Intracytoplasmic sperm injection facilitates fertilization even in the most severe forms of male infertility: pregnancy outcome correlates with maternal age and number of eggs available. *Fertil Steril*, 64 (2): 369, 1995.
- 9- **Kahraman S, Taşdemir M, Taşdemir I, et al:** Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. *Hum Reprod*, 11 (6): 1343, 1996.
- 10- **Nagy Z, Liu J, Cecile J, et al:** Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 63: 808, 1995.
- 11- **Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, et al:** The use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in patients with necrozoospermia. *Fertil Steril*, 66 (2): 331, 1996.
- 12- **Craft I, Tsirigotis M, Bennett V, et al:** Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management

- of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril*, 63 (5): 1038, 1995.
- 13- **Harrington T, Schauer D, and Gilbert B:** Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J Urol*, 156: 1647, 1996.
 - 14- **Laurence AL and Lisek EW:** Successful sperm retrieval by percutaneous epididymal and testicular sperm aspiration. *J Urol*, 159: 437, 1998.
 - 15- **World Health Organization:** Laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 1992.
 - 16- **Coburn M, Kim ED, and Wheeler TM:** Testicular biopsy in male infertility evaluation. In: *Infertility in the male*. 3rd ed. Edited by Lipschultz LI and Howard SS. St Louis: CV Mosby Co, chapt. 12, pp. 219-248, 1997.
 - 17- **Sigman M, Lipshultz LI, Howards SS:** Evaluation of the subfertile male. In: *Infertility in the male*. 3rd ed. Edited by Lipshultz LI and Howard SS. St Louis: CV Mosby Co, chapt. 9, pp. 173-193, 1997.
 - 18- **Kim ED, Gilbaug JH, Patel VR, et al:** Testis biopsies frequently demonstrate sperm in men with azoospermia and significantly elevated follicle-stimulating hormone levels. *J Urol*, 157: 144, 1996.
 - 19- **Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, et al:** Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *J Urol*, 159: 1548, 1998.
 - 20- **Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H, et al:** Intracytoplasmic sperm injection using an immobilized or motile human spermatozoon. *Fertil Steril*, 63: 1241, 1995.
 - 21- **Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, et al:** Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril*, 68: 108, 1997.
 - 22- **Jarow JP:** Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. *J Urol*, 156: 1647, 1991.
 - 23- **Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, et al:** Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology*, 49 (3): 435, 1997.
 - 24- **Shekarriz M, DeWire DM, and Thomas AJ:** A method of human semicentrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol*, 28: 31, 1995.
 - 25- **Aitken RJ, Buckingham D, and Harkiss D:** Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fert*, 97: 441, 1993.
 - 26- **Iwasaki A, and Gagnon C:** Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*, 57: 409, 1992.
 - 27- **Kadioğlu A, Köksal İT, Abbasoğlu S, Orhan İ, Uysal M:** Farklı testiküler patolojilerde lipid peroksidasyon düzeyi. *Türk Üroloji Dergisi*, 24: 250, 1998.