

Peran Teknik Immunohistokimia pada Studi Biopsi Testis Manusia

Paisal,¹ Kusmardi²

¹Program Doktor Ilmu Biomedik

²Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran, Universitas
Indonesia
Jakarta

Penulis korespondensi:

Dr. Drs. Kusmardi, MS.
Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran
Universitas Indonesia
Jakarta
Indonesia

ABSTRAK

Teknik IHK sangat bermanfaat dalam pengamatan biopsi testis, terutama ketika pengamatan dengan pewarnaan biasa masih memberikan hasil yang ambigu. Adapun teknik IHK banyak digunakan dalam penelitian terkait identifikasi azoospermia, identifikasi atau klasifikasi tumor pada testis, dan mengidentifikasi populasi sel germinal pada fetus yang kemudian dapat memberi informasi terkait asal-usul tumor pada testis. Pada makalah ini dibahas marker protein yang banyak diteliti pada penelitian terkait ketiga penerapan tersebut. Marker yang banyak diteliti untuk identifikasi populasi sel germinal fetus yaitu *placental alkaline phosphatase* (PLAP), C-KIT, CHK2, PCTAIRE-1, dan *melanoma antigen A4* (MAGE-A4), AP-2, OCT3/4, dan protein M2A. Sementara itu, marker yang banyak diteliti untuk identifikasi azoospermia yaitu DGCR8, iNOS, dan analisis profil makrofag dan sel Leydig. Adapun marker yang telah diteliti untuk identifikasi tumor testis yaitu C-KIT, OCT3/4, SOX2, NANOG dan DGF3.

PENDAHULUAN

Imunohistokimia (IHK) merupakan metode untuk menentukan lokasi dari suatu antigen dalam jaringan atau sel berdasarkan pengenalan antigen-antibodi yang dapat teramati dengan mikroskop cahaya.¹ IHK memiliki sejarah yang panjang, dimulai dari tahun 1940 ketika Coons mengembangkan teknik immunofluoresen untuk mendeteksi suatu antigen pada jaringan tersimpan.² Selanjutnya, teknik enzimatis yang dikembangkan oleh Nakane, merupakan era penting dalam imunohistokimia, karena reaksi tersebut dapat dilihat melalui mikroskop cahaya.³⁴ Inovasi tersebut membawa IHK melampaui lingkup eksklusif laboratorium yang dilengkapi dengan mikroskop fluoresensi dan teknik IHK menyebar ke sekelompok besar peneliti serta ahli patologi.⁵ Fase selanjutnya yaitu penemuan peroksidase-antiperoksidase (PAP) oleh Sternberger et al⁶ dan metode *alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase* (APAAP) oleh Mason et al⁷ yang secara signifikan memperluas penerapan IHK.⁶⁸ Molekul *diaminobenzidine* (DAB) terkonjugasi ke antibodi juga diperkenalkan pada periode yang sama,⁹ saat ini mewakili kromogen yang paling banyak digunakan untuk peroksidase.¹⁰ Perkembangan selanjutnya, partikel koloid emas diperkenalkan sebagai pewarna IHK¹¹ dan temuan tersebut mengarah pada metode IHK sub-seluler.¹²

Secara umum, teknik IHK dibagi menjadi dua tahap utama yaitu (1) preparasi slide (fiksasi spesimen dan pemrosesan jaringan) dan tahapan reaksi (secara berurutan: antigen *retrieval*, *blocking* ikatan non-spesifik, *blocking* peroksidase endogen, inkubasi antibodi primer dan aplikasi sistem deteksi, *counterstaining*, *mounting* serta penyimpanan). Sementara itu, tahapan ke dua yaitu (2) interpretasi dan kuantifikasi hasil.¹

Teknik IHK dapat diterapkan untuk analisis infertilitas melalui biopsi testis. Peran klinis dan pendekatan biopsi testis pada analisis infertilitas pria dimulai dari beberapa dekade yang lalu. Pada tahun-tahun pasca-perang dunia, terdapat banyak deskripsi yang menggambarkan sel-sel testis normal dari yang imatur hingga dewasa serta pola umum yang terlihat pada pria infertil.¹³ Percobaan deskripsi kuantitatif komponen testis dan sel germinal telah dilakukan untuk memahami proses yang memicu terjadinya kegagalan spermatogenesis. Johnsen mengusulkan sistem skoring untuk mendeskripsikan spermatogenesis secara kuantitatif. Johnsen membagi skor biopsi testis dari 1–10, berdasarkan profil sel yang ada dalam tubulus seminiferus. Skor 10 menunjukkan spermatogenesis maksimal sedangkan skor 1 menunjukkan tidak adanya sel germinal.¹⁴ Meskipun demikian, skor Johnsen memiliki beberapa kekurangan. Oleh karena itu, penggunaan marker IHK dapat memberikan akurasi yang lebih tinggi pada diagnosis histopatologi, khususnya biopsi dengan fenotip histologi campuran. Adapun marker protein yang berpotensi sebagai penanda infertilitas, khususnya azoospermia yaitu DGCR815, iNOS16, serta analisis profil makrofag dan sel Leydig.¹⁷

Teknik IHK juga dapat digunakan pada beragam penelitian terkait neoplasia termasuk di antaranya diagnostik pada neoplasia yang tidak mengalami diferensiasi morfologi, menentukan sub-tipe neoplasia, karakterisasi tempat utama malignansi neoplasia, serta diskriminasi sel jinak dan ganas. Selain itu, IHK juga digunakan dalam penelitian terkait faktor prognosis dan terapi beberapa penyakit, identifikasi struktur, identifikasi organisme, dan identifikasi material yang disekresikan oleh sel.¹⁸⁻²² Pewarnaan Hematoxylin-eosin (HE) sebenarnya cukup untuk melakukan diagnosis beberapa tumor pada testis. Walaupun demikian, pada beberapa kondisi analisis IHK diperlukan untuk memperoleh hasil yang lebih akurat. Misalnya pada kasus diagnosis tumor dengan susunan sel saling berdifusi yang memiliki sitoplasma yang pucat atau bening, tumor dengan pola glandular/tubular, tumor dengan pola mikrosistik, dan tumor oxyphilic. Signifikansi klinis dari proliferasi intratubular sel atipikal, dan sel atipikal yang tidak diketahui juga dapat diklarifikasi melalui IHK.²³ Contoh marker tumor yang telah

dieksplorasi di antaranya OCT3/4, C-KIT, NANOG dan SOX2.²⁴

Di antara manfaat teknik IHK yang paling mendasar pada analisis testis ialah untuk mengetahui proses spermatogenesis itu sendiri. Terlebih, pada periode sebelum pembentukan spermatogonia pada embrio/fetus. Penggunaan marker protein dan analisis pola ekspresi protein marker tersebut dapat memberi hasil yang lebih tepat untuk mendukung analisis morfologi. Disamping itu, teknik IHK juga mungkin berguna dalam mengevaluasi kemungkinan asal sel germinal karsinoma metastasis mengingat terdapat hipotesis bahwa sel germinal pada fetus merupakan sumber atau asal dari karsinoma in situ atau intratubular germ cell neoplasia unclassified (IGCNU).²⁵ Dari sekian banyak manfaat teknik IHK, dalam makalah ini akan dibahas terkait penerapan IHK pada analisis testis manusia di antaranya analisis spermatogenesis (pada fetus), analisis infertilitas khususnya azoospermia, dan analisis tumor.

Peran IHK dalam Studi Spermatogenesis pada Fetus

Pada manusia, populasi sel germinal dalam testis fetus dikenal dengan istilah gonosit sering disamakan dengan populasi gonosit dari hewan pengerat yang bersifat homogen. Hal tersebut berlandaskan pada hasil penelitian yang menunjukkan adanya ekspresi protein DAZL26, VASA27 dan CHK228 pada semua sel germinal selama trimester kedua. Bertentangan dengan teori tersebut, pengamatan morfologi menunjukkan adanya sub-populasi yang berbeda-beda pada sel germinal fetus. Adapun sub-populasi sel germinal tersebut diklasifikasikan menjadi dua kategori oleh Wartenberg, 1976²⁹ atau tiga kategori oleh Fukuda et al, 1975.³⁰

Wartenberg, 1976 mengklasifikasikan sel germinal fetus menjadi gonosit dan pro-spermatogonia. Istilah gonosit merujuk pada populasi sel germinal yang telah bermigrasi ke korda testikular. Gonosit memiliki ciri khas yaitu adanya kandungan material sitoplasma granular (mengandung glikogen), memiliki nukleus besar dengan kromatin yang jarang, dan posisi sel yang dekat dengan basal lamina pada batas jaringan ikat. Sementara itu, pro-spermatogonia merupakan sel yang mirip spermatogonia pada pria dewasa. Pro-spermatogonia memiliki ciri berupa tingginya frekuensi mitosis, sehingga

diberi istilah M-pro-spermatogonia. M-pro-spermatogonia kemudian digantikan oleh transitional pro-spermatogonia atau T1-pro-spermatogonia yang tidak membelah atau resting dan selanjutnya diganti oleh T2-pro-spermatogonia.²⁹

Klasifikasi sel germinal juga dilakukan oleh Holstein et al, 1987. Holstein mengidentifikasi sel germinal pada embrio dengan usia 8, 10, 13 dan 22 minggu. Pada usia ke-8 minggu, sel germinal terletak pada korda testikular dan dapat dikenali melalui mikroskop karena banyaknya kandungan glikogen. Sel tersebut memiliki nukleus dan nukleolus yang besar. Sitoplasma sel mengandung mitokondria berbentuk bulat dengan struktur tubulus internalnya tampak sedikit mengalami dilatasi. Aparatus Golgi kurang terlihat mencolok. Banyak glikogen ditemukan dan terdistribusi merata pada sitoplasma kecuali pada ruang marginal di bawah plasmalema. Sel dengan karakteristik tersebut diklasifikasikan sebagai gonosit. Karakteristik sel yang tampak pada embrio usia 8 minggu ternyata juga muncul pada embrio yang berusia 10 minggu serta pada beberapa sel di usia 13 minggu. Pada usia fetus yang lebih dari 13 minggu, populasi sel dengan karakteristik yang berbeda dengan gonosit dapat teridentifikasi dengan ciri-ciri yang lebih mirip dengan spermatogonia. Sel germinal pada usia fetus yang lebih tua memiliki nukleus dan nukleolus yang tampak lebih besar serta glikogen tidak lagi nampak pada pengamatan. Terdapat pula sel yang memiliki ciri fetal spermatogonia, mitokondria yang bulat namun memiliki struktur internal cristate dan saling terhubung satu sama lain melalui intermitochondrial cement.³¹

Berbeda dengan klasifikasi sel germinal fetus oleh Wartenberg 1976, Fukuda & Hedinger 1975 mengklasifikasikan sel germinal menjadi tiga kategori, yaitu gonosit, sel intermediet dan fetal spermatogonia. Klasifikasi tersebut didasarkan pada analisis ultrastruktur sel germinal fetus usia 9 sampai 30 minggu. Gonosit memiliki rasio nukleo-sitoplasma tertinggi di antara tiga sub-populasi sel. Nukleus pada sel gonosit berisi nukleolus yang mencolok dan terletak pada bagian tengah.

Sitoplasma sel gonosit memiliki aparatus Golgi yang berkembang dengan baik, droplet lipid, dan susunan paralel cisternae pendek dari RE kasar. Selain itu, banyak terdapat mikrofilamen khususnya pada bagian bawah membran sel.

Sementara itu, sel intermediet memiliki ciri yaitu mengandung sejumlah rER dengan cisternae yang panjang, bercabang dan/atau melebar yang terhubung ke cisternae perinuklear. Sel intermediet terhubung satu sama lain oleh jembatan sitoplasma anta-sel. Adapun sub-populasi ketiga yaitu fetal spermatogonia yang juga memiliki jembatan sitoplasma. Fetal spermatogonia memiliki rasio nukleo-sitoplasma yang rendah dan kromatin inti yang lebih padat. Mitokondria terletak dekat dengan nukleus dan antar mitokondria dihubungkan oleh zat semen (cementing substance). Selain itu, droplet lipid dan sisterna rER jarang ditemukan pada sel-sel Fetal spermatogonia.³⁰

Pengetahuan rinci terkait proses diferensiasi merupakan prasyarat untuk mengidentifikasi perubahan patologis pada diferensiasi sel germinal. Oleh karena itu, penelitian di tahun-tahun berikutnya tidak hanya berfokus pada morfologi saja namun dilakukan evaluasi pola ekspresi protein pada testis fetus dan kaitannya dengan perubahan morfologi sel atau diferensiasi sel germinal. Penelitian tersebut memungkinkan untuk dilakukan dengan penerapan metode IHC. Adapun protein yang berpotensi sebagai marker untuk mengidentifikasi sub-populasi sel germinal pada testis fetus di antaranya placental alkaline phosphatase (PLAP)³², C-KIT³³, OCT4³⁴, CHK2³⁵, PCTAIRE-1³⁶, dan melanoma antigen A4 (MAGE-A4) (Tabel 1)³⁷. Di tahun 2004, Gaskell et al kemudian melakukan penelitian lebih lanjut terkait pola ekspresi keenam protein tersebut dan kaitannya dengan morfologi sel germinal pada testis fetus.³⁸ Penelitian oleh Gaskell et al kemudian dikonfirmasi oleh Pauls et al di tahun 2006 dengan menggunakan marker protein c-KIT, AP-2, OCT3/4, protein M2A, dan MAGE-A4.³⁹

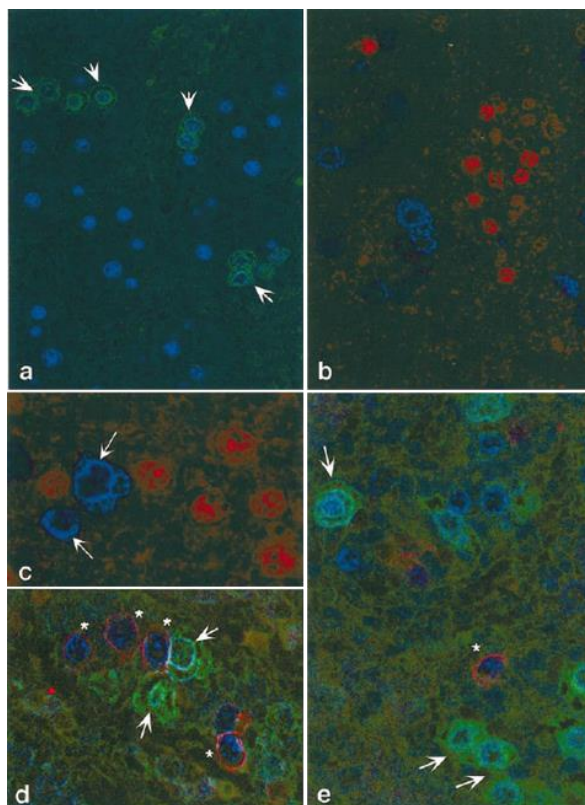
Tabel 1. Protein marker yang telah diteliti untuk mendeteksi sub-populasi sel germinal pada fetus.

Protein	Keterangan	Referensi
PLAP	Plasenta alkaline phosphatase (PLAP) adalah 70-kDa alkaline phosphatase dan biasanya diekspresikan dalam <i>syncytiotrophoblasts</i> , sel germinal primordial, sel tumor seperti karsinoma paru, ovarium, gastrointestinal, dan uterus. PLAP merupakan homodimer terikat membran, dan setiap subunit protein memiliki panjang 535 asam amino serta dikodekan oleh gen yang berada pada kromosom 2q. PLAP diduga berperan dalam migrasi sel germinal primordial yang tepat pada janin yang sedang berkembang.	4041424344
CHK2	CHK2 merupakan protein nuklear, anggota dari subfamili CDS1 dari serin/treonin protein kinase. Protein CHK2 diduga merupakan regulator <i>checkpoint</i> siklus sel dan supresor tumor. Protein ini memiliki yang penting untuk aktivasi sebagai respons terhadap kerusakan DNA dan dengan cepat terfosforilasi sebagai respons terhadap penghambatan replikasi dan kerusakan DNA. Ketika teraktivasi, protein CHK2 menghambat fosfatase CDC25C, mencegah dimulainya mitosis, dan telah terbukti menstabilkan protein supresor tumor p53, yang menyebabkan penghentian siklus sel di G1. Selain itu, protein ini berinteraksi dengan dan memfosforilasi BRCA1 setelah terjadi kerusakan DNA.	28
C-KIT	Reseptor c-kit tirosin kinase termasuk dalam subfamili reseptor PDGF/CSF-1/c-kit. Reseptor proto-onkogen c-kit dan ligannya, ligan kit diduga berperan dalam migrasi sel germinal dari <i>yolk sack</i> gonad yang sedang berkembang dan juga berperan bagi kelangsungan hidup dan perkembangan selanjutnya.	3345
MAGE-A4	Keluarga gen MAGE terdiri dari 17 gen dan dibagi menjadi 3 kelompok (MAGE-A, MAGEB, dan MAGE-C). Keluarga gen MAGE-A terdiri dari 12 gen yang diaktifkan pada tumor, termasuk melanoma, karsinoma kandung kemih, karsinoma kolorektal, karsinoma lambung dan karsinoma payudara. Selain itu, percobaan imunohistokimia menunjukkan adanya ekspresi protein MAGE di testis manusia, khususnya pada spermatogonia.	46
OCT3/4	Gen OCT mengkode faktor transkripsi yang memiliki <i>POU-specific domain</i> dan homeodomain. OCT-3 diekspresikan pada totipoten dan pluripoten stem sel dari pregastrulasi embrio dan didownregulasi selama diferensiasi menjadi endoderm dan mesoderm. OCT-3 juga diekspresikan pada primordial germ cell	34
PCTAIRE-1	PCTAIRE-1 adalah anggota dari keluarga cyclin-dependent kinase (cdk). Aktivitas PCTAIRE-1 bergantung pada siklus sel dan memiliki aktivitas tertinggi pada fase S dan G2.	47

Berdasarkan pola ekspresi protein marker, Gaskell et al mengklasifikasikan sel germinal sebagai gonosit, sel intermediet, dan pre-spermatogonia. Gonosit adalah populasi sel tunggal bulat dicirikan sebagai OCT4^{pos}/C-KIT^{pos}/MAGE-A4^{neg}. Sel intermediet biasanya muncul dengan berpasangan dan ditandai sebagai C-KIT^{neg}/MAGE-A4^{neg}/OCT4^{low/neg}.³⁸ Kedua populasi sel tersebut mengekspresikan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA).⁴⁸ Oleh karena itu, kedua populasi sel tersebut dapat digolongkan sebagai M-pro-spermatogonia menurut kriteria yang dibuat oleh Wartenberg.²⁹ Populasi ketiga yaitu sel-sel yang mengekspresikan OCT4^{neg}/C-KIT^{neg}/MAGE-A4^{pos} dan digolongkan sebagai pre-spermatogonia. Populasi pre-spermatogonia tidak mengekspresikan PCNA⁴⁸ sehingga diklasifikasikan pula sebagai T1-spermatogonia jika menggunakan kriteria yang dibuat oleh Wartenberg.²⁹

Dari hasil penelitian oleh Gaskell et al dapat disimpulkan bahwa di trimester pertama, sebagian besar sel germinal merupakan gonosit, namun selama periode trimester selanjutnya, populasi gonosit yang berbeda yaitu sel intermediet dan prespermatogonia terdeteksi dalam korda testis.³⁸

Di sisi lain, analisis IHK oleh Pauls et al menunjukkan bahwa terdapat dua populasi sel germinal fetus yang berbeda selama trimester kedua dan ketiga. Populasi pertama memiliki karakteristik seperti gonosit dan sel intermediet jika menurut kriteria yang dibuat oleh Fukuda et al. Adapun populasi tersebut mengekspresikan c-KIT, M2A, OCT3/4 dan AP-2γ. Sementara itu, populasi yang kedua cocok dengan kriteria morfologi pre-spermatogonia dan dicirikan dengan adanya ekspresi MAGE-A4. Meskipun demikian, terdapat satu sel intermediet yang mengekspresikan MAGE-4. Pauls et al kemudian menyimpulkan bahwa penemuan tersebut sesuai dengan gagasan bahwa sel intermediet mewakili tahap transisi dari gonosit ke pre-spermatogonia.³⁹



Gambar 1. Hasil pewarnaan imunofluoresen sel germinal manusia pada trimester kedua dengan marker OCT4/C-KIT/MAGE-A4. (a) CHK2 (biru) dan MAGE-A4 (hijau) pada usia 16 minggu terko-ekspresi pada sub-populasi sel germinal (tanda panah), namun lebih banyak sel dengan CHK2^{pos} yang tidak berko-ekspresi dengan MAGE-A4. (b dan c) pada minggu ke-17, pewarnaan dengan OCT4 (merah) dan MAGE-A4 (biru, tanda panah pada c) menunjukkan bahwa tidak terjadi ko-ekspresi pada kedua protein tersebut. (d dan e) Pada minggu ke-16 dan ke-19 pewarnaan tripel dilakukan dengan marker CKIT (merah), CHK2 (biru), dan MAGE-A4 (hijau). Tidak terdapat sel germinal yang mengekspresikan C-KIT and MAGE-A4 secara bersamaan, namun CHK2^{pos}/C-KIT^{pos} (tanda bintang) dan populasi CHK2^{pos}/MAGE-A4^{pos} (tanda panah pada d, e) muncul di tubulus seminiferus.³⁸

Peran IHK dalam Studi Diagnosis Azoospermia

Azoospermia adalah kondisi tidak ditemukannya sama sekali spermatozoa pada cairan semen yang diejakulasikan. Terdapat dua tipe azoospermia yaitu tipe obstruktif dan tipe non obstruktif (NOA). Pada azoospermia tipe obstruktif, produksi spermatozoa masih berjalan dengan baik namun ditemukan adanya sumbatan pada saluran transportasi spermatozoa, dari tempat produksi di tubulus seminiferus sampai ke uretra. Adapun struktur yang sering mengalami gangguan pada azoospermia tipe obstruktif yaitu

epididimis, vas deferens, atau duktus ejakulatorius. Penyebab yang dapat menimbulkan gangguan pada struktur tersebut antara lain trauma atau cedera, infeksi, inflamasi, pasca pembedahan area pelvis, pertumbuhan kista, atau kelainan genetik berupa fibrosis kistik.^{49,50}

Berbeda halnya dengan azoospermia tipe obstruktif, pada azoospermia tipe NOA terjadi gangguan dalam produksi spermatozoa. Penyebab azoospermia NOA dapat berupa faktor genetik (*Kallmann Syndrome*, *Klinefelter Syndrome*, dan delesi kromosom Y), gangguan endokrin (ketidakseimbangan hormon, hiperprolaktinemia, dan resistensi androgen), gangguan ejakulasi (cairan seminalis masuk ke dalam kandung kencing), penyakit yang menyerang testis (*Cryptorchidism*, *Sertoli cell-only syndrome*, *Mumps orchitis*, torsio testis, tumor), dan pengaruh obat-obatan atau zat tertentu (bisphenol A, dan radiasi).⁴⁹ Sub-tipe NOA dikategorikan ke dalam tiga kelas utama yaitu *Sertoli cell-only syndrome* (SCOS), *meiotic arrest* (MA), dan *hypospermatogenesis* (HYPO).⁵¹ SCOS merupakan gangguan spermatogenesis yang parah yang ditandai dengan hanya sel Sertoli saja yang melapisi tubulus seminiferus. Sementara itu, MA merupakan gangguan pada pematangan sel germinal akibat terhentinya spermatogenesis pada tahap meiosis. Adapun HYPO merupakan gangguan pada produksi sperma, proses spermatogenesis umumnya terhenti pada tahap spermatosit atau tahap spermatid bulat.^{52,53}

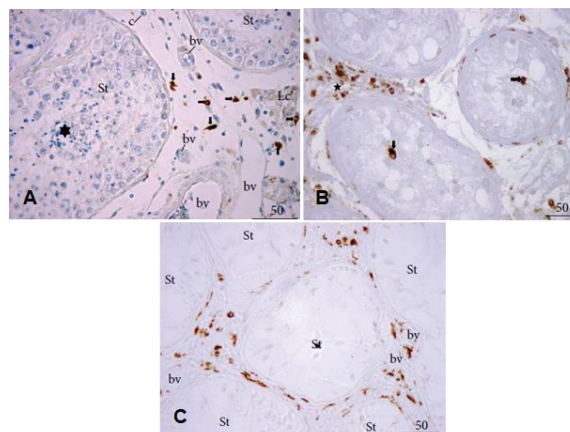
Karena kurangnya biomarker yang cocok dan terbatasnya data yang tersedia untuk melakukan pemulihan produksi sperma, terkadang operasi yang kurang tepat sasaran dilakukan pada pasien. Oleh karena itu, banyak dilakukan penelitian untuk mencari marker gen, marker serum, dan marker protein, serta pengembangan teknik yang lebih sensitif dan non-invasif untuk deteksi spermatogenesis pada testis individu azoospermia. Pada pasien NOA, tes diagnostik yang baik dapat memiliki banyak manfaat, seperti penilaian yang lebih rinci dari sub-tipe histopatologi, prognosis hasil *testicular sperm extraction* (TESE), dan perencanaan yang baik untuk *assisted reproductive technology* (ART).¹⁵

Di tahun 2014, Goluz et al melakukan eksplorasi profil IHK sel makrofag dan Leydig pada pasien infertil yang nantinya dapat digunakan sebagai penanda dalam diagnosis azoospermia.¹⁷ Interaksi sel Leydig dan makrofag

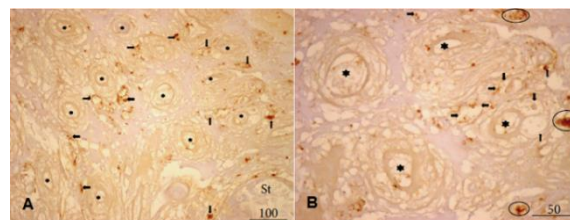
di jaringan interstisial testis pertama kali diamati pada akhir tahun 1960-an. Interaksi tersebut menunjukkan bahwa makrofag interstisial testis dan sel Leydig secara fungsional mungkin terkait. Adapun tiga fungsi klasik makrofag antara lain (1) imunoregulasi - dengan mempresentasikan antigen dan sebagai ko-stimulator termasuk sekresi sitokin; (2) fagositosis dan remodeling jaringan; dan (3) sintesis prostaglandin, *growth factor*, sitokin dan *reactive oxygen species*.⁵⁴ Meskipun makrofag pada testis memiliki banyak karakteristik umum seperti makrofag di tempat lain, makrofag pada testis memiliki sifat yang unik, yang diduga penting untuk interaksi makrofag dengan sel Leydig. Selain itu, makrofag testis menunjukkan pola sekresi protein yang berbeda dari makrofag peritoneal.⁵⁵ Di bawah kondisi non-inflamasi dan kondisi fisiologis yang normal, makrofag memiliki peran penting dalam perkembangan sel Leydig. Jika makrofag tidak muncul pada interstitium testis, perkembangan sel Leydig menjadi terganggu. Oleh karena itu, makrofag diduga menyediakan faktor pertumbuhan dan diferensiasi sel Leydig. Sebaliknya, pada pria infertil dengan gangguan spermatogenesis, ketika makrofag diaktifkan dan mengeluarkan mediator inflamasi justru akan mengganggu steroidogenesis sel Leydig.⁵⁴

Analisis IHK sel makrofag dapat dilakukan dengan marker protein CD68. Dalam testis pasien OA, CD68 diekspresikan dalam jumlah sedang oleh sel-sel dalam jaringan ikat longgar interstisial. Sementara itu, dalam tubulus seminiferus sama sekali tidak ditemukan sel yang mengekspresikan CD68. Berbeda dengan kasus OA, dalam biopsi pasien NOA, sel yang mengekspresikan CD68 banyak ditemukan di jaringan interstisial. Makrofag menyusup ke daerah Sel Leydig serta lamina propria seminiferus tubulus. Selain itu, makrofag ditemukan melintasi dinding tubulus dan menginvasi epitel seminiferus serta lumen tubulus. Terdapat pula sel positif CD68 di dekat pembuluh darah (Gambar 2A-B).¹⁷

Sel Leydig dari biopsi NOA menunjukkan ekspresi testosteron yang beragam. Beberapa sel memiliki intensitas sinyal normal, sedangkan beberapa sel lainnya menunjukkan ekspresi testosteron yang lemah dan tidak teratur (Gambar 3A-B). Selain itu, di beberapa sel terjadi ekspresi testosteron yang berlebihan (Gambar 3A). Sinyal tidak teratur dan tidak homogen tersebut ditemui dalam sel Leydig yang memiliki vakuola di sitoplasmanya.^{17,54}



Gambar 2. A. Biopsi dari pasien OA dengan spermatogenesis yang normal. Di dalam tubulus seminiferus (St) terdapat banyak elongated spermatid (*). Di antara St terdapat makrofag dengan jumlah sedang (positif CD68, →). Tidak terdapat makrofag di dalam St (Lc, Klaster sel Leydig; bv, pembuluh darah). B. Biopsi dari pasien dengan NOA. Tubulus seminiferus (dilapisi dengan hanya sel Sertoli saja atau beberapa spermatogonia) dikelilingi oleh jaringan ikat longgar yang banyak mengandung sel CD68 positif (*). Beberapa dari sel-sel tersebut melekat ke lamina propria, atau menginvasi lumen tubulus (→). C. Biopsi dari pasien dengan NOA. Tubulus seminiferus (St) menunjukkan kondisi SCOS. Daerah interstitium kaya dengan sel CD68 positif.¹⁷



Gambar 3. A. NOA, biopsi testis dengan sklerosis tubuler (*) dan vakuolisasi intensif sel Leydig. Ekspresi testosteron yang tidak teratur (→) juga terlihat (St, tubulus seminiferus). B. NOA, Beberapa sel Leydig menunjukkan sinyal positif yang tidak teratur (→); sebaliknya, hanya sedikit sel Leydig yang memiliki sinyal normal atau sangat kuat (dilingkari).^{17,54}

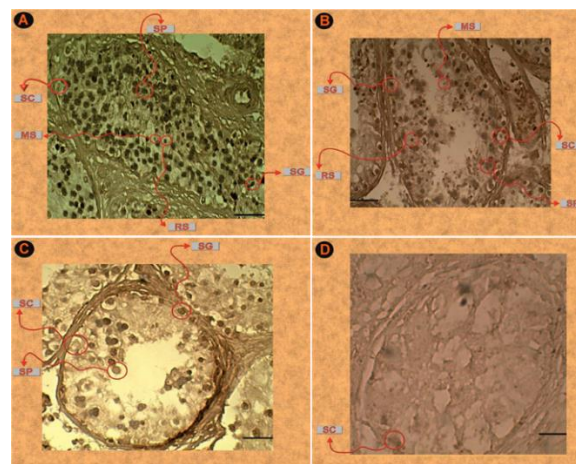
Selain melihat profil sel Leydig dan makrofag oleh Goluz et al, penelitian terkait biomarker azoospermia dilakukan oleh Babakhanzadeh et al Di tahun 2020, Babakhanzadeh et al menguji potensi *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) sebagai marker protein,¹⁵ mengingat penelitian menggunakan hewan coba yang di-*knockout* pada gen DGCR8 mengakibatkan infertilitas, *spermatogenic arrest* pada tahap proliferasi atau

diferensiasi.^{56,57} DGCR8 sendiri diketahui berperan dalam biogenesis dan maturasi miRNA. Adapun miRNA banyak diekspresikan selama proses spermatogenesis. miRNA berukuran sekitar 22 nukleotida. miRNA pada awalnya ditranskripsi sebagai bagian dari transkrip RNA yang dikenal sebagai pri-miRNA dengan panjang berkisar ratusan hingga ribuan nukleotida.⁵⁸ Pri-miRNA kemudian diproses menjadi pre-miRNA yang memiliki panjang sekitar 70 nukleotida dan memiliki struktur *stem-loop* oleh kompleks mikroprosesor (MC) yang terdiri dari DROSHA dan DGCR8.⁵⁹ Pre-miRNA ditranspor ke sitoplasma oleh exportin-5 dan diproses lebih lanjut menjadi RNA pendek untai ganda oleh DICER enzim RNase III.⁶⁰ miRNA yang matur kemudian dimuat ke *guide-strand channel* pada protein Argonaute (AGO) membentuk *RNA-induced silencing complex* (RISC).⁶¹ miRNA dapat mengatur ekspresi gen melalui penghambatan translasi protein dan/atau destabilisasi mRNA.⁶²

Analisis IHC menunjukkan bahwa DGCR8 tidak diekspresikan pada sel Sertoli. Pada spesimen kontrol (pasien OA) terlihat bahwa DGCR8 diekspresikan secara bertahap dari meiosis awal spermatosit hingga pasca-meiosis, spermatid. Sementara itu, ekspresi DGCR8 hampir tidak dapat diidentifikasi dalam sel spermatogenik dan spermatid sampel HYPO dan MA (pasien NOA). Hal tersebut mengindikasikan bahwa DGCR8 memiliki peran yang penting dalam tahap meiosis dan pasca-meiosis. Selain itu, diduga DGCR8 ditranskripsikan di dalam sel germinal. Oleh karena itu, pada spesimen SCOS yang tidak memiliki sel germinal, ekspresi DGCR8 tidak terdeteksi.¹⁵

Penelitian lain terkait analisis IHC pada testis pasien azoospermia dilakukan oleh Costur et al yang menganalisis ekspresi NOS pada sampel TESE.¹⁶ Nitric oxide (NO) adalah radikal bebas yang disintesis oleh nitrit oksida sintase (NOS). Terdapat tiga isoform NOS pada mamalia. Semua isoform NOS tersebut menggunakan L-arginin sebagai substrat, dan molekul oksigen serta nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (NADPH) tereduksi sebagai ko-substrat. Sementara itu, flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), dan (6R-) 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4) merupakan kofaktor.⁶³ Dari tiga isoform NOS, dua di antaranya diekspresikan secara konstitutif dan bergantung pada kalsium, yaitu neuronal-NOS

(nNOS) dan endotelial-NOS (eNOS). Adapun *inducible-NOS* (iNOS) dapat diinduksi tanpa melalui kalsium.⁶⁴

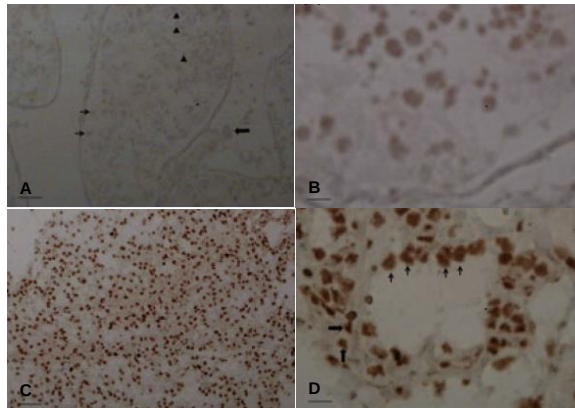


Gambar 4. Analisis IHC bagian testis dewasa dengan antibodi anti-DGCR8. (A) Segmen testis sampel dengan OA (B) Segmen testis sampel dengan HYPO. (C) Segmen testis dengan MA. (D) Segmen testis sampel dengan SCOS. Singkatan: RS, spermatid bulat; SP, spermatosit; MS, spermatid matang; SC, sel Sertoli; SG, spermatogonia¹⁵

Isoform NOS yang diekspresikan di testis yaitu iNOS dan eNOS, diketahui terlibat dalam spermatogenesis, infertilitas, pematangan sperma dan apoptosis Sertoli dan sel germinal.⁶⁵ Sumber utama NO di testis berasal dari makrofag yang ditemukan di pembuluh dan di interstitium. Dalam kondisi normal, iNOS berperan dalam membatasi jumlah sel germinal di testis.⁶⁶ Hal tersebut berlandaskan pada penelitian menggunakan hewan coba yang menunjukkan bahwa tikus dengan testis iNOS-/- memiliki berat rata-rata testis yang lebih berat dibandingkan dengan tikus normal. Pada tikus iNOS-/- juga terjadi penurunan pada apoptosis sel germinal secara signifikan.⁶⁷ Sementara itu, upregulasi iNOS menyebabkan produksi NO meningkat dan kemudian berpotensi meningkatkan produksi ROS.⁶⁸ ROS diduga merupakan faktor penting yang memediasi kerusakan pada testis manusia serta gangguan fungsi sperma yang kemudian merujuk pada infertilitas melalui berbagai efek seperti sitotoksitas langsung atau peroksidasi lipid pada fluiditas membran atau fragmentasi DNA.⁶⁹

Berdasarkan analisis IHC, pada biopsi dari pasien yang setelah menjalani prosedur TESE kemudian ditemukan spermatozoa (kelompok spermatozoa-*present*), ekspresi iNOS sangat lemah. Pewarnaan IHC yang lemah tersebut

teramati pada sel Sertoli dan sel germinal di tubulus seminiferus serta sel Leydig di intertubular (Gambar 5A-B). Sementara itu, pada kelompok spermatozoa-absent, biopsi dari pasien yang setelah menjalani prosedur TESE tidak ditemukan spermatozoa, terlihat pewarnaan IHK yang sangat intens pada sel Sertoli dan sel Leydig (Gambar 5C-D).¹⁶



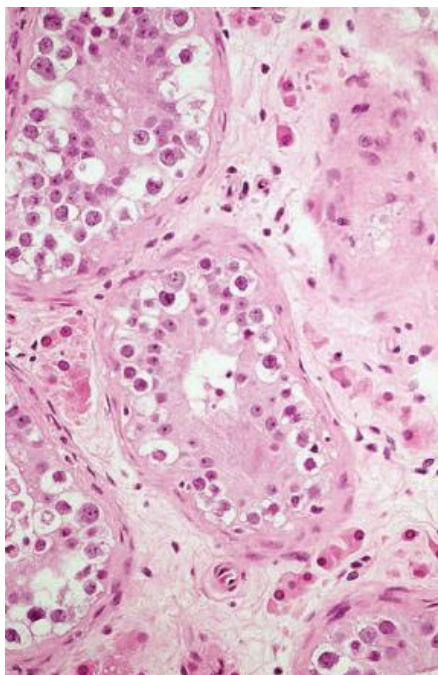
Gambar 5. A-B. Fotomikrograf jaringan testis pasien azoospermia kelompok spermatozoa-present. Beberapa sel germinal berhasil teramati, namun spermatozoa matang tidak terlihat di tubulus seminiferus. Immunostaining iNOS dengan sinyal lemah terdapat dalam sel Sertoli (panah tipis) dan sel germinal (panah) di tubulus seminiferus serta dalam sel Leydig (panah tebal) di daerah inter-tubular. C-D. Fotomikrograf jaringan testis kelompok spermatozoa-absent. Immunostaining iNOS yang sangat intens teramati dalam sel Sertoli (panah tipis) di tubulus seminiferus dan sel Leydig (panah tebal) di daerah peritubulus. Hanya sel Sertoli yang ada di tubulus.¹⁶

Penerapan IHK untuk Diagnosis Tumor pada Testis

Tumor sel germinal testis dibagi menjadi seminoma, yang membentuk sekitar setengah dari semua tumor testis dan yang terjadi pada pasien yang lebih tua; dan tumor non-seminomatosa, yang terdiri dari beberapa sub tipe, antara lain koriokarsinoma, karsinoma embrional, yolk sac tumour, teratoma, dan tumor campuran.⁷⁰ Sementara itu, Oosterhuis dan Leendert mengklasifikasikan tumor sel germinal menjadi lima tipe. yang terjadi pada pria dewasa merupakan tumor tipe II, bersifat malignan, terkait dengan intratubular germ cell neoplasia, *unclassified type* (IGCNU) atau carcinoma in situ. Sementara itu, tumor tipe I, di dalamnya termasuk teratoma dan *yolk sac tumour* banyak terjadi pada *infant* dan anak-anak. Tumor tipe III yaitu *spermatocytic seminoma*. Tumor tipe IV dan V merupakan kista dermoid dari ovarium dan penyakit gestational trophoblastic (Tabel 2).⁷¹ Sel-sel IGCNU secara morfologis menyerupai primordial sel germinal atau gonosit (Gambar 7). Sel IGCNU juga mengekspresikan banyak faktor transkripsi terkait pluripotensi yang sama seperti sel germinal primordial dan stem sel embrionik di antaranya OCT3/4 (Gambar 8A), NANOG dan KIT (Gambar 8B), yang merupakan tiga dari 12 gen yang paling diup-regulasi secara signifikan dalam IGCNU.^{72,73}

Tabel 2. Lima tipe tumor sel germinal.⁷¹

Tipe	Tempat	Fenotip	Usia	Asal Sel
I	Testis atau ovarium	Teratoma (imatur)/ <i>yolk sac tumour</i>	Neonate dan anak-anak	Sel germinal Primordial (PGC)/Gonosit
II	Testis	Seminoma/non-seminoma	>15 tahun	Sel germinal Primordial (PGC)/Gonosit
	Ovarium	Dysgerminoma/non-seminoma	>4 tahun	Sel germinal Primordial (PGC)/Gonosit
	Dysgenetic gonad	Dysgerminoma/non-seminoma	Kongenital	Sel germinal Primordial (PGC)/Gonosit
III	Testis	<i>Spermatocytic seminoma</i>	>50 tahun	Spermatogonium/spermatosit
IV	Ovarium	<i>Dermoid cyst</i>	Anak-anak/dewasa	Oogonia/oosit
V	Placenta/uterus	<i>Hydatidiform mole</i>	Masa fertil	Empty ovum/spermatozoa



Gambar 7. Penampakan mikroskopis IGCNU, susunan basal membran mirip dengan sel seminoma dengan sitoplasma yang bening dan nukleus poligonal yang berselingan dengan sel Sertoli dan bergeser ke arah lumen tubulus.

Pewarnaan imunohistokimia OCT3/4 merupakan marker yang sensitif dan spesifik dapat digunakan untuk deteksi IGCNU dalam biopsi testis orang dewasa.⁷⁴ Meskipun demikian, signifikansi OCT3/4 dengan pewarnaan imunohistokimia kurang jelas pada pasien dengan usia kurang dari 1,5 tahun.⁷⁵ Oleh karena itu, disarankan bahwa imunohistokimia ganda dengan OCT3/4 dan *testis specific protein on the Y chromosome* (TSPY) akan memberi informasi yang lebih banyak dalam mengidentifikasi IGCNU.⁷⁶ Dapat dikatakan bahwa sel yang memberi hasil positif terhadap kedua protein tersebut mampu menimbulkan sel tumor germinal invasif karena mengekspresikan OCT3/4 (dapat mencegah apoptosis) dan TSPY (meningkatkan proliferasi). Selain itu, ko-ekspresi tersebut tidak muncul dalam sel germinal yang menunjukkan keterlambatan pematangan saja. TSPY sendiri terekspresi dalam IGCNU dan seminoma, tetapi tidak pada non-seminoma yang lain.⁷⁶

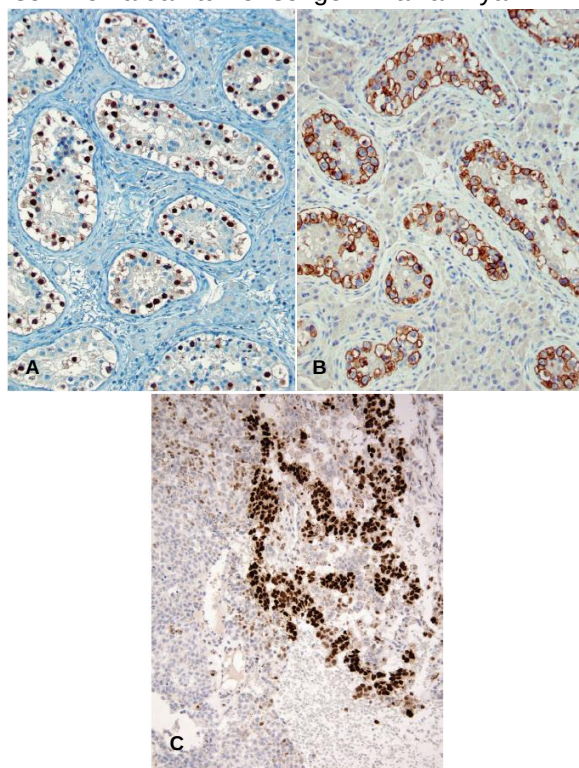
Gen *NANOG* adalah regulator pluripotensi yang terletak pada kromosom 12 di bagian 12p13.⁷⁷ Gen di bagian kromosom tersebut merupakan isokromosom 12p, secara konsisten diamati pada tumor sel germinal selain IGCNU

dan terdapat kemungkinan bahwa gen di bagian tersebut bertanggung jawab dalam pertumbuhan independen / invasif sel-sel Sertoli.⁷⁸ Ekspresi *NANOG* diup-regulasi pada stem sel embrionik dan bersama dengan OCT4, mencegah diferensiasi stem sel embrional serta mempertahankan sifat pluripotensi.⁷⁹ Ekspresi *NANOG* terlihat pada awal perkembangan janin (di 24 minggu usia kehamilan atau kurang) kemudian hilang saat gonosit matang pada testis dewasa. Kegagalan dalam *down-regulasi* *NANOG* mungkin menjadi faktor penting dalam karsinogenesis tumor sel germinal.⁸⁰ Ekspresi protein *NANOG* pada inti sel dapat diamati di IGCNU, seminoma klasik, dan karsinoma embrional, tetapi tidak pada teratoma matur. Adapun Seminoma spermatositik juga tidak mengekspresikan *NANOG*.^{79,80}

C-KIT merupakan reseptor sitokin dan tirosin kinase. Ekspresi C-KIT diperlukan untuk migrasi dan kelangsungan hidup sel germinal primordial, kemudian ekspresi C-KIT di *down-regulasi* pada usia kehamilan 25 minggu.⁸¹ Ekspresi C-KIT dapat diamati pada kasus IGCNU dan seminoma,²⁴ namun ekspresi dalam sel seminoma relatif lebih sedikit dibanding sel-sel IGCNU. Mutasi pada ekson 17 dari gen C-KIT terlihat di sebagian besar kasus (63%) dari tumor sel germinal bilateral di testis. Sementara itu, mutasi tersebut terjadi (6%) pada tumor sel germinal unilateral, menunjukkan bahwa mutasi ini terjadi sebelum sel germinal primordial bermigrasi dalam embrio dan bahwa pasien dengan c- Mutasi KIT rentan untuk mengembangkan sel germinal bilateral tumor.⁸¹

SOX2 adalah faktor transkripsi yang diekspresikan oleh stem sel embrionik dan stem sel saraf.²⁴ Ko-ekspresi SOX2 dengan OCT3/4 mampu mempertahankan sifat pluripotensi dalam stem sel embrionik. Studi profil ekspresi telah menunjukkan ekspresi yang lebih besar pada gen terkait spermatogenesis (termasuk PRAME, MAGEA4, SPAG1, dan HPX) dan ekspresi yang lebih rendah SOX2 pada seminoma dibandingkan dengan embrional karsinoma.⁸² Fenotip seminoma yang tidak mengekspresikan SOX2 mirip dengan sel germinal primordial, sedangkan fenotip karsinoma embrional yang mengekspresikan SOX2 mirip dengan sel punca embrionik.²⁴ Analisis IHK menunjukkan ekspresi SOX2 yang kuat dalam embrional karsinoma (Gambar 8D) dan sangat lemah atau tidak ada pada seminoma (Gambar 8D), *yolk sac tumour*,

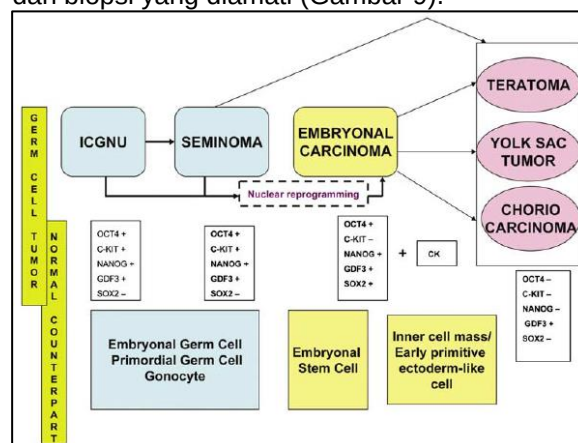
koriokarsinoma, dan IGCNU.²³ Oleh karena itu, SOX2 dapat digunakan sebagai marker protein untuk membedakan karsinoma embrional dari seminoma dan tumor sel germinal lainnya.^{24,83,84}



Gambar 8. Pewarnaan IHK menunjukkan adanya ekspresi OCT3/4 dalam nukleus sel-sel IGCNU. B. Pewarnaan IHK menunjukkan adanya ekspresi c-KIT dalam sitoplasma sel-sel IGCNU. C. Pewarnaan IHK pada sel tumor germinal campuran menunjukkan adanya ekspresi SOX2 pada karsinoma embrional (kanan) namun tidak diekspresikan pada seminoma (kiri).

Selain C-KIT, OCT3/4, NANOG, dan SOX2 Gopalan et al juga menganalisis ekspresi GDF3 pada tumor sel germinal. GDF3 diekspresikan pada yolk sac tumor biasanya hanya positif secara fokal pada karsinoma embrional dapat menjadi marker tambahan dalam membedakan *yolk sac tumour* dari embrional karsinoma.²⁴ Korkola et al juga menemukan bahwa gen GDF3 secara signifikan diekspresikan pada karsinoma embrional, sedangkan pada seminoma menunjukkan ekspresi yang dapat dideteksi namun sangat rendah. Berdasarkan pewarnaan IHK, GDF3 diekspresikan kuat pada sitoplasma sel karsinoma embrional, dengan ekspresi yang lebih lemah tetapi menyebar pada sel-sel seminoma dan IGCNU.⁸⁵ Berdasarkan penelitian pola ekspresi marker protein, C-KIT, OCT3/4,

NANOG, SOX2, GDF3 oleh Gopalan et al kombinasi analisis ekspresi ke-5 marker tersebut dapat digunakan untuk menentukan jenis tumor dari biopsi yang diamati (Gambar 9).²⁴



Gambar 9. Model patogenesis tumor pada testis.²⁴

KESIMPULAN

Eksplorasi marker protein IHK telah dilakukan untuk membantu identifikasi gangguan spermatogenesis melalui biopsi testis. Pada kasus azoospermia, NOA, terdapat pola ekspresi yang khas pada protein DGCR8, iNOS, serta profil makrofag dan sel Leydig. Makrofag banyak ditemukan menyusup ke daerah sel Leydig serta lamina propria seminiferus tubulus. Makrofag ditemukan melintasi dinding tubulus dan menginvasi epitel seminiferus serta lumen tubulus. Pada pasien NOA, kehadiran makrofag tersebut kemudian dapat mengganggu steroidogenesis pada sel Leydig. Protein DGCR8 juga memiliki pola ekspresi yang khas, diekspresikan secara bertahap dari meiosis awal spermatosit hingga spermatid pada kondisi normal. Sementara itu, ekspresi DGCR8 hampir tidak dapat diidentifikasi dalam sel spermatogenik dan spermatid dari pasien NOA. Selanjutnya, analisis ekspresi iNOS pada pasien NOA menunjukkan adanya pewarnaan IHK yang sangat intens pada sel Sertoli dan sel Leydig.

Teknik IHK diterapkan pula dalam identifikasi tumor testis. Marker protein yang berpotensi dalam mengidentifikasi tumor tersebut di antaranya C-KIT, OCT3/4, SOX2, NANOG dan GDF3. Pewarnaan IHK OCT3/4 secara spesifik dapat digunakan untuk mendeteksi kasus IGCNU. Adapun protein NANOG yang seharusnya di-downregulasi justru terdeteksi pada kasus IGCNU, seminoma klasik, dan karsinoma embrional. Ekspresi C-KIT juga gagal di-downregulasi pada kasus IGCNU dan seminoma. Sementara itu, analisis IHK

menunjukkan ekspresi SOX2 yang kuat pada kasus embrional karsinoma. Marker selanjutnya yaitu GDF3 yang diekspresikan kuat pada sitoplasma sel karsinoma embrional dan ekspresi yang lebih lemah tetapi menyebar pada sel-sel seminoma dan IGCNU. Kombinasi marker protein tersebut diharapkan mampu membedakan jenis tumor testis yang dialami pasien sehingga dapat dilakukan penanganan yang tepat.

Penerapan IHK juga memberikan pengetahuan terkait sel germinal pada fetus yang ternyata terdiri dari beberapa sub-populasi. Adapun sub-populasi tersebut dapat diidentifikasi dengan marker PLAP, c-KIT, CHK2, PCTAIRE-1, dan MAGE-A4, AP-2, OCT3/4, dan protein M2A. Secara umum, populasi dengan karakteristik seperti gonosit dan sel intermediet mengekspresikan PLAP, CHK2, PCTAIRE-1, c-KIT, M2A, OCT3/4 dan AP-2 γ . Sementara itu, populasi dengan kriteria morfologi pre-spermatogonia dicirikan dengan adanya ekspresi MAGE-A4.

Daftar Pustaka

1. Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. In: Diagnostic Immunohistochemistry. Elsevier; 2006. p. 1–42. DOI:10.1016/B978-0-443-06652-8.50007-7
2. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp Biol Med*. 1941;47(2):200–2. DOI:10.3181/00379727-47-13084P
3. Avrameas S, Uriel J. [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1966;262(24):2543–5.
4. NAKANE PK. SIMULTANEOUS LOCALIZATION OF MULTIPLE TISSUE ANTIGENS USING THE PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY METHOD: A STUDY ON PITUITARY GLANDS OF THE RAT. *J Histochem Cytochem*. 1968;16(9):557–60. DOI:10.1177/16.9.557
5. Haines DM, West KH. Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108(1–2):151–6. DOI:10.1016/j.vetimm.2005.08.007
6. STERNBERGER LA, HARDY PH, CUCULIS JJ, MEYER HG. THE UNLABELED ANTIBODY ENZYME METHOD OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY PREPARATION AND PROPERTIES OF SOLUBLE ANTIGEN-ANTIBODY COMPLEX (HORSE RADISH PEROXIDASE-ANTI HORSE RADISH PEROXIDASE) AND ITS USE IN IDENTIFICATION OF SPIROCHETES. *J Histochem Cytochem*. 1970;18(5):315–33. DOI:10.1177/18.5.315
7. Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol*. 1978;31(5):454–60. DOI:10.1136/jcp.31.5.454
8. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*. 1984;32(2):219–29. DOI:10.1177/32.2.6198355
9. SINGER SJ. Preparation of an Electron-dense Antibody Conjugate. *Nature*. 1959;183(4674):1523–4. DOI:10.1038/1831523a0
10. STERNBERGER LA. ELECTRON MICROSCOPIC IMMUNOCYTOCHEMISTRY: A REVIEW. *J Histochem Cytochem*. 1967;15(3):139–59. DOI:10.1177/15.3.139
11. Page Faulk W, Malcolm Taylor G. Communication to the editors. *Immunocytochemistry*. 1971;8(11):1081–3. DOI:10.1016/0019-2791(71)90496-4
12. Roth J, Bullock GR PP, editor. Techniques in Immunocytochemistry. In Academic Press; 1982. p. 107–20.
13. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Hum Reprod*. 2007;22(1):2–16. DOI:10.1093/humrep/del279
14. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Horm Res Paediatr*. 1970;1(1):2–25. DOI:10.1159/000178170
15. Babakhanzadeh E, Khodadadian A, Nazari M, Dehghan Tezerjani M, Aghaei SM,

- Ghasemifar S, et al. Deficient Expression of DGCR8 in Human Testis is Related to Spermatogenesis Dysfunction, Especially in Meiosis I. *Int J Gen Med*. 2020;13:185–92. DOI:10.2147/IJGM.S255431
16. Coştur P, Filiz S, Gonca S, Çulha M, Güleçen T, Solakoğlu S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the azoospermic human testis. *Andrologia*. 2012;44:654–60. DOI:10.1111/j.1439-0272.2011.01245.x
17. Goluža T, Boscanin A, Cvetko J, Kozina V, Kosović M, Bernat MM, et al. Macrophages and Leydig Cells in Testicular Biopsies of Azoospermic Men. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–14. DOI:10.1155/2014/828697
18. LEONG A.-Y, WRIGHT J. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. *Histopathology*. 1987;11(12):1295–305. DOI:10.1111/j.1365-2559.1987.tb01874.x
19. Taylor, CR & Cote R. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist. In: Major Problems in Pathology. Taylor, CR & Cote R, editor. WB Saunders: Nova Iorque; 1994.
20. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016–9. DOI:10.1097/00000478-200007000-00014
21. Bodey B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther*. 2002;2(4):371–93. DOI:10.1517/14712598.2.4.371
22. Jaffer S, Bleiweiss IJ. Beyond Hematoxylin and Eosin—The Role of Immunohistochemistry in Surgical Pathology. *Cancer Invest*. 2004;22(3):445–65. DOI:10.1081/CNV-200034896
23. Emerson RE, Ulbright TM. The use of immunohistochemistry in the differential diagnosis of tumors of the testis and paratestis. *Semin Diagn Pathol*. 2005;22(1):33–50. DOI:10.1053/j.semdp.2005.11.003
24. Gopalan A, Dhall D, Olgac S, Fine SW, Korkola JE, Houldsworth J, et al. Testicular mixed germ cell tumors: a morphological and immunohistochemical study using stem cell markers, OCT3/4, SOX2 and GDF3, with emphasis on morphologically difficult-to-classify areas. *Mod Pathol*. 2009;22(8):1066–74. DOI:10.1038/modpathol.2009.66
25. SKAKKEBÆK NE, BERTHELSEN JG, GIWERCMAN A, MÜLLER J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*. 1987;10(1):19–28. DOI:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00161.x
26. RUGGIU, M SAUNDERS, PTK & HCOOKE H. Dynamic Subcellular Distribution of the DAZL Protein Is Confined to Primate Male Germ Cells. *J Androl*. 2000;21:470–7.
27. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(17):9585–90. DOI:10.1073/pnas.160274797
28. Bartkova J, Falck J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. *Oncogene*. 2001;20(41):5897–902. DOI:10.1038/sj.onc.1204746
29. WARTENBERG H. Comparative Cytomorphologic Aspects of the Male Germ Cells, Especially of the “Gonia”. *Andrologia*. 1976;8(2):117–30. DOI:10.1111/j.1439-0272.1976.tb02120.x
30. Fukuda T, Hedinger C, Groscurth P. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tissue Res*. 1975;161(1). DOI:10.1007/BF00222114
31. HOLSTEIN AF, SCHÜTTE B, BECKER H, HARTMANN M. Morphology of normal and malignant germ cells*. *Int J Androl*. 1987;10(1):1–18. DOI:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00160.x
32. Wartenberg H. Differentiation and development of the testes. In: *The Testis*. New York: Raven Press; 1981. p. 39–81.
33. Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, et al. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*. 1993;125–37.
34. Rosner MH, Viganò MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F R, PW SL. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990;345:686–692.
35. Zhou B-BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408(6811):433–9.

- DOI:10.1038/35044005
36. Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, et al. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J*. 1992;11(8):2909–17.
 37. Yakirevich E, Sabo E, Dirnfeld M, Sova Y, Spagnoli GC, Resnick MB. Morphometrical Quantification of Spermatogonial Germ Cells With the 57B Anti-MAGE-A4 Antibody in the Evaluation of Testicular Biopsies for Azoospermia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11(1):37–44. DOI:10.1097/00129039-200303000-00007
 38. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LLL, Anderson RA, Saunders PTK. Immunohistochemical Profiling of Germ Cells Within the Human Fetal Testis: Identification of Three Subpopulations. *Biol Reprod*. 2004;71(6):2012–21. DOI:10.1095/biolreprod.104.028381
 39. Pauls K, Schorle H, Jeske W, Brehm R, Steger K, Wernert N, et al. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod*. 2006;21(2):397–404. DOI:10.1093/humrep/dei325
 40. Goldsmith JD, Pawel B, Goldblum JR, Pasha TL, Roberts S, Nelson P, et al. Detection and Diagnostic Utilization of Placental Alkaline Phosphatase in Muscular Tissue and Tumors With Myogenic Differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(12):1627–33. DOI:10.1097/00000478-200212000-00011
 41. Griffin CA, Smith M, Henthorn PS, Harris H, Weiss MJ, Raducha M, et al. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am J Hum Genet*. 1987;41(6):1025–34.
 42. HUSTIN J, COLLETTE J, FRANCHIMONT P. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. *Int J Androl*. 1987;10(1):29–35. DOI:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00162.x
 43. MARTIN D, TUCKER DF, GORMAN P, SHEER D, SPURR NK, TROWSDALE J. The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. *Ann Hum Genet*. 1987;51(2):145–52. DOI:10.1111/j.1469-1809.1987.tb01056.x
 44. Zackson SL, Steinberg MS. A molecular marker for cell guidance information in the axolotl embryo. *Dev Biol*. 1988;127(2):435–42. DOI:10.1016/0012-1606(88)90329-6
 45. Robinson LLL. Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(9):845–52. DOI:10.1093/molehr/7.9.845
 46. Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Chomez P, et al. MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer*. 2001;92(11):2778–85. DOI:10.1002/1097-0142(20011201)92:11<2778::aid-cncr10125>3.0.co;2-s
 47. Charrasse S, Carena I, Hagmann J, Woods-Cook K, Ferrari S. PCTAIRE-1: characterization, subcellular distribution, and cell cycle-dependent kinase activity. *Cell Growth Differ*. 1999;10(9):611–20.
 48. SCHLATT S, WEINBAUER GE. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl*. 1994;17(4):214–22. DOI:10.1111/j.1365-2605.1994.tb01245.x
 49. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324–32. DOI:10.1016/j.eururo.2012.04.048
 50. Gudeloglu A, Parekattil SJ. Update in the evaluation of the azoospermic male. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):27–34. DOI:10.6061/clinics/2013(sup01)04
 51. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis*. 2014;4(1):e28218. DOI:10.4161/spmg.28218
 52. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1995;10(6):1457–60. DOI:10.1093/HUMREP/10.6.1457
 53. Hauser R, Botchan A, Amit A, Ben Yosef D, Gamzu R, Paz G, et al. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia--is it necessary? *Hum Reprod*. 1998;13(11):3081–5. DOI:10.1093/humrep/13.11.3081
 54. Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol*. 2002;57(1–2):3–18.

- DOI:10.1016/S0165-0378(02)00020-7
55. Hutson JC, Stocco DM. Comparison of cellular and secreted proteins of macrophages from the testis and peritoneum on two-dimensional polyacrylamide gels: evidence of tissue specific function. *Reg Immunol.* 2(4):249–53.
 56. Zimmermann C, Romero Y, Warnefors M, Bilican A, Borel C, Smith LB, et al. Germ Cell-Specific Targeting of DICER or DGCR8 Reveals a Novel Role for Endo-siRNAs in the Progression of Mammalian Spermatogenesis and Male Fertility. White-Cooper H, editor. *PLoS One.* 2014;9(9):e107023. DOI:10.1371/journal.pone.0107023
 57. Modzelewski AJ, Hilz S, Crate EA, Schweidenback CTH, Fogarty EA, Grenier JK, et al. Dgcr8 and Dicer are essential for sex chromosome integrity during meiosis in males. *J Cell Sci.* 2015;128(12):2314–27. DOI:10.1242/jcs.167148
 58. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509–24. DOI:10.1038/nrm3838
 59. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231–5. DOI:10.1038/nature03049
 60. BOHNSACK MT, CZAPLINSKI K, GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004;10(2):185–91. DOI:10.1261/rna.5167604
 61. Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(7):368–76. DOI:10.1016/j.tibs.2010.03.009
 62. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* 2011;12(2):99–110. DOI:10.1038/nrg2936
 63. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2001;11(2):66–75. DOI:10.1016/S0962-8924(00)01900-0
 64. Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(9):1321–32. DOI:10.1016/0006-2952(95)00181-6
 65. O'Bryan MK, Schlatt S, Gerdprasert O, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Testis: Evidence for Potential Roles in Both Normal Function and Inflammation-Mediated Infertility1. *Biol Reprod.* 2000;63(5):1285–93. DOI:10.1095/biolreprod63.5.1285
 66. Hutson JC. Physiologic Interactions Between Macrophages and Leydig Cells. *Exp Biol Med.* 2006;231(1):1–7. DOI:10.1177/153537020623100101
 67. Lue Y, Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Functional Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Induction of Male Germ Cell Apoptosis, Regulation of Sperm Number, and Determination of Testes Size: Evidence from Null Mutant Mice. *Endocrinology.* 2003;144(7):3092–100. DOI:10.1210/en.2002-0142
 68. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* 1997;100(10):2417–23. DOI:10.1172/JCI119782
 69. Aitken RJ. The Amoroso Lecture The human spermatozoon - a cell in crisis? *Reproduction.* 1999;115(1):1–7. DOI:10.1530/jrf.0.1150001
 70. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 1997;15(2):594–603. DOI:10.1200/JCO.1997.15.2.594
 71. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):210–22. DOI:10.1038/nrc1568
 72. Skotheim RI, Lind GE, Monni O, Nesland JM, Abeler VM, Fosså SD, et al. Differentiation of Human Embryonal Carcinomas In vitro and In vivo Reveals Expression Profiles Relevant to Normal Development. *Cancer Res.* 2005;65(13):5588–98. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-0153
 73. Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, et al. Origin of pluripotent germ cell tumours: The role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;288(1–2):111–8. DOI:10.1016/j.mce.2008.02.018
 74. de Jong J, Stoop H, Dohle GR, Bangma CH, Kliffen M, van Esser JW, et al. Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and

- invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol.* 2005;206(2):242–9. DOI:10.1002/path.1766
75. Jones TD, MacLennan GT, Bonnin JM, Varsegi MF, Blair JE, Cheng L. Screening for Intratubular Germ Cell Neoplasia of the Testis Using OCT4 Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(11):1427–31. DOI:10.1097/01.pas.0000213288.50660.f7
 76. Li Y, Tabatabai ZL, Lee T-L, Hatakeyama S, Ohyama C, Chan W-Y, et al. The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. *Hum Pathol.* 2007;38(10):1470–81. DOI:10.1016/j.humphath.2007.03.011
 77. Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, et al. Human STELLAR , NANOG , and GDF3 Genes Are Expressed in Pluripotent Cells and Map to Chromosome 12p13, a Hotspot for Teratocarcinoma. *Stem Cells.* 2004;22(2):169–79. DOI:10.1634/stemcells.22-2-169
 78. Honecker F, Oosterhuis JW, Mayer F, Hartmann JT, Bokemeyer C, Looijenga LHJ. New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors. *World J Urol.* 2004;22(1):15–24. DOI:10.1007/s00345-004-0399-7
 79. Hoei-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, Brask Sonne S, Graem N, Skakkebaek NE, et al. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology.* 2005;47(1):48–56. DOI:10.1111/j.1365-2559.2005.02182.x
 80. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LHJ, Pauchnik M, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer.* 2005;104(10):2092–8. DOI:10.1002/cncr.21435
 81. Biermann K, Göke F, Nettersheim D, Eckert D, Zhou H, Kahl P, et al. c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. *J Pathol.* 2007;213(3):311–8. DOI:10.1002/path.2225
 82. Biermann K, Heukamp LC, Steger K, Zhou H, Franke FE, Sonnack V, et al. Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer Genomics Proteomics.* 4(5):359–67.
 83. Santagata S, Ligon KL, Hornick JL. Embryonic Stem Cell Transcription Factor Signatures in the Diagnosis of Primary and Metastatic Germ Cell Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(6):836–45. DOI:10.1097/PAS.0b013e31802e708a
 84. de Jong J, Stoop H, Gillis A, van Gurp R, van de Geijn G-J, Boer M de, et al. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. *J Pathol.* 2008;215(1):21–30. DOI:10.1002/path.2332
 85. Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RSV, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, et al. Down-Regulation of Stem Cell Genes, Including Those in a 200-kb Gene Cluster at 12p13.31, Is Associated with In vivo Differentiation of Human Male Germ Cell Tumors. *Cancer Res.* 2006;66(2):820–7. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-2445