

DIETİLSTİLBESTEROLÜN SIÇAN TESTİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ

Belgin Can*

Seks hormonlarının organizmadaki işlevlerinin anlaşılmasından sonra günümüzde sentetik olarak üretilebilmeleri çeşitli alanlarda kullanımlarına olanak sağlamıştır.

Erkeklerde görülen malign tümörlerin % 10'unu oluşturan prostat kanseri % 70-80 oranında androjen bağımlı olması dolayısıyla östrojenlerin en yaygın klinik kullanım alanını oluşturur (10,17). Bu tedavi sırasında yan etkiler açısından testis hedef bir organdır. Östrojen kullanımı ile LH ve FSH'nın hipofiz ön lobundan baskılanmasına bağlı olarak, spermatojenezis durur ve testislerde atrofi başlar (3,4,5, 13,14,16,19).

Bu çalışmada tedavide kullanılan dietilstilbesterolün testis morfolojisi üzerindeki etkileri sıçanlarda gösterilmiştir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada materyal olarak 4-6 aylık 300-400 gr. ağırlığında Wistar tipi 30 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların 20'si deney grubuna 10 adedi de kontrol grubuna alındı.

Deney grubu sıçanlarına iki ay boyunca, haftanın 3 günü dietilstilbesterol 0.25 mg./per rat doz subkutan yolla alt ekstremitelerden uygulandı (8).

Kontrol grubunu oluşturan sıçanlara da aynı günlerde serum fizyolojik enjekte edildi.

* A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalında Uzman Doktor

Bu çalışma Uzmanlık Tezinin kısaltılmış şeklidir.

Geliş Tarihi : 28 Kasım 1992

Kabul Tarihi : 22 Aralık 1992

İkinci ayın bitiminde deney grubu ve kontrol grubuna ait sıçanların her iki testisleri eterle anestezi uygulanarak çıkarıldı ve takibe alındı.

Parçaların bir kısmı ışık, bir kısmıda yarı ince kesitleri elde edebilmek için elektron mikroskobu doku izleme yöntemlerine göre tespit ve takip edildi.

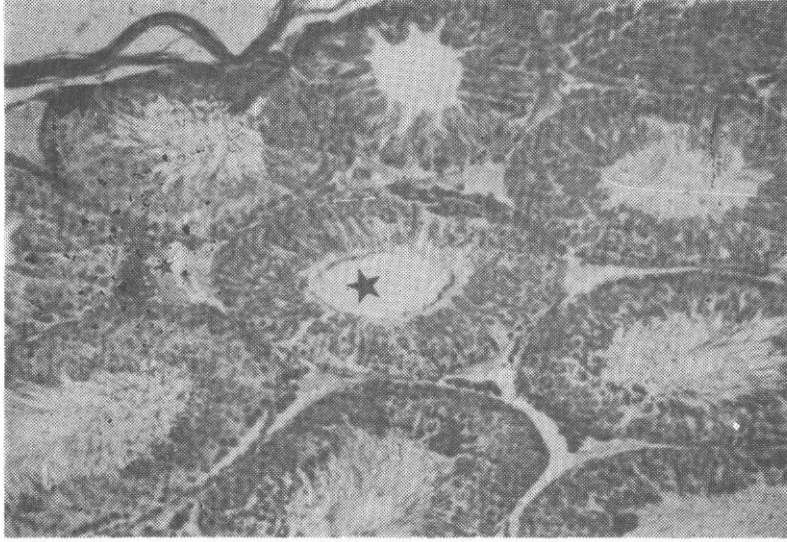
Işık mikroskobunda inceleyebilmek için dokular Bouine solüsyonunda oda ısısında fikse edildi (15). Dehidratasyon, şeffaflandırma infiltrasyon işlemlerinden sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan Leitz-1512 tipi mikrotom ile 4-6 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler sırasıyla, Hematoksilin-Eozin (H.E), Periyodik Asit Schiff (PAS), Masson'un Trikrom boyası, Mallori Azan, Heidenhain'in Demirli Hematoksilin boya ile boyanmıştır (7).

Yarı ince kesit elde etmek için aynı organ bölgelerinden alınan örnekler % 3'lük glutaraldehit ve % 1'lik OsO₄'ün fikzator olarak kullanıldığı geleneksel elektron mikroskobu takibi yapıldı. LKB-III ultra mikrotomunda cam bıçakla 1 mikrometrelik yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi-azür II birleşik boyasıyla boyandı. Elde edilen kesitler Carl Zeiss fotomikroskobuyla incelendi ve fotoğrafları çekildi.

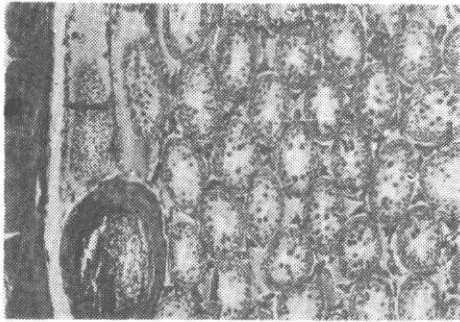
BULGULAR

Kontrol grubunda sıçan testisini dıştan saran tunika albujeayı bağ dokusu elemanlarından başlıca kollajen teller oluşturuyordu (Şekil 1).

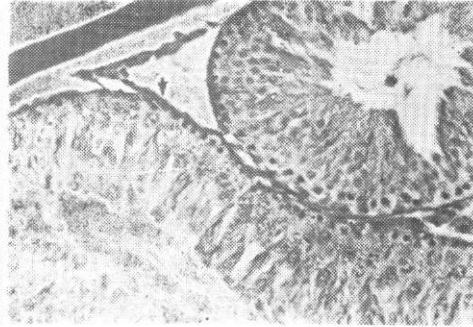
İki ay diyetstilbesterol kullandıktan sonra tunika albujeayı oluşturan kollajen tellerde belirgin bir artış görüldü (Şekil 2). Kollajen tellerin oldukça kalın bir şerit halinde kapsülayı oluşturarak testisi sardığı gözlemlendi. Kapsülanın iç sınırına dayalı olarak gözlenen damar duvarı adventisiasını oluşturan bağ dokusu elemanlarında da belirgin şekilde kalınlaşma vardı. Kontrol (Şekil 3) ve deney (Şekil 4) grubu eşit büyütmelemlerde incelendiğinde; deney grubunda seminifer tübüllerin küçük çaplı olduğu ve duvarı oluşturan jermal epitel hücrelerinin azlığı nedeniyle duvarın ince görünen kazandığı görüldü (Şekil 2,4). Jermal epitel hücrelerinin arasında ki çözümler ve tübül lümenine olan hücrel döküntüler dikkat çekiciydi (Şekil 5). Se-



Şekil 1 : Kontrol grubu sıçan testisi. Tunika albujineayı oluşturan bağ dokusu (kalın ok), seminifer tübüller (büyük yıldız) ve peritübüler alan (küçük yıldız) görülüyor. Mallory Azan X 32.

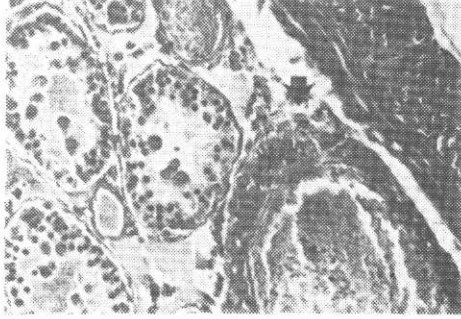


Şekil 2 : Deney grubunda oldukça kalınlaşmış tunika albujinea (büyük ok) dokuyu sarıyor. Seminifer tübüllerin çaplarında küçülme ve duvarı döşeyen hücrelerde alçalma (ok başı) görülüyor. Mallory Azan X 12.5.

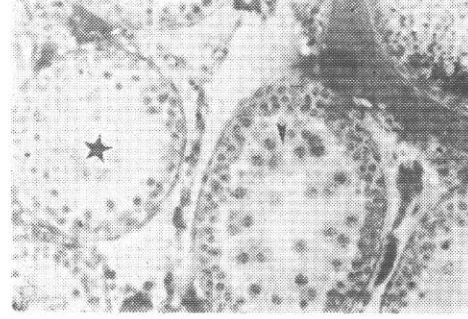


Şekil 3 : Kontrol grubunda tübül bazal membranı düzenli ve ince görünümde (ok) görülüyor. Hematoksilin Eozin X 80.

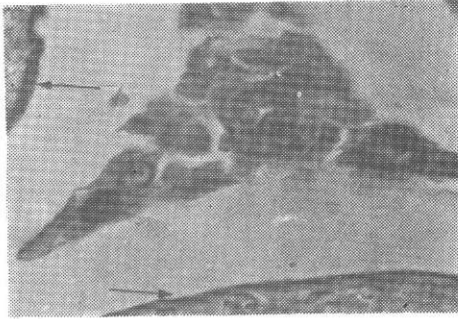
minifer tübüllerin bazal membranının (Şekil 7) kontrol kesitlerin bazal membranına (Şekil 6) oranla kalınlaştığı görüldü. PAS boyasıyla boyanan kesitler incelendiğinde PAS + reaksiyon veren bu alanlar kalın dalgalı seyirlerle tübüleri sarmış olarak görüldü.



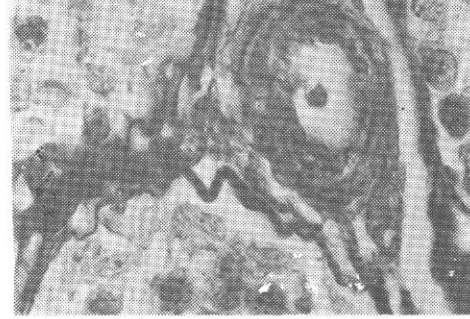
Şekil 4 : Deney grubunda tunika albugineada ve alt sınırdaki damar duvarında kalınlaşma (ok) görülüyor. Heidenhain'in demirli hematoxilin boyası zıt boya Van Gieson ile birlikte X 80.



Şekil 5 : Deney grubunda ince duvarlı dar çaplı seminifer tübüllerde jerminal epitel hücreleri arasında çözümler (ok başı) tübül lümeninde hücresel döküntüler (yıldız) görülüyor. Trikrom Masson X 100.

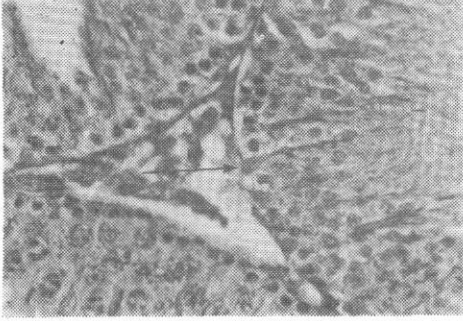


Şekil 6 : Kontrol grubunda tübül bazal membranı düzenli ve ince görünümde (ok) görülüyor. PAS X 400.

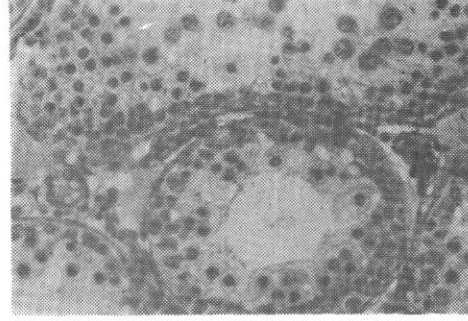


Şekil 7 : Deney grubunda seminifer tübüllerin bazal membranı kalın dalgalı (ok) yapı gösteriyor. PAS X 400.

Kontrol grubunda bazal mebran üzerine düzgün aralıklarla dizilmiş Sertoli hücreleri ve aralarında spermatojenetik hücreler belirgin şekilde gözlenirken (Şekil 8), deney grubunda hücrelerin farklı yapısal özellikler gösterdiği dikkat çekti (Şekil 9). Bazal membrana yakın bazı alanlarda spermatogonyum olduğu düşünülen hücre dizileri görüldü. Bu hücre dizilerinin sitoplazma ve çekirdeklerinin yapısal ayrıntılarına ilişkin ayırıcı özellikler tam seçilemedi, ancak çekirdek membranı oldukça belirgindi. Kromatinin yerleşimi ve yapısı hücreler arasında değişkenlik gösteriyordu (Şekil 10). Daha derin katlara doğru düzensiz yerleşmiş belirgin kromatin yapısı içeren çekirdekleriyle oldukça iri primer spermatosit aşamasında olduğu düşünülen hücreler



Şekil 8 : Kontrol grubunda Sertoli hücreleri (ok) sitoplazma ve çekirdekleri ile iyi seçiliyor. H.E. X 125.

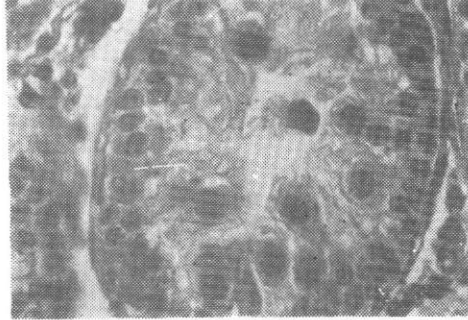


Şekil 9 : Deney grubunda Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında kayıplar görülüyor. H.E. X 125.

görüldü (Şekil 10). Sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon yapısının oluşmadığı izlendi. Bu kesitlerde bazal mebrandan lümene doğru yaklaştıkça hücrelerin yuvarlak yapılarını korudukları ancak birbirlerinden çok farklı özellikler göstermedikleri görüldü (Şekil 11).



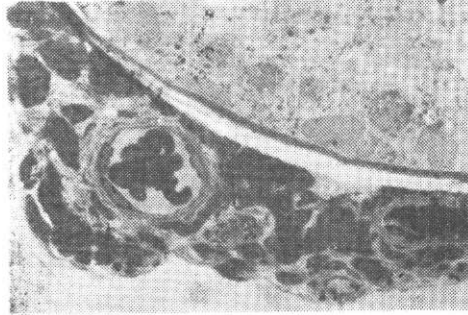
Şekil 10 : Deney grubunda primer spermatosit aşamasındaki hücreler (ok) ve şekil bozukluğuna uğramış Spermatogonyumlar (kıvrık ok) görülüyor. H.E. X 500.



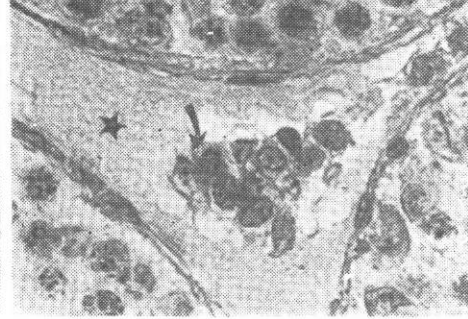
Şekil 11 : Deney grubunda seminifer tübülde jerminal epitel hücrelerinin spermatojenezisi tam anlamıyla oluşturmadıkları görülüyor. H.E. X 200.

Kontrol grubunda interstisiyel alanda kapillerler çevresinde gruplar yapmış olarak Leydig hücreleri (Şekil 12) ve aralarında az sayıda fibroblast ve makrofajlara rastlandı. Leydig hücrelerinin çevresinde kümelendiği kapillerle düzenli lümenleri ve belirgin endotelleri ile görüldü. Deney grubunda normalde interstisiyel alanda kapillerler çevresinde yerleşmiş olarak görülen Leydig hücreleri yer yer dağınık şekilde bulunuyordu. Hücreler arasındaki bağ dokusunun doğal yapısını kaybederek hiyaline benzeyen homojen görünüm kazandığı görül-

dü. Yine aynı alanda kapillerlerin düzenli yapılarının bozulduğu Leydig hücrelerinin çekirdeklerinin çoğunlukla piknotik ve oval şekilli olduğu gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 12 : Kontrol grubunda yarı ince kesitte intertübüller alanda düzgün lümenli kılcak damarlar çevresinde Leydig hücreleri arasında makrofajlar (ince ok) ve fibroblastlar (ok başı) görülüyor. Toluidin mavisi Azür II X 400.



Şekil 13 : Deney grubunda yapıları bozulmuş ve piknotik çekirdekli Leydig hücreleri (ok) ve hücreler arasında hiyaline benzer yapılaşmalar (yıldız) görülüyor. H.E. X 400.

TARTIŞMA

Östrojen tedavisi erkeklerde prostat kanserli hastalarda 50 yıla yakın bir süredir kullanılmaktadır (1,11,20). İlk kez 1941 yılında Charles Hoggins ve Clarence Hodges östrojen tedavisi ve cerrahi yolla kastrasyonun prostat kanserinde etkili olduğunu göstermiştir (2,11,12, 13,21). Son çalışmalarda da oral uygulama ile ortaya çıkan komplikasyonların parenteral östrojen uygulanmasıyla önlenebileceği bulunmuştur (9).

Östrojenin testis fonksiyonları üzerinde inhibitör etkileri iyi anlaşılmıştır. Bu etkiler hem hipofiz gonadotropinleri sekresyonunun inhibisyonu şeklinde hem de direkt Leydig hücrelerinin androjen üretimi üzerinde olmaktadır (3,4,5,13,14,16,19).

Östrojen tedavisini takiben oluşan endokrinolojik değişiklikler geçmişte açıkça ortaya konmakla birlikte (19,22) yapısal bulgular üzerinde çalışmalar daha sınırlı kalmıştır.

Bu çalışmada deney grubunda tunika albugineayı oluşturan bağ dokusu elemanlarında belirgin bir artış görüldü. Aynı grupta seminifer tübüllerin, kontrol grubundaki seminifer tübüllere oranla, küçük çaplı oldukları ve duvarı döşeyen hücrelerin azlığı nedeniyle duvarın ince görünümde olduğu ve tüp lümenlerinin daha boş olduğu görüldü.

Balze ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda testis dokusunda östrojen kullanımından sonra olan değişiklikleri doza ve süreye bağlı olarak değerlendirdiler (3,4). Bu çalışmanın bulguları Balze ve arkadaşlarının araştırmalarında orta yoğun şiddetli olarak değerlendirilen etkiler: bulgularıyla uyum sağlıyordu. Bu çalışmada jerminal epitel hücreleri arasında çözülme ve tübül lümenine hücrel dökülmeler gözlemlendi. Spermatojenik elemanlarda belirgin azalma vardı. Balze'nin tanımladığı dev spermatogonyumlara rastlanılmadı.

Östrojen kullanımını takiben oluşan bulgulardan bir diğeri peritübüler dokuda oldukça geniş fibrozis görülmesidir (16). Bu çalışmadaki deney grubu sıçan testislerinin seminifer tübül bazal membranlarının kontrol grubuna oranla oldukça kalınlaşmış olması ve PAS (+) boyanarak görülebilmesi diğere araştırmacıların (16,18,23) bulgularıyla uyum göstermektedir.

Östrojen kullanımıyla Sertoli hücrelerinde de atrofik değişiklikler gözlemlenmiştir (3). Bu hücreler bazı araştırmacılar tarafından immatür hücreler olarak değerlendirilmiştir (18). Bazı araştırmacılar ise östrojen tedavisinden sonra tek fark olarak yağ damlacıklarının birikimini göstermişlerdir (16). Fakat yağ damlacıklarının varlığı sadece östrojen tedavisi için tipik değildir. Spermatojenezisin durdurulduğu durumlarda, kriptorşidizm, hipofizektomi, lokal ısı artışı ve testiküler feminizasyon sendromunda da aynı olay görülür (6). Tedavide kullanılan doza göre hücre içinde biriken yağ damlacıkları ve diğere inklüzyonların sayısının değiştiği düşünülmektedir (16,18). Bu çalışmada Sertoli hücrelerinin birbirinden farklı özellikler gösterdiği dikkati çekti ancak sitoplazmik içerik seçilemediğinden inklüzyonlarda görülemedi.

Spermatogonyumların üzerinde lümeneye doğru oldukça iri sitoplazmaları ve belirgin kromatin yapısı içeren çekirdekleri ile primer spermatozoid aşamasında olduğu düşünülen hücreler görüldü. Bu hücreler Balze ve arkadaşlarının (4) çalışmasında orta şiddette lezyonların olduğu gruba uyuyordu. Balze'nin tarif ettiği vakuollü spermatozoidler bu çalışmadaki gözlemlerde görülemedi.

İntertübüler bağ dokusunda görülen değişiklikler Balze ve arkadaşlarının çalışmasında (3,19) ilacın süre ve dozuna göre değerlendirilmişti. Erken dönemde Leydig hücrelerinin düzensiz gruplar halinde olduğu ikinci grupta hücrelerin dağınık yerleştiği ve son gruptaysa Leydig hücreleri ya da fibroblast benzeri hücreler olarak adlandırılan hücrelerin az sayıda olduğu; bunların yerine orta büyüklükte poligonal şekilli hücrelerin görüldüğü bildirilmiştir (3,9).

Bu çalışmada normalde intertübüler dokuda kılcal damarlar çevresinde görülen Leydig hücrelerinin yer yer dağıldıkları, hücreler arasındaki bağ dokusunun normal yapısını kaybettiği, lif yapısının seçilemediği ve hiyaline benzeyen homojen görünümde olduğu, kılcal damarların ise düzenli yapılarını kaybetmiş oldukları görüldü. Daha büyük büyütmelelerde Leydig hücrelerinin piknotik çekirdekli oval şekilli hücreler olarak yer aldığı gözlemlendi.

Bu çalışma ışık mikroskobunda elde edilen gözlemlere göre değerlendirilmiştir. Ancak ince yapısal düzeyde oluşan değişiklikleri saptayabilmek ve bu konudaki araştırma sonuçları ile kıyaslayabilmek için ilerde elektron mikroskopta yapılacak gözlemlerle sonuçlar vurgulanabilir.

ÖZET

Bu çalışmada sentetik östrojen dietilstilbesterolün sıçan testis dokusu üzerine yaptığı değişiklikler ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

Kontrol grubuna ait incelemede, testis dokusu tüm normal özelliklerini gösterirken, deney grubunda a) Belirgin doku atrofisi, b) Tunika albugineada kalınlaşma, c) Seminifer tübül duvarında daralma ve tübül çaplarında azalma, d) Peritübüler bağ dokusunda kalınlaşma, e) Seminifer tübül epiteli bazal mebranında dalgalı yapı, f) Jerminal epitel hücreleri arasında çözülme ve dökülmeler, g) Spermatojenik elementlerde azalma h) Sertoli ve Leydig hücrelerinde yapısal değişiklikler gözlemlendi.

Sonuç olarak sıçanlar için kabul edilen tedavi dozunda (8), deney süresi sonunda spermatojenezisin ikinci aşaması olan mayoz bölünme safhasında durduğu tespit edildi. İnce yapısal düzeyde olan değişiklikleri saptayıp, diğer sonuçlarla karşılaştırabilmek amacı ile elektron mikroskobunda çalışmanın gerekliliğine inanıldı.

Anahtar Kelimeler : Testis, Dietilstilbesterol.

SUMMARY

A Light Microscopic Analysis of Rat Testis After Parenteral Administration of Diethylstilbestrol

This study is concerned with the morphological changes observed in rat testicular tissue following diethylstilbestrol administration.

While there wasn't any change in the control group, in the light microscopic examination of the group to which diethylstilbestrol was given, the most important changes observed were; a) Atrophy of the gonads, b) Thickening of tunica albuginea, c) Narrowing of seminiferous tubular wall and decreasing of tubuli diameters, d) Extensive fibrosis of the peritubular tissue, e) Marked increase in thickness and infolding of basement membrane, f) Dissociation and desquamation of spermatogenic epithelium, g) A gradual disappearance of spermatonic elements, h) Structural changes of Sertoli and Leydig cells.

Consequently, after the administration of therapeutic dosage of diethylstilbestrol it was seen that the spermatogenesis was stopped in the second phase, «Meiosis.

On the light of this study, it is believed that further investigation by means of electron microscopy should be carried out for seeing fine structure.

Key Words : Testes, Diethylstilbestrol.

KAYNAKLAR

1. Aro JLV Haapiainen RK Rannikko SAS Alfthan OS and the Finnprostate Group : High dose polyestradiol phosphate with and without acetosalicylic acid versus orchiectomy in the treatment of prostatic cancer, *British Journal Urology* 63 : 512-514, 1989.
2. Bishop MC Lemberger RJ Sellby C Lawrence WT : Estrogen dosage in Prostatic Cancer : The Threshold Effect. *British Journal of Urology* 64 : 290-296, 1989.
3. de la Balze FA Mancini RE Bun GE Irozu J : Morphologic and histochemical changes produced by estrogens on adult human testis. *Fertil Steril* 5 : 421-436, 1954.
4. de la Balze FA Gurtman AL Janches M Arrilage F Alvarez AS Segal I : Effect of Estrogens on the human testis with special reference to the germinal epithelium. A Histologic Study. *J. Clin Endocrinol Metab.* 22 : 1251-1261, 1962.
5. Dunn CW : Stilbesterol Induced testicular degeneration in hypersexual males. *J. Clin. Endocrinol* 1 : 643-648, 1941.
6. Flickinger CJ Loving CK : Fine structure of the testis and epididymis of rats treated with cyproterone acetate. *Am Anat* 146 : 359-384, 1976.
7. Gridley MF : Manual of histologic and special staining technics 2nd Ed. Mc Graw. Hill Book Company New York, 1960.
8. Griffith JQ Farris EJ : The rat in Laboratory investigation 334, 1942.
9. Gunnarsoon PO Norlen BJ : Clinical Pharmacology of polyestradiol phosphate. *The Prostate* 13 : 299-304, 1988.
10. Haapiainen R Rannikko S Alfthan O : Comparison of primary orchiectomy and polyestradiol phosphate in the treatment of advanced prostatic cancer. *British Journal of Urology.* 66 : 94-97, 1990.

11. Henriksson P Edhag O Eriksson A Johansson SE : Patient of high risk of cardiovascular complications in oestrogen treatment of prostatic cancer. *British Journal of urology* 63 : 186-190, 1989.
12. Henriksson P Eriksson A Stage R Collste L Pousette A Von Sschoultz B Calstrom K : Cardiovascular Follow-up of patients with prostatic cancer treated with single-drug polyestradiol phosphate. *The Prostate* 13 : 257-261, 1988.
13. Huhtaniemi IT Warren DD Catt KJ : Comparison of oestrogen and GnRH agonist analogue induced inhibition of the pituitary - testicular function in rat. *Acta Endocrinologica* 103 : 163-171, 1983.
14. Kalla NR Nisula BC Menard R Loriaux DL : The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis *Endocrinology* 106 : 35-39, 1980.
15. Krajian AA Gradwohl RBH : *Histopathological Technic*, 2nd Ed. St. Louis Fhe C.V. Mosby Company, 1952.
16. Lu CC Steinberg A Effects of estrogen on human seminiferous tubules light and electron microscopic analysis. *Am J Anat* 153 : 1-14, 1978.
17. Scott WW Menon W Walsh PG : *Hormonal Therapy of prostate cancer* 45 : 1929-1936, 1980.
18. Schulze C : Sertoli Cells and Leydig Cells in Man. *Adv Anat Embryology and Cell Biology* Vol 88 : 1-104, 1984.
19. Schulze C : Response of the human testis to longterm estrogen treatment : Morphology of Sertoli Cells. Leydig cells and spermatogonial cells. *Cell Tissue Res* 251 : 31-43, 1988.
20. Smith DR : *General Urology* Lange Med Pub. 10th Ed., 1981.
21. Stege R Calstrom K Collste L Eriksson A Heriksson P Pousette A Von Schoultz B : Single-Drug Parenteral Estrogen Treatment in Prostatic Cancer : A study of two maintenance-dose regimens. *The Prostate* 14 : 183-188, 1989.
22. Yanaihara T Troen P : Studies of the human testis. Effect of estrogen on testosterone formation in human testis in vitro. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 34 : 968-973, 1972.
23. Young GPH Golstein M Phillips DM Sundorom K Gunsalus GL Bardin CW : Sertoli cell-only syndrome produced by cold testicular ischemia *Endocrinology* 122 : 1074-1082, 1988.