

KİNOLON TÜREVLERİNİN SPERMİOGENEZ VE TESTİS ANDROJEN RESEPTÖRLERİNE ETKİSİNİN WİSTAR TİPİ SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI

EFFECT OF CHINOLON DERIVATIVES ON SPERMIOGENESIS AND TESTIS ANDROGEN RECEPTORS INVESTIGATED AT WISTAR RATS

BAŞAK, D*., AYTEKİN, Y**., ALTUĞ, T***., HEKİM, N****., ÖNER, A*****., ÖZDİLER, E*.

- * SSK Okmeydanı Hastanesi II. Üroloji Kliniği
- ** İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı
- *** İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Merkezi
- **** Pakize Tarzı Hormon Laboratuvarı
- ***** Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı

ÖZET

Kinolon türevlerinden ciprofloxacın ve ofloxacın'ın toksik dozlarının Wistar tipi sıçan testislerinde spermiogenez ve androjen reseptör sayısına tesiri incelendi. Reseptör tayinleri DNA miktarı ölçülerek yapıldı. Histolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskopunda tetkik edildi. Patolojik değişiklikler her iki metodta da anlamlı bulunmadı.

SUMMARY

The effects of chinolon derivatives ciprofloxacin and ofloxacin on spermiogenesis and androgen receptors were investigated at Wistar rats. Receptor amounts were directly correlated to the DNA amount in the nucleus. Histological changes were detected by light and electron microscopy.

The pathological findings were not significant in both methods.

GİRİŞ

Saatte milyonlarca sperm hücresi üreten germinal epitel tabakası vücutta en fazla proliferen olan dokudur. Bu yüzden dış etkenlere çok hassastır. Bazı ilaçlar ve kimyasal maddelerin germinal epitele etki etmesi ile kısırlığa varan değişiklikler ortaya çıkar (1).

Nitrofurantoin derivatları, bazı antibiyotikler ve kemoterapötikler (gentamisin, oksitetrasiklin, trimetoprim gibi) direkt olarak germinal hücrelere etki ederler (2).

Gittikçe daha yaygın olarak kullanılan yeni kinolon türevlerinden ciprofloxacın ve ofloxacın'ın bu yöndeki etkileri günümüzde kısmen bilinmektedir. Ciprofloxacın'ın prostat dokusunda, serum konsantrasyonunun 200-400 katına ulaşan yoğunlukta bulunduğu gösterilmiştir (3). Ofloxacın'ın ise spermatogenez ve sperm motilitesini bozucu bir etkisi olmadığı bilinmektedir, bu bakımdan diğer antibiyotiklere üstünlük sağlamış durumdadır (4).

Androjen hormonları Leydig hücreleri tarafından sentezlenir ve testiste intersellüler sıvıya salgılanır. Salgılanan androjen hormonunun hangi miktarının seminifer tubulusta tutulacağı ortamdaki bağlayıcı proteinlere bağlıdır. Testiste iki türlü androfilik makromolekül bulunmuştur. Bunlardan ilki ABP (Androgen Binding Protein) adı verilen ve sıçan testisinde büyük miktarlarda bulunan proteindir (5). İkinci bir tür androjen bağlayıcı protein intrasellüler reseptör özellikleri taşımaktadır ve ilk olarak hipofizektomili sıçanlarda gösterilmiştir (6). Testosteron tubuluslarda androjen bağlayıcı proteine (ABP) bağlanıp germ hücrelerine ve epididimise taşındıktan sonra (7), ABP'den dissosiyeler olur. Böylelikle hücre içerisine giren testosteron sitoplazmada reseptör olarak tanımlanan proteinlere bağlanır ve yine reseptör vasıtası ile hücre çekirdeğine taşınır (8). Çekirdekte, androjen reseptör kompleksi DNA, RNA sentezlerini uyarır (9, 10, 11). Steroid hormon reseptörlerinin diğer bağlayıcı proteinlerden büyük farkı, hormon ile reseptör arasında çok yüksek bir bağlanma afinite ve spesifitesi bulunmasıdır. Hormonun reseptörlere yüksek afinite ve spesifite ile bağlanması ise hücrenin DNA

ve RNA sentezinin artmasına sebep olmakta, diğer bir deyişle bağlanma biyolojik bir cevapla sonuçlanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ofloxacin ve ciprofloxacin'in toksik ölçülerde;

a. testis androjen reseptör sayısına etkisini, DNA tayini ile araştırmak

b. seminifer hücre yapılarında olan değişikliği ışık ve elektron mikroskopunda incelemektir.

MATERYAL VE METOD

Anderson ve arkadaşları (12) tarafından geliştirilen ve nukleusa bağlı uterin östrojen reseptörlerini incelemekte kullanılan "nükleer yer değiştirme metodu" testis androjen reseptörleri tayininde kullanılmıştır (13). Bu metodun prensibi şöyledir:

a. Testosteron hormonu hücreye girer ve spesifik sitoplazmik reseptöre bağlanır.

b. Hormon reseptör kompleksi nukleusa girdikten sonra kromatin üzerindeki akseptör bölgeye bağlanır.

c. Nükleer pellet izole edilir ve oksijen ortamından serbestleştirilir.

d. Nukleusa bağlı kompleksteki markalanmış hormon radyoizotop markalı hormonla değiştirilir.

e. Nukleuslar yıkanır ve radyoaktivite sayılır.

Araştırmada İstanbul Üniversitesi DETAM'da yetiştirilen Wistar tipi genç erişkin sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar % 21 protein içeren pellet yemler ile ad libidum beslendiler, her gün taze çeşme suyu verildi. 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ışık periyodunda tutuldular. Hayvanlara verilecek ilaç dozu LD 50 miktarına göre ayarlandı ve tubajla uygulandı. 40-70 g. arası olan sıçanlara ofloxacin 1750 mg/kg ve 875 mg/kg, ciprofloxacin ise 2500 mg/kg ve 1250 mg/kg dozlarında verildi. Bu şekilde her birinde 10 yetişkin sıçan olan dört grup oluşturuldu. Kontrol grubuna ise 5 gün süre ile gastrik tubajla çeşme suyu verildi.

Hayvanlar ilaç bitiminden 48 saat sonra, erken dönemde ve 4 hafta sonra, geç dönemde, yüksek dozda eter verilerek öldürüldü ve testisleri alındı.

Testis nükleer androjen tayinleri şu şekilde yapıldı:

- Dokular makasla ince kıyıldıktan sonra 0.01 M Tris-HCL tamponu (pH 7.4) ile cam-cam potter homojenizatöründe homojenize edildi. 0.01 M Tris-HCL tamponu (pH 7.4) 0.32M sakkaroz ve 3mM MgCl içeriyordu.

- Homojenizat gazlı bezden süzüldü. Süzün-tüdeki nükleer pellet 15' 800 devirde çevrildikten sonra üç kez yukarıdaki tamponla yıkandı.

- DNA tayini difenilamin metodu ile (Burton reaksiyonu) yapıldı. 20-40 ug DNA içerecek miktarda alınan nükleer pellet 60 nM I-testosteron ile gece boyu 25 C'de inkübe edildi.

- X800 devirde santrifüj edildi, üç kez tamponla yıkandı, tekrar santrifüj edildi, üst faz atıldı ve pelet 2 x 1.5ml eter: kloroform (4:1) ile ekstrakte edilerek gamma sayacında sayıldı (5).

Ayrıca testislerden hazırlanan preparatlar ışık ve elektron mikroskopunda incelendi. Işık mikroskobu tetkiki için Bouin sıvısında fikse edilen doku parçaları 24-48 saat sonra dehidratasyon işlemi için alkol serilerinden geçirildi (%70-90-96-100'lük alkol serileri). Bundan sonra toluol'de şeffaflaştırılıp parafin içine gömüldüler ve bloklandılar. Bloklardan 7 mikron kalınlığında alınan kesitlere haemotoxyleneosin (HE) boyaları ve periodik acid shiff (PAS) reaksiyonları uygulandı, ışık mikroskobu ile tetkik edilip fotomikrografları çekildi.

Elektron mikroskop tetkiki için alınan küçük doku örnekleri Na-kakodilat tamponlu glutaraldehid ve osmium-tetrokaid fiksatifleri kullanılarak tespit edildi. Aseton serilerden geçilerek dehidratasyonu yapıldı ve vestopal içine gömüldü. Bloklardan ultramikrotomla 700 mikron kalınlığında alınan kesitlere kurşun-sitrat kontrastlamaları yapılarak Jeol 1000C elektron mikroskopunda incelendi ve resimleri çekildi.

SONUÇLAR

I. Androjen reseptör sayısındaki sonuçlar:

Kontrol grubu: Ortalama 2.652 pmol/mg DNA

Grup I: (1250 mg/kg Ciprofloxacin 5 gün süre ile)

Erken Devrede: 1.058-1.485 pmol/mg DNA (ortalama 1.318 pmol/mg DNA)

Geç Devrede: 0.111-0.762 pmol/mg DNA (ortalama 0.492 pmol/mg DNA)

Grup II: (875 mg/kg ofloxacin 5 gün süre ile)

Erken devrede: 3.325-3.854 pmol/mg DNA
(ortalama 3.589 pmol/mg DNA)

Geç devrede: 0.183 pmol/mg DNA

Grup III: (2500 mg/kg Ciprofloxacın 5 gün süre ile)

Erken devrede: 0.981-1.592 pmol/mg DNA
(ortalama 1.286 pmol/mg DNA)

Geç devrede: 0.976 pmol/mg DNA

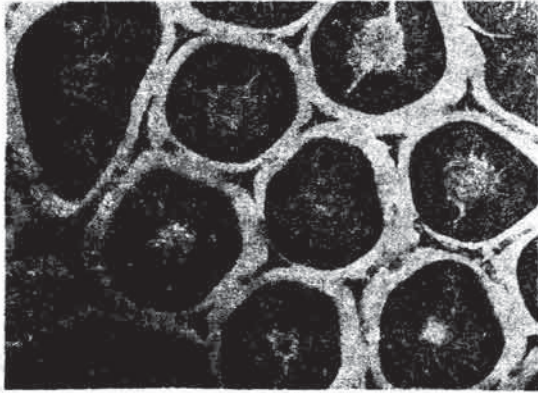
Grup IV: (1750 mg/kg ofloxacin 5 gün süre ile)

Erken devrede: 1.213-1.753 pmol/mg DNA
(ortalama 1.483 pmol/mg DNA)

Geç devrede: 0.557-1.666 pmol/mg DNA
(ortalama 1.111 pmol/mg DNA)

II. Işıık ve elektron mikroskobu sonuçları:

Kontrol sııan grubundan elde edilen testis kesitlerinde seminifer tubulusların düzenli germinal epitele sahip oldukları görülmüştür (Resim 1). Se-

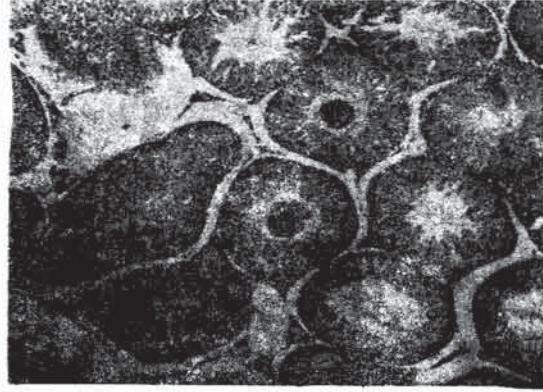


Resim 4

minifer tubulusların peritübüler dokuları normal kalınlıktadır. Bazal laminadan lümeneye doğru dizilmiş germinal hücrelerden, spermatogonium, spermatosit ve spermatidler seminifer epiteliumun farklı safhalarında ve olgunlaşma döneminde izleniyordu. İnterstisyel dokuda Leydig hücreleri küçük gruplar oluşturarak tubul aralarında kapillerlerin etrafında bulunuyordu.

Düşük doz ofloxacin (875 mg/kg) ve ciprofloxacın (1250 mg/kg) uygulamalarından sonra testis seminifer tubuluslarında ışık mikroskobu seviyesinde görülen en belirgin özellik, seminifer tubul lümeninde olgunlaşmamış germinal hücrelerin dökülmeleri ve birikmeleri şeklinde ortaya çıkmıştır. Düşük doz ofloxacin ve ciprofloxacın uygulama-

larından sonra elde edilen bulgular benzerlik göstermiştir. Seminifer tubuluslar bazılarında olgunlaşmamış hücre dökülmeleri görülürken (% 10-15 kadar), diğer çoğu tubuluslar bu bulguyu göstermediler (Resim 2,3).



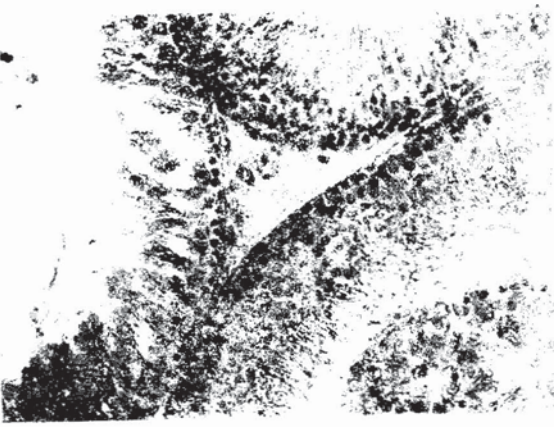
Resim 2



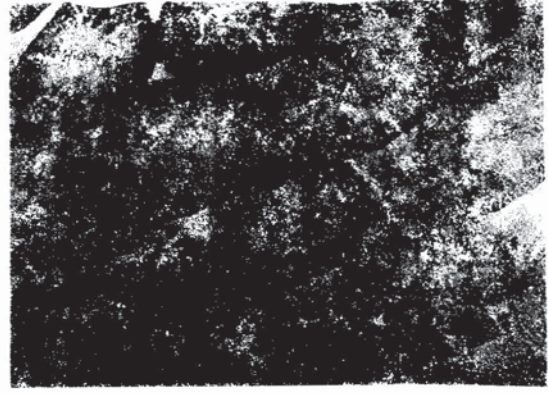
Resim 3

Bu testislerin elektron mikroskobisi ile tetkinde özellikle tubuluslarda, bazal seviyede bulunan spermatogoniumlar ile, Sertoli hücreleri arasında membran ilişkilerinin bozulduğu görülmüş, Sertoli hücrelerinin membranlı organellerindeki (mitokondria, endoplazmik retikulum ve mikrotubulus membranları) bozukluklar yaygın olarak tespit edilmiştir. Lümendeki döküntü hücreler incelendiğinde bunların mayoz bölünmenin değişik fazlarındaki spermatositler ve olgunlaşmamış spermatidler olduğu görülmektedir (Resim 4).

Ultrastrüktür araştırmasında diğer bir bulgu da tüm antibiyotik uygulamalarında spermatogoniumlarda koyu tip olanların daha sıklıkla görülmesi ve bazı spermatogoniumların bazal



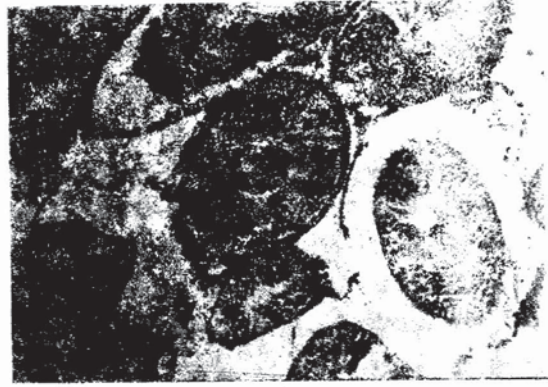
Resim 4



Resim 7



Resim 5



Resim 8



Resim 6

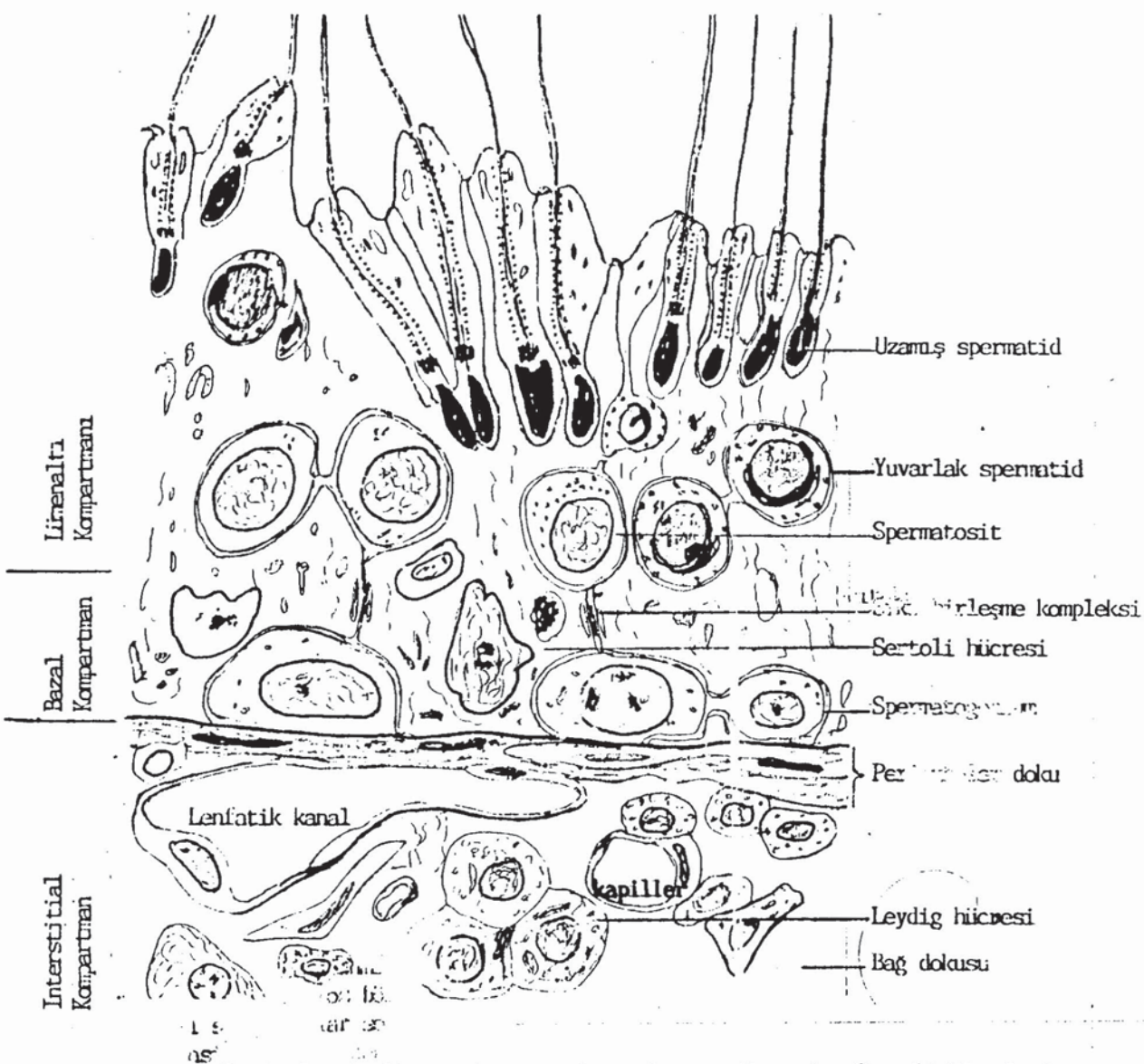
laminadan ayrılması ve çekirdek piknozu kadar varan kromatin bozukluklarıdır (4, 6).

Yüksek doz ofloxacin (1750 mg/kg) ve ciprofloxacin (2500 mg/kg) uygulamalarında seminifer tubulus lümenine olgunlaşmamış germinal hücrelerin dökülmesi bulgusu her testiste daha fazla tubulusta görülmüştür (% 15-20 kadar). Germinal epiteldeki düzenin bozulması daha dikkat

çekici olmuştur (Resim 7, 8). Bu grupta da intakt seminifer tubuluslar çoğunlukta kalmıştır. Germinal epitel bozukluklarının fazla olduğu bölgelerde fokal Leydig hücresi artışları da görülmüştür.

TARTIŞMA

Aldığımız kesitlerde bazı tubuluslar intakt kalırken diğer bazılarının lümenlerinde fazlaca olgunlaşmamış germinal hücre döküntülerinin görülmesinin sebebi seminifer epitelium siklusu kavramı ile açıklanabilir (Şekil 1). Bu kavrama göre tüm memeli testislerinin cinse has belirli sayılarda germinal epitelium siklusu mevcuttur (14,15). Bu sıklularda bazı dönemler dış ve iç etkenlere karşı daha duyarlıdır (16). Sıçan türünde 14 ayrı kompozisyon halinde bulunabilen seminifer tubulus kesiti görüntüsü veren hücre ilişkisinin hangi fazlarının uygulanan antibiyotiğe cevap verdiğini bilmiyoruz. Ancak ortaya çıkan seminifer tubulus hasarlarının reversibl olabileceği ve germinal epiteliumun tam bir siklusu sonunda re-



Germinal epitelium ve interstitiuma ait şematik çizim. Sertoli hücreleri sıkı birleşme kompleksleri altında bazal kompartmandaki spermatogoniumlar (Mitoz bölünen geçiren hücreler) ve Limenaltı kompartmandaki spermatositler (Mitoz bölünen geçiren hücreler), yuvarlak başlı ve uzamış başlı spermatidler seminifer tubulusun bazal Laminasından Limene doğru hareket eden hücreler olarak sıralanmışlardır. Seminifer tubulus duvarını oluşturan Peritubular doküde Myoid hücre katı ve hücresiz katlar izleniyor. Interstitial kompartmanda lenfatik damarlar, kan damarları, bağ dokusu hücrelerinden başka androgen sentezi ile görevli Leydig hücreleri grupları gösterilmiştir.

generasyona uğrayabileceği düşünülmektedir. Uygunladığımız antibiyotik cinsinin, daha evvel uygulanan antibiyotiklere göre testiste spermatogeneze etkisi en düşük seviyede kalmıştır (17).

Toksik dozlarda verilen ilaçlara reseptör seviyesindeki değişiklikler anlamlı olmamıştır. Ancak dikkati çeken 4 haftalık takip sonunda reseptör sayılarında düşmelerdir. Bu çalışmanın devamı olarak daha düşük dozda verilen antibiyotiklerin daha geniş hayvan gruplarında araştırılması uygun olacaktır.

Netice olarak bu antibiyotik grubunun diğerlerine nazaran daha masum olduğu, verilen dozların gonadotoksik olmadığı, süre için daha fazla deneye ihtiyaç olduğu ifade edilebilir. Ayrıca diğer ilaçlarla sinerjistik etkiler olup olmadığı ve neticelerin türe has olup olmadığı araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- Neumann, F.: Effects of drugs and chemicals on spermatogenesis. Arch. Toxicol., Supply. 7, 109-117 1984.
- 2- Timmermanns, L.: Influence of antibiotics on spermatogenesis J Urol. 112:348-349, 1974.
- 3- Gombert, M.E., duBouchet, L., Aulicino, T.M., Berkowitz, L.B., Macchia, R.: Brief Report: Prostatic tissue concentrations of ciprofloxacin after oral administration Am J Med 82(suppl 4A): 130-132, 1987.
- 4- Schramm, P.: Ofloxacin: Concentration in human ejaculate and influence on sperm motility Infection 14 Supply 4:274-275, 1986.
- 5- Hansson, V., Djoseland, O., Reusch, E., Attramadal, A., Torgensen, O.: An androgen-binding protein in the testis cytosol fraction of adult rats. Comparison with the androgen-binding protein in the epididymis. Steroids 21:457-474, 1973.
- 6- Hansson, V., McLean, W.S., Smith, D.J., Tindall, S.C., Weddington, S.C., Nayfeh, S.N., French, F.S., Ritzén, E.M.: Androgen receptor in rat testis Steroids 23:823-832, 1974.
- 7- Hansson, V.: Androgen Transport and Receptor Mechanism in Testis and Epididymis Universitetsforlaget Trykningssentral, Oslo 1974.
- 8- Sekeris, C.E.: Receptor interactions with the genome Res. Steroids 7:115-119, 1977.
- 9- Coffey, D.S., Shimasaki, J., Williams-Ashman, H.G.: Polymerization of Deoxy-ribonucleotides in relation to androgen induced prostatic growth Arch. Biochem. Biophys. 124:184-198, 1968.
- 10- Davies, P., Griffiths, K.: Stimulation of RNA-Polymerase Activity in vitro by Prostatic Steroid-Protein Receptor Complexes Biochem. J 136:611-622, 1973.
- 11- Chung, L.W.K., Coffey, D.S.: Biochemical characterization of Prostatic Nuclei. Relationships between DNA synthesis and protein synthesis Biochem. Biophys. Acta 247:584-596, 1971.
- 12- Anderson, J., Clark, J., Peck, E.Jr.: Study of the nuclear-bound-uterine estrogen receptor by the nuclear exchange method Biochem. J 126:561, 1972.
- 13- Sanborn, B.M., Elkington, J.S.H., Steinberger, A., Steinberger, E.: Androgen binding in the testis: In vitro production of androgen binding protein (ABP) by Sertoli cell cultures and measurement of nuclear bound androgen by a nuclear exchange assay in Dutau, M. and Means (eds). Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis. Plenum Press, New York, p 293, 1974.
- 14- Stoa, K.F., Hekim, N., Dahl, O., Hoisater, P.A.: Binding of Steroid Biochem 11:261-265, 1979.
- 15- Clermont, Y.: Kinetics of the spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelial cycle and spermatogonial renewal Physiol. Rev 52:198-236, 1972.
- 16- Amann, R.P.: Structure and function of the normal testis and epididymis J Am College Toxicol. 8:457-471, 1989.
- 17- Öner, A., Aytekin, Y., Altuğ, T., Kural, A.R., Tuncel, R., Solok, V.: Cephoperazone, ceftriaxon ve cefotaxim'in spermatogenez üzerine etkileri 9. Ulusal Üroloji Kongresi tebliği Bodrum, 1987.