

ETANOLÜN SIÇAN TESTİSİ VE FERTİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Uzm. Dr. Engin YENİLMEZ (*), Dr. A. Pınar YAMANTÜRK (**), Prof. Dr. Yener AYTEKİN (*)

ÖZET: Etanolün testisde spermatogenez üzerindeki olumsuz etkilerinin primer yolla Sertoli hücrelerini etkileyerek ortaya çıktığı (1) belirtilmesine karşın, kan testosteron düzeyini de belirgin olarak düşürmesi (5,7,12,16,17) bu olayda sekonder bir etkinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu sekonder etkinin testosteron eksikliğinin giderilmesi yoluyla ortadan kaldırılıp kaldırılamayacağını araştırmak amacıyla genç erişkin Sprague-Dawley türü sıçanlardan gruplar oluşturuldu. Gavaj ile I. gruba çeşme suyu, II. gruba sukroz solüsyonu, III. ve IV. gruba ise etanol verildi. IV. gruba ayrıca intramusküler olarak testosteron enjekte edildi. Etanol verilen sıçanların kan testosteron düzeyleri kontrollere göre önemli ölçüde düşmüştü, etanole ilaveten testosteron verilen sıçanlarda bu düzey kontrollere yaklaşılmıştır. Işık ve elektron mikroskopu ile yapılan incelemelerde III. gruba ait sıçan testislerinde sıçandan sıçana ve tubulden tubule farklılık gösteren bazı spermatogenez bozuklukları izlendi; IV. grupta ise bu bozukluklara çok seyrek olarak rastlandı. Seminifer tubul çapları III. ve IV. gruplarda I. gruptakilerden daha küçük; IV. grupta III. gruptakilerden daha büyük bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, sıçanlardaki yavru sayıları III. grupta kontrollerden daha düşük bulunurken IV. grupta bu sayı kontrollere yakın bulundu.

SUMMARY: THE EFFECTS OF ETHANOL ON THE RAT TESTIS AND FERTILITY. It can be thought that ethanol effects the Sertoli cells secondarily since it reduces blood testosterone levels significantly (5,7,12,16,17) although one report describes its negative effects on spermatogenesis in the testis are primary (1). In the present study the groups which consist the young adult Sprague-Dawley rats were formed to investigate whether this possible secondary effect would get rid of or not by supplementation of testosterone. The rats in groups. I, II and III-IV were administered tap water, sucrose solution, ethanol solution respectively by gavage. The rats in group IV were also injected testosterone intramuscularly. Blood testosterone levels of the rats which were given ethanol decreased remarkably comparing with the control levels, but the levels of the same hormone belong to the rats which were injected testosterone adding ethanol gavage were found close to the control levels. It appeared that the testes of group III showed slightly abnormal spermatogenesis under the light and the electron microscope and these abnormalities were different from one rat to another and from one tubule to another. These kinds of abnormalities were seldom in group IV. The diameters of tubules in groups III and IV were smaller than they were in group I but in group IV the diameters of tubules were larger than they were in group III. Not significantly the rats of group III brought forth young at the lower numbers from the control group but in group IV these numbers were found close to the control group.

GİRİŞ

Etanolün, testis morfolojisi ve fonksiyonları üzerinde çeşitli olumsuz etkiler yaptığı bilinmektedir. Etanol dışardan kontrollü olarak verildiğinde kan testosteron düzeyini düşürmekte (5,7,12,16,17), erkek sıçanlarda pubertal testis gelişimini geciktirmekte, sperm sayısı ve hareketliliğini azaltmaktadır (1). Alkolün gonadotoksik etkileri birçok hayvan türünde gösterilmiş, özellikle sıçan en iyi model olarak seçilmiştir. Biyokimyasal araştırmalarda etanolün membran harabiyetine neden olduğu (11) böylece birçok dejeneratif hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı da gösterilmiştir (10). Etanolün sıçan vücut ağırlığı ve testis ATP içeriğini azalttığı da bildirilmiştir (3). Sıçan testislerinde spermatogenezisi bozarak etkisini gösteren etanol, somatik hücreler olan Sertoli ve Leydig hücrelerinin membran sistemlerini etkileyerek steroid metabolizmasını baskı altına almaktadır (11). Bu çalışmada etanol uygulanan sıçanlarda, eksilen testosteron miktarı kadar testosteron dışardan verilerek testosteron eksikliği karşılanmış, bu sıçanların testis fonksiyonlarının ve morfolojisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Işık mikroskop seviyesinde germlenel hücreler üzerinde gösterilen değişiklikler yanında elektron mikroskop seviyesinde Sertoli ve Leydig hücrelerindeki ultrastrüktür bulguları da araştırılmıştır. Kan testosteron seviyelerinde gözlenen düşmeler ve steroid biyosentezi ile ilgili organellerdeki bozukluklar saptanmış ve bunlar arasındaki ilişki tartışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Araştırmamızda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (DETAM)'nden sağlanan 180-200 g. ağırlığındaki Sprague-Dawley türü genç erişkin

albino sıçanlar kullanıldı. Tüm sıçanlara ad libitum su ve yiyecekler ek olarak sıçan başına günde 3 ml. sıvı gavajla verildi. Deney boyunca bütün gruplara ait sıçanların yem ve sıvı tüketimleri kaydedildi; vücut ağırlıkları ölçüldü. Gruplar şu şekilde oluşturuldu: I. Grup (kontrol): Erkek sıçanlara gavajla çeşme suyu verildi. II. Grup (sukroz): Erkek sıçanlara 3 ml. % 40'lık etanol solüsyonunun kalori değerine eşdeğer sukroz (1.65 g.) çeşme suyunda çözülerek gavajla 3 ml. verildi. III. Grup (etanol): Erkek sıçanlara gavajla çeşme suyu ile hazırlanan % 40'lık etanol solüsyonu 3 ml. verildi. IV. Grup (etanol + testosteron): Erkek sıçanlara % 40'lık etanol solüsyonu gavajla 3 ml. verildi. Deneyin 30. gününde sıçanların kanları alınıp serumlarında testosteron düzeyi ölçülerek, etanol verilen sıçanlarda ortalama azalan kan testosteron miktarları belirlendi. Deneyin ikinci ayında IV. gruba ait sıçanlara etanole ek olarak sıçan başına haftada bir defa 25 ng testosteron (sustanon 250) 4 hafta süre ile intramusküler olarak enjekte edildi. Her bir grup 10 erkek + 10 dişi olmak üzere 20 sıçandan oluşurken; bir ve iki aylık dönemlerde incelemeye alındı.

Deneyin 10, 30, 45 ve 60. günlerinde kuyruk veninden alınan sıçan kanlarında etanol ve testosteron düzeyleri saptandı. Serum testosteron düzeyleri RIA; serum etanol düzeyleri ise FPIA yöntemleri ile ölçüldü.

Deneyin 20 ile 30. ve 50 ile 60. günleri arasında her kafilete bir erkek ve bir dişi olacak şekilde çiftleştirilen bütün gruplara ait erkek ve dişi sıçanlar bu periyodların bitiminde ayrıldılar; dişi sıçanlardan her biri birer küçük kafete konarak bir ay boyunca döl verimi hesaplanmak üzere her gün takip edildiler. Çiftleştirilen dişilerin doğurup doğurmadıkları, doğuranların yavru sayıları saptandı. Yavrular doğduktan sonra bir ay, gelişim bozukluğu olup olmadığının belirlenmesi amacıyla takip edildi. Bir aylık uygulamaya tabi tutulan sıçanlar deneyin 30. gününde, iki aylık uygulamaya tabi tutulan sıçanlar ise deneyin 60. gününde sakrifiye edilerek bu sıçanların testisleri ışık mikroskopu için Bouin, elektron mikroskopu için ise glutaraldehit fiksatilerine alındı. Rutin ışık ve elektron mikroskopik doku takiplerinden sonra usulüne uygun preparasyonlar hazırlanarak ışık ve elektron mikroskoplarında incelendi.

Işık mikroskopu incelemeleri için hazırlanan preparatlar-

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul

** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul

Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje no: 455/280291) tarafından desteklenmiştir.

TABLO 1

GRUPLAR	Testosteron düzeyi (ortalama±SE) ng/dl	İncelenen Tubul sayısı	Tubul çapı (ortalama±SE) mikron
I. (30 gün)	165.03±2.64	104	267.10±2.29
II. (30 gün)	162.46±3.01	109	285.10±3.37
III. (30 gün)	46.15±1.93**	105	229.20±3.30**
I. (60 gün)	169.96±3.24	103	273.90±2.54
II. (60 gün)	165.15±2.86	101	283.70±3.75
III? (60 gün)	39.50±2.48**	110	210.00±2.22**
IV. (etanol 60, testosteron 30 gün)	135.70±3.24*	107	260.60±2.09*

* p<0.05

** p<0.001

daki görüntüler Hertel-Reuss Kassel marka ışık mikroskopunun oküler kısmına takılan ekranda izlendi. Bu ekranda izlenen seminifer tubullerin enine kesitlerinin çapları ölçüldü. Her gruptan en az 100 tubul çapı ölçüldükten sonra tubul çaplarındaki değişiklikler istatistiksel olarak araştırıldı.

İstatistik yöntem olarak Student t-test ve Mann Whitney u-test kullanıldı.

BULGULAR

Biyokimyasal Bulgular:

Serum etanol düzeyleri, uygulamadan bir saat sonra kontrollerde < 10 mg/dl iken etanol verilen gruplarda > 300 mg/dl olarak saptanmıştır. Etanol uygulamasından 24 saat sonraki örneklerde ise düzey 10 mg/dl'nin altına inmiştir.

III. gruba ait sıçanlarda serum testosteron seviyeleri önemli ölçüde düşmüş; IV. gruba ait sıçanlarda ise I. ve II. grupların düzeylerine yaklaşmıştır (Tablo 1).

Morfolojik Bulgular

Testis örneklerine ışık mikroskobu düzeyinde, hematoksil-eozin boyaları ve PAS reaksiyonu uygulanmış; elektron mikroskobu düzeyinde kurşun sitrat ve uranil asetat kontrastlamaları yapılmış, örnekler tek tek incelenmiş, çekilen fotoğraflarda morfolojik bulgular gösterilmiştir. I. gruba (Resim 1a, 1b) göre II. grupta (Resim 2a, 2b) bir değişiklik izlenmemiş; III. grup sıçanlarda (Resim 3a, 3b) bireyler arasında ve tubulden tubule değişen spermatogenez bozukluklarına rastlanmıştır; IV. grupta (Resim 4a, 4b) ise spermatogenez bozuklukları minimum seviyeye inmiştir. III. grupta elektron mikroskopik incelemelerde Sertoli hücrelerinde düz endoplazma retikulumu (SER) sisternalarında dilatasyonlarla, artık cisimciklere ait fagositoz ve lipid inklüzyonlarında artış gözlenmiştir (Resim 3b).

Sertoli hücresinin daha çok bazal kısmında yer alan lipid inklüzyonları, ince bir membranla sarılı yuvarlak veya düzensiz yapılar olarak izlenmiştir. Bunların bazıları elektron yoğun (koyu) homojen tarzda gözlenirken, diğer bazıları heterojen tarzda saptanmıştır (Resim 3b). Bu grupta Sertoli hücresi ile spermatogoniumlar arasında vakuol şeklinde açılmalar ile spermatogoniumlarda atrofi izlenmiştir (Resim 3b). Işık ve elektron mikroskobu incelemelerinde, bütün gruplarda, Leydig hücreleri morfolojisinde önemli etkilenmeler görülmemiştir.

I. grup ile II. grup tubul çapları arasında belirgin farklılık görülmemiştir. Tubul çapları III. grupta küçülmüş, IV. grupta ise kontrollere yakın bulunmuştur. İkinci ay sonunda III. gruptaki tubul çapları, birinci ay sonuçlarına göre, daha küçük olarak saptanmıştır. Testosteron düzeyleri de tubul çapı

küçülmeleri ile uyumlu olarak azalmıştır (Tablo 1).

Diğer Bulgular

İstatistik anlamlılık saptanmamakla birlikte III. gruba ait erkek sıçanlarla çiftleştirilen dişi sıçanların ortalama yavruleme sayıları (3.5) kontrollere göre (12.8) daha düşük bulunurken; IV. grupta (9) kontrol değerlerine yaklaşmıştır. Yavru sıçanlarda herhangi bir gelişme bozukluğu görülmemiştir.

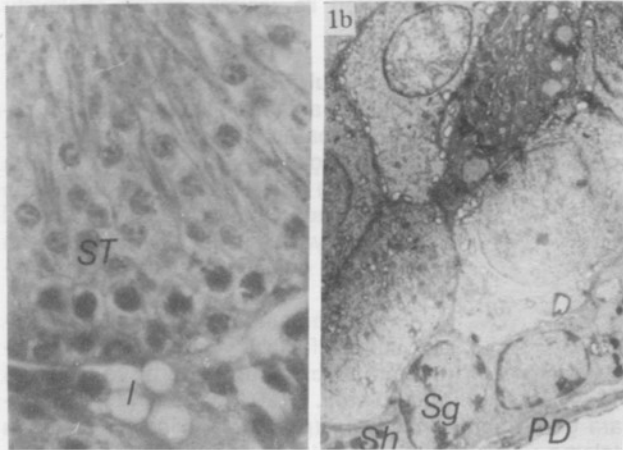
Gruplar arasında su tüketimi bakımından anlamlı farklılık yoktur. Günlük ortalama yem tüketimi, III. (14.5 g) ve IV. (13.4 g) gruplarda, I. (20.2 g) ve II. (19.1 g) gruplara göre daha az olmuştur (p < 0.01). İkinci ay sonunda ortalama vücut ağırlığı, III. (315 g) grupta I. (331 g) ve II. (325 g) gruplara göre daha düşük olarak saptanmıştır (p<0.05).

TARTIŞMA

Etanolün vücutta toksik etki yaptığı, lenfosit ve polimorf nükleuslu lökositlerin artışı ile gösterilmiş (9), etanolün parçalanması ile ortaya çıkan ilk metabolik ürün olan asetaldehitin buna neden olduğu bildirilmiştir. Etanol toksisitesi sonucunda testosteron biyosentezinde azalma olduğu (5,7,8,12,14,16,17) morfolojik delilleri ile de ortaya konmuştur (16). Çalışmamızda etanol verilen sıçanlarda saptanan testosteron düzeylerindeki belirgin düşüşler, bu raporları desteklemektedir.

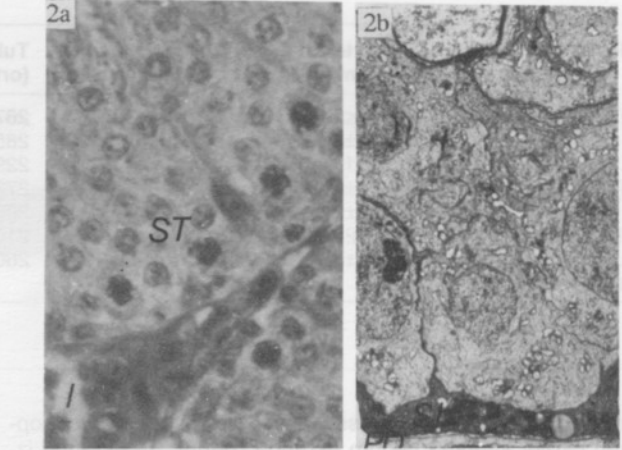
Anderson ve arkadaşları tarafından (1) alkolün testiste oluşturduğu etkilerin primer olarak Sertoli hücreleri üzerinden olduğu bildirilmiştir. Sertoli hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olan dış ve iç etkiler her zaman spermatogenez bozmaktadır. Leydig hücrelerinin membran bozuklukları, özellikle SER membranlarında görülen morfolojik bozukluklar, steroid biyosentezinde önemli bozukluklara neden olacaktır. Etanol uygulaması sonucunda serum testosteron düzeylerindeki düşme, bu organel bozuklukları ile açıklanabilir. Etanol uygulaması ile Leydig hücrelerinde izlenen SER sisternalarında genişlemeler, germinal hücre sayılarında azalma, tubullerin çaplarında küçülme (14), germinal hücre dejenerasyonu ve anormal spermatid sayısında artma (1) gibi bulgular çalışmamızda da gözlenmiştir. Etanol Leydig hücrelerinden testosteron üretimini azaltarak indirekt (sekonder) yolla veya direkt (primer) yolla Sertoli hücrelerini etkileyebilir. Bizim çalışmamızda indirekt etkinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Sıçan türünde bireysel farklılıklar olmaktadır. Etanol grubuna günde 3 ml % 40'lık etanol solüsyonunun gavajla verilmesinden 24 saat sonra serumda etanolün kontrol düzeylerine düşmesi, bunun tamamen metabolize olduğunu göstermektedir. Işık mikroskobu seviyesinde seminifer tubullerin çoğunda belirgin değişiklikler gözlenmemiş olmasının nedeni, verilen etanolün metabolize olarak testis rejenerasyonuna olanak sağlaması olabilir. Ayrıca ışık mikroskopik değerlendirme, birçok dejeneratif etkinin görülebilmesi için yeterli olamamaktadır.

Kronik alkolik sıçanların testislerini elektron mikroskopik düzeyde inceleyen bazı araştırmacılar Sertoli hücrelerinde aşırı nükleus invaginasyonları, sitoplazmada vakuolleşme, lipid birikimi ve fagositozda artış izlemişler; lipid birikiminin fagositoz veya steroid yapımıyla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir (1). Bu bulgulara bizim araştırmamızda da rastlanmıştır. Ser-



Resim 1. Kontrol grubu sıçan testisine ait a) Mikrofotografi x 400, b) Elektronmikrograf x 2450.

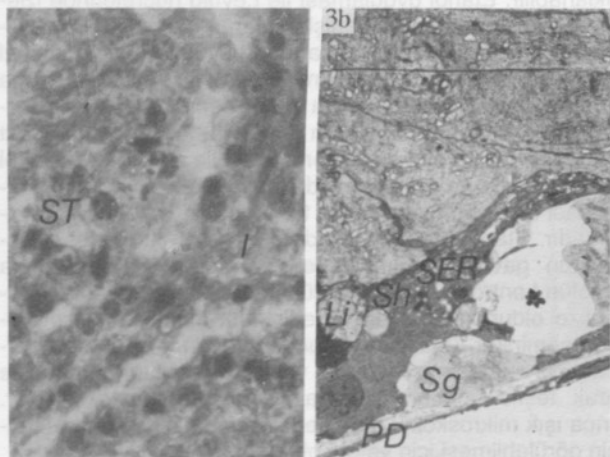
toli hücresinde görülen lipid inklüzyonları artışı, etanolün Sertoli hücresindeki dejeneratif etkisinin sonucu ortaya çıkmaktadır. Rosenblum ve arkadaşları (10,11), lipid birikiminin lipid peroksidasyonu ile gerçekleşebileceğini bildirmişlerdir. Birçoğu sitotoksik olan endoperoksitler ve aldehitler, membran ve organellerin yapısal lipidlerinin ileri derecede azalmasına, böylece membranların bozulmasına neden olmaktadır (7). Etanolün beslenme yetersizliğine neden olarak, değişik organ ve dokularda olumsuz etkiler yaptığı bildirilmiştir (2,6,13,15,16). Araştırmamızda sukroz grubuna, etanol verilen sıçanların etanolden aldığı kaloriye denk sukroz verildi. Böylece etanol grubunda fazla kalori alımından kaynaklanabilecek değişikliklerin bu grupta da belirlenmesi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması sağlandı. Nitekim morfolojik incelemelerde kontrol grubu ile sukroz grubu arasında farklılık görülmemiş, etanol grubunda ise bulgular bölümünde sözedilen değişiklikler izlenmiştir. Çalışmamızda



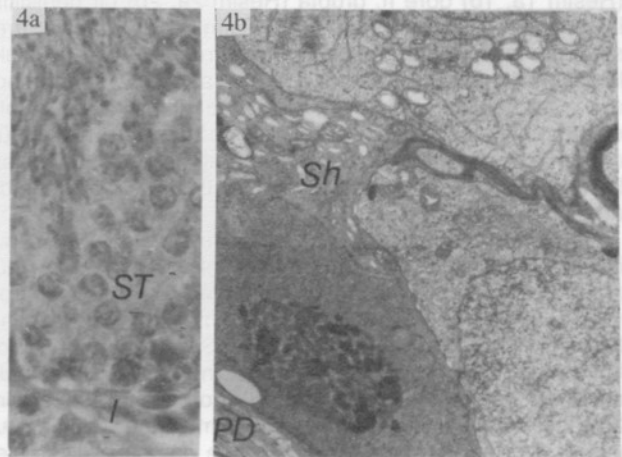
Resim 2: Sukroz grubu sıçan testisine ait a) Mikrofotografi x 400, b) Elektronmikrograf x 2450. Seminifer tubuller, peritubuler doku ve interistisyel doku ile ilgili patoloji izlenmemektedir.

etanolün yem tüketimini azalttığı, böylece büyümekte olan sıçanlarda vücut ağırlığı artışının bir miktar gerilediği saptanmıştır. Bununla birlikte alkolik myopati ve kardiyomyopatisi olan 50 alkolik erkek hastada yapılan klinik ve laboratuvar çalışmalarda hiçbir beslenme bozukluğu ve elektrolit dengesizliği olmadığı belirlenmiştir (13). Ayrıca etanolün beslenme faktörleri ve siroza bağlı olmaksızın testosteron metabolizması üzerine önemli derecede etkili olduğu da bildirilmiştir (4).

Sonuç olarak, bu çalışmada etanolün Sertoli hücreleri üzerine etkilerinde etanole ek olarak verilen testosteronun seminifer tubullerde oluşan bozuklukları tamamen düzeltmediği, böylece etanol etkisinde primer etkiye ek olarak sekonder etkinin de katkısı bulunduğu söylenebilir. Etanole ek olarak verilen testosteron, kan testosteron düzeylerini kontrol düzeylerine yaklaştırmış ancak tam olarak kontrol düzeylerine eriştirememiştir. Bu nedenle kontrol testosteron



Resim 3: Etanol grubu sıçan testisine ait a) Mikrofotografi x 400, b) Elektronmikrograf x 2450. Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında vakuol şeklinde açılmalar (*) dikkat çekmektedir.



Resim 4: Etanol + Testosteron grubuna ait a) Mikrofotografi x 400, b) Elektronmikrograf x 7750. Seminifer tubuller, peritubuler doku ve interistisyel dokunun yenilendiği görülmektedir.

ST= Seminifer tubul, PD= Peritubuler doku, I= İnteristisyel doku, Sh= Sertoli hücresi, Sg= Spermatogonium, SER= Düz endoplazma retikulumu, Li= Lipid inklüzyonları.

düzeylerini tutturacak şekilde testosteron verilmeli ancak doz, kontrol düzeylerini aşmayacak şekilde ayarlanmalıdır. Aksi takdirde iyatrojenik etki ile istenmeyen değişiklikler ortaya çıkabilir. Bu konuda yeni bir doz ayarlaması yapılarak sürdürülecek çalışmaların, alkolik bireylerde testosteron eksikliğine bağlı oluşabilen bazı infertilite vakalarına olumlu katkılar sağlayabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Anderson, R.A. et al: Biochemical and structural evidence for ethanol-induced impairment of testicular development: Apparent lack of Leydig cell involvement. *Toxicol Appl Pharmacol*, 100:62 (1989).
2. Diamond, I.: Alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *N Engl J Med* 320: 458 (1989).
3. Farghali, H.; Williams, D.S.; Gavalier, J. et al: Effect of short-term ethanol feeding on rat testes as assessed by ³¹P NMR spectroscopy, ¹H NMR imaging and biochemical methods. *Alcohol Clin Exp Res*, 15: 1018 (1991).
4. Gordon, G.G. et al: Effect of alcohol (ethanol) administration on sex hormone metabolism in normal men. *N Engl J Med*, 295: 793 (1976).
5. Ida, Y., Tsujimaru S., Nakamura K. et al: Effects of acute and repeated alcohol ingestion on hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal functioning in normal males. *Drug Alcohol Depend*, 31: 57 (1992).
6. Lieber, C.S.: Biochemical and molecular basis of alcohol induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med*, 319: 1639 (1988).
7. Little, P.J., Adams, M.L.; Cicero, T.J.: Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the developing male rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 263: 1056 (1992).
8. Riesenfeld, A.: Growth depressing effects of alcohol and nicotine in two strains of rats. *Acta Anat*, 122: 18 (1985).
9. Riesenfeld, A.; Oliva, H.: The effect of nicotine and alcohol on the fertility and life span of rats. *Acta Anat*, 128: 45 (1987).
10. Rosenblum, E.R. et al: Lipid peroxidation: A mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Radical Biol and Med*, 7: 569 (1989).
11. Rosenblum, E.R. et al: Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol and Alcoholism*, 22: 241 (1987).
12. Singh, S.K., Pandey, R.S.: Multiple mechanisms of ethanol-induced gonadal toxicity to adult male rats. *Indian J Exp Biol*, 29: 1039 (1991).
13. Urbano-Marguez, A. et al: The effect of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med*, 320: 409 (1989).
14. Van Thiel, D.H. et al: Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology*, 105: 888 (1979).
15. Van Thiel, D.H.; Lester, R.: Sex and alcohol. *N Engl J Med*, 291: 251 (1974).
16. Weinberg, J; Vogl, A.W.: Effects of ethanol consumption on the morphology of the rat seminiferous epithelium. *J Androl*, 9: 161 (1988).
17. Woo, N.D.; Persaud, T.V.N.: Rat embryogenesis following exposure to alcohol and nicotine. *Acta Anat* 131: 122 (1988).