

KRONİK MORFİN UYGULAMASINDA TESTİS MORFOLOJİSİ

Doç. Dr. Yener Aytekin (*), Doç. Dr. Mehmet Güngör (*),
Doç. Dr. Halil Sağduyu (*)

ÖZET: Bu çalışmada 125-150 gr ağırlığında genç erişkin erkek sıçanlara içinde baz morfin bulunan (2x75 mg) peletler deri altına yerleştirilerek etkinin uzun süreli olması sağlanmıştır. Kontrol grubu sıçanlara plasebo peletleri uygulanmıştır. Işık ve Elektron mikroskop ile testis dokuları incelenmiş önemli morfolojik değişiklikler saptanmıştır.

SUMMARY: Effect of chronic administration of morphine on Spermatogenesis in rat: Morphine was administered by implantation of morphine pellets subcutaneously. Placebo pellets were implanted to control rats. Our results clearly showed that chronically administered morphine may induce marked morphological alterations in testes tissue of rats.

GİRİŞ

Opium alkaloidlerin en önemlisi olan morfin ve benzeri droglar, çok eskiden beri ve hala günümüzde vücuttaki çeşitli organ ve sistemlerdeki etkilerinden yararlanılmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş kullanma alanı bulmasının önemli nedeni hoşla gitmeyen bir his olan ağrıyı seçici olarak güçlü bir şekilde bastırmasıdır. Medikal amaçlar dışında keyif verici olarak özellikle 2. dünya savaşı sonrasında kullanılmaya başlanan morfinin çok bilinen aneljezik etkileri yanında bazı sistemler üzerine bu arada ürogenital sistem üzerine de etkilerinden bahsedilmektedir. Bunlar Gonadotropinlerin hormonal regulasyonunda önemli olan bazı hipotalamus bölgelerine etki ederler.

Kronik narkotik kullananlarda seksüel fonksiyonlarda bozukluk olduğu yaygın olarak kabul edilmekle beraber morfin alışkanlığı ve testis morfolojisi bozukluğu arasındaki ilişkiye dair bilgiler çok kısıtlıdır.

Morfine bağlı testis değişiklikleri ile ilgili morfolojik bulgular yayınlanmamış olmasına rağmen bazı ilaçların yol açtığı hormonal değişiklikler (1,6,11,14,15,18) ve spermatogenetik sürecin çeşitli faktörler karşısında duyarlılığı (1,20) klinik gözlemler ve birçok hayvan deneyleri ile ortaya konulmuştur (18). Morfinin etkisindeki sıçan testislerinde ortaya çıkacak morfolojik değişikliklerin, diğer bazı kimyasal maddelerle oluşturulan testis morfolojisi bozukluklarına benzemesi beklentisi bizi bu araştırmayı yapmaya teşvik etti.

Araştırmamızda *Rattus norvegicus* cinsi erişkin erkek sıçanlarda kronik biçimde morfin etkilenmesi sağlanmış ve bu hayvanların testis dokuları morfolojik açıdan değerlendirilmek için incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Bu araştırmada 15 adet 125-150 gr ağırlıklarında erkek beyaz sıçanlar kul-

* I.Ü.İst.Tıp Fak. Histoloji-Embryoloji Bilim Dalı Çapa-İst.

** I.Ü.İst.Tıp Fak Farmakoloji Anabilim Dalı Çapa-İst.

lanıldı. Hayvanlar araştırmadan 10 gün önce üç gruba ayrılarak kafeslere yerleştirildi ve deney sonuna kadar sabit şartlarda tutuldu. Birinci gruptaki (Morfin grubu) deney hayvanlarının sırt bölgesine deri altına herbirinde 75 mg baz morfin bulunan peletlerden 2 adet yerleştirildi (10). 5 gün sonra pelet uygulaması yinelenildi. Diğer iki grup, kontrol ve yiyeceği kısıtlanmış gruptaki sıçanlara morfin peletleri yerine içinde morfin bulunmayan fakat diğer tüm özellikleri ile morfin peletlerine benzeyen plasebo peletleri yerleştirildi. Kontrol grubu, deney süresince serbest (ad libidum) beslenirken, yiyeceği kısıtlanmış gruptaki sıçanların yiyecek ve içecekleri morfin grubunkilerle eşit tutuldu. Bunlarda, morfinin yeme isteği (iştah) üzerindeki bilinen engelleyici etkisinin, sonuçlara olası etkisi aydınlatılmaya çalışıldı. İlk pelet uygulamasında sonraki 12. günde araştırmaya alınan tüm hayvanların (35 mg/kg sodyum pentobarbitalin periton içine verilmesi ile oluşturulan anestezi altında), testisleri alındı. Testislerden ayrılan doku parçaları, Elektron mikroskop araştırmaları için tamponlu osmik asid, ışık mikroskop için Bouin solusyonları içine alındı. Metoduna uygun dehidratasyon ve gömme işlemleri yapıldıktan sonra, ışık mikroskop kesitlerine hematoksilin-eosin boyamaları ve PAS reaksiyonları uygulandı. Elektron mikroskop ve ışık mikroskop resimleri çekildi ve değerlendirmeleri yapıldı.

BULGULAR

Mikroskopik olarak her üç gruptaki hayvanların testislerinde dikkat çekici bir anormallik bulunmadı. Testis ağırlıkları ve boyutlarında anlamlı sapmalar yoktu.

Mikroskopik incelemelerimizde Kontrol ve yiyeceği kısıtlanmış gruptaki hayvanların testisleri normal görüntüler vermiştir. Seminifer tubulusların germinal epiteliyumundaki hücre sıraları düzgün, spermatogenesise ait ilişkiler sağlıklı bulunmuştur (Res.1). Interstitial dokunun Leydig hücreleri, kapillerler, lenfatik doku oldukça düzenlidir. Böylece yiyeceği kısıtlanmış gruptaki sıçanların testislerinin de kontrol grubu gibi olduğu tesbit edilmiştir.

Morfin peletleri uygulanan sıçanların testislerinde ışık mikroskopu ve elektromikroskopu seviyesinde yaptığımız araştırmada özellikle germinal epiteliyumda belirgin değişiklikler saptanmıştır. Tubulus kesitlerinden bazılarında çok aşırı germinal epiteliyum bozuklukları görülmüştür (Res.2). Bazı seminifer tubuluslarda ise etkilene minimum düzeyde kalmıştır. Işık mikroskopu düzeyinde en göze çarpan bulgu, çoğu tubulusların lümenine olgunlaşmamış germinal hücrelerin ve Sertoli hücre artıklarının dökülmesidir (Res.3). Elektronmikroskopta tubulus lümenlerindeki olgunlaşmamış germinal hücreler daha iyi tanımlanabilmekte, bunların zaman zaman çok çekirdekli hücre füzyonları oluşturduğu görülmektedir. Spermiogenesis sürecinde spermatidlerde Golgi kompleksi ile nukleus ilişkilerinde organizasyon bozuklukları, sık sık binuklear veya anormal spermatozoon oluşumuna sebep olmuştur (Res.4 a).

Elektron mikroskop bulguları özellikle Sertoli hücreleri hücre elemanları ile ilgilidir. Bu hücrelerde aşırı vakuolleşme ve dilatasyonlar gösteren düz endoplazma retikulumu (SER) sisternaları hücreye gözenekli bir yapı kazandırmıştır. Membran yıkımı ile ilgili "membranöz yapılar" ve artık cisimcik (Residual body) ile Lipid inklusyonu bölüğü oldukça dikkati çekicidir (Res.4).

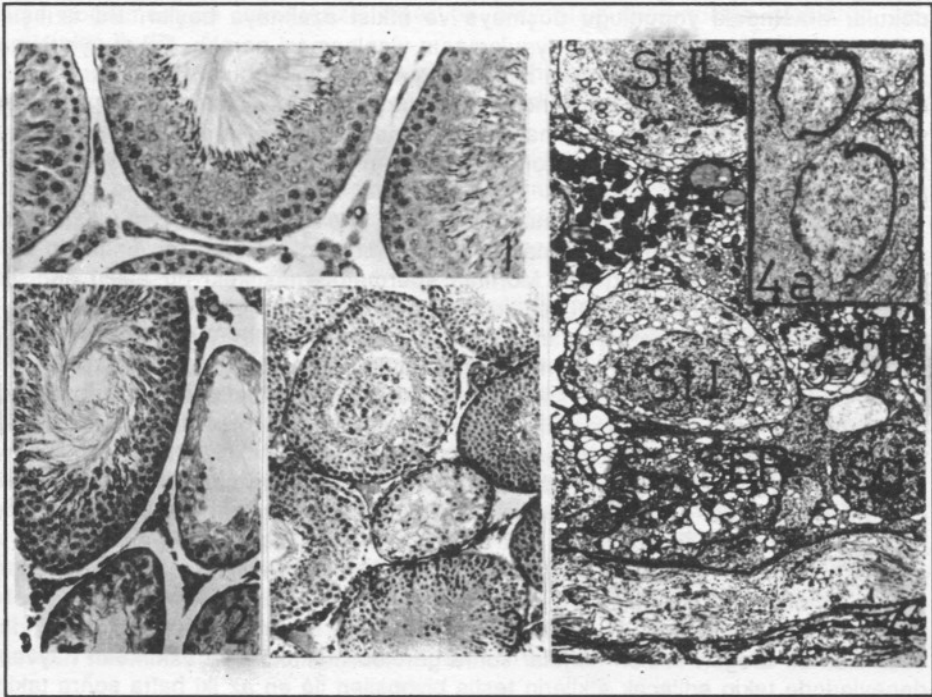
Morfin uygulanmış grupta yuvarlak spermatidlerin lümeneye dökülmesi hızlanmış ve spermatidlerin akrosom oluşumundaki sürecinde kusurlar bulunmuştur (Res. 3,4 a).

Kontrol grubunda seyrek olarak görülebilen germinal hücre nekrozlarına, morfin uygulanmış grupta daha fazla rastlanılmıştır. Işık mikroskop incelenmesinde interstitial dokuda kontrol grubu ve morfin uygulanmış grup arasında bir farklılık görülmemiştir. Leydig hücreleri tek tek veya küçük hücre toplulukları halinde damarların civarında veya tubuluslara yakın bölgelerde izlenmiştir (Res.1.)

Elektron Mikroskop araştırmasında morfin uygulanmış grupta Leydig hücrelerinin SER dilatasyonlarının az çok arttığı izlenmiş yine bu hücrelerde mitokondria krista bozukluklarına yer yer rastlanılmıştır. Bu bulguların siteroid biosentezi etkileyebileceği düşünülmüştür.

TARTIŞMA

Tıbbi olarak kullanımı tavsiye edilen ve edilmeyen bir çok tip farmakolojik



Resim 1. Kontrol sıçanlara ait testis mikrofotografisi. Seminifer tubulus ve aradokuya ait elemanlar normal görülmekte. X200

Resim 2. Morfin uygulanmış sıçanların testislerinde üst sol köşede kontrol grubuna benzer germinal epitel taşıyan seminifer tubulus yanında diğerleri hücreden çok fakir ve küçük çaplı olarak izleniyor. X180

Resim 3. Morfin uygulanmış sıçanların seminifer tubulusu lümeninde olgunlaşma sürecini tamamlamış hücre döküntüleri görülmektedir. X180

Resim 4. Morfin uygulanmış sıçanların seminifer tubuluslarına ait ultrastrüktürde spermatogonium (Sg), spermatosit I (StI), spermatosit II (StII) hücreleri ile zeminde geniş ve düzensiz sitoplazması ile izlenen sertoli hücresi (S) görülmektedir. Sertoli hücresinde geniş SER sisternaları, artık cisimcik (Rb) ve lipid inklüzyonlarının bolluğu dikkat çekicidir. Resim 4a. Gelişme bozukluğu gösteren çift çekirdekli spermatid ultrastrüktürü. Elektromikrograf X4000

ajan ve keyif verici olarak kullanılan maddeler erkeklerde endokrin ve üreme fonksiyonlarını etkileyebilir (11,14,15,20). Alkol, opiatlar, barbitüratlar ve marijuananın gonadal fonksiyonu baskıladığı ve spermatogenezisi bozduğu hatta erkeklerde libidoyu azalttığı bildirilmiştir (2,8,17,21).

Üreme sistemi vücudun diğer sistemlerine göre kendisini kontrol eden mekanizmalar yönünden en karmaşık yapıya sahiptir. Üreme sisteminin fizyolojik kontrolü dikkatle incelenirse etkili kompleks mekanizmaların primer drog etkilerine hedef olduğu görülür (1,20).

Birçok sentral sinir sistemi (SSS) doruğunun hipotalamik-hipofizier sistem fonksiyonu üzerinde inhibitör etki yaptığı kabul edilmektedir. SSS drogların kullanımı sonunda erkeklerde testosteron sekresyonu inhibisyonu ve spermatogenezisin supresyonu görülmüştür (18).

Morfin hangi yolla uygulanırsa uygulansın hızlı ve tam bir biçimde emilerek kana geçer ve etkisini gösterir. Vücutta morfinin metabolize olması ve atılması ile dokular arasındaki yoğunluğu düşmeye ve etkisi azalmaya başlar. Bu azalışın önlenmesi için uygun aralıklarla uygulamanın yinelenmesi gerekir. Fakat uygulama aralıkları kısa da tutulsa vücuttaki morfin yoğunluğunda ve buna bağlı olarak etkideki dalgalanmalar bütünüyle önlenemez. Bu araştırmada kullanılan deri altına pelet yerleştirilmesi biçimindeki uygulama dokular arasında etkin, kararlı ve sürekli morfin yoğunluğu ve uygulamada kolaylık sağlayan bir yöntem olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (10,22).

Bu araştırmada alınan sonuçlarından da anlaşılabileceği gibi yeterli doz ve sürelerle uygulanan morfin, spermatogeneziste morfolojik olarak gözlenebilen bozukluklara yol açabilmektedir. Morfinin spermatogenezisteki bu etkisi değişik mekanizmalarla açıklanabilir. Düşünülebilecek bir yol, androgen yapımı ve spermatogenezisin testiküler fonksiyonlar üzerindeki direkt etkisidir. Vücuttaki kolesterol ve steroid hormon sentezi drogların direkt etkisi ile inhibe olmaktadır (18).

Birçok drog testosteron sentezini direkt olarak inhibe edebilir. Droglar tarafından düşürülen testosteron düzeylerinden sorumlu olan başlıca mekanizma, testosteronunun sentez ve sekresyonu üzerinde sekonder etkilerle, hipotalamik-hipofizier fonksiyondaki bozulmadır. Erkek üreme sisteminin büyük bir bölümü androgenler için hedef organlar olduğundan, Testosteron düzeyini düşüren drogların, erkek üreme fonksiyonu üzerinde çok sayıda etki oluşturabilecekleri beklenebilir.

Drog etkileri için olası bir hedef spermatogenezisteki hızlı üreyen hücreler ve özelleşmiş bazı düzeneklerdir. Seminifer epitelin bir siklusu sıçanda yaklaşık olarak 13 gün sürmektedir (11). Böylece spermatogenez sürecinin erken aşamalarında etkili olan bir drogun etkileri haftalar sonra görülebilmektedir. Bu bakımdan hayvan deneylerinde takip edilecek etkilerin testis biyopsileri ile en az iki hafta sonra takip edilmesi daha uygundur. Spermatogenez yenilenebilir bir süreç olduğundan gelişmekte olan bazı germinal hücrelerin kaybindan bir müddet sonra yeniden tam ve eksiksiz bir hücre serisi görmek de mümkündür. Ayrıca spermatogenezisin daha sonraki aşamaları eksojen toksinlerden kan-testis barieri ile korunmaktadır. Bu faktörler nedeni ile bazen drogların testiküler etkilerinin boyutlarını yorumlamak güçleşebilmektedir.

Sağlıklı bir spermatogenezisin endokrin sisteminin dengeli ve etkin çalışması-na bağlı olduğu bilinmektedir. Özellikle testis dokusunu oluşturan hücrelerin çoğalıp gelişmesi için LH,FSH ve testosteron gibi seks hormonlarının fizyolojik sınırlar içinde yapılıp salgılanması gerekir. Daha önce yapılan çalışmalarda morfinin LH ve FSH hormonlarının salgılanmasını selektif bir biçimde inhibe ettiği gösterilmiştir.

(4,5,6,18). Bunun sonucu total testis ağırlığında daha az fakat spermatogeneziste belirgin morfolojik bozukluklar saptanmıştır.

Morfin ve diğer opioid drogların yiyecek ve sıvı alımını inhibe ettiği belirlenmiştir (12,13). Bu olasılık gözönüne alınarak morfin verilmeyen bir grup sıçanın günlük yiyecek alımı kısıtlanmış ve spermatogenezisi incelenmiştir. Bu gruptaki sıçanlarda herhangi bir bozukluğun görülmemesi morfinin spermatogenezis üzerindeki etkisinin onun beslenme üzerindeki etkisinin dolaylı bir sonucu olamayacağına ortaya koymaktadır.

Spermatogenezis gibi sürekli hücre bölünmesi ve çoğalması ile karakterize bir olayda protein ve nükleik asid yapımının önemi açıktır. Diğer taraftan morfinin protein ve nükleik asid yapımını inhibe ettiği saptanmıştır (7,9,16). Bu çalışmada saptandığı gibi bölünme veya olgunlaşma süreçlerinde duraklama sebebiyle lümene sürüklenen hücre artıklarının ve morfolojik bozuklukların sebebi morfin etkilenmesine bağlanmaktadır. Olasılıkla morfinin böyle hücre bölünmesini inhibe edici etkisi hücre çoğalması ile karakterize diğer bir olay olan immunolojik olaylarda da görülmektedir (3).

Bulgularımızda da bildirildiği gibi spermiohistogenesis sürecinde spermatidlerde Golgi kompleksinin katkısı ile akrozom teşekkülü sırasında bazı bozukluklara rastlanılmıştır.

Singer ve Ark. (17)'nin 1986'da yayınladıkları çalışmada eroin, morfin ve haşhaş kullanan müptelaların menilerinin araştırmasında bildirilen oligozoospermi, astenozoospermi ile sperm anormallikleri olarakta yuvarlak başlı spermiler ve dolaşık spermiler gibi morfolojik bulgular bizim testes morfolojisi bulgularımıza uymaktadır.

Morfin etkilenmesinden sonra sıçan testislerindeki tesbit ettiğimiz morfolojik bulguların spesifik morfin etkisine bağlı olduğunu söyleyemeyiz. Morfinin ortaya koyacağı baskılayıcı etkilerin meni analizlerine yansıtacağını fakat kullanım süresinin olumsuz etkisinin spermatogenetik kök hücrelerle ilişkisinin önemli olduğunun unutulmaması gerektiğini vurgulamak istiyoruz. Son yıllarda erkeklerde, endüstriyel kimyasal maddelerle (11,15) veya terapötik amaçlarla çeşitli maddelerin kullanım yoluyla (18,19,20) testiküler doku üzerinde olumsuz direkt ve indirekt etkilerin olduğu yazılmıştır. Spermatogenezisdeki bozuklukların derecesi ve kalıcılığı veya reversibl olması durumu doza bağlıdır (11,12). Araştırma ortamımızda, morfin etkisinin ortadan kalkmasından sonra spermatogenezisin birkaç spermatogenetik siklustan sonra düzeleceğini beklemekteyiz. Deney şartlarımızda süreklilik gösteren germinal hücre çoğalma ve farklılaşması olayında öncü hücre olan ana tip spermatogonium destrüksiyonlarına rastlanılmamıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Bartke, A., Hafiez, A.A., Bex, F.S. and Dalterio, S. : Hormonal interactions in regulation of androgen secretion. *Bi ol Reprod* 18, 44-54 (1978).
- 2- Bloch, E., Thysen, B., Morrill, G.A., Gardner, E. and Fujimoto, G. : Effects of cannabinoids on reproduction and development. *Vit. Horm.* 36, 203-258 (1978).
- 3- Brown, S.M., Stimmel, B., Taub, R.N., Kochwa, S., Rosenfield, R.E.: Immunologic dysfunction in heroin addicts. *Arch Intern Med.* 134:1001 (1974).
- 4- Bruni, J.F., Van Vugt, D., Marshall, S., Meites, J.: Effects of maloxone, morphine and methioine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci* 21:461 (1977).
- 5- Cicero, T.J., Meyer, E.R., Wiest, W.A. Effects of chronic morphine administration the reproductive system of the male rat. *J. Pharmacol Exp Ther* 192:542 (1975).

- 6- Cicero, T.J., Meyer, E.R., Bell, R.D.: Effects, of morphine on serum testosterone and Luteinizing hormone levels and on secondary sex organs of the male rat. *Endocrinology* 98:367 (1976).
- 7- Clouet, D.H., Rather, M. : The effect of morphine administration on the incorporation of ¹⁴C- Leucine into protein in cell-free system from rat liver and brain. *J. Neurochem* 15:17 (1968).
- 8- Dalterio, S. and Bartke, A. : effects of abused substances on male reproductive development. Sah. 77-89 "Male Fertility and its Regulation. Editör T.J. Lobl and ESE Hafez MTP Press Limited 1985" kitabından.
- 9- Datta, R.K., antopol, W. : Inhibitory effect of chronic administration of morphine on uridine and thymidine incorporating abilities of mouse liver and brain subcellular fractions. *Toxicol appl Pharmacol* 23:75 (1972).
- 10- Gibson, R.D., Tingstad, J.E.: Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. *J. Pharm. Sci* 59:426 (1970).
- 11- Heywood, R. and James, R.W.: Current laboratory approaches for assessing male reproductive-toxicity: Testicular Toxicity in laboratory animals. Sah. 147-160 "Reproductive Toxicology. Editör R.H. Dixon Raven Press New York 1985" kitabından.
- 12- Koyuncuoğlu, H., Berkman, K., Sabuncu, H.: Feeding, drinking, urine osmolality in DI Brattleboro rats: Changes by morphine, maloxone D-amino acids, Prolyl-leucyl-glycinamide (PLG). *Pharmacol Biochem, Behav* 20:90 (1984).
- 13- Mark-Kaufman, R., Kanarek, R.B.: Morphine selectively influences macronutrient intake in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 12:427 (1980).
- 14- Meistrich, M.L.: Quantitative correlation between testicular stem cell survival sperm production and fertility in the mouse. Treatment with different cytotoxic agents. *J. Androl* 3, 58-68 (1982).
- 15- Meistrich, M.L.: Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod* 34, 17-28 (1986).
- 16- Nobile, W.D., Müller, G.C.: Inhibition of protein and RNA synthesis in Hela cells by levallorphan and Levorphanol. *Molec Pharmacol* 2:534 (1976).
- 17- Singer, R., Ben-Bassat, M., Malik, Z., Sagiv, M., Ravid, A., Shohat, B., Livni, E., Mamon, T., Segenreich, E. and Servadio, C.: Oligozoospermia, Astenozoospermia, and Sperm Abnormalities in ex-Addict to Heroin Morphine, and Hashish. *Arch androl* 16, 167-174 (1986).
- 18- Smith, C.G. and Harclerode, J.E.: Therapeutic drug effects on male reproductive function. Sah. 39-48 "Male Fertility and its Regulation. Editör T.J. Lobl and E.S.E. Hafez. M.T.P. Press Limited 1985" Kitabından.
- 19- Thachil, J.V., Jewett, M.A.S., Ridev, W.D.: The effects of cancer and cancer therapy on male fertility. *J. Urol* 126, 141-145 (1981).
- 20- Vazquez, J.J.: Hormonal control of Testicular function. Sah. 63-71 "Testicular and Epididymal Pathology. Editör Nistal and Paniagua. George Time Verlag 1984" Kitabından.
- 21- Wang, C., Chan V., Yeung, R.T.T.: The effect of heroin addiction on pituitary-testicular function. *Clin Endocrinol* 9:455-461 (1987).
- 22- Wei, E.: Assessment of precipitated abstinence in morphine-Dependent rats. *Psychopharmacologia (Berl)* 28:35 (1973).