

DIETİLSTİLBESTROL'ÜN OVOSİTLERDE MAYOZ BÖLÜNMEYE ETKİLERİ

Olca Semiz* ❖ Alp Can** ❖ Meral Tekelioğlu***

ÖZET

Sentetik bir östrojen bileşiği olan dietilstilbestrolün (DES), fare ovositlerinde mayoz bölünme üzerindeki etkileri araştırıldı. DES'in mayoz bölünme aşamaları ve kromozom dağılımına etkilerini göstermek amacıyla, kumulus-ovosit kompleksleri (KOK) ile kontrollü in vitro deneyler yapıldı. α -tübülün, kromozomlar ve F-aktin işaretlenerek konfokal mikroskopta incelendi. KOK'lar germinal vezikül (GV) aşamasının başından metafaz-II aşamasının sonuna kadar, mayoz-I veya mayoz-II süresince DES'e maruz bırakıldı. Kontrol grubundaki ovositler, mayoz bölünmenin ilk yarısında büyük oranda metafaz-I'e ulaşıırken, DES uygulanan gruptakiler ulaşamadı ve kromozomlarda yoğunlaşma, mekik mikrotübülüslerinde azalma gözlemlendi. Mayoz bölünmenin ikinci yarısında kontrol hücrelerinin çoğu metafaz-II'ye ulaşıırken, DES uygulanan grupta birinci mayoz mekiğinin parçalandığı gözlemlendi. Fakat, GV aşamasındaki ovositler ve kumulus hücrelerinde mikrotübülüs anormalliği bulunmadı. Mayoz-I süresince DES uygulanan ovositler kontrol kültürüne alındığında, DES etkilerinin kaybolduğu görüldü. DES'in ovositlerin gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerinin, şiddetli fakat geri döndürülebilir nitelikte olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dietilstilbestrol, Mayoz Mekliği, Mikrotübülüs, In Vitro Maturasyon

SUMMARY

THE EFFECTS OF DIETILSTILBESTROL ON MEIOSIS IN OOCYTES

This study examined the effects of the synthetic estrogen compound Diethylstilbestrol (DES) on meiosis in mouse oocytes. Controlled in vitro experiments were performed using cumulus-oocyte complexes (COCs) to study the effects of DES on meiosis stages and chromosome distribution. Alfa-tubulin, chromosomes and F-actin were labelled and studied using a confocal microscope. COCs were exposed to DES during meiosis-I or meiosis-II, beginning from the germinal vesicle (GV) stage to the end of metaphase-II. During the first half of meiosis, while most of the oocytes in the control group reached metaphase-I, those in the DES-exposed group were unable to reach metaphase-I, and condensing in the chromosome degrease in spindle microtubule was also observed. During the second half of meiosis, while most of the control cells reached metaphase-II, fragmentation of the first meiosis spindle was observed in the DES-exposed group. However, microtubular abnormalities were not detected in GV stage oocytes and cumulus cells. When oocytes exposed to DES during meiosis-I were brought to control culture, the effects of DES were observed to disappear. We conclude that the negative effect of DES on oocyte maturation is severe but reversible.

Key Words: Diethylstilbestrol, Meiotic Spindle, Microtubule, In Vitro Maturation

*Uzm. Arş. Gör. Dr. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

***Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Sentetik, non-steroid östrojen bileşiklerinden Dietilstilbestrol'e (DES) pre-natal maruz kalmanın, üreme organları üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir (1). DES, son 30 yıl içinde spontan düşüklüğü ve hamileliğin diğer komplikasyonlarını önlemek için kullanılmıştır. Ancak; ilerleyen yıllarda, dişi üreme sistemi anormallikleri, vajinal adeno karsinom, üreme yeteneğinde azalma ve bağışıklık sistemindeki bozukluklar ile direkt bir ilgisi olduğu gösterilmiştir (2,3,4,5).

Gelişim sırasında zararlı etkenlere maruz kalındıysa, bunu gözlemek çok zordur. Kimyasal maddeler, çoğu örnekte olduğu gibi, etkilerini maturasyon ve farklılaşma sırasında spesifik bir anda gösterip kaybolabilirler. DES'in in vivo teratojen ve kanserojen etkilerini araştırmak için bazı hayvan modelleri önerilmiştir (2). Bunlar gösterdi; DES ovaryumları hedefliyor ve ovaryumda gelişim hatalarına, folikül erken tükenmesine, multi ovular folikül ve düşük implantasyon oranlarına neden olmaktadır (3,4,5).

Biz bu çalışmada, in vitro koşullarda, DES'in izole edilmiş ovositlere etkisini gözlemleyebileceğimiz bir deney modeli kullandık. Bu modelde, fare ovositlerini mayoz bölünmenin ilk veya ikinci yarısında (GV-metafaz-I aralığı veya metafaz-II-metafaz-II aralığı) 30 μ M DES'e maruz bırakarak, DES'in mayoz mekiği oluşumu ve fonksiyonuna etkilerini analiz ettik. Mayoz bölünmenin ilk yarısına karşılık gelen ilk sekiz saatlik DES uygulamasının, birinci mayoz mekiğinin oluşumuna etkileri incelenirken, bunu izleyen ikinci yarıya karşılık gelen on saatlik uygulamada birinci mayoz mekiği oluşuktan sonraki etkilerini inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

19-21 günlük Balb-C türü (Mus musculus) farelere, i.p. 5 I.U. gonadotropin (PMSG) enjeksiyonu yapılarak folikül gelişimi uyarıldı. Folikül patlatılarak kumulus hücreleri ile çevrelenen ovositler (kumulus-ovosit kompleksi, KOK) toplandı (n=655) ve MEM kültür ortamına alınarak %5 CO₂'li, nemli ortamda 37°C'de inkübe edildi.

DES dimetilsülfoksit içinde çözülerek hazırla-

nan stok solüsyondan, 30 μ M.lık çalışma solüsyonu taze olarak hazırlandı ve KOK'lar mayoz bölünmenin farklı aşamaları boyunca bununla muamele edildi. Bir grup KOK 0-8. saatler arasında (GV-metafaz-I aralığı), diğer grup ise 8-18. saatler arasında (metafaz-I-metafaz-II aralığı) DES'e maruz bırakıldı. İlk sekiz saat DES uygulanan KOK'lardan bir kısmı 8-18. saatler arasında kontrol kültür ortamına alınarak, DES etkilerinin geri dönüşlü olup olmadığı kontrol edildi. DES uygulanan gruplar, kontrol grupları ile karşılaştırıldı.

Kumulus hücreleri, inceltirilmiş pipetle temizlenerek, kontrol ve deney gruplarındaki ovositler MTSB-XF ile 30 dakika, 37°C'de fikse edildi (6). Üç kez yıkanarak, PBS içinde +4°C'de incelenene kadar saklandı.

Fluoresan işaretleme, mayoz mekiği mikrotübülüslerinin organizasyonunu, mikrotübülüs organize edici merkezleri (MTOC), fibriler-aktin ve kromozomları göstermek amacı ile yapıldı. Mikrotübülüsler α -tübülin için spesifik olan, sıçan monoklonal antikoru Yol 1:34, 1:50 oranında sulandırılarak işaretlendikten sonra, sekonder anti-kor ile işaretleme yapıldı (7). F-aktin rhodamin-falloidin ile işaretlendi. Tübülin ve F-aktin işaretlemeleri sırasında ovositler doksanar dakika 37°C'de bekletildi. Kromozomların işaretlenmesinde 10 mM 7-Aminoaktinomisin-D kullanıldı.

İşaretlenen ovositler, 63x Zeiss Plan-Apo objektifi kullanılarak, Zeiss LSM-510 konfokal mikroskopunda incelendi.

BULGULAR

DES'in Mayoz Hücre Döngüsüne Etkileri:

DES'in mayoz bölünmenin gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri, KOK'lar 0-8 ve 8-18 saat aralıklarında DES'e maruz bırakılarak değerlendirildi. Hücrelerin mayoz bölünmenin hangi aşamasında olduğu, mekiği ve kromozomların analiziyi belirledi ve yüzdeler belirtilerek Tablo 1'de özetlendi.

Kontrol ile 30 μ M DES uygulanan grup arasında GV aşamasında kalıp mayozu sürdüremeyen ovositlerin sayısı açısından belirgin farklılık bulunmadığı için, bunlar sayım dışı bırakıldı.

Tablo 1: DES Uygulanan Gruplar ve Kontrol Gruplarında Mayoz Bölünmenin Değişik Aşamalarındaki Ovositlerin Yüzdeleri (n=655)

Zaman (saat)	Doz (μ M)	ProMet	M-I	A-I	T-I	M-II	Anormal
0-8							
Kontrol	-	13	72	13	1	1	-
DES	30	3	-	-	-	-	97
8-18							
Kontrol	-	1	4	1	-	94	-
DES	30	8	3	-	-	-	89
0-8							
DES'in	-	2	5	1	-	92	-
Uzaklaştırılması	30	6	91	3	-	-	-

ProMet; Prometafaz, M-I; Metafaz-I, A-I; Anafaz-I, T-I; Telofaz-I, M-II; Metafaz-II

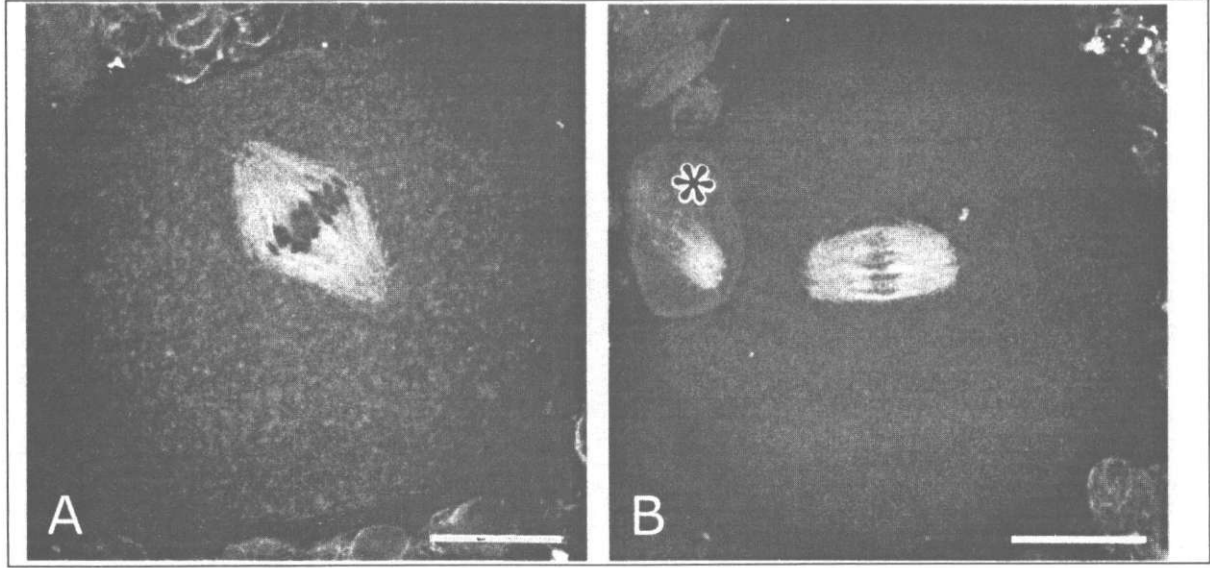
Kontrol grubunda ilk sekiz saatte, ovositlerin %13'ü prometafaz, %72'si metafaz-I, %13'ü anafaz-I, %1'i telofaz-I ve %1'i de metafaz-II aşamasındaydı. Aynı aralıkta DES uygulanan hücrelerin %3'ü prometafaz aşamasında iken, %97'si anormal, yoğunlaşmış kromozom düzenlenimi gösterdi. Bu düzenlenim, herhangi bir mayoz aşaması ile uyuşmuyordu. Ovositlerde, tipik olarak hücrelerin merkezine yakın yerleşmiş, yoğun kromozomlar izlendi ve normal kromozom bivalentlerinin oluşumunda aksaklık görüldü.

Kontrol grubunda, mayoz bölünmenin ikinci yarısında (8-18. saatler arası), ovositlerin %1'i prometafaz, %4'ü metafaz-I, %1'i anafaz-I, %92'si metafaz-II aşamasındaydı. İkinci yarıda 30mM DES'e maruz bırakılan KOK'larda dramatik olarak mayozun ilerlemesi durdu. Az sayıda ovosit (%11) normal prometafaz veya metafaz aşamasında iken, çoğunluğu anormal görünümliydi (%89). Kromozomlar ovoplazmanın merkezinde yoğunlaştı ya da ovoplazmaya dağıldı. Bu bulgu, ilk mayoz mekiğinin düzeninin DES uygulamasına bağlı olarak tamamen kaybolduğunu gösterdi. Çünkü; kromozomlar DES uygulanmadan önce, metafaz-I düzleminde başarılı bir şekilde düzenlenirken, uygulama sonrası sitoplazmaya dağılmıştı.

Mayoz-I ve II Sırasında DES'in Mayoz Mekiği Oluşumu Üzerine Etkileri:

Kontrol metafaz-I mekikleri, tipik fıçı şeklini gösterdiler ve hücrenin periferine yerleştiler. Kromozomlar bir uçta kinetokorlara, diğer uçtan kutuplara bağlı şekilde orta hatta sıralanmıştı. Kontrol metafaz-II mekiklerinde, mikrotübülüs kütlesi metafaz -I'den daha küçüktü; fakat, fıçı şeklindeki görüntülerini korumaktaydılar. Mekik, kutup cisimciğine yakın yerleşmişti (Şekil 1 A,B). Bütün bu mekik dinamikleri, mayoz aşamaları için normal olay ve işaretler olarak bilinmektedir (8).

30 μ M DES, mayoz mekiğinin oluşumundan önce ve sonra uygulanınca, yüksek oranda anormal ovosit izlendi. Mayoz-I sırasında uygun dizilimli kromozom veya mekik mikrotübülüsü hemen hemen hiç gözlenemedi. En göze çarpan bulgu; mikrotübülüs kütlesinin azalması veya kaybolmasıydı. Bazı örneklerde kalan az miktardaki mekik mikrotübülüsü, kromozomları uygun olarak düzenlemeye yetecek düzeyde değildi. Bu nedenle çoğu hücre, kromozom kümeleri ile birbirine karışmış, filamentöz görünümlü, eksik, yoğunlaşmış küçük tübülün kütleleri içeriyordu (Şekil 2 A,B). Temel bozukluk, mekik oluşumundaki başarısızlıktan kaynaklanıyordu. Bunun sonucu



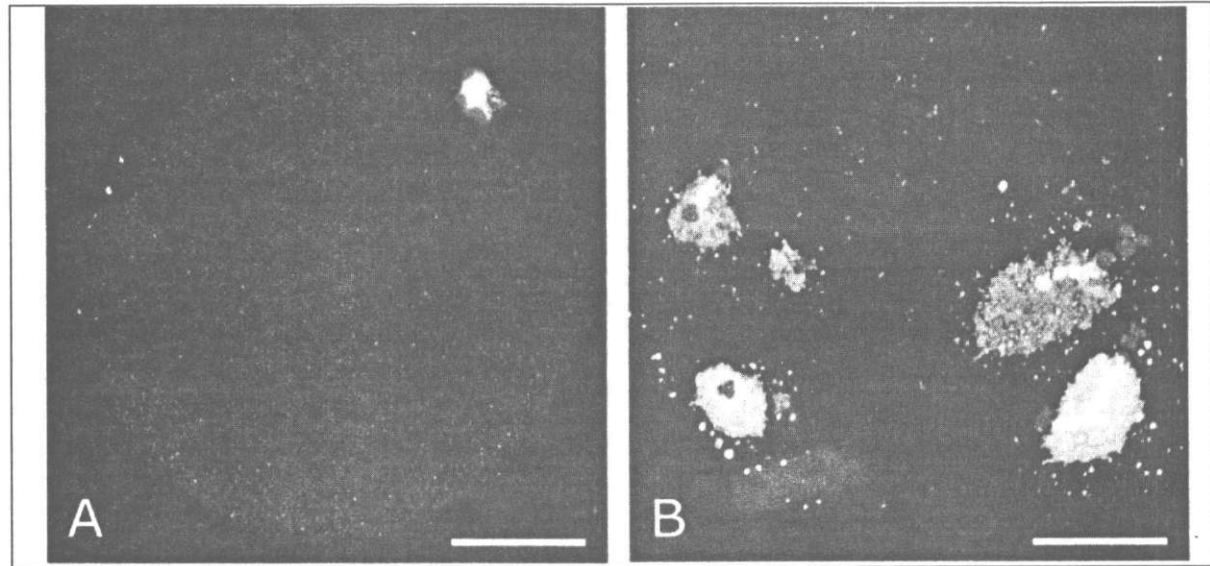
Şekil 1:

Metafaz-I aşamasındaki ovositin mikrotübülüs ve kromozomlarının görünümü (A)

Metafaz-II aşamasındaki ovositin mikrotübülüs, kromozom ve kutup cisimciğinin (*) görünümü (B). (Barlar 20 μ m)

olarak da, kromozomların yanlış dizilimine neden oluyordu. Hücreler, mayoz mekiği oluştuktan sonra DES'e maruz bırakıldığında, var olan birinci mayoz mekikleri, ovoplazmaya rast gele

dağılmış küçük parçalara ayrıldılar. Mekik parçaları genelde disfonksiyoneldi. Çünkü; hücreler sitokinezi başaramamışlar ve dolayısı ile hiç kutup cisimciği oluşturamamışlardı.



Şekil 2:

Mayoz bölünmenin ilk yarısında DES'e maruz bırakılan ovositlerde mekik mikrotübülüslerinin oldukça azaldığı ve kromozomların yoğunlaştığı görülüyor.(A) (Bar 20 μ m)

Mayoz bölünmenin ikinci yarısında DES uygulanan ovositlerde 1. mayoz mekiğinin parçalanarak ovoplazma içine kromozomlarla birlikte dağıldığı görülüyor. (Bar 5 μ m)

DES uygulamasının, hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin, geri dönüşlü olup olmadığını anlamak için, sekiz saat DES'e maruz bırakılan ovositler, bunu izleyen on saat süre içinde kontrol kültüründe tutuldular. Deney sonunda, kontrol grubundaki ovositlerin çoğu (%92) metafaz-II'ye ulaşırken, DES uygulanmasından sonra iyileştirme yapılan gruptaki ovositlerin çoğu (%91) metafaz-I aşamasına ulaşabildiler (Şekil 3). Ayrıca, normal mekik yapısına ve iyi organize olmuş MTOC'lara sahiptiler. Bu grupta hücre ölümüne dair açık bir işaret yoktu. Bu bulgular gösterdi ki, DES'in etkisi geri çevrilebilir (reversible) özellik taşıyordu. Fakat, öyle görülüyor ki, DES uygulanan hücreler mayozu bitirmek için daha uzun süreye ihtiyaç duymuşlardı.

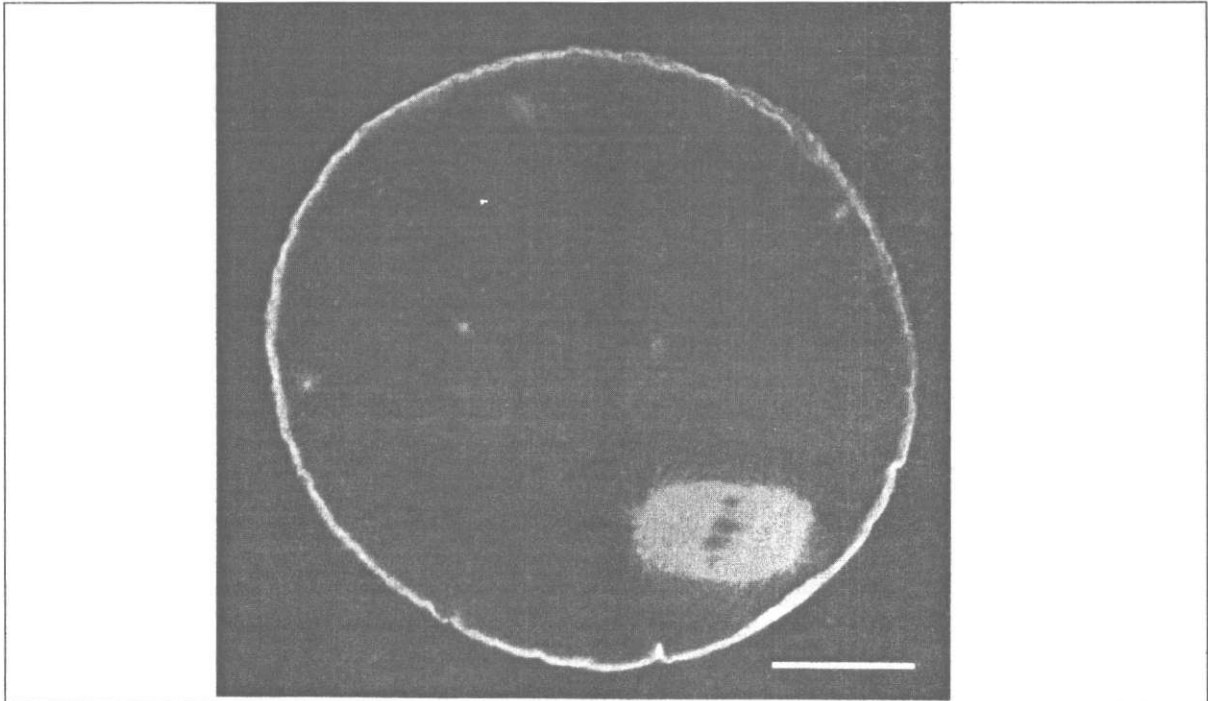
İlginç bir başka bulgu da, GV safhası ovositleri ve komşu kumulus hücrelerinin DES uygulanmasından etkilenmediği, dolayısı ile hiç bir kromozom dağılım bozukluğuna ve mikrotübülüs bozulmasına rastlanmadığıydı idi (Şekil 4 A,B).

TARTIŞMA

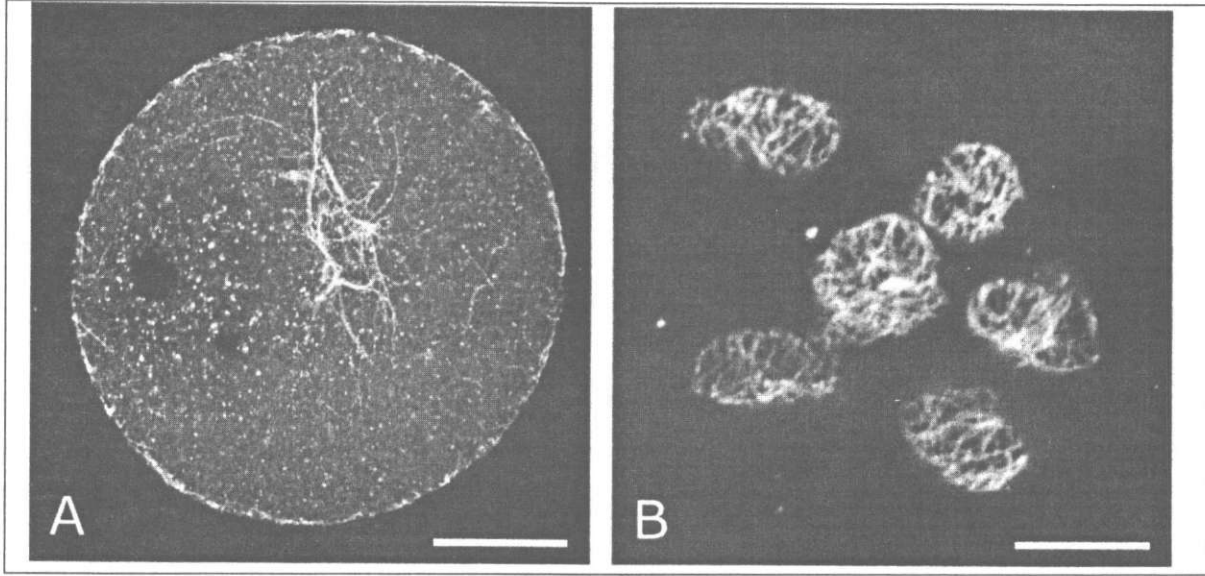
Östrojenik ajanların *in vitro* ortamda ovositler üzerindeki etkilerini araştırmak, *in vivo* ortamda-

ki etkilerini kesin olarak ortaya çıkarmayabilir. Ancak, DES ve benzer etkili bileşiklerin insan da dahil memelilerde germ hücresi gelişiminin kontrol noktalarında mayozu etkileyerek üreme fonksiyonunu bozduklarına ilişkin yeterince kanıt vardır (9). DES'in izole edilmiş mikrotübülüslerde ve kültür hücrelerindeki mikrotübülüs bozucu etkileri, bu ajanın memeli ovositlerinde de mayoz bölünme aşamalarını durdurabileceği şüphesini doğurduğu için bu çalışma yapılmıştır (10,11,14).

Sonuçlar gösteriyor ki; DES memeli ovositlerinde hücre bölünmesinin düzenlenimiyle ilgili mekanizmayı engellemektedir. DES uygulamasının iki ana sonucu ortaya çıkarılmıştır. Birincisi; DES uygulamasının metafaz-I'e ilerlemeyi geciktirerek ve mayoz-I sırasında metafaz-I mekiğinin oluşumunu engelleyerek mayoz bölünmenin gelişimini bozduğudur. Bu etkiler, mayoz bölünmenin aşaması ve hücre tipine göre değişiklik gösterir. Çünkü; kumulus hücreleri ve GV, DES'ten etkilenmemiştir. İkincisi; diğer araştırmacılar tarafından da gözlemlendiği gibi DES mekiği etkilediği için kromozom dağılım bozukluklarına neden olabilir (12). Bu sonuçlar, DES etkilerinin, bir şe-



Şekil 3: İlk sekiz saat sonrası DES uygulaması sonlandırıldığında normal metafaz-I mekiğinin yeniden izlenmesi (Bar 20 µm)



Şekil 4: DES'ten GV aşamasındaki ovosit (A) ve kumulus hücrelerinin (B) mikrotübülüslerinin etkilenmediği görülmekte (Barlar 20 ve 10 μ m).

kilde mayoz mikrotübülüsleriyle sınırlı olduğu sonucunu çıkarmamıza neden olmuştur. Böylece DES, çevredeki hücreleri ve dokuları fazlaca etkilemeden ovositlerde anöploidi veya fertilizasyon kusuru gibi genetik hatalara yol açabilir. KOK'ların kullanılmasının nedeni, bir yere kadar in vivo koşulları sağlamaktır. Eğer DES uygulanmış çıplak ovositler, anormal mayoz aşamalarından geri dönmezse, kumulus hücreleri ovosit metabolizması için kaçınılmaz bir çevre sağlıyor sonucuna varılabilir.

DES'in hücrelerin %50'sinde mikrotübülüs bozulmasına yol açması için gerekli doz (EC50), göğüs kanseri hücrelerinde 48-50 μ M, prostat kanseri hücrelerinin yarısını öldüren doz (LD50) 19-23 μ M olarak rapor edilmiştir (13,14). Bu hücrelerde apoptotik çekirdek sayısında artış gözlenmiştir. DES'in etkili, fakat öldürücü olmayan dozunu belirlemek için yapılan çalışmalarla birlikte bizim çalışmamız gösterdi ki, DES'in etkisi hücrenin çeşidine ve hücre döngüsünün evresine bağlıdır.

DES, mayoz bölünmenin olduğu mayoz-I sırasında, toplam mikrotübülüs kütlelerinde dramatik bir azalmaya yol açarken, var olan mayoz-I mekiğinin, bir kaç grup mikrotübülüs ve kromozom oluşturacak şekilde parçalanması, mayoz-II

sırasında mekik kutpu bütünlüğünün kaybı ile ilişkilidir. DES uygulanmasından sonra gözlemlenen minyatür mekik parçaları, DES'in kısmen sentrozom materyalinin organizasyon ve fonksiyonu ile ilgili bir bileşik olduğunu, mekik kutpu bileşenleriyle etkileştiğini düşündürmektedir. Bu etkinin açıklaması, MTOC'lar veya sentrozomlara yerleşmiş olarak bilinen α -tübulin ile direkt ilişkili olabilir (12). Bu sonuçlar memeli ovositlerinde DES'in rolünü anöploidojen olarak gören düşünceleri desteklemektedir.

Ovositlerde, DES uygulamasına bağlı hücre döngüsü gelişmesinin, reseptör aracılı olduğunu kabul etmek mümkündür. Fakat, DES'in östrojen reseptörleri aracılığı ile mikrotübülüs bozucu etkisiyle ilgili araştırmalar, östrojen reseptörü pozitif hücrelerin DES toksisitesine daha meyilli olduğunu gösterememiştir (13). DES metabolitleri olan İndenestrol A ve B'nin etkisini test eden mikrobiyoloji çalışmalarından ise, reseptör bağımlı mekanizmayı destekleyici kanıt gelmemiştir (15). Bu çalışmalar, bu son ürünlerin sitotoksik etkilerinin, reseptör aracılı aktiviteden çok, mikrotübülüs polimerizasyonuna direkt etkiyle olduğunu gösterdi. DES'in fare ovositleri üzerindeki etkilerinin hedef proteinlerini açığa çıkarmak için yeni çalışmalar gereklidir.

TEŐEKKÖR

Bu alıŐma, Dr. Olçay Semiz'in uzmanlık tezinin bir bۆlümünü içermektedir ve 4. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresinde sunulmuŐtur.

KAYNAKLAR

1. Herbst AL and Bern HA Developmental effects of diethylstilbestrol in pregnancy, Thieme-Stratton, 1981, New York.
2. Newbold RR Diethylstilbestrol and environmental estrogens influence the developing female reproductive system. Endocrine Disruptors. CRC press, 1999; 39-55 pp.
3. Sangvai M, Thie J, and Hofmann GE. The effect of intrauterine diethylstilbestrol exposure on ovarian reserve screening. Am. J. Obstet. Gynecol. 1997; 177: 568-572
4. Iguchi T, Fukazawa Y, Uesugi Y ve ark. Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. Biol. Reprod. 1990; 43:478-484.
5. Pal I, Shifren JL, saacson KB ve ark. Outcome of IVF in DES-exposed daughters experience in the 90s. J. Assist. Reprod. Genet. 1997; 14:513-517
6. Can A and Albertini F. Stage specific effects of carbendazim on meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. Mol. Reprod. Dev. 1997a; 46:351-362
7. Kilmartin JV, Wright B and Milstein C. Rat monoclonal anti-tubulin antibodies derived by using a new non-secreting rat cell line. J. Cell. Biol. 1982; 93:576-582.
8. Albertini DF. Cytoplasmic microtubular dynamics organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. Mutat. Res. 1992; 296:57-68.
9. Halling A, Forsberg JG. Ovarian reproductive function after exposure to diethylstilbestrol in neonatal life. Biol. Reprod. 1990; 43:472-477.
10. Sharp DC and Parry JM. Diethylstilbestrol: the binding effects of diethylstilbestrol upon the polymerisation and depolymerisation of purified microtubule protein in vitro. Carcinogenesis. 1985; 6:865-871.
11. Sato Y, Murai T, Oda T ve ark. Inhibition of microtubule polimerization by synthetic estrogens: formation of a ribbon structure. J. Biochem. 1987; 101:1247-1252.
12. Tsutsui T and Barret JC. Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogenlike chemicals. Environ. Healt Perspect. 1997; 105:supp 3,619-624.
13. AizuYokota E, Ichinoseki K and sato Y. Microtubule disruption induced by estradiol in estrogen reseptor-positive and negative human breast cancer cell lines. Carcinogenesis. 1994; 15:1875-79.
14. Robertson CN,Roberson KM, Padilla GM ve ark. Induction of apopitosis by diethylstilbestrol in hormone-intensive prostate cancer cells. J. Natl. Cancer Inst. 1996; 88:908-917.
15. Webster DR and Borisy GG. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. J. Cell Sci. 1989; 92:57-65

ÇalıŐma Ankara Üniversitesi 98090009, Tübitak AYD-240 ve DPT K 120560, NATO-CRG 951282 nolu projelerle desteklenmiŐtir.