

TAMOKSİFENİN SIÇAN KARACİĞERİNE ETKİSİ: IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

Aysel GÜVEN*, Feriha ERCAN**

ÖZET

Tamoksifen, meme kanserinin tedavisinde uzun süreli, en çok kullanılan trifeniletillen grubundan, en etkili antiöstrojenik ilaçtır. Bu ilacın uzun süreli kullanımına bağlı olarak karaciğer ve uterusu yan etkilere neden olduğu bilinmektedir.

Karaciğer üzerine morfolojik etkilerini incelemek amacı ile Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlara 3.5 ay süreyle i.p olarak tamoksifen, 1.5 mg /kg olacak şekilde uygulandı. Alınan karaciğer biyopsi materyalleri ışık ve elektron mikroskopu düzeyinde incelendi.

Işık mikroskopu düzeyinde karaciğer hücre kordon düzeninde bozulma, kanama odakları, Dissé aralığı bağ dokusunda artış gözlemlendi. Hepatosit ince yapısında membran ve organellerinde değişiklikler, glikojen içeriğinde ve lipid damlacıklarında ve vakuollerde artma gözlemlendi.

Sonuç olarak, sıçanlarda bu süre ve dozda tamoksifen uygulanımı karaciğer hasarına sebep olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Tamoksifen, karaciğer, morfoloji

SUMMARY

The effects of tamoxifen on the rat liver; light and electron microscopical study. Tamoxifen is an antioestrogenic in a triphenylethylen group drug, common used for long time period mammary gland cancer treatment. Long time period consumption of this drug has a negative effect on the uterus and liver.

For observation of the effect of tamoxifen on the liver morphology, tamoxifen was applied to the Sprague-Dawley female rats ip. 1.5 mg/kg for 3.5 months. Liver samples were examined at both light and electron microscopy level.

Liver samples was showed that degeneration of the regulation of the cell cordon, bleeding areas, increase of the connective tissue at Dissé space at light microscopy level. Ultrastructural observations showed that alterations of the membrane and organelle structure, formation of vacuoles, and increase of glycogen and lipid droplets in the hepatocyte cytoplasm.

As a result, application of the tamoxifen to the rats in these doses and time causes liver degeneration.

As a result, patient treated with tamoxifen because of the observation of the liver degeneration should be under control frequently.

Key words: Tamoxifen, liver, morphology

GİRİŞ

Kadınlarda, en sık görülen kanserlerden biri olan meme kanserinin tedavisi ve yüksek risk taşıyan kişilerin korunması önemlidir. Bu amaçla nonsteroid antiöstrojen maddeler; östrojenin meme tümörlerinin gelişimine direkt etkisi ve büyümesini stimüle etmesi

nedeniyle meme kanseri riski taşıyan ve meme kanseri olan kadınlarda antikanserojen olarak yaygın şekilde kullanılırlar (12,13, 23).

Tamoksifen; kemoterapötik ve kemoproflaktik olarak, meme kanserinin endokrin tedavisinde uzun süreli, en çok kullanılan antineoplastik maddelerden biridir (1,3,20).

Mecmuaya geldiği tarih: 16.03.1999

* Büyük Çamlıca Hastanesi, Çamlıca, İstanbul

** Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul

Meme tümör dokusunun östrojene bağlı proliferasyonu, tamoksifenin gerek reseptör (2,3,9,10,13,21) gerekse direkt hücresele antiöstrojen aktivasyonu ile önlenmektedir (13,24). Bununla birlikte uzun süreli tamoksifen uygulanmasının belirli dokularda östrojen seviyesinin artmasına neden olduğu bilinmektedir (7,18,22).

Tamoksifenin östrojen benzeri aktivasyonunun, östrojen bağımlı tümör gelişimine neden olduğu ileri sürülerek, özellikle karaciğerde östrojenik etkisiyle hepatokarsinogenik aktivasyonu (5,14,15,16,17,19,25) ve endometrium kanserini stimüle ettiği saptanmıştır (1,11,20,21,22).

Tamoksifenin, tedavi ve proflaktik amaçlı uzun süre kullanılmasında, östrojenik etkisi nedeniyle yan etkilere neden olması önemlidir (1,4,5,7,8,14,16,19).

Bu çalışmada, tamoksifenin sıçan karaciğeri üzerine etkilerini morfolojik yönden incelemek amaçlandı.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Enstitüsü (DE-TAE)'ünden elde edilen 12 adet Sprague-Dawley cinsi (180-200 gr) genç erişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik koşullarda tutulan sıçanlara (n=6), dimetilsülfoksitte çözülmüş 6.6mg/ml oranında tamoksifen citrate (Nolvadex), 1.5mg/kg olacak şekilde i.p. olarak 3,5 ay süreyle her gün uygulandı. Kontrol grubuna (n=6) ise sadece dimetilsülfoksit verildi.

Mikroskopik Preparasyon

Kontrol ve deney grubu sıçanlardan, eter anestezisi altında aynı karaciğer bölgelerinden ışık ve elektron mikroskopik gözlemler için biyopsi materyalleri alındı. Işık mikroskopik inceleme için alınan doku parçaları Bouin fiksatifinde tesbit edildi. Ru-

tin mikroteknik işlemlerinden sonra, 4-5 µ kalınlığında alınan kesitlere hematoksilin-eosin (H+E), Masson trikrom, periyodik asit schiff+haemalun (PAS+Hl) boya ları uygulandı. Boyalı kesitler Olympus BH-Z fotomikroskopunda değerlendirildi.

Elektron mikroskopik inceleme için alınan 1 mm³'lük biopsi materyalleri; fosfat tamponlu (pH 7.3, 0,1M) (3'lük glutaraldehit çözeltisinde 1.5 saat fikse edildi. (1'lik OsO₄ ile 1 saat süren postfiksasyon sonrası rutin elektron mikroskopi takibi yapılarak, araldit içinde polimerize edildi. Leica Ultracut R ultramikrotomunda alınan yaklaşık 60nm kalınlığındaki kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat boya ları ile kontrastlandı. İnce kesitler Jeol 1200 SX elektron mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR

Kontrol grubu: Işık mikroskopik incelemelerde V. centralis çevresinde düzenli şekilde yer alan karaciğer hücre kordonlarının yer aldığı gözlemlendi (Mikrograf 1, 2, 3). Hepatosit sitoplazmasında, PAS+ boyanan glikojenin homojen dağılımlı ve ince partiküller şeklinde olduğu görüldü (Mikrograf 2). Masson trikrom ile boyalı kesitlerde bağ doku dağılımı düzenli olarak görüldü. (Mikrograf 3).

Elektron mikroskopi gözlemlerinde, hepatosit nükleusları, sitoplazmadaki organel dağılımı ve glikojen partikülleri normal yapıdaydı. Hepatositlerin birbirine komşuluk eden ekzokrin yüzlerinde düzenli yapıda zonula occludens ve safra kanallikülü izlendi (Mikrograf 4).

Tamoksifen grubu: Işık mikroskopi incelemelerinde karaciğer hücre kordonlarının yapı ve bütünlüğünün bozulduğu, periportal saha ve hepatosit kordonları arasında büyük kanama odakları olduğu görüldü (Mikrograf

5 A). Hepatosit nukleuslarında şekil bozuklukları, ve sayıca artmış nukleoluslar gözlemlendi (Mikrograf 5 A-B).

Nukleusların piknoza giderek dejenere olduğu, sitoplazmasında vakuolizasyonun ileri derecede arttığı izlendi (Mikrograf 5B, 6). Bazı hepatositlerin sitoplazmasını glikojenin doldurduğu, Dissé aralığındaki bağ dokuda ve sinüzoid içerisinde PAS+ yapıda madde nin yer aldığı ve sinüzoid duvar yapısının bozulduğu görüldü (Mikrograf 6). Masson trikrom ile boyalı kesitlerde hepatositler arasında yer alan Dissé aralığı bağ dokusunda ve mononükleer hücre infiltrasyonunda artış gözlemlendi (Mikrograf 7).

Elektron mikroskopi bulgularında hepatositlerde, belirgin heterokromatin yapısına sahip ve invaginasyon yapmış nukleuslar mevcuttu (Mikrograf 8 A), bazı kesitlerde ise ışık mikroskopi bulgularına paralel olarak nukleolus sayısında artış görülmekteydi (3 nukleolus) (Mikrograf 8 B). Sitoplazmada; granüllü endoplazmik retikulum sisterna yapısında artış ve dilatasyon (Mikrograf 8 A), düz endoplazmik retikulum sisterna yapısında incelleme, yer yer madde birikimi ve bazı hepatositlerde sayıca azalmış mitokondriler izlendi. Bazı hepatositlerde hücre dejenerasyonuna bağlı organel kaybı, ve vakuolizasyon alanları görüldü (Mikrograf 9, 10). Sekonder lizozom sayısında ve lipid damlacıklarının miktarında artış gözlemlendi. Özellikle α glikojen partikülleri sayıca artarak rozet formunda büyük gruplar oluşturmaktaydı (Mikrograf 11). Hücrenin safra kanalikülüne yakın yüzünde dilate olmuş ve sayıca artmış Golgi aygıtı vardı. Safra kanalikülünü oluşturan ekzokrin yüzde, mikrovilli yapısında düzensizlik, sayısında azalma, lümeninde genişleme ve zonula occludens yapısında düzensizlik ve hücreler arası ilişkide azalma izlendi (Mikrograf 12). Dissé aralığına bakan yüzde mikrovilli yapısında incelleme ve düzensizlik gözlemlendi (Mikrograf 8 A).

TARTIŞMA

Günümüzde kullanılan antineoplastik ilaçların, çoğunun doğrudan sitotoksik şekilde etkiyerek hücre hasarı meydana getirdiği bilinmektedir⁽²⁵⁾. Antiöstrojenik etkili tamoksifen, meme kanserinin tedavisinde uzun süreden beri kullanılan en iyi ilaçtır.

Tamoksifen sindirim sistemine alındıktan sonra, intestinal absorpsiyona uğrar ve % 98'i plazma albuminine bağlanarak taşınır. Bir çok ilaç gibi tamoksifen de, karaciğerde mitokondri ve düz endoplazmik retikulum mikrozoamlarında sitokrom P-450 oksidazlarla metabolitlerine ayrılır. Büyük kısmı feçesle, bir kısmı da idrar yoluyla atılan bu metabolitler başta karaciğer olmak üzere akciğer, uterus, pankreas, hipofiz gibi organlarda yüksek konsantrasyonda birikir⁽¹³⁾. Tamoksifenin karaciğer kanserine neden olması, karaciğer mikrozoamlarında metabolize edilmesi, dokularda birikimi nedeniyle çalışmalar karaciğer üzerine odaklanmıştır^(14, 19,21,22).

Bu amaçla, tamoksifenin kullanım süresi ve dozuyla ilişkili karşılaştırmalı olarak yapılan ışık mikroskopik bir çok araştırmada, ilacın uzun süreli veya yüksek dozda kullanılmasının, östrojenik etkiyi ortaya çıkararak, serum östrodiol konsantrasyonunda artışa neden olarak, karaciğerde zararlı etkiyi oluşturduğu^(1,6,7,8,10,12,13,23) ve insanda tamoksifenin günde 10mg' dan fazla dozda alındığında ortaya çıktığı saptanmıştır⁽¹³⁾.

Hepatosellüler tümör insidansının doz ve verilen süreye bağlı olarak arttığını gösteren ışık mikroskopik çalışmalarda; tamoksifen verildikten 31 hafta sonra sıçanlarda kanserlerin büyük çoğunluğunun hepatosellüler karsinoma olduğu⁽¹⁴⁾ ve ilacın verilmiş süresine paralel olarak artan çapta ve sayıda hiperplastik nodüle neden olduğu saptanmıştır⁽¹⁾.

Tamoksifen, karaciğer üzerine zararlı etkisini; organ ağırlığında azalma^(2,7,25), hepatosit

organellerinde morfolojik ve fonksiyonel bozukluklar, lipidozis (13,14) ve hepatosellüler karsinomalar (14,16,17,18,19,20) olarak gösterir.

Greaves P. ve arkadaşları da, tamoksifen alanlarda yaygın lipidozis hepatosellüler karsinom, ayrıca hepatosit peroksizomlarında proliferasyon tesbit etmişlerdir (14).

3.5 ay süreyle tamoksifen uygulanan sıçanların karaciğerlerinin histolojik yapısında büyük değişimler olduğu gözlenmiştir.

Tamoksifenin; ilaç ile oluşturulan karaciğer hasarının en yaygın görülen bulgularından birisi olan kolestazise neden olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır (4,11,17). Tamoksifenin DNA veya proteinlere kovalent bağlandığı ve bu kovalent bağlanmanın doku toksisitesi ve karsinojenite meydana getirdiği bir çok araştırmacı tarafından saptanmıştır (5,20). Ayrıca tamoksifenin, karaciğerde DNA sentezini azalttığı, DNA hasarı ile hepatosellüler kanser ve karsinojenik süreçte etkili olan genotoksik etki oluşturduğu ileri sürülmüştür (1,7,14,16,19,20,22).

Hirsimaki P. ve arkadaşları, tamoksifen alanlarda hepatosit nükleus çapında ve kromatin miktarında artış, apoptotik ve nekrotik hepatositler saptamışlardır (17). Buna paralel olarak bazı hepatosit nükleuslarında kromatin yoğunlaşması görülmüş, özellikle ışık mikroskopide çok büyük boyutta, polimorfik, çok nükleoluslu ve yer yer de piknotik nükleuslara rastlamışlardır. Gerek nükleus, gerekse sitoplazmadaki bu değişikliklerin; tamoksifenin DNA ve protein üzerine direkt etkisi ile (5,20) ve ayrıca hücre organellerinde hasara paralel olarak nükleus-sitoplazma ilişkisinde azalma ile olduğu düşünülmektedir.

Yapılan birçok çalışmada özellikle ışık mikroskopik düzeyde incelemeler yapılarak tamoksifenin kullanım süresi ve dozuna bağlı olarak artış gösteren hepatocellüler karsinoma neden olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada, ışık mikroskopi seviyesinde belirgin hepatocellüler karsinoma görülen dokuların yanısıra görülmeyen karaciğer dokularında da elektron mikroskopi bulguları bu hücrelerde de az olmakla birlikte hasar meydana geldiğini ortaya koymuştur. Tamoksifen ile ilgili organel düzeyinde hepatosit morfolojisi çalışmalarının azlığı göz önüne alındığında elde ettiğimiz bulguların ilacın kullanımının gerektiği durumlarda dikkatli olunması gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ahotupa M., Hirsimäki P., Pärssinen R. and Mäntylä E.: Alterations of Drug Metabolising and Antioxidant Enzyme Activities During Tamoxifen-induced Hepatocarcinogenesis in the Rat. *Carcinogenesis*. 15: 863 (1994).
2. Al-Turk W.A., Stohs S.J. and Roche E.B.: Effect of Tamoxifen Treatment in Liver, Lung and Intestinal Mixedfunction Oxidases in Male and Female Rats. *Drug Metabolism and Disposition* (1981).
3. Bertram G. Katzung: Estrogen & Progesterone Inhibitors & Antagonists. *Basic & Clinical Pharmacology*. 624 and 841. Sixth edition. Copyright (1995).
4. Blackburn A.M., Amiel S.A., Millis R.R., Rubens R.D.: Tamoxifen and Liver Damage *Br. Med. J. Clin-Res Ed*. 289: 288 (1984).
5. Carthew P., Nolan B.M., Edwards R.E. Smith L.L.: The Role of Cell Proliferation in the promotion of Rat Liver Tumours by Tamoxifen. *Cancer Letters*. 106:163-169 (1996).
6. Dökmeci İ.: Farmakoloji. İlaç uygulamalarında Temel Kavramlar. Cilt.2. Saray Medikal Yayıncılık (1996).
7. Dragan Y.P., Fahey S., Street K., Vaughan J., Jordan V.C. and Pitot H.C.: Studies of Tamoxifen as a Promoter of Hepatocarcinogenesis in Female Fischer F344 Rats. *Breast Cancer Research and Treatment*. 31:11 (1994).
8. Dragan Y.P., Xu Y-D., and Pitot H.C.: Tumor Promotion as a Target for Estrogen / Antiestrogen Effects in Rat Hepatocarcinogenesis. *Preventive Medicine*. 20:15-26. (1991).
9. Fernö M., Anderson C., Fallenius G. and Idvall I.: Oestrogen Receptor Analysis of Paraffin Sections and Cytosol Samples of Primary Breast Cancer in Relation to Outcome After Adjuvant Tamoxifen Treatment. *Acta. Oncologica*.35:17 (1996).
10. Fornander T., Rutqvist L.E., Wilking N., Carlström K. and Schoultz B.: Oestrogenic Effects of Adjuvant Tamoxifen in Postmenopausal Breast Cancer. *Eur.J. Cancer* 29:497 (1993).
11. Fornander T., Rutqvist L.E.: Adjuvant Tamoxifen and Second Cancers. *Lancet*.1: 616 (1989).
12. Fornander T., Cedermark B., Mattsson A., Skoog L., Theve T., Askergren J., Rutqvist L.E., Glas U., Silfversward C., Somell A., Wilking N., Hjalmar M-L.: Adju-

- vant Tamoxifen in Early Breast Cancer: Occurrence of New Primary Cancers. The Lancet. 117 (1989) .
13. Furr B.J.A., and Jordan V.C.: The Pharmacology and Clinical Uses of Tamoxifen Pharmac. Ther. 25:127 (1984).
 14. Greaves P., Goonetilleke R., Nunn G., Topham J. and Orton T.: Two-Year Carcinogenicity Study of Tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived Rats. Cancer Research. 53 :3919 (1993).
 15. Hard G.C., Williams G.M., Iatropoulos M.J.: Tamoxifen and Liver Cancer. The Lancet. 342: 444 (1993).
 16. Hirsimaki P., Mantyla E., Hirsimaki Y. and Mantyla M.: The Effects of Tamoxifen and Toremifen on Rat Liver Ultrastructure and Peroxisomal Enzymes. ICEM 13-PARIS 1229 (1994).
 17. Hirsimaki P., Hirsimaki Y., Nieminen L.i and Joe P.B.: Tamoxifen induces hepatocellular carcinoma in rat liver: a 1 year study with two antiestrogens. Arch. Toxicol . 67:49 (1993).
 18. Jordan V.C.: Molecular Mechanisms of Antiestrogen Action in Breast Cancer .Breast Cancer Research and Treatment. 31:41 (1994).
 29. Kim D.J., Han B.S., Ahn B., Lee K.K., Kang J.S. Tsuda H.: Promotion Potential of Tamoxifen on Hepatocarcinogenesis in Female SD or F344 Rats Initiated with Diethylnitrosamine. Cancer Letters. 104:13 (1996).
 20. Mani C. and Kupfer D: Cytochrome P-450 mediated Activation and Irreversible Binding of the Antiestrogen Tamoxifen to Proteins in Rat and Human Liver: Possible Involvement of Flavin-containing Monooxygenases in Tamoxifen Activation. Cancer Research. 51: 6052 (1991).
 21. Mani C., Gelboin H.V., Park S.S., Pearce R., Parkinson A. and Kupfer D.: Metabolism of the Antimammary Cancer Antiestrogenic Agent Tamoxifen. Drug Metabolism and Disposition. 21:645 (1993).
 22. Morrow M., Jordan V.C.: Risk Factors and the Prevention of Breast Cancer with Tamoxifen. Cancer Surveys. 18:211 (1993).
 23. Robertson J.F.R , Ellis I.O., Nicholson R.I., Robins A., Bell J. and Blamey R.W.: Cellular Effects of Tamoxifen in Primary Breast Cancer. Breast Cancer Research and Treatment 20:117 (1991).
 24. Taylor C. M., Blanchard B. and Zava D.T.: Estrogen Receptor-Mediated and Cytotoxic Effects of the Antiestrogens Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen. Cancer Research. 44: 1409 (1984).
 25. Williams G.M., Iatropoulos M.J., Djordjevic M.V. and Kaltenberg O.P.: The Triphenylethylene Drug Tamoxifen is a Strong Liver Carcinogen in the Rat. Carcinogenesis. 14: 315 (1993).

Mikrograf Açıklamaları:

Mikrograf 1: Kontrol sıçan karaciğerinde, V. Centralis (VC) çevresinde hepatositlerden kurulu düzenli hücre kordonlarının (HK), yapısı görülmektedir. Sin: Sinüzoid, H+E, X200

Mikrograf 2: Kontrol grubunda, hücreler içerisinde homojen dağılımlı PAS (+) glikojen partikülleri izlenmektedir. PAS+HI, X400

Mikrograf 3: Kontrol grubunda periportal sahada; V. interlobularis (v), A.interlobularis (a), ductuli biliferi (db) ve kollagen liflerinin (→) yer aldığı düzenli bağ doku yapısı izlenmektedir. Masson trichrome, (200

Mikrograf 4: Kontrol grubunda düzenli yapıda hepatosit görülmektedir.: n: Nükleus, →: granüllü endoplazmik retikulum, ⇒: düz endoplazmik retikulum, m: mitokondri, l: lizozom, →←: zonula occludens, s: safra kanalikülü, elektronmikrograf, bar: 500 nm

Mikrograf 5A: Tamoksifen verilen grupta hepatosit kordon düzeninin (→) bozukluğu, büyük kanama odakları (*) ve çok nükleoluslu (>) hepatositler gözlenmektedir. H+E, X100, inset: X1000

Mikrograf 5B: Tamoksifen verilen grupta, hepatositlerde artmış vaküolizasyon (v), nükleuslarda şekil bozukluğu (→), nükleolus sayısında artış (>) gözlemlenmiştir. H+E, X400

Mikrograf 6: Tamoksifen verilen grubun hepatositlerinde nükleus çap farklılıkları (n), sitoplazmada ileri derecede vakuolizasyon (v), bazı hücrelerde PAS+ (*) madde yoğunlaşması belirgin olarak izlenmektedir. PAS+HI, X1000

Mikrograf 7: Tamoksifen verilen grupta hepatosit sitoplazmalarında vakuolizasyon (→) bağ dokuda ve mononükleer hücre infiltrasyonunda (*) artış görülmektedir. Masson-trichrome, X200

Mikrograf 8A: Tamoksifen verilen gruba ait hepatositte membran yapısı düzensiz nükleuslar (n), sekonder lizozom sayısında artma (l), büyük vakuoller (v), Dissé aralığına bakan yüzünde mikrovilli yapısında bozulma (*), hepatositler arasında ilişkide kopukluk ve boş alanlar izlenmektedir. Elektronmikrograf, bar 1 µm

Mikrograf 8B: Tamoksifen verilen gruba ait hepatosit nükleusunda 3 nükleolus görülmektedir. Elektronmikrograf, bar 1 µm

Mikrograf 9: Tamoksifen verilen grubun hepatosit sitoplazmasında, granüllü endoplazmik retikulum yapısında incelme (\rightarrow), mitokondri sayısında azalma (m) ve hücre dejenerasyonuna bağlı organellerde azalma ve boş alanların (*) ortaya çıktığı gözlenmektedir. Elektronmikrograf, bar: 1 μ m

Mikrograf 10: Tamoksifen verilen grubun hepatosit sitoplazmasında mitokondri matrisinde yoğun madde birikimi (m), granüllü endoplazmik retikulumda (\rightarrow) ve düz endoplazmik retikulum tübül vesiküllerinde dilatasyon (\succ), α glikojen partiküllerinin rozet tarzında yoğunlaştığı (\Rightarrow) görülmektedir. Elektronmikrograf, bar: 200nm.

Mikrograf 11: Tamoksifen verilen grupta hepatosit sitoplazmasında α glikojen partiküllerinin yoğun birikimi (\rightarrow) sekonder lizozomların artışı (\succ) gözlenmektedir. Elektronmikrograf, bar: 2 μ m

Mikrograf 12: Tamoksifen verilen grupta iki hepatosit arasında zonula occludens yapısının bozularak ($\rightarrow\leftarrow$) hücreler arası bağlantının koptuğu, safra kanalikülünde mikrovilli sayısında azalma ve incelmenin (m) ortaya çıktığı görülmektedir. Elektronmikrograf, bar: 500nm.