

## DİŞİ RAT ÜRETERİNDE ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİNİN (ER) VARLIĞI İLE ERKEN VE GEÇ ÖSTROJEN TEDAVİSİNİN ER, EPİTEL VE DÜZ KAS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

*THE PRESENCE OF ESTROGEN RECEPTORS AND THE EFFECTS OF DELAYED VERSUS EARLY ESTROGEN THERAPY ON ER, URETERAL EPİTHELIUM AND SMOOTH MUSCLE IN FEMALE RATS*

KOÇAK İ.\*, DÜNDAR M.\*, ÇUHACI N.\*\*

\* Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, AYDIN

\*\* Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, AYDIN

### ÖZET

Genital ve alt üriner sistemde östrojen reseptörleri (ER) varlığı ve östrojen tedavisinin hücre düzeyindeki etkileri iyi bilinirken, üst üriner sistemde bu yönde sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada dişi rat üreterinde ER reseptör varlığını immunohistokimyasal olarak göstermeyi ve cerrahi menopoza uyguladığımız ratlarda östrojen tedavisinin üreterin ER, epitel ve düz kası üzerine olan histolojik etkilerini göstermeyi amaçladık.

28 adet 4 aylık sağlıklı dişi Wistar albino rat rast gele olarak 4 gruba bölündü. Grup I, II ve III' e bilateral overiektomi (BOVX), grup IV' e ise yalancı operasyon uygulandı. Grup II' ye hemen, grup III' e ise 6 hafta sonra başlanan 17-beta östradiol tedavisi toplam 6 hafta uygulandı. Çalışma periyodu sonunda çıkarılan üreterler ER varlığı için immunohistokimyasal olarak, epitel ve düz kas kalınlığının mikrometrik ölçümü için Masson's trichrome boyaması ile değerlendirildi.

Gruplar arasında üreter epitel ve düz kas kalınlığında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ( $p=0.942$  ve  $p=0.393$ ). İmmunohistokimyasal değerlendirme ile hiçbir grupta üreterde spesifik östrojen reseptör boyanması gösterilemedi. Grupların ikili olarak epitel ve düz kas ortalamalarının karşılaştırılmasında da anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

Dişi rat üreterinde spesifik ER olmaması nedeniyle uyguladığımız östrojen tedavisinin, grupların östrojen durumundan bağımsız olarak, üreter epitel ve düz kası üzerinde histolojik düzeyde etkili olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Östrojen reseptörü, östrojen tedavisi, üreter, rat

### ABSTRACT

The presence of estrogen receptors (ER) and the effects of estrogen therapy in cellular level are well known in the genital and the lower urinary tract. But limited number of studies on this subject was performed in the upper urinary tract. We aimed to demonstrate the presence of ER in the female rat ureter immunohistochemically and the histologic effects of estrogen treatment on ER, epithelium and smooth muscle in the ureters of rats subjected to surgical menopause.

Twenty-eight healthy, 4 month-old female Wistar albino rats were divided randomly into four groups. Bilateral ovariectomy (BOVX) were performed in groups I, II and III whereas sham operation was performed in group IV. 17-beta estradiol treatment was applied to group II immediately and to group III 6 weeks after operation for 6 weeks totally. At the end of the study period, ureters were respected and examined for the presence of ER immunohistochemically and for the micrometric measurement of the thickness of epithelium and smooth muscle by Masson's trichrome staining.

There was no statistically significant difference between the groups for the ureteral epithelium and smooth muscle thickness ( $p=0.942$  and  $p=0.393$  respectively). Specific estrogen receptor staining in the ureter could not be demonstrated in any group by immunohistochemical examination. There was also no statistical difference in mean thickness of epithelium and smooth muscle when groups were compared with each other ( $p>0.05$ ).

We conclude that there is no effect of estrogen treatment on ureteral epithelium and smooth muscle histologically, independent of the estrogen status of the groups, due to the lack of specific estrogen receptors in the female rat ureter.

Key Words: Estrogen receptor, estrogen treatment, ureter, rat

## GİRİŞ

Kadın üriner sisteminin östrojenler için hedef doku olduğu düşünülmektedir. Östrojenler spesifik reseptörleri aracılığı ile etki gösterirler. Genital ve alt üriner sistemde östrojen reseptörleri (ER) varlığı ve östrojen tedavisinin doku düzeyindeki etkileri iyi bilinmektedir. İnsan ve hayvanlarda üretrada yüksek östrojen reseptör konsantrasyonları saptanmıştır<sup>1-3</sup>. Östrojen reseptörlerinin kadın mesanesinde trigon bölgesinde yoğunlaştığı bilinmektedir<sup>4</sup>. Östrojenler nöronal sensivite ve nörotransmitter metabolizmasını artırarak üretral mukoza, submukoza, periüretral kollojen doku ve pelvik çatı üzerinde trofik etki gösterirlerken, mesane üzerinde alfa adrenerjik reseptörlerin dansite ve sensitivitesini artırarak etkili olurlar<sup>5</sup>. Bu sonuçlar sonrası östrojen preparatları yıllardır kadınlarda alt üriner sistem sorunlarının ve tartışmalı olsa da üriner inkontinans tedavisinde kullanım alanı bulmuştur<sup>6</sup>.

Buna karşın üst üriner sistemde östrojen reseptörlerinin varlığına ve östrojen tedavisinin doku düzeyinde etkinliğine yönelik çalışmalar azdır. Hormonların, özellikle östrojen ve progesteron'un üreter üzerindeki etkisine yönelik çalışmaların gebelik hidroureteronefrozunun etiyojisinin belirlenmesi ile sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda genellikle birbirleri ile uyumsuz sonuçların elde edildiği belirtilmektedir<sup>7</sup>.

Bu çalışmada dişi rat üreterinde ER reseptör varlığını immunohistokimyasal olarak göstermeyi ve cerrahi menopoza uyguladığımız ratlarda erken ve geç dönemde uygulanan östrojen tedavisinin üreterin ER, epitel ve düz kası üzerine olan histolojik etkilerini göstermeyi amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ağırlıkları 230 ile 250 gram arasında değişen 30 adet 4 aylık sağlıklı dişi Wistar albino rat kullanıldı. Her kafeste üçer adet tutulan ratlar, standart süt pellet yemi ve şehir suyu ile beslendi. 2 rat çalışma öncesi deneyim periyodunda kullanıldıktan sonra, rast gele olarak 4 ayrı çalışma grubu oluşturuldu (Tablo I). İntraperitoneal xylazine (5 mg/kg) ve ketamine (25 mg/kg) anestezi ile prone pozisyonda traş ve povidon iyot ile cilt temizliği yapıldı. Bilateral dorsal flank insizyonu ile Grup I, II ve III'de bilateral overiektomi (BOVX) uygulanırken grup IV'e yalnızca

operasyon uygulandı. Grup II ve III'ün 6 haftalık östrojen tedavisinde 17-beta östradiol (Premarin® intramuskuler, 1 mg/kg/gün, Wyeth Corp., USA) kullanıldı. Grup I, II ve IV 6 haftalık çalışma periyodu sonunda, grup III ise 12 hafta sonrasında sakrifiye edildi. Üreteropelvik bileşkedden itibaren yaklaşık 3 cm'lik üreter bölümü çıkarıldı.

Grup	No	Operasyon	Östrojen tedavisi (6 hafta süreli)	Sakrifikasyon zamanı
I	7	-	BOVX	6. hafta
II	7	-	BOVX + (hemen)	6. hafta
III	7	BOVX	+ (6 hafta sonra)	12. hafta
IV	7	-	Yalancı	6. hafta

Tablo I. Çalışmadaki grupların dağılımı, tedavi ve sakrifikasyon zamanı

**Histolojik inceleme:** Çıkarılan üreterler % 10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda fikse edildi. Parafine gömülen doku bloklarından eşit uzaklıkta 4 mikronluk kesitler hazırlandı. Öncelikle rutin hematoksilin eosin (HE) boyası uygulandı. Ayrıca düz kas tabakasını belirlemek için Masson's trichrome (MT) boyaması uygulanıp üreteriyum epitel kalınlığı ve muscularis propria kalınlığı büyük büyütmede (x 400) mikrometrik oküler kullanılarak ölçüldü.

**İmmunohistokimyasal inceleme:** Üreteral doku örneklerinde immunohistokimyasal olarak avidin-biotin peroxidaz yöntemi ile fare monoklonal antikor 1D5 klonu kullanılarak (Dako Corp., kod:N 1575, Carpinteria, USA) östrojen reseptörlerinin varlığı karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

**İstatistiksel değerlendirme:** Veriler bilgisayara kaydedilerek istatistik programında (Windows için SPSS 9.0) değerlendirildi. Veri ortancalarının karşılaştırılması için Kruskal-Wallis varyans analizi, gruplar arası ortalamaların ikili karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı.

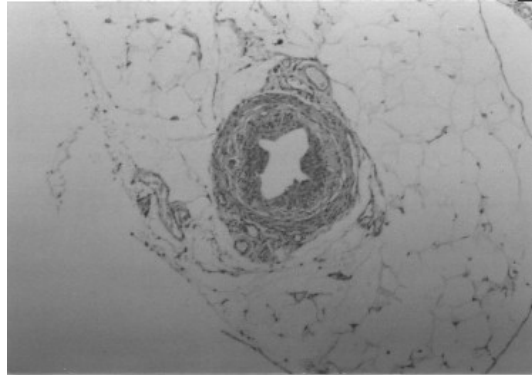
## BULGULAR

Çalışma gruplarındaki üreterlerin epitel ve düz kas kalınlık ortalama ve standart hataları

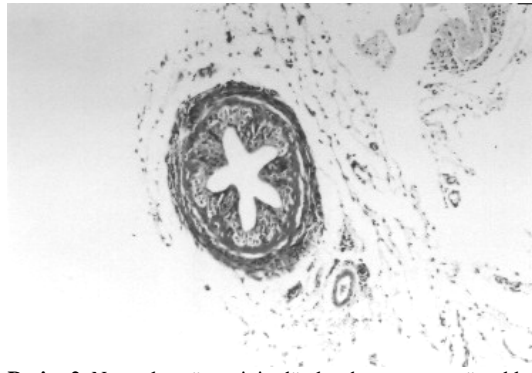
mikrometre olarak (Ort±SH, µm) tablo II' de gösterilmektedir. Histolojik değerlendirmede tüm gruplarda HE ve MT boyama ile elde edilen sonuçlar benzer olarak değerlendirildi (Resim 1, 2). Gruplar arasında üreter epitelini (p=0.942) ve düz kas kalınlığının karşılaştırılmasında (p=0.393) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. İmmunohistokimyasal değerlendirme ile hiçbir grupta üreterlerde spesifik östrojen reseptör boyanması gösterilemedi (Resim 3). Grupların ikiye ayrılarak epitel ve düz kas ortalamalarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p> 0.05).

Grup	I	II	III	IV
Epitel*	37.35	35.28	36.07	36.00
	± 2.21	± 1.88	± 1.25	± 3.61
Düz Kas*	18.14	17.28	19.82	17.85
	± 0.87	± 1.06	± 1.43	± 0.40

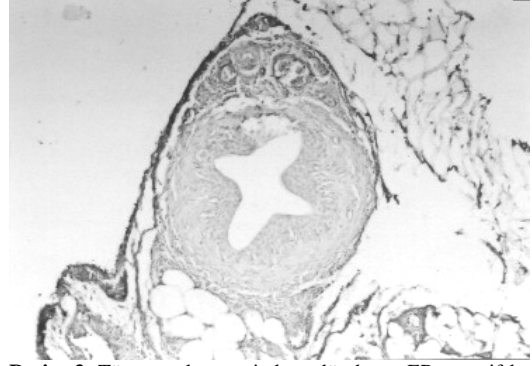
**Tablo II.** Gruplarda üreterlerin ortalama epitel ve düz kas kalınlığı (Ort ± SH, µm) (\* P< 0.05)



**Resim 1.** Normal rat üreterinin histolojik görünümü (HEx40).



**Resim 2.** Normal rat üreterinin düz kas boyanmasını örnekleyen kesiti (MTx40).



**Resim 3.** Tüm grupların epitel ve düz kasta ER negatif boyanmasını örnekleyen üreter kesiti. Periüretral dokuda boyalı kalıntıları izlenmektedir (x100).

### TARTIŞMA

Menopoz sonrası östrojenlerle yapılan lokal ve sistemik tedaviler alt ürogenital semptomlarda hızlı bir düzelmeye yol açmaktadır. Özellikle vulva ve vajende atrofik değişiklikler düzelerken inkontinans yakınmalarında subjektif düzelmeler de saptanmıştır<sup>8</sup>. Stress inkontinansa yönelik objektif düzelmeye kanıtları yokken, sıkışma inkontinansında ve alt üriner sistem enfeksiyonlarında östrojen tedavisi sonrası azalma olduğu gösterilmiştir<sup>9</sup>.

Östrojenlerin vajinal, klitoriyal ve üretral arteriyal akım üzerinde vazoprotektif ve vazodilatör etkilerinin olduğu gösterilmiştir<sup>10</sup>. Tarcan ve arkadaşları yaşlanma ile kadınlarda klitoriyal kavernoöz erektil dokuda histolojik değişiklikleri ve fibrozis varlığını ortaya koydular<sup>11</sup>. Berman ve arkadaşları östrojenlerin vajen mukoza bütünlüğünün korunması ve vajinal kan akımının sürdürülmesindeki önemine işaret etti<sup>12</sup>. Östrojenlerin vasküler dokular üzerinde düz kas hücrelerinde kalsiyum sinyalizasyonu ve endotel kökenli vazodilatörler üzerinde düzenleyici rolü ile etkili oldukları öne sürülmüştür<sup>13</sup>.

Üreter, altında gevşek bağ dokusu ve elastik dokunun bulunduğu transisyonel hücre epitelinden yapılmıştır. Üreter dışı doğru sarmal ve uzunlamasına düz kas lifleri ile sarılıdır. En dıştaki adventisya tabakası ise fibröz bağ dokusundan ibarettir<sup>14</sup>.

Literatürde deneysel olarak dişi rat üreterinde ER varlığına ve östrojenin üreter epitel ve düz kası üzerine olan etkisine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Farklı anahtar kelimelerle yapı-

ğımız medline taraması ile konuya ilişkin deneysel çalışmaların sıklıkla alt üriner sisteme yönelik olduğu görülmektedir. Güncel klinik bir çalışmada ER kadınların östrojen durumlarından bağımsız olarak alt üriner sistemin skuamöz epitelinde saptanırken, ürotelyal dokularda ise ER varlığı gösterilememiştir<sup>1</sup>. Deneysel olarak Babonlarda radyoizotopla işaretlenmiş östradiol'ün ureter ve mesanenin lamina propriasında konsantre olduğu, düz kaslarda ise tutulumun olmadığı gösterilmiştir<sup>2</sup>. Dişi tavşanlarda uretra ve mesanede saptanan ER yoğunluğu uterus oranla 10-20 kat daha az bulunmuştur<sup>3</sup>. Erkek tavşanlarda ise posterior uretra ve prostatik stromal dokular dışındaki üriner sistemde spesifik ER bulunamamıştır<sup>15</sup>. Köpeklerde yapılan bir çalışmada prostatik uretra ve dişide proksimal uretra mukoza ve submukozasında benzer yoğunlukta spesifik ER boyanması saptanmış ve bu ilişki aynı embriyolojik kökene bağlanmıştır. Yine bu çalışmada her iki sekste böbrek, ureter, mesane ve distal uretrada ise spesifik ER boyanması gösterilememiştir<sup>16</sup>. Benzer olarak biz de çalışmamızda, dişi rat ureter epitel ve düz kasında grupların östrojen durumundan bağımsız olarak spesifik ER boyanması varlığını ortaya koyamadık. Bu durum literatür verileri de göz önüne alındığında ureterin mesane ve uretraya göre farklı embriyolojik kökenli oluşuna bağlanabilir.

Histolojik düzeyde ise trikrom boyama ile mikrometrik olarak ölçülen ureter epitel ve düz kas kalınlığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptamadık. Bu nedenle alt üriner sistemden farklı olarak ureteral doku histolojisi üzerinde erken ve geç dönemde uygulanan östrojen tedavisinin belirgin bir histolojik etkisi olmadığı sonucuna vardık. Konu ile ilgili olarak üretelyumun sitozolik reseptör düzeyinde ER varlığını ortaya koyan immünohistokimyasal ve düz kasda kontraktıl yanıtları değerlendiren ileri fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda cerrahi menopoza sonrası erken veya geç dönemde verilen östrojen tedavisinin dişi rat ureteri üzerinde spesifik ER varlığı olmaması nedeniyle etkili olmadığını ve bu nedenle üst üriner sistemin menopoz sonrası oluşan hormonal değişikliklerden etkilenmediği düşüncesindeyiz.

#### KAYNAKLAR

- 1- **Blakeman PJ, Hilton P, Bulmer JN:** Estrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to estrogen status. *BJU int.* 86: 32-38, 2000.
- 2- **Weaker FJ, Herbert DC, Sheridan PJ:** Autoradiographic demonstration of binding sites for oestradiol and dihydrotestosterone in the urinary tract of male and female baboons. *Urol Res.* 11: 127-130, 1983.
- 3- **Batra SC, Iosif CS:** Female urethra: a target for estrogen action. *J Urol.* 129: 418-20, 1983.
- 4- **Iosif CS, Batra S Ek A, Astedt B:** Estrogen receptors in the human female urinary tract. *Am J Obstet Gynecol.* 141: 817-820, 1981.
- 5- **Ekstrom J, Iosif CS, Malmberg L:** Effects of long-term treatment with estrogen and progesterone on in vivo muscle responses of the female rabbit urinary bladder and urethra to autonomic drugs and nerve stimulation. *J Urol.* 150: 1284-88, 1993.
- 6- **Fantl AJ, Cardozo L, McClish DK:** Estrogen therapy in the management of urinary incontinence in postmenopausal women: A Meta analysis. First report of the hormones and urogenital therapy committee. *Obstet Gynecol.* 83: 12-18, 1994.
- 7- **Weiss RM:** Physiology and pharmacology of the renal pelvis and ureter. In *Campbell's Urology* (Walsh PC, Retik BA, Vaughan ED, Wein AJ, ed). Seventh edn. Philadelphia Saunders, Vol. I. Chapt. 25, 862, 1998.
- 8- **Pandit L, Ouslander JG:** Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Am J Med Sci.* 314: 228-231, 1997.
- 9- **Parazzini F, Colli E, Origgi G, Surace M, Bianci M, Benzi G, Artibani W:** Risk factors for urinary incontinence in women. *Eur Urol.* 37: 637-643, 2000.
- 10- **Nation B, Mclusky NJ, Leranthe CZ:** The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem.* 30: 195-207, 1988.
- 11- **Tarcan T, Park K, Goldstein I, Maio G, Fassina A, Krane RJ, Azadzi KM:** Histomorphometric analysis of age related structural changes in human clitoral cavernosal tissue. *J Urol.* 161: 940-944, 1999.
- 12- **Berman J, McCarty M, Kyprianou N:** Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. *Urology* 44: 650-656, 1998.
- 13- **Ruehlmann DO, Mann GE:** Actions of estrogen on vascular endothelial and smooth-muscle cells. *Biochem Soc Trans.* 25 (1): 40-45, 1997.
- 14- **Tanagho EA:** Anatomy of the genitourinary tract; in Tanagho EA, McAninch JW (eds):

*DİŞİ RATLARDA ÜRETERDE ER VARLIĞI VE ÖSTROJEN TEDAVİSİNİN HİSTOLOJİK ETKİLERİ*

- Smith's General Urology. 15th eds. New York, McGraw-Hill Comp. 1: 6-7, 2000.
- 15- **Bodker A, Anderson KE, Batra S, Juhl BR, Meyhoff HH:** The distribution of estrogen receptors in the urinary tract of the male rabbit. An immunohistochemical and biochemical study. Scand J Urol Nephrol 27 (2): 169-174, 1993.
- 16- **Schulze H, barrack ER:** Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the normal male and female canine urinary tract and prostate. Endocrinology 121: 1773-1783, 1987.