

In Utero Etanol Uygulamasının Sıçan Testis Morfolojisi Üzerine Etkileri

Yasemin Ersoy Çanilloğlu¹, Feriha Ercan²

¹Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Abd, İstanbul, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, İp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Abd, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Etanol, erkeklerde testislerde atrofiye, germ hücrelerinde kayba, sperm üretiminde azalmaya, seminifer tübül çaplarında azalmaya ve testis ağırlığında düşüğe neden olur. Gebelik döneminde etanol uygulaması hem dişilerde hem de erkeklerde reproduktif fonksiyonları bozarak fetuste teratojenik etki göstermektedir. Bu çalışmanın amacı *in utero* etanol uygulanan sıçanların testisindeki değişimleri incelemektir.

Yöntem: Bu çalışmada 2 deney grubu kullanılmıştır: 1) Kontrol grubu. 2) Alkol grubu. Alkol grubundakilere gestasyonel 14.günden itibaren doğuma kadar %30 etanol içeren sıvı verilmiştir. Deney ve kontrol grubundaki anne sıçanlardan doğan erkek yavrulardan 0., 15., 30. ve 90. günlük dönemlerde testis örnekleri alınmış, rutin parafin takibi uygulanmış ve kesitlere morfolojik inceleme için Masson'un üçlü boyaması uygulanmıştır.

Bulgular: Alkol neonatal grubunda bazı seminifer tübüllerde düzensizlikler gözlenirken zamana bağlı olarak seminifer tübüllerde dejenerasyon ve spermatogonik hücre serilerinde azalma gözlenmiştir. Alkol neonatal ve postnatal 15. gün grubunda mezenkimal bağ dokusunun fazla olduğu, postnatal 30 gün ve 90 gün grubunda da interstisyel bağ dokunun artmış olduğu görülmüştür.

Sonuç: Sonuç olarak, gestasyonel dönemde alınan alkol, erkek yavrularda seminifer tübüllerde spermatogonik hücre serilerinde azalmaya neden olmaktadır. Buna bağlı olarak gebelik döneminde alınan alkol, erkeklerde testiste atrofiye ve spermatogonik serideki hücre sayısını azaltarak infertiliteye sebep olabilir.

Anahtar sözcükler: Etanol, farklılaşma, infertilite, testis, morfoloji

ALTERATIONS OF TESTICULAR MORPHOLOGY IN RATS EXPOSED TO *IN UTERO* ETHANOL

ABSTRACT

Aim: Ethanol causes testicular atrophy, loss in germ cells, decrease in sperm production, decrease in the radius of seminiferous tubule lines and decrease in the testicular weight. Ethanol use in pregnancy also causes teratogenic effects in fetus by degenerating reproductive functions both in males and females. The aim of this study is to examine the testicular changes in rats which are applied ethanol in utero.

Method: 2 experimental groups were used: 1) Control group 2) Alcohol group.

Alcohol group was given liquid containing 30% ethanol beginning from the 14th gestational day until birth. Testicular samples were obtained from 0, 15, 30 and 90-day-old offsprings of mother rats in experiment and control groups. Sections were administered routine paraffin method and stained with Masson's trichrome for morphologic examination.

Result: As in alcohol neonatal group some disorders in seminiferous tubules were observed, a degeneration in seminiferous tubules and decrease in spermatogenic cell series were observed related with the time. In alcohol neonatal and postnatal 15 days group mesenchymal tissue, in postnatal 30 days and 90 days groups the interstitial tissue were observed to be more.

Conclusion: As a result in utero ethanol administration cause severe degeneration in the spermatogenic cell series in the seminiferous tubules of the male offsprings. Related to this, in utero ethanol causes infertility by decreasing the number of cells in spermatogenic series and testicular atrophy in males.

Key words: Ethanol, differentiation, infertility, morphology, testis

Giriş

Testiküler gelişim hücre farklılaşması, göçü, proliferasyonu ve apoptozisini içine alan olaylar zinciridir. Embriyonik gelişim boyunca; primordial germ hücreleri gastrulasyon aşamasındaki embriyonun epiblastlarından köken alırlar (1, 2, 3). Erkek ve dişi sıçan gonadları embriyonik dönemin 13. gününde morfolojik olarak bipotansiyel veya farklılaşmamış gonadlar olarak tanımlanırlar. Primordial germ hücreleri embriyonik dönemin 11. gününde son barsak ve dorsal mezenterden göç ederek genital tepelerin olduğu bölgeye gelirler, erkek fetuslarda cinsiyet kordonlarının merkezine yerleşirler ve daha sonra seminifer tübülleri meydana getirirler (4). Seminifer kordonlar içindeki germ hücreleri morfolojik olarak primordial germ hücrelerinden farklılaşırlar ve prospermatogonyum veya gonosit adını alırlar (5). Sıçanlarda erkek gonadların ilk morfolojik değişimi embriyonik dönemin 13,5–14,5 günleri arasında testiküler kordonların oluşumu ile başlar. Testiküler kordonlarda germ hücreleri Sertoli hücreleri ile daha sonra da peritubular myoid hücreler ile sarılırlar. Sertoli hücrelerinin proliferasyonu doğumdan sonra 3. haftaya kadar devam eder. Gonositlerin proliferasyonu ise embriyonik dönemin 17,5 gününe kadar olur, geç embriyonik dönemde çoğalması durur ve doğuma kadar sessiz bir döneme girerler (6).

Doğumdan sonra gonositler, tübüllerin merkezinden ayrılıp bazal membran boyunca yerleşmeye başlarlar. Bazı gonositler bazal membranda yerleştikten sonra bölünmeye başlarken bir kısım gonositlerde tübülün merkezinde bölünmeye başlar (7). Erkekteki germ hücrelerinin pozisyonlarındaki bu değişim testiküler gelişim için önemlidir. Seminifer kordta yeniden yerleşmeyen hücreler dejenerer olurlar. Gonositler yeniden yerleşimlerinde yeni oluşmaya başlayan bazal kompartmanda yerleşirler. Bu da belli bir süre sonra Sertoli-Sertoli hücre bağlantı komplekslerinin oluşumunda ve spermatogenik germ hücrelerinin oluşması için uygun çevre oluşumunda önemli yer tutar (8). Tüm gonositler mitotik çoğalma dönemine girerler. Bu postnatal olaylar spermatogonyumların alt tiplerinin ortaya çıkmasına neden olur. Spermatogonyumların çok yönlü farklılaşmaları lokal çevresel faktörlere ve seminifer tübül içindeki hücreler arası etkileşimlere bağlıdır (9, 10).

Etanol reproduktif toksin olarak kabul edilen bir maddedir (11). Erkeklerde kronik etanol kullanımı testislerde atrofiye, sperm üretiminde azalmaya ve testosteron düzeyinde düşüğe neden olur (12). Histolojik incelemelerde seminifer tübül çaplarında azalma ve germ hücrelerinde kayıp rapor edilmiştir. Kronik etanol kullanımı gonadal disfonksiyona

neden olur; spermatogenik olayları baskılar; seminifer tübül siklusundaki tüm aşamalarda spermatogonyumların proliferatif aktivasyonunu azaltır (13, 14).

Gebelik döneminde etanol uygulaması fetüste teratojenik etki göstermektedir. Hem dişilerde hem de erkeklerde reproduktif fonksiyonları bozmaktadır (15). Cinsiyet karakterlerinin farklılaşmasında defektlere neden olmaktadır (16).

Bu çalışmanın amacı, *in utero* etanol uygulanan sıçanların gelişmekte olan testislerindeki morfolojik değişiklikleri zamana bağlı olarak incelemektir.

Materyal ve Metod

Sıçanların gebe bırakılması

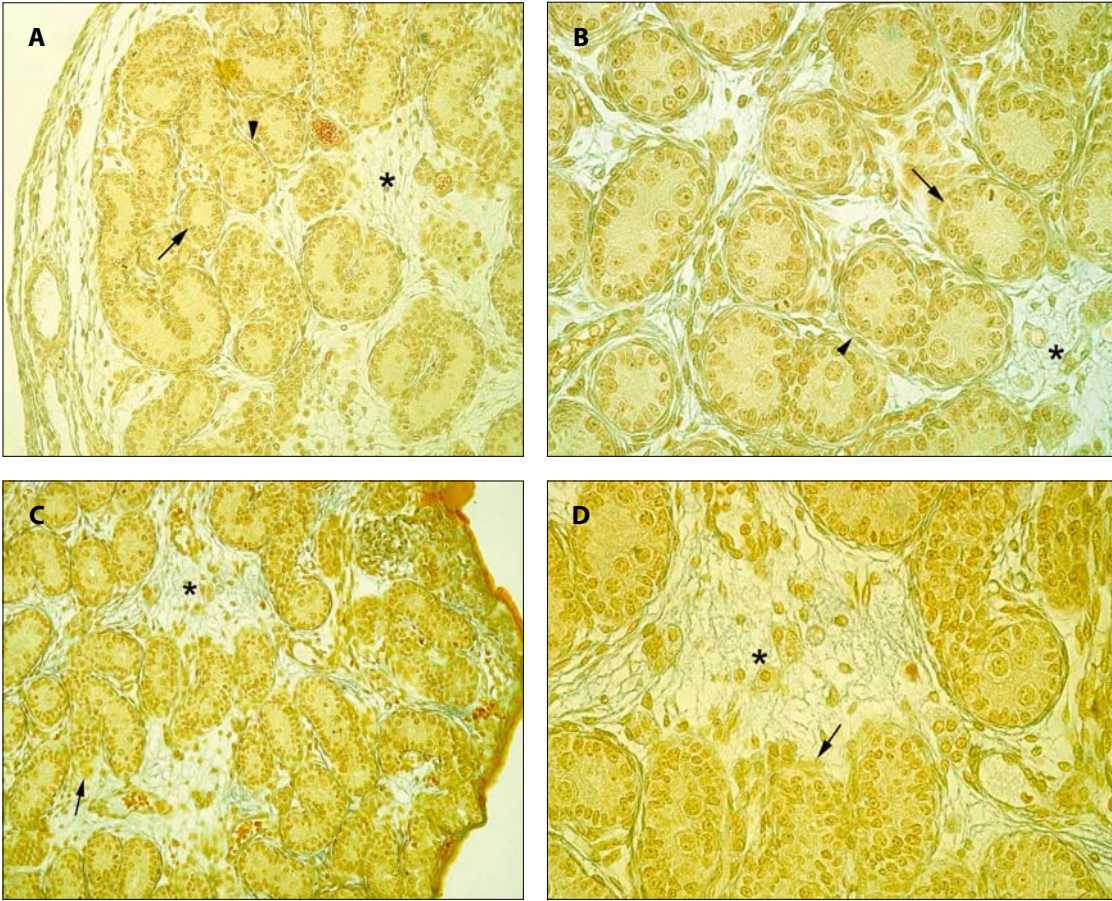
Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (04–2007-mar). Bir dişi-1 erkek veya 2 dişi-1 erkek olacak şekilde talaşsız kafeslerde Sprague Dawley ırkı sıçanlar çiftleşmeye bırakılmıştır. Ertesi gün vaginal plak görülen sıçanlar gebeliğin 0. günü kabul edilmiştir.

Gruplar: 1) Alkol Grubu (n=7): Gebe sıçanlara gebeliğin 14. gününden itibaren doğuma kadar %30 etanol içeren sıvı diyeti uygulanmıştır. 2) Kontrol Grubu(n=7): Gebe sıçanlara çeşme suyu verilmiştir.

Kontrol ve alkol grubundaki anne sıçanlardan doğan erkek yavrulardan neonatal, postnatal 15 gün, 30 gün ve 90 günlük dönemlerde derin eter anestezisi altında testis örnekleri alınmış ve morfolojik incelemeler için hazırlanmıştır. Bu süre içinde anne ve yavru sıçanlar uygun kafesler içinde, 12 saat aydınlık-karanlık ortamda, standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir.

Işık mikroskopik preparasyon

Tüm gruptan alınan testis örnekleri ışık mikroskopik inceleme için hazırlanmıştır. Bouin solüsyonu ile immersiyon fiksasyonundan sonra testis dokusu çeşme suyunda 2 saat yıkandıktan sonra, yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiş, toluen ile şeffaflaştırılmış, 60 °C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan yaklaşık 5 µm kalınlığında alınan kesitler genel morfolojik değerlendirme ve interstisyumdaki değişiklikleri gözlemek için Masson'un üçlü boyaması ile boyanmıştır.



Şekil 1. Kontrol 0. gün grubunda (A, B), bir iki sıralı gonositlerden oluşan seminifer tübüller (→) ve merkezi kısımda mezenkimal bağ dokusu (*) etrafında ince bir interstisyel bağ dokusu (▶) gözlenmektedir. Alkol 0. gün grubunda (C, D), küçük çaplı az sayıda gonositten oluşan düzensiz sınırları olan seminifer tübül yapıları (→) görülmektedir. Seminifer tübüllerin etrafında kalın mezenkimal bağ dokusu (*) gözlenmektedir. Masson'un Üçlü Boyası. Orijinal büyütmeye A, C: x200, B, D:x400.

Bulgular

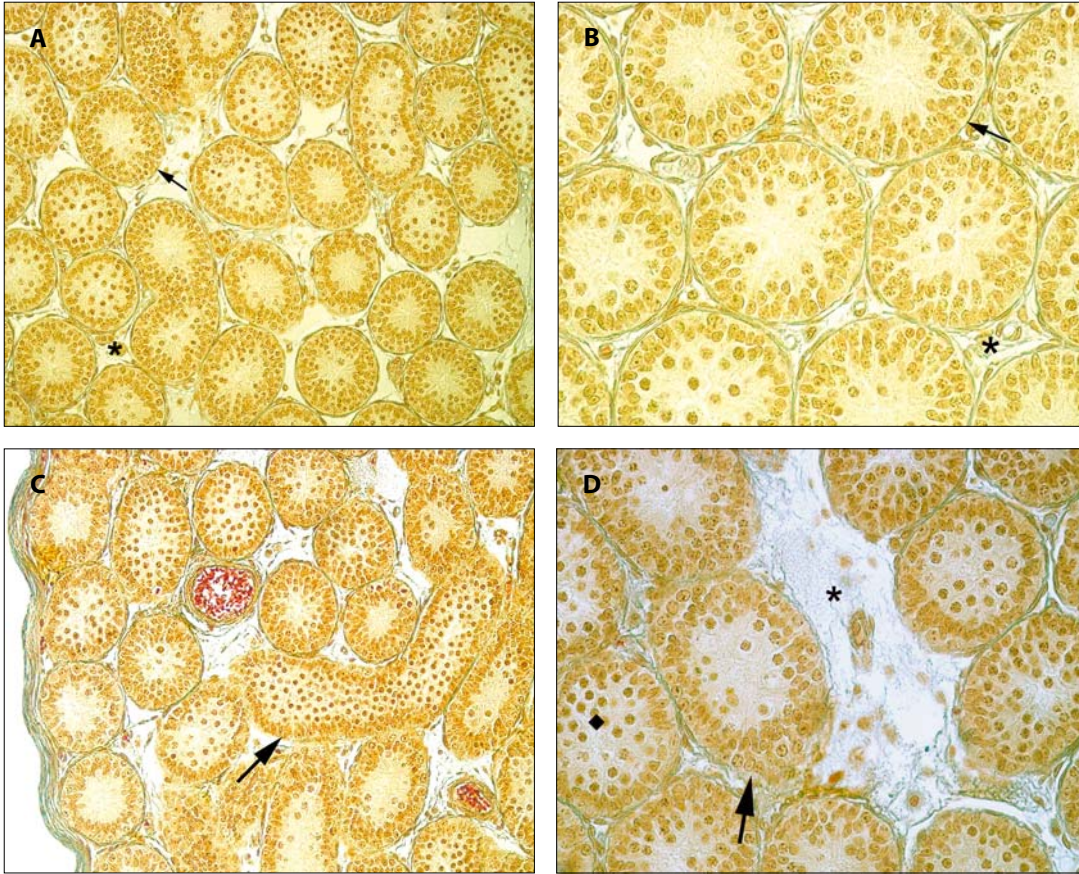
Histopatolojik bulgular

Kontrol 0. gün grubunda; bir iki sıralı gonositlerden oluşan seminifer tübüller görülmüştür. Seminifer tübüllerin arasında mezenkimal bağ dokusu gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin oluşumunun periferden merkeze doğru olduğu ve periferdeki seminifer tübüllerin etrafında ince bir bağ dokusunun olduğu görülmüştür (Şekil 1 A, B). **Alkol 0. gün grubunda;** periferden merkeze doğru az sayıda küçük çaplı seminifer tübüllerin düzensiz yerleşmiş gonositlerden oluştuğu, seminifer tübüllerin etrafında ve merkezde kalın bir mezenkimal bağ dokusunun varlığı gözlenmiştir (Şekil 1 C, D).

Kontrol 15. gün grubunda; seminifer tübül çaplarının küçük, fakat düzenli yapıda olduğu görülmüştür. Seminifer tübül duvarındaki gonosit ve spermatogenik seriye ait hücrelerin oluşumuyla birlikte hücre sırasının arttığı dikkat çekmiştir. Birçok tübülde lümenin oluştuğu görülmüştür. Lümen oluşumunun tamamlanmadığı

az sayıdaki seminifer tübülde merkezi kısımda hücrelerin varlığı dikkati çekmiştir. Seminifer tübüllerin sınırlarının düzenli olduğu ve seminifer tübüllerin etrafında ince bir bağ dokusunun olduğu görülmüştür (Şekil 2 A, B). **Alkol 15. gün grubunda;** küçük çaplı seminifer tübüllerin duvarında gonosit ve spermatogenik seriye ait hücrelerin düzensiz dizildiği görülmüştür. Birçok tübülde lümen oluşumunun başlamadığı ve tübülün merkezi kısmının hücrelerle dolu olduğu ve bazı bölgelerde de tübül sınırlarının düzensiz olduğu gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin etrafında kalın bir bağ dokusu görülmüştür (Şekil 2 C, D).

Kontrol 30. gün grubunda; testislerde düzenli seminifer tübül yapısı gözlenmiştir. Tübülde lümen oluşumunun tamamlandığı görülmüştür. Spermatogenik seriye ait hücreler düzenli olarak tübül duvarında dizilmiştir. İnterstisyel bağ dokusu düzenli morfolojide gözlenmiştir (Şekil 3 A, B). **Alkol 30. gün grubunda;** bazı seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait hücre tabakasında azalma, spermatogenik hücrelerde vakuol ve



Şekil 2. Kontrol 15. gün grubunda (A, B), gonositler, spermatogonyumlar, primer spermatisitler ve Sertoli hücrelerinden oluşan seminifer tübüllerin (→) düzenli dizilimi ve aralarında düzenli interstisyel bağ dokusu (*) görülmektedir. Alkol 15. gün grubunda (C,D), düzensiz yapıda seminifer tübüller (→), seminifer tübüllerin lümeninde hasarlı hücreler (◆) ve seminifer tübüllerin arasında yer yer yoğun mezenkimal bağ dokusu (*) görülmektedir. Masson'un Üçlü Boyası. Orijinal büyütme A, C: x200, B, D: x400.

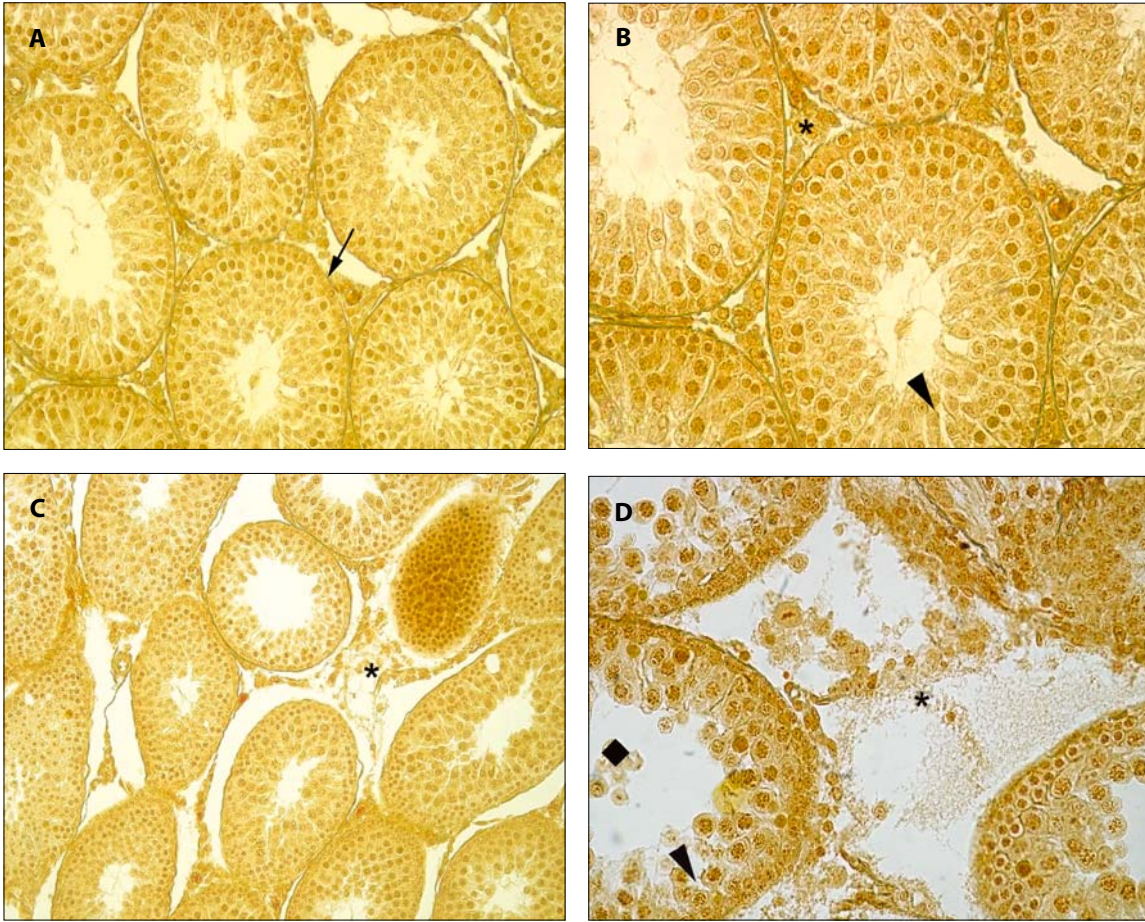
hücrelerarası alanlarda açılmalar görülmüştür. Gevşek hücrel organizasyona sahip regresif tübüller ve düzensiz tübül yapısında hücrelerarası bağlantısı olmayan az sayıda germ hücrelerinden ve Sertoli hücrelerinden oluşan dejeneratif tübüller görülmüştür. Bazı seminifer tübüllerde lümeninde döküntü hücreler gözlenirken bazı tübüllerde ise lümen oluşumu gözlenmemiştir. İnterstisyel bağ dokusunda yer yer kalınlaşmalar gözlenmiştir (Şekil 3 C, D).

Kontrol 90. gün grubunda; normal morfolojik yapı gözlenmiştir. Tübül çevreleri düzgün olup interstisyel bağ dokusu normal özellikte görülmüştür (Şekil 4 A, B). *Alkol 90. gün grubunda;* bazı alanlarda dejeneratif ve yer yer hücrel bağlantıları olmayan nadir germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinden oluşan atrofik tübüllerin olduğu gözlenmiştir. Bazı seminifer tübüllerin lümeninde döküntü hücreler görülmüştür. Seminifer tübüllerin etrafında kalın interstisyel bağ dokusu gözlenmiştir (Şekil 4 C, D).

Tartışma

Yaptığımız çalışmada erken gelişim döneminden itibaren alkolün testiste seminifer tübüllerde dejenerasyona ve spermatogenik seri hücrelerinde erken dönemden başlayarak yetişkin dönemde de devam eden morfolojik hasara neden olduğu gösterilmiştir.

Önceki çalışmalarda etanolün seminifer tübül döngüsünün bütün evrelerinde spermatogonyumların çoğalma aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir (14). Kronik etanol kullanımı spermatogenik yetkinliği baskılayıp gonadal fonksiyon bozukluğuna yol açar ve ayrıca spermatogenezini önleyerek erkek üreme aktivitesini engeller (17). Etanol kullanımı spermatogonyumların çoğalma aktivitesini ve spermatogenik aktiviteyi azaltır (13). Alkol kullananlarda testis çapları anlamlı derecede düşmüştür ve germ hücre kaybı vardır (18). Yapılan bir çalışmada 30 gün süre ile alkol uygulanan yetişkin erkek sıçanlarda testiküler atrofi gösterilmiştir (19). Hayvan deneylerinde kronik alkol kullanımı germ hücre hasarı gibi dejeneratif değişikliklere yol



Şekil 3. Kontrol 30. gün grubunda (A, B), düzenli morfolojide seminifer tübüller (→), interstisyel bağ dokusu (*) ve bazı seminifer tübüllerde spermatozoonlar (▶) gözlenmektedir. Alkol 30. gün grubunda (C, D), seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait hücre sırasında azalma ve hücreler arasında açılmalar (▶), bazı bölgelerde seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (◆) ve bazı alanlarda da seminifer tübüllerin etrafında interstisyel bağ dokusu artışı (*) görülmektedir. Masson'un Üçlü Boyası. Orijinal büyütme A, C: x200, B, D: x400.

açar. Leydig hücre fonksiyonlarının azalması testiküler atrofi ya da sterilite ile birlikte ortaya çıkmaktadır (20).

Bizim çalışmamızda da gebelik döneminde alkol alan anne sıçanların yavrularında tüm zaman dilimlerinde testis gelişiminde gerileme görülmüştür. İlaveten, seminifer tübül yapılarının azlığı, düzensizliği ve daha geniş alanlarda mezenkimal bağ dokusunun olduğu dikkat çekmektedir.

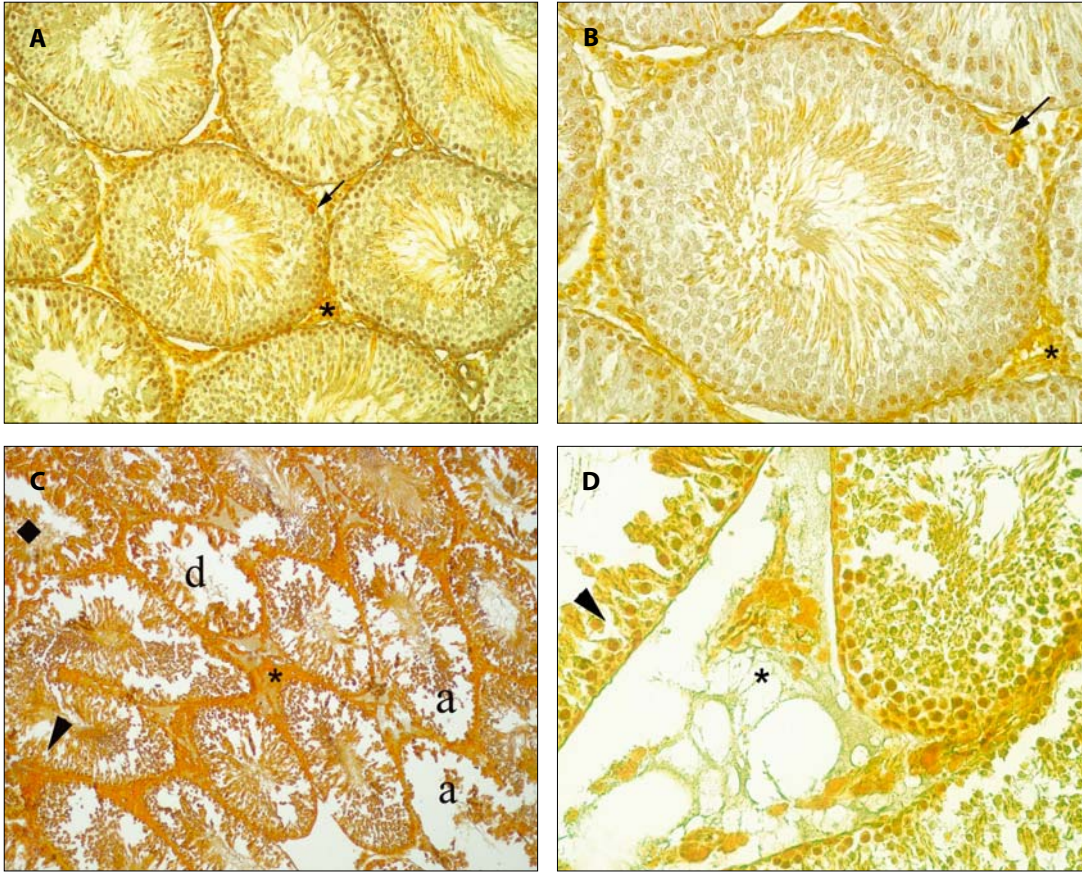
Postnatal 0. günde sağlıklı annelerin yavrularının seminifer tübüllerinde çok sayıda gonositin yer aldığı ve tübüllerin etrafında ince bir mezenkimal bağ dokunun varlığı gösterilmiştir (7). İlerleyen postnatal dönemlerde gonositlerin çoğalması ve düzenli olarak yerleşimi, Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarındaki düzenlemeler erişkin dönemde erkekte fertilitenin sağlanması açısından önem taşımaktadır (8).

Buna bağlı olarak çalışmamızda 0. gün grubunda, az sayıda gonosit içeren seminifer tübüllerinin sayısının fazla olduğu ve

tübülleri çevreleyen mezenkimal bağ dokusunun yoğun olduğu görülmüştür. 15. gün grubunda seminifer tübüllerin merkezinde dejeneratif hücrelerin varlığı ve tübüllerin etrafının yoğun bir bağ dokusu ile sarıldığı gözlenmiştir.

Alkol almış annelerin yavrularında gelişim döneminde lümeninde döküntü hücrelerin fazla olmasının nedeninin; normal gelişim sürecinde gözlenen gonositlerin seminifer tübül duvarı boyunca lümeninden bazale yerleşiminde bir bozukluktan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda gebelikte alkol uygulamasından sonra 30. gün grubunda, hücresel dejenerasyonlar oluştuğu ve gevşek hücresel organizasyona sahip regresif tübüllerin beraberliğinde düzensiz tübül yapısında, hücrelerarası bağlantısı olmayan, az sayıda germ hücrelerinden ve Sertoli hücrelerinden oluşan dejeneratif tübüllerin varlığı gösterilmiştir. Alkol 90. gün grubunda da regresif ve dejeneratif yapıdaki tübüllerin yanı sıra hücresel



Şekil 4. Kontrol 90. gün grubunda (A, B), düzenli seminifer tübül yapısı (→) ve interstisyel bağ dokusu (*) görülmektedir. Alkol 90. gün grubunda (C, D), dejeneratif (d) ve atrofik (a) seminifer tübüller, seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait hücre sırasında azalma ve hücreler arasında açılma (▶), seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (◆) ve seminifer tübüllerin arasında interstisyel bağ doku artışı (*) görülmektedir. Masson'un Üçlü Boyası. Orijinal büyütme A, C: x200, B, D:x400.

bağlantıları olmayan, nadir sayıda germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinden oluşan atrofik tübüllerin varlığı görülmüştür. Tübüllerin etrafında ise interstisyel alanın genişlediği gösterilmiştir.

Gebelik döneminde kronik etanol kullanımının, doğan bebeklerin testislerinde gonositlerin hasarına ve buna bağlı olarak gelişim döneminde spermatogenik hücre hasarına ve erişkin dönemde infertiliteye neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (13, 14, 15).

Sonuç olarak; elde ettiğimiz tüm bu bulgulara göre gebelik döneminde uygulanan alkol, yetişkin dönemde atrofik seminifer tübül sayısında artışa sebep olmuştur. Buna göre prenatal alkol uygulamasının uzun dönemde sıçanlarda spermatogenik hücrelerde geri dönüşümsüz olarak hasara sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu bilgilerin doğrultusunda deneysel olarak gebelikte uygulanan alkolün yetişkin dönemde erkek infertilitesinin oluşumunda etkili olabileceği ve erkek infertilite tedavilerine ışık tutması açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Bilgilendirme

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje no: SAG-DKR-290506-0084) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Robinson LLL, Gaskell TL, Saunders PTK Anderson AA. Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Mol Hum Repro* 2001;7: 845–852.
2. Jarvis S, Elliott D J, Morgan D, Winston R and Readhead C. Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse. *Hum Repro* 2005;20-1:108–116.
3. Ginsberg M, Snow MH and McLaren A. Primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990;110:521-528.
4. El Sokary GH. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2001;22:93–99.
5. Udani M, Parker S, Gavaler J, Van Thiel DH. Effects of in utero exposure to alcohol upon male rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;Jul-Aug;9(4):355–9.
6. Wilson ME and Handa RJ. Gonadotropin Secretion in Infantile Rats Exposed to Ethanol In Utero. *Alcohol* 1997; 14: 497–501.
7. Orth JM, Mc Guinness MP, Qiu J, Jester WF Jr and Li LH. Use of in vitro systems to study male germ cell development in neonatal rats. *Theriogenology* 1998;49:431–439.
8. McGuinness MP and Orth JM. Gonocytes of male rats resume migratory activity postnatally. *European J of Cell Biol* 1992;59:196–210.
9. Berruti G. Signalling events during male germ cell differentiation: bases and perspective. *Front Biosci* 1998;3:1097–1108.
10. Jarvis S, Elliott D J, Morgan D, Winston R and Readhead C. Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse. *Hum Repro* 2005;20- 1:108–116.
11. Rosenblum E, Gavaler J.S. and Van Thiel D.H. Lipid Peroxidation: a mechanism for ethanol-associated testicular injury in rats. *Endocrinology* 1985;116: 311–318.
12. Villata J, Balleca J.L, Nicolas J.M, Martinez de Osaba M.J, Antunez E, Pimentel C. Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21: 128–133.
13. Koh P.O. and Kim M.O. Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes, *J Vet Med Sci* 2006;68(10): 1013–1017.
14. El Sokary G H. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; 22:93–99.
15. Udani M, Parker S, Gavaler J, Van Thiel DH. Effects of in utero exposure to alcohol upon male rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;Jul-Aug;9(4):355–9.
16. Wilson ME and Handa RJ. Gonadotropin Secretion in Infantile Rats Exposed to Ethanol In Utero. *Alcohol* 1997;14: 497–501.
17. Salonen I and Huhtaniemi I. Effects of chronic ethanol diet of pituitary-testicular function of the rat. *Biol Reprod* 1990;42: 55–62.
18. Van Thiel D.H, Gavaler J. S, Eagon P. K, Chiao Y. B, Cobb C. F. And Lester R. Alcohol and sexual function, *Pharmacol Biochem Behav* 1980;13: 125-129.
19. Emanuela M.A., Emanuele N. Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 2001;25:282–287.
20. Martinez FE, Martinez M, Padovani CR and Bustos-Obregon E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB), *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000;32(2):175–184.