# *Preface*

قال تعالي:

﴿ بِسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ﴾

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ﴿١﴾ خَلَقَ الْإِنسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿٢﴾ اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ ﴿٣﴾ الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿٤﴾ عَلَّمَ الْإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿٥﴾

صدق الله العظيم

سورة العلق (١-٥)

# Dedication

**To those who are giving me the love and support, my parents**

**To those who are surrounding me by love and respect, my wives; Madeha Ahmed and Hedia Zolain.**

**To my lovely kids ; Dalia, Mohamod & Abdallaha**

**To my supervisor & colleagues, I dedicated this work.**

# Acknowledgement

My first and last thanks to ALLAH who gave me ability to carry out this work. My deep thanks and respect to my supervisors; Associated Prof. **Shams-Eldein Hassaballa** and prof **Shadia Abdoelatti Omer**, for their help, guidance and patience to bring out this work . My thanks to University of Nyala and Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) for their financial support .My great thanks without limit to all my colleagues , Abdalla Ibnomer, Hedia Zolain, Abdelnasir Adam and Eltahier Shuiep.

Finally to all those who I didn't mention my deep respect and a lot of thanks.

*Elkhier Tamour Ahmed Tamour*

# Abstract

This study was conducted to investigate the effect of injection of Estradiol Benzoate to intact and castrated male rabbits on some blood constituents and prostate tissue. A total of Ninety mature male rabbits (54 intact and 36 castrated) were used in this study.The rabbits were randomly divided into three groups and each group was further divided into four sub-groups. The rabbits of each groups were injected estradiol benzoate dosed at 0, 40, 80 and 120 µgm/rabbit, through intramuscular (IM) route, on each alternative day over a period of 30 days, whereas group three (18 intact rabbits) were offered an oral dosage of 1mg from prolactin inhibitor (Bromocriptine Mesilate)/ rabbit in addition to estradiol. Serum LH, FSH, and Testosterone levels were performed by immunoenzymometric assay , total-protein, Albumin, glucose , urea , creatinine, lipids profiles, AST, ALT and ALP enzymes, were measured in serum samples. Automate chemistry analyser (MINDARY) and reagent Biosystem® Spain made were used for analysis .

Prostate tissue samples were taken from each sub-groups, tissue processing method was made by automatic tissue processor and then embedded in paraffin wax. Sections of 5µ thick were cut by a rotary microtome, stained in Mayer's haematoxylin and Eosin H&E (Bancrof et al., 1996). All sections were examined under the light microscope (Olympus) to describe the microscopic changes and imaged by using digital camera. The statistical analyses were done using the SPSS statistical program, version 20 for Windows (IBM SPSS Statistics 20 IL, USA),and the results were expressed in form of mean ± standard deviation. The results showed that, the mean serum levels of LH and FSH were not affected by injection of estradiol benzoate in all intact and castrated rabbits sub-groups ($P>0.05$), while the mean testosterone concentration levels were showed insignificant increase in both intact and castrated male rabbits, except the intact male rabbit sub-group that

received estradiol benzoate at 120 µg/rabbit (P<0.05). However, the concentration levels of total protein ,glucose albumin and calcium were not affected by the injection of different doses of estradiol benzoate, Moreover, the study revealed that, the injection of estradiol benzoate at a dose of 40µg and 120 µg IM to intact male rabbits induced a significant (*P*<0.05) decrease in the creatinine level and increase in urea concentration in castrated rabbits. However, the result of the present study showed that, the injection of estradiol benzoate at doses of 40, 80 and 120 µgm/ rabbit intramuscularly were not induced any significant (P>0.05) changes on lipids profile of intact and castrated male rabbits, while HDL was significantly (P<0.05) increased at a dose 40 µg in intact male rabbits. However, liver enzymes AST, ALT and ALP did not affected (*P*<0.05) by injection of estradiol benzoate to intact rabbits, whereas, AST and ALP were significantly (P<0.05) decreased in castrated male rabbits as compare to the intact male rabbits. The correlation between estradiol benzoate doses and blood constituents had showed that, a significant positive correlation in ALT ,testosterone and significant negative correlations in glucose , triglyceride , LDL and LH in intact male rabbits, whereas, a significant positive correlation in glucose , urea , and a significant negative correlations in creatinine , triglyceride , AST ,and ALP And in castrated male rabbits were detected. Furthermore, the effects of estradiol benzoate in prostate tissues were ranged from hyperplasia with dysplasia or dysplasia only in intact male rabbits; hyperplasia was represented by papillary projection in castrated male rabbits ,however, administration of estradiol benzoate to intact male rabbits in concomitance with prolactin inhibitor (Bromocreptein mysaylate) induced mild hyperplasia in intact male rabbits.

It is concluded that injection of estradiol benzoate to male rabbits induced many effects represented in LH , FSH, testosterone , total-protein, Albumin, glucose , urea , creatinine , lipids profiles , liver enzymes, there is however, strong evidence shows

that excessive or untimely exposure to estrogens can facilitate development of prostatic changes, disorders and even malignancies.

# مستخلص الأطروحة

أجريت هذه الدراسة لتقصي التغيرات في بعض مكونات الدم ونسيج غدة البروستات نتيجة للحقن بالاستراديول بنزويت لذكور الارانب غير المخصيه والمخصيه. عدد تسعون ذكر بالغ من الارانب (54 غير مخصيه و 36 مخصيه) تم استخدامها في هذه الدراسة. وزعت الارانب عشوائيا الي ثلاث مجموعات وكل مجموعة قسمت لاحقا الي اربعة مجموعات فرعية.الارانب في كل مجموعة حقت استراديول بنزويت بجرعات 0، 40، 80 و 120 ميكروجرام/ارنب عن طريق العضل يوم بعد يوم لفترة 30 يوم، بينما المجموعة الثالثة (احتوت علي 18 ارنب) اعطيت جرعات فموية بمقدار 1 ملجم من مثبط البرولاكتين (بروم كربتين ميثاليت)/ ارنب بالاضافة للاستراديول. مستوي الهرمونات المصفر، المحفز لنمو الجريبات ، و التستوستيرون تم قياسها باستخدام طريقة القياس الانزيمي المناعي، البروتين الكلي ، الألبومين، الجلوكوز ، اليوريا، الكرياتين، الدهون، الانزيمات إسبارتات ترانساميناز ، الأنين ترانساميناز ،و الفوسفاتاز القلوي تم قياسها باستخدام جهاز التحليل الكيميائي الاتوماتيكي (MINDARY) ووسيط التفاعل ®Biosystem اسباني الصنع. تم اخذ عينات لنسيج البروستات من كل المجموعات الفرعية، تمت معالجة انسجة البروستات بواسطة جهاز معالجة الانسجة الاتوماتيكي ومن ثم طمرت في شمع البرافين. قطعة سمكها 5 ميكرون تم قطعها باستخدام جهاز التقطيع الدوار ، وتم صبغها بصبغة مايير H&E حسب وصف (Bancrof et al., 1996) . كل المقاطع النسيجية تم فحصها تحت المجهر الضوئي (Olympus) لوصف التغيرات المجهرية وتصويرها بالكاميرة الرقمية . التحليل الاحصائي تم باستخدام البرنامج الاحصائي SPSS طراز 20 لنظام التشغيل ويندوز (IBM SPSS Statistics 20 IL, USA) ، وتم التعبير عن النتائج في شكل المتوسط ± الانحراف المعياري.

. أظهرت النتائج بان متوسط مستوي السيرم للهرمونات المصفر والمحفز لنمو الجريبات لم يتأثر بحقن الاستراديول بنزويت في كل المجموعات الفرعية للأرانب غير المخصيه والمخصيه ($P>0.05$) ، بينما متوسط مستوي تركيز التستوستيرون اظهر ارتفاع غير معنوي في كل من الزكور غير المخصيه والمخصيه ماعدا في الزكور غير المخصيه للمجموعة الفرعية التي اعطيت استراديول بنزويت بجرعة 120 مكيروجرام /أرنب. بينما مستوي تركيز البروتين الكلي ، الالبومين، الجلوكوز ، والكالسيوم لم تتأثر بحقن الجرعات المختلفة للاستراديول بنزويت. وعلاوة على ذلك، كشفت الدراسة أن حقن الاستراديول بنزويت بجرعات 40 و 120مكيروجرام عن طريق العضل احدث نقصان معنوي ($P<0.05$) للكرياتين للزكور غير المخصيه ، وزيادة معنوية ($P<0.05$) لليوريا عند الزكور المخصيه. ومع ذلك، أظهرت نتيجة الدراسة الحالية أن حقن الاستراديول بنزويت بجرعات 40 و 80 و 120 ميكروجرام / أرنب بالعضل لم تحدث أي تغييرات معنوية كبيرة ($P>0.05$) على الدهون في كل من الذكور غير المخصيه والمخصيه، بينما البروتين الدهني عالي الكثافة ازداد معنويا ($P<0.05$) عند الجرعة 40 ميكروجرام في الذكور غير المخصيه. مع ذلك انزيمات الكبد إسبارتات ترانساميناز ، الأنين ترانساميناز ،و الفوسفاتاز القلوي لم تتأثر ($P>0.05$) بحقن الاستراديول بنزويت للذكور غيرالمخصيه. بينما إسبارتات ترانساميناز و الفوسفاتاز القلوي انخفضت معنويا ($P<0.05$) عند الذكور المخصية بالمقارنة مع الذكورغير المخصيه .

الارتباط بين جرعات الاستراديول بنزويت و مكونات الدم في ذكور الارانب غير المخصيه اظهر وجود ارتباط معنوي موجب في الأنين ترانساميناز و التستوستيرون . ووجود ارتباط معنوي سالب في الجلوكوز ، الجليسيريدات الثلاثية ، البروتين الدهني منخفض الكثافة و الهرمون المصفر. و في ذكور الارانب المخصيه اظهر وجود ارتباط معنوي موجب في الجلوكوز واليوريا ووجود ارتباط معنوي سالب في الكرياتنين ، الجليسيريدات الثلاثية ، إسبارتات ترانساميناز و الفوسفاتاز القلوي . علاوة على ذلك، ثاثيرات الحقن بالاستراديول بنزويت علي نسيج البروستات ترواح من فرط في النسيج وتغير في شكل الخلايا او تغير شكل الخلايا فقط عند ذكور الارانب غير المخصيه ، فرض في النسيج متمثلا ببروزات حليميه عند ذكور الارانب المخصيه. وعلي الجانب الاخر حقن الاستراديول بالتزامن مع مثبط البرولاكتين ( البروكربتين ميثاليت) احدث فرض تنسج خفيف بنزويت لذكور الارانب غير المخصيه. وخلصت الدراسة بان حقن الاستراديول بنزويت لذكور الارانب له تأثيرات عديدة علي كل من الهرمونات المصفر ، محفز الجريبات والتستوستيرون، البوتين الكلي ، الالبومين ، الجلوكوز، اليوريا ، الكرياتين، الدهون، انزيمات الكبد، ولكن هناك أدلة قوية تبين أن التعرض المفرط أو غير الملائم للأستروجين يمكن أن يسهل تطور التغيرات في البروستات، والاضطرابات وحتى الأورام الخبيثة.

# List of contents:

## List of tables:

## List of figures

## List of Abbreviations:

| Abbreviation | Stand for |
|---|---|
| **AST** | Aspartate Aminotransferase |
| **ALT** | Alanine Aminotransferase |
| **ALP** | Alkaline phosphatase |
| **BPA** | Bisphemol A |
| **BPH** | Benign prostatic hyperplasia |
| **C°** | Degree centigrade |
| **cm** | Centimeter |
| **DES** | Diethylstilbestrol |
| **DHT** | Dihydro testosterone |
| **dL** | Deciliter |
| **E2** | Estrogen |
| **EDC** | Endocrine disrupting compound |
| **ERs** | Estrogen receptors |
| **ERα** | Estrogen receptors alpha |
| **EU** | European union |
| **FSH** | Follicle stimulating hormone |
| **G** | Gram |
| **HDL** | High density lipoprotein |
| **H&E** | Hematoxiline and Euosin |
| **IFCC** | International Federation of Clinical Chemistry |
| **IM** | Intramuscular |
| **Kg** | Kilogram |
| **L** | Liter |

| | |
|---|---|
| **LDH** | Lactate dehydrogenase |
| **LDL** | Low density lipoprotein |
| **LH** | Luteinizing hormone |
| **mg** | Milligram |
| **ml** | Milliliter |
| **Mmol** | Millimol |
| **MDH** | Malate dehydrogenase |
| **Ng** | Nano gram |
| **Nm** | Nanometer |
| **nmol** | Nano mol |
| **NS** | Normal saline |
| **O-CPC** | O-Cresolphthalein complexon |
| **Pg** | Pico gram |
| **PIF** | Prolactin inhibitory factor |
| **PRL** | Prolactin |
| **PTH** | Parathyroid hormone |
| **RBCs** | Red blood corpuscular |
| **r.p.m** | Round per minutes |
| **SHBG** | Sex hormone binding globulin |
| **SPSS** | Statistical package for social science |
| **U** | Unit |
| **UGS** | Urogenital sinus |
| **VLDL** | Very low density lipoprotein |
| **µ** | Micro |

# Introduction

Estrogens are steroid hormones include estrone, estradiol, and estriol which animal body is produce them naturally (Moskowitz, 2006), and they are regarded as the main reproductive hormones that affects growth, development, maturation and functioning of reproductive tract as well as the sexual differentiation and the behavior (Balthazart *et al.*, 2009). Estrogen was historically believed to be a female hormone, but there is growing evidence of a biological role of this steroid in the male reproduction (Tohidi, 2010). The source of estrogen in males may be germ cells (Carreau *et al.*, 2003), or liver, adrenal glands, adipose tissue, and testes (Tohidi, 2010). Beside indigenous estrogens, there were exogenous estrogens called Xenoestrogens which have been defined by The United States Environmental Protection Agency as "an exogenous agent" that interferes with synthesis, secretion, transport, metabolism, binding action or elimination of natural blood borne hormones that are present in the body and which are responsible for homeostasis, reproduction and developmental process (Evanthia *et al*., 2009). There were differences between the natural and synthetic steroids in their effects on body due to the difference in affinity for binding to globulin , biological activity in plasma, metabolism, and half-life (Anna-Maria and Niels,1999). The exogenous estrogenic compounds were used for anabolic purposes in food animals to increase the secretory characteristics of growth hormone (Misztal *et al.*, 2007 and Colak *et*

*al.,* 2011) for weight gain purposes. Other exposure sources to these compounds may occur through industry , agriculture, and some of these compounds are used in food production and food packaging , diet (e.g. pesticide residues on fruit and vegetables, food contaminated by compounds found in can lining and plastic wrapping etc.), in addition to phytoestrogens, which are found in rich amount in certain plants. Although the endogenous estrogen have physiological roles in males (Nilsson *et al* ., 2001; O'Donnell *et al* ., 2001; Hess and Carnes, 2004 and Carreau *et al* ., 2008 and Tohidi, 2010), the exposure to exogenous estrogen can cause adverts effects such as erectile dysfunction and impotence (Adaikan and Srilatha, 2003), infertility (Rozati *et al* ., 2002), prostate cancer (Ritchie *et al.,* 2003) and testicular dysgenesis syndrome (TDS) (Sharpe, 2003).

The objectives of this study were:

1. To investigate the changes on concentrations of glucose, total protein, albumin, calcium, urea and creatinine, lipids profiles, AST, ALT and ALP enzymes of intact and castrated male rabbits due to exposure to different doses of estradiol benzoate.
2. To study the changes on serum concentration of reproductive hormones LH, FSH, testosterone.
3. To study the correlation between the estradiol doses and the changes in blood biochemical parameters.

4. To study the effect of estradiol benzoate on prostate tissue and the role of prolactin on estrogen action in prostate was also investigated.
5. To compare the effect of estrogen on prostate gland in presence and absence of testicular testosterone.