



Gelişimsel kalça displazili bebeklerde kalça eklem kapsülü ve ligamentum kapitis femoriste östrojen reseptörlerinin saptanması

Engin Eren DESTELİ¹, Ahmet PİŞKİN¹, Ali Birol GÜLMAN¹, Figen KAYMAZ², Bülent KÖKSAL¹, Murat ERDOĞAN¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Samsun;

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Çalışmamızın amacı insan kalça eklem kapsülü ve ligamentum capitis femorislerindeki östrojen reseptörü varlığını saptamaktır.

Çalışma planı: Gelişimsel kalça displazisi (GKD) nedeniyle ameliyat edilen 15 hastanın ve kontrol grubu olarak da 15 intrauterin ölü fetüsün toplam 30 kalçasından ligamentum capitis femoris (LCF) ve kalça eklem kapsülü biyopsileri alındı. Olguların cerrahi sırasında ortalama yaşı 10.3 (dağılım: 6-18) ay idi. Tam kat 1x1 cm anterior kapsül ve LCF örnekleri biyopsi olarak alındı. Kalça eklem kapsülü ve LCF'de bulunan hedef östrojen hücrelerinin oranını saptamak için monoklonal östrojen reseptör antikoları kullanılarak immünohistokimyasal bir çalışma yapıldı.

Bulgular: Kontrol grubundaki LCF örneklerinde saptanan östrojen reseptörü (ÖR) boyanma oranı $1.6 \pm 0.2\%$, kalça eklem kapsülünde ise $1.3 \pm 0.2\%$ idi. GKD bulunan grupta ise LCF örneklerinde saptanan ÖR boyanma oranı $2.5 \pm 0.3\%$, kalça eklem kapsülünde ise $2.0 \pm 0.3\%$ idi. LCF ve kalça eklem kapsülünde ÖR boyanma oranının kontrol grubunda GKD bulunan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde az olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Her iki grupta da, kalça eklem kapsülündeki ÖR boyanma oranı LCF'dekine göre anlamlı derecede düşüktü ($p < 0.01$).

Çıkarımlar: Ligamentum kapitis femoris ve kalça eklem kapsülünde yüksek oranda bulunan östrojen reseptörleri, GKD'nin etiolojisinde östrojenin etkisini destekler niteliktedir.

Anahtar sözcükler: Gelişimsel kalça displazisi; kalça eklem kapsülü; ligamentum kapitis femoris; östrojen reseptörü.

Gelişimsel kalça displazisi (GKD), çeşitli etkenlere bağlı olarak gelişebilen bir yenidoğan patolojisidir. Genetik kod ile belirlenen çeşitli çevresel ve biyomekanik faktörlerin etkisi ile embriyonik, fetal ve çocukluk dönemi boyunca kalça gelişimi devam eder.^[1-5] Günümüzde, GKD etiolojisine etki eden hormonal faktörlerle ilgili laboratuvar çalışmaları sınırlı sayıdadır.^[6] Doğum

anında kalça eklem kapsülü ve ligamentum kapitis femoris'teki (LCF) aşırı gevşeklik ilk dislokasyona yol açan en önemli yapısal bozukluktur.

Östrojenin bir çok dokunun yapısını etkilediği çalışmalarda gösterilmiştir.^[7,8] Hormon aktivitesi için hedef hücrelerde östrojen reseptör (ÖR) proteinleri bulun-

Yazışma adresi: Dr. Engin Eren Desteli, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı 55139 Kurupelit, Samsun.

Tel: 0532 - 226 71 53 e-posta: erendesteli@yahoo.co.uk

Başvuru tarihi: 01.11.2011 **Kabul tarihi:** 19.03.2013

©2013 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu
www.aott.org.tr adresinde
doi:10.3944/AOTT.2013.2772
Karekod (Quick Response Code):



malıdır.^[9] Östrojenin diğer dokularda gösterdiği etkinin benzerini kalça kapsülü ve ligamentum tereste de göstermesi oldukça olasıdır. GKD'nin etiolojisi ise kesin olarak ortaya konulamamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada GKD'nin gelişimindeki hormonal etkiyi araştırmak için kalça kapsülü ve ligamentum kapitis femoris (LCF) dokularında ÖR'lerin varlığını inceledik.

Gereç ve yöntem

Cerrahi öncesi hastanemiz bilimsel kurulunca onay ve hasta ailelerinden onam formu alındı. GKD'ye yönelik cerrahi girişim yapılan (medial veya anterolateral yaklaşımla açık redüksiyon, Salter osteotomisi) 15 hastadan ve 15 intrauterin ölü fetüsten LCF ve kalça eklem kapsülü biyopsileri alındı. Disloke kalçaların hepsi tek taraflı idi. Fetüslerin kalça eklemi muayenelerinde normal oldukları görüldü. Olguların cerrahi sırasındaki ortalama yaşı 10.3 (dağılım: 6-18) ay idi. Toplam 60 adet örnek önce GKD ve kontrol grubu olarak gruplandı. Daha sonra her iki grup ikiye ayrılarak LCF ve kalça eklem kapsülü grupları oluşturuldu. Tam kat 1x1 cm anterior kapsül ve LCF örnekleri biyopsi olarak alındı. Kalça displazisi nedeniyle ameliyat edilen bebeklerin tümünün cinsiyeti kız idi.

Ticari monoklonal östrojen reseptör antikoru Estrogen Receptor Ab-11 (Clone 1D5) MW:67kDa, (Fisher Scientific, Loughborough, Birleşik Krallık) pozitif ve negatif kontrollerde meme kanserine doku örneği ile kullanıldı. Negatif kontrollerde IgG1 immünooglobülin, anti-östrojen reseptör antikoru yerine kullanıldı. Tüm analizlere bir pozitif ve bir negatif kontrol örneği dahil edildi.

Doku kesitleri ksilen ile deparafinize edildikten sonra alkol ile ıslatıldı. Akabinde, örnekler 15 dakika süre ile Tris tamponlu salinde bırakıldı ve %0.1 Tween/fosfat tamponlu salin (pH: 7.4) ile yıkandı. Spesifik olmayan antikor bağlanmasının engellenmesi için oda ısısında 30 dakika non-immün serum uygulandı. Pozitif ve negatif kontrollü örnekler 16 saat boyunca oda sıcaklığında, nemli ortamda, ilgili primer antikorlar ile inkübe edildi. Sonrasında, sekonder antikor (LabVision; biyotinlenmiş keçi anti-polivalanı) ve streptavidin-biyotin peroksidaz kompleksi nemli ortamda ayrı ayrı tatbik edildi. Yüzde 0.024 hidrojen peroksidaz fosfat tamponlu salin (pH:7.4) içeren diaminobenzidin (DAB) tetrahidroklorür substratı uygulandı. Örnekler alkol ile dehidrate edildi ve lameller Entellan (Merck, Darmstadt, Almanya) ile kaplandı.

Östrojen reseptör boyanma derecesi 100 adet bağ dokusu hücresine oranlanarak saptandı. İstatistiksel analizlerde bağımsız ve eşleştirilmiş gruplar için t-testinden yararlanıldı. P değerinin 0.05'ten düşük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri-

lerin analizi SPSS for Windows v.11.5 programı ile yapıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD).

Bulgular

Tüm doku örneklerindeki bazı bağ dokusu hücre çekirdeklerinde ÖR boyanması pozitif olarak saptandı (Şekil 1 ve 2). Östrojen reseptörü pozitif boyanma değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre kontrol grubundaki LCF ve kalça kapsülü örneklerindeki ÖR boyanma oranı, GKD'li gruba göre anlamlı düzeyde düşük idi ($p<0.001$). Kontrol grubunda LCF dokusunda ÖR boyanma oranı 1.6 ± 0.2 iken, kalça kapsülünde bu oran 1.3 ± 0.2 olarak kaydedildi. GKD'li grupta ise LCF dokusunda ÖR boyanma oranı 2.5 ± 0.3 , kalça kapsülünde ise 2.0 ± 0.3 olarak bulundu. Her iki grupta da kalça kapsülündeki ÖR pozitif boyanma oranları LCF örneklerindeki boyanma oranlarına kıyasla anlamlı derecede düşük idi ($p<0.01$).

Tartışma

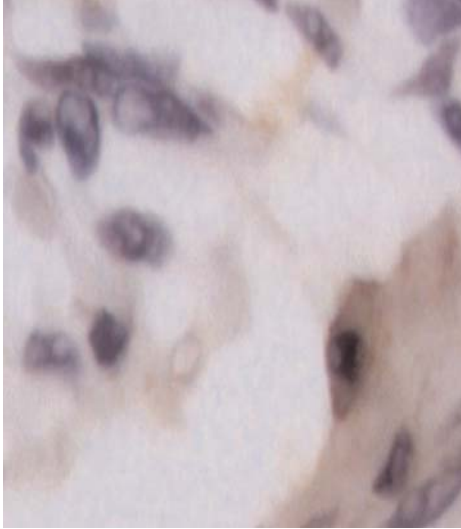
Maternal hormonların kalça kapsülü üzerindeki eklem gevşetici etkisi literatürde birçok yazar tarafından tanımlanmıştır.^[3,6,10] Önceki çalışmalar, kızlarda GKD'nin daha yüksek oranda görülmesini maternal hormonlara kız yenidoğanın tepkisinin daha fazla olması ile açıklamışlardır. Bununla birlikte, maternal hormonlar hem erkek hem kız fetüslerine etki etmektedir. Hormon aktivitesi etki ettiği dokudaki belli reseptörlerin saptanması ile kanıtlanabileceğinden, biz kalça eklemindeki ÖR varlığını araştırdık.

Hücre seviyesindeki hormon aktivitesi hormon ve ona özgü reseptörünün birleşmesi ile başlar. Östrojen reseptörü, sitoplazmada sentezlenen ve çekirdeğe gönderilen nükleer bir proteindir.^[8] Östrojen ve progesteronlar hücre içi reseptörlerine bağlandıktan sonra yapısal değişiklikleri başlatır.

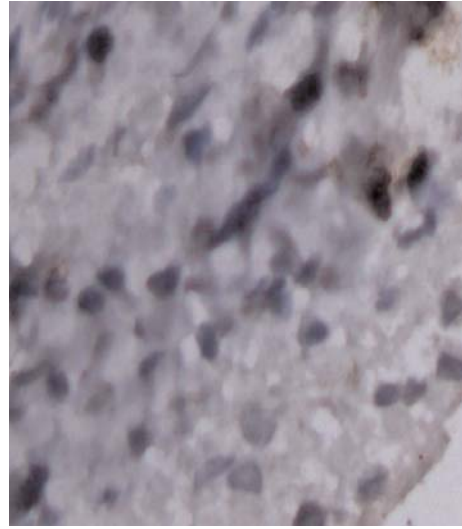
Kalıtıl bağ laksitesini Wynne-Davies, GKD'nin kalıtımındaki iki ana faktörden biri olarak açıklamıştır.^[4] Fetüste gelişen periferik eklem laksitesi, ikinci ve üçüncü trimesterlerde fetal dolaşıma katılan maternal hormonlara bağlanmıştır.^[3]

Östrojen, kollajen miktarına negatif etki eder. Bağ dokusunda gelişen relaksasyonun temel nedeninin bu etki olabileceğini düşünüyoruz. Literatürde östrojenin bağ dokusu üzerinde gevşetici etkisi gösterilmiştir.

Liu ve ark.'nın çalışmalarında, artan 17beta-östradiol seviyeleri ile kollajen sentezindeki azalmayı ve bunun da bayan atletlerde ön çapraz bağ yaralanması üzerindeki etkisi gösterilmiştir.^[7] Bir başka çalışmada, Akesson ve ark.,^[6] 17 beta-östradiol uygulanması ile periartiküler dokuda çözünür kollajen miktarının azaldığını göstermişlerdir. Yazarlar, aynı zamanda, zorlamayla immobili-



Şekil 1. Ligamentum capitis femorisin parafine gömümlü kesitlerinde östrojen reseptörünün yerleşimi. Reseptörler ligamanın bağlayıcı doku stromasının içindeki fibroblastların çekirdeklerinde gözlenmektedir. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]



Şekil 2. İnsan kalça kapsülünün parafine gömümlü kesitlerinde östrojen reseptörünün yerleşimi. Reseptörler kalça kapsülünün bağlayıcı doku stromasının içindeki fibroblastların çekirdeklerinde gözlenmektedir. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

Tablo 1. GKD ve kontrol grubundaki LCF ve kalça eklemlerinde ÖR pozitif boyanma oranları.

| | GKD grubu | Kontrol grubu | p değeri |
|----------------------|-----------|---------------|----------|
| LCF ÖR (%) | 2.5±0.3 | 1.6±0.2 | p<0.001 |
| Kalça kapsülü ÖR (%) | 2.0±0.3 | 1.3±0.2 | p<0.001 |
| p değeri | p<0.01 | p<0.01 | |

zasyon sonucu ortaya çıkan eklem kontraktürlerine bağlı hastalık ve yaralanmaların kısa dönem tedavisinde 17 beta-östradiol kullanımını önermektedirler.

Andren ve ark., GKD'si olan yenidoğanların konjuge östriol, konjuge östron ve 17beta-östradiol atılımlarını analiz etmiş ve GKD grubundakilerin atılım oranını kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır.^[10] Bir başka çalışmada ise, göbek bağından alınan kan örneğindeki 17beta-östradiol miktarı ve yenidoğan kalça instabilitesi arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve 17beta-östradiolün yüksek seviyelerinin kızlarda kalça instabilitesini artırdığı gösterilmiştir.^[11]

Nakamura ve ark., TGF-beta1'in sığır trabeküler ağ hücrelerinde doz bağımlı olarak kollajen kontraksiyonuna yol açtığını bildirmişlerdir.^[12] Bazı çalışmalar ise, östrojenin TGF-beta kaynaklı gen ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir.^[13] Östrojenin bu mekanizma ile TGF-beta'nın kollajen kontraksiyonunu artırıcı etkisini baskılaması, kalça çevresi dokularda kollajen kontraksiyonunu azaltarak gevşemeye neden oluyor olabilir.

Shynlova ve ark., sıçanların rahim dokusundaki Tip ve Tip 3 kollajen oranlarının gestasyonel değişikliklere bağlı olarak plazmadaki östrojen/progesteron seviyesi ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.^[14] Östrojen tatbiki, sıçan kalça eklem kapsülü, deri, aort ve kuyruk tendon dokularındaki toplam kollajen miktarını da azaltmaktadır.^[15-18]

İncelediğimiz tüm doku örneklerinde ÖR'ye rastlandı. Kontrol grubundaki LCF ve kalça kapsülü örneklerindeki ÖR'ler, GKD'li gruptakilere oranla anlamlı seviyede düşüktü. Bu sonuç, östrojenin reseptör sayısını artırıcı etkisine bağlanabilir. LCF örneklerindeki ÖR boyanma oranını kalça eklem kapsülü örneklerine göre daha fazla olması nedeniyle, LCF'nin östrojenden kalça eklem kapsülüne göre daha fazla etkilendiğini söyleyebiliriz. Reseptör oranları arasındaki bu fark, sadece kalça eklemi ile sınırlı olmayıp diğer eklemler için de geçerli olabilir. Bu nedenle, diğer dokular için de benzer reseptör çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Kontrol grubu ve GKD'li grubun yaş ortalamalarının farklı olması çalışmamızın bir dezavantajıdır. Bu durum reseptör oranlarını etkilemiş olabilir.

Sonuç olarak, LCF ve kalça eklem kapsülünde yüksek oranda bulunan ÖR'ler, GKD'nin etiyolojisinde östrojenin etkisini destekler niteliktedir.

Çıkar Örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

1. Carter CO, Wilkinson JA. Genetic and environmental factors in the etiology of congenital dislocation of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 1964;(33):119-28.
2. Dunn PM. Prenatal observation on the etiology of congenital dislocation of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 1976;(119):11-22.
3. Wilkinson JA. Prime factors in the etiology of congenital dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg Br* 1963;45:268-83.
4. Wynne-Davies R. Acetabular dysplasia and familial joint laxity: two etiological factors in congenital dislocation of the hip. A review of 589 patients and their families. *J Bone Joint Surg Br* 1970;52:704-16.
5. Suzuki S, Yamamuro T. Correlation of fetal posture and congenital dislocation of the hip. *Acta Orthop Scand* 1986;57:81-4.
6. Akeson WH, Woo SL, Amiel D, Doty DH, Rutherford L. Value of 17beta-oestradiol in prevention of contracture formation. *Ann Rheum Dis* 1975;35:429-36.
7. Liu SH, Al-Shaikh RA, Panossian V, Finerman GA, Lane JM. Estrogen affects the cellular metabolism of the anterior cruciate ligament. A potential explanation for female athletic injury. *Am J Sports Med* 1997;25:704-9.
8. Brenner RM, West NB, McClellan MC. Estrogen and progesterin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* 1990;42:11-9.
9. Aarskog D, Stoa KF, Thorsen T. Urinary oestrogen excretion in newborn infants with congenital dislocation of the hip joint. *Acta Paediatr Scand* 1966;55:394-7.
10. Andren L, Borglin NE. Disturbed urinary excretion pattern of oestrogens in newborns with congenital dislocation of the hip. 1. The excretion of oestrogen during the first few days of life. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1961;37:423-6.
11. Andersson JE, Vogel I, Ulbjerg N. Serum 17 beta-estradiol in newborn and neonatal hip instability. *J Pediatr Orthop* 2002;22:88-91.
12. Nakamura Y, Hirano S, Suzuki K, Seki K, Sagara T, Nishida T. Signaling mechanism of TGF- β 1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4331-6.
13. Diaz-Chavez J, Hernandez-Pando R, Lambert FP, Gariglio P. Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Mol Cancer* 2008;7:3.
14. Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille BL, Lye SJ. Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 2004;70:986-92.
15. Fischer GM, Swain ML. Effect of sex hormones on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and non-castrated male rats. *Am J Physiol* 1977;232:617-21.
16. Hama H, Yamamuro T, Takeda T. Experimental studies on connective tissue of the capsular ligament. Influences of aging and sex hormones. *Acta Orthop Scand* 1976;47:473-9.
17. Shikata J, Sanada H, Tamamuro T, Takeda T. Experimental studies of the elastic fiber of the capsular ligament: influence of aging and sex hormones on the hip joint capsule of rats. *Connect Tissue Res* 1979;7:21-7.
18. Yamamuro T, Hama H, Takeda T, Shikata J, Sanada H. Biomechanical and hormonal factors in the etiology of congenital dislocation of the hip joint. *Int Orthop* 1977;1:231-6.