



# Ooferektomi yapılmış sıçanlarda aralıklı yüksek doz östrojen tedavisinin kemik yapısı üzerine etkisi

## *The effects of early intermittent high-dose estrogen treatment on bone structure of ovariectomized rats*

Suna ÖMEROĞLU, <sup>1</sup> Deniz ERDOĞAN, <sup>1</sup> Gülnur TAKE, <sup>2</sup> Celal ILGAZ, <sup>1</sup> Müfide GÖRGÜN, <sup>1</sup> Neşe LORTLAR <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı;  
<sup>2</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Amaç:** Ooferektomiye bağlı kemik kaybını önlemede değişik östrojen tedavi yöntemlerinin etkileri daha önce sıçanlarda araştırılmıştır. Bu çalışmada, ooferektomi yapılmış sıçanlarda daha önce uygulanmamış olan erken dönem, aralıklı, yüksek doz östrojen tedavisinin kemik yapısı üzerine etkileri araştırıldı.

**Çalışma planı:** Erişkin, gebe olmayan 20 adet Wistar cinsi sıçana iki taraflı ooferektomi uygulandı. Ooferektomi sonrası 15. ve 22. günlerde, deney grubuna 25 mg/kg dozunda 17 $\beta$ -estradiol subkutan olarak uygulanırken, kontrol grubuna yalnızca susam yağı uygulandı. Son enjeksiyondan 14 gün sonra sıçanlar öldürüldü ve proksimal femurlarının ışık ve elektron mikroskopik incelemesi yapıldı.

**Sonuçlar:** Kontrol grubu sıçanların ışık mikroskopisi incelemesinde proksimal femurlarında spongiyöz kemik yapısında belirgin hasarlanma gözlenirken, deney grubunda spongiyöz kemik yapısı hemen hemen tümüyle normal idi. İnce yapı düzeyindeki incelemede ise, kontrol grubunda kemik hücrelerinde dejenerasyon ve artmış kemik döngüsü belirgindi; deney grubunda ise kemik hücreleri ve kemik matriksi normal bulundu. Kontrol grubu (62 $\pm$ 16 pg/ml) ve deney grubu (580 $\pm$ 124 pg/ml) serum östrojen düzeyleri arasında anlamlı fark vardı (p<0.001).

**Çıkarımlar:** Aralıklı yüksek doz östrojen tedavisi ooferektomi yapılmış sıçanların proksimal femurlarında spongiyöz kemik kaybını kemik döngüsünü baskılayarak önlemede ve serum östrojen düzeyini artırmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Kemik gelişimi/ilâç etkisi; kemik hastalıkları, metabolik/önleme ve kontrol; kemik rezorpsiyonu/ilâç etkisi; estradiol/terapötik kullanım; östrojen replasman tedavisi; osteoporoz, postmenopozal/komplikasyon/ilâç tedavisi; ovariektomi; sıçan.

**Objectives:** The effects of various estrogen replacement protocols to prevent bone loss following ovariectomy have been the subject of many studies in rats. This study was designed to determine the effects of early intermittent high-dose estrogen replacement therapy, which has hitherto not been studied, on bone structure of ovariectomized rats.

**Methods:** Bilateral ovariectomies were performed in 20 female mature non-pregnant Wistar rats. All the animals were randomly assigned to two groups to receive either subcutaneous 17 $\beta$ -estradiol (25 mg/kg) or only sesame oil on days 15 and 22 after ovariectomy. Fourteen days after the last injection, the rats were sacrificed and proximal femurs were removed for both light and electron microscopic analyses.

**Results:** In the light microscopic analysis, control femurs exhibited a marked destruction in the structure of the cancellous bone, whereas estradiol-treated rats had almost normal cancellous bone. Ultrastructural analysis showed degeneration and increased turnover in bone cells of the control femurs, whereas the bone cells and the bone matrix appeared almost normal in the treatment group. A statistically significant increase in serum estrogen levels was found in estradiol-treated rats (580 $\pm$ 124 pg/ml versus 62 $\pm$ 16 pg/ml, p<0.001).

**Conclusion:** Intermittent high-dose estrogen treatment prevents cancellous bone loss in the proximal femurs of ovariectomized rats through inhibition of bone turnover and results in significantly increased serum estrogen levels.

**Key words:** Bone development/drug effects; bone diseases, metabolic/prevention & control; bone resorption/drug effects; estradiol/therapeutic use; estrogen replacement therapy; osteoporosis, postmenopausal/complications/drug therapy; ovariectomy; rats.

**Yazışma adresi:** Dr. Suna Ömeroğlu, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 06500 Beşevler, Ankara.  
Tel: 0312 - 214 10 00 / 6926 Faks: 0312 - 212 46 47 e-posta:homerglu@superonline.com

**Başvuru tarihi:** 09.12.2002 **Kabul tarihi:** 25.09.2003

Osteoporoz, toplam kemik doku kitlesinde, kemik içeriğinde bozulma olmaksızın azalma, fizyopatolojik olarak kemik yapım ve yıkım dengesinin yıkım lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Osteoporozun en iyi bilinen nedenlerinden biri de over fonksiyonlarının çeşitli nedenlerle kaybına bağlı ortaya çıkan östrojen eksikliğidir. Östrojen eksikliğinde, yerine koyma tedavisi en sık kullanılan tedavi yöntemidir.<sup>[1,2]</sup> Ooferektomi uygulanmış sıçan modeli, osteoporoz tedavisinde östrojenin etkilerini görmek amacıyla en sık kullanılan hayvan modelidir. Bunun nedeni, sıçanda ooferektomi sonrası uyarılan kemik dokusu kaybıyla ilgili biyolojik mekanizmaların, insandaki postmenopozal kemik kaybı mekanizmaları ile yakın benzerlikler göstermesidir.<sup>[3,4]</sup>

Çeşitli çalışmalarda, ooferektomi yapılan sıçanlarda 12 ile 360 gün arasında değişen sürelerde ve günlük 1 µg/kg ile 4 mg/kg arasında değişen dozlarda 17 -estradiolün subkutan uygulamanının kemik kaybını önlemede ya da kemik oluşumunu hızlandırmada olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.<sup>[5-11]</sup> Ancak günlük olarak değil de aralıklı, yüksek doz östrojen tedavisinin etkinliği üzerine bir çalışmaya rastlamadık. Osteoporoz tedavisinde kullanılan bazı ilaçların günlük kullanımıyla haftalık tek doz kullanımını arasında, toplam haftalık doz aynı olduğunda klinik olarak fark olmadığı ve hasta uyumunun daha iyi olduğu gösterilmiştir.<sup>[12]</sup> Östrojenin tedavi dozunun günlük değil de, osteoporoz tedavisinde kullanılan bu ilaçlar gibi haftada bir kez, ancak yüksek dozda kullanımının daha kolay uygulanabilir olduğu düşüncesinden hareketle bu kontrollü çalışmayı planladık ve erken dönem aralıklı, yüksek doz östrojen tedavisinin kemik yapısı üzerine etkisini sıçan modelinde inceledik.

## Gereç ve yöntem

Çalışmaya yerel etik kurulu onayı alındıktan sonra başlandı. Yaklaşık 12 haftalık, ortalama 200 gr ağırlığında olan ve gebe olmayan 20 adet Wistar tipi dişi sıçan kontrol ve deney grubu olarak rastgele ikiye ayrıldı. Tüm sıçanlara 50 mg/kg intramusküler ketamin hidroklorid (Ketalar , Eczacıbaşı Warner Lambert, İstanbul) anestezisi altında iki taraflı ventral ooferektomi yapıldı. Ooferektomi sonrasında tüm sıçanlar 25 °C sıcaklıkta ayrı olarak kafese kondu ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde bırakıldı. Ooferektomi yapılmış sıçanlarda ooferek-

tomiye bağlı hiperfaji nedeniyle oluşabilen kilo artışını önlemek için gıda alımında kısıtlamaya gidildi.<sup>[13]</sup> Ooferektomi sonrası 15. ve 22. günlerde, deney grubu sıçanlarına ilk ağırlıkları göz önünde bulundularak susam yağında çözünmüş 25 mg/kg 17 -estradiol (Sigma Chemical Co., Steinheim, Almanya) subkutan olarak uygulanırken, kontrol grubu sıçanlarına ise subkutan olarak sadece susam yağı uygulandı. Kontrol grubundan üç, deney grubundan ise bir sıçan izlemler sırasında öldüler. Son enjeksiyondan 14 gün sonra sıçanların tümü öldürülerek, doku örnekleri ve serum östrojen düzeylerini ölçmek amacıyla kan örnekleri alındı.

Tüm sıçanların sağ proksimal femurları ışık mikroskopi incelemesi için çıkarıldı; her iki gruptan üçer sıçanın sol proksimal femurları da elektron mikroskopi incelemesi için çıkarıldı. Çıkarılan sağ proksimal femurlar 72 saat süreyle %10'luk formalin solüsyonunda bekletildikten sonra %10'luk nitrik asit ile dekalsifiye edildi ve rutin ışık mikroskopik işlemler sonrası parafin bloklara gömüldü. Alınan ince kesitler (5 µm) hematoksilin-eosin (H-E) ile boyanarak Olympus BH2 fotomikroskopta incelendi. Çıkarılan sol proksimal femurlar ise 24 saat süreyle fosfat tamponlu glüteraldehit solüsyonunda bekletildikten sonra %10'luk nitrik asit ile dekalsifiye edildi. Örnekler daha sonra 1x1x1 mm büyüklüğünde parçalara bölünerek %1'lik osmium tetroksid ile ikinci kez tespit edildi. Etil alkol serilerinde dehidrate edildikten sonra Araldit-DDSA karışımına gömüldü. İnce kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyanarak elektron mikroskopta incelendi (Carl Zeiss EM-900).

Işık ya da elektron mikroskopik incelemeler sırasında somut sayısal ölçümler yapılmadı. Kontrol ve deney gruplarının ortalama serum östrojen düzeylerinin karşılaştırılmasında bağımsız örnekler için t-testi kullanıldı ve 0.05'den küçük *p* değerleri anlamlı kabul edildi.

## Sonuçlar

Işık mikroskopi kesitlerinde, kontrol grubu sıçanların femur proksimalindeki spongiyöz kemiğin yapısında belirgin bir bozulma ve kemik kaybına bağlı büyük boşlukların varlığı dikkat çekmekteydi (Şekil 1a). Deney grubu sıçanlarının tümünde, femur proksimalindeki spongiyöz kemik yapının hemen hemen tümüyle normal olduğu gözlemlendi (Şekil 1b). Kontrol grubu sıçanlarının proksimal femurlarının ince yapı düzeyinde

incelenmesinde ise, kemik hücrelerinde belirgin dejenerasyon ve artmış kemik döngüsü (bone turnover) en belirgin değişikliklerdi (Şekil 2a, b). Deney grubunda ise kemik hücreleri ve kemik matriksi normal olarak değerlendirildi (Şekil 3).

Kontrol ve deney gruplarında serum östrojen düzeyleri ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla  $62 \pm 16$  pg/ml ve  $580 \pm 124$  pg/ml;  $p < 0.001$ ).

### Tartışma

Sıçanlarda oofektomi sonrası en yoğun kemik kaybı ilk 100 gün içinde ortaya çıkmaktadır ve hatta ilk iki hafta içinde bile saptanabilmektedir.<sup>[14]</sup> Bu yüzden, östrojen ile yerine koyma tedavisinin başlangıcı için oofektomi sonrası ikinci haftanın sonu uygun zaman dilimi olarak görülmektedir. Sıçan modelinde oofektomi sonrası kemik kaybının önlenmesinde bazı hormonların ya da ilaçların etkisini gözlemek için östrojenin hemen oofektomi sonrası başlanması önerilmiştir.<sup>[13]</sup> Bu tedavi yöntemi daha önce pek çok çalışmada da uygulanmıştır.<sup>[5-7,9,11]</sup> Ancak bu tür uygulamanın bir hormonun ya da ilacın sadece koruyucu rolünü ortaya koyacağı açıktır. Bu çalışmanın amacı, aralıklı yüksek doz östrojen uygulamasının tedavi edici rolünü saptamak olduğu için, deney grubu sıçanlarında östrojen uygulamasına oofektomiden hemen sonra değil, iki hafta sonra başlanmıştır.

Farklı dozlarda ve sürelerde östrojen uygulamasının osteoporoz tedavisindeki rolü oofektomi yapılmış sıçan modelinde araştırılmıştır.<sup>[5-11]</sup> Bir çalışmada dişi sıçanlara 17 gün süreyle günlük 4 mg/kg 17 -estradiol uygulanmıştır.<sup>[9]</sup> Çalışmamızda haftalık toplam doz belirtilen çalışmayla benzerlik göstermekle birlikte, haftalık toplam doz her gün yerine haftada bir kez uygulanmıştır.

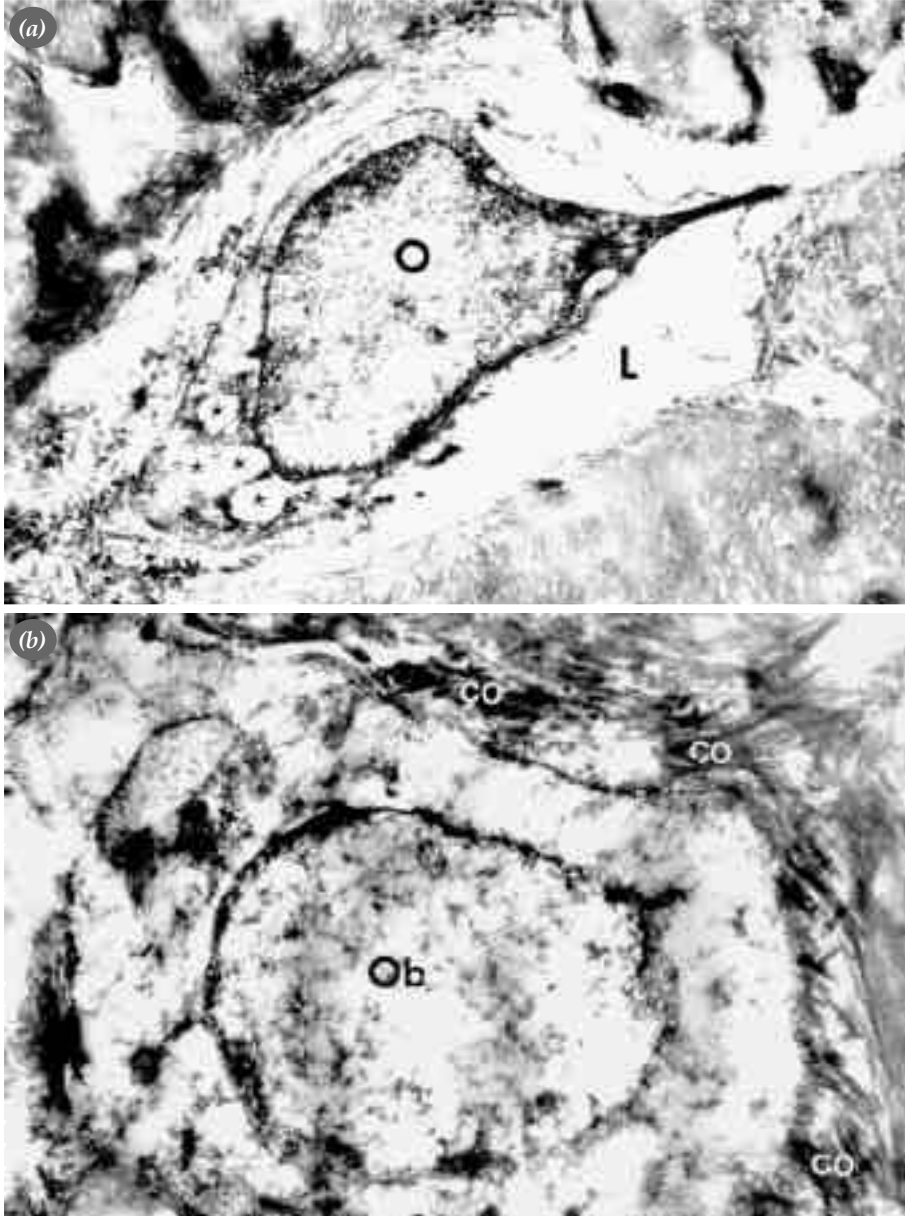
Oofektomi sıçanlarda hem kemik yıkımını hem de yapımını artırmakta, ancak yıkım yapımı geçtiği için kemik kitlesinde daha fazla azalma olmaktadır.<sup>[15]</sup> Sıçanlarda oofektomi sonrası erken ve geç dönemde osteoporoz oluşumu ile artmış kemik döngüsü arasında yakın bir ilişki saptanmıştır.<sup>[14]</sup> Çalışmamızda da kontrol grubu sıçanlarında erken dönemde kemik dokusunda gözlenen yapısal düzeydeki hasaralanmalar ve kemik döngüsündeki yoğun artış bu saptamayı destekler niteliktedir. Kısa ya da uzun süreli östrojen tedavisinin oofektomi sonrası görülen osteoporozu, kemik döngüsünü baskılayarak önlediği ve spongiyöz kemik kaybını neredeyse tümüyle ortadan kaldırdığı belirtilmiştir.<sup>[10,11,16]</sup> Çalışmamızda, oofektomi sonrası erken dönemde sadece iki kez uygulanan aralıklı yüksek doz östrojen tedavisinin bile sıçan proksimal femurunda hem hücre dejenerasyonunu hem de hücredeki yapım-yıkım olayını eş zamanlı olarak baskıladığı ve spongiyöz kemik yapısını koruduğu ortaya



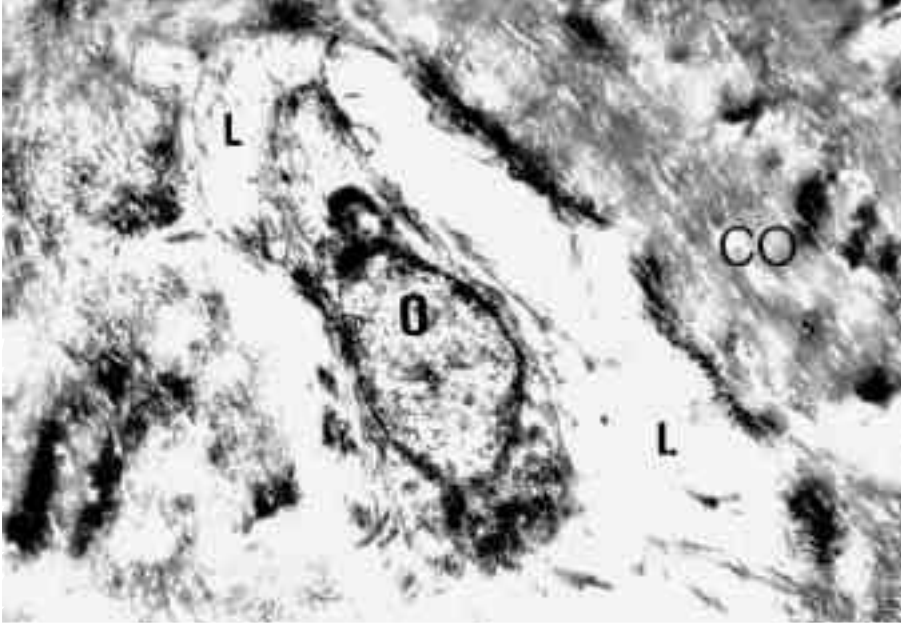
**Şekil 1.** Proksimal femurun ışık mikroskop görüntüleri. **(a)** Kontrol grubu sıçanlarında femur proksimalinde spongiyöz kemik yapısının neredeyse tümüyle hasarlandığı ve yer yer büyük boşlukların olduğu gözleniyor (H-E x 200). **(b)** Deney grubu sıçanlarında ise spongiyöz kemik yapısının korunduğu dikkat çekiyor (H-E x 200).

konmuştur. Bununla birlikte, 17 gün süreyle günlük yüksek doz 17 -estradiol uygulamasının (4 mg/kg) spongiyöz kemik oluşumunu uyardığı bildirilmiştir.<sup>[6]</sup> Çalışmamızdaki doz uygulamasının da benzer etkisi olabileceği düşünülmekle birlikte, kemik oluşumu ölçümü somut olarak yapılmadığı için bu konuda kesin bir yorumda bulunmak doğru olmayacaktır.

Çalışmamızda, ooferektomi yapılmış olan sıçanlarda aralıklı, yüksek doz östrojen verilmesinin yapısal değişiklikler yanında serum östrojen düzeylerini de erken dönemde hızla artırdığı gözlenmiştir. On yedi gün süreyle günlük 4 mg/kg dozunda uygulanan 17 -estradiolün serum östrojen düzeyini 17.5 nM/L'ye yükselttiği belirtilmiştir.<sup>[6]</sup> Yine ooferektomi yapılmış sıçanlarda beş hafta süreyle



**Şekil 2.** Kontrol grubu sıçanlarında ince yapı düzeyinde inceleme. **(a)** Lakuna (L) içinde yerleşik osteositin (O) ince yapı görünümü. Sitoplazmada hücre dejenerasyonunu simgeleyen vakuolizasyon (\*) belirgin bir biçimde gözleniyor (Kurşun sitrat, uranil asetat x 6000). **(b)** Bir osteoblastın (Ob) ince yapısı. Aşırı derecede artmış olan yeni kollajen fibrillerin varlığı (co) artmış kemik döngüsünü simgeliyor (Kurşun sitrat, uranil asetat x 12000).



**Şekil 3.** Deney grubu sıçanlarında ince yapı düzeyinde inceleme. Lakunada (L) yerleşik bir osteositin (O) ince yapısı. Hücre dejenerasyonunun olmadığı ve kollajen fibrillerin (co) düzenli seyrettiği görülüyor (Kürşün sitrat, uranil asetat x 3000).

günlük 10, 25 ve 50 µg/kg dozlarında uygulanan 17-estradiolün, serum östrojenini sırasıyla 40, 38 ve 106 pg/ml düzeylerine çıkardığı saptanmıştır.<sup>[16]</sup> Bu çalışmada deney grubu sıçanlarında öldürülmeden hemen önce saptanan ortalama serum östrojen düzeyi yaklaşık 600 pg/ml idi; bu düzey kontrol grubundaki sıçanlara göre yaklaşık 10 kat daha yüksekti.

Uyguladığımız östrojen tedavi yönteminin etkisinin, diğer östrojen tedavi yöntemleri ve tümüyle normal grup (oofektomi yapılmamış) ile karşılaştırılmaması bu çalışmanın eksikliği olarak algılanabilir. İleride yapılacak olan çalışmalarda bu tür karşılaştırmaların da yapılmasına gereksinim olduğu görülmektedir. Ayrıca, çalışmamızda gerek ışık gerekse elektron mikroskop bulguları sadece görsel olarak değerlendirilmiştir. Bu tür çalışmalarda, yapısal düzeydeki bulguların sayısal olarak da değerlendirilmesinin elde edilen verileri daha da güçlendireceği açıktır.

Klinik uygulamada postmenopozal osteoporoz tedavisinde, erken dönem aralıklı yüksek doz östrojen uygulamasını yararlı olabilir. Özellikle, uygulamanın günlük kullanıma göre daha kolay olması bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Ancak bu tür doz uygulamalarının, daha yüksek hayvan modellerinde

deneysel araştırılması yapılmadan, olası yan etkileri ortaya konmadan ve en son olarak da klinik karşılaştırmalı çalışmalar olmadan günlük uygulamaya geçirilmesi doğru değildir.

Sonuç olarak, sıçanlarda oofektomi sonrası erken dönemde uygulanan aralıklı, yüksek doz östrojen tedavisi proksimal femurda spongiyöz kemik kaybını esas olarak kemik döngüsünü baskılayarak önlemektedir. Ayrıca bu tür uygulama serum östrojen düzeyini de önemli ölçüde yükseltmektedir.

### Kaynaklar

1. Atik OŞ. Osteoporoz. Ankara: Meteksan A.Ş.; 1998.
2. Nevitt MC. Epidemiology of osteoporosis. Rheum Dis Clin North Am 1994;20:535-59.
3. Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. Bone Miner 1992;18:227-36.
4. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 1991;15:175-91.
5. Chow JW, Lean JM, Chambers TJ. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. Endocrinology 1992;130:3025-32.
6. da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17 beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. Braz J Med Biol Res 2001;34: 1015-22.
7. Kalu DN, Salerno E, Liu CC, Echon R, Ray M, Garza M, et al. A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. Bone Miner 1991;15:109-23.

8. Schmidt IU, Wakley GK, Turner RT. Effects of estrogen and progesterone on tibia histomorphometry in growing rats. *Calcif Tissue Int* 2000;67:47-52.
9. Tobias JH, Chow J, Colston KW, Chambers TJ. High concentrations of 17 beta-estradiol stimulate trabecular bone formation in adult female rats. *Endocrinology* 1991;128:408-12.
10. Turner RT, Evans GL, Wakley GK. Mechanism of action of estrogen on cancellous bone balance in tibiae of ovariectomized growing rats: inhibition of indices of formation and resorption. *J Bone Miner Res* 1993;8:359-66.
11. Wronski TJ, Yen CF, Scott KS. Estrogen and diphosphonate treatment provide long-term protection against osteopenia in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1991;6:387-94.
12. Rizzoli R, Greenspan SL, Bone G 3rd, Schnitzer TJ, Watts NB, Adami S, et al. Two-year results of once-weekly administration of alendronate 70 mg for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2002;17:1988-96.
13. Kimmel DB, Moran EL, Bogoch ER. Animal models of osteopenia or osteoporosis. In: An YH, Friedman RJ, editors. *Animal models in orthopaedic research*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 279-305.
14. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 1989;45:360-6.
15. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985;37:324-8.
16. Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1988;123:681-6.