

RATLARDA DIETHYLSTILBESTROLÜN EPİFİZ PLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ*

Dr.Birol Gülman**, Dr.Değer Şahin***, Dr.Filiz Karagöz****

ÖZET

Prenatal diethylstilbestrol (DES) kullanımının, epifiz plakları üzerine etkilerini araştırmak amacı ile; 8 dişi, 8 erkek sıçana doğduğu günden başlayarak 5 gün, günde 5 mikrogram DES cilt altına injekte edildi. Diğer 8 dişi ve 8 erkek sıçan kontrol grubu olarak takip edildi. 3.ay sonunda, femur alt uç ve tibia üst uç epifiz plaklarının genişlikleri ölçüldü ve histolojik değişiklikler değerlendirildi.

Histolojik incelemelerde; DES injeksiyonu yapılan grupta, epifiz plaklarında kıkırdak proliferasyonu azalmış, kıkırdak matürasyonu ve kalsifikasyonu artmış olarak bulundu. DES verilen sıçanlarda, epifiz plağı genişlikleri ölçümlerinde belirgin daralma vardı ($p < 0.05$, $p < 0.001$).

Bu çalışma sonuçları, prenatal DES kullanımının, epifiz plaklarının erken kapanmasına neden olarak uzunluğuna büyümesini inhibe edebileceğini gösterdi.

* Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Ortopedi ve Travmatoloji - Patoloji Anabilim Dalı çalışmalarından.

** Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Doçenti.

*** Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi.

**** Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Patoloji Anabilim Dalı Yardımcı Doçenti.

SUMMARY

THE EFFECTS OF DIETHYLSTILBESTROL ON EPIPHYSEAL PLATES IN THE RATS

In order to investigate the effects of prenatal diethylstilbestrol (DES) administration on epiphyseal plates, 5 µg/day DES injected subcutaneously to 8 female and 8 male rats for 5 days beginning the day of birth. The other 8 female and 8 male rats were followed to be control group. At the end of the 3 th month, the widenings of the lower femoral and upper tibial epiphyseal plates were measured and histological changes were evaluated.

In histologic examinations, the cartilage proliferation in epiphyseal plates were found to be decreased and the cartilage maturation and calcification were found to be increased in DES injected group. There were significant narrowing, in the measurements of the epiphyseal plate widenings, in the DES injected rats ($p < 0.05$, $p < 0.001$).

The results of this study revealed that the prenatal DES administration can be cause longitudinal bone growth inhibition by early epiphyseal plate closing.

Key words : Diethylstilbestrol, epiphyseal plate.
Anahtar kelimeler: Diethylstilbestrol, epifiz plağı.

Östrojen ve östrojen benzeri etki gösteren sentetik maddeler günümüzde endojen östrojenin etkisini taklit etmek yada pekiştirmek, eksilmiş olan hormonu yerine koymak, hormonal düzeydeki dengesizliği gidermek ve aile planlaması amacı ile geniş bir kullanım alanı bulmaktadır¹. Östrojenin bu kadar yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanması, istenmeyen etkileri de beraberinde getirmiş, hemen tüm sistemler üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir¹⁻⁴.

Her ne kadar östrojenin asıl görevleri, genital organların ve sekonder seks karakterlerinin belirlenmesi ise de bu hormonun iskelet sistemi üzerinde; protein anabolik etkisi ile kemik yapımını uyarıcı, epifiz plaklarını uyarak kemik uzunlamasına büyümesini artırıcı fakat epifizio-diyafiziyel kapanmayı süratlendirici etkileri bilinmektedir^{1,5,6}.

Nonsteroid sentetik bir östrojen olan diethylstilbestrol (DES), 1970'li yıllara kadar, oldukça geniş ölçüde kullanılmış ve gelişim periyodunda bu ilacın; ürogenital defektlere, vaginal epiteliyal tümörlere ve infertiliteye yol açacak fonksiyonel bozukluklara neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir⁷⁻⁹.

Konu ile ilgili literatür incelendiğinde, DES'ün prenatal kullanımının, araştırmalarda daha çok ürogenital sistem üzerinde yoğunlaştığı görüldü. Bu çalışmada ise DES'ün gelişmekte olan kemikte epifiz plaklarına olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak, ağırlıkları 180-200 gr arasında değişen Swiss-Albino cinsi 5 aylık 4 adet dişi, 4 adet erkek sıçan seçildi. Bu sıçanlar bir ay süre ile yem sanayi tarafından hazırlanan normal diyet ile beslenerek sağlık ve davranışları yönünden gözlem altında tutuldular. Sıçanların çiftleşmesi ve gebelikleri sağlandıktan sonra 4 dişi sıçan ayrı kafeslere alındı. Sıçanların gebelikleri sona erdiğinde toplam 38 yavru elde edildi. Yavruların 6 tanesi çeşitli nedenlerle ilk 24 saat içinde öldüler. Geri kalan 32 yavru her anneye 8 yavru düşecek şekilde dağıtıldı. 32 yavrunun 16'sı dişi, 16'sı erkek olarak tesbit edildi ve bunlar da 8'i deney, 8'i kontrol olmak üzere alt gruplara ayrıldı.

Deney grubunda kullanılmak üzere Estrogenin ampul (IE.Kimyaevi A.Ş.) preparatı seçildi. Bu ampullerde 1 cc sıvı yağ içerisinde 5 mikrogram DES bulunmaktaydı. Ampuller 0.1 mililitrede 5 mikrogram negatif madde içerecek şekilde steril zeytinyağı ile seyreltilerek injeksiyon için hazırlandı.

Deney grubundaki 8 dişi, 8 erkek sıçanlara ilki doğumu takip eden ilk 24 saat içinde olmak üzere 5 gün süre ile günde bir kez, 5 mikrogram aktif DES içeren 0.1 mililitre solusyon subkutan olarak injekte edildi. Kontrol grubu oluşturan neonatal dönemdeki 8 dişi, 8 erkek sıçana ise aktif madde içermeyen steril zeytinyağı 0.1 mililitre subkutan olarak aynı sürede ve aynı şekilde uygulandı.

Denekler ergenlik dönemlerine ulaşmaları için 3 aylık süre beklendi. 3 ay dolduğunda deney ve kontrol gruplarındaki sıçanlar yoğun eter buharı ile öldürüldü.

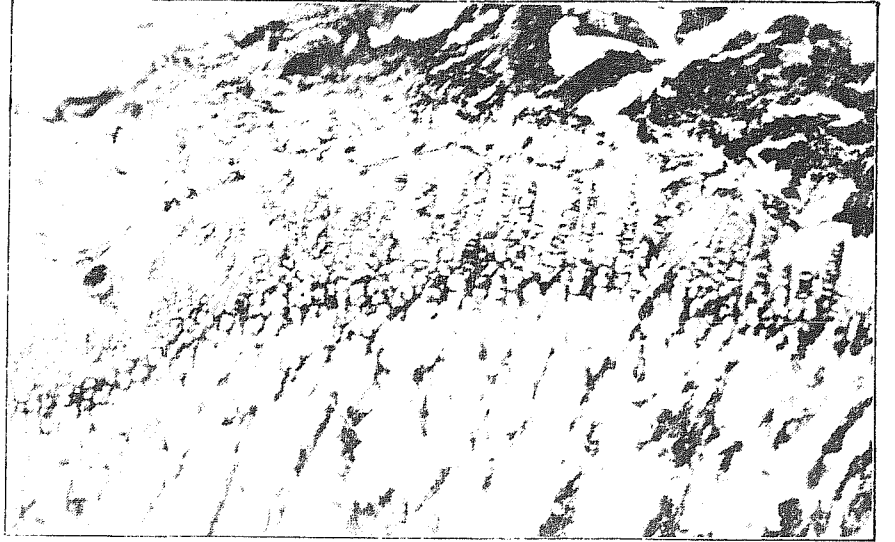
Uygulanan otopside; her iki diz eklemleri, femur alt uç ve tibia

üst uç epifiz plaklarını içine alacak şekilde çıkartıldı. Histolojik inceleme için doku örnekleri; formol-nitrik asit solüsyonunda tesbit ve dekalsifiye edildi. Büyüme plaklarından alınan örnekler rutin takipten sonra Hematoxylin eosin ile boyandı ve ışık mikroskopu seviyesinde incelendi. Epifiz plaklarının kalınlıkları, mikroskopun ölçüm ve sayım parçası ile (VEB Carl Zeiss Jena) X 150 büyütme ile yapıldı. Her bir doku örneğinde, epifiz plağının proliferatif zon üst ucu ile metafiz arasında 5 ölçüm yapıldı ve ortalama değerler bulunarak ölçüm sonucu saptandı.

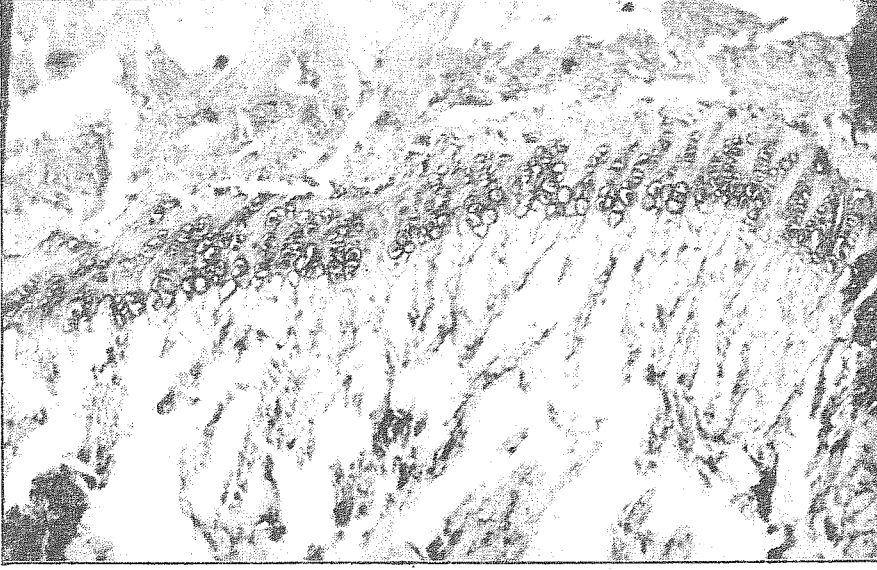
BULGULAR

Deney ve kontrol grubunda bulunan sıçanlar tüm deney süresince gelişim ve davranışları yönünden incelendi. Deney grubundaki sıçanların, kontrol grubundakilere göre çok farklı olmamakla beraber aktivitelerinin daha az ve gelişimlerinin daha yavaş olduğu gözlemlendi.

Kontrol grubu oluşturan 8 dişi ve 8 erkek sıçanın 16 femur alt uç epifiz plağı ve 16 tibia üst uç epifiz plağı ve DES injeksiyonu yapılan deney grubundaki, 8 dişi, 8 erkek sıçanın 16 femur alt uç ve 16 tibia üst uç epifiz plağı histolojik olarak incelenerek, her iki gruptaki bulgular karşılaştırıldığında; deney grubundaki epifiz plaklarında, proliferatif zonda kolonlar yapan kırık hücre sayısında azalma ve kırık matürasyonu ve kalsifikasyonunda artma olduğu görüldü (Resim 1a, b).



Resim 1a. Kontrol grubundan bir olguda femur alt uç epifiz plağının histolojik görünümü (HE X 40).



Resim 1b. DES injeksiyonu yapılan gruptaki bir olguda femur alt uç epifiz plağının histolojik görünümü (HE X 40). Kontrol ile deney grupları karşılaştırıldığında; proliferatif zonda hücre sayısında azalma ve epifiz plağı yüksekliğinde azalma histolojik olarak görülmektedir.

Epifiz plaklarının kalınlık ölçümleri yapıldığında; hem dişi hem de erkek sıçanlarda, femur alt uç ve tibia üst uç kalınlıklarının deney grubunda belirgin azalma gösterdiği ve kontrol ve deney gruplarındaki ölçümler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı derecede olduğu saptandı (Tablo I, II).

Tablo I. Femur alt uç epifiz plağı kalınlıklarının karşılaştırılması.

Cins	Kontrol	Deney	t	p
Dişi	245.63±10.82 µ	192.81±7.27 µ	4.05	<0.001
Erkek	233.75±6.41 µ	176.08±7.45 µ	5.88	<0.001

Tablo II. Tibia üst uç epifiz plağı kalınlıklarının karşılaştırılması.

Cins	Kontrol	Deney	t	p
Dişi	215.76±8.43 µ	190.00±7.56µ	2.35	< 0.05
Erkek	204.20±7.41 µ	175.61±7.63µ	2.69	< 0.05

TARTIŞMA

Genital farklılaşma insanlarda prenatal dönemde oluşurken sıçanlarda neonatal dönemde gelişmektedir¹⁰. Bu nedenle farelerin neonatal tedavisi, insanlardaki prenatal ilaç etkilerini gösteren bir model olarak bu konuda yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır^{10,11}. Bu çalışmada da DES'ün epifiz plakları üzerine etkileri aynı yöntem ile araştırıldı.

Kemiğin uzunluğuna büyümesinin, genetik, metabolik, endokrin ve beslenme gibi birçok faktör tarafından etkilendiği bilinmektedir⁶. Çalışmamızda, 5 aylık 4 dişi, 4 erkek sıçanın çiftleşmesinden elde edilen 32 yavru sıçan kullanılarak ve aynı besinler verilerek, denekler arasında farklılık olmaması amaçlandı.

Yüksek doz östrojenin sıçanlarda cüceliğe neden olduğu ilk defa 1936'da Zodek¹², tarafından gösterilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, östrojen tedavisi ile kemik uzunluğuna büyümesinin inhibe olduğunu göstermiş ve östrojenin bu etkisini, büyüme hormonunun (GH) periferal etkisini antagonize ederek yaptığı görüşü ileri sürülmüştür¹³⁻¹⁵.

Bu çalışmada, nonsteroid sentetik bir östrojen olan DES injeksiyonu yapılan dişi ve erkek sıçanlarda epifiz plaklarının histolojik incelemesinde, proliferatif zondaki kıkırdak kordonlarının kontrol gruba göre kısa olması, büyümeyi inhibe ettiğini düşündürdü. Epifiz plağı genişlikleri ölçümlerinde, DES kullanılan grupta elde edilen değerlerin kontrol gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunması histolojik bulguları destekledi. Bu bulgular konu ile ilgili literatür verileri ile uyumlu bulundu.

12. hafta sonunda, deney grubundaki sıçanların gelişmelerinin kontrol gruptaki sıçanlardan geri olduğu gözlemlendi. Bu gelişim geriliğinin, sadece kemik büyümesindeki gerilikle değil, Liu ve

ark.¹⁶, tarafından ileri sürülen; östrojen etkisi ile, diyet alımında azalma veya somatotropik hormon salgılanmasında ortaya çıkan düşüklük sonucu olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, prenatal DES kullanımının bilinen, ürogenital defektlere, vaginal epiteliyal tümörlere ve infertiliteye neden olması yanında, gelişmekte olan kemikte epifiz plağını inhibe edici etkisi olduğu kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Kayaalp O. **Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.** Ulucan Matbaası, Ankara, 2386-2408, 1986.
2. Reynolds JEF. **Martindale the extra pharmacopoeia.** The pharmaceutical press, London, 1433-1435, 1982.
3. Robbins SL, Angell M, Kumar V. **Enviromental disease in: Basic pathology.** WB Saunders Company, Philadelphia, 234-253, 1981.
4. Gordan GS. Estrogen and bone. **Orthop Clin** 200: 174-180, 1985.
5. Gündüz M. **Fizyopatoloji.** Ege Üni. Matbaası, Bornova-İzmir, 190-226, 1977.
6. Ege R. Dr.Samuel L. Turek. **Ortopedi ilkeleri ve uygulamaları.** Yargıçoğlu Matbaası, Ankara, 118-119, 1980.
7. Robboy SJ, Young RH, Herbst A. **Vaginal and cervical abnormalities related to prenatal exposure to diethylstilbestrol in: Pathology of the female genital tract.** Blaustein A, Springer Verlag, New York, 87-101, 1977.
8. Henry EC, Miller RK, Baggs RB. Direct fetal injections of diethylstilbestrol and 17 B- Estrodiol: A method for investigating their teratogenicity. **Teratology** 29: 297-304, 1984.
9. Baggs RB, Miller RK. Induction of urogenital malformation by diethylstilbestrol in the ferret. **Teratology**, 27: 28A, 1983.
10. Forsberg JG. Late effects in the vaginal and cervical epithelia after injections of diethylstilbestrol in to neonatal mice. **Am J Obstet Gynecol** 1:101-104, 1975.

11. Forsberg JG, Kalland T. Neonatal estrogen treatment and epithelial abnormalities in the cervico vaginal epithelium of adult mice. **Cancer Res** 41: 721-734, 1981.
12. Zodek B. Lancet 2: 842, 1936. In: Josimovich JB, et al. : Estrogenic inhibition of growth hormone-induced tibial epiphyseal growth in hypophysectomised rats. **Endocrinology** 81: 1428-1430, 1967.
13. Singh IJ, Gunberg DL. Effects of estrogen treatment on bone cortex of the young rat. **Anat Rec** 171: 273-283, 1971.
14. Josimovich JB, et al. Estrogenic inhibition of growth induced tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, 81: 1428-1430, 1967.
15. Jansson JO, Eden S, Isakson O. Sites of action of testosterone and estradiol on longitudinal bone growth. **Am J Physiol** 244: 135-140, 1983.
16. Liu FT, Lin HS, Burich RL. Effect of some oral contraceptive steroids on the development of endometrial squamous metaplasia and cysts in rats. **Am J Obstet Gynecol** 1: 685-690, 1972.