

# Neonatal Dönemde Verilen Diethylstilbestrolün Adült Sıçanların Ovaryum Dokusu Üzerine Etkisi

İ.Değer ŞAHİN  
Bedri KANDEMİR  
Filiz KARAGÖZ  
Yüksel ALVUR

THE EFFECT OF NEONATALLY PERFORMED  
DIETHYLSTILBESTROL ON ADULT OVARY

Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

Geliş Tarihi: 10 Şubat 1989  
Kabul Tarihi: 3 Haziran 1989

## ÖZET

*Bu çalışmamızı Diethylstilbestrol (DES)'ün insanlarda prenatal kullanımının erginlik döneminde, ovaryum dokusu üzerinde ne gibi değişiklikler oluşturacağını gözlemek amacıyla 12 haftalık bir zaman süreci içerisinde, 16 neonatal dönemdeki sıçan üzerinde gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz bulgular, gelişim sürecinde kullanılan östrojen ve türevlerinin olumsuz etkilerinin aktifreproduktif hayatta devam ettiğini gösterdi.*

Anahtar Kelimeler: Diethylstilbestrol, Ovaryum.

T Kİ Tıp Araş Dergisi C.8, S.4,1990,299-304

## SUMMARY

*This study has been carried out on sixteen newborn rats. In order to observe the effect of Diethylstilbestrol on adult ovarium. The examination of ovarium after twelve weeks administration of Diethylstilbestrol revealed persistent histologic change during the active reproductive period.*

KeyWords: Diethylstilbestrol, Ovary.

T J Research Med Sci. V.8, N.4,1990,299-304

## GİRİŞ

Östrojen ve östrojen benzeri etki gösteren bazı sentetik maddeler, günümüzde endokrin fonksiyonlarla ilgili bozukluklarda yaygın olarak kullanılmaktadır (1,11).

Östrojenin bu şekilde kullanılmaya başlanması istenmeyen etkilerini de beraberinde getirmiş ve başta genital sistem olmak üzere hemen tüm sistemler üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir (11,16,17).

Gebeliği sırasında Diethylstilbestrol (DES) kullanmış kadınların kız çocuklarında erişkin dönemde vaginal clear celi adenokarsinoma saptanmasından (9) sonra gelişim periyodunda östrojenin, özellikle de DES'in kullanımının sonuçları pek çok araştırmaya konu olmuştur (4-6,9,13,21).

Bu çalışmalarda, DES kullanımı sonucu servikovajinal epitelde tümöre öncülük eden değişikliklerden, tümör oluşumuna kadar giden bul-

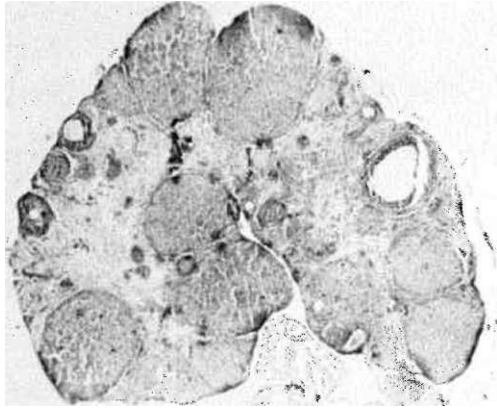
guların yanısıra, genital traktta yapısal anomililer gibi **tumoral** olmayan pek çok değişikliğin de ortaya çıktığı bildirilmiştir (7,13,18,19).

Bu çalışmamızda, genital diferansiasyon açısından insanlardaki prenatal dönem değişikliklerinin, sıçanların neonatal dönem değişiklikleri ile uyumlu olduğunu gözönüne alarak (5,6,13), DES'in prenatal dönemdeki kullanımının, adült dönemde ovaryum üzerine etkilerini gözlemek amacıyla neonatal dönemdeki sıçanlar model olarak kullanılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda deney hayvanı olarak, Swiss-Albino cinsi 5 aylık 4 adet dişi ve 4 adet erkek sıçamın çiftleştirilmesi sonucu elde edilen yavru sıçanların dişileri kullanıldı.

Deney grubu olarak ayrılan 8 adet neonatal dönemdeki dişi sıçanların çiftleştirilmesi sonucu elde edilen yavru sıçanların dişileri kullanıldı.



Şekil 1. Kontrol grubunda ovaryumun genel görünümü (H.Ex100)

Deney grubu olarak ayrılan 8 adet neonatal dönemdeki dişi sıçana ilk enjeksiyon doğumu izleyen 24 saat içinde olmak üzere 5 mikrogram aktif DES içeren 0,1 ml yağlı solüsyon subkutan olarak 5 gün süreyle günde bir kez enjekte edildi.

Kontrol grubu olarak ayrılan 8 adet neonatal dönemdeki dişi sıçana da deney grubu ile aynı koşullarda olmak üzere 0,1 ml steril zeytinyağı uygulandı.

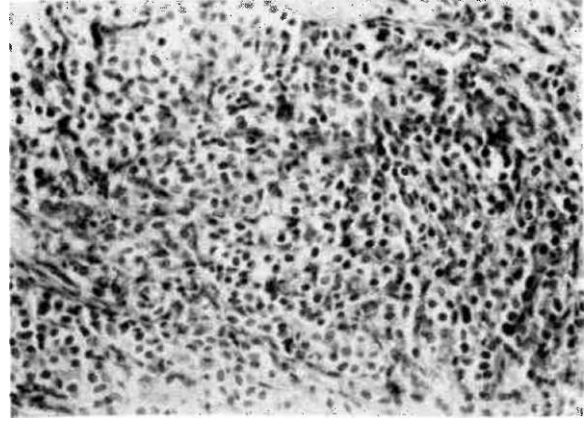
Beşinci gün enjeksiyonundan sonra kontrol ve deney grubunu oluşturan sıçanlar, ilk 4 hafta beslenmelerinin sağlanması amacıyla, ana sıçanların yanında tutularak ayrı ayrı kafeslere alındılar, standart diyet ve su ile beslendiler. 12 hafta sonunda, deney ve kontrol grubunu oluşturan sıçanlar, yoğun eter buharı ile öldürüldüler.

Sıçanların her iki ovaryumunun tamamı, 24 saat süreyle, %10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi ve rutin işlemde geçirilerek, parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan hazırlanan 7 mikron kalınlığındaki kesitler Hematoksilin Eozin (H+E), Gemori'nin gümüşleme, Masson'un trikrom, PAS ve Toluidin mavisi yöntemleriyle boyandılar.

## BULGULAR

Deney grubunu oluşturan sıçanların, çok farklı olmamakla birlikte, kontrol grubuna oranla aktivitelerinin daha az ve gelişirlerinin daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan otopsilerinde, deney grubu hayvanların tümünde, genital traktus kontrol grubundakilere oranla daha küçük ve ince bulunmuştur.



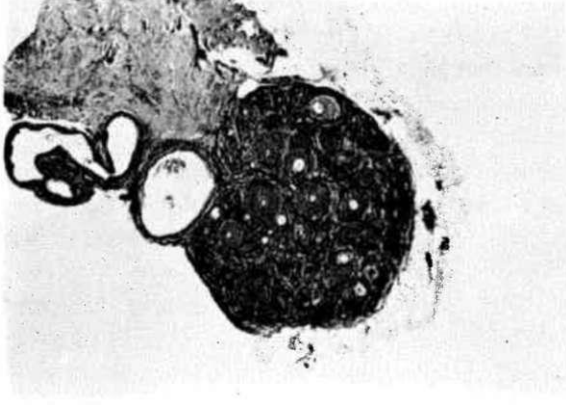
Şekil 2. Kontrol grubunda ovaryumun stroması içinde yer alan interstisyel hücreler (H.Ex400).

Kontrol grubunda, lobüle, sarımsı renkte ve yumuşak kıvamda olan ovaryumlar, deney grubunda düzgün yüzeyli, beyaz renkte daha küçük ve sert kıvamlı olarak saptanmıştır.

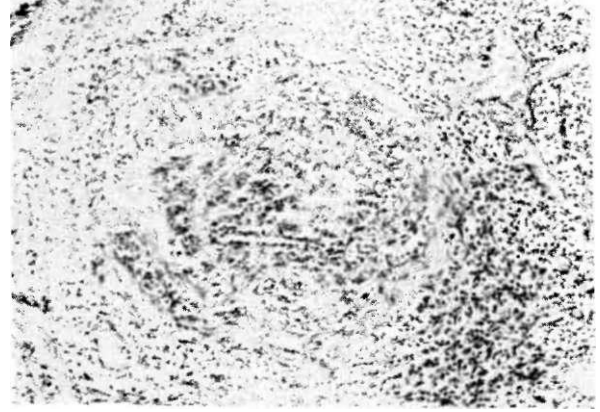
Kontrol grubunda ovaryumu, ince fibröz bağ dokusu çeperden oluşan bir kapsül çevrelemektedir. Bundan parankim içine doğru uzanan, ince bağ dokusu bantların ovaryum dokusunu ünitelere ayırdığı izlenmiştir. Ovaryum dokusu içinde, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküllerle, çok sayıda korpus luteumun yer aldığı saptanmıştır (Şekil 1). Granüloza hücreleri, poligonal, eozinofilik stoplazmalı olup, çekirdekleri kromatinden orta derecede zengin ve yuvarlak biçimdedir. Bunlar orta sıklıkta mitoz göstermektedir. Stroma içinde folliküller arasında geniş, kaba granüllü stoplazma ve küçük, gevşek kromatin dağılımı gösteren yuvarlak çekirdekli interstisyel hücreler yer almaktadır (Şekil 2). İnterstisyel hücreler arasında, belirgin endokrin vasküler bir stroma izlenmiş olup yapılan gümüş boyama ile bunların tek tek retikülün ağı ile sarıldığı görülmüştür. Ovaryum stroması içinde, her 1300 büyütme alanında 1 mastosit izlenmiştir. Vasküler yapılar konjesyon dışında özellik göstermemektedir.

Deney grubunda ise, tüm deney hayvanlarının ovaryumlarında kontrollere göre %30-40 oranında, hacim azalması olduğu görülmüştür. Ovaryumu çevreleyen fibröz kapsül ile bundan parankim içine doğru giren bağ dokusu demetlerinde kalınlaşma görülmüştür.

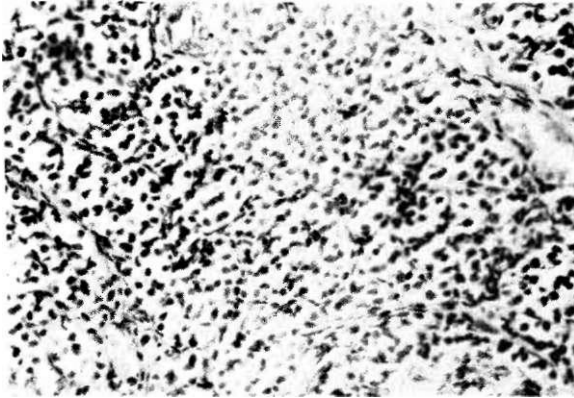
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, primer folliküller aleyhine sayıca artmış sekonder fol-



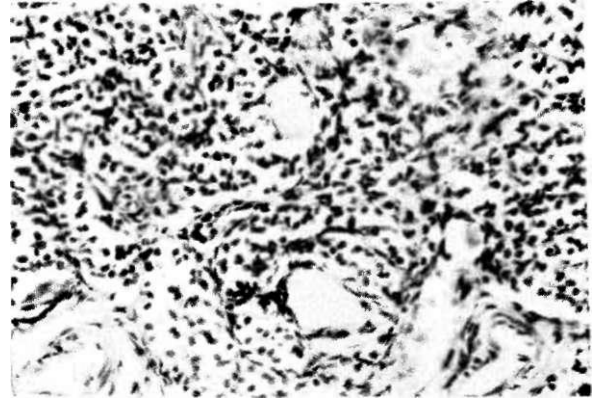
Şekil 3. Dene grubunda ovaryumun genel görünümü (H.Ex100).



Şekil 4. Granüloza hücrelerinde nekroz (H.Ex200).



Şekil 5. Dene grubunda ovaryumun stroması içinde yer alan interstisyel hücreler (H.Ex400).



Şekil 6. Dene grubunda vasküler yapılarda homojen eozinofilik madde birikimi (H.Ex400).

Liküller saptanmış, bazı folliküllerde küçük genişlemeler dikkati çekmiştir. Yapılan seri kesitlerde ise korpus luteum ve korpus albicans görülmemiştir (Şekil 3). Granüloza hücreleri, kontrollere oranla daha prolifer ve yer yer geniş çaplara varan nekroz alanları içermektedir (Şekil 4). Kontrollere göre daha az yer kaplayan interstisyel hücreler daha küçük yapıda olup, çekirdekleri stoplazma aleyhine büyümüş ve çekirdek kromaütin yapısı yoğunlaşmıştır. Stoplazmaları ileri derecede saydam ve granül içermemektedir (Şekil 5).

İnterstisyel hücreler arasında yer alan endokrin vasküler stroma ve hücreleri tek tek saran retikülün ağında yıkılma bulunmaktadır. Stroma içinde yer alan mastositler sayıca artmıştır.

Kontrollerde özellik göstermeyen vasküler yapıların lümenlerinde ve duvarlarında homojen

eozinofilik PAS pozitif madde birikimi görülmüştür (Şekil 6).

Dene hayvanlarının birinin heriki tüp lümeninde polimorf nüveli lökosit (PNL) birikimi görülmüştür.

## TARTIŞMA

Memelilerde genital sistemin gelişmesinde steroid hormonların önemi bilinmektedir. Testiküler hormonlar, erken fetal dönemde erkek seksüel yapılarının diferansiasyonunu sağlamaktadır. Dişilerde ise östrojenik hormonların fetal reproduktif traktın diferansiasyonundaki rolü tam olarak bilinmemektedir (13).

1971'de Herbst'in (9) gebeliği sırasında DES kullanmış bir kadının kız çocuğunda vaginal clear celi adenokarsinoma saptamasından sonra, gelişimin kritik periyodlarında östrojen kul-

lanımının sonuçları giderek artan bir ilgiyle araştırılmaktadır (5,13,18,21).

Genital diferansiyasyon, insanlarda prenatal dönemde oluşurken, sıçanlarda neonatal periyodda gelişmektedir (5). Bu nedenle sıçanların neonatal tedavisi, insanlardaki prenatal ilaç etkilerini gösteren bir model olarak, bu konuda yapılan araştırmalarda, kullanılmaktadır (5,6,13).

Bugüne kadar yapılan birçok deneysel çalışmada, neonatal dönemde DES verilerin dışı sıçanların serviks ve vajinalarında preneoplastik ve neoplastik değişiklikler olduğu gösterilmiştir (6,19-21,23). Ayrıca anneleri DES almış olan dışı yavrularda reproduktif traktus anomalileride saptanmıştır (4,7,10,13,18,19,21).

Yapılan çalışmalarda, genital traktusta oluşan değişikliklerin doza bağımlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir (13,20,23). Tenenbaum ve Forsber (20), neonatal dönemde çeşitli dozlar kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 10-5 mikrogram/gün ve daha düşük dozlarda DES'in ovaryumlarda herhangi bir etki oluşturmadığını gözlemişlerdir. Yine aynı çalışmada, düşük dozlarda DES'in ovaryumun fonksiyonlarını bozduğunu, yüksek dozlarda ise hedef organda direkt etki ile değişikliklere yol açtığını bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada, Goomer (7) ve arkadaşları, neonatal dönemdeki sıçanlara verilen östrojenin luteinizan hormon releasing faktör (LH-RF) salınımında kronik bir bozukluğa ve plazma hipofizer LH seviyelerinin düşmesine yol açtığını, bununla seksüel diferansiyasyon değişikliğine neden olabilecek bir mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Wordinger (21) ve arkadaşları gebelik sırasında verilen DES'in hipotalamo-hipofizer aksı bozduğunu, McLachlan (13) ve arkadaşları da gebelik sırasında verilen DES'in fetal reproduktif trakta bir DES akümülyasyonuna sebep olduğunu göstermişlerdir.

Wordinger (21) ve arkadaşları fetal ovaryumun DES için direkt bir hedef organ olabileceğini de ileri sürmüşlerdir.

Prenatal ya da neonatal dönemde, DES kullanımının dışı genital sistem üzerindeki etkileri en belirgin biçimde genç erişkin dönemde ortaya çıkmaktadır (5,18,20,23).

Çalışmamızdaki deney hayvanları, onikinci haftanın sonunda kontrollerle karşılaştırıldığında gelişmelerinde gerilik olduğu saptanmıştır. Bu gelişim geriliğinin, östrojen etkisiyle diyet ahnımında azalma ya da somatotropik hormon salgısında ortaya çıkan bir düşüklükten ileri gelebileceği Liu (12) ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür.

DES verilen gruptaki sıçanların ovaryumlardaki değişikliklerin hipofiz üzerine indirekt etki ile ovaryum gelişmesinin inhibisyonuna bağlı olabileceği bildirilmektedir (12,13,15,20).

Ovaryumların histolojik incelemesinde deney grubu sıçanların tümünde izlenen korpus luteum yokluğu, dejenere kistik follikül gelişimi, sekonder ve tersiyer folliküllerde, primer folliküllere oranla artma, ovaryum stromasında bağ dokusu artımı çeşitli çalışmalarla uygunluk göstermektedir (4,12,15,20,21,23). Bu bulgular, gerekli genadotropinlerin yapımı ve salınımının yetmezliğine bağlı olarak follikül gelişmesinin, ovulasyon oluşmasını sağlayacak noktaya ulaşmadığını göstermektedir.

Deney hayvanlarının tümünün ovaryumlarında tespit ettiğimiz bir diğer bulgu interstisyel hücrelerdeki değişikliklerdir. Benzer değişiklikler Wordinger (21) ve Tenenbaum (20) tarafından yapılan çalışmalarda da saptanmıştır. Görülen bu değişiklikler, FSH'nın siklik periyod oluşturmaksızın sürekli stimülasyonu, plazma LH seviyesinin kronik yetmezliği ve överden sürekli östrojen salınımı ile açıklanabilir (2,7,20,21).

Deney grubunda izlediğimiz folliküller granüloza hücrelerindeki değişikliklerin, folliküler granüloza ve teka interna hücrelerinin östrojenin primer kaynakları olduklarını (2,3,14,20) kabul ederek, interstisyel hücrelerindeki değişiklikleri oluşturan mekanizma ile geliştiğini düşünmekteyiz.

Önemli bulgularımızdan biri de ovaryum stromasındaki kan damarları duvarlarında, çevresinde ve lümenlerinde izlediğimiz homojen eozinofilik PAS pozitif madde birikimidir. Ovaryum ile ilgili çalışmalarda rastlayamadığımız bu bulguyu, Wordinger (22) ve arkadaşları, uzun süre oral olarak DES verilmiş sıçanların endometrial dokularında tespit etmişlerdir. Bu maddenin kollajen dejenerasyonu ve fibrin birikimi sonucu oluşan antijen, antikör ve komplemanları içeren lokalize bir immün yanıt olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

DENEY GRUBUNDA GÖZLENEN BULGULARIN DÖKÜMÜ

D % 100	Ovaryumda Hipoplazi	Kapsül Kalınlaşması	Korpus Luteum Yokluğu	Folikül- lerde		Granüloza Hücrelerinde			Stromada		İnterstisyel Hücrelerde			Tüp Lümenlerinde PNL
				Sayıcı Artma	Proliferasyon	Çekirdekte Kromatin Yoğunluğu	Z	Bağ Dokusu Artımı	Mastositlerde Sayıca Artım	Endokrin Vasküler Stromada Yıkılma	Tüp Lümenlerinde PNL			
100	100	100	100	100	100	100	87.5	100	100	100	87.5	87.5	100	125
J-A	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	*	+	-
1-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2-A		4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-B	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	4
3-A		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3-B		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4-A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5-A	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6-A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	-
7-A		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7-B	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8-A j	.			*	+	+	+	+	+	.	+	+	+	-
8-B	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

İnterstisyel hücreler arasında yer alan endokrin vasküler stroma ve interstisyel hücreleri tek tek saran retikülün lif ağındaki yıkımında, homojen eozinofilik madde birikiminde olduğu gibi immün bir yanıtı gösterdiğini düşünmekteyiz. Mastositlerdeki prelüferasyon bu olayda immün bir mekanizmanın rol aldığı yolundaki kanımızı desteklemektedir.

DeneySEL çalışmamızdan ve ilgili kaynaklardan elde ettiğimiz bilgilere dayanarak, gelişim sürecinde uygulanacak östrojen ve türevlerinin, seks karakterlerinin oluşumu ile ilgili endokrin organların normal fonksiyonlarında sapmalara yol açabileceği ve bunlarında aktif reproduktif yaşamda kalıcı gelişim ve fonksiyon bozukluklarına neden olabileceği sonucuna ulaşabiliriz.

KAYNAKLAR

1. Astwood EB: Estrogens and Progestins In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman LS, A Gilman. Forth Edition. London, Toronto, The MacMillan Company, pp: 1538-1561,1970.
2. Blandau RJ: The Female Repoductive System In: Histology. Weiss L, RO Greep. Fourth Edition. New York, Mc Grow Hill Company, pp:881-924,1977.
3. Erkoçak A: Özel Histoloji. Beşinci Baskı. İzmir, Refko, S: 191-222,1984.
4. Forsberg JG: The development of atypical epithelium in the mouse uterine cervix and vaginal fornix after neonatal oestradiol treatment. Br J exp Path, 50:187-195, 1969.

5. Forsberg JG: Late effects in the vaginal and cervical epithelia after injections of diethylstilbestrol into neonatal mice. *Am J Obstet Gynecol*, 1:101-104,1975.
6. Forsberg JG, T Kalland: Neonatal estrogen treatment and epithelial abnormalities in the cervicovaginal epithelium of adult mice. *Cancer Res*, 41:721-734,1981.
7. Goomer N, Saxeena RN, Shet AR: Effect of neonatal testosterone and oestriol treatment on the development of the hypothalamo-hypophysial axis in the female rat. *J Reprod Fert*, 50:239-243,1977.
8. Hancy AF, RR Newbold, BF Fetter Paraovarian cysts associated with prenatal diethylstilbestrol exposure. *Am J Pathol*, 124(3): 405-411,1986.
9. Herbst A L, Ulfelder H, Poskanzer DC: Adenocarcinoma of the vagina: Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med*, 284:878-881,1971.
10. Henry EC, Miller RK, Baggs RB: Direct fetal injections of diethylstilbestrol and 17- estradiol: A method for investigating their teratogenicity. *Teratology*, 29:297-304, 1984.
11. Kayaalp O: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt III, Dördüncü Baskı, Ankara, Ulucan Matbaası, s: 2386-2408,1986.
12. Liu FTY, 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.
13. McLachlan JA, Newbold RR, Bullock BC: Long term effects on the female mouse genital tract associated with perenatal exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res*, 40:3988-3999,1980.
14. Novak ER, Woodruff JD: Gynecologic and Obstetric Pathology. Seventh Edition. Philadelphia, WB Saunders Company, pp:142-153,1974.
15. Ory H: Functional ovarian cysts and oral contraceptive. *JAMA*, 228 (1):68-69,1974.
16. Reynolds JEF: Martindale The Extra Pharmacopoeia. Twentyeight Edition. London, The pharmaceutical Press, pp: 1433-1435,1982.
17. Robbins SL, Angell M, Kumar V: Environmental Disease In: basic Pathology. Third Edition. Philadelphia, WB Saunders Company, pp:234-253,1981.
18. Robboy SJ, Young RH, Herbst A: Vaginal and Cervical Abnormalities Related to Prenatal Eexposure to Diethylstilbestrol In: Pathology of the Female Genital Tract. Blaustein A. New York, Springer Verlag, pp: 87-101, 1977.
19. Robboy SJ, Taguchi O, Cunha GR: Normal development of the human female reproductive tract and alterations resulting from experimental exposure to diethylstilbestrol. *Human Pathol*, 13 (3): 190-198,1982.
20. Tanenbaum A, Forsberg JG: Structural and functional changes in ovaries from adult mice treated with diethylstilbestrol in the neonatal period, *J Reprod Fert*, 73:465477,1985.
21. Wordinger JR, Higman B: Histology and ultrastructure of the adult mouse ovary following a single prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Virchows Arch (Cell Pathol)*, 45:241-253,1984.
22. Wordinger JR, Higman B, Townsend JW: Histochemical and ultrastructural characteristics of the endometrial connective tissue stroma from mice continuosh/ fed diathyistilbestrol. *Virchow Arch (Cell Pathol)*, 47:247-261, 1984.
23. Yasuda Y, Kihara T, Nisimura H: Effect of prenatal treatment with ethinyl estradiol on the mouse uterus and ovary, *am J Obstet Gynecol*, 127:832-836,1977.