

Prenatal Dönemde Uygulanan Diklofenak Sodyumun, Postnatal Dönemde Sıçanın Eklem Kıkırdak Dokusuna Etkisi

EFFECTS OF PRENATAL DICLOFENAC SODIUM EXPOSURE ON THE ARTICULAR CARTILAGE OF THE RAT IN THE POSTNATAL PERIOD

Ersan ODACI*, Adnan KORKMAZ**, Bülent AYAS***, M. Çetin RAĞBETLİ****, Nusret ÇİFTÇİ*****

* Yrd.Doç.Dr. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD,
** Doç.Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD,
*** Araş.Gör., Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD,SAMSUN
**** Yrd.Doç.Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD, VAN
***** Prof.Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD, SAMSUN

Özet

Yapılan çalışmalar nonsteroidal antiinflamatuar (NSAİ) ilaçların kıkırdak proteoglikanlarının sentezini inhibe ederek kıkırdak yapısını bozduğunu göstermektedir. Gebelik döneminde ortaya çıkan romatizmal hastalıklarda NSAİ ilaçlar kullanılabilir. Ancak gebelikte kullanılan NSAİ ilaçların fetus eklem kıkırdağını ne şekilde etkilediğini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada denek grubu gebe sıçanlara hamileliklerinin 5. gününden itibaren 15 gün süreyle 1 mg/kg i.m diklofenak sodyum, kontrollere ise aynı sürede i.m 1 ml. serum fizyolojik enjekte edildi. Doğumdan sonraki 20. haftada, sıçan yavrularının eklem kıkırdaklarından hazırlanan preparatlar asidik proteoglikanlar için spesifik olan alsiyan mavisi (pH 1 metodu) ile boyandı. Boyama yoğunluğu preparatlar kodlandıktan sonra dört araştırmacı tarafından ayrı ayrı, Haigh M ve Scott JE'ye (1986) göre açık (-) ve koyu (+) olarak ifade edilen bir skala ile değerlendirildi. Çalışmada kontrol grubunun koyu mavi (+) denek grubunun ise açık mavi (-) boyandığı ve aralarında bariz bir farklılık olduğu gözlemlendi. Denek grubu eklem kıkırdaklarının açık mavi (-) olarak boyanması gebelikte kullanılan diklofenak sodyumun asidik proteoglikanların sentezini inhibe ederek fetal dönemde fetus kıkırdağı gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ve postnatal dönemde de devam ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Eklem kıkırdağı, Sıçan, Diklofenak sodyum.

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:278-281

Summary

It has been shown that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) affect the cartilaginous tissue structure by inhibiting the synthesis of proteoglycans. Rheumatic diseases during pregnancy raise the issue of using antirheumatic drug. However, there is a paucity of any published material that demonstrates how the fetal cartilage is affected by the NSAIDS. In this study, diclofenac sodium was given to pregnant rats for fifteen days. Controls received physiological saline (1ml) in the same period. On the postnatal twentieth week, the articulation cartilages of the pups were processed for routine paraffin histology and stained with alcian blue, a specific dye for proteoglycans. The staining density of the matrix was evaluated in a blind fashion by four investigators. Grading of the staining density of the matrix was made according to the criteria of Haigh M. and Scott JE (1986). Two grades were used light (-) and dark (+). The staining density in the controls was significantly darker (+) than in the diclofenac treated group. This result suggests that use of diclofenac sodium during gestation affects the development of fetal cartilages by inhibiting the synthesis of proteoglycans and that this situation is also visible later in life.

Key Words: Articular Cartilage, Rat, Diclofenac sodium

T Klin J Med Sci 2001, 21:278-281

1980'li yıllardan sonra gelişen teknoloji ve serbest ticaret anlayışı her alanda olduğu gibi sağlık alanında da tüketici bir toplum ortaya çıkarmıştır. Bunun sonucu olarak ilaç tüketimi kontrolsüz bir şekilde artmıştır. Ülkemizde en

Geliş Tarihi: 12.10.2000

Haberleşme Adresi: Dr. Ersan Odacı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji AD
55139, SAMSUN

¶ 28-31 Ağustos 2000'de V. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

çok tüketilen ilaç grupları antibiyotikler, ağrı kesiciler ve antiromatizmal ilaçlardır. Nonsteroidal antiinflamatuar (NSAİ) ilaçlar bağımlılık yapmadığı için bir çok romatizmal hastalıkların tedavisinde tercih edilen antiromatizmal ilaçlardır. Antiinflamatuar özelliklerinden dolayı kas-iskelet rahatsızlıklarında da ve eklem hastalıklarında tercih edilmektedirler (1).

Eklem kıkırdakları sinoviyal sıvı vasıtası ile eklem yüzeylerinin kaygan oluşunu sağlar ve böylece kemik hareketleri kolaylaşır. Bu şekilde mekanik baskı azalır (1,2). Kıkırdak ara maddesindeki proteoglikanların doğumdan önceki ve sonraki iskelet sisteminin gelişiminde önem

li rolü olduğu bilinmektedir (3,4). Son çalışmalarda bir kıkırdak proteoglikanı olan kondroitin sülfatın, radyasyon, enfeksiyon veya ilaçlar gibi etkenlerle yanlış indüksiyonu sonucunda nöral tüp defektleri, spondilokostal disostoz, spondilotorasik disostoz, multipl vertebral segmentasyon defektleri gibi konjenital anomalilere, dejeneratif eklem rahatsızlıklarına ve daha bir çok sağlık problemlerine yol açtığı bildirilmiştir (5-8). Bu etkenler arasında önemli faktörlerden birisi ise NSAİ ilaçlardır (6,7).

Diklofenak sodyum, hamilelikte ortaya çıkabilecek romatizmal hastalıklarda kullanılabilen bir NSAİ ilaçtır. Çalışmalarda hamilelikte kullanılan diklofenak sodyumun, fetus organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilediği gibi kıkırdak dokusunun gelişimini de olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (9-11). Ancak kaynaklarda diklofenak sodyumun eklem kıkırdak üzerindeki etkisi ile ilgili her hangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu çalışmada diklofenak sodyuma maruz kalan gebe sıçan yavrularının, postnatal 20. haftada eklem kıkırdak dokusuna etkisi histokimyasal olarak araştırıldı.

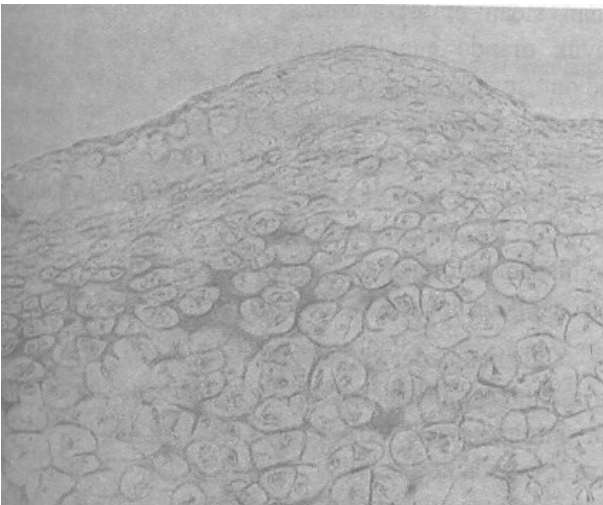
Materyel ve Metod

Çalışmaya toplam 40 adet erişkin, ağırlıkları 200 gr. dan büyük dişi Wistar Albino sıçanlar ile başlandı. Döllenme için 48 saat aynı kafeste tutulan erkek ve dişi sıçanlar daha sonra ayrı kafeslere alındılar. 5 gün boyunca dişi sıçanların ağırlıkları tartıldı. Ağırlıklarında artış olanlar gebe olarak kabul edildi ve gebe kalan sıçanlar çalışmaya alındı. Gebe sıçanlardan 15'i kontrol, 15'i ise deney olarak kullanıldı. Gebeliklerinin 5. gününden itibaren deney grubu sıçanlara 15 gün süreyle her gün 1 cc (1 mg/kg) IM diklofenak sodyum (Voltaren® ampul, CIBA-GEIGY, İstanbul), kontrol grubuna ise aynı süre içerisinde her gün 1 cc IM serum fizyolojik enjekte edildi. Doğumdan sonra sıçanlar süttten kesilinceye kadar (yaklaşık 2 hafta) doğal beslenme-

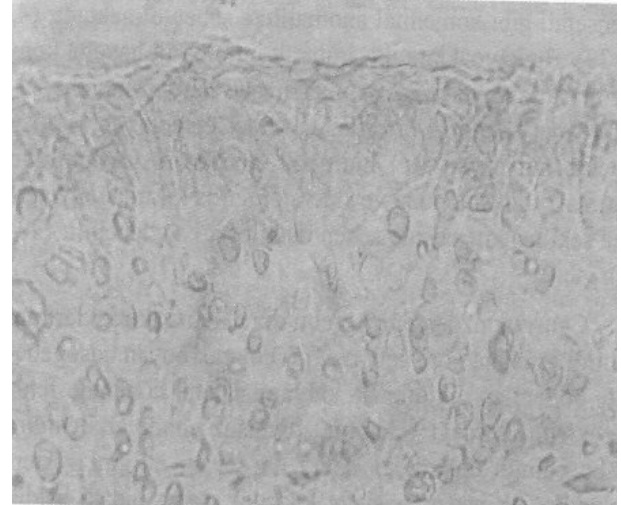
ye bırakıldı. Daha sonra ayrı kafeslere alınan yavru sıçanlar normal bir diyetle beslendiler. Doğumdan sonraki 20. haftada kontrol ve deney grubu yavru sıçanlardan aynı sayıda olmak üzere, derin anestezi altında (1.25 gr/kg üretan i.p.) intrakardiyak yolla %10'luk nötral formalinle perfüze edildiler. Perfüze edilen hayvanlardan alınan diz eklem kıkırdak dokusu materyalleri rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler kıkırdak dokusundaki asidik proteoglikanlar için spesifik bir boya olan alsiyen mavisi (pH 1 metodu) ile boyandı (12,13) ve preparatlar kodlandı. BH-2 tipi Olympus marka ışık mikroskobu kullanılarak preparatlara ait görüntüler 4 ayrı monitöre aktarıldı ve her preparata ait aynı görüntü 4 araştırmacı tarafından birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi. Araştırmacılar değerlendirmelerini boyama yoğunluğunu esas alan, açık mavi (-) ve koyu mavi (+) ile ifade edilen bir skala ile değerlendirdiler (12). Resimler aynı mikroskop kullanılarak çekildi.

Bulgular

Alsiyen mavisi (pH 1 metodu) ile boyanan preparatlarda kontrol ve deney grupları diz eklem kıkırdaklarının farklı koyulukta boyandıkları ve deney grubu ile kontrol grubu arasında bariz farklılıklar olduğu görüldü. Kontrol grubu sıçanların preparatlarında ekstrasellüler sahanın koyu mavi olarak boyandığı gözlemlendi ve bu grup sıçanların değerlendirilmesi (+) olarak kabul edildi (12). Ayrıca kıkırdak yapısını oluşturan kondrositlerin normal yapılarını korudukları ve izogen gruplar oluşturdukları da izlendi (Şekil 1). Aynı anda birlikte boyanan deney grubu sıçanların preparatlarında ise ekstrasellüler alanın açık mavi olarak boyandığı izlendi ve değerlendirilmesi (-) olarak kabul edildi (12). Bununla birlikte kondrositlerin sayıca azaldığı, normal yapılarına ulaşamadıkları, şekil ve büyüklüklerinin değiştiği ve izogen gruplar oluşturmadıkları da izlendi (Şekil 2).



Şekil 1. Kontrol grubu sıçanların eklem kıkırdağında normal kondrosit yapısının oluştuğu ve kondrositlerin izogen gruplar oluşturdukları izlenmektedir. Boyası: Alsiyen Mavisi (pH 1 metodu). Orijinal büyütme 25X10



Şekil 2. Deney grubu sıçanların eklem kıkırdağında normal kondrosit yapısının tam olarak oluşmadığı, kondrositlerin şekil ve büyüklüklerinin değiştiği ve izogen gruplar oluşturmadıkları izlenmektedir. Boyası: Alsiyen Mavisi (pH 1 Metodu). Orijinal büyütme 25X10

Tartışma

Son yıllarda romatizmal hastalıkların tedavisinde NSAİ ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır. 1991 yılında yapılan bir araştırmada ABD'de bu grubun ilacı olan aspirinin yılda 6000 ton kullanıldığını göstermektedir (14). NSAİ ilaçlar grubundan olan diklofenak sodyum ise ülkemizde değişik firmalar tarafından değişik isimler adı altında son yirmi yıl içerisinde piyasaya sürülmüştür. Voltaren (ampul, emulgel, supozituar, tb., göz damlası), miyadren (ampul, drj., tb.), dikloron (tb, supozituar, ampul), diclomec (jel, ampul) sadece bir kaç örnektir (15). Yaygın kullanıma sahip olan diklofenak sodyumun bazı çalışmalarda bir çok organ ve dokunun yapısını bozduğu (7,16), bir çok sistemde de yan etkileri olduğu gösterilmiştir (17). Bu yan etkilerden en çok bilinenleri midede; ülser, kanama, hazımsızlık, stomatit, böbreklerde; akut renal yetmezlik, hipertansiyon, interstisyel nefrit, ciltte; eritema multiforme (Stevens-Johnson sendromu ve toksik nekrolizis), büllöz erüpsiyonlar, ilaç erüpsiyonları, püstüler psöriazis, karaciğerde; hepatit, Reye sendromu, merkezi sinir sisteminde; baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, aseptik menenjit, kanda; aplastik anemi, trombositopeni, nötropeni, hemolitik anemi, akciğerlerde; pulmoner ödem, pulmoner alveolitis, astma ve anafilaktik reaksiyonlardır (17).

Embriyonal transplantasyon çalışmaları, skleratom hücrelerinin özel indükleyici maddelere cevap olarak vertebra cisimlerini ve arkusunu şekillendirmek için farklılaştığını göstermektedir (18-20). Vertebra cisimleri notokord tarafından üretilen maddelere cevap olarak şekillenirken, vertebra arkusları ise nöral tüp tarafından üretilen maddelere cevap olarak şekillenirler (4, 18-20). Yapılan deneysel çalışmalar, notokord tarafından salgılanan kondroitin sülfat moleküllerinin skleratomda kıkırdağın şekillenmesi için güçlü bir indükleyici olduğunu göstermektedir (20-22). Skleratomların anormal indüksiyonu spinal defektlere sebep olabilmektedir (4, 20, 22). Vertebra cisimlerinin defektif indüksiyonu skolyoza sebep olurken, vertebra arkuslarının anormal indüksiyonu da spina bifida ve anensefali gibi konjenital anomalilere sebep olmaktadır (4, 20-23). Bu kaynaklara dayanılarak intrauterin hayatta kondroitin sülfatın yeterince salınmaması, salınmasının bozulması veya salındığı ortamda çevresel etkenler tarafından (ilaçlar, radyasyon vs.) hidrolize edilmesi skleratomların anormal indüksiyonuna ve skleratomlarda kıkırdağın yeterince şekillenememesine sebep olabileceği söylenebilir (20-22).

Çalışmamızda deney grubu diz eklem kıkırdaklarının, kontrol grubuna göre açık mavi (-) olarak boyanması gebelikte kullanılan diklofenak sodyumun fetal dönemde fetus diz eklem kıkırdağı gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ve bu etkinin doğumdan sonra da devam ettiğini göstermektedir. Alsian mavisi ile kıkırdak dokusundaki asidik proteoglikanların varlığı tespit edilebilmektedir (12, 13). Çalışmamızda deney grubunun açık mavi (-) boyanması diz eklem kıkırdak matriksindeki asidik proteoglikan miktarının azaldığını göstermektedir. Böylece, çalışmada kul-

lanılan dozdaki diklofenak sodyumun diz eklem kıkırdak matriksindeki asidik proteoglikanların sentezini bozduğu söylenebilir (9).

Kaynaklar salisilat, indometazin ve diklofenak sodyum gibi NSAİ ilaçların plasenta bariyerini geçerek gelişmekte olan fetusu etkilediğini göstermektedir (24,25). Ayrıca NSAİ ilaçların yetişkin eklem kıkırdağında proteoglikanların sentezini inhibe ederek kıkırdak yapısını bozdukları da gösterilmiştir (9,16). Bu bilgiler çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. Ancak kaynaklarda prenatal dönemde uygulanan diklofenak sodyumun plasenta bariyerini geçerek diz eklem kıkırdağı gelişimini ne şekilde etkilediği açıklanmamıştır.

Çalışmamızın sonucuna göre prenatal dönemde kullanılan diklofenak sodyum dozu, sıçanlarda diz eklem kıkırdak dokusu matriksindeki proteoglikan miktarını azaltmakta ve bu azalma postnatal 20. haftada da devam etmektedir. Ancak bu azalmanın kıkırdak proteoglikanları olarak bilinen ve glikozaminoglikanların (GAG) iki ana tipi olan kondroitin sülfat ve keratan sülfattan (9) hangilerinde ne miktarda meydana geldiği önem kazanmaktadır.

NSAİ ilaçlar etkilerini araşidonik asidin prostoglandinlere (PG) dönüşümünü baskılayarak göstermektedirler. Bu etki siklooksijenaz enziminin inhibisyonu sonucunda araşidonik asidin PG'e dönüşümünün engellenmesi şeklinde olmaktadır (9). Bu ilaçlar ağrı yapıcı kimyasal veya mekanik etkenlerle artmış olan prostoglandinlerin oluşumunu katalizleyen siklooksijenaz enzimini inhibe ederek aneljezik ve antipiretik etkilerini göstermektedirler. Erişkin insan kıkırdağı üzerinde yapılan çalışmalar NSAİ ilaçların kıkırdak matriksinde GAG sentezini de inhibe ettiğini ve bunun da kıkırdakta harabiyete sebep olabileceğini göstermektedir (9). Aynı çalışmada sürekli NSAİ tedavisine maruz kalan kişilerin kıkırdak matriksinde GAG sentezinin sürekli inhibisyonu sonucu eklemlerde bozulmaların görülebileceği belirtilmektedir (9).

Kaynaklarda 3 mg/kg dozda diklofenak sodyum uygulanan sıçan embriyolarında blastosist implantasyonun büyük oranda engellendiği (26), 4 mg/kg diklofenak sodyum uygulanan sıçan embriyolarında ise fetus kaburgalarında defektler olduğu bildirilmiştir (27). Bununla birlikte 10 mg/kg diklofenak sodyum uygulanan tavşanlarda herhangi bir teratojen etki görülmediği de bildirilmektedir (28). Bu çalışmalarda gebeliğin farklı zamanlarında uygulanan diklofenak sodyumun fetusda farklı etkiler yapabileceği belirtilmektedir (26-28).

Çalışmamızda kullandığımız dozlarda sıçan yavrularında herhangi bir konjenital anomaliye rastlanmamıştır. Bu durum kaynak verileri ile karşılaştırıldığında verilen dozun fetusda konjenital anomaliye sebep olabilecek kadar yüksek dozda olmadığını göstermektedir (26-28). Ancak deney grubu sıçanların matriks GAG miktarının kontrol grubuna göre daha az olması verilen ilaç dozunun konjenital anomali oluşturacak dozda olmasa bile tedavi dozu olarak riskli olabileceğini düşündürmektedir.

Kaynaklarda çok nadir olarak görülen konjenital anomalilerin (Jarko-Levin Sendromu, Spondilocoostal Disostoz gibi) son on yıl içerisinde ülkemizde de görüldüğünün bildirilmiş olması (8, 23) NSAİ ilaçların yaygın bir şekilde ülkemizde kullanılması ile aynı zamana denk gelmektedir. Bu yüzden diklofenak sodyum gibi NSAİ ilaçların gebelikte hekimler tarafından dikkatli bir şekilde kullanılması gerekmektedir.

Çalışmamızda kontrol grubu ile denek grubu sıçanların eklem kıkırdakları karşılaştırıldığında, denek grubu sıçanların eklem kıkırdaklarında, kıkırdak hücre sayısının azaldığı, kondrositlerin şekil ve büyüklüklerinin değiştiği ayrıca izogen gruplar oluşturmadıkları da dikkati çekmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlar kaynak verileri ile uyumluluk göstermektedir (11). Bununla birlikte denek grubu sıçanların eklem kıkırdak hücrelerinin şekil ve büyüklüklerinde meydana gelen değişikliklerin ilave çalışmalarla incelenmesi de gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Wright V. Historical overview of NSAIDs. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1993; 13 (1): 4-6.
2. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. Philadelphia: WB Saunders Company. 1997: 109-30.
3. Keith L, Moore TVN. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. Philadelphia: WB Saunders Company. 1998: 405-24.
4. Larsen WJ. *Human Embryology*. New York: Churchill Livingstone INC, 1993: 65-92.
5. Taylor JR, Scott JE, Cribb AM, and Bostworth TR; Human intervertebral disc acid glycosaminoglycans. *J Anat* 1992;180: 137-41.
6. Whelton A, Hamilton JW, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; Effects on kidney function. *J Clin Pharmacol* 1991; 31: 588-98.
7. Robson JA, Geisert JREE; Expression of a keratan sulfate proteoglycan during development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the ferret. *J Comp Neurol* 1994; 340: 349-60.
8. Aslan Y, Erduran E, Mocan H, Yıldırım A, Ökten A, Gedik Y. Multiple vertebral segmentation defects brief report of three patients and nosological considerations. *Gen Coun* 1997; 8(3): 241-8.
9. Shield MJ; Anti-inflammatory drugs and their effects on cartilage synthesis and renal function. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1993; 13: 7-16.
10. Rağbetli MÇ, Kaplan S, Korkmaz A. Prenatal dönemde uygulanan diklofenak sodyumun 20 haftalık erkek sıçan dorsal hipokampusunun piramidal hücre sayısına etkisi. *Turkish J Biology* 1997; 21: 307-15.
11. Korkmaz A, Çiftçi N, Kaplan S, Rağbetli MÇ. Prenatal dönemde uygulanan diklofenak sodyumun trakeanın kıkırdak dokusuna olan etkileri. III Ulusal Anatomi Kongresi Kongre Kitapçığı 1995; 68-9.
12. Haigh M, Scott JE. A method for processing tissue sections for staining with cupromeronic blue and other dyes, using CEC techniques, for light and electron microscopy. *Basic and Applied Histochemistry* 1986; 30: 479-86.
13. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York: Churchill Livingstone. 1996: 191-2.
14. Waissmann G. Aspirin. *Sci Am* 1991; 264: 84-90.
15. Ommat R. *Vademecum 98 Modern İlaç Rehberi*. Ankara: Feryal Matbaası, 1988: 1084-5.
16. Catalano MA. Worldwide safety experience with diclofenac. *Am J Med* 1986; 80 (suppl 4B):81-7.
17. Brooks PM. Side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Med J Aust* 1988;148: 248-51.
18. Keynes RJ, Stern CD. Mechanisms of vertebrate segmentation. *Development* 1988; 103: 413-29.
19. Ogden JA, Ganey TM, Sasse J, Neame PJ, Hilbelink DR. Development and maturation of the axial skeleton; in Weinstein SL, ed. *The Pediatric Spine: Principles and Practice*. New York: Raven Press. 1994: 3-69.
20. Theiler K. Vertebral malformations. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1998; 112: 1-99.
21. O'Rahilly R, Müller F. *Developmental Stages in Human Embryos*. Washington: Carnegie Institution of Washington. 1987.
22. Dias MS, Li V, Landi M, Schwend R, Grabb P. The embryogenesis of congenital vertebral dislocation: Early embryonic buckling? *Pediatr Neurosurg* 1998; 29:281-9.
23. Satar M, Kozanoğlu MN, Atilla E. Identical twins with an autosomal recessive form of spondylocostal dysostosis. *Clin Genet* 1992; 41: 290-2.
24. Manchester D, Margolis HS, Sheldon RE. Possible association between maternal indomethacin therapy and primary pulmonary hypertension of newborn. *Am J Gynecol* 1976; 126 (4): 467-9.
25. Levin DL, Mills LJ, Weinberg AG. Hemodynamic, pulmonary vascular, and myocardial abnormalities secondary to pharmacologic constriction of fetal ductus arteriosus. *Circulation* 1979; 60 (2): 360-4.
26. Carp HJA, Fein A, Nebel L. Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988; 28: 273-7.
27. Brooks PM, Needs C. Antirheumatic medication in pregnancy (letter). *Br J Rheumatol* 1985; 24 (4): 382.
28. Russel JG. Antirheumatic medication in progranry (letter). *Br J Rheumatol* 1986; 25 (2): 229.