

# Sıçanlarda nitrofen ile oluşturulan diafragma hernisinde prenatal steroid ve TRH tedavisinin yeri

M. Kemal ÇİĞDEM, A. İhsan DOKUCU, Abdurrahman ÖNEN, Selçuk OTÇU, Hayrettin ÖZTÜRK, Engin DEVECİ, Selçuk YÜCESAN

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi ve Histoloji Anabilim Dalları, Diyarbakır ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa

## Özet

Doğumsal diafragma hernisi (DDH)'inde mortalite, eşlik eden pulmoner hipoplazi ve pulmoner hipertansiyon nedeni ile yüksektir. Bu nedenle prenatal dönemde akciğer hipoplazisinin engellenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu deneysel çalışmada sıçanlarda Nitrofen verilerek oluşturulan DDH modelinde, glukokortikoid ve "thyroid releasing hormone" (TRH)'un akciğer matürasyonu üzerine etkisinin olup olmadığını araştırılması amaçlanmıştır.

On Wistar-Albino türü dişi sıçan çiftleştirilerek gebeliğin 9.5'uncü gününde iki gruba nitrofen (100 mg), kontrol grubuna da zeytinyağı verildi. Nitrofen verilen grupların birine de 16. günden başlayarak beş gün süre ile glukokortikoid (0.25 mg/kg betametazon) ve TRH (25 µg/kg) verilmiştir. Gestasyonun 21. gününde sezaryan ile elde edilen fetüslerde her iki akciğerin histopatolojik kesitlerinin incelenmesinin yanı sıra, DNA analizleri ile matürasyon değerlendirmeleri yapıldı.

Kontrol grubunda 9, nitrofen grubunda 14 ve tedavi verilen grupta da 7 fetüs incelenebildi. Nitrofen grubu ile tedavi verilen grup arasında morfolojik değerlendirmeler ve DNA analizi yönünden belirgin farklılık saptanmadı. Histopatolojik incelemeler sonucunda her iki grubun da sol akciğerleri daha fazla olmak üzere hipoplazi bulguları sergiliyordu. Sonuç olarak nitrofen ile DDH oluşturulan bu sıçan modelinde prenatal TRH ve glukokortikoid tedavisinin akciğer matürasyonunu geliştirmek yönünde katkısı olmadığı görülmüştür. Bunun nedeninin, tedaviye gestasyonun 16. gününde başlamamız olduğunu düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Doğumsal diafragma hernisi, pulmoner hipertansiyon, fetüs hastalıkları, troid hormonları, steroidler, fetal organ gelişimi, fetal tedavi

## Giriş

Kaydedilen tüm gelişmelere karşın, doğumsal diafragma hernili olgularda mortalite halen yüksektir.

**Adres:** Dr. Murat Kemal Çiğdem, Dicle Üniv. Tıp Fak. Hastanesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Diyarbakır  
**Yayına Kabul Tarihi:** 15.9.2000

## Summary

**The role of prenatal steroid and TRH treatment in rats with nitrofen induced diaphragmatic hernia**

The mortality of congenital diaphragmatic hernia (CDH) is high due to associated pulmonary hypoplasia and pulmonary hypertension. Thus studies aiming to prevent pulmonary hypoplasia in the prenatal period are gaining importance. In this study the role of glucocorticoids and "Thyroid releasing hormone" (TRH) on lung maturation in rats with nitrofen induced CDH is investigated.

Ten pregnant Wistar-Albino female rats received nitrofen (100 mg) in two groups on their 9.5 day of pregnancy, while the control group had olive oil administered. In one nitrofen group additionally starting on day 16, glucocorticoids (0, 25 mg/kg betametazon) and TRH (25 µg/kg) was administered for 5 days. Fetuses were delivered by cesarean section on the 21st day of gestation and the fetal lungs were histopathologically investigated and DNA analysis and maturation were obtained.

Nine fetuses in the control, 14 in the nitrofen and 7 in the treatment group could be investigated. No significant difference was identified in the morphologic evaluation and DNA analysis of the nitrofen and treatment groups. Histopathology revealed hypoplasia that was more prominent in the left lung in both groups. In conclusion the prenatal administration of TRH and glucocorticoids in prevention of nitrofen induced CDH has not been found effective. We believe this may be related to the initiation of treatment on day 16 of gestation.

**Key words:** Congenital diaphragmatic hernia, pulmonary hypertension, fetal disease, thyroid hormones, steroids, fetal organ maturity, fetal therapy

Mortaliteyi etkileyen temel unsurlardan birisi akciğer hipoplazisi ve buna eşlik eden pulmoner hipertansiyondur (12,14,18). Akciğer hipoplazisinin, göğüs boşluğuna giren karın içi yapıların basısına bağlı olduğunu savunanların yanında, akciğerin primer patolojisi olduğunu ve diyaframadaki defektin de buna ikincil olarak geliştiğini önc sürenler de mev-

cuttur (4,9,12). Klinik uygulamada, prematüre doğum olasılığına karşı akciğer matürasyonunu arttırmak amacı ile prenatal dönemde glukokortikoidler kullanılmaktadır (2,3). Bunun yanında akciğerlerin büyüme ve gelişiminde hormonal faktörlerin de etkili olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur (1,7,17). Çalışmamızda, sıçanlarda doğumsal diafragma hernisi (DDH) modelinde, prenatal glukokortikoid ve TRH uygulamasının akciğer matürasyonunu etkileyip etkilemediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Vücut ağırlıkları 200-250 gr olan 10 adet Wistar-Albino türü dişi sıçan erkek sıçanlar ile çiftleştirildi. Günlük vaginal yayma izlemi yapılarak, spermin yaymada görüldüğü gün gebeliğin sıfırıncı günü olarak kabul edildi. Rastgele üç gruba ayrılan sıçanların ilk iki grupta yer alanlarına gebeliğin 9.5'uncü gününde gastrointestinal sistem yolu ile 1 ml zeytinyağı içerisinde 100 mg 2,4-diklorofenil-4-nitrofenil eter (Nitrofen, Riedel-de Haen, Almanya) verildi. Kontrol grubunu oluşturacak son gruba ise aynı günde 1 ml zeytinyağı verildi. Bir ve üçüncü gruplara ek işlem uygulanmazken, ikinci grupta yer alan gebe sıçanlara 16. Günden itibaren beş gün süre ile, 12'şer saat ara ile 0.25 mg/kg betametazon (Celestone, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 25 µg/kg TRH (Er-Kim, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Gebeliğin 21. gününde laparotomi yapılarak fetüsler toplandı ve vücut ağırlıkları kaydedildi. Fetüslerin karın boşlukları açılarak diafragma defekti olup olmadığı ve varsa tipi belirlendi. Diaframadaki defektin boyutu, barsakların göğüs içerisinde kapladıkları alan gözönüne alınarak üç derecede tanımlandı; % 50'sinden fazlasını kaplıyorsa büyük, % 50'den daha azını kaplamış ise orta ve defekte rağmen hiç göğüs içerisine girmemişlerse de küçük diafragma defekti olarak kabul edildi.

Sternotomi ile her iki akciğer çıkarılıp ayrı ayrı tartıldı. Akciğer doku örnekleri önce % 10'luk formaldehit solüsyonu içerisine alındıktan sonra, DNA analizi için doku örnekleri "Fermantesin DNA purifikasyonu kiti" kullanılarak "Templeyt DNA purifikasyonlu" direkt 260 nanometre spektrofotometrik "ultravisible" yöntem ile incelendi. Histopatolojik inceleme için ise, rutin takip işlemleri sonrası he-

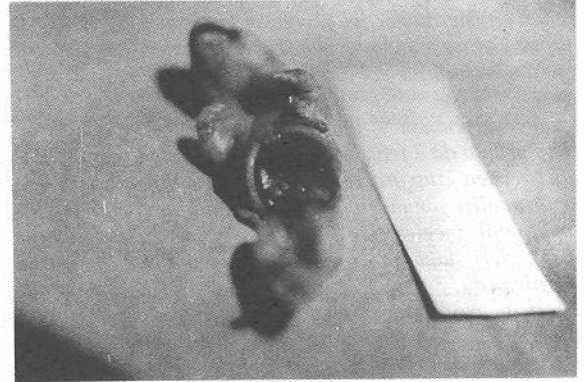
motoksilen-eozin ile boyanarak ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde non-parametrik "Kruskal-Wallis ve ANOVA" testi kullanıldı.

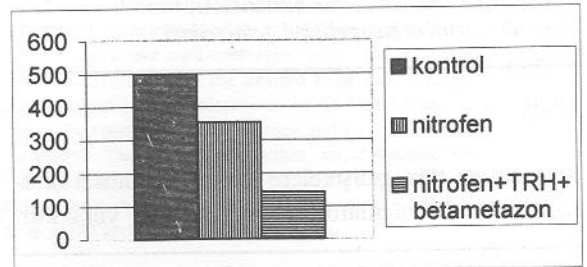
## Bulgular

Nitrofen verilen 7 sıçanın yavruları toksisiteye bağlı intrauterin kaybedilmişlerdi. Bu nedenle her gruptan sadece birer gebe sıçanın yavruları değerlendirmeye alınabildi. Yalnızca nitrofen verilen sıçandan 14, nitrofen ve tedavi verilen sıçandan 7, kontrol grubundan ise 9 adet fetüs elde edilmiştir. Kontrol grubunda hiç DDH gelişmemişken, diğer iki grupta saptanan DDH'ların tümü sol taraf yerleşimli idi. Nitrofen grubundaki 14 fetüsün 7'sinde büyük, beşinde orta ve 2'sinde de küçük diafragma defekti gözle-nirken, tedavi grubundaki 7 fetüsün 4'ünde büyük, ikisinde orta ve birinde de küçük defekt belirlendi (Resim 1).

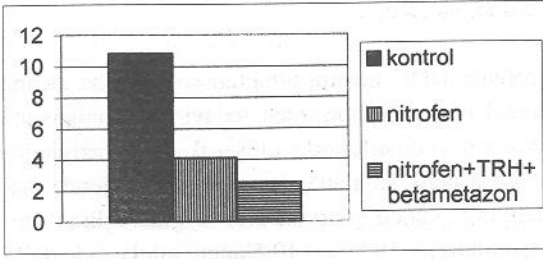
**Morfolojik değerler:** Ortalama vücut ağırlıkları, sol akciğer / vücut ağırlığı ve sağ akciğer / vücut ağırlığı



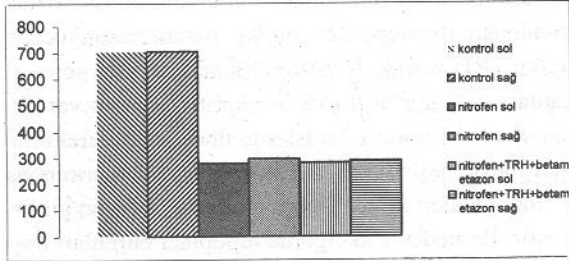
Resim 1. Sol büyük diafragma hernisi gelişmiş olan yavru sıçan.



Şekil 1. Kontrol ve deney grubu hayvanların total vücut ağırlıkları ortalamalarının karşılaştırılması (mg).



Şekil 2. Kontrol ve deney grubu hayvanların Sol AC/total vücut ağırlıkları ortalamalarının karşılaştırılması (mg).



Şekil 3. Kontrol ve deney grubu hayvanların sağ ve sol akciğer DNA miktarlarının karşılaştırılması (µg/100 mg).

oranları diğer iki grupta kontrol grubuna göre düşük olarak izlenmiştir (Şekil 1 ve 2). Nitrofen grubu ile tedavi grubundaki fetüslerin sol akciğer ve sol akciğer / vücut ağırlığı ortalamaları karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte kontrol grubunun sağ, sol akciğer ağırlıkları ve her iki akciğerin vücut ağırlığına oranları, nitrofen ve tedavi gruplarından belirgin yüksek bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$ ).

**DNA analizi:** Gruplara ait her iki akciğer için saptanan DNA analizi sonuçları Şekil 3'de gözlenmektedir. DNA değerleri kontrol grubu dışındaki iki grup arasında anlamlı farklılık göstermezken, bu iki grup ile kontrol grubu arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ).

**Histopatolojik değerlendirme:** Kontrol grubu fetüslerin her iki akciğerlerinin kesitleri, iyi gelişmiş sakküler formda alveol yapısı ve alveoller arası septumun normal kalınlıkta oluşu şeklinde matür akciğer görünümü sergiliyordu. Nitrofen grubundaki fetüslerin sol akciğerlerinde; alveol duvarında ve interalveoler septumda hafif kalınlaşma, bronşiol epitelinde papiller tarzda gelişimler ve yer yer bronşiol epitelinde dejenerasyon gözlemlendi. Bu grubun sağ akciğerlerinde ise histopatolojik olarak; alveol du-

varında ve interalveoler septumda hafif kalınlaşma, vasküler yapılarda yer yer hemoraji, alveol lümeninde genişleme ve yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu vardı. Tedavi grubunun sol akciğer kesitlerinde; alveol duvarında kalınlaşmaya ek olarak duvar yapısında bozulma ve interalveoler septumda yırtılma, fibrotik doku artışı, alveoler boşlukta eritrosit dağılımı gözlemlendi. Sağ akciğer kesitlerinin histopatolojik incelemesinde ise; bronşiol duvarındaki hücrelerde hipertrofi, papiller gelişimler, lümeninde yer yer deskuamatik hücreler, bronşiol epitelinin bazal membranında kalınlaşma ve fibrotik doku birikimi dikkati çekiyordu.

Bu incelemeler sonucunda, prenatal TRH ve glukokortikoid uygulanan ve uygulanmayan grup arasında maturasyon yönünden farklılık olmadığı görüldü.

## Tartışma

Nitrofenin hayvanlarda DDH oluşturabildiği ilk defa Nakao ve arkadaşları tarafından 1981 yılında bildirilmiştir (16). Yavru siçanlarda DDH oluşabilmesi için anne siçana hamileliğin kaçınıcı günü ve ne kadar nitrofen verilmesi gerektiği konularında Kluth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar yol gösterici olmuştur (12,13). Bununla birlikte yapılan deneysel çalışmaların çok büyük çoğunluğunda, çalışmamızda da uyguladığımız gibi hamile siçanlara gebeliğin 9.5'uncu günü 100 mg nitrofenin intragastrik olarak verilmesiyle sol DDH oluşturulmuştur (10,14,20). Kluth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, nitrofenin hamileliğin 10'uncu ya da 11'inci günü verilmesiyle sağ DDH oluşturulabileceği bildirilmekteyse de (13) sol DDH'nin insan modeline daha fazla benzerlik göstereceği düşünülerek yaptığımız çalışmada bu model tercih edilmiştir.

DDH'nin cerrahi tedavisi basit olmasına rağmen bu hastalarda mortalite halen çok yüksek seviyelerdedir. Bunun en önemli nedeni, bu patolojiyle birlikte görülen pulmoner hipoplazi ve pulmoner hipertansiyondur (5). Pulmoner hipoplazinin patogenezi için farklı görüşler ortaya atılmıştır. Birçok araştırmacıya göre, karın içi organların toraksa yer değiştirmesi sonucu akciğerlerin bası altında kalmasıyla normal gelişimleri engellenmekte ve bunun sonucu olarak da akciğer hipoplazisinin geliştiği öne sürülmektedir.



Bugün yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin gelişmesine, nitrik oksit ve surfaktan tedavilerine, yüksek frekanslı ventilasyon ve ECMO (ekstracorporeal membran oksijenasyonu)'nun kullanılmasına rağmen DDH'da mortalitenin % 60 seviyesinde olduğu bildirilmektedir (5,6). Bununla birlikte bu yöntemler oldukça pahalı ve deneyim gerektirdiğinden, sadece birkaç merkezde uygulanabilmektedir.

DDH tanısının prenatal dönemde konulabildiği düşünülerek bazı farmakolojik ajanların anneye uygulanması suretiyle bebeğin akciğer matürasyonunun prenatal dönemde hızlandırılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yöntemle hem daha ucuz hem de daha etkili bir tedavi olanağı sağlanabileceği düşünülerek bazı farmakolojik ajanlarla deneysel çalışmalar yapılmıştır (10,14,19,21). Antenatal dönemde uygulanması düşünülen ilk ajan, halen prematür doğum yapması olası annelere, bebeklerde hiyalen membran hastalığı gelişme riskini azaltmak amacıyla verilen glukokortikoidler olmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antenatal dönemde uygulanan glukokortikoid tedavisinin, DDH ile birlikte olan hipoplazik akciğerin parenkim matürasyonunu artırdığı bildirilmiştir (14). Koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada, DDH oluşturulmuş fetüslere antenatal dönemde uygulanan glukokortikoidin, hipoplazik akciğerlerin matürasyonunu belirgin bir şekilde arttırdığı görülmüştür (19). Bir başka çalışmada sıçanlarda DDH oluşturulduktan sonra prenatal dönemde anneye glukokortikoid uygulanmış ve yavru sıçanlar akciğerlerindeki hipoplazi yönüyle incelenmiştir. Alınan sonuçlar gerek DNA miktarları gerekse morfolojik olarak değerlendirildiğinde, glukokortikoid uygulanan grupta uygulanmayan grup arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur (8).

Yapılan araştırmaların büyük çoğunluğunda çalışmamızda uyguladığımız gibi glukokortikoid ve TRH kombine olarak kullanılmıştır. Bunun sinerjistik etki ile akciğer fonksiyonları üzerinde daha olumlu etki oluşturacağı düşünülmektedir (15). Bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda nitrofen vermek suretiyle DDH oluşturulan sıçanlarda, aynı taraf ve karşı taraf akciğerlerin hipoplazi ve immatüresini inceledik. Ayrıca nitrofen verilerek yavrularında DDH oluşturulan hamile sıçanlara steroid ve TRH verildikten sonra doğan yavruların akciğerlerine bu hormonların etkilerini, morfolojik, biyogenetik ve histopatolo-

jik olarak inceledik.

Nitrofenle DDH oluşturulduktan sonra gebe sıçana prenatal dönemde hormonal tedavi uygulanmasıyla yavruların akciğerlerinde oluşacak hipoplaziyi önlemeye yönelik yapılan çalışmaların birçoğunda, hamileliğin 9.5'uncu günü nitrofen uygulandıktan sonra hamileliğin 18.5 ve 19.5'uncu günlerinde 0.25 mg/kg betametazon ve 25 µg/kg TRH uygulanmıştır (8,14). Ancak biz çalışmamızda, hamileliğin 9.5'uncu günü nitrofen uygulandıktan sonra hamileliğin 16'ıncı gününden itibaren 0.25 mg/kg betametazon ve 25 µg/kg TRH verdik. Kluth ve arkadaşları (13) gebe sıçanlara 100 mg nitrofeni intragastrik olarak verdikten sonra 14 günlük fetüslerde diafragma defektinin gelişmeye başladığını ve hipoplazi bulgularının da 17'inci günden itibaren görülmeye başladığını bildirmiştir. Bu nedenle akciğerde hipoplazi bulguları başlamadan önce hormonların verilmesinin daha uygun olacağını düşünerek çalışmamızda steroid ve TRH 16'ıncı günden itibaren verildi. Bu çalışmada gebe sıçanlara gebeliğin 9.5'uncu günü 100 mg nitrofen intragastrik olarak verildikten sonra DDH gelişmiş yavruların, total vücut ağırlıkları, akciğer ağırlıkları ve akciğer ağırlığı/total vücut ağırlıkları ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında, anlamlı derecede düşük bulundu. Bununla birlikte gerek akciğer dokusundaki DNA miktarlarının ölçüm sonuçları, gerekse histopatolojik değerlendirme sonuçları DDH gelişen tarafta daha belirgin olmak üzere her iki akciğerde de hipoplazi lehine bulgular olduğunu gösteriyordu. Bu sonuçlar, daha önce yapılan gebe sıçanlara nitrofen verilmesiyle DDH oluşturulmuş hayvan modellerinde (12,14) elde edilen sonuçlarla benzerdir.

Nitrofen ve tedavi gruplarında elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında, beklediğimizin aksine hipoplazi yönüyle farklılık olmadığı görüldü. Prenatal dönemde verdiğimiz steroid ve TRH'nin akciğer matürasyonu üzerine bir etkisi olmamıştı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz DNA ve morfolojik sonuçlar ile histolojik değerlendirme sonuçları, daha önce yapılmış benzer çalışmalarla kıyaslandığında; morfolojik ve DNA sonuçları benzerken, Losty'nin çalışmasında elde ettiği histolojik değerlendirme sonuçları; hormonal tedavi uygulanan grubun, akciğer matürasyonu yönüyle uygulanmayan gruptan iyi

yönde oldukça farklı olduğu ve sonuç olarak steroid ve TRH'nin akciğer matürasyonu üzerine belirgin iyileştirici etkilerinin olduğu bildirilmiştir (14). Oysa bizim elde ettiğimiz histolojik değerlendirme sonuçları nitrofen ve tedavi grupları arasında farklılık olmadığı yönündeydi. Elde ettiğimiz sonuçların diğer çalışmalardan farklı olmasının nedeni, prenatal dönemde verilen hormonların değişik zamanlarda kullanılması olabilir.

Sonuç olarak, 1) sıçanlara gebeliğin 9.5'uncu günü nitrofen verilmesiyle sol DDH oluşabildiği 2) DDH oluşturulan sıçanlarda bilateral akciğer hipoplazisinin oluştuğu ve 3) intrauterin 16'ınca gündən itibaren gebelere 5 gün boyunca betametazon ve TRH'nin verilmesinin akciğer matürasyonu üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı saptandı.

## Kaynaklar

1. Bos AP, Tibboel D, Hazebroek FW: Surfactant replacement therapy in high risk congenital diaphragmatic hernia. *Lancet* 338:1279, 1991.
2. Caspi E, Shreyer P: Prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants by antepartum glucocorticoid therapy. *Br J Obstet Gynaecol* 83:187, 1976.
3. Collaborative group on Antenatal Steroid therapy: Effects of antenatal dexamethasone administration in the infant: Long-term follow up. *Am J Obstet Gynecol* 141:276, 1981.
4. Gray SW, Skandalakis JE: *Embryology for surgeons*. Saunders, Philadelphia, 1972, pp.359.
5. Harrison MR, Adzick NS, Flake AW: Congenital diaphragmatic hernia: An unsolved problem. *Semin Pediatr Surg* 2:109, 1993.
6. Harrison MR, Adzick NS, Estes JM: A prospective study of the outcome for fetuses with diaphragmatic hernia. *JAMA* 271:382, 1994.
7. Hitchcock KR: Hormones and the lung. Thyroid hormones and glucocorticoids in lung development. *Anat Res* 194:15, 1979.
8. Ijsseltijn H, Pacheco BA, Albert A: Prenatal hormones alter antioxidant enzymes and lung histology in rats with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol* 272:1059, 1997.
9. Iritani I: Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol* 169:133, 1984.
10. Islam S, Narra V, Cote GM: Prenatal vitamin E treatment improves lung growth with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 34:172, 1999.
11. İkagami M, Jobe AH, Newnham J: Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 156:178, 1997.
12. Kluth D, Kangah R, Reich P: Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 25:850, 1990.
13. Kluth D, Tenbrinck R, Ekspare M: The natural history of congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia in embryo. *J Pediatr Surg* 28:456, 1993.
14. Losty PD, Suen HC, Manganaro TF: Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *J Pediatr Surg* 30:420, 1995.
15. Morales WJ, O'Brien WF, Angel JL: Fetal lung maturation: The combined use of corticosteroids and thyrotropin releasing hormone. *Obstet Gynecol* 73:111, 1989.
16. Nakao Y, Iritani I, Kishimoto H: Experimental animal model of congenital diaphragmatic hernia induced chemically. *Teratology* 24:11A, 1981.
17. O'Neil JA, Rowe MI: Congenital diaphragmatic hernia. *Pediatric Surgery*, Fifth edition, pp.819, 1998.
18. Puri P, Gorman WA: Natural history of congenital diaphragmatic hernia: implication for management. *Pediatr Surg Int* 2:327, 1987.
19. Schnitzer JJ, Hedrick HL, Pacheco A: Prenatal glucocorticoid therapy reverses pulmonary immaturity in congenital diaphragmatic hernia in fetal sheep. *Ann Surg* 224:430, 1996.
20. Suen HC, Catlin EA, Ryan DP: Biochemical immaturity of lungs in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 28:471, 1993.
21. Warkany J, Roth CB: Malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. *J Nutr* 35:1, 1948.