

Klomifen Sitrat'ın Farelerin İntrauterin Gelişmeleri Üzerine Etkisi

Şahin A. SIRMALI*
Şermin KALAYCI**

ÖZET

Bu çalışmada, klomifen sitratın farelerin intrauterin gelişmeleri üzerine etkisi araştırıldı. Gebeliğin 7. ve 8. günleri ilaç verilen farelerde gebelik görülmedi. Gebeliğin 14. ve 15. günleri ilaç verilen 30 fareden 20'si gebeydi. 20 anneden 65 fötüs elde edildi. 65 fötustan üçü anormaldi.

SUMMARY

Effects of Clomiphene Citrate on the Intrauterine Development of Mice

In this study the effects of clomiphene citrate on the intrauterine development of mice, has been investigated. Mice that were injected on the 7. or 8. days of gestation did not seen pregnancy. 20 mice were pregnant from 30 mice wich were injected on 14. or 15. days of gestation. 65 fetuses were obtained from 20 mothers. Three of the 65 fetuses were abnormal.

Klomifen sitrat, teratojenik etkisinin olup olmadığı tartışılan ya da en azından konjenital malformasyon olasılığını artırdığından kuşku duyulan ilaçlar grubundandır ¹.

Dişi sıçanlara gebelik sırasında verildiğinde; abortus sayısını artırdığı ve doğan yavru sayısını azalttığı (antifekundite özelliği) gözlenmiştir ^{2,3}. Doğan yavruarda konjenital malformasyonlara neden olduğu da bildirilmektedir ². İnsanlarda ise, klomifen sitratla sağlanan gebeliklerden —az da olsa— bir bölümünün, başta anensefali olmak üzere konjenital malformasyonlarla sonuçlandığına ilişkin olgu raporlarına rastlanmıştır ⁴⁻⁹.

* *Biyolog Dr., U.Ü. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi*

** *Prof. Dr., U.Ü. Tıp Fak. Temel Tıp Bilimleri Bölümü Öğretim Üyesi*

Günümüzde yaygın olarak kullanılan klomifen sitratın, son yayınlarda teratojenik etki yönünde şüpheli ilaçlar grubunda olması ve taranan kaynaklarda, farelerde yapılmış bir çalışmaya rastlanmaması bu araştırmanın yapılmasının temelinin oluşturmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

"U.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi"nden sağlanan ortalama 30 gr. ağırlığında 80 adet dişi fare (Swiss-Albino) üç gruba ayrıldılar ve deney süresince ad libitum beslendiler.

1. Grup: (20 adet) Kontrol olarak alındı ve diğerlerine intraperitoneal (İP) olarak ilaç verildiğinde, bunlara aynı hacimde damıtık su İP olarak verildi.

2. Grup: (30 adet) Gebeliğin 7. ve 8. günü, günde 2 mg/kg dozunda klomifen sitrat (1-(P/beta-diethylaminoethoxy/-phenyl) - 1.2 - diphenyl - 2 - chloroethylene citrate), 0,2 cc damıtık su içinde süspansiyon halinde İP olarak verildi.

3. Grup: (30 adet) Gebeliğin 14. ve 15. günü, 2. gruptaki gibi ilaç uygulandı.

Tüm gruplardaki fareler, her seferinde 20 tane olmak üzere iki dişi fare, içinde bir erkek fare bulunan kopulasyon kafesine alındı ve her üçünün de numaraları kaydedildi. Dişi fareler, tüm gece erkek farelerle beraber bırakıldılar ve ertesi sabah kopulasyon plağı görülen ya da vajinal smearlerinde spermium bulunan fareler için o gün gebeliğin sıfıncı günü olarak kabul edildi^{2,3}. Gebeliği kanıtlanamayanlar için aynı işlem, ertesi gün saat 09.00 da yeniden yapıldı. Gebeliğin 5. günü, yeniden vajinal smear alındı.

Tüm gruplardaki fareler, gebeliğin 19. günü deserebre edildiler. Hemen batin açılarak organlar yerinde gözlemlenip sonra uterus ve ovaryumları çıkartıldı. Özellikle gebe olanların uterusları makroskopik olarak incelendi. Daha sonra, median bir şak yapılarak uterus açıldı. Plasentaların genel görünüşleri ve implantasyon yerleri incelenerek kaydedildikten sonra fötüsler plasentalarıyla birlikte çıkartıldı. Fötüs boyları C-R olarak ölçüldükten sonra fötüs ve plasentalar ayrı ayrı tartıldı. Fötüsler steromikroskopta incelendi. Bunlardan parafin bloklar hazırlandı ve sagittal planda kesitler alındı. Kesitler Haematoksilen-Eosin yöntemiyle boyanarak ışık mikroskopik düzeyde değerlendirildiler.

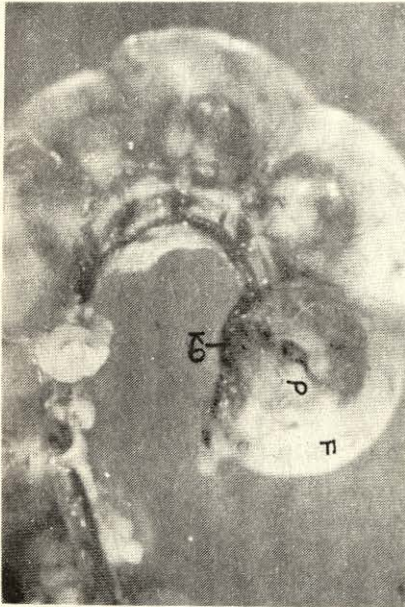
BULGULAR

Kontrol grubu olan I. grupta toplam 20 fareden 17'si gebeydi. Gebeliğin 19. günü batin açılarak yapılan incelemede, uterus içindeki fötüslerin canlı oldukları belirgin olarak görülebiliyordu. Toplam 139 fötüs elde edildi (Tablo 1). Fötüslerin

Tablo: I

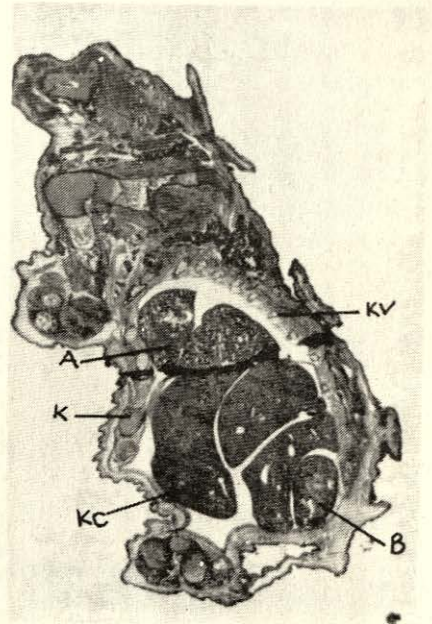
Kullanılan fare sayısı	Doğuran fare sayısı	Doğurma yüzdesi	Fötüs sayısı	Malformasyon yüzdesi	
1. Grup	20	17	85.0	139	0.71
3. Grup	30	20	66.66	65	3.07

tomurcuk şeklindeydi. Üzeri parlak ve çok ince bir deri ile kaplıydı ve mikroskopik incelenmesinde beyin görülmedi. Beynin olması gereken yerde gelişmiş bir çizgili kas kümesi bulunmaktaydı. Kafatası kemiklerinde bir düzensizlik ve asimetri vardı (Resim 4). Diğer ikisinde ise baş, gövde ve ekstremiteler ayırıl edilebiliyordu ve uzun tomurcuklar şeklindeydi. Derileri; çok ince, kıvrıntısız, gergin, parlak ve ödemliydi. Parmaklar tam ayrılmamış yarıklar şeklindeydi. Gözler belirgin, ancak kulak kepçesi gelişmemişti (Resim 5). Bu anomalili fötuslar mikroskopik olarak incelendiklerinde, birisinin beyninin çok küçük ve kafatası boşluğunu tümüyle doldurmuş durumda olduğu görüldü. Sternum ve özellikle klounna vertebralis çok düzensiz ve kıvrıntılıydı ve çok kalın bir diyafragma dikkat çekiyordu (Resim 6). Makroskopik olarak yukarda anlatılana çok benzeyen malformasyonlu üçüncü fötusa dışardan bakıldığında, ağız ve dudakların iyi gelişmediği görülmekteydi. Beyin kontrol grubundan ayrımlı değildi. Kolumna vertebralis ve sternum, diğerindeki gibi kıvrıntılı ve çok düzensizdi, ayrıca ossifikasyon merkezleri de belirgin değildi (Resim 7).



Resim: 3

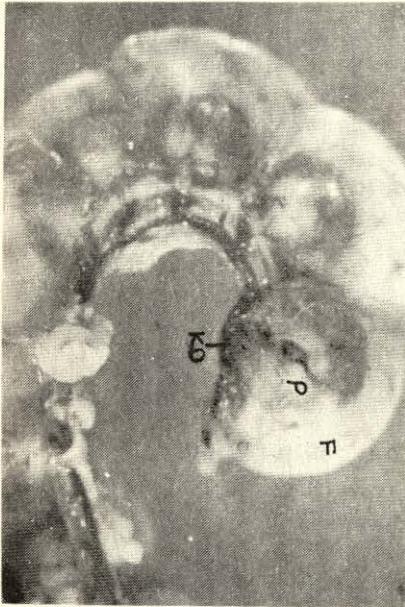
Deney grubunda gebe bir farenin uterusu. F; fötus, P; plasenta, KD; kan damarı.



Resim: 4

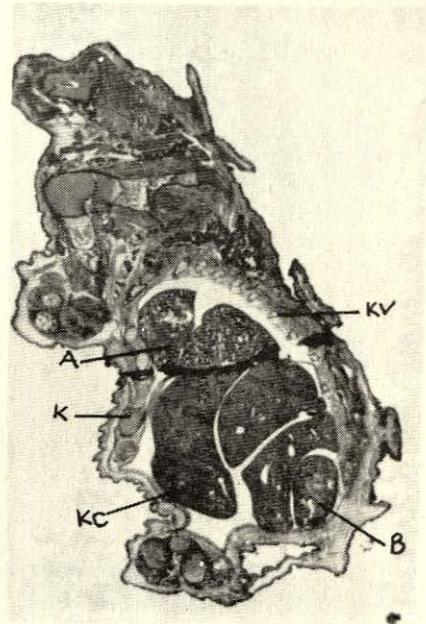
Deney grubu malformasyonlu fötus (Sagittal kesit). A; akciğer, KC; karaciğer B; böbrek, KV; kolumna vertebralis, K; kosta. HE.

tomurcuk şeklindeydi. Üzeri parlak ve çok ince bir deri ile kaplıydı ve mikroskopik incelenmesinde beyin görülmedi. Beynin olması gereken yerde gelişmiş bir çizgili kas kümesi bulunmaktaydı. Kafatası kemiklerinde bir düzensizlik ve asimetri vardı (Resim 4). Diğer ikisinde ise baş, gövde ve ekstremiteler ayırıl edilebiliyordu ve uzun tomurcuklar şeklindeydi. Derileri; çok ince, kıvrıntısız, gergin, parlak ve ödemliydi. Parmaklar tam ayrılmamış yarıklar şeklindeydi. Gözler belirgin, ancak kulak kepçesi gelişmemişti (Resim 5). Bu anomalili fötuslar mikroskopik olarak incelendiklerinde, birisinin beyinin çok küçük ve kafatası boşluğunu tümüyle doldurmuş durumda olduğu görüldü. Sternum ve özellikle klounna vertebralis çok düzensiz ve kıvrıntılıydı ve çok kalın bir diyafragma dikkat çekiyordu (Resim 6). Makroskopik olarak yukarda anlatılana çok benzeyen malformasyonlu üçüncü fötusa dışardan bakıldığında, ağız ve dudakların iyi gelişmediği görülmekteydi. Beyin kontrol grubundan ayrımlı değildi. Kolumna vertebralis ve sternum, diğerindeki gibi kıvrıntılı ve çok düzensizdi, ayrıca ossifikasyon merkezleri de belirgin değildi (Resim 7).



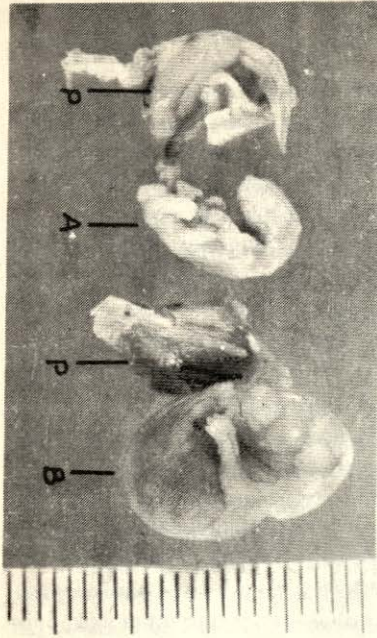
Resim: 3

Deney grubunda gebe bir farenin uterusu. F; fötus, P; plasenta, KD; kan damarı.



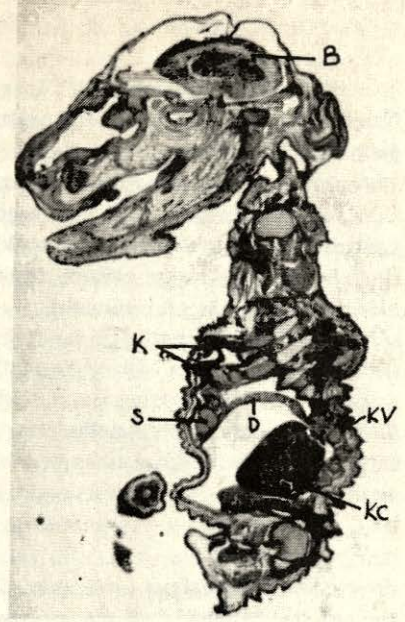
Resim: 4

Deney grubu malformasyonlu fötus (Sagittal kesit). A; akciğer, KC; karaciğer B; böbrek, KV; kolumna vertebralis, K; kosta. HE.



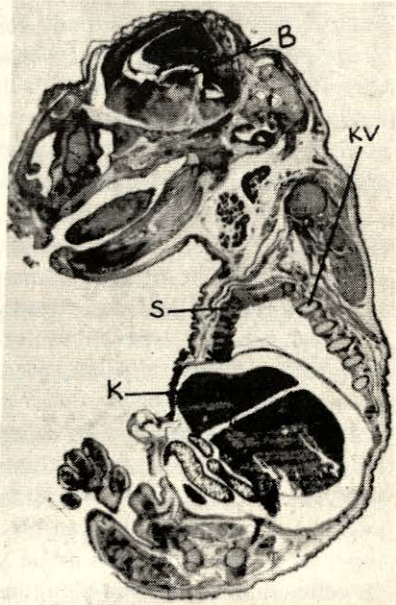
Resim: 5

A; Deney grubunda malformasyonlu fötüs. B; Deney grubunda normal görünümlü fötüs. P; plasenta.



Resim: 6

Deney grubu malformasyonlu fötüs (Sagital kesit). B; beyin, K; kosta, KV; kolumna vertebralis, S; sternum, D; diyafragma, KC; karaciğer. HE.



Resim: 7

Deney grubu malformasyonlu fötüs (Sagital kesit). B; beyin, KV; kolumna vertebralis, S; sternum, K; karaciğer. HE.

TARTIŞMA

Belirtildiği gibi, gebeliğin 14. ve 15. günlerinde klomifen sitrat etkisinde kalan fütuslarda yüzde 3.07 oranında konjenital malformasyon saptanmıştır. Belirgin malformasyonluların dışında kalan diğer fütusların ağırlıkları kontrole göre azalmıştı. Plasenta ağırlıkları ise kontrol grubuna oranla artmıştı ve disk şekli yitirip yuvarlağa yakın bir şekil almışlardı. Bu görünüşleriyle 14 günlük plasentaları anımsatıyorlardı. Gebeliğin 14. günü verilen klomifen sitratın, plasentaların o günkü şekillerinde kalmalarına neden olduğu düşünülebilir. Bu çalışmada fötal sirkulasyonda patolojik bir değişme olup olmadığı incelenemedi. Ancak, klomifen sitrat verildikten sonra gebeliğini sürdürebilen farelerin uteruslarını besleyen kan damarlarının çaplarının büyümesi ve taşıdıkları kan miktarının çoğalmış olması, fütusların kanlanma gereksinmelerinin arttığına işaret edebilir. Sıçanlarda yapılan benzer bir çalışmada da araştırmacılar görülen malformasyonların nedenini, klomifen sitratın uterotopik etkisine bağlamaktadırlar². Barnes ve Mayer sıçanlarda, gebeliğin 13-17. günlerinde verilen klomifen sitratın fütuslarda zararlı bir etki oluşturmadığını bildirmektedirler³. Bu bulgunun sonuçlarımıza uymamasının nedeni, kullanılan deney hayvanı türünün ve verilen dozun ayırtımlı olmasına bağlı olabilir. Gebelik sırasında klomifen sitratın etkisinde kalmış insanlarda, distal sindaktili ve torako-lomber skolioz görüldüğü bildirilmektedir⁵. Kimi araştırmacılar, konjenital malformasyonlar ve anomaliler ile ovulasyon indüke eden ilaç arasında bir ilişki kurabilmek için daha çok kanıt gereksinme olduğunu bildirmektedirler. Onlara göre malformasyonun nedeni, ovulasyonu uyaran ilaçtan çok supfertiliteye neden olan etken olabilir⁶⁻⁷. Bu tip kadınlar, farkedilmemiş erken spontan abortuslar nedeniyle steril ya da supfertil olarak tanımlanmış olabilirler⁸. Anensefali olgularını bildiren raporlar incelendiğinde bunların bir bölümünde klomifen sitratın yanında başka ilaçların da kullanıldığı görülmektedir^{4,9}. Bu durumda yalnızca klomifenin olay üzerindeki etkisini ayırt etmek güçtür. Kimi olgularda ise hastanın gebe kaldığı farkedilmemiş ve kadın gebeliğinin ilk dönemlerinde yanlışlıkla ilaç almıştır⁶⁻⁸. Bu gibi durumlarda ise etkenin fertilizasyondan önce mi, yoksa sonra mı olduğu sorusu doğmaktadır. Kimi araştırmacılar, anensefali ile klomifen sitrat arasında nedensel bir ilişki kurulabileceğini, ancak bunun için daha çok kanıt gereksinme olduğunu kabul etmektedirler^{4-6,9}.

Klomifen sitratın, uterus üzerinde anti-östrojenik bir etki oluşturduğu kabul edilmektedir^{1,10,11}. Yalnızca östrojenin uterusu girmesini engellemekle kalmayıp, olasılıkla uterusu dışarıya atılmasını da hızlandırdığı bildirilmektedir¹⁰. Klomifen sitratın, östrojenin uterus üzerindeki etkisini de engellediğinin bilinmesi, çalışmamızda, gebeliğin erken dönemlerinde ilaç uygulandıktan sonra neden fötüs elde edilmediğini açıklamaya yardımcı olur kanısındayız. Bu bulgu, daha önce yapılan çalışmaların bir bölümüyle uyum gösterirken³, bir bölümünün sonuçlarından bir dereceye kadar ayırtımlıdır^{2,3}. Sıçanlara gebeliğin 1-7. günleri ile 1-4. günleri sırasında ve sıfırıncı günü yapılan klomifen sitrat uygulamasından sonra fötüs elde edilemediği bildirilmektedir^{2,3}. Barnes ve arkadaşları bu durumun; ilacın uterusu implantasyona uygun olmayan bir ortam oluşturan endokrin etkisi (anti-gonadotropik ya da anti-östrojenik) ile mi yoksa döllenmiş ovumun tüplerden geçerken lizis edilmesinin sonucu mu olduğunun bilinmediğini belirtmektedirler³. Ancak, ila-

cın anti-östrojenik etkisi üzerinde daha çok durmaktadırlar ve bunun nedenini de, östrojenin implantasyonun sağlanmasında etkin olduğu verisine bağlanmaktadır. Gebeliğin hemen implantasyondan sonraki dönemlerinde ilaç uygulanmasından sonra embriyoların yaşamlarını yitirmeleri, olasılıkla klomifen sitratın anti-gonadotropik etkisi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. İlaç uygulaması aynı zamanda plasenta gelişimi başlamadan önce yapılmış olduğundan, ilacın uterus üzerindeki anti-östrojenik etkisi, plasenta gelişimini olumsuz yönde etkilemiş olabilir. Buna bağlı olarak embriyonun, yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan plasenta hormonlarından yoksun kalmış olması düşünülebilir³. Bundan önceki araştırmacılar, embriyo ya da fötusun yaşı ilerledikçe klomifen sitratın daha az etkili olduğuna işaret etmektedirler²⁻³. Bizim bulgularımız ve düşüncemiz de bu doğrultudadır. Çalışmamızda farelerde gebeliğin 14. ve 15. günü klomifen sitrat uygulanmış grupta gebelik oranı % 66,66 (Kontrol % 85,0), fötus sayısı/gebelik sayısı ise 3,25 (kontrol 8,17) idi. Barnes ve Mayer'in sonuçları ise, fötus oranı 0,2-0,8 ve kontrol 8,7'dir³. Mc Cormack ve Clark'ın sonuçlarında ise fötus oranı 0,66'dır². Aradaki farklılık temelde, kullanılan hayvan türlerinin ayrımlı oluşundan ve ilaç kullanıldığı sırada embriyo ya da fötusun yaşından ileri gelebilir. Bizim sonuçlarımız, Segal ve Nelson'un % 50 gebelik sonucuyla uyum göstermektedir³.

Klomifen sitratın teratolojik etkisinin olup olmadığı, daha önce yapılan hayvan deneyleri ile olgu raporlarının ve modern teratolojinin ışığı altında tartışıldığında, bu ilaç için daha ayrıntılı hayvan deneylerinin yapılması gerektiği sonucuna varılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. GOLBUS, M.S.: Teratology for the obstetrician: Current status. *Obstet Gynecol*, 55: p. 269-277, 1980.
2. MC CORMACK, S., CLARK, J.H.: Clomid administration to pregnant rats causes abnormalities of the reproductive tract in offspring and mothers. *Science*, 204: p. 629-631, 1979.
3. BARNES, L.E., MEYER, R.K.: Effects of ethamoxypriphetol, MRL-37 and clomiphene on reproduction in rats. *Fertil Steril*, 13: p. 472-480, 1962.
4. BARRETT, C., HAKIM, C.: Anencephaly, ovulation stimulation, subfertility and illegitimacy. *Lancet*, 2: p. 878, 1975.
5. BERMAN, P.: Congenital abnormalities associated with maternal clomiphene ingestion. *Lancet*, 2: p. 878, 1975.
6. DYSON, J.L., KOHLER, H.G.: Anencephaly and ovulation stimulation. *Lancet*, 1: p. 1256-57, 1973.
7. SANDLER, B.: Anencephaly and ovulation stimulation. *Lancet*, 2: p. 379, 1973.
8. SINGH, M., SINGHI, S.: Possible relationship between clomiphene and neural tube defects. *J Pediatr.*, 93 (1): p. 152, 1978.
9. YLIKORKALA, O.: Congenital anomalies and clomiphene. *Lancet*, 2: p. 1262, 1975.

10. ROY, S., MAHESH, V.B., GREENBLATT, R.B.: Effects of clomiphene on the physiology of reproduction in the rat: III. inhibition of uptake of radioactive oestradiol by the uterus and the pituitary gland of immature rat. Acta Endocrinol (Kbl), 47: p. 669-675, 1964.
11. HOLTKAMP, D.E., GRESLIN, J.G., ROOT, C.A., LARNER, L.J.: Gonadotrophin inhibiting and anti-fecundity effects of chloramiphene (26054). Proc Soc Exp Biol Med, 105: p. 197-201, 1960.

Dr. Şahin A. SIRMALI, Ph.D.
U.Ü. Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı
BURSA