

Klomifen Sitrat'ın Farelerin Östrus Siklusu ve Üremeleri Üzerine Etkisi

Şahin A. SIRMALI *
Şermin KALAYCI **

ÖZET

Bu çalışmada klomifen sitratın, farelerin östrus siklusu ve gebe kalmaları üzerine etkisi araştırıldı. İlaç, kopulasyon ve ovulasyondan 1 ve 2 gün önce verildi. 2.0 mg/kg/gün dozunda verilen ilaç farelerin östrus siklusunun düzenini bozdu. Kontrol grubunda 20 fareden 18'i gebe kalırken, ilaç uygulanan 40 fareden hiçbiri gebe kalmadı.

SUMMARY

Effects of Clomiphene Citrate on the Estrous Cycles and Fertility of Mice

In this study the effects of clomiphene citrate on the estrous cycles and fertility of mice, has been investigated. Compound was administered 1 or 2 days before copulation and ovulation. Dose of 2.0 mg/kg/day interrupted the estrous cycle of mice. None of the 40 treated animals became pregnant, whereas 18 of 20 control animals became pregnant.

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

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

Klomifen sitratın, dişi sıçanlara gebelikten önce verildiğinde ovulasyonu baskıladığı ve gebeliği önlediği¹⁻⁴, tavşanlarda ise ovulasyonun uyarılması üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı² bildirilmektedir. Klomifen sitratın sıçanlarda ovulasyonu baskılayıp gebeliği önlemesine karşın, kadınlarda ovulasyonu büyük ölçüde uyardığı (yüzde 70-90) ve ovulasyonu uyarmasından daha düşük bir oranda (yüzde 25-50) da gebeliği sağladığı kanıtlanmıştır⁵⁻⁷. Klomifen sitrat verilen sıçanlarda östrus siklusunun bozulduğu^{1,3,6}, normal menstruasyon gören kadınlarda korpus luteum evresini uzattığı ve kontraseptiflerin ovulasyonu önleyici etkilerini ortadan kaldırdığı^{5,8} belirtmektedir.

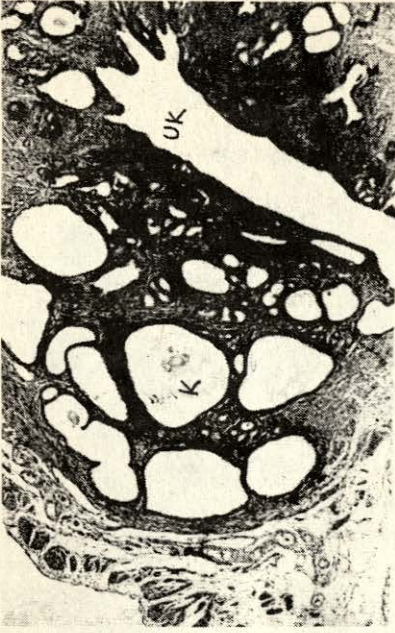
Bu çalışmada, kadınlarda steriliteyi tedavi amacıyla kullanılan, buna karşın sıçanlarda gebeliği önleyen klomifen sitratın fareler üzerine etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

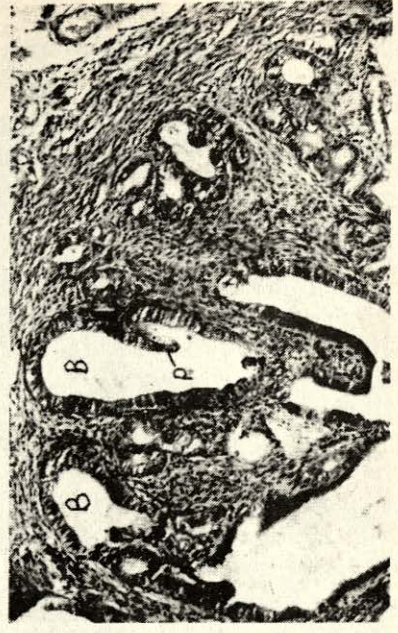
"U.Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi"nden sağlanan ortalama 30 gr. ağırlığında 60 adet dişi fare (Swiss-Albino) kullanıldı. Bunlardan 40 tanesi deney, 20 tanesi de kontrol gruplarına ayrıldı ve tümü deneyin her evresinde ad libitum beslendi. Tüm gruplardaki farelerin östrus evrelerini saptayabilmek için saat 09.00 - 10.00 arası vajinal smear alındı ve yarı yarıya etil alkol + eter'de fiks edildi. Daha sonra Harris' haematoxylin + Shorr's trichrom ile boyandı. Smear alındığında östrus evresinde bulunan fareler için o gün, östrus siklusunun 1. günü olarak kabul edildi⁹. Deney grubundaki farelere, 3. ve 4. gün saat 09.00'da 2 mg/kg/gün dozunda klomifen sitrat, damıtık suda süspansiyon yapılmış şekliyle 0,2 cc. hacminde intraperitoneal (İP) olarak enjekte edilirken, kontrol grubuna aynı hacimde damıtık su verildi. 4. gün saat 16.00'da iki dişi fare, içinde bir erkek fare bulunan çiftleşme kafesine alındı. Dişi fareler, tüm gece erkek farelerle beraber bırakıldılar. 5. gün saat 09.00'da kopulasyon plağı görülen ya da vajinal smearinde spermium bulunan fareler için o gün gebeliğin sıfıncı günü olarak kabul edildi¹³. Gebeliği kanıtlanamayanlar için aynı işlem, ertesi gün saat 09.00'da yeniden yapıldı. Gebeliğin 5. ve 10. günü, yeniden vajinal smear alındı. Her iki gruptaki fareler gebeliğin 19. günü deserebre edildi. Batın açılarak uterus ve ovaryumlar çıkartıldı ve % 10 formalde fiks edilip parafin blok hazırlandı. Daha sonra kesitler Haematoksilen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR

Kontrol grubunda toplam 20 fareden 18'i gebeydi. Deney grubunda 40 fareden hiç birinde gebelik görülmedi. Bu farelerin uterus kesitlerinde, kistik glandular hiperplazi dikkati çekiyordu (Resim: 1). Bez lümenini döşeyen epitel yer yer çok katlı epitel tipindeydi ve lümeneye doğru papiller uzantılar yapmıştı (Resim: 2). Lümen epitelinde yer yer mitoz görülüyordu (Resim: 3). Ovaryum kesitlerinde oldukça gelişmiş korpus luteumlar çoğunlukta idi (Resim: 4). Bazı ovaryumlarda seröz kistler görüldü (Resim: 5). Kontrol grubunda gebe kalmayan iki farenin uterus kesitlerinde kistik yapılara rastlanmadı (Resim: 6). Ovaryumları da normal görünümdeydi.

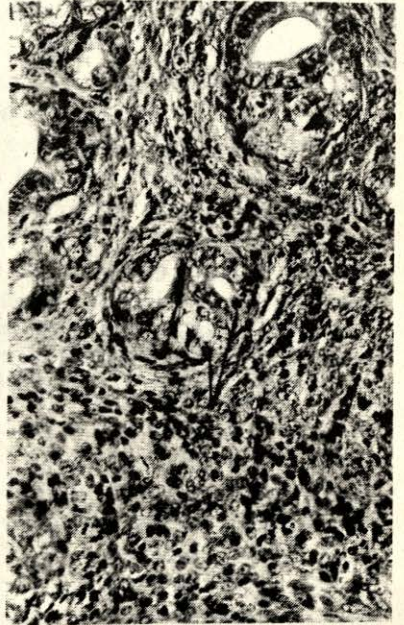


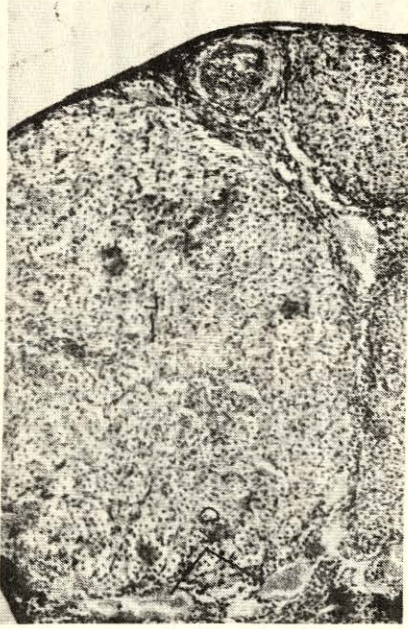
Resim: 1
Deney grubunda gebe kalmayan
farelerin uterus kesiti (enine kesit)
UK; uterus kavitesi, K; kist. HE. 63X.



Resim: 2
B; aynı grubun değişik çap ve bü-
yüklükteki uterus bezleri, P; papilla.
HE. 160X.

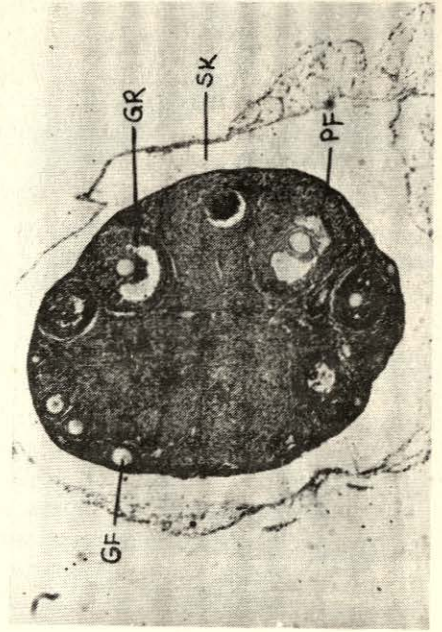
Resim: 3
M; bez lümenini döşeyen epitelde
mitoz. HE. 400X.





Resim: 4

Deney grubu ovaryumunda oldukça gelişmiş korpus luteum. L; lutein hücreler, KD; kan damarı. HE. 160X.



Resim: 5

Deney grubu ovaryumunda seröz kist. SK; seröz kist, PF; Primer foliküller, GF; gelişmekte olan foliküller, GR; Graaf folikülü. HE. 63X.



Resim: 6

Kontrol grubu uterus kesiti (enine kesit). UK; uterus kavitesi, E; endometrium, M; myometrium. HE. 63X.

TARTIŞMA

İlacı ovulasyondan 2 gün önce verebilmek için, farelerin yaklaşık 4-5 gün süre östrus siklusu^{9,10} saptandı. Farelerde ovulasyonun, östrus siklusunun başlamasından 6-10 saat sonra (% 80'i, 10. saatte) olduğu bilinmektedir¹⁰. Bu bilgilerin ışığı altında, farelere ilaç uygulanmadan önce vajinal smear alınarak bir sonraki olası ovulasyon zamanı saptandı ve ona göre ilaç verildi. Bir sonraki ovulasyon zamanının bilinmesi gebelik oranını yükseltme olanağını da sağlamaktadır. Çünkü farelerde gebe kalma olasılığının; ovulasyondan 0-1 saat önce % 83, 10-12 saat önce % 50, 12-14 saat önce % 20 ve 14 saat önce sıfır olduğu bildirilmektedir¹⁰. Farelerde tüm dişilerin % 90'ının, östrus başlangıç günü saat yaklaşık 16.00'da etkin duruma geldiği taranan kaynaklarda rastlanan bilgiler arasındadır¹⁰. Bu nedenle dişi fareler, saat 16.00'da erkek kafesine konuldu. Kopulasyon ve ovulasyon büyük bir olasılıkla o gece olacağından, dişiler 24 saat yerine yalnız tüm gece erkek kafesinde tutuldu¹³.

Deney grubunda gebeliğin hiç görülmemesi, kimi araştırmacıların sıçanlarda elde ettikleri sonuçlarla uyum içindedir^{1,2,4,6}. Araştırmacılar bu sonuçları, hem östrojenik ve hem de antiöstrojenik özelliğe sahip olan klomifen sitratın^{1,5,6,8,11}, antiöstrojenik etkisine bağlamaktadırlar^{2,3,6,7,11}. İlacın östrojen reseptörlerine bağlanmak için doğal östrojenle yarışmaya girdiği, östrojenin yerini alarak (kompetitif antagonizm) reseptörleri bloke ettiği ve böylece östrojenin etkinlik göstermesini engellediği kabul edilmektedir. Bu engelleme başlıca östrojenin; LRH, FRH ve gonadotropinlerin salgılanmasını baskılayan negatif feedback'i üzerindedir^{3,5-8,11}.

¹². Kimi araştırmacılar sıçanlarda klomifen sitrat uygulamasından sonra uterus, hipofiz ve hipotalamus tarafından alınan östradiol niceliğinin azaldığını ve bu azalmanın ilacın dozuna bağlı olduğunu göstermişlerdir^{7,11,12}. Kato ve arkadaşları, östradiolün ya hiç bir metabolik değişikliğe uğramadan, ya da çok az değişikliğe uğrayarak anterior hipotalamusta tutulduğunu ve biriktirildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, radyoaktif östradiol ile yaptıkları çalışmada klomifen sitratın, östradiolün anterior hipotalamus tarafından alınmasını önemli ölçüde azaltırken, hipotalamusun diğer bölgelerindeki östrojen reseptörlerini etkilemediğini göstermişlerdir¹². Östrojenin fare ve sıçanlarda pozitif feedback etkisini anterior hipotalamus üzerinden, FSH ve LH salgılanması üzerindeki negatif feedback etkisini ventral hipotalamus üzerinden oluşturduğu bildirilmektedir⁹. Klomifen sitratın fare ve sıçanlar üzerindeki infertilite etkisi bu verilere dayanılarak açıklanabilir. Klomifen sitratın, östradiolün anterior hipotalamus tarafından alınmasını engellemesi, başka bir deyişle östradiolün anterior hipotalamus üzerine etki göstermesini engellemesi, östrus siklusu gösteren fare ve sıçan gibi türler için önemlidir. Bu türlerde östrojenin, anterior hipotalamusu etkileyerek östrus siklusunu kontrol altında tuttuğu bilinmektedir. Anterior hipotalamusun, östrojen tarafından etkilenmesi engellendiğinde (örneğin; ovaryumlar çıkartılarak doğal östrojen kaynağı kesildiğinde) bu hayvanların bir daha östrusa girmedikleri görülmektedir⁹. Overyektomi yapılmadan, klomifen sitrat uygulayarak doğal östrojenin pozitif feedback etkisi engellendiğinde de sonuç aynı olabilir. Verilen klomifen sitratın dozuna bağlı olarak ovulasyon sayısının azaldığını bildiren kaynak bu görüşü destekler görünümündedir⁴. Yaptığımız araştırmada, klomifen sitrat uygulanan farelerin aralıklarla incelenen

vajinal smearlerinde, östrus göstermeleri gereken günlerdeki smearleri diöstrus görünümdeydi. Farelerin, ilaç uygulandıktan sonra östrus göstermedikleri şeklindeki bulgumuz, sıçanlarda elde edilen bulgulara uymaktadır ^{1.3.4}. Ventral hipotalamustaki östrojen reseptörleri, klomifen sitrat tarafından bloke edilmediğinden, östrojenin bu bölgedeki LH ve FSH salgılanması üzerindeki negatif feedback etkisi engellenemeyecektir. Buna bağlı olarak LH ve FSH niceliği azalacaktır. Sıçanlara ilaç verildikten sonra FSH ve LH salgılanmasının baskılandığını bildiren kaynaklar ^{1.7.8}, bu görüşü destekler doğrultudadır. Sıçan ve farelere klomifen sitrat verildikten sonra üreme fizyolojilerinde ortaya çıkan değişikliklerin bu açıdan açıklanabileceği kamsındayız.

İnsanların menstrual siklus göstermesine karşılık, fare ve sıçan gibi türlerin östrus siklusunun olması, klomifen sitratın insanlarda ovulasyonu ve gebeliği uyarmasına karşılık fare ve sıçanlarda baskılanmasını açıklayabilmemize yardımcı olabilir.

İnsanlar ve kemiriciler arasında, hipotalamus-hipofiz-ovaryumun birbirlerini etkilemeleri açısından önemli sayılabilecek bir ayırım daha vardır. İnsanlarda prolaktinin korpus luteumu etkilediğine ilişkin bir kanıt yoktur. Ancak, fare ve sıçanlarda prolaktinin, korpus luteumun sürekliliğini sağladığı ve progesteron salgılanmasını uyardığı bilinmektedir ^{5.9}. Sıçan ve farelerde, foliküllerin gelişmesi ve ovulasyon kendiliğinden olurken korpus luteum etkili bir progesteron salgısı yapmaz. Progesteron salgılanması koitus gibi bir uyarana sonuca artar. Böyle bir uyarılmadan sonra, prolaktin salgılanmasındaki artışın, korpus luteumdan progesteron salgılanmasını hızlandırdığı bildirilmektedir ⁵. Koitusu fertilizasyon izlemese bile, koitus uyarısının etkisiyle progesteron salgılanmasının devam ettiği ve hayvanlarda 'yalancı gebelik' olarak tanımlanan tablonun ortaya çıktığı belirtilmektedir ^{5.9.10}. Bu çalışmada kopulasyondan önce klomifen verilerek farelerin ovulasyonunun önlendiği, bunu izleyen koitusun progesteron salgılanmasını başlattığı ve sonuçta farelerin yalancı gebelik periyoduna girdikleri düşünülebilir. Çalışmamızda farelere klomifen sitrat verildikten sonra alınan vajinal smearlerde diöstrus görülmesi (luteal evre) ve uterus kesitlerindeki hiperplazi bulguları (progesteron etkisi) bu varsayımı destekler yöndedir.

Klomifen sitratın biyolojik etkinliği başlıca antiöstrojenik özelliklerine bağlı olmakla birlikte, zayıf da olsa, östrojenik özelliklerinin de olduğu bildirilmektedir ^{1.12}. Doğal östrojenin varlığında antiöstrojenik etki gösterirken, doğal östrojenin yokluğunda ise antiöstrojenik doz düzeyinde östrojenik etki gösterdiği bilinmektedir ^{7.8.11}. Bazı araştırmacılar, aşırı nicelikte periferik östrojen varlığının hipotalamus üzerindeki güçlü negatif feedback'e neden olduğu avonulatuar siklusun tedavisinde en iyi sonucun alındığını bildirmektedirler ⁷.

KAYNAKLAR

1. HOLTKAMP, D.E., GRESLIN, J.G., ROOT, C.A., LERNER, L.J.: Gonadotrophin inhibiting and anti-fecundity effects of chloramiphe (26054). Proc Soc Exp Biol Med, 105: p. 197-201, 1960.
2. GOLDFARB, A.F.: Clomiphene citrate: its effects in some ovulatory defects. Clin Obstet Gynec, 10: p. 390-400, 1967.

3. BARNES, L.E., MEYER, R.K.: Effects of ethamoxytriphetol, MRL-37 and clomiphene on reproduction in rats. *Fertil Steril*, 13: p. 472-480, 1962.
4. HOLTKAMP, D.E., DAVIS, R.H., RHOADS, J.E.: Effect of chloramiphene on fertility and ovulation. *Fed Proc*, 20: p. 419, 1961.
5. GOLD, J.J.: *Gynecologic Endocrinology*. 2nd ed. Hagestown, Harper and Row, 1975, p. 285-398.
6. GOODMAN, L.S., GILMAN, A.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 5th ed. New York, Mac Millian, 1975, p. 1423-1450.
7. ROY, S., GREENBLATT, R.B., MAHESH, V.B., JUNGCK, E.C.: Clomiphene citrate: further observations on its use in induction of ovulation in the human and its mod of action. *Fertil Steril*, 14: p. 575-595, 1963.
8. GREENBLATT, R.B., ROY, S., MAHESH, V.B., BARFIELD, W., JUNGCK, E.C.: Induction of ovulation. *Am J Obstet Gynec*, 84: p. 900-912, 1962.
9. GANONG, W.F.: *Review of Medical Physiology*. 9th ed. Los Altos, Lange, 1979, p. 340-354.
10. HARTMAN, C.G.: *Bilim ve Ritim Metodu (Çeviren: Prof. Dr. Hüsnü Kişnişçi)* Ankara. H.Ü. Yayınları, B6, p. 76-140.
11. ROY, S., GREENBLATT, R.B., MAHESH, V.B.: Effects of clomiphene on the physiology of reproduction in the rat: II-its oestrogenic and antioestrogenic actions. *Acta Endocrinol (Kbh)*, 47: p. 657-668, 1964.
12. KATO, J., KOBAYASHI, T., WILLEE, C.A.: Effects of clomiphene on the uptake of estradial by the anterior hypothalamus and hypophysis. *Endocrinology*, 82: p. 1049-1052, 1968.
13. MC COLL, J.D., GLOBUS, M., ROBINSON, S.: Effect of some therapeutic agents on the developing rat fetus. *Toxicol App Pharmacol*, 7: p. 409-417, 1965.

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