

Tek Doz Methotrexate Uygulanmasının Over Folikül Rezervi Üzerinde Etkisi (Deneysel Hayvan Çalışması)

Hüsnü Çelik, MD¹; Remzi Atılğan, MD; Nusret Akpolat, MD²; Aziz Karaoğlu, MD³;
Ekrem Sapmaz, MD¹; Cem Parmaksız, MD.¹

ÖZET

Amaç: Sistemik tek doz Methotrexate (MTX) verilmesinin over folikül rezervi üzerine etkisinin araştırılması.

Materyal ve Method: Çalışmada toplam 20 adet Wistar Albino cinsi kullanıldı. Düzenli sıklulara sahip olduğu tespit edilen ratlar rastgele iki gruba ayrıldı. Grup I (n=10)'de : İntra musküler (IM) olarak tek doz halinde 50mg/m² MTX, Grup II (n=10)'de IM olarak tek doz halinde aynı hacimde serum fizyolojik (SF) uygulandı. Son MTX dozundan sonra bir hafta süreyle tüm ratlara günlük smear takipleri yapılarak siklus düzensizlikleri olup olmadıkları araştırıldı. Tedavi sonrası üçüncü haftanın sonunda ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve bilateral overleri çıkarıldı. Çıkarılan overlerden hazırlanan hemotoksilen-eozin ile boyanmış preparatlarda primordial, primer, sekonder, tersiyer folikül, korpus luteum sayıldı ve folikül rezervi hesaplandı. Fibrozis varlığı ve histiyosit infiltrasyonu araştırıldı.

Bulgular: Gruplar arası karşılaştırmalarda tek doz MTX verilen grupta primer, sekonder folikül sayılarında azalma, atretik folikül, fibrozis ve histiyosit skorlarında artışlar olduğu tespit edildi. Fark anlamlı bulunmadı (p>0.05). Tedavi sonrası smear takiplerinde MTX verilen ratların bir tanesinde estrus fazı görülmedi (p>0.05). Korpus luteum ve folikül kisti MTX grubunda azalmış olarak bulundu (p>0.05).

Sonuç: MTX'in over folikül rezervlerinde azalmalara neden olması menapoz yaşında etkili olabilir. İnsanlardaki etkilerinin belirlenebilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Methotrexate, ectopik gebelik, rat.

ABSTRACT

Objective: To investigate the effects of systemic single-dose methotrexate (MTX) administration on ovarian follicle reserve.

Materials and Methods: The study included a total of 20 rats of Wistar Albino species. The rats that had regular cycles were randomly allocated to two groups. Group I (n=10) was administered single-dose intramuscular (im) 50 mg/m² MTX, while Group II (n=10) received single-dose serum physiologic at the same volume. After administration of the last MTX dose, daily smear follow-ups of all rats were made for one week and these were examined for cycle irregularities. At the end of the third week after treatment, rats were sacrificed and bilateral ovaries were taken out. Primordial, primary, secondary, tertiary follicle and corpus luteum were counted in the preparations of ovarian samples stained with hematoxylin eosine. Presence of fibrosis and histiocyte infiltration was examined.

Results: Inter-group comparison showed that there was a decrease in primary, secondary follicle counts and a increase atretic follicle counts, fibrosis and histiocyte infiltration scores in the group that was administered single-dose MTX. The differences were insignificant (p>0.05). It was seen in the post-treatment smear follow-ups that one rat that was given MTX did not have estrus phase (p>0.05). No difference was found between groups in terms of corpus luteum and follicle cyst (p>0.05).

Conclusion: The reductions by MTX in ovarian follicle reserves may affect menopause age. Further studies are needed to determine its effects on humans.

Key words: Methotrexate, ectopic pregnancy, rat.

GİRİŞ

Kemoterapi rejimlerinin bir çoğunun over fonksiyon kaybı yada azalması ile olan ilişkisi uzun zamandan beri bilinmektedir. Ajanın türü, dozu, hastanın yaşı ve ilacın kullanım süresine bağlı olarak over fonksiyonları değişik oranlarda etkilenmektedir (1).

Methotrexate (MTX) bir folat antagonisti kemoteropatik ajandır. Bening jinekolojik hasta grubundan ektopik gebelikte yaygın olarak tek ve multi doz rejimleri halinde kullanılmaktadır (2). Son zamanlarda daha az ilaç kullanılması ve daha az yan etkilerinden dolayı tek doz rejimleri tercih edilmektedir. Her ne kadar ektopik gebeliğin tedavisinde kullanılan cerrahi metodlar ile karşılaştırıldığında MTX kullanan hastalarda fertilité oranlarının değişmediğini bildiren çalışmalar bulunmakla birlikte, farklı endikasyonlar ile kullanılan metotratsat'tan sonra over fonksiyon kayıplarını bildiren çalışmalar mevcuttur. Bower ve ark'ları tarafından yapılan çalışmada Gestesyonel trofoblastik neoplazi nedeniyle MTX verilen hastaların kontrol grubuna göre daha erken menapoza girdikleri tespit edilmiştir (3). Yine erken evre meme kanseri nedeniyle MTX verilen hastalarda %30 oranında belirli düzeylerde over fonksiyon kayıpları bildirilmiştir (4).

Literatürde ektopik gebelikte kullanılan mtX rejimlerinin mikroskobik düzeyde overyan rezerv ve morfoloji üzerine etkileri araştırılmamıştır. Bu çalışmamızda ektopik gebelikte verilen tek doz MTX rejimli model alınarak bu tedavinin histopatolojik düzeyde ovaryan rezerv ve morfoloji üzerine etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında Düzenli sıkluslara sahip 200 – 220 gram ağırlığında, 16 haftalık, erişkin dişi Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 22-23 C° sabit ısıdaki odalarda barındırıldı. Hayvanların beslenmesinde, standart pellet yemi ve şehir suyu kullanıldı. Çalışmanın tüm aşamalarında 1983 Helsinki deklarasyonunda bildirilen “hayvanlarda bilimsel çalışmalar için etik kurallar” a uyuldu.

Ratlardaki östrus dönemlerini belirlemek için Mallenby ve ark. (5) kullandıkları vajinal smear yöntemi uygulandı. Takiplerinde östrus fazında olduğu tespit edilen ratlar rastgele oluşturulan ve her birinde 10 rat bulunan iki gruptan birine dahil edildi.

Grup I (n=10)'de : İntra musküler (IM) olarak tek doz, 50mg/m² MTX, Grup II (n=10)'de : IM, tek doz aynı hacimde serum fizyolojik (SF) verildi. Son MTX veya SF uygulanmasından sonra bir hafta süreyle tüm ratlara haftalık smear takipleri yapılarak siklus düzensizlikleri olup olmadıkları araştırıldı. Tedavi sonrası üçüncü haftanın sonunda ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek bilateral overleri çıkarıldı ve elde edilen dokular %10 formaldehit içerisinde patoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Rutin hazırlık işlemlerinden sonra her bir overden 3 mm aralıklarla kesitler hazırlandı. Bu kesitlerin her birinden 0.3 mikron kalınlığında preparatlar hazırlandı. Bunlardan rastgele 5 tanesi hemotoksilen-eozin ile boyanarak; primordial, primer, sekonder, tersiyer folikül ve korpus luteum sayıldı. Ayrıca, primordial, primer, sekonder, tersiyer folikül sayıları toplanarak ortalama over folikül rezervi hesaplandı ve karşılaştırıldı (6). Fibrozis varlığı ve histiyosit infiltrasyonu yönünden ordinal skala oluşturularak skorlandı (az: 1, orta: 2, çok: 3 puan). Elde edilen sayı ve skorların ortalaması alınarak her bir rat için ortalama değerler oluşturuldu.

İstatistiksel yöntem olarak, Mann Whitney U ve κ^2 testleri kullanıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma boyunca ratların hiç birisinde ölüm ve aktivitede azalma izlenmedi. Deneyin tüm aşamaları ratların tamamında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deneklerin ağırlıkları ve yaşları arasında fark yoktu (p>0.05, Mann Whitney U). Gerek MTX gerekse SF verilen deneklerin tedavi sonrası smear incelemelerinde Grup II'den bir denek hariç diğerlerinin düzenli östrus sıkluslarına sahip olduğu görüldü.

Grup II'deki bir denekte östrus fazı ikinci haftada tespit edildi. Fark anlamlı değildi (p>0.05, κ^2).

Tüm gruplarda histopatolojik olarak incelenen parametreler Tablo-1'de gösterildi. Kemoterapi verilen deneklerin tamamında primer, sekonder folikül, folikül kisti, korpus luteum sayısında azalma, atretik fo-

likül, fibrozis ve histiyosit skorlarında artışlar tespit edildi. Ancak fark anlamlı değildi ($p>0.05$, Mann Whitney U). Yine, MTX grubunda ortalama over folikül rezervinde azalma olmakla birlikte anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$, Mann Whitney U).

TARTIŞMA

Çalışmamızda MTX verilen grupların ovarian histopatolojik incelemelerinde primordial, primer, sekonder folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında artış tespit edildi. Ayrıca histiyosit infiltrasyonu ve fibrozis skorlarında artış kaydedildi. Çalışmamız ektopik gebeliklerin medikal tedavisinde kullanılan MTX rejimlerinin model alındığı ve bu tedavilere bağlı olarak over folikül rezervinin histopatolojik düzeyde araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamız bir deneysel hayvan çalışması olmakla birlikte elde ettiğimiz sonuçların klinik açıdan yorumlanması MTX kullanılan hastalarda over fonksiyonlarında bozulma ve kontrol grubuna göre daha erken menapoz görüldüğünü bildiren çalışmalarını destekleyici niteliktedir (3,4).

Literatür araştırmasında ektopik gebelik nedeniyle MTX kullanılan hastaların menapoz yaşı konusunda herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle tespit ettiğimiz MTX'in overyan folikül rezervi üzerine olan negatif etkisinin menapoz yaşını etkileyip etkilemeyeceği konusunda söyleyebileceklerimiz sınırlıdır.

Bu sınırlanmanın iki önemli nedeni vardır. Bunlardan birisi çalışmamızın bir deneysel hayvan çalışması olması, bir diğeri de deneklerimizin gebe olmasıdır (intrauterin yada ektopik).

Bilindiği üzere prematür overyan yetmezlikte temel olaylardan birisi atreziye uğrayan folikül sayısında artış olmasıdır. Kemoterapi ve diğer etiyolojik nedenler folikülleri tahrip ederek prematür menapozun patofizyolojisinde rol oynamaktadır (7). Kemoterapi ilaçlarının ovarian foliküller üzerinde yaptığı etkinin mekanizması konusunda bilgiler kısıtlıdır. Bu ilaçlara bağlı olarak granüloza hücrelerinde apoptozisin indüklenmiş olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (8,9).

Literatürde Stovall ve arkadaşları tarafından ektopik gebelik nedeniyle tek doz MTX kullanan olgularda %79.6 gebelik oranları bildirilmiştir (10). Bu konudaki diğer yayınların oranları da benzerdir. Ancak tek doz MTX rejimlerinden sonra overyan toksisiteye ilişkin herhangi bir çalışma yada olgu bildiri yapılmamıştır. Ben-Shlomo ve ark'ları tarafından ektopik gebelik nedeniyle salpingostomi ve multi doz MTX verilen olguların karşılaştırıldığı çalışmada MTX alanlarda %14.3, salpingostomi geçirenlerde %1.8 oranında overyan kist oluştuğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, her ne kadar insanlarda ve farklı metodla yapılmış olsa da MTX ile ovarian disfonksiyon arasındaki ilişkiyi göstermesi bakımından önemlidir (11).

Tablo 1. Her iki grupta incelenen parametreler (Primordial folikül, primer folikül, sekonder folikül, atretik folikül, korpus luteum, folikül kisti: adet, histiyosit infiltrasyonu, fibrozis: skor, puan) (Ortalama \pm Standart sapma)

	Grup I (MTX)	Grup II (SF)	P değeri
Primordial folikül (adet)	13.6 \pm 2.7	14.2 \pm 3.1	P>0.05
Primer folikül (adet)	23.5 \pm 5.4	25.4 \pm 5.1	P>0.05
Sekonder folikül (adet)	7.2 \pm 1.3	8.7 \pm 0.7	P>0.05
Atretik folikül (adet)	1.7 \pm 0.7	1.5 \pm 0.7	P>0.05
Korpus luteum (adet)	1.2 \pm 0.8	1.3 \pm 0.7	P>0.05
Folikül kisti (adet)	0.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.5	P>0.05
Histiyosit infiltrasyonu (skor)	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.3	P>0.05
Fibrozis (skor)	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.3	P>0.05

Çalışmamızda overyan kist oluşumu arasında fark bulunmamıştır.

Bildirilen bir çok benzeri çalışmada ektopik gebeliklerin tedavisinde MTX kullanımını takiben başarılı gebelik oranlarının verilmiş olması elde ettiğimiz bulgular ile uyumsuzluk içerisinde değildir (10). Zira bu çalışmalarda elde edilen sonuçların yorumu; menstruel siklus düzeni ve gebelik oranları üzerinden yapılmaktadır. Bizim çalışmamızda da MTX verilen deneklerin sadece bir tanesinde siklus düzensizliği saptanmıştır. Overlerde folikül rezervinin azalması gebelik oranlarını kısmen azaltabilir ve menstrüel düzensizlikler yapabilir. Ovaryan rezerv üzerine negatif etki, gebelik oranlarını etkilemese bile bunun menapoz yaşı üzerine etkili olmayacağı konusunda garanti vermez. Nitekim farklı bir metod olmakla birlikte, Bower ve arkadaşlarının çalışmasında gestesyoneel trofoblastik neoplazi nedeniyle MTX verilen hastaların kontrol grubuna göre üç yıl daha erken menapoz girdiklerinin gösterilmiş olması bu düşüncemizi desteklemektedir (3).

Çalışmamızın önemli bir farklılığı olarak; Ektopik gebelik nedeni ile MTX rejimlerini kullanan olgularının gebeliklerinden dolayı ovulatuvar olmayan hastalar olmasıdır. Bilindiği üzere kemoterapiler en fazla hasarı matür foliküller üzerinde yapmaktadır (9). Bu nedenle, jinekolojik endikasyonlar dahilinde hastaların MTX'i kullandıkları dönem dikkate alınarak overlerdeki etkilenmenin daha az olabileceği düşünülebilir. Ancak overyan rezervin azaldığı ileri yaşlarda MTX'in overler üzerindeki negatif etkisi bir başka açıdan önemli olabilir. Zira ileri yaş, reproduktif kapasitenin azaldığı ve bu nedenle kontrollü ovarian hiperstimulasyonun indüksiyonlarının sıkça yapıldığı bir dönemdir. Ovulasyon indüksiyonu ile ektopik gebelik oranlarındaki artış bilinmektedir (12). Bu nedenle ektopik gebelik nedeniyle MTX'in bu dönemde kullanılması over rezervini daha da azaltabilir. Bu noktada bulgularımız uyarıcı niteliğe sahip olabilir.

Sonuç olarak; Çalışmamız bir deneysel hayvan çalışmasıdır ve bu nedenle türler arası farklılıklar olabileceği dikkate alınmalıdır. İstatistiksel anlam bulunmamakla birlikte MTX verilen grupta folikül rezervi azalmış olarak bulunmuştur. Çalışmamız, insanlara yönelik kesin sonuçlar içermemekle birlikte elde edilen bilgiler daha ileri düzeyde ve daha kapsamlı çalışmalara temel olabilir.

KAYNAKLAR

1. Rivkees SA, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. JAMA. 1988 ; 259 : 2123-5
2. Barnhart K, Coutifaris C, Esposito M. The pharmacology of methotrexate. Expert Opin Pharmacother. 2001 ; 2:409-17.
3. Bower M, Rustin GJ, Newlands ES, Holden L, Short D, Foskett M, Bagshawe KD. Chemotherapy for gestational trophoblastic tumours hastens menopause by 3 years. Eur J Cancer. 1998 ;34:1204-7.
4. Lower EE, Blau R, Gazder P, Tummala R. The risk of premature menopause induced by chemotherapy for early breast cancer. J Womens Health Gend Based Med. 1999 ; 8:949-54
5. Mallenby, J., Dunyer, J., Hawkins, C. And Hitchen, C. Effects of experimental limbic on the estrus cycle and reproductive succes in rats, Epilepsia, 1991; 2: 220-227.
6. Souza AZ, Fonseca AM, Izzo VM, Clauzet RM, Salvatore CA. Ovarian histology and function after total abdominal hysterectomy. Obstet Gynecol. 1986 ; 68: 847-9
7. Kalantaridou SN, Nelson LM. Premature ovarian failure is not premature menopause. Ann N Y Acad Sci. 2000; 900:393-402
8. Meiorow, D., Nugent, D., Livni, N. and Gosden, G. The effects of chemotherapy on human primordial follicles an *in-vitro* study. Presented at the annual meeting of the Israel Fertility Association, Tel-Aviv, May 6, 1997
9. Meiorow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. Hum Reprod. 1999 ;14:1903-7
10. Stovall TG, Ling FW. Single-dose methotrexate: an expanded clinical trial. Am J Obstet Gynecol. 1993;168:1759-62.
11. Ben-Shlomo I, Eliyahu S, Yanai N, Shalev E. Methotrexate as a possible cause of ovarian cysts formation: experience with women treated for ectopic pregnancies. Fertil Steril. 1997; 67:786-8.
12. Fernandez H, Coste J, Job-Spira N. Controlled ovarian hyperstimulation as a risk factor for ectopic pregnancy. Obstet Gynecol. 1991;78:656-9.