

Tek ve Multi Doz Methotrexate Uygulamalarına Bağlı Overyan Histopatolojik Değişimler ve Folikül Gelişimi Üzerine Etkileri

Hüsni ÇELİK*, Remzi ATILGAN**, Nusret AKPOLAT***, Bilgin GÜRATES****,
Fethi HANAY**, Aziz KARAOĞLU*****

ÖZET

Amaç: Sistemik tek doz ve multidoz Methotrexate (MTX) verilmesinin over folikül rezervi üzerine etkilerinin karşılaştırılması.

Metod: Çalışmada toplam 32 adet Wistar Albino cinsi kullanıldı. Düzenli sıkluslara sahip olduğu tespit edilen ratlar rastgele dört gruba ayrıldı. Grup I (n=8)'de: İntra musküler (IM) olarak tek doz, 50mg/m² MTX, Grup II (n=8)'de: IM, tek doz aynı hacimde serum fizyolojik (SF), Grup III (n=8)'de IM, multidoz MTX+ folinik asit, Grup IV (n=8)'de IM, multidoz protokolündeki MTX ve folinik asit ile aynı hacimde SF verildi. Her bir grupta olmak üzere, tedavi sonrası 15. günde ratlar genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve bilateral overleri çıkarıldı. Çıkarılan overlerden hazırlanan preparatlarda primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral, atretik foliküller ve korpus luteum sayıldı. Ayrıca, fonksiyonel over kistleri, Fibrozis varlığı ve histiyosit infiltrasyonu araştırıldı.

Bulgular: Gruplar arası karşılaştırmalarda multidoz MTX verilen Grup III ratların overlerinde, fibrozis, histiyosit infiltrasyon skorları ve fonksiyonel over kist oluşumunda anlamlı artışlar tespit edildi (p<0.05). Primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral, atretik foliküller ve korpus luteum sayılarında anlamlı değişiklik saptanmadı (p>0.05). Grupların hiçbirisinde ilaç uygulama sonrası siklus düzensizliği saptanmadı (p>0.05).

Sonuç: Çalışmamızda tespit ettiğimiz multidoz MTX'in overlerde fibrozis skorlarında yaptığı anlamlı artışlar uzun dönemde overyan rezervleri etkileyebilir. İnsanlardaki klinik etkilerinin belirlenebilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Methotrexate, overyan histopatolojik değişimler.

ABSTRACT

Objective: To compare the effects of single-dose and multi-dose Methotrexate (MTX) administration on ovarian follicle reserve.

Materials and methods: The study included 32 Wistar Albino species rats. Rats that were found to have regular cycles were randomly allocated to four groups. Group I (n=8) was administered intra-muscular (i.m.) single-dose 50 mg/m² MTX; Group II (n=8) was administered i.m. single-dose serum physiologic (SP); Group III (n=8) was administered i.m. multi-dose MTX and Group IV (n=8) was administered the same volume of SP as MTX and leucovorin in the multi-dose protocol. In each group, the rats were sacrificed under general anesthesia by cervical dislocation on the 15th day after treatment and their bilateral ovaries were taken out. Preparations from the ovaries were examined in terms of primordial, primary, secondary, preantral, antral, atretic follicle and corpus luteum counts. In addition, functional ovarian cysts, presence of fibrosis, and histiocyte infiltration were examined.

Results: Comparisons among groups showed that there were significant increases in fibrosis, histiocyte infiltration scores and functional ovarian cyst formation in the ovaries of rats in group III, which was administered multi-dose MTX (p<0.05). No significant change was found in primordial, primary, secondary, preantral, antral, atretic follicles and corpus luteum counts (p>0.05). There was no cycle irregularity in the groups after drug administration.

Conclusion: The significant increases caused by multi-dose MTX in fibrosis scores of the ovaries, as we found in our study, can influence ovarian reserves in the long run. Further studies are needed to determine the clinical effects in women.

Keywords: Methotrexate, ovarian histopathological changes.

Geliş tarihi: 10.04.2005

Kabul tarihi: 15.05.2005

*Yard. Doç.Dr.; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hast ve Doğum AD, ELAZIĞ

**Araşt.Gör.; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, ELAZIĞ

***Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, ELAZIĞ

**** Doç.Dr.; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hast ve Doğum AD, ELAZIĞ

*****Doç Dr.; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Medikal Onkoloji BD, ELAZIĞ

İletişim: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hast ve Doğum Anabilim Dalı, ELAZIĞ

Tel:0 532 325 70 93

E-posta: husnucelik@hotmail.com

GİRİŞ

Kemoterapi rejimlerinin bir çoğunun over fonksiyon kaybı ya da 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. Gestasyonel trofoblastik hastalıklar (GTH) ya da benign jinekolojik hasta grubundan ek-topik gebelikte yaygın olarak tek ve multi doz rejimleri halinde kullanılmaktadır (2,3). Literatürde multi-doz MTX'dan sonra over fonksiyon kayıplarını bildiren çalışmalar mevcuttur. Bower ve ark'ları tarafından yapılan çalışmada GTH nedeniyle MTX verilen hastaların kontrol grubuna göre daha erken menapozla girdikleri tespit edilmiştir (4). Yine erken evre meme kanseri nedeniyle MTX verilen hastalarda %30 oranında değişik düzeylerde over fonksiyon kayıpları bildirilmiştir (5). Daha önce tek doz MTX kullanımının ovaryan morfoloji üzerine etkilerini araştırdığımız bir ön çalışmada overler üzerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını tespit ettik. Ancak, MTX tek ajan kemoterapi protokolü çerçevesinde özellikle GTH'larda multi doz "MTX rescue protokolü" şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bildiğimiz kadarı ile literatürde tek doz ve multidoz şeklinde kullanılan MTX rejimlerinin mikroskopik düzeyde overyan morfoloji ve folikül gelişimi üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmamızda ratlarda tek doz ve multi doz MTX rejimleri model alınarak bu tedavilerin histopatolojik düzeyde overyan folikül gelişimi 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. (6) kullandıkları vajinal smear yöntemi uygulandı. Smear takiplerinde düzenli östrus siklusuna sahip olduğu tespit edilen ratlar rastgele oluşturulan ve her birinde 8 rat bulunan dört gruptan birine dahil edildi.

Grup I (n=8)'de: Tek doz MTX (Bu grupta bulunan ratlara 50mg/m² MTX, İntra musküler (IM) tek doz olarak uygulandı). Grup II (n=8)'de: Tek doz serum fizyolojik (SF) (Bu grupta bulunan ratlara I. Grupta uygulanan MTX ile aynı hacimde, IM, tek doz SF uygulandı). Grup III (n=8): Multi doz MTX IM olarak, 1,3, 5 ve 7. günlerde 1 mg/kg MTX, 2,4,6 ve 8. günlerde 0.1 mg/kg folinik asit uygulandı. Grup IV(n=8): Multidoz SF (IM olarak, 1,3,5 ve 7. günlerde multidoz MTX grubunda uygulanan MTX ile aynı hacimde SF, 2, 4, 6 ve 8. günlerde multidoz protokolünde uygulanan folinik asit ile aynı hacimde SF uygulandı). (MTX: Methotrexate DBL PF flk 50 mg, Orna, İstanbul. Folinik asit: Calcium leucovorine DBL flk 15 mg/ m², Orna, İstanbul)

Ratların tümünde MTX, SF ya da folinik asit uygulamaları öğleden sonra saat 17:00 ve 18:00 arasında yapıldı. Her grupta, son MTX veya SF uygulanmasından sonra smear takipleri yapılarak siklus düzensizlikleri olup olmadıkları araştırıldı. Tedavi sonrası 15. günde ratlar genel anestezi altında 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 seçilen 5 tanesi hematoksilen-eozin ile boyanarak; primordial, primer, sekonder, preantral, antral, atretik foliküller ve korpus luteum sayıldı. Her bir preparata ait ortalama değerler bulundu. Folikül geli-

şimine ait mikroskopik klasifikasyonda Mazaud ve arkadaşlarının metodu kullanıldı (7). Ayrıca, fonksiyonel over kistleri, fibrozis varlığı ve histiyosit infiltrasyonu araştırıldı. 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, Kruskal Wallis varyans analizi, Mann Whitney U 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 tamamının düzenli östrus siklusuna sahip olduğu görüldü.

Tüm gruplarda histopatolojik olarak incelenen parametreler Tablo-1'de gösterildi. İkili karşılaştırma-

larda foliküler gelişim basamaklarından primordial, primer, sekonder, preantral, antral, atretik foliküller ve korpus luteum sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). Ancak multidoz MTX verilen Grup III ratlarda, diğer gruptakilere göre incelenen parametrelerden fonksiyonel kist oluşumunda, histiyosit infiltrasyonu ve fibrozis skorlarında anlamlı artış bulundu ($p < 0.05$, Mann Whitney U).

TARTIŞMA

Çalışmamız tek ve multidoz MTX rejimlerinin over folikül rezervi üzerinde etkilerinin histopatolojik düzeyde karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda, multidoz MTX verilen grupların overyan histopatolojik incelemelerinde fonksiyonel kist oluşumu, histiyosit infiltrasyonu ve fibrozis skorlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Çalışmamız bir deneysel hayvan çalışması olmakla birlikte elde ettiğimiz sonuçların klinik açıdan yorumlanması multidoz MTX kullanılan hastalarda over fonksiyonlarında bozulma ve kontrol grubuna göre daha erken menapoz görüldüğünü bildiren çalışmalarını destekleyici niteliktedir (4,5).

Tablo 1. Her iki grupta incelenen parametreler (primordial, primer, sekonder, preantral, antral, atretik foliküller, korpus luteum, fonksiyonel over kistleri: Adet, fibrozis varlığı ve histiyosit infiltrasyonu: Skor, puan) (Ortalama \pm Standart sapma)

	<i>Grup I</i>	<i>Grup II</i>	<i>Grup III</i>	<i>Grup IV</i>	<i>P değeri</i>
Primordial folikül (adet)	14.6 \pm 2.4	13.4 \pm 3.4	14.3 \pm 4.1	13.6 \pm 2.7	>0.05
Primer folikül (adet)	24.5 \pm 6.4	23.4 \pm 4.3	22.3 \pm 7.3	26.5 \pm 6.7	>0.05
Sekonder folikül (adet)	6.7 \pm 1.4	7.7 \pm 0.8	5.2 \pm 2.1	6.8 \pm 1.7	>0.05
Preantral (adet)	6.3 \pm 1.3	6.2 \pm 1.4	5.6 \pm 2.4	6.6 \pm 1.2	>0.05
Antral (adet)	6.1 \pm 1.1	6.1 \pm 1.1	5.8 \pm 1.9	6.4 \pm 1.5	>0.05
Atretik folikül (adet)	1.8 \pm 0.9	1.8 \pm 0.6	1.7 \pm 0.7	1.7 \pm 0.7	>0.05
Korpus luteum (adet)	1.4 \pm 0.6	1.6 \pm 0.7	1.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.6	>0.05
Folikül kisti (adet)	0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.4*	0.4 \pm 0.3	>0.05, <0.05
Histiyosit infiltrasyonu (skor)	0.3 \pm 0.4	0.1 \pm 0.2	0.7 \pm 0.6*	0.3 \pm 0.2	>0.05, <0.05
Fibrozis (skor)	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4*	0.4 \pm 0.3	>0.05, < 0.05

*Diğer grupların değerlerine göre fark anlamlıdır.

Literatür araştırmasında, GTH'nin aksine ektojik gebelik nedeniyle multidoz MTX kullanılan hastaların menapoz yaşı konusunda herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Fibrozis skorlarında anlamlı artışlar şeklinde elde ettiğimiz bulgular, multidoz MTX'in menapoz yaşını etkilediğini bildiren çalışmaları desteklemektedir (4,5).

Bilindiği gibi prematür overyan yetmezliğe sahip olan olgulardan yapılan overyan biyopsilerde interstisyel fibrozis skorlarının artmış bulunduğu bildirilmektedir (8). Daha net konuşabilmek için elimizde yeterli veri yoktur. Zira, gerek çalışmamızın bir deneysel hayvan çalışması olması, gerekse deneklerimizin gebe olmaması (intrauterin, ektojik ya da molar gebelik) spekülasyonlarımızı sınırlamaktadır. 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 (9). Kemoterapötik ajanların overyan foliküller üzerinde yaptığı etkinin mekanizması konusunda bilgiler kısıtlıdır. Bu ilaçlara bağlı olarak granüloza hücrelerinde apopitozisin indüklenmiş olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (10,11). Çalışmamızda MTX kullanımı ile atretik folikül sayısında artış olmakla birlikte bu anlamlı bulunmamıştır. Ancak fonksiyonel kist oluşumunda anlamlı artış overyan disfonksiyonun bir habercisi ve nedeni olabilir. Ben-Shlomo ve ark'ları tarafından ektojik 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 bir fizyolojik zeminde yapılmış olmakla birlikte MTX ile overyan disfonksiyon arasındaki ilişkiyi göstermesi bakımından önemlidir (12). Çalışmamızda overyan kist oluşumu multidoz MTX kullanılanlarda anlamlı olarak artmış bulunmuştur.

Yine, çalışmamızda gösterildiği gibi, multidoz MTX verilmesinin overyan folikül gelişiminde herhangi bir anlamlı değişiklik yapmaması literatürde bildirilen birçok çalışmada olduğu gibi, ektojik gebe-

lik ya da GTH nedeniyle MTX kullanımını takiben başarılı gebelik oranlarının bildirilmiş olması ile uyum içerisindedir (13). Ancak bu çalışmalarda elde edilen sonuçların yorumu; menstrüel siklus düzeni ve gebelik oranları üzerinden yapılmaktadır. Overyan fibrozis üzerinde olan anlamlı artış, gebelik oranlarını etkilemese bile bunun menapoz yaşı üzerine etkili olmayacağı konusunda garanti vermez. Çalışmamızda MTX verilen ratlarda gebelik oranları araştırılmamıştır. Nitekim Bower ve arkadaşlarının çalışmasında gestasyonel trofoblastik neoplazi nedeniyle MTX verilen hastaların kontrol grubuna göre üç yıl daha erken menapoza girdiklerinin gösterilmiş olması bu düşüncemizi desteklemektedir (4).

Çalışmamızın önemli bir farklılığı olarak; ektojik gebelik ya da GTH nedeni ile MTX rejimlerini kullanan olguların gebeliklerinden dolayı ovulatuvar olmayan hastalar olmasıdır. Bilindiği üzere kemoterapötik ajanlar en fazla hasarı matür foliküller üzerinde yapmaktadır (11). Çalışmamızda her ne kadar folliküler gelişim üzerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmiş olmakla birlikte, fibrozis ve histiyosit infiltrasyonu artışlarında ovulatuvar ve anovulatuvar overlerde farklı etkilerin olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerekir. Bu nedenle, ektojik gebelik ya da GTH durumunda olan hastaların MTX'i kullandıkları dönemin anovulatuvar olduğu dikkate alınarak overlerdeki etkilenmenin daha az olabileceği düşünülebilir.

Ancak overyan rezervin azaldığı ileri yaşlarda MTX'in overlerde fibrozise ait değişiklikleri artırması bir başka açıdan önemli olabilir. Zira ileri yaş, reproduktif kapasitenin azaldığı ve bu nedenle kontrollü overyan hiperstimulasyonun sıkça yapıldığı bir dönemdir. Ovulasyon indüksiyonuna bağlı olarak ektojik gebelik oranlarındaki artış bilinmektedir (14). Bu durumlarda ektojik gebelik nedeniyle multidoz MTX'in bu dönemde kullanılması overde fibrozise ait değişiklikleri arttırabilir. Bu noktada bulgularımız uyarıcı niteliğe sahip olabilir.

Sonuç olarak; elde ettiğimiz bulgular bir deneysel hayvan çalışmasına aittir ve sonuçların insanlar için yorumlandığı durumlarda türler arası farklılıkların

olabileceği dikkate alınmalıdır. 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. Lipscomb GH, McCord ML, Stovall TG, Huff G, Portera SG, Ling FW. Predictors of success of methotrexate treatment in women with tubal ectopic pregnancies. N Engl J Med 1999;341:1974-8.
4. 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.
5. 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.
6. Mallenby, J., Dunyer, J., Hawkins, C. And Hitchten, C. Effects of experimental limbic on the estrus cycle and reproductive succes in rats, Epilepsia 1991;2:220-227.
7. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H, Magre S. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. Endocrinology 2002;143:4775-87.
8. Koh JM, Kim CH, Hong SK, Lee KU, Kim YT, Kim OJ, Kim GS. Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. Eur J Endocrinol 1998;138:554-6.
9. Kalantaridou SN, Nelson LM. Premature ovarian failure is not premature menopause. Ann N Y Acad Sci 2000;900:393-402.
10. Meirow, 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 1997.
11. Meirow 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.
12. 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.
13. Stovall TG, Ling FW. Single-dose methotrexate: an expanded clinical trial. Am J Obstet Gynecol 1993;168:1759-62.
14. Fernandez H, Coste J, Job-Spira N. Controlled ovarian hyperstimulation as a risk factor for ectopic pregnancy. Obstet Gynecol 1991;78:656-9.