

TAMOKSİFENİN SIÇAN KARACİĞERİNE ETKİSİ: IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

Aysel GÜVEN*, Feriha ERCAN**

ÖZET

Tamoksifen, meme kanserinin tedavisinde uzun süreli, en çok kullanılan trifeniletillen grubundan, en etkili antiöstrojenik ilaçtır. Bu ilacın uzun süreli kullanımına bağlı olarak karaciğer ve uterusu yan etkilere neden olduğu bilinmektedir.

Karaciğer üzerine morfolojik etkilerini incelemek amacı ile Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlara 3.5 ay süreyle i.p olarak tamoksifen, 1.5 mg /kg olacak şekilde uygulandı. Alınan karaciğer biyopsi materyalleri ışık ve elektron mikroskopik düzeyinde incelendi.

Işık mikroskopi düzeyinde karaciğer hücre kordon düzeninde bozulma, kanama odakları, Dissé aralığı bağ dokusunda artış gözlemlendi. Hepatosit ince yapısında membran ve organellerinde değişiklikler, glikojen içeriğinde ve lipid damlacıklarında ve vakuollerde artma gözlemlendi.

Sonuç olarak, sıçanlarda bu süre ve dozda tamoksifen uygulanımı karaciğer hasarına sebep olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Tamoksifen, karaciğer morfolojisi

SUMMARY

The effects of tamoxifen on the rat liver; light and electron microscopical study. Tamoxifen is an antioestrogenic in a triphenylethylen group drug, common used for long time period mammary gland cancer treatment. Long time period consumption of this drug has a negative effect on the uterus and liver.

For observation of the effect of tamoxifen on the liver morphology, tamoxifen was applied to the Sprague-Dawley female rats ip. 1.5 mg/kg for 3.5 months. Liver samples were examined at both light and electron microscopy level.

Liver samples was showed that degeneration of the regulation of the cell cordon, bleeding areas, increase of the connective tissue at Dissé space at light microscopy level. Ultrastructural observations showed that alterations of the membrane and organelle structure, formation of vacuoles, and increase of glycogen and lipid droplets in the hepatocyte cytoplasm.

As a result, application of the tamoxifen to the rats in these doses and time causes liver degeneration.

As a result, patient treated with tamoxifen because of the observation of the liver degeneration should be under control frequently.

Key words: Tamoxifen, liver morphology

GİRİŞ

Kadınlarda, en sık görülen kanserlerden biri olan meme kanserinin tedavisi ve yüksek risk taşıyan kişilerin korunması önemlidir. Bu amaçla nonsteroid antiöstrojen maddeler; östrojenin meme tümörlerinin gelişimine direkt etkisi ve büyümesini stimüle etmesi

nedeniyle meme kanseri riski taşıyan ve meme kanseri olan kadınlarda antikanserojen olarak yaygın şekilde kullanılırlar^(12,13,23).

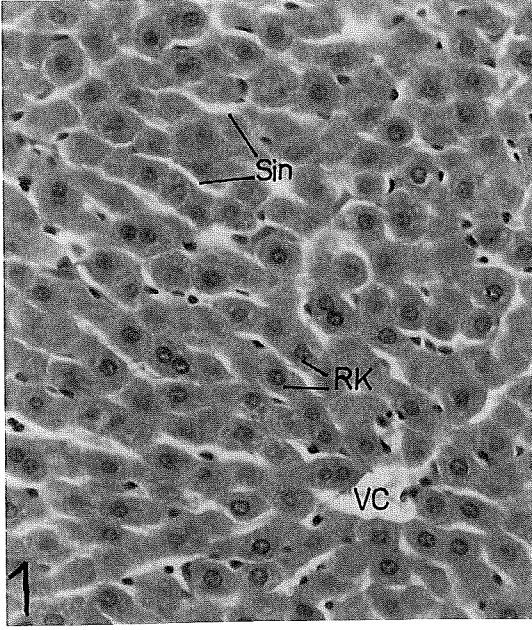
Tamoksifen; kemoterapötik ve kemoproflaktik olarak, meme kanserinin endokrin tedavisinde uzun süreli, en çok kullanılan antineoplastik maddelerden biridir^(1,3,20).

Mecmuaya geldiği tarih: 16.03.1999

* Büyük Çamlıca Hastanesi, Çamlıca, İstanbul

** Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul

Mikrograf 1: Kontrol sıçan karaciğerinde, V. Centralis (VC) çevresinde hepatositlerden kurulu düzenli hücre kordonlarının (HK), yapısı görülmektedir. Sin: Sinüzoid, H+E, X200



nunla birlikte uzun süreli tamoksifen uygulanmasının belirli dokularda östrojen seviyesinin artmasına neden olduğu bilinmektedir (7,18,22).

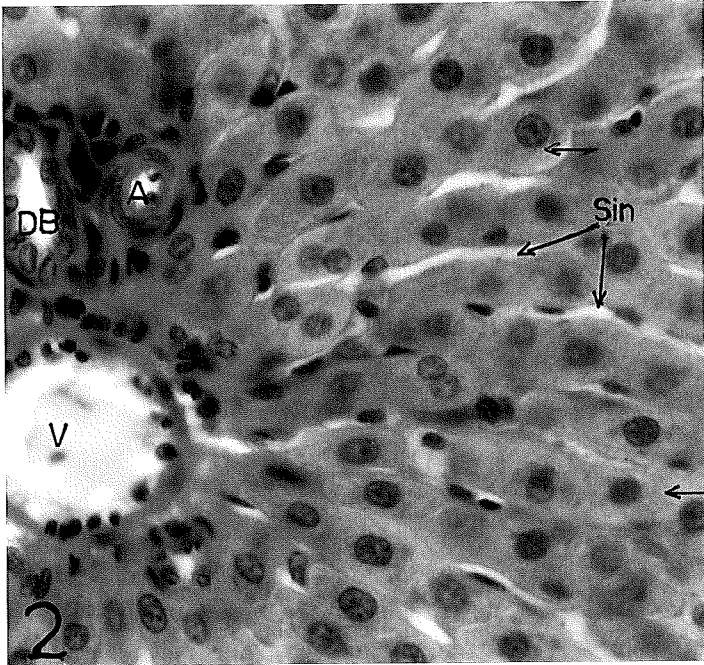
Tamoksifenin östrojen benzeri aktivasyonunun, östrojen bağımlı tümör gelişimine neden olduğu ileri sürülerek, özellikle karaciğerde östrojenik etkisiyle hepatokarsinojenik aktivasyonu (5,14,15,16,17,19,25) ve endometrium kanserini stimüle ettiği saptanmıştır (1,11,20,21,22).

Tamoksifenin, tedavi ve proflaktik amaçlı uzun süre kullanılmasında, östrojenik etkisi nedeniyle yan etkilere neden olması önemlidir (1,4,5,7,8,14,16,19).

Bu çalışmada, tamoksifenin sıçan karaciğeri üzerine etkilerini morfolojik yönden incelemek amaçlandı.

Meme tümör dokusunun östrojene bağlı proliferasyonu, tamoksifenin gerek reseptör (2,3,9,10,13,21) gerekse direkt hücresel antiöstrojen aktivasyonu ile önlenmektedir (13,24). Bu-

Mikrograf 2: Kontrol grubunda, hücreler içerisinde homojen dağılımlı PAS (+) glikojen partikülleri izlenmektedir. PAS+HI, X400



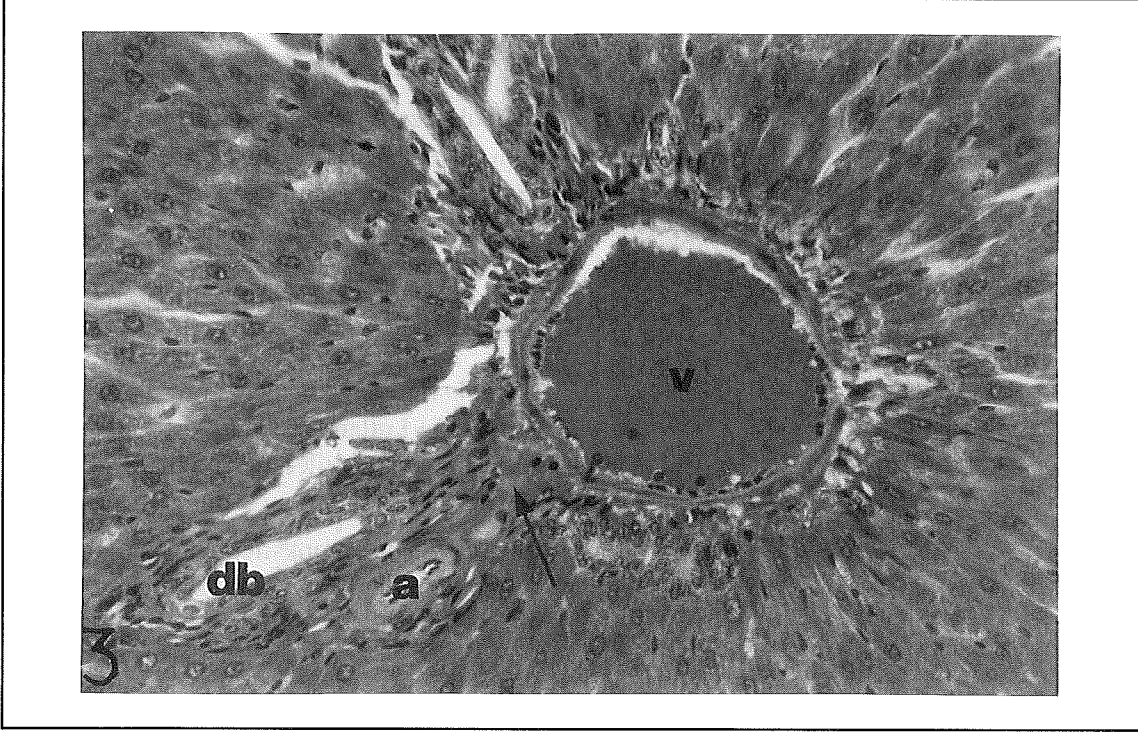
MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Enstitüsü (DE-TAE)'ünden elde edilen 12 adet Sprague-Dawley cinsi (180-200 gr) genç erişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik koşullarda tutulan sıçanlara (n=6), dimetilsülfoksitte çözülmüş 6.6mg/ml oranında tamoksifen citrate (Nolvadex), 1.5mg/kg olacak şekilde i.p. olarak 3,5 ay süreyle her gün uygulandı. Kontrol grubuna (n=6) ise sadece dimetilsülfoksit verildi.

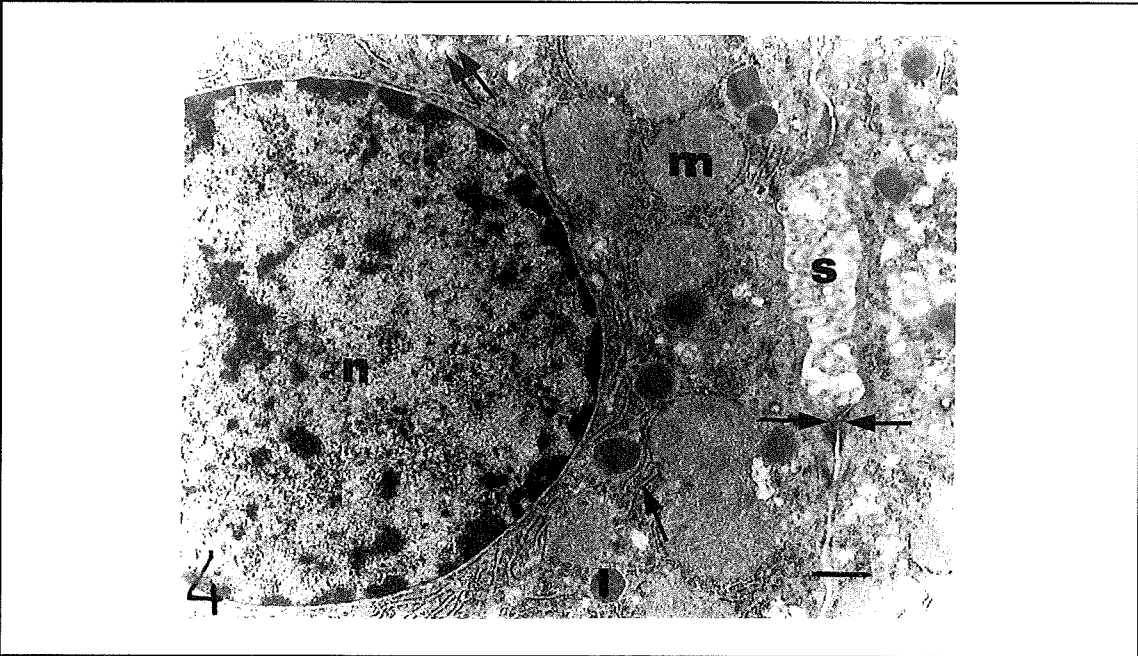
Mikroskopik Preparasyon

Kontrol ve deney grubu sıçanlardan, eter anestezisi altında aynı karaciğer bölgelerinden ışık ve elektron mikroskopik gözlemler için biyopsi materyalleri alındı. Işık mikroskopik inceleme için alınan doku parçaları Bouin fiksatifinde tesbit edildi. Rutin

Mikrograf 3: Kontrol grubunda periportal sahada; V. interlobularis (v), A.interlobularis (a), ductuli biliferi (db) ve kollagen liflerin (→) yer aldığı düzenli bağ doku yapısı izlenmektedir. Masson trichrome, x200



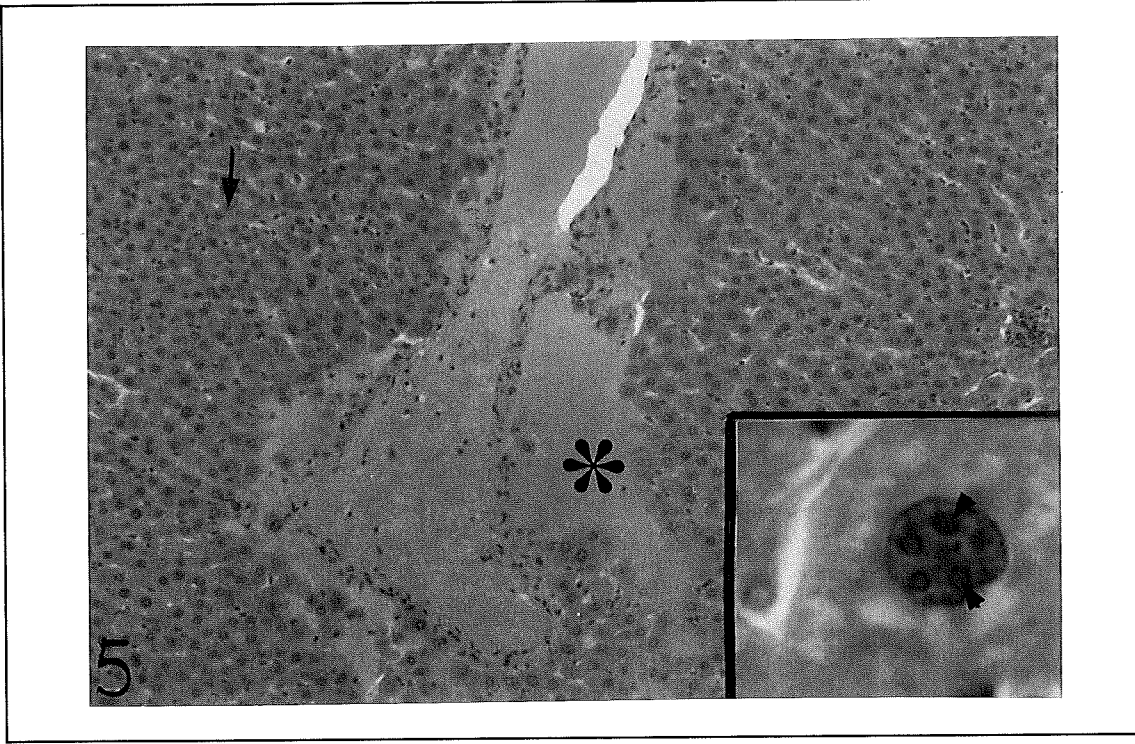
Mikrograf 4: Kontrol grubunda düzenli yapıda hepatosit görülmektedir.: n: Nükleus, →: granüllü endoplazmik retikulum, ⇒: düz endoplazmik retikulum, m: mitokondri, l: lizozom, →←: zonula occludens, s: safra kanalikülü, elektronmikrograf, bar: 500 nm



mikroteknik işlemlerinden sonra, 4-5 µ kalınlığında alınan kesitlere hematoxilin-eosin (H+E), Masson trikrom, periyodik asit

schiff+haemalun (PAS+HI) boyaları uygulandı. Boyalı kesitler Olympus BH-Z fotomikroskopunda değerlendirildi.

Mikrograf 5A: Tamoksifen verilen grupta hepatosit kordon düzeninin (→) bozukluğu, büyük kanama odakları (*) ve çok nukleoluslu (>) hepatositler gözlenmektedir. H+E, X100, inset: X1000



Elektron mikroskopik inceleme için alınan 1 mm³'lük biopsi materyalleri; fosfat tamponlu (pH 7.3, 0,1M) (3'lük glutaraldehit çözeltisinde 1.5 saat fikse edildi. (1'lik OsO₄ ile 1 saat süren postfiksasyon sonrası rutin elektron mikroskopi takibi yapılarak, araldit içinde polimerize edildi. Leica Ultracut R ultramikrotomunda alınan yaklaşık 60nm kalınlığındaki kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat boya ile kontrastlandı. İnce kesitler Jeol 1200 SX elektron mikroskobunda değerlendirildi.

BULGULAR

Kontrol grubu: Işık mikroskopik incelemelerde V. centralis çevresinde düzenli şekilde yer alan karaciğer hücre kordonlarının yer aldığı gözlemlendi (Mikrograf 1, 2, 3). Hepatosit sitoplazmasında, PAS+ boyanan glikojenin homojen dağılımlı ve ince partiküller şeklinde olduğu görüldü (Mikrograf 2). Masson trikrom ile boyalı kesitlerde bağ do-

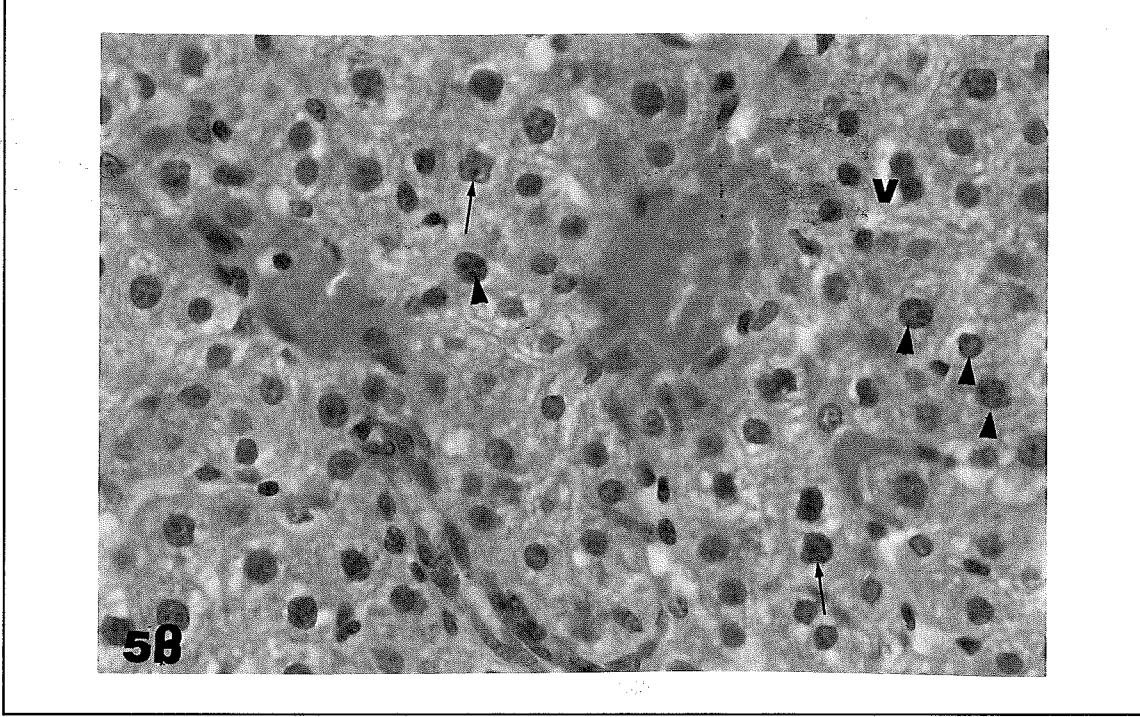
ku dağılımı düzenli olarak görüldü. (Mikrograf 3).

Elektron mikroskopi gözlemlerinde, hepatosit nukleusları, sitoplazmadaki organel dağılımı ve glikojen partikülleri normal yapıdaydı. Hepatositlerin birbirine komşuluk eden ekzokrin yüzlerinde düzenli yapıda zonula occludens ve safra kanalikülü izlendi (Mikrograf 4).

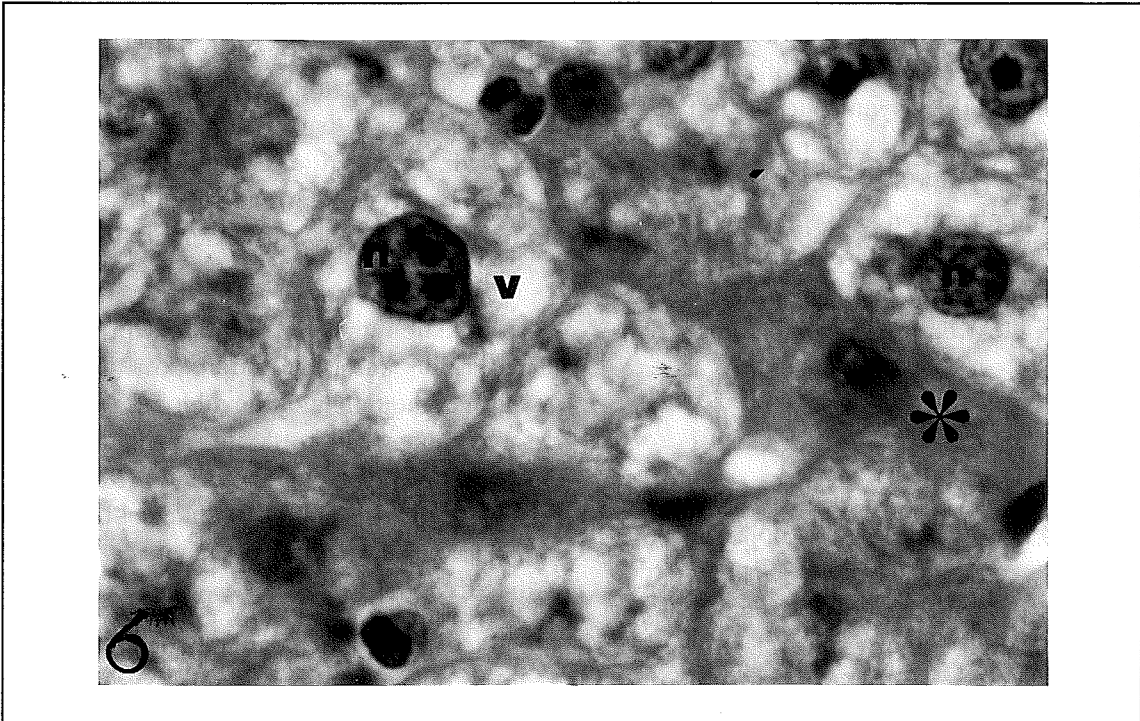
Tamoksifen grubu: Işık mikroskopi incelemelerinde karaciğer hücre kordonlarının yapı ve bütünlüğünün bozulduğu, periportal saha ve hepatosit kordonları arasında büyük kanama odakları olduğu görüldü (Mikrograf 5 A). Hepatosit nukleuslarında şekil bozuklukları, ve sayıca artmış nukleoluslar gözlemlendi (Mikrograf 5 A-B).

Nukleusların piknoza giderek dejenere olduğu, sitoplazmasında vakuolizasyonun ileri derecede arttığı izlendi (Mikrograf 5B, 6). Bazı hepatositlerin sitoplazmasını glikojenin doldurduğu, Dissé aralığındaki bağ dokuda

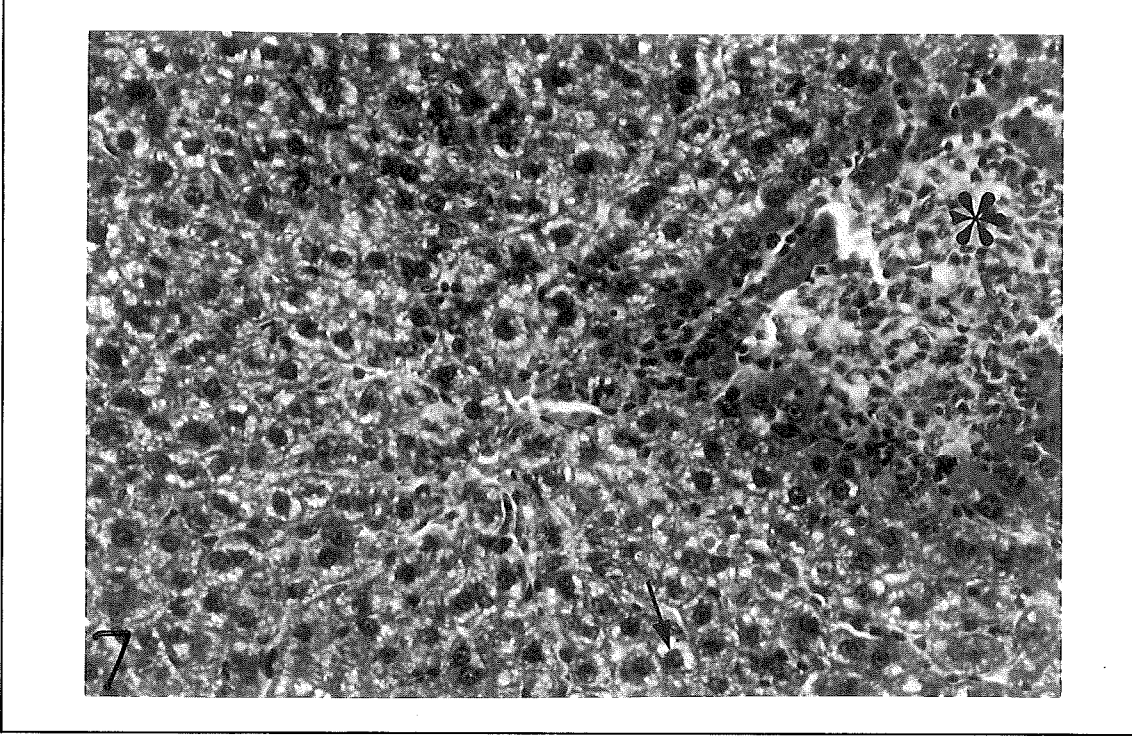
Mikrograf 5B: Tamoksifen verilen grupta, hepatositlerde artmış vaktiolizasyon (v), nukleuslarda şekil bozukluğu (→), nukleolus sayısında artış (>) gözlemlendi. H+E, X400



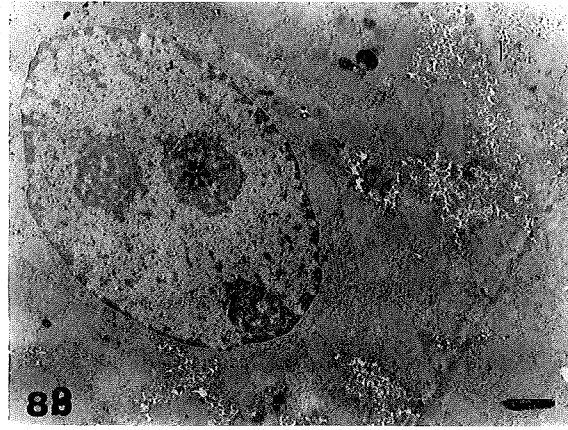
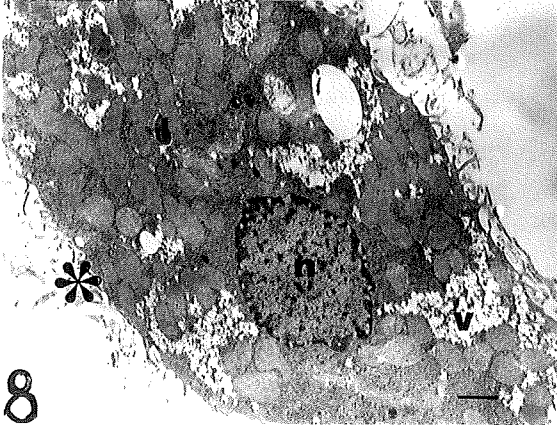
Mikrograf 6: Tamoksifen verilen grubun hepatositlerinde nukleus çap farklılıkları (n), sitoplazmada ileri derecede vakuolizasyon (v), bazı hücrelerde PAS+ (*) madde yoğunlaşması belirgin olarak izlenmektedir. PAS+HI, X1000



Mikrograf 7: Tamoksifen verilen grupta hepatosit sitoplazmalarında vakuolizasyon (→) bağ dokuda ve mononükleer hücre infiltrasyonunda (*) artış görülmektedir. Masson trichrome, X200



Mikrograf 8A: Tamoksifen verilen gruba ait hepatositte membran yapısı düzensiz nükleuslar (n), sekonder lizozom sayısında artma (l), büyük vakuoller (v), Dissé aralığına bakan yüzünde mikrovilli yapısında bozulma (*), hepatositler arasında ilişkide kopukluk ve boş alanlar izlenmektedir. Elektronmikrograf, bar 1 µm **B:** Tamoksifen verilen gruba ait hepatosit nükleusunda 3 nukleolus görülmektedir. Elektronmikrograf, bar 1 µm



sında yer alan Dissé aralığı bağ dokusunda ve mononükleer hücre infiltrasyonunda artış gözlemlendi (Mikrograf 7).

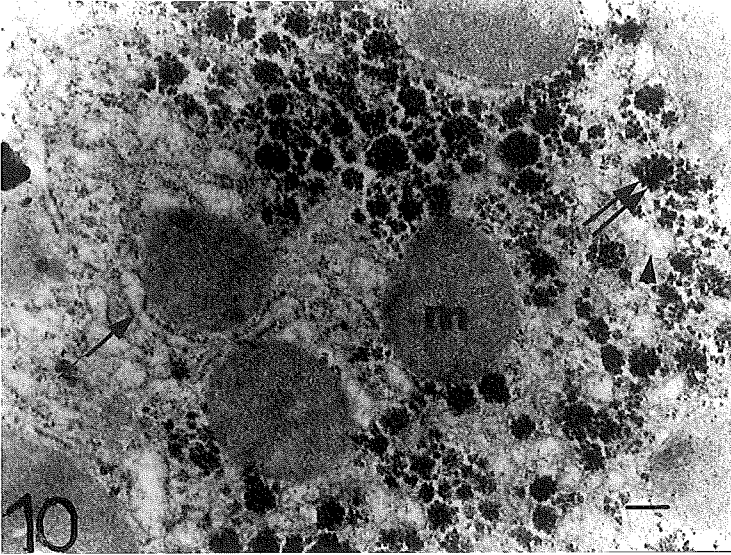
Elektron mikroskopi bulgularında hepatositlerde, belirgin heterokromatin yapısına sahip ve invaginasyon yapmış nükleuslar mevcuttu (Mikrograf 8 A), bazı kesitlerde ise ışık

mikroskopi bulgularına paralel olarak nükleolus sayısında artış görülmekteydi (3 nükleolus) (Mikrograf 8 B). Sitoplazmada; granüllü endoplazmik retikulum sisterna yapısında artış ve dilatasyon (Mikrograf 8 A), düz endoplazmik retikulum sisterna yapısında incelleme, yer yer madde birikimi ve bazı hepatositlerde sayıca azalmış mitokond-

Mikrograf 9: Tamoksifen verilen grubun hepatosit sitoplazmasında, granü- lü endoplazmik retikulum yapısında incelmeye (→), mitokondri sayısında azalma (m) ve hücre dejenerasyonuna bağlı organellerde azalma ve boş alanların (*) ortaya çıktığı gözlenmektedir. Elektronmikrograf, bar: 1 µm



Mikrograf 10: Tamoksifen verilen grubun hepatosit sitoplazmasında mito- kondri matrisinde yoğun madde birikimi (m), granüllu endoplazmik retiku- lumda (→) ve düz endoplazmik retikulum tübül vesiküllerinde dila- tasyon (>), α glikojen partiküllerinin rozet tarzında yoğunlaştığı (⇒) görülmekte- dir. Elektronmikrograf, bar: 200nm.



riler izlendi. Bazı hepatositlerde hücre de- jenerasyonuna bağlı organel kaybı, ve vaku- olizasyon alanları görüldü (Mikrograf 9, 10). Sekonder lizozom sayısında ve lipid damla- cıklarının miktarında artış gözlemlendi. Özel- likle α glikojen partikülleri sayıca artarak rozet formunda büyük gruplar oluşturmaktaydı

(Mikrograf 11). Hücrenin safra kanalikülüne yakın yüzünde dilate olmuş ve sayıca artmış Golgi aygıtı vardı. Safra kana- likülünü oluşturan ekzokrin yüzde, mikrovilli yapısında düzensizlik, sayısında azalma, lümeninde genişleme ve zonula occludens yapısında düzensizlik ve hücreler arası ilişkide azalma izlendi (Mikrograf 12). Dissé aralığına bakan yüzde mikrovilli yapısında incelmeye ve düzensizlik gözlemlendi (Mikrograf 8 A).

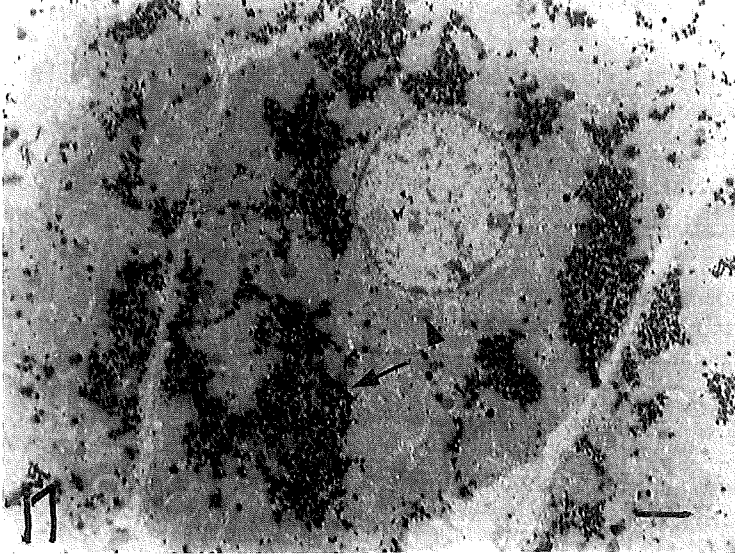
TARTIŞMA

Günümüzde kullanılan antine- oplastik ilaçların, çoğunun doğrudan sitotoksik şekilde et- kiyerek hücre hasarı meydana getirdiği bilinmektedir (25). Anti- östrojenik etkili tamoksifen, meme kanserinin tedavisinde uzun süreden beri kullanılan en iyi ilaçtır.

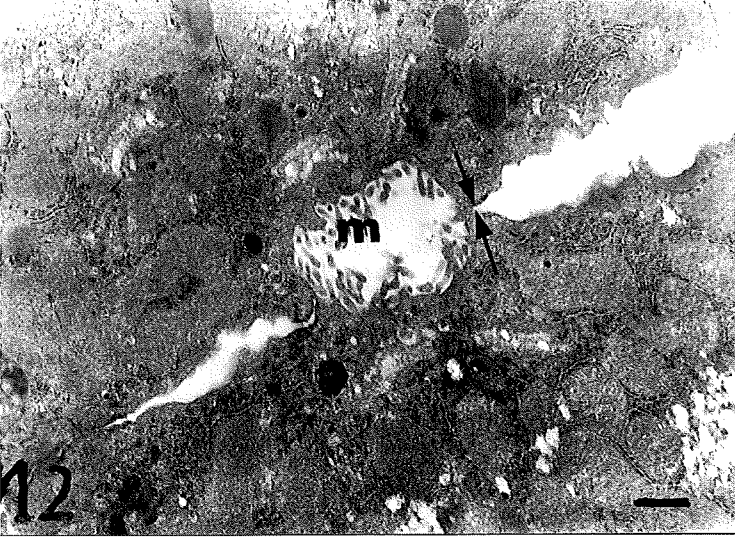
Tamoksifen sindirim sistemine alındıktan sonra, intestinal ab- sorbsiyona uğrar ve % 98'i plazma albuminine bağlanarak taşınır. Bir çok ilaç gibi ta- moksifen de, karaciğerde mi- tokondri ve düz endoplazmik retikulum mikrozomlarında si- tokrom P-450 oksidazlarla me- tabolitlerine ayrılır. Büyük kıs- mı feçesle, bir kısmı da idrar yoluyla atılan bu metabolitler

başta karaciğer olmak üzere akciğer, uterus, pankreas, hipofiz gibi organlarda yüksek konsantrasyonda birikir (13). Tamoksifenin karaciğer kanserine neden olması, karaciğer mikrozomlarında metabolize edilmesi, doku- larda birikimi nedeniyle çalışmalar karaciğer üzerine odaklanmıştır (14, 19,21,22).

Mikrograf 11: Tamoksifen verilen grupta hepatosit sitoplazmasında α glikojen partiküllerinin yoğun birikimi (\rightarrow) sekonder lizozomların artışı (\triangleright) gözlenmektedir. Elektronmikrograf, bar: 2 μ m



Mikrograf 12: Tamoksifen verilen grupta iki hepatosit arasında zonula occludens yapısının bozulması ($\rightarrow\leftarrow$) hücreler arası bağlantının kopması, safra kanalicülünde mikrovilli sayısında azalma ve incelenin (m) ortaya çıktığı görülmektedir. Elektronmikrograf, bar: 500nm.



Bu amaçla, tamoksifenin kullanım süresi ve dozuyla ilişkili karşılaştırmalı olarak yapılan ışık mikroskopik bir çok araştırmada, ilacın uzun süreli veya yüksek dozda kullanılmasının, östrojenik etkiyi ortaya çıkararak, serum östrodiol konsantrasyonunda artışa neden olarak, karaciğerde zararlı etkiyi oluşturduğu (1,6,7,8,10,12,13,23) ve insanda tamoksifenin günde 10mg'dan fazla dozda alındığın-

da ortaya çıktığı saptanmıştır (13).

Hepatosellüler tümör insidansının doz ve verilen süreye bağlı olarak arttığını gösteren ışık mikroskopik çalışmalarda; tamoksifen verildikten 31 hafta sonra sıçanlarda kanserlerin büyük çoğunluğunun hepatosellüler karsinoma olduğu (14) ve ilacın verilmiş süresine paralel olarak artan çapta ve sayıda hiperplastik nodüle neden olduğu saptanmıştır (1).

Tamoksifen, karaciğer üzerine zararlı etkisini; organ ağırlığında azalma (2,7,25), hepatosit organellerinde morfolojik ve fonksiyonel bozukluklar, lipidozis (13,14) ve hepatosellüler karsinomalar (14,16,17,18,19,20) olarak gösterir.

Greaves ve arkadaşları da, tamoksifen alanlarda yaygın lipidozis hepatosellüler karsinom, ayrıca hepatosit peroksisomlarında proliferasyon tespit etmişlerdir (14).

3.5 ay süreyle tamoksifen uygulanan sıçanların karaciğerlerinin histolojik yapısında büyük değişimler olduğu gözlenmiştir.

Tamoksifenin; ilaç ile oluşturulan karaciğer hasarının en yaygın görülen bulgularından birisi olan kolestazise neden olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır (4,11,17). Tamoksifenin DNA veya proteinlere kovalent bağlandığı ve bu kovalent bağlanmanın doku toksisitesi ve karsinogenite meydana getirdiği bir çok araştırmacı tarafından saptanmıştır (5,20). Ayrıca tamoksifenin, karaciğerde DNA sentezini

azalttığı, DNA hasarı ile hepatosellüler kanser ve karsinojenik süreçte etkili olan genotoksik etki oluşturduğu ileri sürülmüştür (1,7,14,16,19,20,22).

Hirsimaki ve arkadaşları, tamoksifen alanlarda hepatosit nukleus çapında ve kromatin miktarında artış, apoptotik ve nekrotik hepatositler saptamışlardır (17). Buna paralel olarak bazı hepatosit nukleuslarında kromatin yoğunlaşması görülmüş, özellikle ışık mikroskopide çok büyük boyutta, polimorfik, çok nukleoluslu ve yer yer de piknotik nukleuslara rastlamışlardır. Gerek nukleus, gerekse sitoplazmadaki bu değişikliklerin; tamoksifenin DNA ve protein üzerine direkt etkisi ile (5,20) ve ayrıca hücre organellerinde hasara paralel olarak nukleus-sitoplazma ilişkisinde azalma ile olduğu düşünülmektedir.

Yapılan birçok çalışmada özellikle ışık mikroskopik düzeyde incelemeler yapılarak tamoksifenin kullanım süresi ve dozuna bağlı olarak artış gösteren hepatocelluler karsinomaya neden olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada, ışık mikroskopi seviyesinde belirgin hepatocelluler karsinoma görülen dokuların yanısıra görülmeyen karaciğer dokularında da elektron mikroskopi bulguları bu hücrelerde de az olmakla birlikte hasar meydana geldiğini ortaya koymuştur. Tamoksifen ile ilgili organel düzeyinde hepatosit morfolojisi çalışmalarının azlığı göz önüne alındığında elde ettiğimiz bulguların ilacın kullanımının gerektiği durumlarda dikkatli olunması gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ahotupa M, Hirsimäki P, Pärssinen R and Mäntylä E: Alterations of Drug Metabolising and Antioxidant Enzyme Activities During Tamoxifen-induced Hepatocarcinogenesis in the Rat. *Carcinogenesis*. 15: 863 (1994).
2. Al-Turk WA, Stohs SJ and Roche EB: Effect of Tamoxifen Treatment in Liver, Lung and Intestinal Mixedfunction Oxidases in Male and Female Rats. *Drug Metabolism and Disposition* (1981).
3. Bertram G. Katzung: Estrogen & Progesterone Inhibitors & Antagonists. *Basic & Clinical Pharmacology*. 624 and 841. Sixth edition. Copyright (1995).
4. Blackburn AM, Amiel SA, Millis RR, Rubens RD: Tamoxifen and Liver Damage. *Br. Med. J. Clin-Res Ed*. 289: 288 (1984).
5. Carthew P, Nolan BM, Edwards RE Smith LL: The Role of Cell Proliferation in the promotion of Rat Liver Tumours by Tamoxifen. *Cancer Letters*. 106:163-169 (1996).
6. Dökmeci İ: Farmakoloji. İlaç uygulamalarında Temel Kavramlar. Cilt.2. Saray Medikal Yayıncılık (1996).
7. Dragan YP, Fahey S, Street K, Vaughan J, Jordan VC and Pitot HC: Studies of Tamoxifen as a Promoter of Hepatocarcinogenesis in Female Fischer F344 Rats. *Breast Cancer Research and Treatment*. 31:11 (1994).
8. Dragan YP, Xu Y-D., and Pitot HC: Tumor Promotion as a Target for Estrogen / Antiestrogen Effects in Rat Hepatocarcinogenesis. *Preventive Medicine*. 20:15-26. (1991).
9. Fernö M, Anderson C, Fallenius G and Idvall I: Oestrogen Receptor Analysis of Paraffin Sections and Cytosol Samples of Primary Breast Cancer in Relation to Outcome After Adjuvant Tamoxifen Treatment. *Acta. Oncologica*.35:17 (1996).
10. Fornander T, Rutqvist LE, Wilking N, Carlström K and Schoultz B.: Oestrogenic Effects of Adjuvant Tamoxifen in Postmenopausal Breast Cancer. *Eur.J. Cancer* 29:497 (1993).
11. Fornander T, Rutqvist LE: Adjuvant Tamoxifen and Second Cancers. *Lancet*.1: 616 (1989).
12. Fornander T, Cedermarck B, Mattsson A, Skoog L, Theve T, Askergren J, Rutqvist LE, Glas U, Silfversward C, Somell A, Wilking N, Hjalmar M-L: Adjuvant Tamoxifen in Early Breast Cancer: Occurrence of New Primary Cancers. *The Lancet*. 117 (1989).
13. Furr BJA, and Jordan VC: The Pharmacology and Clinical Uses of Tamoxifen. *Pharmac. Ther.* 25:127 (1984).
14. Greaves P, Goonetilleke R, Nunn G, Topham J and Orton T: Two-Year Carcinogenicity Study of Tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived Rats. *Cancer Research*. 53 :3919 (1993).
15. Hard GC, Williams GM, Iatropoulos MJ: Tamoxifen and Liver Cancer. *The Lancet*. 342: 444 (1993).
16. Hirsimaki P, Mantyla E, Hirsimaki Y and Mantyla M: The Effects of Tamoxifen and Toremifen on Rat Liver Ultrastructure and Peroxisomal Enzymes. *ICEM 13-PARİS 1229* (1994).
17. Hirsimaki P, Hirsimaki Y, Nieminen L.i and Joe PB: Tamoxifen induces hepatocelluler carcinoma in rat liver: a 1 year study with two antiestrogens. *Arch. Toxicol* . 67:49 (1993).
18. Jordan VC: Molecular Mechanisms of Antiestrogen Action in Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 31:41 (1994).
20. Kim DJ, Han BS, Ahn B, Lee KK, Kang JS Tsuda H: Promotion Potential of Tamoxifen on Hepatocarcinogenesis in Female SD or F344 Rats Initiated with Diethylnitrosamine. *Cancer Letters*. 104:13 (1996).
20. Mani C and Kupfer D: Cytochrome P-450 mediated Activation and Irreversible Binding of the Antiestrogen Tamoxifen to Proteins in Rat and Human Liver: Possible

Involvement of Flavin-containing Monooxygenases in Tamoxifen Activation. *Cancer Research*. 51: 6052 (1991).

21. Mani C, Gelboin HV, Park SS, Pearce R, Parkinson A and Kupfer D: Metabolism of the Antimammary Cancer Antiestrogenic Agent Tamoxifen. *Drug Metabolism and Disposition*. 21:645 (1993).
22. Morrow M, Jordan VC: Risk Factors and the Prevention of Breast Cancer with Tamoxifen. *Cancer Surveys*. 18:211 (1993).
23. Robertson JFR, Ellis IO, Nicholson RI, Robins A, Bell J. and Blamey RW: Cellular Effects of Tamoxifen in Primary Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 20:117 (1991).
24. Taylor CM, Blanchard B and Zava DT: Estrogen Receptor-Mediated and Cytotoxic Effects of the Antiestrogens Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen. *Cancer Research*. 44: 1409 (1984).
25. Williams GM, Jatroopoulos MJ, Djordjevic MV and Kaltenberg OP: The Triphenylethylene Drug Tamoxifen is a Strong Liver Carcinogen in the Rat. *Carcinogenesis*. 14: 315 (1993).