

Gebe Sıçanlara Uygulanan Diklofenak Sodyumun Postnatal Uterus Üzerine Etkilerinin Araştırılması: Stereolojik Bir Çalışma

An Investigation of the Effects of Diclofenac Sodium Applied to Pregnant Rats on Postnatal Uterus: A Stereological Study

Şehri Karakoç, Neşe Çölçimen*, Murat Çetin Rağbetli

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van

ÖZET

Amaç: Nonsteroidal Antiinflatuvar ilaç (NSAİİ)'lerin analjezik, antipiretik ve antiinflatuvar özellikleri mevcuttur. Bu özelliklerinden dolayı gebelikte de kullanılmaktadırlar. Biz de çalışmamızda gebe sıçanlara bu ilaç grubundan olan Diklofenak Sodyum'u uygulayarak, postnatal dönemde yavru sıçanların uterusu üzerinde oluşturduğu etkileri stereolojik yöntemlerle araştırmayı planladık.

Yöntem ve Gereçler: 12 adet Wistar Albino sıçan alındı. Çalışma ve sham olmak üzere 2 gruba ayrıldı, gebeliğin beşinci gününden itibaren, 15 gün süreyle her gün çalışma grubuna 1mg/kg Diklofenak Sodyum ve sham grubuna da aynı miktarda serum fizyolojik uygulandı. Postnatal dördüncü haftada anestezi altında yavru sıçanların uterusu disseke edildi ve rutin histolojik takip metodları uygulandı. 5µm kalınlığında kesitler alındı. Masson Trikrom boyası ile boyandı. Stereolojik ölçümde, Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı. Total doku volüm oranları, Shetereom 1.5 version paket programında verilmiş noktalı alan cetveliyle değerlendirildi.

Bulgular: Grupların uterus epitel ve seroza tabakalarının volümleri karşılaştırıldığında, çalışma grubunda sham grubuna göre azaldığı ve istatistikî açıdan anlamlı bulunduğu tespit edildi (p<0.05).

Sonuç: Gebeliklerinde NSAİİ verilen sıçanların yavrularında endometriumda değişikliklere yol açtığı tesbit edildi. Bu sonuç bize bu grup ilaçların intrauterin dönemde tercih edilmesini gerektiren durumların daha özenli seçilmesi gerekliliğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Diklofenak sodyum, gebelik, stereoloji, uterus

ABSTRACT

Introduction: Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are a group of drugs that have analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects. Because of these characteristics they are also used in pregnancy. Diclofenac Sodium from this group of drugs was applied to pregnant rats and it was planned to investigate the effect of postnatal pups on the uterus by stereological methods.

Materials and Methods: Twelve Wistar Albino rats were chosen. They were divided into two groups. From the fifth day of gestation, every day for 15 days, study group was applied 1 mg/kg Diclofenac sodium and sham group the same amount of physiological saline. At postnatal week 4, the uterus of the pups was dissected and routine histological follow-up methods were applied. Sections were taken 5µm thick. Tissues stained with Masson's Trichrome. The stereological measurement was evaluated using the modified method of the Cavalieri principle. The total tissue volume ratios were assessed using the dotted area scale given in the Shetereom 1.5 version package program.

Results: When the volumes of the uterine epithelium and serosa layers of the study and sham groups were compared, it was found that the study group had a statistically significant decrease compared to the sham group (p<0.05).

Conclusion: NSAIDs during pregnancy caused changes in endometrium in the offsprings. It is suggested that more careful selection of these group drugs should be preferred in intrauterine period.

Key Words: Diclofenac sodium, pregnancy, stereology, uterus

Giriş

Nonsteroidal antiinflatuvar ilaç (NSAİİ)'lar, dünyada en sık reçete edilen ilaç grupları içerisinde yer alırlar. Ülkemizde de en sık kullanılan ilaç

grupları içerisinde olup, International Medical Statistic (IMS) verilerine göre 2013 yılında 120 milyon NSAİİ reçete edilmiştir (1). Bu ilaç grubu en sık analjezik, antiinflatuvar ve antipiretik olarak kullanılmaktadır (2). NSAİİ' lar

Prostaglandin (PG) sentezini önleyerek enflamasyonu azaltırlar, ateş yükselmesine engel olurlar, ağrı kesici etki gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı NSAİİ' lar genellikle iskelet sistemi, kas-eklem ve romatizmal hastalıklarda, ağrı, ateş ve enflamasyonun tedavisi için kullanılırlar (3). Gebelik esnasında kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve romatizmal hastalıkların (Romatoid Artrit, spondiloartropatiler gibi) tedavisi için bu ilaç grubunun kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir. Aynı zamanda NSAİİ' lar obstetrik komplikasyonlarda; erken doğumu ve preeklampsiyi önlemede, polihidroamniyozu ve antifofolipid sendromunu tedavi etmede de tercih edilmektedirler. Ancak, NSAİİ' ların gebelik süresince kullanımının annede ve fetusda yan etkilere yol açtığı birçok çalışmada bildirilmiştir. Hamilelikte kullanılan NSAİİ' ların gebelik ve doğum süresini uzattığı, duktus arteriosusun (DA) erken kapanması ve Persisten Pulmoner Hipertansiyon (PPHN)'a neden olduğu, oligohidroamnios, ileal perforasyon, beyinde Cystic Periventricular Leukomalazia (cPVL), Periventriculer/intraventiküler hemoraji (PVH/IVH), böbrekte kistik displazi, tubuler disgenezi, iskemik hasar ve nefron sayısında azalmaya yol açtığı, akciğer ve iskelet sistemi üzerinde de olumsuz etkiler oluşturdukları bildirilmiştir (4). Günümüzde ileri yaş gebeliklerinin artması ile gebelikler de eşlik eden birçok hastalıkla birlikte sürdürülmektedir. Bu durumlarda ilaç tedavilerinin her ne kadar öncelikle anneyi tedavi etmeyi amaçlasa da gelişecek embriyoyu gözetenek düzenlenmeleri gerekmektedir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamız da üniversitemiz Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları (150-200) gr. arasında olan daha önce hiç çiftleşmemiş 6 adet erişkin Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Ayrıca çalışma öncesi üniversitemiz Etik Kurulundan izin alındı alındı (Tarih: 26.03.2009, Karar No: 04). Sonra dişi sıçanlar çalışma (3 adet), sham (3 adet) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Çiftleşme sonrasında dişi sıçanlarda vaginal plak gözlenenler, gebeliğin sıfırncı '0.' günü kabul edildi. Çalışma grubuna gebeliklerinin 5. günden itibaren 15 gün süreyle günde bir kez 1mg/kg (insan dozu) diklofenak sodyum (Diklofenak Sodyum, 75mg/3 ml ampul intramüsküler (IM) enjekte edildi. Sham grubu gebe sıçanlara ise aynı süre içerisinde her gün 1cc/kg serum fizyolojik enjekte edildi. Sıçanlar

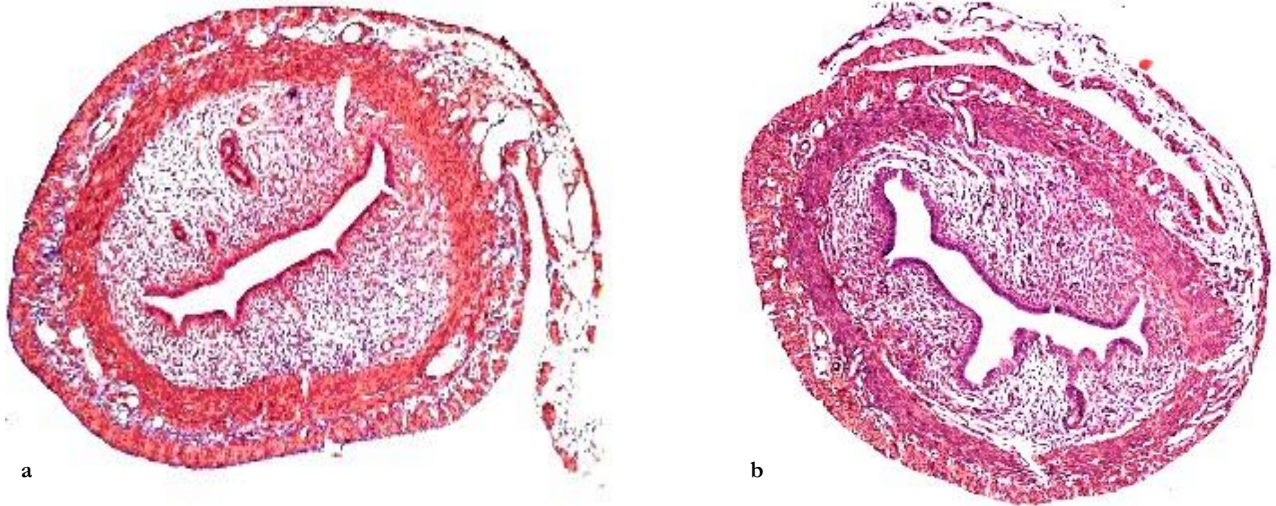
normal ışık ve karanlık siklusu ile (21 ± 2 °C) takibe alınarak, standart yem ve suları ad libitum olarak verildi. Postnatal 28. günde, hepsi 4 haftalık olmak üzere, 6 adet çalışma grubu ve 6 adet sham grubu elde edildi. Uterus gövde, fundus ve serviks olmak üzere 3 parçaya ayrılarak, rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü ve bloklar hazırlandı. İlk kesit rastgele seçilerek, 5 µm kalınlığında, ardışık bir çift olmak üzere 15 kesit alındı, alınan kesitler deparafinize edildikten sonra Masson Trikrom boyası ile boyanarak ışık mikroskopik (Zeiss axioskop 40 Carl Zeiss Göttingen, Germany) incelemeye tabi tutuldu. Resimler için AxioVision 3,1 (Zeiss axioplan 2 imaging Göttingen, Germany) programı kullanıldı. Stereolojik ölçümde, Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı (5). Sonrasında epitel, mukoza (endometrium), muskularis (myometrium), seroza (perimetrium) ve total doku volüm oranları, Shetereom 1.5 version paket programında verilmiş noktalı alan cetveliyle ölçüldü (6,7). Özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Hesaplamalarda, istatistik anlamlılık düzeyi olarak %5 alındı ve hesaplamalar SPSS (ver.12) istatistik paket programında yürütüldü.

Bulgular

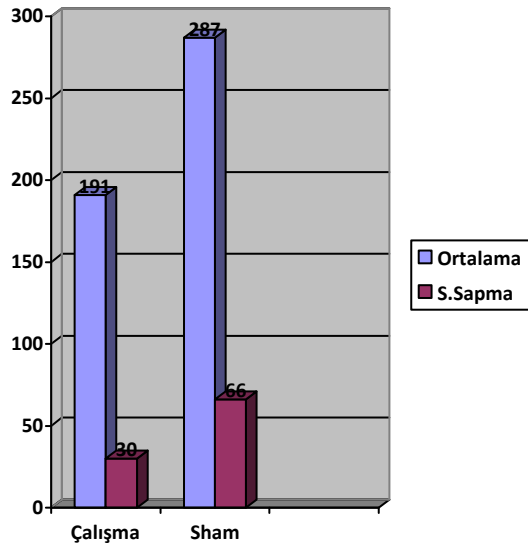
Çalışmamızda, ışık mikroskobu ile sıçan uterus dokusu üzerine Diklofenak Sodyum'un epitel tabakası, tunika mukoza, tunika muskularis, tunika seroza ve total doku volümlerine etkisi araştırıldı (Resim 1). Epitel tabaka volüm oranının çalışma grubunda, sham grubuna göre azaldığı fakat sham grubunda ise değişmediği tespit edildi ve bu azalma istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Grafik 1). Aynı şekilde seroza tabakası volüm oranının çalışma grubunda, sham grubuna göre azaldığı fakat sham grubunda ise değişmediği tespit edildi ve bu istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Grafik 2). Mukoza tabakası, muskularis tabakası ve total doku volüm oranlarının çalışma ve sham gruplarında değişmediği tespit edildi ve değerler istatistiki açıdan anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 1).

Tartışma

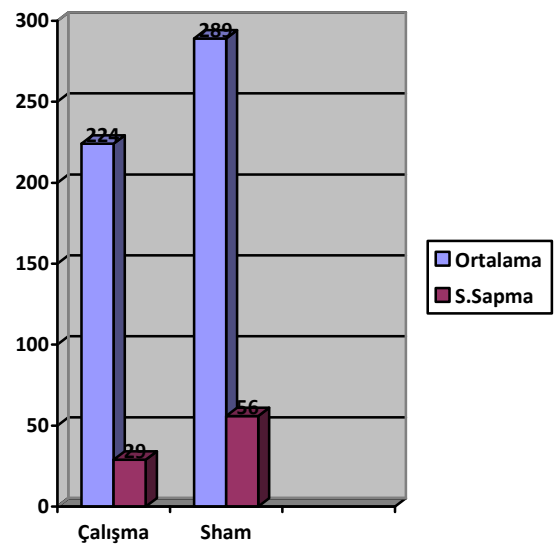
Siklooksijenaz (COX) enzimi, membran fosfolipidlerinden prostaglandin sentezlenmesinde anahtar enzimdir. COX enziminin iki izoformu vardır; COX-1 (yapısal) ve COX-2 (indüklenebilir). COX-1 fizyolojik şartlarda aktif durumdadır ve vasküler homeostasis, gastrik



Resim 1. a-Uterus çalışma grubu görüntüsü b-Uterus sham grubu görüntüsü (Masson Trikrom x10 obj.)



Grafik 1. Grublara ait epitel tabaka volüm oranları.



Grafik 2. Grublara ait tunika seroza volüm oranları.

Tablo 1. Gruplara uygulanan tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

	Grup	Median	Mean	St.Dev.	Min.	Max.	p
Epitelyum Tabakası	Çalışma	181875000 ^{b#}	191093750	30461137	167812500	251562500	0.01
	Sham	290000000 ^a	287291667	66625899	192812500	364062500	
Tunika Mukoza	Çalışma	1579375000 ^a	1576250000	471071916	947500000	2257500000	0.141
	Sham	2038125000 ^a	2045000000	588380723	1107500000	2695000000	
Tunika Muskularis	Çalışma	2085000000 ^a	2108958333	477656006	1518750000	2845000000	0.392
	Sham	2317500000 ^a	2342083333	630594296	1465000000	3297500000	
Tunika Seroza	Çalışma	216093750 ^b	224062500	29105814	195312500	276875000	0.002
	Sham	309843750 ^a	289791667	56402455	198750000	345000000	
Tüm Doku	Çalışma	4695000000 ^a	4640000000	1407096301	2755000000	6750000000	0.225
	Sham	5227500000 ^a	5499166667	1261520577	4160000000	7805000000	

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (p<0.05).

#: Farklı harf alan grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır.

fonksiyonlar, trombosit aktivitesi ve renal fonksiyonları düzenleyen prostaglandilerin sentezini sağlar. COX-2 normal fizyolojik durumlarda dokularda saptanamaz. Sadece herhangi bir inflamasyon durumunda indüklenir ve inflamasyona yanıt olarak ortaya çıkar. COX-2 ağrı, ateş ve inflamasyon oluşturan prostaglandinlerin sentezinde rol oynar (8).

NSAİ ilaçların etki mekanizmalarından biri de Siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe etmektir. NSAİ'ler bu basamağı bloke ederek, prostaglandin sentezini engellemektedirler ve böylece hem analjezik hem de antiinflamatuvar etkiler oluşturmaktadırlar (9).

COX-2 ovulasyon, fertilizasyon ve implantasyon gibi birçok reproduktif basamakta rol oynar (10). COX-2 ekspresyonu tüm siklus boyunca endometriyumda saptanmakla birlikte ovulasyondan sonra, sekretuar fazda en yüksek konsantrasyona ulaşmaktadır (11). PGE₂S ve PGF_{2α}S insan endometrial epitelinde lokalizedirler. İnsanda implantasyon pencere döneminde uterin sıvıda bu maddelerin konsantrasyonu artar. Yine implantasyon pencere döneminde COX-1 luminal ve glandular epitelden, COX-2 de luminal epitel ve vasküler hücrelerden expresse edilir (12).

Siklooksijenaz inhibitörlerinin ovulasyon, fertilizasyon, desidualizasyon, ve akabinde gerçekleşecek olan implantasyon (12) ve doğumda (gecikmiş doğum, doğum süresinde uzama) (13) major etkilerinin olduğu yönünde kanıtlar vardır, çünkü bu olayların tamamında PG'lerin önemli rolleri mevcuttur. Bunları destekler şekilde COX-2'nin eksik olduğu dişi farelerde fertilizasyon, implantasyon desidualizasyon defektleri olduğu gösterilmiştir (12). COX-2 defektli dişi farelerin sıklıkla infertil oldukları, COX-1 defektli dişi farelerin ise fertil olduğu ancak bunlarda doğum defektleri olduğu gösterilmiştir (14). Bazı çalışmalarda yine prenatal NSAİ kullananlarda düşük riskinde artış olduğu gösterilmiştir (15).

Amerikan Gıda ve İlaç Komisyonu (FDA) tarafında gebelikte kullanılacak ilaç sınıflandırılmasında NSAİ ilaç grubu 1. ve 2. trimesterde B/C kategorisinde 3. trimesterde D kategorisinde değerlendirilmektedir (13). Bu nedenle kullandıkları gebelik periyodu, ilacın dozu ve süresi fetus üzerinde oluşturacağı etkiler açısından farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar birçok çalışmada ortaya konulmuştur.

Son epidemiyoloji araştırmalar gebeliğin 1.trimesterinde NSAİ kullanımının konjenital kardiyak anomalilere (büyük ventiküler ve atrial septal defekt) ve gastroşizis, diafragma hernisi gibi

orta hat defektlerine neden olabileceğini gösterdi (15).

Treme yakın NSAİ kullanımı: annede; gebelik süresini ve doğumu uzattığı, peripartum kan kaybı ve anemiyi arttırdığı, fetusta; cutanöz ve intrakarnial kanama riskini artırdığı, ductus arteriosusun erken kapanmasına neden olarak pulmoner hipertansiyona yol açtığı, renal fonksiyonları bozarak üriner outputu azalttığı ve amniotik sıvı volümünün azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (16).

Diklofenak sodyum kobaylarda prostaglandin sentezini inhibe ederek implantasyon ve plasantasyonu bozmuştur. Carp ve ark. (17) tarafından sıçanlara 3mg/kg Diklofenak Sodyum verdikleri çalışmalarında kontrol grubunda blastosist implantasyon oranının %72, Diklofenak Sodyum uygulanan grupta da bu oranının %35-41 arasında olduğu tesbit edilmiştir. Sonuçta; Diklofenak Sodyum'un desidual defekte neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz endometrium epitel ve serozal dokularda ki meydana gelen değişiklikler ve volüm azalması bulgusu da bu sonuçları desteklemektedir.

Üstün ve ark. (18) yaptıkları bir çalışmada 0.2 mg/kg Diklofenak Sodyum ((düşük doz)) uygulanan sıçanların overlerini histopatolojik olarak incelenmesi sonucu Diklofenak Sodyum grubunda kontrol grubuna göre sekonder folikül sayısında düşüşün anlamlı derecede olduğu, tersiyer folikül sayısında ise farklılık olmadığını bildirmişlerdir

Kökçü ve ark. (19) yapmış olduğu çalışmada gebeliğin 4. gününden 17. gününe kadar 14 gün süreyle denek grubundaki 12 erişkin gebe rata 0.2 mg/kg (düşük doz) Diklofenak sodyum verilmiş, ratlardan doğan fetus sayısının daha az olduğu ve denek grubunun gebelik süresinin önemli derecede daha uzun olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada Diklofenak Sodyumun yarık damağa yol açtığı tesbit edildi. Diğer bir çalışmada gebe sıçanlara 5 mg/kg Diklofenak Sodyum (yüksek doz) uygulaması sonucu fetusların kaburgalarında deformiteler olduğu bildirilmiştir (13). Biz çalışmamızda yavru sıçanlarda herhangi bir teratojen etki tesbit etmedik.

Nonsteroidal Antiinflamatuvar ilaç (NSAİ)'lar intrauterin dönemde kullandıkları gebelik periyodu, ilacın dozu ve kullanım süresine bağlı olarak fetuste fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere yol açabilmektedir. Bu nedenle bu grup ilaçları gebelik döneminde tercih ederken oluşturabilecekleri olumsuz etkileri göz önünde bulundurulmalı ve daha dikkatli olunmalıdır.

Kaynaklar

1. Eminler AT, Uslan MI, Köksal AŞ, Parlak E. Non-steroid Anti-inflamatuvar İlaçların Üst Gastrointestinal Sistem Yan Etkileri ve Önlenmesi. *Güncel Gastroenteroloji* 2014; 18(3): 333-338.
2. Van Gelder MM, Roeleveld N, Nordeng H. Exposure to Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs during Pregnancy and the Risk of Selected Birth Defects: A Prospective Cohort Study. *PLoS One* 2011; 6(7): e22174.
3. Gökçimen A, Malas MA. Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisite ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. *Isparta Süleyman Demirel Üniv Tıp Fak Derg* 2003; 10(3): 50-52.
4. Antonucci R, Zaffanello M, Puxeddu E, Porcella A, Cuzzolin L, Pilloni MD, et al. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. *Curr Drug Metab* 2012; 13(4):474-490.
5. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147(Pt 3):229-263.
6. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96(5): 379-394.
7. Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology, three-dimensional measurements in microscopy. *BIOS Scientific Publishers, Oxford* 1998: 39-68.
8. Duman EN. NSAİ İlaçların Kronik Ağrı Tedavisinde Yeri. *Klinik Gelişim Dergisi* 2007; 20(3): 145-149.
9. Kapıcıoğlu MİS. Steroid olmayan Antiinflatuar İlaçlar (NSAİİ). *TOTBİD Dergisi* 2007; 6(1-2): 69-70.
10. Gaytán M, Morales C, Bellido C, Sánchez-Criado JE, Gaytán F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ovulation: lessons from morphology. *Histol Histopathol* 2006; 21(5): 541-556.
11. Kasap E, Karaarslan S, Gur EB, Genç M, Sahin N, Gülcü S. Investigation of the Roles of Cyclooxygenase-2 and Galactin-3 Expression in the Pathogenesis of Premenopausal Endometrial Polyps. *Journal of Pathology and Translational Medicine* 2016; 50(3): 225-230.
12. Salleh N. Diverse Roles of Prostaglandins in Blastocyst Implantation. *Scientific World Journal* 2014; 968141.
13. Özbudak H, Ünal AZ, Sabuncuoğlu S. Gebelikte Non-Steroidal Antiinflatuar İlaçların Kullanımın Değerlendirilmesi. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2016; 20: 64-71.
14. Thill M, Becker S, Fischer D, Cordes T, Hornemann A, Diedrich K, et al. Expression of Prostaglandin Metabolising Enzymes COX-2 and 15-PGDH and VDR in Human Granulosa Cell. *Anticancer Research* 2009; 29(9): 3611-3618.
15. Casina M, De Santis M, Cesari E, Van Eijkeren M, Berkovitch M, Eleftheriou G, et al. First trimester diclofenac exposure and pregnancy outcome. *Reproductive Toxicology* 2010; 30(3): 401-404.
16. Risser A, Donovan D, Heintzman J, Page T. NSAID Prescribing Precautions. *American Family Physician*, 2009; 80 (12): 1371-1378.
17. Carp HJ, Fein A, Nebel L. Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988; 28(3):273-277.
18. Üstün C, Kökçü A, Çokşemin Ş, Kandemir B. Sıçanlarda, prostoglandin sentez inhibitörü diklofenak sodyum'un ovarian follikulogenezis üzerine etkisi. *T Klin Jineköl Obst* 1993; 3(1): 70-72.
19. Kökçü A, Üstün C, Çokşemin Ş, Balat Ö. Gebe sıçanlara uygulanan diklofenak sodyumun fetüs sayısı ve gebelik süresine etkisi. *T Klin Jineköl Obst* 1992; 2: 295-297.