

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ENDOMETRİUM KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
BEVACİZUMAB (VEGF MONOKLONAL ANTİKORU)
ADLI MADDENİN TEK BAŞINA VE KLASİK
KEMOTERAPÖTİKLERLE KOMBİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Dr. Ceren YILDIZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2010

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ENDOMETRİUM KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
BEVACİZUMAB (VEGF MONOKLONAL ANTİKORU)
ADLI MADDENİN TEK BAŞINA VE KLASİK
KEMOTERAPÖTİKLERLE KOMBİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Dr. Ceren YILDIZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. S. Sinan ÖZALP

ESKİŞEHİR

2010

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Ceren YILDIZ'a ait "Endometrium kanser hücre kültüründe BEVACİZUMAB (VEGF monoklonal antikoru) adlı maddenin tek başına ve klasik kemoterapötiklerle kombine etkilerinin incelenmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:06.01.2010

| | | |
|--------------|---|------|
| Jüri Başkanı | Prof. Dr. S. Sinan ÖZALP | İmza |
| | Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı | |
| Üye | Prof. Dr. Ömer T. YALÇIN | İmza |
| | Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı | |
| Üye | Doç. Dr. H. Mete TANIR | İmza |
| | Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı | |

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
...../...../.....Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimi süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Hikmet HASSA'ya, tez danışmanım Prof.Dr. S. Sinan ÖZALP'e, rahmetle ve özlemle andığım Prof. Dr. Atilla YILDIRIM'a, Prof.Dr. K. Turgay ŞENER'e, Prof.Dr. Ömer Tarık YALÇIN'a, Doç.Dr. H. Mete TANIR'a tezimin her aşamasında birlikte çalıştığımız Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. A. Tansu KOPARAL'a, doktora öğrencisi R. Beklem BOSTANCIOĞLU'na, verdikleri maddi ve bilimsel destek için ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Yıldız, C. ‘Endometrium kanser hücre kültüründe BEVACİZUMAB (VEGF monoklonal antikoru) adlı maddenin tek başına ve klasik kemoterapötiklerle kombine etkilerinin incelenmesi’ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010. Endometriyum kanseri; endüstrileşmiş ülkelerde kadın genital sisteminin en sık rastlanan kanseridir. Bu hastaların çoğu düşük evrelerde yakalanır ama halen bu hastalığa bağlı mortalite önemlidir. Hastaların % 75’i sınırlı hastalıkla karşımıza çıkar, bu grupta tedavi cerrahidir. Hastaların üçte birinde tekrarlayan ya da metastatik hastalık nedeniyle sistemik kemoterapiye ihtiyaç vardır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) , endometriyum kanserinde tümör büyümesinde önemli bir düzenleyici rolü olan glikoproteindir. Preklinik çalışmalarda, VEGF’e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardan olan Bevacizumab birçok nonjinekolojik insan solid tümörlerinde umut veren etkiye sahiptir. Tez kapsamında sisplatin, doksorubisin, bevacizumab gibi maddelerin bazı farklı kombinasyonlarının sitotoksik ve apoptotik etkilerini saptamak için *in vitro* testler kullanılmıştır. Bu amaçla, Ishikawa hücre kültürü kullanılarak sitotoksik etkiyi belirlemek için Tetrozolum Testi (MTT Testi), apoptosizi saptamak için ise DAPI boyama ve kaspaz-3 testi kullanılmıştır. Bu bilgiler ışığında amacımız antianjiyojenik faktörün sık görülen bir jinekolojik kanserde klasik kemoterapilerle kombine ve tek başına kullanımının etkilerini araştırmak ve klinik pratiğe yansıtmaktır. Ishikawa hücreleriyle yapılan *in vitro* sitotoksikite deneyleri sonucunda üçlü ilaç kombinasyonu tekli ve ikili ilaç kombinasyonlarına göre daha yüksek bir inhibisyon göstermiştir. DAPI boyama ve Kaspaz 3 aktivite test sonuçları, üçlü ilaç kombinasyonunun diğer iki uygulamaya göre daha fazla apoptotik etki meydana getirdiğini göstermektedir. Bu sonuçlar çoklu ilaç kombinasyonunun ümit verici olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Endometrium kanseri, MTT, DAPI, Ishikawa, apoptosis.

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Proje no:2009-11/002

ABSTRACT

Yıldız, C. The effect of Bevacizumab (VEGF monoclonal antibody) with or without classic chemotherapeutics in endometrium carcinoma cell culture. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Gynecology and Obstetrics, Eskisehir, 2010. Endometrial carcinoma is the most common malignancy of the female genital tract in industrialized countries. Although most endometrial carcinomas are detected at low stage, there is still a significant mortality from the disease. About 75 % of the patients present limited disease, confined to the uterus that can be cured by surgery. However, one third of the patients will need systemic treatment because of metastatic or relapsing disease. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important regulator of angiogenesis in endometrial cancer growth. Preclinical studies have shown that a humanized variant of monoclonal antibody against VEGF, Bevacizumab, has shown promising activity in many non-gynecologic human solid tumors. Invitro tests have been used to determine the cytotoxic and apoptotic effects of agents which are the main topic of our study (cisplatin, doksorubisin, bevacizumab). Cytotoxic effect was determined by the standard MTT assay and apoptosis by DAPI staining, caspase-3 in Ischikawa cell culture. Based on these informations, the aim of our study is to determine the effect of a antiangiogenic agent Bevacizumab with or without classic chemotherapeutics which used in one of the most common gynecologic malignancy and use these informations in our clinical practice. In vitro cytotoxicity and apoptosis tests against Ishikawa cells indicated that the triad drug combination showed a higher inhibition than a single and dual drug combination, which holds a promise for multidrug combination.

Keywords: Endometrial carcinoma, MTT, DAPI, Ischikawa, Apoptosis.

Supported by: Eskisehir Osmangazi University Scientific Research Commision, Project Number:2009/11-002

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| TABLOLAR DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Endometrium Kanseri ile İlgili Genel Bilgiler | 3 |
| 2.1.1. İnsidans, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri | 3 |
| 2.1.2. Klinik | 8 |
| 2.1.3. Tanı | 8 |
| 2.1.4. Evreleme | 10 |
| 2.1.5. Tedavi | 15 |
| 2.2. Endometrium Kanseriinde Kemoterapinin Yeri | 19 |
| 2.3. Kanser Tedavilerinin Araştırılmasında Hücre Kültürü Kullanımı | 33 |
| 2.4. Kanserde İn Vitro İlaç Etkilerinin Araştırılması | 34 |
| 2.4.1. İn Vitro Sitotoksosite Testleri | 34 |
| 2.4.2. Apoptosis Deneyleri | 35 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 38 |
| 3.1. Biyolojik Aktivite Çalışmaları | 38 |
| 3.1.1. Kullanılan Aletler | 38 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler | 38 |
| 3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri | 38 |
| 3.1.4. Kullanılan Araç Gerecin Hazırlanması | 38 |
| 3.1.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması | 39 |
| 3.1.6. Kullanılan Hücreler | 39 |
| 3.1.7. Yöntem | 39 |

| | |
|----------------------|----|
| 4. BULGULAR | 42 |
| 5. TARTIŞMA | 56 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 74 |
| KAYNAKLAR | 76 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------------|---|
| AP | Doxorubicin, Sisplatinum |
| ark | Arkadaşları |
| BEVA | Bevacizumab |
| BT | Bilgisayarlı Tomografi |
| CAP | Cyclophosphamide, Doxorubicin, Sisplatinum |
| C_{maks} | Doruk Konsantrasyon |
| D&C | Dilatasyon - Küretaj |
| DM | Diabet |
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| EAA | Eğri Altında Kalan Alan |
| EİN | Endometriyal İnterepitelyal Neoplazi |
| EORCT | European Society for Research and Treatment of Cancer |
| FIGO | International Federation Of Gynecology and Obstetrics |
| GOG | Jinekoloji Onkoloji Grubu |
| IGF | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü |
| i.v. | İntravenöz |
| KT | Kemoterapi |
| LN | Lenf Nodu |
| mg | Miligram |
| MGA | Megesterol Asetat |
| ml | Mililitre |
| µM | Mikromolar |
| MPA | Medroksiprogesteron Asetat |
| MR | Manyetik Rezonans Görüntüleme |
| MTT | Tetrozolum Testi |
| NSGO | Nordic Society of Gynecologic Oncology |
| PAP | Pap smear |
| PCO | Polikistik Over |
| p.o | Ağız Yolu |
| RT | Radyoterapi |
| SSI | Servikal Stromal İnvazyon |

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| Tm | Tümör |
| USA | United State of America |
| USG | Ultrasonografi |
| VEGF | Vasküler Endotelial Growth Factor |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| 3.1. Sisplatinin Ishikawa hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi | 42 |
| 3.2. Adriablastinin Ishikawa hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi | 43 |
| 3.3. Bevacizumabın Ishikawa hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi | 44 |
| 3.4. Sisplatin ve Adriablastinin farklı dozlarının birlikte uygulanmasının Ishikawa hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi | 44 |
| 3.5. Bevacizumab, Sisplatin ve Adriablastinin farklı dozlarının birlikte uygulanmasının Ishikawa hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi | 45 |
| 3.6. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları a. Kontrol b. DMSO | 47 |
| 3.7. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları C1. Sisplatin 20µM C2. Sisplatin 40µM | 48 |
| 3.8. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları C3. Sisplatin 80µM | 49 |
| 3.9. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları D1. Adriablastin 5 µM D2. Adriablastin 10 µM D3. Adriablastin 20 µM | 50 |
| 3.10. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları E1. Bevacizumab 4,8 mg/ml E2. Bevacizumab 9,6 mg/ml | 51 |
| 3.11. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları F. Sisplatin 40µM+Adriablastin 20µM, G. Bevacizumab 9,6 mg/ml+Sisplatin 40µM+Adriablastin 20µM | 52 |
| 3.12. Ishikawa hücrelerinin sisplatin, adriablastin ve bevacizumab ile tek başlarına ve kombine olarak 12 saatlik muamelesi sonucunda elde edilen Kaspaz-3 sonuçları | 54 |

TABLÖLAR

| | Sayfa |
|--|-------|
| 2.1. Endometrium Kanserinde Risk Faktörleri Ve Görece Oranları | 6 |
| 2.2. Endometrial Hiperplazilerin Klasifikasyonu | 7 |
| 2.3. Klinik Evreleme (FIGO 1971) | 11 |
| 2.4. Cerrahi Evrelemeye Göre Hastaların Dağılımı | 14 |
| 2.5. Cerrahi Evreleme Sonrası Risk Grupları | 14 |
| 2.6. Endometriyal Kanserde 5 Yıllık Sağkalım | 17 |
| 2.7. Risk Faktörlerine Göre 5 Yıllık Rekürrens Oranları | 17 |
| 2.8. Endometrial Karsinomada Tedavi Planı | 19 |
| 2.9. Endometrium Kanserinde Hedef Tedaviler | 22 |
| 2.10. Endojen Anjiojenik ve Antianjiojenik Faktörler | 31 |

1.GİRİŞ

Kanser; insan sağlık sistemi üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir problemdir. Teşhis, korunma yöntemleri ve tedavilerdeki gelişimlere rağmen bu hastalık hala bütün dünyada milyonlarca hastayı etkilemekte, onların yaşam kalitesini düşürmekte ve dünyadaki ölüm nedenlerinin başını çekmektedir(1).

Endometrium kanseri kadın genital sisteminin gelişmiş ülkelerde en sık rastlanan malign tümördür. Endometrium kanseri; meme, barsak ve akciğer kanserlerinin ardından kadınlarda 4. en sık rastlanan kanser olup, kanser ölümlerinin 7. en sık sebebidir. Genel olarak bakıldığında kadınların yaşamları boyunca % 2-3'ünde bu malignite gelişecektir(2). Endometrium kanserinin primer tedavisi cerrahidir. Primer cerrahi tedaviyi takiben evresine göre radyoterapi ve/veya kemoterapi gündeme gelir. Birçok kemoterapötik ajan ya da kombine ajanlar ile metastatik endometrium kanserinde yanıt alınması hatta remüsyon elde edilmesi mümkünse de cevap oranı düşük ve sağkalım süreleri kısadır ve tüm sitotoksik tedavi palyatif olarak değerlendirilmelidir(3,4). En sık kullanılan kemoterapötik ajanlar adriablastin ve sisplatin, karboplatin ya da paklitakseldir. Bu ajanlarla elde edilen cevapların çoğu kısmidir ve genellikle ortalama 3-6 ay olmakla beraber median sağkalım nüks vakalarda 4 ila 8 ay arasında değişmektedir. Ortalama 5 yıllık sağkalım tüm evrelerde % 76 olarak bulunmuştur(5,6). 2006 yılında yapılan bir çalışmada Evre 3 ve 4 hastalığı olanlarda adriablastinin sisplatinle kombinasyonu radyoterapiye üstün bulunmuştur ve ortalama % 42-55 oranında tedaviye cevap saptanmıştır(7). 2004 yılında yapılan başka bir çalışmada ise tek ajan adriablastin ile adriablastin, sisplatin kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak ikili kombinasyonun cevap oranını arttırdığı ve daha uzun hastaliksız yaşam sağladığı saptanmıştır(8).

Kanser, cevabı hücre biyolojisinin derinliklerinde saklı olan günümüzün ölümcül hastalığıdır. Moleküler biyolojide sağlanan gelişmelerin ışığında kansere karşı ilaç geliştirme çalışmaları tüm dünyada hız kazanmıştır. Günümüzde herhangi bir ilacın organ ve dokular üzerine kanserojen, mutajen, teratojen olma olasılığını araştırmak ve antikanser ilaç etkinliğini belirlemek için hayvan testlerine tercih edilen hücre kültürü testlerinden elde edilen sonuçların daha gerçekçi ve spesifik olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur(1).

Endometrium kanseri tedavisinde, kemoterapi sıklıkla başvuru bir yöntemdir. Kanser tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalardaki bulgular göz önüne alındığında, apoptozis ve sitotoksitenin kemoterapiyle yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Hücre kültürü tekniği kullanılarak uygulanan yöntemler ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle ilaç endüstrisi tarafından geliştirilen yeni ilaç adaylarının kansere karşı etkinliğinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Test maddelerinin özellikle kanserli hücrelerde apoptosis mekanizmasını çalıştırması ve kanserli hücrelerin seçici olarak ölmesini sağlaması durumunda, bu maddeler kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılmak üzere ek klinik araştırmalara konu olacaktır(1).

Sonuç olarak pek çok çalışmada hedef tedavilerden olan antianjiyogenik ajanların kemoterapi (KT) ajanlarıyla kombine kullanımının genellikle additif ve sinerjik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Klinik uygulamalarda bu antianjiyogenik ajanların tek başına kullanımlarında etkileri sınırlıdır. KT ajanlarıyla kombinasyon sonrası KT etkisinin arttığı görülmüştür. Bunun için pek çok mekanizma öne sürülmüştür ama net bir açıklama yapılamamıştır. Bevacizumab gibi ajanlar ile kombinasyonda daha düşük dozda sitotoksik ilaç kullanılarak daha yüksek dozda kullanımdakine benzer etki elde edilebilir. Ayrıca bu ajanlar pek çok çalışmada gösterildiği gibi ilaç direncini ortadan kaldırmak için de kullanılabilir. KT ile kombine kullanımda ihtiyaç duyulan KT'tik dozu azalır ve yan etkide de azalma meydana gelir(4).

Bu tez kapsamında bevacizumab, sisplatin, adriablastin isimli ilaçların sitotoksik ve apoptotik etkilerini saptamak için, Ishikawa hücreleri kullanılarak *in vitro* testler uygulanmıştır. Bu amaçla, hücre kültürleri kullanılarak kullanılan ilaçların sitotoksik etkilerini belirlemek için mitokondriyal aktivite ölçümüne dayanan Tetrazolium Testi (MTT testi), apoptotik etkileri belirlemek amacıyla, çekirdek DNA'sında meydana gelen değişiklikleri gösteren DAPI boyama ve Kaspaz-3 Elisa kolorimetrik kit testi kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometrium Kanseri İle İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. İnsidans, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

İnsidans

Kanser; insan sağlık sistemi üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir problemdir. Teşhis, korunma yöntemleri ve tedavilerdeki gelişimlere rağmen bu hastalık hala bütün dünyada milyonlarca hastayı etkilemekte, onların yaşam kalitesini düşürmekte ve dünyadaki ölüm nedenlerinin başını çekmektedir(1).

Endometrium karsinomu gelişmiş ülkelerde belirgin bir artış eğilimi göstermektedir ve bu ülkelerde kadın genital sisteminin en sık rastlanan malign tümörüdür (9). İnsidansı yansıtabilecek güvenilir istatistiksel veriler olmamakla birlikte, Türkiye Sağlık İstatistikleri 2006 verilerine göre endometrium kanseri yüz binde 1.29 insidansla ülkemizde ikinci sıklıkla görülen kadın genital sistem karsinomudur. Endometrium kanseri; meme, barsak ve akciğer kanserlerinin ardından kadınlarda 4. en sık rastlanan kanser olup, kanser ölümlerinin 7. en sık sebebidir(2).

National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) programı verilerine göre 40.100 endometrium kanseri olgusu 2008 yılında tüm dünyada tanı almıştır. Yine bu programın 1996-1998 yılları arasındaki verilerine dayanarak ABD'de bir kadının hayatı boyunca endometrium kanseri tanısı alma riski % 2.7 ve bu hastalıktan ölme riski % 0.5 olarak saptanmıştır(10). Genel olarak bakıldığında yaşamları boyunca kadınların % 2.6'sında endometrium kanseri gelişecektir(11).

Endometrium kanseri primer olarak postmenopozal kadınlarda görülen ve yaş attıkça seyri kötüleşen bir hastalıktır. Endometrium kanserlerinin % 95'i 40 yaşın üzerinde, % 75'i postmenopozal, % 25'i premenopozal dönemde görülür(12). Genellikle 50-65 yaşları arasında tespit edilmesine rağmen ortalama yaş 60'dır(13). Hastalığın erken teşhis ve tedavisi ile birlikte tedavi yöntemlerinin değişmesi 5 yıllık sağkalım oranını arttırmıştır(14).

Endometrium kanserlerinin büyük bir kısmının gelişiminde östrojenin rolü olduğu açıkça ortaya koyulmuştur; karşılanmamış östrojene maruz kalmayı artıran tüm faktörler endometrium kanseri riskini arttırmaktadır.

Epidemiyoloji

Endometrium kanserinin iki farklı patogenetik tipi bilinmektedir. En sık rastlanan tipi olan Tip 1 endojen ya da ekzogen karşılanmamış östrojene maruz kalma öyküsü olan daha genç, perimenapozal kadınlarda görülmektedir. Bu kadınlarda tümör hiperplazik endometrium olarak başlamakta ve kansere ilerlemektedir. Bu tümör östrojen bağımlı olup, iyi diferansiye olma eğilimindedir. PTEN tümör baskılayıcı gen, K-ras onkogen, DNA tamir genleri Tip 1 kanserde mutasyona uğramıştır. Tip 2 endometrium kanseri endometriumu uyaracak östrojen kaynağı bulunmadan gelişmektedir. Kendiliğinden gelişen bu kanserler patolojik olarak endometrial hiperplazi ile birlikte değillerdir ve çoğunlukla östrojen bağımlı tümörlere göre daha kötü prognozluurlar. Bu östrojen bağımlı olmayan tümörler daha yaşlı, postmenapozal, zayıf kadınlarda görülme eğilimindedirler. Tip 2 kanserde p53 tümör baskılayıcı ve Her2-neu genlerinde mutasyon mevcuttur(15,16).

Endometrium Kanseri Risk Faktörleri

Yaş: Endometrium kanseri genellikle 40 yaşın üzerindeki kadınlarda görülmektedir. 45 yaşından sonra insidans artar, 60 yaşa doğru maksimum düzeye ulaşır ve sonra hafifçe düşer. Ortalama görülme yaşı 61'dir, % 5 olguda ise 40 yaşın altında görülebilir(17).

Parite: Endometrial kanserli kadınlarda nulliparite daha sık görülür. Kanserli kadınların % 23-31'i nullipardır. Kanser riski nullipar olgularda primiparlara göre 2 kat, 5 ve üzeri doğum yapmışlara göre 3 kat daha fazladır(18).

Obesite: Endometrium kanserli kadınlardaki en yaygın medikal problemin obesite olduğunu gösteren pek çok çalışma vardır. Vücut kitle indeksinin 30'un üzerinde olması endometrium kanser riskini 3 kat artırmaktadır(19).

Ek Medikal Sorunlar: Diyabet, hipertansiyon ve safra kesesi hastalıkları obezite ve uzun süreli östrojen maruziyetinin sonuçlarıdır. Bu sorunlarla endometrium kanseri ilişkilidir ve bu hastalıklar kanser riskini 1.3-3 kat artırır(20,21).

Endokrin faktörler: Polikistik over sendromlu (PCOS) kadınlarda yine anovulasyona bağlı olarak endometrium kanser riski 5 kattan daha fazla olacak şekilde artar(22).

Östrojen salgılayan tümörler: Overin östrojen salgılayan granüloza ve teka hücreli tümörlerinin kanser için risk faktörü olduğu kesindir(23).

Erken menarş-Geç menapoz: 12 yaşımdan önce adet görenlerde daha fazla anovulatuvar siklus olması nedeniyle 1.5-2 kat, 52 yaşımdan sonra adetten kesilenlerde de daha fazla östrojen uyarısı nedeniyle 2-3 kat kanser riski artmıştır(24).

Diyet: Endometrium kanseri ile yüksek yağlı ve proteinli diyet arasında pozitif bir korelasyon vardır. Bu diyetle beslenen Kuzey Avrupa ülkelerinde kanser riski artarken, protein ve yağdan fakir beslenen Japonya’da risk daha azdır(25).

Aile Öyküsü: Endometrium kanserinde aile öyküsü önemlidir. Birinci derece akrabada endometrium kanseri olması önemli bir risk faktörüdür(26). Endometrium kanseri aynı zamanda Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) Sendromu ya da diğer adıyla Lynch Sendromunun ekstrakolonik manifestasyonlarından en sık görülenidir. Bu sendrom otozomal dominant geçer ve bu sendromu taşıyanlarda endometrium kanser riski 40-60 kat artar(27).

Sigara: Bu alışkanlık çoğu kanserde tetikleyici olmasına rağmen endometrium kanserine yakalanma riskini azaltır. Sigara kandaki östrojen düzeyinin düşürmektedir. Yapısındaki nikotin, östrojenin hepatik up-take’ini ve metabolizmasını artırır. Sigaranın bu etkisi obez kadınlarda daha belirgindir. Bunun yanında sigara erken menapoza neden olarak da riski azaltır(28).

Oral Kontraseptifler: Oral kontraseptiflerin uzun süre kullanılması endometrium kanserinden koruyucu etki göstermektedir. Bu ilaçların 1 yıl kullanımı ile risk % 30-50 oranında azalır. Bu koruyucu etki oral kontraseptiflerin kesilmesinden sonra yaklaşık 10-20 yıl daha devam etmektedir(29).

Tamoksifen: Meme kanseri tedavisinde kullanılan bu ilacın endometrium üzerine östrojenik etkisi vardır. Risk tedavi boyunca ve kümülatif dozlarla artmaktadır. Bu risk artışı postmenopozal kadınlarda olmaktadır. Premenopozal olgularda ek izlem gerekmez(30).

Tablo 2.1. Endometrium Kanserinde Risk Faktörleri ve Görece Oranları(31)

| Risk Faktörü | Göreceli Risk |
|---------------------------------|---------------|
| PCOS | ≥ 5 |
| İnfertilite | 2-3 |
| Geç Menapoz | 2-3 |
| Obezite | 2-5 |
| Nulliparite | 3 |
| DM | 1.3-3 |
| Tamoksifen | 3-7 |
| Karşılanmamış Östrojen Tedavisi | 10-20 |
| Atipili Endometrial Hiperplazi | 8-29 |
| Erken Menarş | 1.5-2 |
| Kombine Oral Kontraseptif | 0.3-0.5 |

Endometrium Kanserinin Fizyopatolojisi

Endometrium kanserlerinin oluşumunda, endometriumun östrojen ve progesteron reseptörlerinin yoğunluğu ve dokunun uzun süre karşılanmamış östrojene maruz kalması önemli rol oynamaktadır(32).

Progesteronsuz bir ortamda uzun süreli olarak östrojenle uyarılan endometriumda prekanseröz lezyonlar gelişebilir. Bunlar basitten komplekse doğru değişik aşamalarda endometrial hiperplazilerdir. Endometrial hiperplazi endometrial stroma ve bezlerin fizyolojik durumunun abartılı şekli ile karsinoma in situ arasında değişiklik gösteren biyolojik ve morfolojik farklılaşma spektrumunu yansıtır. Klinik olarak ciddi hiperplaziler sıklıkla progesteron etkisi yokluğunda uzun süre östrojen uyarısı sonucu oluşan proliferatif endometrium zemininde gelişir. Endometrial hiperplaziler; anormal uterus kanamalarına sebep olabilmeleri, östrojen üreten tümörlerle birlikte görülebilmeleri, hormonal tedavi sonucu oluşabilmeleri ve endometrial kanser ile birlikte ya da öncesinde bulunabilmeleri nedeniyle klinik

olarak önemlidirler. Endometrial hiperplazilerde malign potansiyellerin değerlendirilmesi, bu konuda fikir birliğinin olmaması ve tanımlamaların kesinlik kazanamamasından dolayı problem yaratmaktadır(33).

Uluslararası Jinekolojik Patologlar Topluluğu, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) organizasyonu altında terminolojide birliği sağlamak amacıyla bir sınıflama yapmıştır(34).

Tablo 2.2. Endometrial Hiperplazilerin Klasifikasyonu(34)

| Hiperplazi Tipleri | Kansere İlerleme Oranları |
|------------------------------|---------------------------|
| Basit Atipisiz Hiperplazi | %1 |
| Kompleks Atipisiz Hiperplazi | %3 |
| Basit Atipili Hiperplazi | %8 |
| Kompleks Atipili Hiperplazi | %29 |

Endometrial hiperplazinin karsinoma ilerleme riski sitolojik atipinin varlığına ve ağırlığına bağlıdır. Endometrial doku örneklemesinde atipik hiperplazi saptanan olgularda histerektomi yapılırsa yaklaşık % 25 oranında genellikle iyi diferansiye olmuş endometrial karsinomun eşlik ettiği görülecektir(34).

DSÖ klasifikasyonuna alternatif olarak son dönemde, endometrial kollaboratif grup tarafından, Endometrial İntraepitelyal Neoplazi (EİN) olarak adlandırılan bir kavram geliştirilmiştir. EİN tanımı, endometrial kanser riskinin artmış olduğu premalign endometrial hastalığın histopatolojik görünümü şeklinde yapılmaktadır(35,36). EİN, latent premalign hastalığın erken dönemlerinden ve karsinomdan ayırt edilmelidir. EİN tek bir terimdir ve alt grubu yoktur. EİN tanısıyla birlikte 1 yıl içinde endometrial kanser olasılığı % 50'dir. 1yıl sonrasında ise EİN tanısı alan bir hastada kanser gelişme riski 45 kat artmıştır(37). Bir çalışmada DSÖ sistemine göre endometrial hiperplazilerle EİN sistemi karşılaştırılmış ve atipik hiperplazi tanısı alan hastaların % 78'i, kompleks hiperplazilerin % 44'ü ve basit hiperplazilerin % 4'ü EİN tanısı almıştır(38).

2.1.2. Klinik

Genellikle postmenopozal dönemde görülen vaginal kanama klinikte en sık karşılaşılan başvuru nedenidir. Bazı hastalarda endoservikal kanalın tıkanması ve endometrial boşlukta biriken dokuların enfekte olmasıyla piyometra görülür. Postmenopozal hastalarda tanısal küretaj işlemi sırasında servikal os açılınca sıvı boşalabilir. Bu bulguya CLARK bulgusu denir ve maligniteyi düşündürür(39).

2.1.3. Tanı

Klinik Muayene

Endometrium kanseri tanısı klinik muayene ile nadiren konabilir. Metastazların sık rastlandığı bölgeler olan periferik lenf nodları dikkatlice değerlendirilmelidir. İlerlemiş olgularda ileri evre over kanserine benzeyen bulgular (asit, omental kek ya da solid organ metastazları) palpe edilebilir(31).

Pap Smear

Klasik servikovaginal pap smear incelemesinin endometrium karsinomu için tanısal doğruluk oranı en optimum şartlarda bile % 50 civarındadır ve rutinde kullanılmamaktadır. Servikal kanser taraması için rutin kullanımında östrojen kullanmayan postmenopozal kadınlarda PAP testte endometrial hücre görülmesi durumunda ileri tetkik önerilir. Bu durumda hastada endometrium kanserine rastlanma riski % 3-5'dir(40).

Endometrial Örnekleme

Poliklinik koşullarında yapılan pipelle ofis endometrial biyopsinin tanısal doğruluğu, ardından yapılan histerektomi veya dilatasyon ve küretaj (D&C) bulgularıyla karşılaştırıldığında % 90-95'tir(41).

Ofis biyopsi ile tanı konamayan hastalarda ya da anormal kanamanın devam ettiği durumlarda en iyi tanı yöntemi olan D&C'e geçilir(42).

Histeroskopi

Negatif histolojiye karşın, tekrarlayan postmenapozal kanama varlığında, kanamayı açıklayacak yeterli materyalin alınamadığı durumlarda, servikal stenoz varlığında veya yeterli değerlendirmeyi sağlayacak aspirasyon biyopsisini tolere

edemeyen olgularda histeroskopi ve D&C uygulanmalıdır. Histeroskopi endometriyal polip ve submüköz myomların tanısında biyopsi ve D&C'den daha yararlıdır(43,44).

Vaginal Ultrasonografi

Anormal uterin kanamanın değerlendirilmesinde ve ek inceleme yapılacak hastaların seçiminde, endometriyal biyopsinin öncesinde transvaginal ultrasonografi yararlı olabilir. Her ne kadar çok sayıda çalışmada 5 mm altındaki endometrium kalınlığının postmenapozal kadınlarda atrofiyi gösterdiği ve bu kadınlarda histolojik değerlendirmenin gerekli olmadığı belirtilse de, semptomatik bir hastada sadece ultrasonografi bulgusuna dayanarak endometrial biyopsinin gerekmediğine karar verilmemelidir. Eğer endometrial kalınlık 5mm ve üstünyse biopsi gereklidir(43,45,46).

Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans (MR)

Endometrium kanseri iyi diferansiye ve Tip 1 ise akciğer grafisi dışında görüntüleme yöntemine gerek yoktur. BT ya da MR gerekli değildir(47). Bu iki yöntem endometrium karsinomunda lokal ve uzak yayılımların belirlenmesinde yararlı yöntemlerdir. Nükslerde ve özellikle de bölgesel lenf nodlarının değerlendirilmesinde yarar sağlamaktadırlar. MR serviks kanserini endometrium kanserinin endoservikal yayılımından ayırma da kullanılır. Eğer hasta yüksek riskli histolojik tiplere sahipse ya da fizik muayenede yaygın hastalık bulgusu varsa BT tedavi planının belirlenmesinde yararlı olur(48).

CA-125

Endometrium kanserinin yönetimde kullanılabilen tek tümör markırıdır. Preoperatif yüksekliği yaygın hastalığı düşündürür. Yaygın hastalığı olan olgularda tedaviye cevabın izleminde ve rekürrens takibinde kullanılır(49).

Patoloji(50)

Modifiye DSÖ klasifikasyonu:

- 1.Endometrioid adenokarsinom (% 75-80)
 - a.Endometrioid tip
 - b.Papiller villoglandüler karsinom

- c.Silialı karsinom
- d.Skuamöz diferansiyasyon gösteren adenokarsinom
- 2. Uterin papiller seröz karsinom (<% 10)
- 3. Berrak hücreli karsinom (% 4)
- 4. Müsinöz karsinom (% 1)
- 5.Miks tipte karsinom (% 10)
- 6. İndiferansiye karsinom
- 7. Skuamoz karsinom (<% 1)
- 8. Metastatik karsinom

Yayılım

Endometrium karsinomlarının yaklaşık % 50'si endometriumda sınırlıdır. % 26'sı yüzeysel ve % 12'si derin myometriyal invazyon gösterir. Uterus dışına yayılım oranı ise % 12 olarak bildirilmiştir. Endometrium kanseri lokal, hematojen, lenfojen ve intraperitoneal olarak yayılabilir(51).

2.1.4. Evreleme

Endometrium kanserinde evreleme, tedavinin belirlenmesi ve prognoz açısından önemlidir.

Klinik Evreleme

Endometrium kanseri evrelemesinde 1988 yılına kadar klinik evreleme kullanılmıştır. Klinik FIGO evrelemesi (1971), standart kavite uzunluğu ve hastalığın uterus dışı ve pelvik yayılımı gibi klinik bilgilere göre yapılmaktadır. Hastanın medikal durumu ya da yaygın hastalık nedeniyle cerrahinin uygun olmadığı durumlarda klinik evreleme yapılır(52,53). Ancak cerrahi evreleme sistemi kullanılarak yapılan değerlendirmelerde, kanserden ölenlerin çoğunun klinik Evre 1'deki hastalar olması klinik evreleme sisteminin değerini azaltmış, ayrıca yüksek risk grubundaki hastaları saptamak gereği doğmuştur. Klinik evreleme ile cerrahi evreleme arasında büyük farklar vardır ve cerrahi evre genellikle daha yüksek bulunmaktadır. Bu nedenle FIGO, 1988'de cerrahi evreleme sistemini önermiştir(54).

Tablo 2.3. Klinik Evreleme (FIGO 1971)(53,54)

| EVRE | ÖZELLİK |
|---------|---|
| Evre 0 | Karsinoma insitu |
| Evre 1a | Uterus kavitesinin uzunluğu 8cm veya daha az |
| Evre 1b | Uterus kavitesinin uzunluğu 8cm'den fazla |
| Evre 2 | Karsinom korpus ve serviksi tutmuş ancak uterin kavite dışına yayılım yok |
| Evre 3 | Karsinom uterus dışına yayılmış ancak küçük pelvis dışına çıkmamış |
| Evre 4a | Komşu organlara yayılım |
| Evre 4b | Uzak organlara yayılım |

Cerrahi Evreleme

Tam bir cerrahi evreleme için yapılacak işlem minimum şekliyle; yeterli vertikal insizyon, intraperitoneal yıkama sıvısının incelenmesi, abdominal ve pelvik eksplorasyon, gerekli görülen yerlerden biyopsiler, total abdominal histerektomi, bilateral salpingooferektomi ve lenf nodlarının (pelvik, paraaortik) çıkartılıp histopatolojik değerlendirilmesini içermelidir. Histerektomi sonrası uterus açılarak intraoperatif olarak tümörün büyüklüğü, myometriyal invazyon derinliği ve servikal yayılımı değerlendirilmelidir(55-57). Kuşkuolu tüm lenf nodları cerrahi evreleme kapsamı içinde çıkarılmalıdır. Tümör histolojisi ve myometriyal invazyon derinliği lenf nodu metastazı riskini belirleyen önemli parametrelerdir(58).

Endometrium kanserinde selektif pelvik ve paraaortik lenfadenektomiye de içeren genişletilmiş cerrahi evreleme işleminin lenf nodu diseksiyonu yapılmayan hastalarla karşılaştırıldığında kan kaybı, transfüzyon gereksinimi, operasyon süresi ve hastanede kalma süresi açısından anlamlı bir artışa neden olmadığı bildirilmektedir. Damar yaralanması, hematom, lenfokist oluşumu gibi komplikasyonlar lenfadenektomi sonrasında sık görülmeyle birlikte mortalite ve uzun dönem sekeller açısından anlamlı bir artış bulunamamıştır(59).

Yapılan çalışmalarda da beklenen lenf nodu tutulumu insidansına karşılık düşük komplikasyon oranı göz önüne alındığında lenf nodu örneklemesinin bu açıdan göreceli olarak daha güvenilir ve değerli olduğu sonucuna varılmıştır.

Mortalitede artış daha çok hastanın yaşı, kilosu, beraberinde bulunan medikal problemler ve cerrahi teknikle ilişkilidir(60).

Sonuç olarak tam bir cerrahi evrelemenin parçası olan pelvik ve paraaortik lenf adenektomi tüm vakalara önerilmektedir(61). Operasyon sırasında tüm şüpheli nodlar çıkarılmalıdır(62).

Endometrium Kanseri 1999 FIGO Cerrahi Evrelemesi (63)

Evre 1a (Grade 1,2,3): Tümör endometriyumda sınırlı

Evre 1b (Grade 1,2,3): ½'den az myometriyal invazyon

Evre 1c (Grade 1,2,3): ½'den fazla myometrial invazyon

Evre 2a (Grade 1,2,3): Sadece endoservikal glandüler tutulum

Evre 2b (Grade 1,2,3): Servikal stromal invazyon

Evre 3a (Grade 1,2,3): Seroza ve adneks tutulumu / peritoneal sitoloji pozitif

Evre 3b (Grade 1,2,3): Vajinal metastaz

Evre 3c (Grade 1,2,3): Pelvik veya paraaortik metastaz

Evre 4a (Grade 1,2,3): Mesane/ barsak mukozası tutulumu

Evre 4b (Grade 1,2,3): Uzak metastaz, intraabdominal veya inguinal lenf nodu metastazı dahil

Endometrium Kanserinde FIGO'nun Grade Tanımlaması-1999(64) Diferansiyasyonun Histopatolojik Derecesi

Grade 1: Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri <% 5

Grade 2: Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri % 6-50

Grade 3: Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri >%50

Histopatolojik Grade'leme Üzerine Notlar(64):

1. Yapısal grade ile uyumsuz belirgin nükleer atipi grade'i bir puan arttırır.
2. Seröz adenokarsinom, berrak hücreli adenokarsinom ve skuamöz adenokarsinomda nükleer gradeleme kullanılır.
3. Skuamöz diferansiyasyonlu adenokarsinomlarda grade, glandüler komponentin nükleer grade'ine göre yapılır.

Evrelemeye İlişkin Kurallar(63):

1. Günümüzde korpus karsinomu cerrahi olarak evrelendiğinden, klinik Evre 1 ve 2'yi ayırmak üzere yapılan D&C bulguları gibi önceden kullanılan prosedürler artık kullanılmamaktadır.

a- Korpus karsinomlu hastaların küçük bir bölümü primer radyasyon tedavisi ile tedavi edileceklerdir. Bu olgularda 1971 FIGO klinik evrelemesi kullanılır, ancak bu evreleme sisteminin kullanıldığı belirtilmelidir.

2. İdeal olarak myometriyum kalınlığı tümör invazyon kalınlığı ile birlikte ölçülmelidir.

Evreleme Sistemi FIGO 2009

FIGO tarafından 2009 yılında yeniden düzenlediği cerrahi evreleme sistemi Ekim 2009'da Cape Town Güney Afrika'da düzenlenen kongrede açıklanmıştır.

Yeni Evreleme Sisteminde Yapılan Değişiklikler (65)

1. Evre 1a ve 1b olan hastalar 1a başlığı altında toplandı.
2. Evre 1c olan hastalar (1/2 ve/veya daha fazla myometrial invazyonu olanlar) Evre 1b olarak sınıflandı.
3. Endoservikal glandüler tutulumu olup Evre 2a olarak değerlendirilen hastalar Evre 1b grubuna taşındı.

4. Evre 3c ise kendi içinde 2 gruba ayrıldı. Pelvik lenf nodu pozitif olan olgular Evre 3c1, paraaortik lenf nodu pozitif olan olgular Evre 3c2 olarak sınıflandı.

5. Evre 3a olarak değerlendirilen pozitif peritoneal sitoloji ise her evrede karşımıza çıkabildiğinden evrelemeden çıkarıldı.

Tablo 2.4. Cerrahi Evrelemeye Göre Hastaların Dağılımı(66)

| Evre | Hastalar |
|------|----------|
| 1 | (% 70) |
| 2 | (% 13) |
| 3 | (% 14) |
| 4 | (% 3) |

Tablo 2.5. Cerrahi Evreleme Sonrası Risk Grupları(67)

| | |
|-------------|---|
| Düşük Risk | Evre 1a/1b Grade 1,2 Evre 1a Grade 3 |
| Orta Risk | Evre 1b Grade 3 Evre1c, Evre 2 (Herhangi bir evre) |
| Yüksek Risk | Uterus dışı yayılımı olan tüm olgular (Sadece periton sitolojisi pozitif olan ve uterus dışı hiçbir metastazı olmayanlar hariç) |

Prognostik Faktörler

Endometrium kanserinde prognozu etkileyen faktörler bugüne kadar çok kez tartışılmıştır. Bilinen kesin prognostik faktörlerin dışında ırk, yaş, endokrin gibi faktörlerin de prognozu etkilediği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada prognoza etki edecek risk faktörleri uterin ve ekstrauterin olarak ikiye ayrılmıştır(66).

Uterin Faktörler

- Tümör büyüklüğü
- Histolojik tip
- Grade
- Myometrial invazyon
- Lenfovasküler alan invazyonu
- İstmus-serviks yayılımı

Vasküler tutulum
Tümörün hormon reseptör dağılımı

Ekstrauterin Faktörler

Hastanın yaşı
Adneksiyal metastaz
İntraperitoneal yayılım
Pozitif peritoneal sitoloji
Pelvik-paraaortik nodu metastazı
DNA ploidi ve proliferatif indeks
Genetik ve moleküler markerlar
İntraperitoneal tümör

2.1.5. Tedavi

Endometrium kanserinde tedaviyi evrelere göre planlanmaktadır.

Evre 1: Endometriyum kanserli hastalara uygulanacak primer cerrahi işlem total abdominal histerektomi ile beraber bilateral salpingooferektomidir. Yapılacak bilateral salpingooferektomide muhtemel mikroskopik metastaz veya var olan ya da sonradan gelişebilecek over kanseri riskini ortadan kaldırmak amaçlanmaktadır. Endometriyum kanser cerrahisinde genelde göbek altı ve üstü median insizyon tercih edilmektedir. Kullanılan insizyon lüzumu halinde lenfadenektomiye izin verebilecek şekilde olmalıdır. Batına girildikten sonra batın ve pelvis eksplorasyonu yapılırken özellikle diafragma, karaciğer, omentum, ince-kalın barsak serozası ile pelvik ve paraaortik lenf nodlarına, periton yüzeylerine bakılmalıdır. Uterus serozal yüzeyi tümör varlığı açısından değerlendirilmelidir. Şüpheli her lezyondan biyopsi yapılmalıdır. Ayrıca her iki parakolik alan, subdiafragmatik alan ve posterior cul de sac dan 50-150 ml serum fizyolojik kullanılarak sitolojik inceleme maksadıyla batın yıkantı sıvısı alınmalıdır. Total abdominal histerektomi, bilateral salpingooferektomi yapıldıktan sonra pelvik lenf nodları açığa çıkarılmalı ve palpe edilmeli, büyümüş veya şüpheli lenf nodları çıkarılmalıdır. Uterus ameliyathanede açılarak ve frozen section ile tümör büyüklüğü, servikal yayılım ve myometrial invazyon açısından değerlendirilmelidir. Zira bu bilgiler bize lenf nodu diseksiyonu kararı vermekte yardımcı olacaktır. Evre 1 grade 2 ve grade 3 hastalarda, cerrahi tedaviye selektif

pelvik ve paraaortik lenfadenektomi eklenmelidir. Vajinal kubbenin çıkarılması gerekli değildir. Parsiyel omentektomi ve apendektomi de yapılabilir. Laparoskopik yaklaşımla yapılan asiste vajinal histerektomiye ek olarak lenf nodu diseksiyonu da yapılabilinmektedir. Tedavide laparoskopi kullanımı da geçerli yöntem olarak kabul edilmiştir. Laparoskopik ya da laparotomi ile çıkarılan lenf nodu sayıları arasında istatistiki fark yoktur. Laparoskopi hastanede kalma sürelerini azaltmakla birlikte komplikasyon sıklığında artışa neden olmaktadır(68).

Evre 2: Bu evre endometriyum kanserlerinde prognoz uterus korpusunda sınırlı hastalığa nazaran daha kötü seyretmektedir. Yapılacak cerrahi müdahalede radikal histerektominin, basit histerektomi ve radyoterapiye sürvi açısından üstünlüğü gösterilemediğinden günümüzde Evre 2 endometriyum kanseri tedavisinde görüş; total abdominal histerektomi + bilateral salpingooferektomi + selektif pelvik ve paraaortik lenfadenektomi + postoperatif radyoterapi uygulanmasıdır(69).

Evre 3: Tüm makroskopik hastalığı ortadan kaldırmak amaçlanmalı ve daha bireysel planlanmış bir tedavi öngörülmelidir. Cerrahi tedavide total abdominal histerektomi + bilateral salpingooferektomi ile beraber periton sitolojisi, lenfadenektomi, periton örnekleme ve kısmi omentektomi yapılmalı ve hastalığın cerrahi olarak yayılımı ortaya konmalıdır. Postoperatif dönemde uygulanan radyoterapi ile sonuçlar sadece radyoterapi yapılan hastalara göre daha iyidir(70).

Evre 4: Endometriyum kanserlerinin yaklaşık % 3'ünü oluşturur(70). Evre 4 hastalıkta tedavi hastaya göre planlanmakla beraber, genel yaklaşım cerrahi tedaviyi takiben radyoterapi, sistemik hormon tedavisi ya da kemoterapiyi kombine olarak kullanmaktır. Hastalığın sadece mesane ve rektumla sınırlı olduğu az sayıda hastada pelvik egzenterasyon yapılabilir. Endometriyum kanserinde progesterinler metastatik endometriyum kanserinde uygulanmaktadırlar. Adjuvan progesterin tedavisinin sağkalıma belirgin etkisi tespit edilememiştir. Pozitif periton sitolojisinde tedavi edici olarak kullanılabilirler(71).

Tablo 2.6. Endometriyal Kanserde 5-Yıllık Sağkalım(66)

| EVRE | SAĞKALIM(%) |
|------|-------------|
| 1a | 91 |
| 1b | 91 |
| 1c | 85 |
| 2a | 83 |
| 2b | 66 |
| 3a | 50 |
| 3b | 50 |
| 3c | 57 |
| 4a | 25 |
| 4b | 20 |

Tablo 2.7 Risk Faktörlerine Göre 5 Yıllık Rekürrens Oranları(73)

| Risk Kategorisi | 5 Yıllık Rekürrens %'si |
|--|-------------------------|
| HEMATOJEN | |
| Tüm Evreler | |
| Myometrial invazyon %50 ve daha az | 4 |
| Myometrial invazyon %50 'den fazla | 28 |
| Evre 1 (Lenf Nodu negatif) | |
| Myometrial invazyon %66'dan az | 2 |
| Myometrial invazyon %66 ve daha fazla | 34 |
| LENFATİK | |
| Risk Faktörü Yok | 2 |
| SSI ve/veya Lenf Nodu pozitif | 31 |
| PERİTONEAL | |
| Evre 4 Hastalık | 63 |
| Evre 2-3 Hastalık ve 2 ya da fazla risk faktörü* | 21 |
| Evre 1-3 Hastalık ve 1 ya da az risk faktörü* | 1 |
| GENEL | |
| Risk yok** | 2 |
| Risk var ** | 46 |

*: Risk faktörleri: SSI (Servikal stromal invazyon), endometrioid olmayan histolojik tip, L.N. (lenf nodu) pozitifliği, pozitif peritoneal sitoloji.

** : Hemotojen, lenfatik, peritoneal metastaz risk kategorilerinden en az birini taşıyan hastalar.

**** Bu çalışma 915 hasta üzerinde yapılmıştır.

Postoperatif Tedavi

Çalışmamız endometrium kanserinde ek tedavi modaliteleriyle ilgili olduğundan postoperatif tedavinin detayları önem kazanmaktadır.

Cerrahi uygulandıktan sonra jinekolojik cerrah yukarıda tanımlanan prognostik faktörleri değerlendirip uygun cerrahi evreyi belirleyebilir ve postoperatif tedavi için plan yapabilir. Pek çok hastanın ek tedaviye ihtiyacı olmayacaktır. Ama kanıtlanmış risk faktörleri bireyselleştirilmiş tedaviler için uyarlanmalıdır(72).

Definitif cerrahi sonrası ek tedavi gereksinimi olan hastalar için 3 ana modalite tek başına ya da kombine olarak kullanılabilir. Radyasyon tedavisi, kemoterapi ve hormon tedavisi.

Postoperatif radyoterapinin rekürrens açısından risk taşıyan hastalarda efektif olduğunu destekleyen prospektif hiçbir çalışma olmamasına rağmen sıklıkla uygulanmaktadır. Kemoterapi ve hormonal tedavi ileri hastalık evresindeki hastalarda primer olarak yada palyatif tedavi olarak kullanılmaktadır(73).

Tablo 2.8. Endometrial Karsinomada Tedavi Planı(71,72)

| | Düşük Risk | Orta Dereceli Risk | Yüksek Risk |
|---------------------|------------|---|--|
| EVRE | IA,G1,2 | IA,G3 1B,1C(tüm grade'ler) IIA,IIB(tüm grade'ler) IIIA(+ sitoloji) | IIIA, IIIB, IIIC (tüm grade'ler) IVA, IVB (tüm grade'ler) |
| Postoperatif Tedavi | Yok | Vaginal kaf radyasyonu Pelvik RT | Vaginal kaf radyasyonu Pelvik RT Paraaortik RT Tüm abdominal radyasyon/KT |

Endometrium Kanserinde İzlem

Kilo kaybı, ağrı ve vaginal kanama rekürren hastalığı düşündürür. Genelde primer tedavi sonrasında ilk 3 yıl içinde görülür. Rutin vizitlerde pap smear ve radyolojik inceleme ile takip edilir. Ancak bu rutin takipler hastalığın rekürrenslerini öngörmeye etkin değildir. Rekürrensler genelde vaginal kaf sınırında olduğu için bu bölge dikkatle incelenmelidir(74).

2.2. Endometrium Kanserinde Kemoterapinin Yeri

Tez çalışmasında amacımız klasik KT ilaçlarının hedef tedavilerden biri olan antianjiyogenik bir ajanla (bevacizumab) kombine etkilerini incelemek olduğundan kemoterapi hakkında daha detaylı bir bilgilendirme yapılmıştır.

Endometrium kanserinde küratif ve primer tedavi cerrahidir. Hastaların yaşam beklentileri de cerrahi evreye bağlı olarak değişir. Kemoterapi ise endometrium kanserinde adjuvan, neoadjuvan ya da radyosensitizer olarak verilebilir. Erken evre olguların çoğunda sadece cerrahi yeterli olur(75).

Bunun yanında bazı erken evre hastalarda rekürrens gelişir ve bu metastatik ya da lokal rekürren olgularda KT kullanılabilir. Erken evre olmasına rağmen grade 3 hastalık, derin myometrial invazyon, servikal tutulum gibi yüksek risk taşıyan özelliklere sahip hastalarda radyoterapi lokal pelvik nüksü önler ama yaşam

beklentisini etkilemez. Bu grupta da KT gündeme gelir. Yapılan çalışmalarda ileri evre olan olgular yanında, orta dereceli riskli grupta da KT kullanılması önerilmektedir(76).

Erken evre endometrium kanserinde KT kullanımı ile ilgili ilk randomize kontrollü çalışma olan GOG-34'te Evre 1 veya 2 hastalığı olup yüksek risk taşıyan hastalar çalışmaya alınmış ve 2 gruba ayrılmıştır. Hastalar adjuvan pelvik ve/veya paraaortik RT sonrasında ya izleme alınmış ya da hastalara tek ajan adriablastin KT'si verilmiştir. Her iki grup arasında 5 yıllık sağkalım ve hastalıksız yaşam açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Çalışmacılar bu durumu örnek sayısının yetersiz olması ve hastaların izlemiden çıkmasına bağlamışlardır(77).

Japon Jinekolojik Onkoloji Grubunun yaptığı başka bir Faz 3 çalışmada ise % 50'den fazla myometrial invazyonu olan Evre 1c-3c olgular çalışmaya alınmıştır. Bu olgulara ya RT ya da siklofosfamid-adriablastin-sisplatin kombinasyonundan oluşan KT verilmiştir. İki grup arasında hastalıksız sağkalım ve 5 yıllık sağkalım açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak yapılan subgrup analizinde orta derecede riskli ve yüksek riskli gruplarda KT uygulanmasının 5 yıllık ve hastalıksız sağkalımı anlamlı ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda adjuvan KT'nin yüksek ve orta derecede riskli grupta RT'e alternatif olabileceği ileri sürülmüştür(78).

Nordic Society of Gynecologic Oncology (NSGO) ve European Society for Research and Treatment of Cancer (EORCT) tarafından yapılan randomize Faz 3 çalışmanın sonucunda ise erken evre yüksek riskli endometrial kanserde kemoradyoterapi uygulanması tek başına RT'e göre sağkalım açısından anlamlı olarak yararlı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar, mikrometastazlar için yüksek risk taşıyan erken evre hastalığı olan grupta kemoradyoterapinin tek başına RT'den adjuvan olarak üstün olduğunu ileri sürmüşlerdir(79).

High grade histolojiler olan papiller seröz (tüm endometrium kanserlerinin % 10'u) ve clear cell (tüm endometrium kanserlerinin % 3'ü) kanserlerde de Evre 1 dahi olsa kemoterapinin RT ile kombine edilmesini öneren yayınlar mevcuttur. Ama bu konuda henüz araştırmalar yetersizdir ve tedavi konusunda fikir birliği sağlanamamıştır(80).

Evre 3 ve Evre 4 endometrium kanseri ve rekürren hastalık tedavisinde gelişme kaydetmek için kemoterapi ile ilgili pek çok prospektif randomize çalışma yapılmıştır. GOG 122 çalışmasında Evre 3 ve Evre 4 kanseri olan olgular cerrahi sonrası çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan hastalar 2 gruba ayrılmıştı, 1. gruba tüm karın RT, 2. gruba 60 mg/m² adriablastin + 50 mg/m² sisplatin KT'si üç haftada bir yedi kez verilmiştir. Toksikite KT grubunda daha yüksek bulunmuştur. RT grubundaki hastaların % 84'ü ve KT grubundaki hastaların %63'ü tedaviyi tamamlanmıştır. Çalışma sonunda yapılan analizde 5 yıllık sağkalım ve 5 yıllık hastaliksız sağkalım KT kolunda daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarından hareketle ileri evre endometrium kanseri tedavisinde kombine KT'nin yararlı etkileri ortaya konuldu ve KT'nin tedavideki nihai yeri saptanmış oldu(81).

Rekürren endometrium kanseri tedavisinde pek çok tek ajan ve kombine KT etkili olmaktadır. KT ile hastaliksız sağkalım 4 ila 6 ay ve ortalama yaşam süresi 12 ay olarak saptanmıştır. Rekürren hastalıkta en etkili KT rejimleri; antrasiklinler ve platin+taksan kombinasyonları olarak ortaya konmuştur. Tüm bu ajanların cevap oranı ise % 20-30'dur(82).

Gün geçtikçe jinekolojik kanserler dahil pek çok kanserin moleküler biyolojisi, genetiği ve immünitesi ile ilgili bilgilerimiz artmaktadır. Bu bilgiler ışığında daha spesifik tedavi için potansiyel hedefler bulunmakta ve bunlara yönelik tedavi stratejileri geliştirilmektedir. İdeal olarak bu moleküler hedefler, kanser hücresinde olduğu halde normal hücrelerde bulunmamalı ve normal hücre fonksiyonları için gerekli olmamalıdır(83). Malign fenotipe (artmış proliferasyon, hücrelerin ölümsüzleşmesi, invazyon ve metastaz yeteneği) yol açan çeşitli hücre yüzey reseptörleri, sinyal ileti yolları, proliferasyonu stimüle eden ya da apoptozisi inhibe eden çeşitli nükleer proteinler veya genetik materyalin kendisi tedavi hedefi olabilir.

Kanserlerdeki moleküler anormal hedefleri düzeltmeye yönelik tedavi stratejileri arasında; küçük moleküller, monoklonal antikolar, antisense oligonükleotidler, gen tedavileri ve sitokinler yer almaktadır.

Jinekolojik onkoloji bu yeni ajanların ve tedavi stratejilerinin yeni uygulama alanlarından biridir. Endometrium kanserinde de çeşitli hedef tedaviler denenmektedir(84).

Tablo2.9 Endometrium Kanserinde Hedef Tedaviler(84,85)

| |
|--------------------------------------|
| mTOR İnhibitörleri |
| • Temsirolimus (CCI-779) |
| • Everolimus (RAD 001) |
| EGFR İnhibitörleri |
| • Cetuximab |
| Anjiogenez İnhibitörleri |
| • Bevacizumab |
| • Aflibercept |
| • Sorafenib |
| • Sunitinib |
| Diğer Ajanlar |
| • Folat Reseptör İnhibitörü (EC 145) |
| • PARP inhibitör (BSI-201) |

Çalışmada Kullanılan İlaçlar

Tez çalışmamız kapsamında endometrium kanserinin klasik tedavi modalitelerinden olan sisplatin, adriablastin ve yeni hedef tedavi ajanlarından bevacizumab kullanılmıştır.

Kanser Kemoterapisinin Esasları Ve Antineoplastik İlaçlar(86)**Kanser Kemoterapisi İle İlgili Temel Bilgi Ve Kavramlar**

Antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi hastanın veya konağın sağlıklı hücrelerine zarar vermeksizin tümörün büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak, sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki benzerlikler antineoplastik ilaçların seçiciliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bugün kanser kemoterapisinde kullanılan antineoplastik ilaçların çoğu, gerek tümörü gerekse barsak epiteli, kıl follikülleri, kemik iliği kök hücreleri gibi proliferatif indeksi yüksek olan sağlıklı dokuları etkiler. Hücre proliferasyonunun belirgin olmadığı karaciğer, böbrek ve sinir dokusunda da toksisiteye yol açabilen kemoterapötiklerin varlığı bilinmektedir. Bu ilaçların mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri de söz konusudur . Antineoplastik kemoterapötiklerin bir kısmı,

antitümöral etkilerinden bağımsız olarak, farklı klinik durumlarda immünoşüpresif olarak da kullanılır. Antineoplastik ilaçların terapötik indeksleri, antimikrobiyal ilaçlara göre oldukça düşüktür ve yan etkileri fazladır. Kanser kemoterapisinin planlanması ve uygulaması, tümörün türü, hastalığın evresi, hastanın durumu gibi faktörler dikkate alınarak ve bir medikal onkolog tarafından yapılmalıdır(86).

Antineoplastik Kemoterapide İlaçların Etkinliğini Kısıtlayan Faktörler

Antineoplastik ilaçların çoğu sitotoksik etkileriyle malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önler ve onların ölümüne yol açarlar. Kanser kemoterapisinin şifa sağladığı bazı yaygın tümörler olmakla beraber, çoğu zaman metastatik hastalık durumlarında şifa (eradikasyon) anlamında başarı sağlamak mümkün olmamaktadır. Bunun temel nedenlerinden biri ilaca direnç gelişmesidir. Bu faktörler aşağıda belirtilmiştir.

Tümör Biyolojisi Veya Tümör-İlaç Etkileşmesi İle İlgili Faktörler(86)

1. İlaçla Hücrelerin Öldürülmesi: Fare çalışmalarında, belirli bir süre ve dozda uygulanan döneme özgü olmayan sitotoksik bir kanser ilacının, tümörde sabit sayıda hücreyi değil, sabit bir oranı öldürdüğü ve bu oranın mutlak hücre sayısından bağımsız olduğunu öne süren fraksiyonel hücre öldürme varsayımı tanımlanmıştır. Sözkonusu varsayıma göre, ilaç uygulamasından sonra malign hücre sayısında gözlenen azalma üssel (eksponansiyel) niteliktedir. Üssel azalma, antineoplastik ilaçların sikluslar halinde tekrarlanmasını ve kombine olarak kullanılmalarını gerektiren nedenlerden biridir. Ancak, tedavi aralıklarında tümör kitlesinin proliferasyonu da dikkate alındığında hücrelerin tümünün ilaçla ortadan kaldırılmasının mümkün olmadığı anlaşılabilir. İnsan tümörlerine bakıldığında, tümör dokusunun heterojenliği bu varsayımın geçerliliğini kısıtlamaktadır. Tümör heterojenliğinde, özellikle ilaç direnci gösteren klonlar, tek başına tedavi başarısını azaltan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Metotreksat gibi döneme-özümlü olan antineoplastik ilaçların uygulanmasından sonra ise, malign hücre sayısında plato tipi azalma olur. Bu tür antineoplastik ilaçlar, uygulandıkları anda sadece belirli bir dönemde, örneğin S döneminde olan hücreleri öldürürler. Hücre siklusunun diğer dönemlerinde olan hücreler üzerine etkileri yoktur.

Antineoplastik İlaçların Hücre Siklusunun Dönemine Özgü Olup Olmaması: Antineoplastik ilaçlar, etkinliklerine göre iki gruba ayrılır. Bazı ilaçlar çoğalmakta olan hücrelerde ve hücre siklusunun bir döneminde etki gösterirler. Bunlara döneme-özü ilaçlar adı verilir. Bu tür ilaçlar DNA sentezi, DNA'nın transkripsiyonu ve mitoz iğıciğı oluşumu gibi hücre çoğalması ile ilgili dinamik süreçlere etkilidirler. Diğer ilaçlar ise hücre ister istirahat halinde olsun, isterse bölünme dönemlerinden geçiyor olsun, doğrudan DNA hasan oluşturarak öldürücü etki gösterirler. Bunlara da döneme özü-olmayan ilaçlar adı verilir. Direkt öldürücü etkisi olmayan hormonal ilaçlar, döneme özü ilaçlar olup hormon reseptörü taşıyan hücrelerde G/S geçişini bloke ederler.

Tümörün Proliferasyon Hızı: Tümör proliferasyon hızının göstergeleri, çoğalma fraksiyonu veya iki katına çıkma süresi (“doubling time”) olarak tanımlanır. Çoğalma fraksiyonu, tümör kitlesi içinde bölünme halindeki hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranını, iki katına çıkma süresi ise tümör kitlesinin hacim veya hücre sayısı olarak iki katına çıkması için geçen süreyi tanımlar. Tümörün iki katına çıkma süresi 7 gün ile birkaç sene arasında değışir. Örneğın akut lösemi, yüksek dereceli lenfomalar, koryokarsinoma, testis kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi tümörlerde bu süre kısayken kolorektal, mide, küçük hücreli-dışı akciğer kanseri, prostat kanserinin bazı türleri ve cilt kanserleri gibi tümörlerde oldukça uzundur. İkinci gruba giren kanserlerde, tümör hücrelerinin hücre sikluslan çok uzun ve hücre topluluğunun da önemli bir kısmının siklusun G_0 fazında olduğı bilinmektedir. Hızlı çoğalan tümörler antineoplastik ilaçların çoğuna, özellikle antimetabolitlere ve antineoplastik antibiyotiklere karşı yavaş çoğalanlara göre daha duyarlıdır.

Deneyisel tümör modellerinde tümör içindeki kanser hücresi sayısının logaritmasının zamana göre seyrini gösteren eğriye Gompertz eğrisi denilir. Bu eğri lineer değıl, hiperboliktir. Gompertz yaklaşımına dayanan modele göre tümörün çoğalma fraksiyonu sabit olmayıp zaman içinde üssel olarak azalır ve bu durum büyük tümör kitlelerinin kemoterapiye duyarlılığının az olabileceğı görüşünü destekler. Buna karşılık tümör kitlesinin küçük olduğı dönemde, antineoplastik ilaçlara olan duyarlılık daha belirgindir. Bir tümörün klinik olarak saptanabilir hale gelmesi için geçen sürede o tümörün çoğalma hızının belirgin derecede azalmış

olduğu ve neovaskularizasyon ile birlikte metastaz olasılığının arttığını akılda tutmak gerekir.

Bu kavramlar iki tedavi yaklaşımının temelini oluşturur: **(i)** Bir tümörün lokal tedavisinin ardından mikrometastatik hastalığa yönelik olarak adjuvant kemoterapi uygulaması ve **(ii)** Tümör kitlesinin cerrahi olarak azaltılması “debulking”. Her iki durumda da tedavi sonunda kalan (rezidüel) mikroskopik veya makroskopik tümörde çoğalma fraksiyonu artacak ve kemoterapötiklerin etkinliği belirgin olacaktır.

İlacın Farmakokinetiği ve Farmakolojisi: Antineoplastik ilacın tümör dokusu içindeki konsantrasyonu, onun farmakokinetik özelliklerine ve veriliş yoluna bağlıdır. Örneğin kemoterapötiklerin çoğu kan-beyin engelini aşarak santral sinir sistemine (SSS) geçemezler, kan-beyin engelini geçebilen ilaçlar arasında nitrozoüreler, prokarbazin ve epipodofilotoksin türevleri sayılabilir. Bu özellik nedeniyle, akut lenfoblastik lösemide SSS nükslerinin önlenmesi için metotreksatın intratekal yolla uygulanması gerekir. Yüzeysel mesane kanserinin tedavisi için BCG aşısı, interferon veya bazı sitotoksik ilaçlar doğrudan mesane boşluğuna verilir. Tümör dokusunda ilaç konsantrasyonunu arttırmak amacıyla organ veya ekstremiteler perfüzyonu yöntemi uygulanabilir. Bazı tümörlerde etkin hücre içi ilaç düzeyini elde edebilmek için yüksek doz uygulamaları gerekebilir. Örneğin akut lenfoblastik lösemide metotreksatın yüksek dozlarda verilmesi, hücre içinde uzun zincirli poliglutamatların oluşmasını arttırarak tedavinin etkin olmasını sağlar. Yüksek doz metotreksat uygulaması ilacın kan- beyin engelini yeterli miktarda geçmesini de sağlar.

Antineoplastik ilaçların doz-yanıt eğrisi ve doz-toksik yanıt eğrisi genellikle lineerdir ve terapötik pencere dardır. Bu özellikler ilaç dozlarının hastanın vücut yüzey alanına göre ayarlanmasını gerektirir. Terapötik etki, tek doz uygulama sonrasında elde edilen doruk konsantrasyondan (C_{maks}) ziyade, eğri altında kalan alana (EAA/AUC) bağlıdır. Toksik etki ise çoğu zaman doruk konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle kemoterapötiklerin türüne göre devamlı i.v. infüzyon, i.v. bolus injeksiyon veya ağız yolu (p.o.) gibi farklı yollardan verilmesi daha güçlü etki ve daha az toksisiteyi sağlayabilir.

Terapötik etkinliğin artırılmasını kısıtlayan önemli bir faktör toksisitedir. Doz kısıtlayıcı yan tesir, antineoplastik ilaçların daha yüksek doz ve/veya daha sık

kullanılmasını engelleyen yan tesirler olarak tanımlanır. En önemli doz kısıtlayıcı toksisitelerden biri miyelotoksisite (kemik iliği toksisitesi)'dir. Hormonlar, vinkristin, bleomisin, asparajinaz ve sisplatin hariç, antineoplastik ilaçların çoğu miyelotoksiktir. Metotreksat, fluorourasil, daktinomisin, adriablastin için doz kısıtlayıcı yan tesirler arasında mukozitis, bleomisin için pnömonitis ve akciğer fibrozisi, adriablastin ve daunorubisin için kardiyomyopati, vinkristin için periferik nöropati, sisplatin içinse nefrotoksik etki sayılabilir.

İlaç Direnci (Rezistans): Antineoplastik ilacın terapötik etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör ilaç direncidir. Bazı tümörler kemoterapiye hiç yanıt vermez, bu durum birincil (primer) direnç olarak adlandırılır. Kemoterapi sırasında da ilaç direnci gelişebilir; buna ikincil (sekonder) direnç adı verilir. Kemoterapiye duyarlı olduğu bilinen kanser türleri için etkinlik spektrumu, tümörün duyarlı olduğu ilaç grubu şeklinde tarif edilebilir.

Tümörün heterojenliği, kemoterapiye duyarlı hücrelerin ölmesi sonucu bir tür ayıklamaya (seleksiyona) yol açarak sonuçta kazanılmış ilaç direnci gösteren bir tümörün ortaya çıkmasına yol açar. İlaç direncinin gelişimini engellemek için o tümörde tek başına etkili, fakat etki mekanizması ve yan etki profili farklı ilaçlar kombinasyonlar halinde kullanılır. Tek ilaç kullanmak zorunluluğu varsa ilacın yeterli doz ve süre verilmesine dikkat edilmelidir.

Antineoplastik Kemoterapinin Kanser Tedavisindeki Yeri(86)

Antineoplastik kemoterapinin kanser tedavisinde 4 bağlamda yeri vardır.

A.Primer Kemoterapi: Bazı kanser türlerinde küratif amaçla, genellikle de ileri evre kanserlerde, başka tedavi yaklaşımlarının yaşam süresine katkısının olmadığı durumlarda uygulanan kemoterapi “primer kemoterapi” olarak adlandırılır. Küratif amaçla kemoterapi verilen tümörler arasında Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalar, akut lösemiler, metastatik olan ve olmayan koryokarsinom ve germ hücreli tümörler ile çocukluk çağı tümörlerinden bazıları sayılabilir. Primer kemoterapi, ileri evre metastatik hastalık olgularında semptomların palyasyonunu sağlayarak, yaşam kalitesini düzelterek, progresyona kadar geçen süreyi ve yaşam süresini uzatarak yararlı olur. Bu tümörler arasında meme, over, küçük hücreli-dışı akciğer kanseri, nazofarinks kanserleri sayılabilir.

B.Adjuvan Kemoterapi: Tanı anında metastatik olmayan ve lokal tedavisi tamamlanan olgulara, mikrometastatik odakların olabileceği bilgisinden yola çıkarak kemoterapi uygulanması adjuvan kemoterapi olarak adlandırılır. Lokal tedaviden sonra geride kalan odaklarda çoğalma fraksiyonunun yüksek olması, bu dönemde yapılan tedavinin daha etkin olabileceğini düşündürmektedir. Bu tedavi yaklaşımı meme, kolorektal kanser, küçük-hücreli akciğer kanseri gibi tümörlerde hastaliksız ve genel sağkalımı uzatmaktadır.

C.Neoadjuvan Kemoterapi: Lokal ilerlemiş kanserlerde, tümör kitlesini küçülterek lokal tedavinin başarısını arttırmak ve bazı durumlarda organ koruyucu yaklaşımlara olanak sağlamak ve mikrometastazları erken dönemde tedavi etmek amacıyla cerrahi ve/veya radyoterapi öncesinde kemoterapi uygulanması, neoadjuvan tedavi olarak adlandırılır. Evre 3 meme kanserinde tanı anında tümörün metastatik olma olasılığının yüksek olması nedeniyle, neoadjuvan kemoterapi tercih edilen bir tedavi yaklaşımıdır. Yumuşak doku ve kemik tümörlerinde, neoadjuvan kemoterapi ekstremiteler koruyucu cerrahiye olanak sağlayabilir. Baş ve boyun tümörlerinde, örneğin larinks kanserinde neoadjuvan kemoterapi ve/veya radyoterapi organ ve fonksiyon kaybını engelleyebilir.

D.Eşzamanlı (Konkomitan) Kemo-Radyoterapi: Radyoterapi ile kemoterapinin, radyoterapinin etkinliğini arttırmak amacıyla birlikte uygulanması eşzamanlı (konkomitan) kemo-radyoterapi olarak tanımlanır. Seçilen kemoterapötüğün radyoduyarlandırııcı özelliği olmalıdır. Konkomitan uygulamada istenen etki radyoduyarlılığı arttırmak olduğu için, ilaçlar düşük dozlarda uygulanırlar. Bu amaçla kullanılan ilaçlar arasında sisplatin, 5-fluorourasil ve paklitaksel sayılabilir.

Sitotoksik ilaçlar pek çok alt gruba ayrılır. Burada tez çalışmamız kapsamında olanlardan bahsedilecektir.

Kemoterapi İlaçları(86)

Antrasiklinler ve Diğer Sitotoksik Antibiyotikler

Bu grupta çeşitli mikroorganizmaların kültürlerinden elde edilen antibiyotik niteliğinde antineoplastik ilaçlar bulunur. Antrasiklin türevleri olan daunorubisin, adriablastin , epirubisin, idarubisin ve aklarubisin ve diğer sitotoksik antibiyotikler olan bleomisin, daktinomisin, mitoksantron (mitazantron) ve mitomisin bu gruba girerler. Daktinomisin ve antrasiklin türevleri etki mekanizması bakımından benzerler.

Antrasiklin türevleri

Bu grupta bulunan ilaçlar daunorubisin, adriablastin, lipozomal doksorubisin, epirubisin, idarubisin, aklarubisindir. Bunlar etki mekanizmaları ve diğer özellikleri bakımından birbirine benzerler. İdarubisin hem oral hem de parenteral yolla, diğerleri ise sadece parenteral (i.v.) uygulanır.

Antrasiklin türevleri vezikandırılar. İntravenöz enjeksiyonlarından önce vane uygun iğne veya kateter yerleştirilip fizyolojik bir sıvı ile infüzyon başlatılmalı ve sonra infüzyon takımının borusu içine enjeksiyon yapılmalıdır. İlaç solüsyonu damar dışına kaçarsa ağır doku zedelenmesi ve nekroz yapar. Teratojenik, mutajenik ve karsinojenik ilaçlardır.

Doksorubisin (Adriablastin): Daunorubisinin hidroksi türevi olan ve aynı kaynaktan elde edilen diğer bir antrasiklin bileşimidir. Onun gibi DNA çift zincirinde interkalasyon yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozar; ayrıca

topoizomeraz II enzimine bağlanarak DNA hasarı oluşturur. Döneme özgü olmayan bir ilaçtır fakat bu ilacın da S dönemindeki hücrelerde etkinliği daha belirgindir. Tümör hücreleri bu iki ilaca çapraz-direnç gösterirler. Mide-barsak kanalından çok az absorbe edildikleri için i.v. yolla verilirler. Dokulara bağlanıp oradan yavaş salıverildiğinden, karaciğerde hızlı metabolize edilmesine karşın vücutta kalışı ve etkisi uzun sürer, büyük kısmı safra içinde itrah edilir. Karaciğerde yerleşmiş metastaz veya primer tümör ya da başka bir nedenle karaciğer fonksiyonu bozulmuşsa ilaç toksisitesi artar. Geniş spektrumlu ve etkin bir antineoplastik olmasına karşın oldukça toksiktir. Tek ilaç (monoterapi) veya kombinasyon içinde uygulanır. Pek çok tümörde olduğu gibi endometriyum kanserlerinin tedavisinde de kullanılır. 60-75 mg/m² dozunda i.v. infüzyonla 3 haftada bir uygulanır. Başka uygulama şemaları da vardır.

Adriablastinin doz kısıtlayıcı yan etkisi kemik iliği baskılanmasıdır. Olguların % 80 kadarında alopesi yapar. Bulantı ve kusma oluşturabilir. Hem akut hem de kronik kardiyotoksik etkisi vardır. Akut olarak aritmi görülür. Kronik kardiyotoksik etkisi ise kümülatif doza bağlı olarak gelişen kardiyomyopatidir. Kardiyomyopati olasılığının artması nedeniyle kümülatif dozu 550 mg/m²'yi geçmemelidir. Düşük kümülatif dozlarda da konjestif kalp yetmezliğinin klinik belirtilerini ortaya çıkarabilir. Daha önceden mediasteninin ışınlanmış olması, 50 yaşın üstünde olmak, kalp hastalığı bulunması gibi risk faktörleri varsa kümülatif dozun 450 mg/m²'nin üzerine çıkmaması ve hatta hiç kullanılmaması düşünülebilir. Kardiyomyopatinin mortalitesi % 30'un üzerindedir. Deksraksozan adlı bir metal şelatörünün antrasiklinlerle birlikte kullanılmasının kardiyak toksisiteyi azalttığı bildirilmektedir.

Platin Bileşikleri

Yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen organik platin türevi ilaçlardır. Bu gruptaki ilaçlardan tedaviye ilk giren cisplatin, kimyaca platin diamminodiklorür'dür. DNA çift-ipliğinde, iplikler-arası ve iplik-içi çapraz bağlanma yapar; bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlarınkine benzer. Sadece cis izomeri sitotoksiktir. Döneme özgü-olmayan bir ilaçtır.

Mide-barsak kanalından absorbe edilmez; sadece i.v. uygulanır. Dokulara, plazma proteinlerine % 90 oranında ve kısmen geri-dönüşsüz olarak bağlanır. Verilişinden sonra 4 ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir. Eliminasyon

yarılanma ömrü 60 saat kadardır. Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaçtır. Endometrium kanser tedavisinde kullanılabilir. Miyelosüpresif etkinliği orta derecede olduğu için kombinasyonlar için elverişli bir ilaçtır. Alkilleyici ilaçlar, antimetabolitler ve bazı bitkisel kaynaklı ilaçlarla sinerjistik etkileşme gösterir. İntravenöz infüzyon şeklinde tek bir gün 100 mg/m² dozunda veya 5 gün süreyle günde 20 mg/m² dozunda uygulanır.

En ciddi yan etkisi doza-bağımlı olarak akut böbrek yetmezliği yapmasıdır. Glomerüler filtrasyonu bozması nedeniyle hastanın tedavi öncesinde renal fonksiyonlarının yeterli olması ve yoğun hidrasyon sağlanması gereklidir. İlaç uygulandığı sırada ve uygulanmadan sonra, diürez saatte 150 ml'nin üzerinde olmalı, diürezi artırmak için mannitol infüzyonu veya bir diüretik verilmelidir. Aminoglikozid ilaçlar, sisplatinin nefrotoksitesini artırır. Sisplatin aynı zamanda ototoksiktir. Periferik nöropati yapabilir. Ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Hipomagnezemi ve buna bağlı hipokalsemi yapabilir ve tetaniye yol açabilir. Hipomagnezemi ve hipokalsemi, i.v. magnezyum sülfat solüsyonu uygulanarak düzeltilir. Kemik iliği üzerindeki baskılayıcı etkisi diğer birçok antineoplastik ilacınkine oranla düşüktür. Doza-bağımlı bulantı ve kusma yapabilir. Antineoplastik ilaçlar içinde en çok bulantı ve kusma yapanlardan biridir. Bu reaksiyon fenotiazin türevi antiemetiklerle kontrol altına alınamayabilir. Sisplatin uygulandığında hastalara antiemetik olarak serotonin 5-HT₃ reseptör antagonistleri, deksametazon ve birlikte benzodiazepin türevi bir hipnosedatif verilmesi önerilir. Sisplatin, mutajenik, teratojenik ve olasılıkla karsinojenik bir ilaçtır. İlacın ikinci kez uygulaması anaflaksiye kadar giden alerjik reaksiyonlara neden olabilir.

Anjiyenez ve Antianjiyjenik Tedaviler

Yeni damar yapımı (anjiyenez, neovaskularizasyon) vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi; embriyogenez, menstrüel siklus gibi durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiyenez ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit gibi), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda mevcuttur(87).

Onkolojide; tümör dokusunda gerçekleşen bu patolojik anjiyenez 1970'lerden itibaren ilgi konusu olmuştur. Günümüz teknolojiyle birlikte anjiyenez mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmış ve anti-anjiyjenik tedavi yaklaşımları

geliştirilmeye başlanmıştır. Kanserli bir hastaya anti-anjiojenik tedavi uygulayarak hastaya hiçbir yan etki olmadan, sadece tümörün etrafındaki damar yapımı bloke edilerek etkili ve spesifik bir tedavi yaklaşımı yapılmış olacaktır(88,89).

Anti-Anjiojenik Tedaviler

Vücutta her sistemde olduğu gibi bu sistemin de inhibitörleri mevcuttur ve anjiojenez, aktivatörlerin/inhibitörlerin arasındaki dengeye bağlı olarak aktive veya inhibe olmaktadır. Bu sistemin aktivatörleri ve inhibitörleri anjiojenik ve antianjiojenik ajanlar başlığı altında çok kısa olarak Tablo-2.10'da özetlenmiştir(90).

Tablo 2.10. Endojen Anjiojenik Ve Anti-anjiojenik Faktörler

| Anjiojenik Faktörler | Antianjiojenik Faktörler |
|--------------------------|----------------------------------|
| VEGF | Trombospondin-1 ve -2 |
| Bfgf | Endostatin |
| TGF- α ve β | Angiostatin |
| PDGF | Interferon- α , - β |
| HGF/SF | Interlökin -12 |
| TNF- α | Platelet Faktör -4 fragmanı |
| EGF'ler | Angiopoietin-2 |
| Plasental büyüme faktörü | Human macrophage metalloelastase |
| Tissue Factor | TIMP-1 ve -2 |
| IL-6 ve IL-8 | VEGF |
| Angiogenin | Vasostatin |
| Angiopoietin-1 | Anti-thrombin III fragmanı |

Anjiojenik faktörler ile anti-anjiojenik faktörler arasındaki bu denge tümör dokusu gibi hızla çoğalan hücrelerin bulunduğu ortamda hücrelerin çoğalması ve yaşam sürelerinin uzaması için temel unsur teşkil eden anjiojenez lehine bozulmaktadır.

Bu noktada değişik stratejiler öne sürülmüştür. Bunlar; anjiojenik faktörlerin inhibisyonu, doğal anti-anjiojenik faktörlerin uygulanması (Endostatin, Angiostatin vb.), endotel hücrelerinin inaktivasyonu, yeni damarların hücre dışı matriks ile etkileşimini bozacak moleküllerin uygulanması (matriks metalloproteinaz inhibitörleri) şeklinde özetlenebilir(91).

Anjiojenik Faktörlerin İnhibisyonu

Tümörler, anjiojenik faktörlerin üretimiyle karakterize dokular olduklarından, bunların ekspresyonunun ya da etkilerinin inhibisyonu tümör anjiojenezinin baskılanmasında indirek ancak etkili bir yaklaşımdır. Öncelikli hedefler içinde en çok tercih edilenler VEGF ve VEGF reseptörleridir.

Anti VEGF Stratejileri

VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek VEGF in etkinliği önlenmektedir(92,93). Bu mekanizmaları 3 grupta toplayabiliriz. Bunlar; VEGF inhibitörleri, VEGFR inhibitörleri, monoklonal antikordardır.

VEGF'e Yönelik Monoklonal Antikordar;

rhuMab VEGF (Bevacizumab, Avastin®); anti-anjiojenik ve anti-tümör etkinliği olan rekombinant insan monoklonal VEGF antikordur. Faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca yakın zamanda yapılmış randomize faz III çalışmasında metastatik kolorektal kanserli hastalarda konvansiyonel tedaviye kıyasla klasik IFL tedavisiyle kombine edildiğinde hastalarda survinin önemli derecede arttığı, tümör progresyonunda ciddi azalmanın olduğu ve tromboembolik komplikasyonda herhangi bir artış olmadığı tespit edilmiştir(94,95).

2.3. Kanser Tedavilerinin Araştırılmasında Hücre Kültürü Kullanımı

Biyolojik araştırmalarda canlılar ya bir bütün olarak ya da organ, doku veya hücre gibi yapıları alınarak *in vitro* şartlarda incelenmektedir. Hücre (doku) kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların gerçek ortamlarına benzer biçimde hazırlanmış steril besi ortamlarında bir süre yaşatılmalarıdır(96).

Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamakta ve kökeni 1885 yılına kadar dayanmaktadır. 1852’de Wilhelm Roux embriyonik tavuk hücrelerinin birkaç gün boyunca vücut dışında bir tuz çözeltisinde canlılıklarını sürdürebildiğini, daha sonra 1898 yılında Ljunggren insan dokusunun kullanıldığı ilk deneyi yaparak, insan derisininin *in vitro* ortamda asidik sıvıda canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. 1913’te Alexis Carol hücrelerin düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında çoğalabildiklerini belirlemiştir. Wilton Earle ve arkadaşları 1943’te L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını; 1951’de George Gay ilk sürekli (continuous) insan hücre serisini, HeLa serisini geliştirmişlerdir ki bugün bile hala bu hücre serisi yaygın olarak kullanılmaktadır. 1950’li ve 1960’lı yıllarda Eagle, Fischer, Parker, Healy, Morgan, White ve Waymounth adlı araştırmacıların da içinde bulunduğu birçok bilim adamı kültürde bulunan hücrelerin gelişmeleri için gerekli olan besin maddelerini belirlemişlerdir(97).

Hücre (doku) kültürü 3’e ayrılmaktadır:(98)

1. Primer kültür (öncül kültür): Bir organizmadan cerrahi yöntemlerle ayrılmış olan organ, doku ve hücreler uygun bir kültür ortamına konulduklarında, burada yüzeye bağlanmakta ve bölünerek çoğalmaktadırlar. Bu “primer kültür” olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler canlı doku parçalarından gelen ve kültür kabının yüzeyine ilk yapışan hücrelerdir(99).

2. Sekonder kültür (ikincil kültür): Öncül kültür sonucu elde edilen hücrelerin enzimatik yollarla başka bir ortama aktarılması ile elde edilen hücrelerin oluşturduğu kültürdür(100).

3. Sürekli kültür hücresi: *In vitro* şartlarda sürekli büyüyen kültür hücre tipidir. Sürekli kültür hücrelerine, cell line (hücre hattı) veya cell strain adı verilmektedir(98).

Hücre kültürleri aşağıda belirtilen alanlar üzerine çalışmak için iyi bir model sistemi sağlamaktadır:

1. Temel hücre biyolojisi (hücreler arası haberleşme ve bağlantılar, hücre şekli, hücre bölünmesi, hücre iskeleti, çekirdek, protein sentezi, DNA replikasyonu)
2. Hastalığa neden olan ajanlar ile hücreler arasındaki etkileşim.
3. İlaçların hücreler üzerindeki etkileri.
4. Yaşlanma süreci ve tetikleyicileri
5. Beslenmeye ilişkin çalışmalar.

2.4. Kanserde *İn Vitro* İlaç Etkilerinin Araştırılması

2.4.1. *İn Vitro* Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür(101).

Geçmişten bugüne hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Böylece birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Sitotoksosite deneyleri değişik parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalmasını belirler(102).

In vitro sitotoksosite testleri hücre canlılığı, hücre çoğalması, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesini de belirler. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksosite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler neutral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücre metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite testi (hücre lizisini belirlemek için)'dir(103). MTT testi

düşük maliyetli, hızlı, hassas, güvenilebilir ve çok sayıda örnekle çalışılma imkanı sağladığından tercih edilmektedir(104).

Bu çalışmada sitotoksitenin belirlenmesi için MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyi yapılmıştır. Deney metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat dehidrogenaz enzimi ile metabolize olan, tetrazolium tuzu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)'in formazana çevrilmesine dayanmaktadır. Üstte sayılan analizlerin tümünde elde edilen veriler dolaylı olarak toksisite ile ilgili veriler içerirken, MTT deneyinin *in-vitro* olması nedeniyle doğrudan hücre canlılığı, hücre çoğalmasını, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesi mümkündür. Bu avantajları nedeniyle, MTT deneyi tercih edilmiştir. MTT testi monolayer kültürlerde sitotoksite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan bir yöntemdir(105).

2.4.2. Apoptosis Deneyleri

Canlılığın temel karakterlerinden birisi olan ölüm gerek hücre bazında, gerekse organizma bazında sıkça karşılaşılan bir olaydır. Ökaryotik hücrelerde şimdiye kadar morfolojik ve biyokimyasal analizlerle ayırt edilmiş iki tip hücre ölümü belirtilmiştir, bunlar patolojik hücre ölümleri (nekroz) ve fizyolojik “programlanmış (apoptoz)” hücre ölümleridir.

Apoptosis, hücre içindeki intihar programını aktif hale geçiren ileri derecede düzenlenmiş bir hücre ölümü işlemidir(106). Biyokimyasal ve morfolojik açıdan hücre nekrozdan farklı olarak apoptozisde kromatin yoğunlaşması, hücre küçülmesi, DNA fragmentasyonu, plazma membran kabarcıklanması ve iyi korunmuş organelleri içeren membranla çevrelenmiş apoptotik badiler vardır. Apoptotik hücreler, yakındaki yerleşik hücreler tarafından bununla ilişkili bir yangıya neden olmadan fagosite edilir ve sindirilirler(107). Bugünkü birçok anti tümör ilaçlarının olası mekanizmaları, hedef tümör hücrelerdeki apoptozise neden olma yetenekleriyle ilgilidir(108). Memeli hücrelerinde iki tane büyük apoptotik yolak belirlenmiştir: ölüm alması (dış)ve mitokondriyal (iç) yolak. Dış ya da iç yolların stimüle edilmesi kaspazların aktivasyonuna neden olmaktadır(109).

Apoptosis bazı klasik morfolojik ve biyokimyasal özelliklerde karakterize edilmektedir. Çekirdek kondensasyonu ve fragmentasyonu gibi bazı genel çekirdek morfolojisindeki değişiklikler ışık ve floresan mikroskobu ile incelenebilir**(110)**. Apoptosis mekanizmasının tetiklenmesiyle aktive olan enzimlerden önemli bir grup kaspaz ailesidir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmış olan kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan sistein proteazlardır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir şelale reaksiyonlar zincirine neden olurlar. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10) apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara (3, 6, 7) iletirler, efektör kaspazlar ise aktin, fodrin, lamin A, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Kaspaz şelalesi, sitokrom C'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla başlar. Kaspazdaki defektler, otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşmasına katkıda bulunur**(111,112)**. Kaspaz-3'ün hücrelerdeki varlığının tespiti, apoptosis mekanizmasının çalıştığını göstermesinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır **(113)**. Kaspazlardan biri olan Kaspaz 3 apoptotik kaskatta merkezi bir pozisyonda yer alır**(110)**.

Bu tez çalışmasında apoptosisin morfolojik olarak saptanması için DAPI boyama yöntemi uygulanmıştır. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. AT, AU ve IC grupları ile floresan özgülük gösteren, 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) nin, doğal çift iplikcikli DNA ile fluerasan bir kompleks oluşturduğu bilinmektedir. Bu özelliğinden dolayı DAPI, sitokimyasal araştırmalarda çok kullanışlı bir araç olmuştur. DAPI, DNA ya bağlandığı zaman floresan özelliği daha da güçlenir. DAPI, tercihli olarak çift iplikcikli DNA'yı boyayarak çekirdeğin mavi görünmesini sağlar**(114)**. DAPI boyama ile değerlendirilen genel çekirdek morfolojisi; kromatin çekirdeğinde azalma, kromatin kondensasyonu, fragmente olmuş çekirdekler ile karakterizedir**(110)**.

Tez çalışmasındaki ilaçların apoptotik etkilerinin moleküler seviyede değerlendirilebilmesi amacıyla Kaspaz-3 testi uygulanmıştır**(115)**. Bu test yönteminde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu kuyucuklara hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve

kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır**(116)**.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.1.1. Kullanılan Aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, Derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, karbuz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), floresan mikroskopu (Olympus BX51), inverted Mikroskop (Olympus IX71), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DMEM/F12 (1:1) (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Tripsin-EDTA solution (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), % 3,7 Formaldehit (Merck), Dimethyl Sulfoxide (Riedel de Haen), Formaldehit, CaCl, KCl, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, EDTA, MTT (Sigma), DAPI (Sigma), Kaspaz-3 kiti (Chemicon APT165), Sisplatin (Sigma), Adriablastin (Sigma), Bevacizumab (Altuzan) (Roche), Sıvı Azot.

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar, cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), enjektörler (10, 20 ve 50 ml hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler. Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı.

3.1.4. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar

0,2 mm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

Bevacizumab doğrudan medyuma karıştırılarak dozlar hazırlanmıştır. Sisplatin ve Adria, DMSO: Medyum (1:40 oranında) çözülerek dozlar hazırlanmıştır. Dozlar hazırlanır hazırlanmaz kullanılmıştır.

3.1.6 Kullanılan Hücreler

Ishikawa hücreleri İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir'den sağlanmıştır. Ishikawa hücreleri, % 10 Fetal Bovine Serum, penisilin-streptomisin, sodyum bikarbonat içeren DMEM/F12 (1:1) medyumda 37°C'de % 5 CO₂ içeren bir ortamda kültüre edilerek çoğaltılmışlardır. Hücrelerin temininin ardından uygulanan DAPI boyama sonucunda, floresan mikroskopunda incelenen hücrelerde mycoplasma tespit edilmiştir. Hücrelerin medyum ortamına Sprofloksasin ve Tylosin ilave edilerek hücreler mycoplasmadan temizlenmiş çoğaltılarak sıvı azotta (-196°C) stoklanmışlardır.

3.1.7. Yöntem

In Vitro Sitotoksikite Testi (MTT Testi)

Ishikawa hücreleri üzerinde Sisplatin, Adriablastin ve Bevacizumab'ın sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] deneyi yapılarak etkili dozlar saptanmaya çalışılmıştır. Bevacizumabın kullanılan preparatın 4 mililitresinde 100 miligram madde mevcuttur. Alınan 1152 mikrolitre 3 mililitreye tamamlandığı için $25 \times 1,152 = 28,8$ miligramı alınıp, 3 ml'e tamamlanmıştır. $28,8 / 3 = 9,6$ mg/ml olarak en yüksek ilaç dozu kullanılmıştır. Kullanılan maddenin moleküler ağırlığı 148 kilodalton = 148 000 daltondur. $9,6 / 148 000 = 0,000065$ ve $0,000065 \times 10^6 = 65$ mikromolar olarak çevrim yapılmıştır.

Bu amaçla yetiştirilen hücrelerin canlılıkları Trypan Blue boyaması yapılarak belirlendikten sonra hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10^4 olacak şekilde ekilerek 24 saat kültüre edilmişlerdir. 24 saatin sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılarak farklı konsantrasyonlardaki test maddelerini içeren medyumlar plakalara konulmuştur. Test maddeleri ile belirlenen

süreler (sadece 24 saat, 24 ve 48 saat) muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml^{-1} MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Hücrelerin, deney setlerinde her test maddesi dozu için 8 paralel halinde ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır. MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile *post-hoc olarak Tukey testi* uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. *One-way ANOVA* sonuçlarına göre ikili kombinasyon, bevacizumab(BEVA) eklenen (farklı dozlarda) üçlü kombinasyonla karşılaştırılmıştır. Sonuçta üçlü kombinasyonun her iki dozda da ortalamaları ikili kombinasyondan istatistiksel olarak anlamlı farklıdır. Bunun üzerine hangi grubun fark yarattığını görmek adına *Tukey post-hoc comp. test* yapılmıştır. Bu test sonucunda da ikili ve üçlü kombinasyon grupları arasında anlamlı fark olduğu sonucuna varılmıştır.

Apoptosisin Tespiti

Floresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI Boyama)

MTT deneyi sonucunda belirlenen Sisplatin, Adriablastin ve Bevacizumab dozlarının Ishikawa hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla DAPI boyama yapılmıştır. İçlerine steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş olan 6 kuyucuklu plakara ekilen hücreler, 24 saat CO_2 inkübatöründe kültüre edilmişlerdir. Bu süre sonunda kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılarak, maddelerin sitotoksikite testleri sonucunda belirlenen etkili dozları, lameller üzerine yapışan hücrelere 12 saat süresince uygulanmıştır. 12 saat sonrasında kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılmış, steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: $137 \mu\text{M NaCl}$,

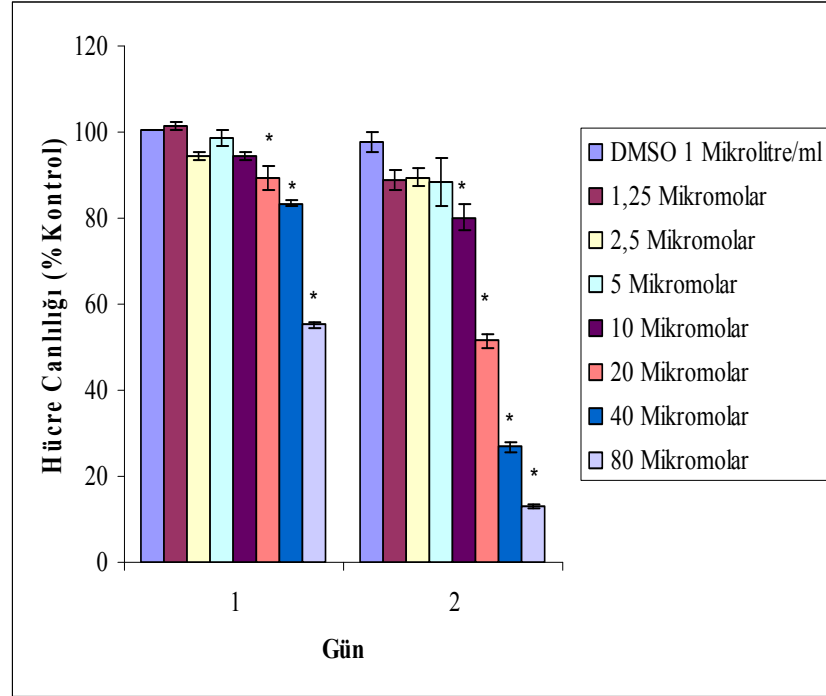
2.7 μM KCl, 15 μM KH_2PO_4 , 8 μM NaHPO_4 ; PH 7.3) ile yıkamaları yapılan lameller, PBS'de çözünmüş olan % 3.7'lik paraformaldehit çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika tespit edilmişlerdir. Tespit işleminin ardından lameller 3 kez PBS ile yıkanarak, 30 dakika 37 °C'de 1mg/ml DAPI (4'6-diamidino-2 fenilindol) ile karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir. Lameller daha sonra PBS ile yıkanarak kapatılmış ve floresan mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

Kaspaz-3 Deneyi

Hücreler, hücre içerikleri toplanmak üzere kitin satın alındığı firmanın yöntemine göre lizis edilerek deney gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda plakalar Eliza mikropate okuyucu ile 405 nm dalga boyunda okutulmuştur (R&D systems, Inc. 1-800-343-7475). Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

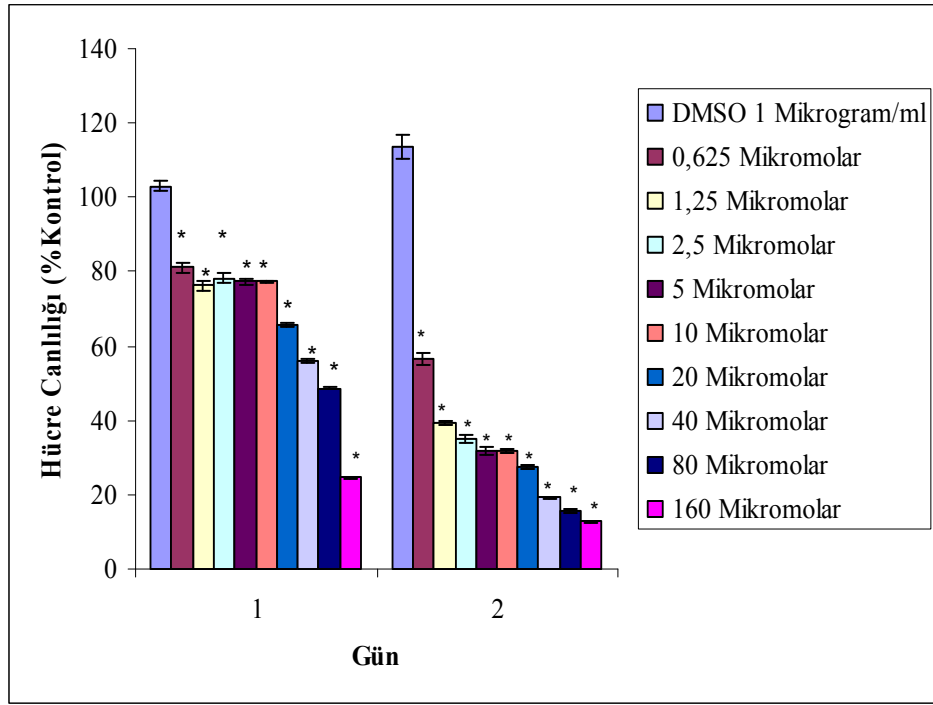
MTT Test Sonuçları



Şekil 3.1. Sisplatinin Ishikawa hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

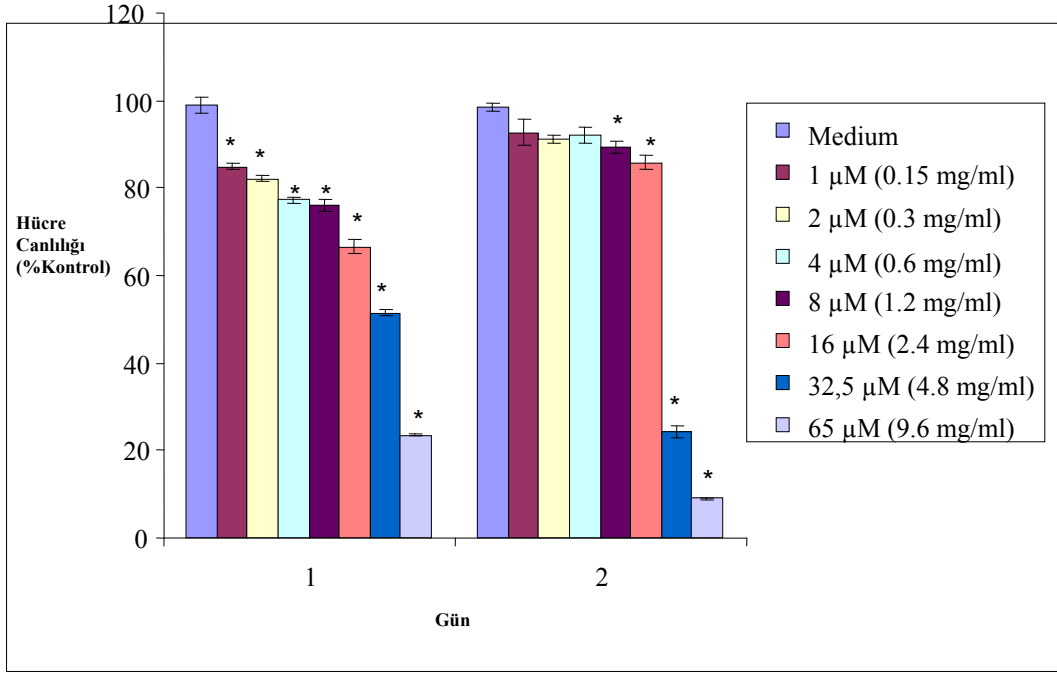
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Anlamlılık değeri $p < 0,05$



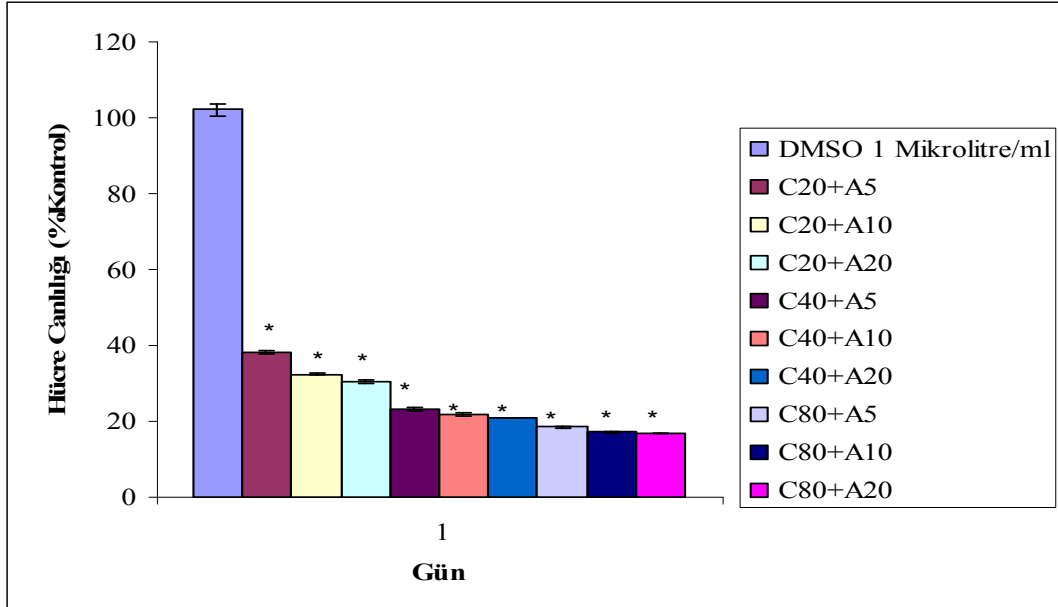
Şekil 3.2. Adriablastinin Ishikawa hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



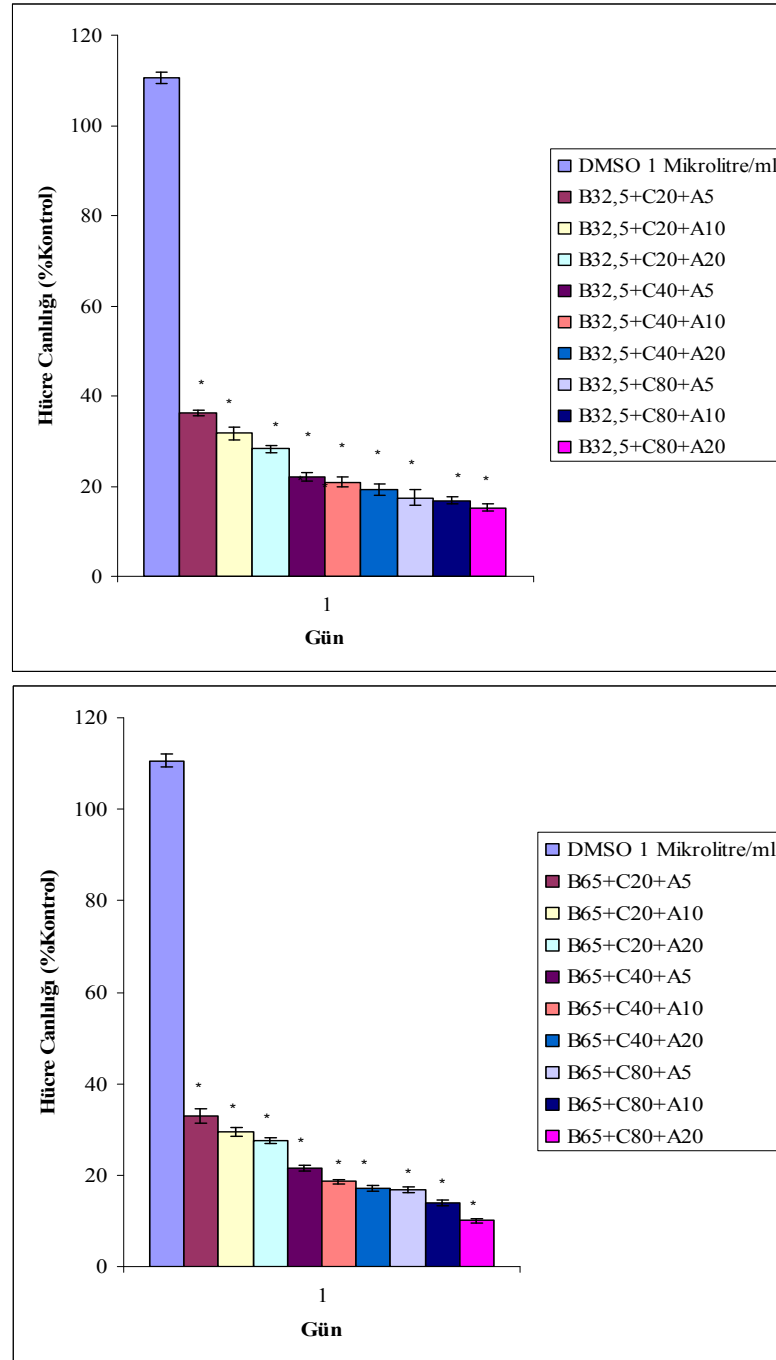
Şekil 3.3. Bevacizumabın Ishikawa hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.4. Sisplatin ve Adriablastinin farklı dozlarının birlikte uygulanmasının Ishikawa hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.5. Bevacizumab, sisplatin ve adriablastinin farklı dozlarının birlikte uygulanmasının Ishikawa hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

***Bevacizumab dozu μ molar olarak verilmiştir. (*) işareti kontrol grubuna göre Anamlı farklılıkları göstermektedir. Anamlılık değeri $p < 0,05$

Sisplatin antikanser ilaç olarak uzun zamandır kullanılmaktadır. Sisplatinin 20 μM 'lık dozunun MTT çalışmalarında etkin olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir(117). Bu nedenle MTT deneylerinde sisplatinin 20, 40 ve 80 μM 'lık dozları seçilerek bevacizumabın bu doza karşı etkinliği araştırılmıştır.

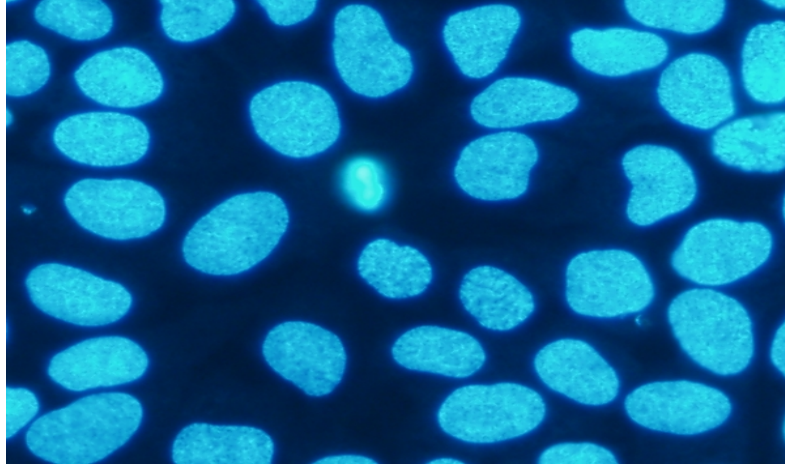
Sisplatin, adriablastininin ve bevacizumab tek başına kullanıldığında Ishikawa hücresinde hücre sayısında doza ve zamana bağlı bir etki görölmüştür. Buna karşın bevacizumabın düşük dozlarında ikinci günde hücre sayısını azaltıcı etki belirgin olarak izlenememiştir. Bu ilacın yüksek dozlarda kullanımında doza bağımlı etkinin ikinci günde de belirgin olarak devam ettiği saptanmıştır.

Sisplatin ve adriablastininin 24 saat birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde ise hücre sayısında doza bağlı bir etki görölmüştür. Kontrol grubuna göre en belirgin etki en yüksek dozda ortaya çıkmıştır. Sisplatinin 80 μM ve adriablastinin 20 μM dozlarında 24 saatlik uygulaması sonrasında hücre çoğalması % 84 oranında azalmıştır(şekil 3.4).

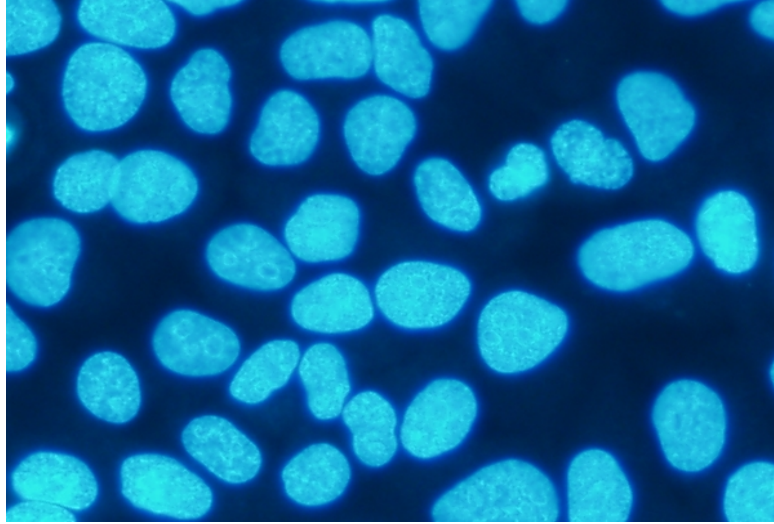
Bevacizumab, sisplatin ve adriablastininin 24 saat birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde ise hücre sayısında doza bağlı bir etki görölmüştür. İkili kombinasyon tedavisine 32.5 μM bevacizumab eklendiğinde hücre çoğalması % 85 oranında azalmıştır. İkili kombinasyon tedavisine 65 μM bevacizumab eklendiğinde ise hücre çoğalması % 90 oranında azalmıştır(şekil 3.5).

Çalışma sonuçlarını değerlendirmek amacıyla yapılan istatistik analizde ikili ve üçlü kombinasyonun hücre çoğalmasına olan etkileri anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0.05$). Üçlü kombinasyon uygulamasının sisplatin ve adriablastin uygulamasına göre daha etkili olarak hücre çoğalmasını engellediği belirlenmiştir. Bevacizumabın ilaç kombinasyonuna eklenmesi etkiyi artırmaktadır.

DAPI Boyama Sonuçları



a.Kontrol

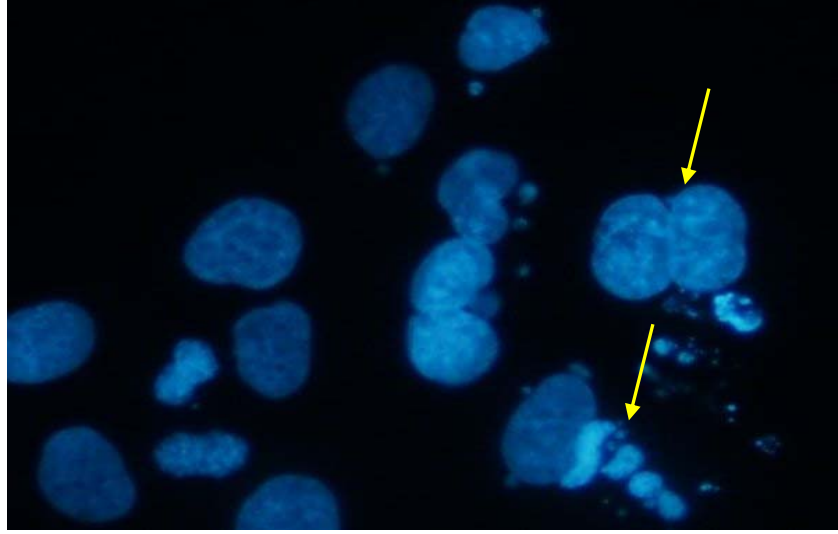


b.DMSO

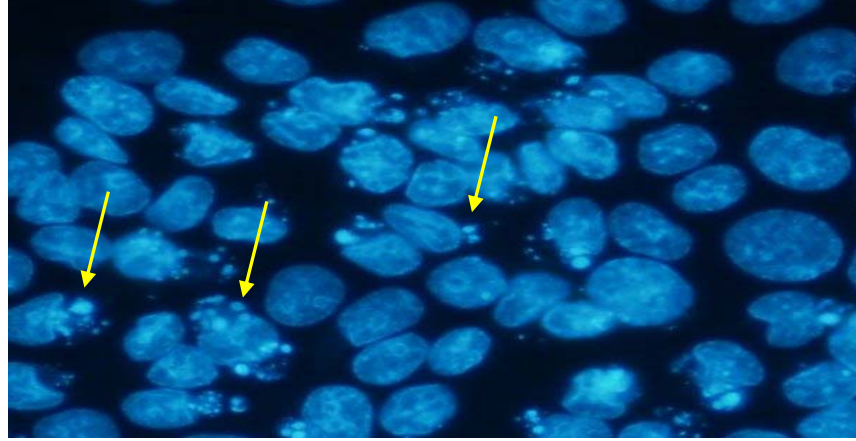
Şekil 3.6. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları.

a. Kontrol, b. DMSO

*Hücrelerde hiçbir etki izlenmemektedir.



C1. Sisplatin 20 μ M

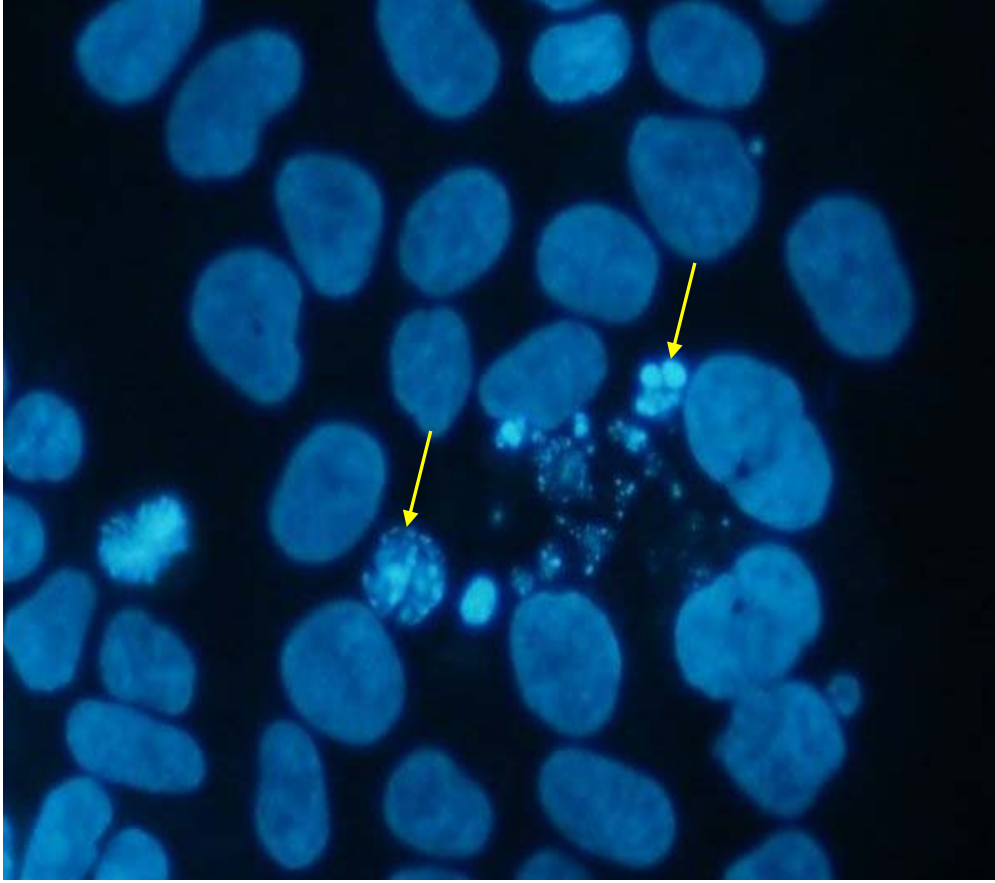


C2. Cisplatin 40 μ M

Şekil 3.7. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları.

C1. Sisplatin 20 μ M C2. Sisplatin 40 μ M

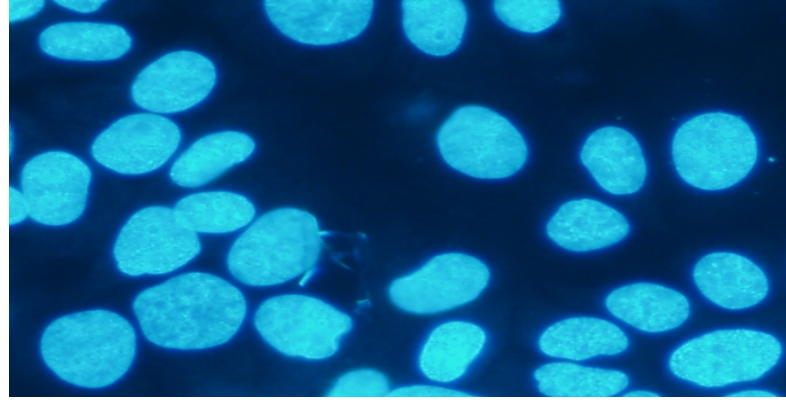
*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.



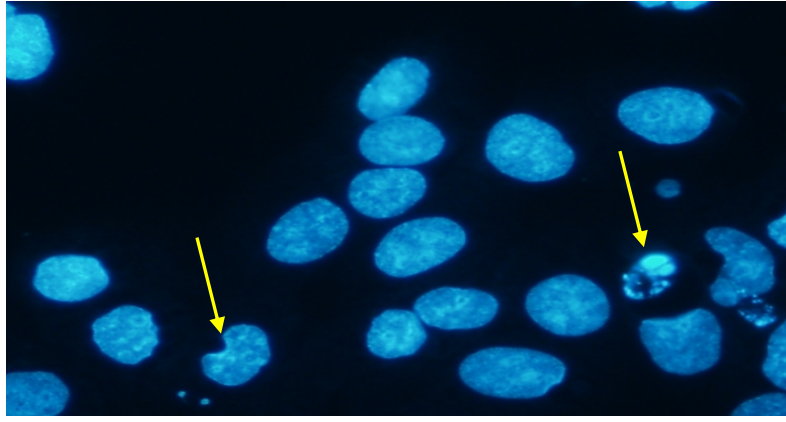
C3. Sisplatin 80 μ M

Şekil 3.8. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları. C3. Cisplatin 80 μ M

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.



D1. Adriablastin 5 µM



D2. Adriablastin 10 µM

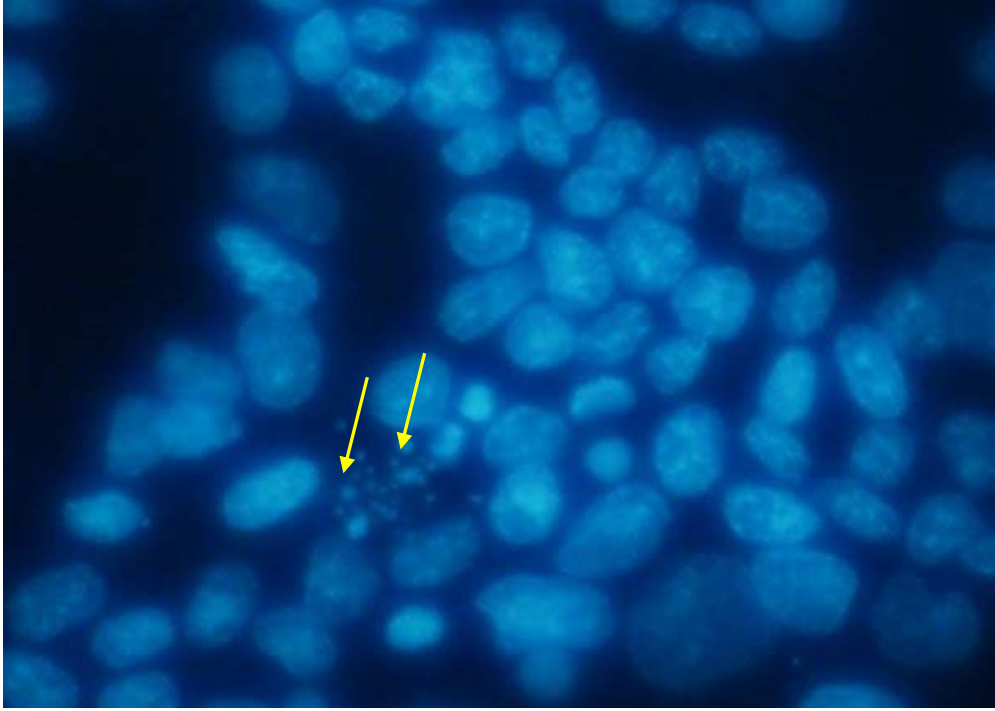


D3. Adriablastin 20 µM

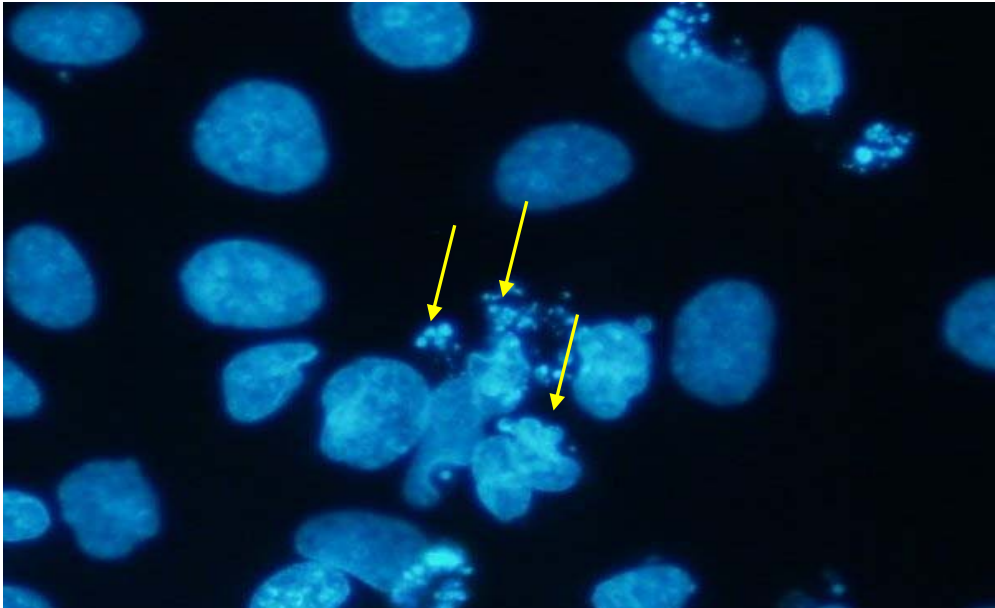
Şekil 3.9. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları.

D1. Adriablastin 5 µM D2. Adriablastin 10 µM D3. Adriablastin 20 µM

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir



E1. Bevacizumab 4,8 mg/ml

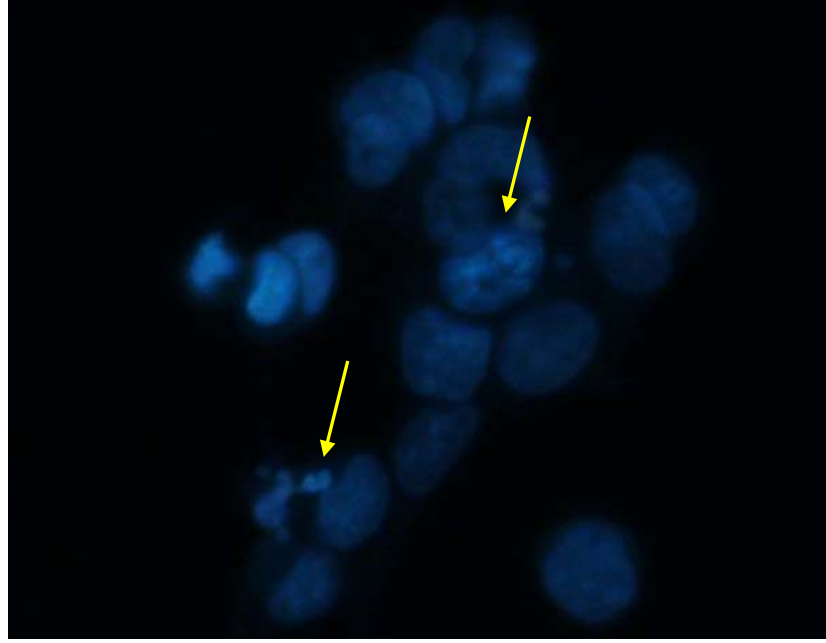


E2. Bevacizumab 9,6 mg/ml

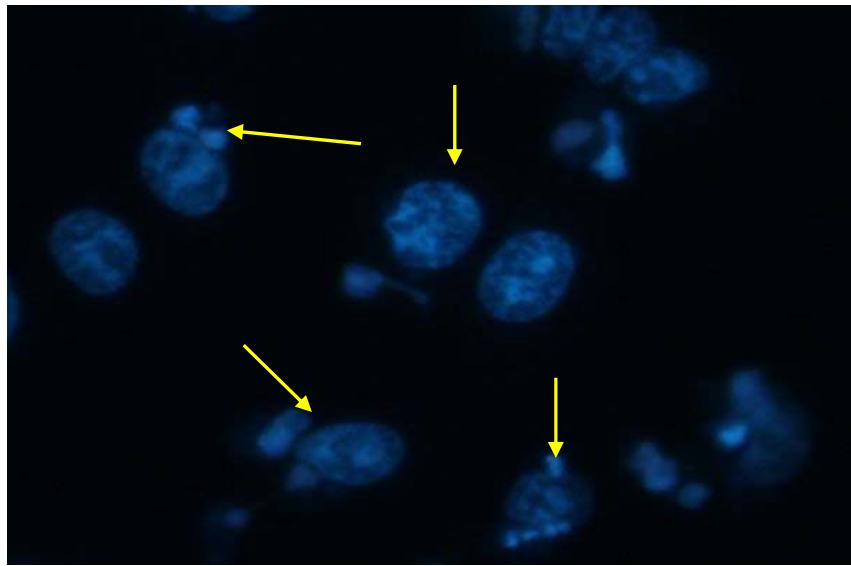
Şekil 3.10. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları.

E1. Bevacizumab 4,8 mg/ml E2. Bevacizumab 9,6 mg/ml

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir



F. Sisplatin 40 μ M + Adriablastin 20 μ M



G. Bevacizumab 9,6 mg/ml+Sisplatin 40 μ M+Adriablastin 20 μ M

Şekil 3.11. Ishikawa hücrelerinin DAPI boyamaları.

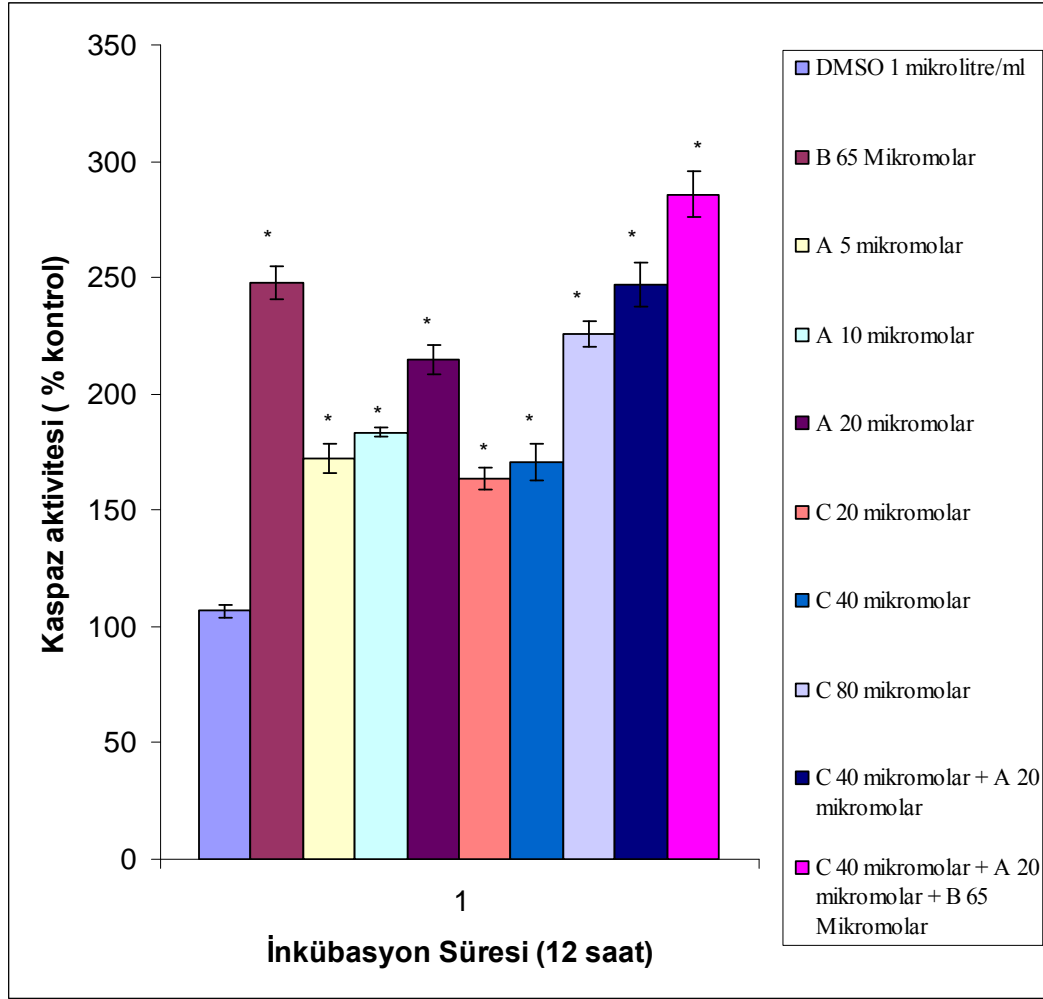
F.Sisplatin 40 μ M+Adriablastin 20 μ M,

G. Bevacizumab 9,6 mg/ml+Sisplatin 40 μ M+Adriablastin 20 μ M

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir

Sisplatin, adriablastin ve bevacizumabın tek başlarına ve birlikte Ishikawa hücreleri üzerinde meydana getirdiği apoptotik etkilerin morfolojik olarak saptanması için, MTT testleri sonucunda etkili görülen dozlar hücrelere uygulanmış ardından DAPI boyama yapılmıştır. Sisplatin, adriablastin ve bevacizumabın tek başlarına ve birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinin çekilen fotoğraflarında bulunan oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. Apoptotik hücrelerde, hücre çekirdeklerinin küçük parçalara ayrıldığı, çekirdeklerde boğumlanma meydana geldiği ve çekirdeklerin kondanse olduğu gözlenmiştir(Şekil 3.6-3.11). Ishikawa hücrelerine uygulanan DMSO yani çözücü ile hücre morfolojisinde değişiklik meydana gelmemiştir. Sisplatinin 20, 40 ve 80 μM 'lık dozlarının 12 saat süreyle uygulandığı Ishikawa hücrelerinde hücre çekirdeklerindeki fragmentasyonun doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir(Şekil 3.7, 3.8). Adriablastinin 5, 10, 20 μM dozlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında preapoptotik etkiyi göstermeye yarayan DAPI boyama sonuçlarında apoptotik hücre sayısının fazla olmadığı saptanmıştır(Şekil 3.9). Bevacizumabın MTT ile etkin olduğu saptanan iki dozunda da hücre çekirdeğindeki fragmentasyonun doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir(Şekil 3.10). Adriablastin+sisplatin kombinasyonunda ve özellikle Adrialastin+sisplatin+bevacizumab kombinasyonunda hücre silüetlerinin silindiği ve apoptozisi gösteren bulguların daha belirgin hale geldiği görülmektedir(Şekil 3.11).

Kaspaz-3 Sonuçları



Şekil 3.12. Ishikawa hücrelerinin Sisplatin (C), Adriablastin (A) ve Bevacizumab (B) ile tek başlarına ve kombine olarak 12 saatlik muamelesi sonucunda elde edilen Kaspaz-3 sonuçları.

Kontrol hücreleri DMSO ile muamele edilmiştir.

(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Ishikawa hücreleri ilaçlarla 12 saat boyunca muamele edildikten sonra fluorimetrik yöntemle kaspaz 3 aktivitesi ölçüldü. Sisplatin, adriablastin ve bevacizumabın tek başlarına ve birlikte Ishikawa hücrelerinin kaspaz 3 aktiviteleri üzerinde meydana getirdiği etkiler Şekil 3.12’de gözlenmektedir. Bevacizumabın tek başına uygulandığında oluşturduğu kaspaz 3 aktivitesi diğer iki ilacın tek tek ve ikili kombinasyonundan daha yüksek bulundu. 40 mikromolar sisplatin+20 mikromolar adriablastin+9,6 mg/ml (65µM) bevacizumabın birlikte uygulanması sonucunda kaspaz-3 aktivitesinin önemli ölçüde artış gösterdiği saptanmıştır ve bu değerleriyle kıyaslanınca en yüksek olarak bulunmuştur. Tek başlarına uygulanan ilaçların kaspaz-3 sonuçları üçü birlikte uygulandığı durumdakine oranla daha düşüktür. Üçlü kombinasyonun kaspaz sonuçları ikili kombinasyondan anlamlı ölçüde yüksektir ($p<0,05$). Moleküler seviyede artmış apoptotik yanıtı yüksek kaspaz 3 aktivasyonunun eşlik ettiği bilinmektedir. Yüksek kaspaz 3 aktivitesi geri dönüşümsüz apoptozisin göstergesidir. İkili kombinasyona bevacizumabın eklenmesi ile kaspaz aktivitesi belirgin olarak artar ve bu durum geri dönüşümsüz apoptozisin göstergesidir.

5.TARTIŞMA

Endometrium kanserinde kemoterapi özellikle ileri evre ve rekürren hastalığın tedavisinde gündeme gelir. FIGO istatistiklerine göre endometrium kanseri tanısı alan hastaların % 13.2'sinin cerrahi evresi 3'tür**(118)**. Endometrial kanseri nedeni cerrahi planlanan hastalarda adneksiyel kitleye rastlanabilir. Kitle endometrium kanserinin metastazı, primer senkron over kanseri ya da benign bir ovaryan patoloji olabilir. Endometrium kanseri nedeni cerrahi evreleme yapılan hastaların % 5 ila % 10'unda malign adneksiyel kitle mevcuttur**(119)**. Endometrium kanserli olgularda izole ovaryan metastaz varsa bu olgular iyi prognoza sahiptir. Mackillop ve Pringle'nin**(120)** çalışmasında izole adneksiyel metastazı olan olguların 5 yıllık sağkalımı % 82.3 olarak saptanmıştır. Bu oran endometrium kanserinin diğer intrapelvik metastazlarıyla gelen hastalarda % 27.7'dir ve fark anlamlı bulunmuştur. Marianni ve ark.**(121)**'in çalışmasında da benzer sonuçlar bulunmuştur. Endometrium kanseri tanısı alan hastaların % 10 kadarında lenf nodu pozitifdir ve bu hastalar FIGO'ya göre Evre 3c olarak sınıflanırlar. GOG 33 çalışmasına göre lenf nodu tutulumunu etkileyen faktörler; grade, derin myometrial invazyon, servikal veya adneksiyel tutulum, lenfovasküler invazyon, histolojik tip (uterin papiller seröz karsinom, clear cell karsinoma vb) olarak tanımlanmıştır**(122)**. Pelvik lenf nodu tutulumu olan olgularda % 40-50 oranında paraaortik lenf nodu tutulumu da vardır**(122,123)**. 5 yıllık hastaliksız sağkalım paraaortik lenf nodu tutulumu olmayanlarda (% 85) olanlara göre (% 35) anlamlı ölçüde daha yüksektir**(124)**.

Endometrium kanserli bir hastada gross olarak büyümüş lenf nodları varsa bunların çıkartılması tedavi açısından yararlıdır. Gross olarak büyümüş lenf nodlarının çıkarılması sonrası verilen radyoterapinin de başarısı daha fazladır. Sonuç olarak önerilen gross olarak büyümüş olan lenf nodlarının eğer çıkarılmaları güvenli ise tedavi amaçlı çıkarılmalarıdır. Evre 3c endometrium kanserli hastalar için önerilen klasik tedavi cerrahi sonrasında adjuvan radyoterapidir. Paraaortik lenf nodu tutulumu olan olgularda önerilen genişletilmiş saha radyoterapisi ile % 30-40 oranında 5 yıllık hastaliksız sağkalım elde edilmektedir**(125,126)**.

Yüksek riskli endometrium kanserinde kemoterapinin cerrahi sonrası radyoterapi olsun ya da olmasın kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Aoki ve ark.**(127)**'nin çalışmasında , Evre 3 endometrium kanseri olan 61 olgu çalışmaya

alınmıştır. Olgulara cerrahi sonrasında adjuvan olarak ya ikili (sisplatin 70mg/m² ve adriablastin 40mg/m²) ya da tekli (siklofosamid 500mg/m²) kemoterapi 4 haftada bir 5 siklus boyunca verilmiştir. Bu grupta hastalısız 5 yıllık sağkalım % 78.6 ve rekkürrens için geçmesi gereken zaman 18 ay olarak saptandı. Hastaların % 49'unda kemoterapiye bağı grade 3/4 nötropeni saptanmış ve sepsise bağı ölüm olmamıştır. Hastaların %19.7'sinde doz redüksiyonu gerekmiştir.

Mundt ve ark.(128)'nın çalışmasında yüksek riskli Evre 1-4 endometrium kanserli vakalar çalışmaya alınmış ve cerrahi sonrası bu vakalara 4 veya 6 siklus siplatin+doksorubisin kemoterapisi verilmiştir. Hastalarda en fazla pelvik rekkürrens görülmüştür. Hastaların % 38'inde vaginal ve % 26'sında nonvaginal pelvik rekkürrens saptanmıştır. Vaginal rekkürrensi olan vakalarda servikal invazyon ve adneksiyel metastazla ilişki kurulurken, nonvaginal olanlarda derin myometrial invazyon ve lenf nodu tutulumu ilişkili bulunmuştur. Tek başına adjuvan kemoterapinin uygulanması ile sıklıkla pelvik rekkürrens görülmektedir ve bu da adjuvan radyoterapinin gerekliliğini göstermektedir.

Klinik evresi 1 ya da 2 olan hastaların sadece % 10 kadarında pozitif peritoneal sitoloji vardır. Bu hastaların yarısında da bu pozitiflik tek ek bulgudur. Klinik Evre 1 veya 2 olan hastalardan cerrahi sonrası peritoneal sitolojisi pozitif saptananların 5 yıllık sağkalımları % 85'den % 56'a düşmektedir. Peritoneal sitolojisi pozitif olan hastalarda standart bir tedavi yoktur. Bu amaçla progestagenler ya da kemoterapi kullanılabilir. Bu konuda ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır(122). Nitekim peritoneal sitoloji pozitifliği ile ilgili bulgu yeni evreleme sisteminde yer almamaktadır(65).

GOG çalışmalarından birinde ileri evre ya da rekürren endometrium kanserinde medroksiprogesteron asetat 200 mg/gün tedavisi ile progesteron resptörü pozitif olanlarda % 37 ve negatif olanlarda % 8 cevap alındığı saptanmıştır. Yüksek riskli ya da düşük riskli grupta RT olsun ya da olmasın progesteron tedavisi adjuvan tedavi olarak kabul edilebilmektedir(129).

Endometrium kanseri Evre 4 FIGO kriterlerine göre a ve b olarak ayrılır. Evre 4a endometrium kanserinde rektal mukoza veya mesane invazyonu vardır. Evre 4b ise peritoneal implantları veya inguinal lenf nodu metastazı gibi uzak organ metastazı olan hastaları kapsamaktadır(118). Evre 4 endometrium kanseri tüm endometrium

kanserlerinin % 3-13'ünü oluşturur. Tanı sonrası 1 yıl içerisinde kansere bağlı ölümlerin % 23'ünden evre 4 hastalık sorumludur**(130,131)**. Evre 4 endometrium kanseri olan olguların 5 yıllık sağkalımları % 10-25 kadardır**(131,132)**.

Evre 4a endometrium kanserinde tedavide yapılan çalışmalar pelvik eksentasyon şeklindeki cerrahi tedavinin yararlı olduğunu göstermiştir. Bu hastaların operasyon sonrası tedavisi ise radyoterapi, sistemik kemoterapi veya her ikisini kapsamaktadır**(133-136)**.

Johns Hopkins Hastahanesinde yapılan bir çalışmada Evre 4b endometrium kanseri olan 65 olguya cerrahi uygulanmış. Bu çalışmada cerrahi sonrası rezidüel tümör 1 cm veya altındaysa optimal cerrahi tedavi yapılmış olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların % 55.4'üne optimal cerrahi yapılmış ve optimal sitoredüktif cerrahi ortalama yaşam beklentisi için en güçlü belirteç olarak kabul edilmiştir. Optimal cerrahi yapılan olguların ortalama sağkalımları 34.3 ay iken, rezidüel tümörü 1 cm'den fazla olan olguların ortalama sağkalımları 11 ay olarak bulunmuştur. Sonuç olarak Evre 4a ve Evre 4b hastalığı olan olgulara uygulanan sitoredüktif cerrahi sağkalıma katkı sağlamaktadır. Yapılan pek çok çalışmada sitoredüktif cerrahinin operasyon sonrasındaki adjuvan tedavinin başarısını arttırdığı gösterilmiştir**(135,136)**.

Evre 4 endometrium kanseri nedeni cerrahi yapılan olgulara eğer rezidüel tümör 2 cm'in altında ise uygulanan adjuvan radyoterapi yarar sağlamaktadır**(137,138)**.

İleri evre metastatik endometrium kanserinde uzak metastazlar açısından risk olduğundan sistemik adjuvan kemoterapi okült ekstrapitoneal metastazların tedavisinde avantaj sağlamaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan ajanlar; adriablastin, sisplatin ve paklitakseldir. İleri evre ya da rekürren endometrium kanserinde adriablastin sisplatin kombinasyonunun ortalama cevap oranı % 45-63'dür, buna rağmen tek başına adriablastin kemoterapisinin cevap oranı ise % 19-27'dir**(139,140)**. İleri evre endometrium kanseri olan olgularda tek ajan paklitaksel kemoterapisi kullanılabilir, kullanılan tek ajan paklitaksel kemoterapisinin ortalama cevap oranı % 36'dır**(141)**.

Fleming ve ark.(142)'nın yaptığı çalışmada adriablastin, sisplatin ve paklitaksel kombinasyon tedavisi uygulanan ileri evre endometrium kanserli olgularda ortalama cevap oranı % 46 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda tümör hacmiyle bağlantılı olarak, ard arda uygulanan radyoterapi ve sistemik kemoterapi intraperitoneal hastalığın kontrolünde ve uzak metastazların önlenmesinde önem taşır(135).

İleri evre endometrium kanseri olan ve performansı düşük olan olgularda hormonal tedavi de kemoterapi ve radyoterapiye alternatif olabilir. İleri evre ya da rekürren endometrium kanseri olan olgularda oral MPA ve tamoksifenin beraber kullanıldığı çalışmada cevap oranı % 33 olarak saptanmıştır.Hastaların tedavisinde bu kombinasyonun kullanılabileceği ileri sürülmüştür(143).

Endometrium kanseri genellikle erken evrede tanı alır ve iyi seyirli bir kanser olarak kabul edilir. Hastaların sadece % 5'inin tanı anında evresi 4'tür(144). Endometrium kanserinin çok az bir kısmı ileri evrede karşımıza çıkmasına rağmen endometrium kanseri tanısı alan olguların % 15'den fazlası kansere bağlı ölmektedir(145). Endometrium kanserinde rekkürrens en sık görüldüğü yerler; vagen kafi, pelvis, abdomen, paraaortik lenf nodları ve akciğerdir(146).

Endometrium kanseri reccürren ya da metastatik ise prognoz kötüdür. GOG çalışmalarında, bu durumda ister hormonoterapi, ister kemoterapi uygulansın ortalama sağkalım genellikle 1 yıl veya daha az olarak saptanmıştır(143-147).

Rekürren endometrium kanseri olan olgularda genellikle serum CA-125 seviyesi yükselir, eğer bu belirteçte yükselme varsa bu sistemik tedaviye yanıtın izleminde kullanılabilir(148,149).

Endometrium kanseri nedenli sadece cerrahi geçiren ve radyoterapi almayan hastalarda gelişen rekürrenslerin yarısı pelviktir ve bunların da yaklaşık % 50'si vagen kafındadır(150,151). Sadece cerrahi uygulanan olgularda rekürren hastalık durumunda kurtarma radyoterapisi kullanılabilir. Bu hastalarda optimal tedavi pelvik radyoterapi ve intertisyel ya da intrakaviter brakiterapi kombinasyonu olmalıdır(152). Endometriumda rekkürrens sonrası kurtarma radyoterapisi genelde başarılı olsa da erken dönemde tümör küçükken tedavi daha başarılıdır. Bununla beraber yüksek risk grubunda adjuvan tedavi ile baştan önlem almak daha yararlı olur(153).

Radyoterapi ya da cerrahi sonrasında lokal rekürrens olan olgularda kurtarma cerrahisinin de yeri vardır. Ama yapılan tüm çalışmaların sonuçları bu cerrahi işlem sonrası ciddi komplikasyonlar gelişebileceğini göstermiştir. Bu nedenle karar aşamasında çok dikkat edilmelidir**(154)**.

Endometrium kanserleri hem östrojen hem de progesteron reseptörlerini eksprese ederler. Yüksek düzeyde progesteron ekspresyonu erken evre kanserde evre ve grade ile koleredir ve bağımsız bir prognostik belirteçtir**(155)**. İlk kez progestinlerin ileri evre endometrium kanserinde kullanımı 1961 yılında ortaya atılmıştır**(156)**.

Yapılan pek çok çalışmada progestinlere cevap oranı % 15-25 arasında değişmektedir. Eski çalışmalarda hidrokspirogesteron kaproat gibi enjektabel formlar kullanılırken, yapılan pek çok yeni çalışmada oral ve intramuskuler preparatlar da benzer bioyararlanım ve cevap oranı göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle oral medroksiprogesteron asetat (MPA) ve megesterol asetat (MGA) kullanılmaktadır. Bu ilaçlar için önerilen dozlar ise MGA için 160mg/gün ve MPA için 200 mg/gün şeklindedir**(157,158)**.

Meme kanseri tedavisinde kullanımı ile endometrium kanseri riskini arttıran tamoksifenin ve selektif östrojen modülatörlerinin (SERMS) ileri evre veya rekürren kanserde kullanımı denenmektedir. GOG'un yaptığı bir çalışmada daha önceden sistemik tedavi almayan grupta cevap oranı % 10 olarak bulunmuştur**(159)**. Endometrial karsinom nedeni östrojen, progesteron reseptörü pozitif olan gruba tamoksifen uygulanırsa cevap oranı % 31 olarak bulunmuştur**(160)**. Tamoksifen hem benign endometrial dokuda hem de kanserli dokuda progesteron reseptör ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu bulgudan hareketle progestinlerle tamoksifenin kombine ve ardışık tedavileri denenmiştir ama bu çalışmalarda cevap oranı tek başına progestin kullanımından farklı değildir**(161,162)**.

GnRh analogları endometrium kanseri tedavisinde pek çok çalışmada test edilmektedir. Endometrium kanseri tanısı alan hastaların çoğuna bilateral oofektomi yapılmasına rağmen bu ilacın kullanılması gündeme gelmektedir. Yani bu ilaç ovaryan hormonların üretimini azaltmak için değil GnRH reseptörü eksprese eden kanser hücrelerinde bu reseptörün *down* regülasyonunu sağlar. Bu amaçla hem

analog hem de antagonistler kullanılmış ve *in vitro* etki gösterilmiştir. Ama tüm çalışmalarda bu etki gösterilememiştir(163,164).

Endometrial kanser hücrelerinin stromasında anlamlı ölçüde aromataz enzimi bulunmaktadır(165). Aromataz enzim inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda çok net sonuçlar alınamamıştır(166,167).

Danazolle ilgili yapılan çalışmada ise hiç bir etki gözlenmezken, yan etki olarak karaciğer enzim yüksekliği izlenmiştir(168).

Rekürren endometrium kanseri tedavisinde çeşitli sitotoksik ajanlar etkilidir.Ama kemoterapi bu grup hastalarda sitotoksik olabilir. Çünkü bu hasta grubu genelde yaşlıdır, daha önceden pelvik radyoterapi almıştır ve obezite, hipertansiyon, diabetes mellitus gibi *comorbiditeleri* vardır. 1994 yılında yayınlanan GOG çalışmasında çalışmaya katılan hastaların ortalama yaşı 65 (36-90) olarak bulunmuştur ve bu grupta daha önceden % 68 oranında pelvik radyoterapi öyküsü vardır(169). Rekürren ya da ileri evre endometrium kanseri tedavisinde tekli ya da kombine kemoterapi rejimleri kullanılabilir. Tek ajan paklitaksel kemoterapisi hem ilk tedavi olarak, hem de daha önce kemoterapi alan grupta pek çok çalışmada etkin bulunmuştur(141,169,170).

Tek ajan karboplatin ya da sisplatin kemoterapisi hem ilk tedavi olarak hem de daha önce kemoterapi alan grupta etkin bulunmuştur(171,172). Antrasiklinler (adriablastin gibi) daha önce tedavi almamış grupta % 20-30 cevap oranına sahiptir. Ama daha önce kemoterapi almış olan grupta ise bu ajanların etkisi over karsinomuyla benzer şekilde daha düşüktür(173).

İleri evre ya da rekürren endometrium kanserinin tedavisinde kombine kemoterapi rejimleri ve kemoendokrin tedaviler denenmektedir. Adriablastinin tek başına ve siklofosfamidle kombine kullanımını karşılaştıran bir çalışmada her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır(174). Tek başına adriablastin kullanımını sisplatin+adriablastin kullanımı ile karşılaştıran iki ayrı çalışmada ise kombinasyonun cevap oranının anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur(139,140).

Kemoterapi kombinasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada adriablastin+sisplatin kombinasyonu ile adriablastin+sisplatin+paklitaksel+G-CSF kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada çoklu ilaç kombinasyonunun

kullanımının daha yüksek yanıt, daha uzun sağkalım ve daha uzun hastalısız yaşamla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmadan hareketle pek çok merkez tedavide ilk seçenek olarak paklitaksel+karboplatin kombinasyonunu kullanmaktadır(175).

Tüm bu çalışmaların sonucunda GOG 209 adıyla yeni bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada paklitaksel+karboplatin kombinasyonu ile adriablastin+sisplatin+paklitaksel+G-CSF kombinasyonu karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları açıklandığı zaman antrasiklinlerin paklitaksel+platin kombinasyonuna eklenmesinin gerekip gerekmediği ortaya çıkacaktır.

Çalışmamızda endometrium kanserinde hedef tedavilerden olan ve antiangiogenetik etkisi bilinen bir ajanın (bevacizumab) tek başına ve klasik endometrium kanserinde kullanılan KT ajanlarıyla kombine olarak gösterdiği etkiler incelendi. Bu amaçla hücre kültür çalışması dizayn edildi ve *in vitro* ilaç etkilerine bakıldı.

Hücre kültürü tekniği kullanılarak uygulanan yöntemler ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle ilaç endüstrisi tarafından geliştirilen yeni ilaç adaylarının kansere karşı etkinliğinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Kanser tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalardaki bulgular göz önüne alındığında, apoptozis ve sitotoksitenin kemoterapiyle yakından ilişkili olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir(176). Kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye cevap olarak apoptozis ile öldükleri bilinmektedir(177).

Mitokondri birçok hücresel yolakta kavşak noktasıdır. Mitokondriler, hücre solunumu ve oksidatif fosforilasyon için gerekli ATP'nin % 80-90'ı üretirler, kalsiyum akışını düzenlerler ve programlı hücre ölümünde önemli rol oynarlar. Mitokondrilerin fonksiyonel bütünlüğünü tehlikeye sokan ilaçlar; tümör hücrelerinin sürekli gelişimi yüksek enerji üretimine bağımlı olduğu için ve tümör hücreleri genellikle pro-apoptotik sinyale karşı ilaca dirençlilik meydana getirdiği için, antikanser tedavilerinde mitokondrilerin hedef olmasını sağlaması bakımından önemlidir(115). Bu nedenle bu tez kapsamında sitotoksik etkilerin belirlenmesinde mitokondriyal aktiviteyi tespit eden MTT testi ve MTT testinden elde edilen sonuçların teyit edilmesi için apoptotik etkiler araştırılmıştır(178). Apoptotik etkinin

morfolojik olarak saptanması için DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. Apoptotik etkinin moleküler seviyede saptanması için kaspaz-3 testi uygulanmıştır. Mitokondri kaspaz zinciri ve apoptozisin düzenlenmesinde en önemli rolü oynayan organeldir. Mitokondriden sitokrom c salınması kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar(179).

MTT testi, sarı renkli suda çözünebilir tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kolorimetrik bir testtir. Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok cell line hücresinde hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır.

Apoptosisin inhibisyonu kanser gelişimindeki adımlardan birisidir. Kanser hastalarında, hastalığın geç dönemlerinde apoptosise karşı bir direnç oluşmakta bu da tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerinde etkili apoptosis aktivasyonunun başlatılması tedavi stratejilerinde önem kazanmıştır (180). Yapılan DAPI deneyleri bevacizumabın tek başına ve birlikte kullanımının ön apoptotik etkilere sahip olduğunu gösterirken, Kaspaz-3 testleri sonucunda Bevacizumabın tek başına ve birlikte kullanımının Ishikawa hücreleri üzerinde daha etkin olduğu saptanmıştır.

Apoptozisin saptanmasında DAPI boyama, çekirdek büyüklüğü ve morfolojisinin saptanmasına yarayan bir indikatör olarak kullanılmaktadır. DAPI fluorasan boyama ile hücre DNA'sında meydana gelen değişimi gözlemlemekte kullanılan bir boyadır, membrandan geçebilir ve hücrelerin membranları arasına girerek DNA'ya bağlanır. DAPI, DNA'ya bağlandığında, DAPI'nin floresansı 20 kat

artar ve bütün hücrelerin çekirdekleri boyanır. Bu deney, tekrarlanabilir, güvenilirdir ve yapılması kolaydır.

Yapılan çalışmaların başlangıcında hücreler 96'lık kuyucuklu plakalara 20000 hücre olacak şekilde ekildi. Yapılan farklı çalışmalarda hücre sayısı birbirinden farklı olarak kullanılmıştır. Örneğin bizim çalışmamızdan farklı olarak taksan ve platin kombinasyonunun over kanser hücre kültüründeki etkilerini inceleyen çalışmada 96'lık kuyucuklu plakalara 3500 hücre ekilmiştir**(181)**. Gagnon ve ark.**(182)**'nin çalışmasında ise Ishikawa hücreleri kullanılmıştı ve bizim çalışmamızdakine benzer şekilde 96'lık kuyucuklu plakalara 20000 hücre ekilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan hücre sayısı ilaç etkileşimlerini görmek için uygun bir sayıydı ve diğer çalışmalardakine benzer şekilde MTT ve kaspaz deneylerinde anlamlı sonuçlar elde edildi.

Hücreler çoğaltıldıktan sonra ilaç uygulamalarına geçildi. Pek çok çalışmada ilaçlar ardışık olarak da kullanılmasına rağmen bizim çalışmamızda tüm ilaçlar kombine etkinin görülebilmesi için hücre kültürüne aynı anda verildi. İlaçların kombinasyonda aynı anda verilmesine Springer Protokolleri esas alınarak karar verildi**(183)**. Bunun yanında Fritzer-Szkeres ve ark.**(184)**'nin lösemi hücre kültüründe yaptıkları çalışmada da adriamisin ve yeni bir ilaç olan ve etkisi araştırılan trimidox aynı anda verilmişti. Yine Oskar ve ark.**(185)**'nin çalışmasında T cell lösemi hücre kültüründe ilaç etkisi çalışılmış ve ilaçlar kombine olarak eşit volümde çözülerek kültüre aynı anda eklenmiştir. Kanzawa ve ark.**(186)**'nin çalışmasında da insan küçük hücreli akciğer kanser hücre kültürü kullanıldı ve antikanser ilaçların etkinliğine bakılmak için yapılan bu çalışmada kombinasyonda ilaçlar aynı anda kültüre eklenmişti.

İlaçlar kültüre belirlenen dozlarda eklendikten sonra MTT deneylerine geçildi. İlaçların dozlarının belirlenmesi için geniş aralıklar kullanıldı. Hücre kültürüne ilaç uygulamaları yapıldıktan sonra tekli kullanımlarda her üç ilaç için de (sisplatin, adriablastin ve bevacizumab) 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasındaki değerler saptandı. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Smith ve ark.**(181)**'nin çalışmasında insan over kanser hücre kültüründe KT'tik ilaçlar denendi ve ilaçlarla MTT testi sırasında inkübasyon süresi 72 saat olarak kullanıldı. Hoekstra ve ark.**(187)** çalışmasında ise bizim çalışmamızdaki gibi Ishikawa'lar kullanıldı ve MTT

öncesi inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlendi. Yine bizim çalışmamızla aynı hücre kültürünü yani Ishikawa'ların kullandığı Gagnon ve ark.(182) çalışmasında MTT öncesinde inkübasyon süresi 48 saat olarak uygulandı. Çalışmamızda 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT uygulandı ve sonuçlar alındı.

İlk denenen ilacımız olan sisplatin antikanser ilaç olarak uzun zamandır kullanılmaktadır. Sisplatinin 20 μM 'lık dozunun MTT çalışmalarında etkin olduğu araştırmacılar tarafından daha önce rapor edilmiştir(84). Bu nedenle MTT deneylerinde sisplatinin 20, 40 ve 80 μM 'lık dozları ve adriablastinin farklı dozları seçilerek bevacizumabın bu doza karşı etkinliği araştırılmıştır. Sisplatinin 80 μM 'lık en yüksek dozu hücre sayısında birinci gün % 45, ikinci gün % 87'lik düşüş meydana getirmiştir. Adriablastinin en yüksek dozu olan 160 μM 'lık doz hücre çoğalmasının ilk gün % 76 oranında ikinci gün ise % 88 oranında düşmesine neden olmuştur. Sonuçta her iki ilacın da hücreler üzerinde doz ve zaman bağımlı artan etkisi MTT ile gösterilmiştir.

Adriablastin ve sisplatin endometrium kanser hücre kültüründe doz ve zaman bağımlı olarak etki etmektedir. Doz artıkça ve süre uzadıkça ilaçların hücre canlılığı üzerindeki etkisi artmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar daha önce yapılan ve yine Ishikawa hücrelerinde sisplatin ve adriablastinin etkilerini MTT ile inceleyen Gagnon ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzer olarak bulunmuştur(182).

Bevacizumabın düşük dozlarının Ishikawa hücreleri üzerinde, hücre sayısında ilk gün azalmaya neden olurken, ikinci gün ilk güne göre hücre sayısında daha az oranda düşüşe neden olduğu birbirinden bağımsız olarak farklı zamanlarda ve farklı pasaj numaralarına sahip hücrelerle yapılan deneyler sonucunda saptanmıştır. Bevacizumabın tek başına 24 ve 48 saat süreyle Ishikawa hücrelerine uygulandığı deneylerin MTT testi ile değerlendirilen sonuçlarında Bevacizumabın 4.8 mg/ml'nin altındaki düşük dozlarında hücre sayısında ilk gün yaklaşık % 20 oranında düşüşe neden olduğu görülmektedir. Aynı düşük dozların ikinci gün kontrole göre % 10 oranında bir azalma meydana getirdiği görülmektedir. Yani BEVA için 48 saatlik etkinin 24 saatlik etkiden daha düşük olduğu söylenebilir. Sharma ve ark.(188)'nın 2009 yılında yaptıkları çalışmada retinal ganglion hücre kültüründe bevacizumabın toksisitesine bakılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda bevacizumabın hücre kültürünün yetiştirildiği medyumdaki protein miktarında artışa neden olarak hücreyi

proliferasiyona sevk ettiği ve hücre sayısını arttırdığı rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızın sonucunda görülen bevacizumabın 2.gün sonunda 1. güne göre hücre sayısında artış meydana getirmesi bu yüzden olabilir.

Bevacizumabın 4,8 mg/ml'lık (32.5 μ molar) dozu ilk gün hücre sayısının % 49, ikinci gün ise % 76 oranında azalmasına neden olmuştur. 9,6 mg/ml'lık (65 μ M) doz birinci gün hücre sayısında % 77, ikinci gün % 91 oranında düşüş meydana getirmiştir.

Carnerio ve ark.(189)'nın 2008 yılındaki çalışmasında bevacizumabın intravitreal endotelyal hücreler üzerindeki etkisi incelenmişti. Bevacizumabın düşük dozlarının hücre çoğalması üzerinde etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir. Buna karşın bevacizumabın klinikte kullanılan yüksek dozlarının hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve apoptotik etkiyi arttırdığı rapor edilmiştir. Spitzer ve ark(190)'nın 2007 yılında farklı ocular hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada bevacizumabın iki farklı ilaçla kombinasyonunun endotel hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Bizim çalışmamızla benzer olarak klinikte kullanılan mg dozlarında bevacizumabın doz ve süre bağımlı hücre canlılığını ve çoğalmasını baskıladığı MTT testi ile gösterilmiştir. Yine bizim çalışmamıza benzer olarak Costa ve ark.(191)'nin çalışmasında da insan mikrovasküler endotelyal hücreleri üzerinde yüksek dozlarda bevacizumabın doz ve süre bağımlı olarak MTT ile hücre proliferasyonu inhibe ettiği ve TUNEL ile de apoptosisi arttırdığı gösterilmiştir.

Shiyin ve ark.(192)'nin çalışmasında over kanser hücre kültüründe bevacizumab(BEVA) ve topotekan kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kanser hücreleri topotekana dirençlidir. Bu nedenle hücre çoğalması üzerine bu hücrelerde tek başına topotekan etki etmemektedir. BEVA ise tek başına bu hücrelerde çalışmamızdakine benzer şekilde aynı dozlarda büyüme inhibisyonu yapmaktadır. VEGF salgılayan bu hücrelere iki ilaç kombine verildiğinde ise etki BEVA ile ortaya çıkan etkiye göre anlamlı ölçüde daha fazla olarak saptanmıştır.Yani BEVA ile topotekana olan direnç ortadan kalkmaktadır. Bu çalışma bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Yani bevacizumab ile başka bir KT ajanının kombinasyonu KT ilaca olan direnci ortadan kaldırıp, total etkiyi artırıyor olabilir.

Çalışmamızda Bevacizumabın 9,6 mg/ml'lik dozunun Ishikawa hücreleri üzerinde sisplatin ve adriablastinin en yüksek dozlarına göre hücre sayısında daha yüksek bir oranda düşüşe neden olduğu MTT testi ile belirlenmiştir.

Argov ve ark.(193) insan kolon kanser hücre kültüründe yaptıkları çalışmada bevacizumabın 0.1-10 μ mol şeklindeki düşük dozlarında hücre canlılığı üzerine ya hiç etkisi görülmemiştir ya da çok düşük bir etkisi saptanmıştır. Bevacizumabın dozu artırılınca etki oluşmuştur ama hücre canlılığı üzerine bevacizumabın etkisi bizim çalışmamızdan farklı olarak adriablastinden daha düşük bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan BEVA'nın molekül ağırlığı 148 kilodaltondur ve bu dozun μ mol olarak karşılığı 65 μ mol olarak verilebilir. Bizim çalışmamızda bevacizumab çok yüksek dozda kullanıldığı için antiproliferatif ve apopitotik etki adriablastinden daha yüksek olarak görülmüştür. Çalışmamızda ekilen hücre sayısı daha fazladır ama kullanılan doz 6 kat daha fazla olduğundan bizim çalışmamızda BEVA daha fazla hücreyi etkilemiştir. Bu durum kullanılan hücre kültürünün ve kullanılan dozun farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Sisplatin ve adriablastininin 24 saat birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde ise hücre sayısında doza bağlı bir etki görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma meydana gelmiştir. En yüksek dozlar olan sisplatin 80 μ M+adriablastin 20 μ M 24 saatlik uygulaması sonrasında hücre çoğalması % 84 oranında azalmıştır.

Bu sonuçlardan hareketle tek ajan yerine ikili kombinasyon kemoterapinin etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir. Bu bulgu Smith ve ark.(181)'nin insan over kanser hücre kültüründe yaptıkları ve kemoterapötikleri kombine kullandıkları çalışmayla benzerdir. Bu çalışmada da KT ajanlarının kombine etkilerinin tek tek kullanımlarından daha fazla olduğu bulunmuştur.

Bevacizumab, sisplatin ve adriablastininin 24 saat birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinde ise hücre sayısında doza bağlı bir etki görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma meydana gelmiştir.

En yüksek doz olan BEVA 4,8 mg/ml+sisplatin 80 μ M+adriablastin 20 μ M 24 saatlik uygulaması sonrasında hücre çoğalması % 85 oranında, yine en yüksek doz olan BEVA 9,6 mg/ml+sisplatin 80 μ M+adriablastin 20 μ M 24 saatlik uygulaması sonrasında hücre çoğalması % 90 oranında azalmıştır. Çalışmamızda

üçlü kombinasyon uygulamasının sisplatin ve adriablastin uygulamasına göre daha etkili olarak hücre çoğalmasını engellediği belirlenmiştir. KT ajanlarının ikili kombinasyonu ile kıyaslanınca BEVA eklenmesi hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana getirmiştir.

Sisplatin, adriablastin ve bevacizumabın tek başlarına ve birlikte Ishikawa hücreleri üzerinde meydana getirdiği apoptotik etkilerin morfolojik olarak saptanması için, MTT testleri sonucunda etkili görülen dozlar hücrelere uygulanmış ardından DAPI boyama yapılmıştır. Sisplatin, adriablastin ve bevacizumabın tek başlarına ve birlikte uygulandığı Ishikawa hücrelerinin çekilen fotoğraflarında bulunan oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. Apoptotik hücrelerde, hücre çekirdeklerinin küçük parçalara ayrıldığı, çekirdeklerde boğumlanma meydana geldiği ve çekirdeklerin kondanse olduğu gözlenmiştir(Şekil 3.6). Ishikawa hücrelerine uygulanan DMSO yani çözücü ile hücre morfolojisinde değişiklik meydana gelmemiştir. Sisplatinin 20, 40 ve 80 μ M'lık dozlarının 12 saat süreyle uygulandığı Ishikawa hücrelerinde hücre çekirdeklerindeki fragmentasyonun doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir(Şekil 3.7, 3.8). Adriablastinin 5, 10, 20 μ M dozlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında preapoptotik etkiyi göstermeye yarayan DAPI boyama sonuçlarında apoptotik hücre sayısının fazla olmadığı saptanmıştır(Şekil 3.9). Bevacizumabın MTT ile etkin olduğu saptanan iki dozunda da hücre çekirdeğindeki fragmentasyonun doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir(Şekil 3.10). Adriablastin+Sisplatin kombinasyonunda ve özellikle ilaçların üçlü kombinasyonunda hücre silüetlerinin silindiği ve apoptozisi gösteren bulguların daha bariz hale geldiği görülmektedir(Şekil 3.11).

X.Wan ve ark.(194)'nın 2007 yılında yaptığı çalışmada da adriablastinin Ishikawa'lardaki etkisine bakılmıştır. Bu çalışmada orijinali PTEN eksprese etmeyen Ishikawa hücreleri düşük dozlarla muamele edilince bizim çalışmamıza benzer olarak DAPI boyama ile az sayıda apoptotik hücre saptanmıştır. PTEN eklenmesiyle apoptotik hücrelerde artış saptanmıştır.

Ishikawa hücreleri ilaçlarla 12 saat boyunca muamele edildikten sonra fluorimetrik yöntemle kaspaz 3 aktivitesi ölçülmüştür. Bevacizumabın tek başına uygulandığında oluşturduğu kaspaz 3 aktivitesi diğer iki ilacın tek tek ve ikili kombinasyonundan daha yüksek bulunmuştur. 40 mikromolar sisplatin+20

mikromolar adriablastin+9,6 mg/ml bevacizumabın birlikte uygulanması sonucunda kaspaz-3 aktivitesinin önemli ölçüde artış gösterdiği saptanmıştır ve bu diğerleriyle kıyaslanınca en yüksek olarak bulunmuştur. Tek başlarına uygulanan ilaçların kaspaz-3 sonuçları üçü birlikte uygulandığı durumdakine oranla daha düşüktür. Bu bulgu yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bulunmuştur.

Moleküler seviyede artmış apoptotik yanıtı yüksek kaspaz 3 aktivasyonunun eşlik ettiği Caruso ve ark.(195) tarafından 2007 yılında rapor edilmiştir(115). Yüksek kaspaz 3 aktivitesi geri dönüşümsüz apoptosisin göstergesidir. Kaspaz-3 pek çok apoptotik yolakta son basamaktır.

Bae S. ve ark.(196)'nın çalışmasında CÍZAR adlı maddenin over kanser hücre kültüründeki etkilerine bakılmıştır. İlacın apoptotik etkisi hem artan kaspaz 3 aktivitesiyle hem de artan apoptotik genler olan BCL-2,BCL-XL ve BAX genleriyle gösterilmiştir. Bu çalışmalardan hareketle biz de çalışmamızda apoptozisi göstermek için kaspaz 3 aktivitesini kullandık.

Sonuçta BEVA tek başına ve sitotoksik ajanlarla kombine edilince hücreleri apoptoza yönlendirmektedir. Hofman ve ark.(197)'nin 2002 yılında yaptıkları çalışmada ratlarda over kanser modeli oluşturulmuştur ve BEVA tek başına ve klasik KT olan paklitakselle kombine olarak kullanılmıştır. BEVA'nın tek başına apoptotik etkisi histolojik olarak izlenmemiştir. Paklitaksel hem tek başına hem de BEVA ile kombinasyonun da apoptosisi inhibe etmiştir ama kombinasyonda hem apoptotik etki hem de hücre çoğalması üzerine olan etki % 20 oranında artmıştır. Böylece asit gelişimi ve tümör büyümesi de engellenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca bizim çalışmamızda BEVA'nın tek başına apoptotik etkisi ve hücre çoğalması üzerine olan etkisi de gösterilmiştir.

Diğer hayvan çalışması modellerinde de KT ajanları ile BEVA kombinasyonunun etkileri farklı kanser tiplerinde araştırılmıştır.

Hung H. ve ark.(198)'nin 2008 yılında yaptığı çalışmada hepatocellüler karsinoma için rat modeli oluşturulmuştur ve bu modelde bevacizumab ve rapamisinin etkisine bakılmıştır. *In vivo* çalışmada BEVA+rapamisinin apoptosisi arttırdığı ve hücre çoğalmasını azalttığı bulunmuştur. Aynı araştırmacı ve arkadaşları 2007 yılında prostat kanser rat modelinde 5-fluorourasil ve bevacizumab kombinasyonunun etkilerini incelemiş ve kombinasyonun tümör büyümesini inhibe

ettiğini bulmuştur. Bu olayı da angiogenezin ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile açıklamışlardır(199). Yine Hung H. ve ark.(198)'nin 2007 yılında aynı ajanlarla ratlarda over kanser modeli oluşturarak yaptıkları çalışmada bevacizumabın ve rapamisininin hücre çoğalmasını azaltarak, apoptozisi arttırarak ve angiogenezi inhibe ederek asit oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Böylece tümör hacmi azaltılarak peritoneal karsinomatozisin engellenebileceği ileri sürülmüştür.

Sonuçta tüm bu çalışmalar da bizim çalışmamızdan elde edilen *in vitro* sonuçların rat deneyleriyle ve sonrasında insan deneyleriyle desteklenebileceğini göstermektedir.

Kanser, gelişmiş ülkelerde kalp-damar hastalıklardan sonra ikinci sıklıkta görülen ölüm nedenidir. Kansere karşı etkili ilaçların geliştirilmesi, cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kanser tedavisinde medikal yaklaşımı da içeren multimodal tedavi yönteminin benimsenmesini sağlamıştır. Bugün, multimodal yaklaşım ile bazı kanser türlerinde şifa (eradikasyon), bazı türlerde ise anlamlı sağkalım avantajı sağlamak mümkün olmaktadır(86).

Endometriyum kanserinin artan sıklığı ve hızla jinekolojik kanserler arasındaki ilk sıraya doğru gidişi; bu hastalığın risk faktörleri, erken tanı için tarama yöntemleri, prognoz üzerine etkili faktörleri ve survi üzerine en etkili tedavi yöntemlerinin bulunmasına yönelik ciddi araştırmalara sebep olmuştur. Tüm bu bilgilerin ışığında kanser tedavisinde hedef tedaviler gündeme gelmektedir. Çalışmamızda da sık rastlanan kadın genital sistem kanserinden olan endometrium kanserinin tedavisinde yeni tedavi modalitelerinin etkisini araştırmıştır.

Erken evrelerinde iyi prognozlu bir kanser olan endometrium kanserinde ileri evre ve rekürren hastalık söz konusu ise prognoz kötüleşmektedir. Bu grupta KT gündeme gelir. Ama KT etkisini arttırmak amaçlı hedef tedavilere de ihtiyaç vardır.

Yıllar boyunca yapılan çalışmalarda pek çok KT ajanı ve hedef tedavi modaliteleri tek başına ve kombine olarak denenmektedir. Bu grup ajandan biri de bevacizumabtır. Endometrium kanserinde de diğer kanserlerde olduğu gibi anjiogenez tümörün büyümesinde ve metastazlarda etkilidir. VEGF yeni damar oluşumuna neden olur ve kötü prognozla ilgilidir. VEGF ekspresyonu pek çok endometrium kanser spesmeninde gösterilmiştir (% 56-100) ve bu durum derin myometrial invazyon, yüksek histolojik grade, lenfovasküler saha invazyonu, lenf

nodu metastazı ve kötü prognozla koleredir**(200)**. Bunun yanında yapılan bazı çalışmalarda da VEGF ekspresyonu ile endometrium kanser prognozu arasında ilişki saptanamamıştır. Bu durum farklı endometrial kanser alt tiplerinde farklı VEGF ekspresyonundan ve farklı evrelerden kaynaklanmış olabilir. Örneğin erken evre ve iyi diferansiye kanserlerde VEGF ekspresyonu fazla iken ileri evre ve kötü diferansiye tümörlerde daha azdır**(201)**.

İlk kez kanser tedavisinde monoklonal antikorlarla immünoterapi 25 yıl önce başlamıştır. 1890 öncesinde non-Hodgkin lenfomada mürin monoklonal antikorunun kullanılmasından beri bu alanda çalışmalar devam etmektedir. Bu ajanlardan biri olan bevacizumab VEGF-A monoklonal antikorudur ve tek başına ya da sitotoksik ajanlarla kombine olarak pek çok malignitede kullanılabilir. 2004 yılından beri kolorektal karsinom tedavisinde başlangıç KT'si olarak FDA onayına sahiptir. BEVA ve 5-FUO KT'si sağkalım üzerine olumlu etki yapan temel tedavi olarak kabul edilmektedir. Meme kanseri tedavisinde de klasik KT ajanlarıyla kombinasyonunda sağkalım üzerine olumlu etki saptanmakla birlikte ama çalışmalar devam etmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde de BEVA sitotoksik ajanlarla kombine kullanılabilir. Çalışmalar kombinasyonun sağkalımı arttırdığını göstermiştir. Metastatik renal cell karsinomunda ise BEVA tek başına etkilidir ve yapılan çalışmalarda erlotinib kombinasyonunda ek yarar saptanamamıştır. BEVA ve IF- α kombinasyonunda ise tek başına IF- α 'ya göre etki daha fazladır. Bevacizumabın metastatik pankreas ve prostat kanserinde ve metastatik malign melonomda da kullanımı denenmektedir**(202)**.

Bevacizumabın jinekolojik onkolojide kullanımı over karsinomu ile başlamıştır ve bu konuda pek çok yayın vardır. Over kanserinde gerek klinik gerekse prelinik pek çok çalışmada BEVA'nın etkisi araştırılmıştır. Yapılan hayvan deneylerinde gerek tek başına gerekse diğer kemoterapötiklerle kombine kullanımında tümör büyümesi BEVA ile inhibe olmaktadır ve KT ajanlarının apoptotik etkisi artmaktadır. Aynı zamanda hayvan deneylerinde BEVA'nın asit oluşumunu da inhibe ettiği gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan randomize kontrollü çalışmalarda tek ajan BEVA ile sağkalım üzerine olumlu bir etki gösterilememiştir. KT ajanlarıyla kombine edilmeden kullanıldığında BEVA'nın etkisi minimaldir**(203)**.

GOG tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada rekürren ya da persistan over kanserli 62 olgu çalışmaya alınmıştır ve bu olgularda klinik cevap oranı % 21 olarak saptanmıştır ve bu olgularda görülen yan etkiler minimaldir(204).

2007 yılında yapılan başka bir çalışmada ise 44 olguya BEVA monoterapi olarak uygulanmış ama intestinal perforasyon (% 11) insidansının yüksek olmasından dolayı çalışma sonlandırılmıştır. Ayrıca bu çalışmaya katılan olgularda ince barsak obstrüksiyonu, HT ve arteriyel tromboemboli de görülmüştür(205).

Bevacizumabın rekürren ya da primer over kanserinde KT tedavisine eklenmesi sonucunda cevap oranı % 16-80 arasında değişmektedir. Bu ikili kombinasyonu ilk tedavi olarak alanlarda cevap oranı en yüksektir. GOG tarafından karboplatin+paklitaksel kombinasyonuna BEVA eklenmesinin etkileri halen devam eden çalışmada incelenmektedir(203).

Serviks kanserinde de bevacizumabın kullanımı son yıllarda gündeme gelmiştir. GOG 227C çalışmasında BEVA kullanımıyla metastatik ya da rekürren serviks kanserli olgularda progresyonun yavaşladığı gösterilmiştir(206). Jason ve ark.(207)'nin çalışmasında da BEVA serviks kanserinde etkili bulunmuştur. Monk ve ark.(208)'nin çalışmasında da rekürren ya da persistan serviks kanserinde BEVA'nın etkili olduğu saptanmıştır ve ikinci ya da üçüncü seçenek tedavi olarak kullanılabilceği ileri sürülmektedir. Bu konuda klinik ve prelinik çalışmaları halen devam etmektedir.

Son olarak çalışmamızın konusu olan endometrium kanserinde BEVA kullanımı ile ilgili daha az sayıda çalışma mevcuttur. GOG 229-E çalışmasında tek ajan olarak rekürren endometrial kanser hastalarında denenmiştir. Bu çalışma 2008 yılında sonuçlanmış ve sonuçları sunulmuştur. 56 hasta çalışmaya alınmıştır ve 15mg/kg iv BEVA her 3 haftada bir hastalara verilmiştir. Hastaların cevap oranı % 15.1 ve 6 aylık progresyonsuz sağkalım % 35.8 olarak saptanmıştır. Hastaların progresyonsuz ortalama sağkalım süresi 4.2 ay ve ortalama sağkalımları ise 10.5 ay olarak bulunmuştur(209). GOG 229-G çalışmasında ise Temsirolimus ve BEVA kombinasyonunun rekürren ya da persistan endometrium kanseri üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. 2010 Temmuzda tamamlanacak olan bu çalışmanın sonuçları da yol gösterici olacaktır.

Sonuç olarak, pek çok çalışmada ve bizim çalışmamızda hedef tedavilerden olan antianjiojenik ajanların KT ajanlarıyla kombine kullanımı genellikle additif ve sinerjik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Klinik uygulamalarda bu antianjiojenik ajanların tek başına kullanımlarında etkileri sınırlıdır. KT ajanlarıyla kombinasyon sonrası KT etkisinin arttığı görülmüştür. Bunun için pek çok mekanizma öne sürülmüştür ama net bir açıklama yapılamamıştır. BEVA gibi ajanlar ile kombinasyonda bizim çalışmamızdaki gibi daha düşük dozda sitotoksik ilaç kullanılarak daha yüksek dozda kullanımdakine benzer etki elde edilebilir. Ayrıca bu ajanlar pek çok çalışmada gösterildiği gibi ilaç direncini ortadan kaldırmak için de kullanılabilir. KT ile kombine kullanımda ihtiyaç duyulan KT'lik dozu azalır ve yan etkide de azalma meydana gelir.

Bizim çalışmamızda bevacizumab adlı yeni tedavi ajanı hem tek başına hem de klasik KT ajanlarıyla kombine edilince etkili bulunmuştur. Özellikle 3 ajanın kombinasyonunda total etki adriablastinin sisplatinle kombinasyonundan daha fazladır. Bu sonuç çoklu ilaç kombinasyonunun ümit verici olduğunu düşündürmektedir. Bununla beraber ilacın *in vivo* ortamda davranışı farklı olabilir. Bu nedenle hayvan ve insan çalışmalarıyla sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Kanser; insan sağlık sistemi üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir problemdir.

2. Endometrium karsinomu kadın genital sisteminin gelişmiş ülkelerde en sık rastlanan malign tümörüdür. Endometrium kanseri, meme, barsak ve akciğer kanserlerinin ardından kadınlarda 4. en sık rastlanan kanser olup, kanser ölümlerinin 7. en sık sebebidir.

3. Genel olarak bakıldığında kadınların yaşamları boyunca % 2-3 kadarında bu malignite gelişecektir.

4. Endometrium kanserinin primer tedavisi cerrahidir. Primer cerrahi tedaviyi takiben evresine göre radyoterapi ve/veya kemoterapi gündeme gelir.

5. En aktif kullanılan kemoterapötik ajanlar adriablastin ve platin bileşikleri olan sisplatin, karboplatin ya da paklitakseldir.

6. Hücre kültürü tekniği kullanılarak uygulanan yöntemler ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle ilaç endüstrisi tarafından geliştirilen yeni ilaç adaylarının kansere karşı etkinliğinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

7. Bu tez kapsamında bevacizumab, sisplatin, adriablastin isimli ilaçların sitotoksik ve apoptotik etkilerine bakılmıştır.

8. Çalışmamızın konusu olan endometrium kanserinde BEVA kullanımı ile ilgili henüz az sayıda çalışma mevcuttur.

9. GOG 229-G çalışmasında ise Temsirolimus ve BEVA kombinasyonunun rekürren ya da persistan endometrium kanseri üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. 2010 Temmuzda tamamlanacak olan bu çalışmanın sonuçları da yol gösterici olacaktır.

10. Pek çok çalışmada ve bizim çalışmamızda hedef tedavilerden olan antiangiojenik ajanların KT ajanlarıyla kombine kullanımı genellikle additif ve sinerjik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir.

11. Klinik uygulamalarda bu antiangiojenik ajanların tek başına kullanımlarında etkileri sınırlıdır. KT ajanlarıyla kombinasyon sonrası KT etkisinin arttığı görülmüştür.

12. Bizim çalışmamızda bevacizumab adlı yeni tedavi ajanı hem tek başına hem de klasik KT ajanlarıyla kombine edilince etkili bulunmuştur.

13. Özellikle 3 ajanın kombinasyonunda total etki adriablastinin sisplatinle kombinasyonundan daha fazladır.

14. Bu sonuç çoklu ilaç kombinasyonunun ümit verici olduğunu düşündürmektedir.

15. Bununla beraber ilacın *in vivo* ortamda davranışı farklı olabilir. Bu nedenle hayvan ve insan çalışmalarıyla sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Davila JC, Rodriguez RJ, Melchert RB, Acosta DJr. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998;38: 63-96.
2. Jemal A , Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
3. Montejo M, Theresa L, Gaffney W, et al. Current challenges in clinical management of endometrial cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009;61:883-889.
4. Temkin SM, Fleming G. Current Treatment of Metastatic Endometrial Cancer. *Cancer Control* 2009;16:38-46.
5. Dimopoulos MP, Papadimitriou CA, Georgoulas V, et al. Paclitaxel and Cisplatin in advanced or recurrent endometrial adenocarcinoma : long term result of phase 2 multicenter study. *Gynecol Oncol* 2000;78:52-57.
6. Fleming GF, Fowler JM, Waggoner SE, et al. Phase 1 trial of escalating doses of paclitaxel combined with fixed doses of cisplatin and doxorubicin in advanced endometrial carcinoma and other gynecologic malignancies: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2001;19:1021-1029.
7. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, et al. Randomized Phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2006;24:36-44.
8. Thigpen T, Brady MF, Homesley HD, et al. Phase III Trial of Doxorubicin With or Without Cisplatin in Advanced Endometrial Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2004; 22 (19:3902-908).
9. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, et al. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clin Proc* 2008;83:97-112.
10. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. Bethesda: National Cancer Institute, 2008.

11. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.
12. Madison T, Schottenfeld D, James SA, et al. Endometrial cancer: Socioeconomic status and racial/ethnic differences in stage at diagnosis, treatment and survival. *Am J Public Health* 2004;94:2104.
13. Farley JH, Nycum LR, Birrer MJ, et al. Age-specific survival of women with endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Gynecol Oncol* 2000;79:86.
14. Smith RA, Eyre C, Cokkinides HJ. Cancer screening in the United States, a review of current guidelines, practices and prospects. *CA cancer J. Clin.* 2007;57(2):90-104.
15. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The Molecular Biology of Endometrial Cancers and Implications for Pathogenesis, Classification, and Target Therapies. *Cancer Control* 2009;16(1):8-13.
16. Hecht J, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol* .2006;24(29):4783-4791.
17. Schottenfeld D. Epidemiology of endometrial neoplasia. *J Cell Biochem* 1995;23:151.
18. Hinkula M, Pukkala E, Kyronen P, et al. Grand multiparity and incidence of endometrial cancer: a population-based study in Finland. *Int J Cancer* 2002;98:912-15.
19. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, et al. Case control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1127-35.
20. Soliman PT, Oh JC, Schmeler KM, et al. Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. *Obstet Gynecol* .2005;105:575.
21. Morimoto LM, Newcomb PA, Hampton JM, et al. Cholecystectomy and endometrial cancer: A marker of long term elevated estrogen exposure? *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1348.
22. Pillay OC, Te Fong LF, Crow JC, et al. The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum Reprod* 2006;21:924.

23. Yavuz H. Endometrium Kanseri, in: Yıldırım M, (ed) Klinik Jinekoloji, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, 1992, 196-210.
24. Wernli KJ, Ray RM, Gao DL, et al. Menstrual and reproductive factors in relation to risk of endometrial cancer in Chinese women. *Cancer Causes Control*. 2006;17:949.
25. Levi F, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C. Dietary factors and the risk of endometrial cancer. *Cancer*. 1993; 71:3575-81.
26. Hemminki K, Granstrom C. Familial clustering of ovarian and endometrial cancers. *Eur J Cancer* 2004;40:90-95.
27. Hemminki K, Bermejo JL, Granstrom C. Endometrial Cancer: Population attribute risks from reproductive, familial and socioeconomic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41:2155.
28. Viswanathan AN, Feskanich D, De VI, et al. Smoking and risk of endometrial cancer: Results from the Nurses Health Study. *Int J Cancer* .2005;114:996.
29. Stanford JL, Brinton LA, Berman ML, et al. Oral contraceptives and endometrial cancer: Do other risk factors modify the association? *Int J Cancer*. 1993;54:243.
30. American College of Obstetricians and Gynecologists: Tamoxifen and uterine cancer. Committee Opinion no. 336, 2006.
31. Shorge JO. Endometrial Cancer, In: Shorge J.O, Halvorson L., Bradshaw K.D. eds., *Williams Gynecology*, The McGraw-Hill Companies, 2008, 180-210.
32. Nyholm NCV, Neilsen AL, Norup P. Endometrial cancer in postmenopausal woman with and without previous estrogen replacement treatment: Comparison of clinical and histopathological characteristics. *Gynecol Oncol* 1993; 49:229-35.
33. Kurman RJ, Norris HJ. Endometrial hyperplasia and related cellular changes. In Kurman RJ (ed): *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 4th ed., New York, Springer-Verlag, 1994, p411.
34. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia: a long term study of 'unterminated' hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985 ; 56:403-12.

35. Mutter GL. The Endometrial Collaborative Group. EIN: Will it bring order to chaos? *Gynecol Oncol* 2000;76:287-290.
36. Silverberg SG, Mutter GL, Kurman RJ, et al. Tumors of the uterine corpus: epithelial tumors and related lesions. In: Tavassoli FA, Stratton MR, (eds). *WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Genital Organs*. IARC Press, 2003, p221-232.
37. Mutter GL. www.endometrium.org. 2005.
38. Hecht JL, Ince TA, Baak JP, et al. Prediction of endometrial carcinoma by subjective endometrial diagnosis. *Mod Pathol* 2005;18:324-330.
39. Iatrakis G, Diakkakis I, Kourounis G, et al. Postmenopausal uterine bleeding. *Clin Exp Obstet and Gynecol* 1997;24:157.
40. Simsir A, Carter W, Elgert P, et al. Reporting endometrial cells in women 40 years and older: Assessing the clinical usefulness of Bethesda 2001. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:571.
41. Feldman S, Berkowitz RS, Ataosteson AN, et al. Cost effectiveness of strategies to evaluate postmenopausal bleeding. *Obstet Gynecol* 1993;81:968.
42. Gordon SJ, Westgate J. The incidence and management of failed pipelle sampling in a general outpatient clinic. *Aust NZ J Obstet Gynecol*. 1999;39:115.
43. Clark TJ, Voit T, Gupta JK, et al. Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review. *JAMA* 2002;288:1610-21.
44. Machtinger R, Korach J, Padoa A, et al. Transvaginal ultrasound and diagnostic hysteroscopy as a predictor of endometrial polyps: risk factors for premalignancy and malignancy. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:325-328.
45. Van den Bosch T, Vandendael A, Van Schoubroeck D, et al. Combining vaginal ultrasonography and office endometrial sampling in the diagnosis of endometrial disease in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1995;85:349-352.

46. DiSaia Bourne TH, Campbell S, Ster CV. Detection of endometrial cancer by transvaginal ultrasonography with color flow imaging and blood flow analysis. *Gynecol Oncol* 1991; 40:253-67.
47. Nagar H, Dobbs S, McClelland HR, et al. The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in detecting cervical involvement in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103:431.
48. Orr J, Chamberlain D. ACOG practise bulletin, clinical management guidelines for obstetrician-gynecologist, Management of Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol* 2005;413:106.
49. Power JL, Hill KA, Shio BJ, et al. Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *J Reprod Med*. 2005;585:50.
50. Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, et al. Tumors of the uterin corpus (epithelial tumors and related lesions). In Tavassoli FA, Devilee P (eds): World Health Organization Classification of Tumours, Lyon , IARC Press, 2003, p221.
51. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage 1 and 2 carcinoma of the endometrium: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1991;40:55.
52. Plentel AA, Freidman EA. Lymphatic system of the female genitalia: The morphologic basis of oncologic diagnosis and therapy, 116. Philadelphia, WB Saunders 1971.
53. International Federation of Obstetrics and Gynecology: Classification and staging of malignant tumors in the female pelvis. *Int J Gynecol Obstet* 1971; 9:172-80.
54. International Federation of Gynecology and Obstetrics: Annual report on the results of treatment of gynecologic cancer. *Int J Gynecol Obstet* 1989; 28: 189-90.
55. John A, Rock D, Thomson. Surgical staging of endometrial carcinoma, surgical staging technique. *TeLinde's Operative Gynecol* 1997; 50:1520.

56. Sanjuan A, Cobo T, Pahisa J, et al. Preoperative and intraoperative assessment of myometrial invasion and histologic grade in endometrial cancer: Role of MR and frozen section. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;385:16.
57. Vorgias G, Hintipas E, Katsoulis M, et al. Intraoperative gross examination of myometrial invasion and cervical infiltration in patients with endometrial cancer: Decision making accuracy. *Gynecol Oncol* 2002;483:85.
58. Goff BA, Rice LW. Assessment of depth of myometrial invasion in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Obstet* 1990; 38:46-8.
59. Orr JW Jr, Holloway RW, Orr PF, Hollman JL. Surgical staging of uterine cancer: an analysis of perioperative morbidity. *Gynecol Oncol* 1991; 42:209-16.
60. Larson DM, Johnson K, Olson KA. Pelvic and paraaortic lymphadenectomy for surgical staging of endometrial cancer: morbidity and mortality. *Obstet Gynecol* 1992; 79:998-1001.
61. Frumovitz M, Bodurka DC, Broaddus RR, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in women with high-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007;104(1):100.
62. Frumovitz M, Solomovitz BM, Singh DK, et al. Frozen section analyses as predictors of lymphatic spread in patients with early-stage uterine cancer. *J Am Coll Surg*. 2004;388:199.
63. Pecorelli S, Benedet JL, Creasman WT, et al. FIGO staging of gynecologic cancer, 1997. FIGO Committee on Gynecologic Oncology, International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynecol Obstet*. 1999;5:64.
64. Benedet JL, Bender H, Jones H, III, et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology, International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynecol Obstet*. 2000;70(2):209.
65. Adapted from Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynecol Obstet* 2009 May;105(2):103-104.

66. Creasman W, Odicino F, Maisonneuve P, et al. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecologic Cancer. 2006; p 5105.
67. International Federation of Gynecology and Obstetrics: Annual report on the results of treatment of gynecologic cancer. *Int J Gynecol Obstet* 1989; 28: 189-90.
68. Ghenzi F, Cromi A, Bergamini V, et al. Laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy versus total laparoscopic hysterectomy for the management of endometrial cancer: A randomized clinical trial. *J Min Inv Gynecol* 2006;13:114.
69. Rubin SC, Hoskins WJ, Saigo PE, Nori D, Mychalczak B, Chapman D, et al. Management of endometrial adenocarcinoma with cervical involvement. *Gynecol Oncol* 1992; 45: 294-295.
70. Pliskow S, Penalver M, Averette HE. Stage III and IV endometrial carcinoma: a review of 41 cases. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 210-5.
71. Rock AJ, Jones WH. Te Linde's Operative Gynecology. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2005.
72. Hoskins JW, Young CR, Carlos AP. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins 2005. Principles And Practise Of Gynecologic Oncology. p: 333-373.
73. Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, et al. High-risk endometrial subgroups: candidates for target-based adjuvant therapy. *Gynecol Oncol*. 2004;95(1):120-126.
74. Amant F, Moerman P, Neven P, et al. Endometrial cancer. *Lancet*. 2005; 266:491-505.
75. Fleming GF. Systemic chemotherapy for uterin carcinoma: metastatic and adjuvant. *J Clin Oncol*. 2007;25:5048.
76. Lu KH. Management of early stage endometrial cancer. *Semin Oncol*. 2009;36:137-44.
77. Hogberg T. Adjuvant chemotherapy in endometrial carcinoma: overview of randomized trials. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008;20:463.

78. Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, et al. Japanese Gynecologic Oncology Group Study. Randomized phase 3 trial of pelvic radiotherapy versus Cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate and high risk endometrial cancer: A Japanese Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol.* 2008;108(1):226-33.
79. Hogberg T, Rosenberg P, Kristensen G, et al. A randomized phase-3 study on adjuvant treatment with radiation +/- chemotherapy in early-stage high-risk endometrial cancer (NSGO-EC-9501/EORCT 55991). *J Clin Oncol.* 2007;20:5503.
80. Hamilton CA, Kapp DS, Chan JK. Clinical aspects of uterine papillary serous carcinoma. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008;20:26.
81. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirito NM, et al. Gynecologic Oncology Group Study. Randomized phase 3 trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2006 ;1:36-44.
82. Van Wijk FH, Van Der Burg ME, Burger CV, et al. Management recurrent endometrioid endometrial adenocarcinoma: an overview. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19:314.
83. Farley J.H. and M.J. Birrer. Biologic directed therapies in gynecologic oncology. *Curr Oncol Rep.* 2003.5(6):p.459-67.
84. See HT et al. Targeted therapy for epithelial ovarian cancer: Current status and future prospects. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13(6):p.701-34.
85. Delmonte A, Sessa C. Molecular targeted agents in endometrial carcinoma: overview of randomised trials. *Clin Oncol (R Coll Radiol.)* 2008;20:554.
86. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. *Pelikan Yayıncılık*, 2009, Ankara, 12. baskı, 1. Cilt, s:432-45.
87. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.

88. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng J Med.* 1971; 285: 1182-6.
89. Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: The role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res.* 2000; 79: 1-38.
90. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995; 13: 765-82.
91. Miller DL, Ortega S, Bashayan O et al. Compensation by fibroblast growth factor1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2260-68.
92. Mentlein R, Held-Feindt J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumor therapy? *Naturewissenschaften* 2003; 90: 385-94.
93. Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 146: 293-309.
94. Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, Pilkinton GJ. Control of human glioma cell growth, migration, and invasion *in vitro* by transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer* 1994; 70:199-203.
95. Breier G, Blum S, Peli J et al. Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2002; 97:142-8.
96. Ozban N. Hücre, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 1998; 37-38.
97. Langdon SP. *Cancer Cell Culture, Methods and Protocols*, Humana Pres, Totowa, New Jersey, 2004.
98. Freshney I. *Culture of Animal Cells*, 3rd edition, John Wiley & Sons Inc., Publication, 1994, New York, USA.
99. Jacoby BW, Pastan HI. *Cell Culture*, Academic Press Ltd., 1979, San Diego, USA, 642.
100. Topal T. Hücre Kültür Teknikleri, Uğur Basımevi, 2004, İstanbul, 45-57.

101. Putnam KP, Bombik DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, *Toxicology In Vitro*, 2002;16: 599-607.
102. Weyerman J, Locmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics* 2005;288:369-376.
103. Gad SC. *In vitro* toxicology, Second Edition, Taylor & Francis, 2000, New York.
104. Collier AC, Pristos CA. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT", *Biochemical Pharmacology* 2003; 66:281-287.
105. Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples, *Toxicology in Vitro* 2001;15:477-488.
106. Huan-Huan C, Li-Li Y, Shang-Bin L. Artesunate reduces chicken choriocallantoic membrane neovascularisation and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on human microvascular dermal endothelial cell. *Cancer Letters*, 2004;211: 163-173.
107. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994;73: 2013-2016.
108. Hickmann JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 1992; 11: 121-139.
109. Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy, *Cancer Letters*, 2009, 281, 128-133.
110. Gjorret JO, Fabian D, Avery B, et al. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. *Mol Reprod. Dev.* 2007;74:961-971.
111. Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation, *Curr. Opin. in Cell Biol.*, 2002;14 : 715-720.
112. Irusta PM, Chen YB, Hardwick JM. Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. *Current Opin. in Cell Biol.*, 2003; 15: 700-705.

113. Misiti F, Clementi ME, Tringali G, Vairano M, et al. Fragment 31-35 of β -amyloid peptide induces neurodegeneration in rat cerebellar granule cells via bax gene expression and caspase-3 activation, A crucial role for the redox state of ethionine-35 residue. *Neurochemistry International*, 2006; 49: 525-532.
114. Hazeleger WC, Dalvoorde M, Beumer R. Fluorescence microscopy of NaCl-stressed, elongated *Salmonella* and *Listeria* cells reveals the presence of septa in filaments. *Laboratory of Food Microbiology*, 2006; 288:55-65.
115. Caruso F, Villa R, Rossi M, Pettinari C, et al. Mitochondria are primary targets in apoptosis induced by the mixed phosphine gold species chlorotriphenylphosphine-1,3 bis(diphenylphosphino) propanegold(I) in melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 2007; 73: 773-781.
116. [http1 ://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf). Ulukaya, Dr. Engin Apoptozis Ders Notları, (2003), Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.
117. Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway. *Lung Cancer*, 2008; 62:8-14.
118. Creasman W, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the corpus uteri. In Pecorelli S, Creasman WT, Pettersson F, et al (eds). *International Federation of Gynecology and Obstetrics Annual Report on the Results of Treatment in Gynecologic Cancer*. *J Epidemiol Biostat* 1998;3:35-62.
119. Takeshima N, Hirai Y, Yano K, et al. Ovarian metastasis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998;70:183-187.
120. Mackillop WJ, Pringle JF. Stage 3 endometrial carcinoma :A review of 90 cases. *Cancer* 1985;56:2519-2523.
121. Marianni A, Webb MJ, Keeney GL, et al. Assessment of prognostic factors in stage 3a endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2002;86:38-44.
122. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, et al. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 1987;60:2035-2041.

123. McMeekin DS, Lashbrook D, Gold M, et al. Analysis of FIGO stage 3c endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 2001;81:273-278.
124. Morrow P, Bundy BN, Kurman RJ, et al. Relation between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage 1 and 2 carcinoma of the endometrium: A Gynecological Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1991;40:55-65.
125. Mariani A, Webb MJ, Galli L, Podratz KC. Potential therapeutic role of para-aortic lymphadenectomy in node-positive endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2000;76:348-356.
126. Hicks ML, Piver MS, Poretz JL, et al. Survival in patients with paraaortic lymph node metastases from endometrial adenocarcinoma clinically limited to the uterus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:607-611.
127. Aoki J, Kase H, Watanabe M, et al. Stage 3 endometrial cancer: Analysis of prognostic factors and failure patterns after adjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2001;83:1-5.
128. Mundt AJ, McBride R, Rotmensch J, et al. Significant pelvic recurrence in high-risk pathologic stage 1-4 endometrial carcinoma patients after adjuvant chemotherapy alone: Implications for adjuvant radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:1145-1153.
129. Thigpen JT, Brady MF, Alvarez RD, et al. Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial cancer: A dose response study by the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 1999;17:1736-1744.
130. Wolfson AH, Sightler SE, Markoe AM, et al. The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol* 1992;45:142-146.
131. Pliskow S, Penalver M, Averette HE. Stage 3 and stage 4 endometrial carcinoma: A review of 41 cases. *Gynecol Oncol* 1990;38:210-215.
132. Vardi JR, Tadros GH, Anselmo MT, Rafla SD. The value of exploratory laparotomy in patients with endometrial carcinoma according to the new

- International Federation of Gynecology and Obstetrics staging. *Obstet Gynecol* 1992;80:204-208.
133. Goff BA, Goodman A, Muntz HG, et al. Surgical stage 4 endometrial carcinoma :A study of 47 cases. *Gynecol Oncol* 1994;52:237-240.
 134. Ayhan A, Taşkıran C, Celik C, et al. The influence of cytoreductive surgery on survival and morbidity in stage 4B endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:448-53.
 135. Bristow RE, Zerbe MJ, Rosenshein NB, et al. Stage 4b endometrial carcinoma :The role of cytoreductive surgery and determinants of survival. *Gynecol Oncol* 2000;78:85-91.
 136. Chi DS, Welshinger M, Venkatraman ES, Barakat RR. The role of surgical cytoreduction in stage 4 endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997;67:56-60.
 137. Greer BE, Hamberger AD. Treatment of intraperitoneal metastatic adenocarcinoma of the endometrium by the whole-abdomen moving strip technique and pelvic boost irradiation. *Gynecol Oncol* 1983;16:365-373.
 138. Martinez A, Podratz K, Schray M, et al. Results of whole abdominopelvic irradiation with nodal boost for patients with endometrial cancer at high risk of failure in peritoneal cavity. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2:431-466.
 139. Thigpen T, Blessing J, Homesley H, et al. Phase 3 trial of doxorubicin +/- Sisplatin in advanced or recurrent endometrial carcinoma :A Gynecologic Oncology Group (GOG) study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993;12:261.
 140. Aapro M, Bolis G, Chevallier B, et al. An EORTC-GCCG randomized phase 2 trial of doxorubicin (dox) versus dox-Sisplatin (CDDP) in endometrial carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994;13:275.
 141. Ball HG, Blessing JA, Lentz SS, et al. A phase 2 trial of paclitaxel in patients with advanced or recurrent adenocarcinoma of the endometrium: A Gynecologic Oncology Group Study . *Gynecol Oncol* 1996;62:278-281.
 142. Fleming GF, Fowler JM, Waggoner SE, et al. Phase 1 trial of escalating doses of paclitaxel combined with fixed doses of Sisplatin and doxorubicin in advanced

- endometrial cancer and other gynecologic malignancies:A Gynecologic Oncology Group Study.J Clin Oncol 2001,19:1021-1029.
143. Whitney CW, Brunetto VL, Zaino RJ,et al.Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus tamoxifen in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study.Gynecologic Oncology Group study.Gynecol Oncol. 2004 Jan;92(1):4-9.
 144. Petterson F, Creaseman WT, Shepherd JH.Annual report on the results of treatment in gynecologic cancer.Stockholm,International Federation of Gynecology and Obstetrics,1995,p22.
 145. Jemal A, Thomas A, Murray T,et al.Cancer Statistics,2002.CA Cancer J Clin 2002;52:23-47.
 146. Cirisano FD Jr, Robboy SJ, Dodge RK,et al.The outcome of stage 1-2 clinically and surgically staged papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared with endometrioid carcinoma.Gynecol Oncol 2000;77:55-65.
 147. Gallion HH, Brunetto VK, Lentz SS,et al.Standard timed doxorubisin plus Sisplatin versus circadian-timed doxorubisin plus Sisplatin in patient with FIGO stage 3/4 or recurrent endometrial carcinoma.A gynecologic Oncology Group Study.Society of Gynecologic Oncologists 2002;84:487.
 148. Abramovich D, Markman M, Kennedy A ,et al.Serum CA-125 as a marker of disease activity in uterine papillary serous carcinoma.J Cancer Res Clin Oncol 1999;125:697-698.
 149. Cherchi PL, Dessole S, Ruiu GA,et al.The value of serum CA-125 and association CA-125/CA19-9 in endometrial carcinoma.Eur J Gynecol Oncol 1999;20:315-317.
 150. Ingersoll FM.Vaginal recurrence of the corpus: Management and prevention.Am J Surg 1971;121:473-477.
 151. Adlers JG, Abeler V, Kolstad P.Recurrent adenocarcinoma of the endometrium:A clinical and histopathological study of 379 patients.Gynecol Oncol 1984;17:85.

152. Greven KM. Interstitial radiation for recurrent cervix and endometrial cancer in the suburethral region. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 1998;48:831-834.
153. Roeske JC, Lujan A, Rotmensch J, et al. Intensity-modulated whole pelvic radiation therapy in patient with gynecologic malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1613-1621.
154. Barakat RR, Goldman NA, Patel DA, et al. Pelvic exenteration for recurrent endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1999;75:99-103.
155. Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD. Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: Effect on survival in surgically staged patients. *Gynecol Oncol* 1993;50:281-286.
156. Kelley R, Baker W. Progestational agents in treatment of carcinoma of the endometrium. *N Engl J Med* 1961;264:216-222.
157. Sall S, DiSaia P, Morrow Cp, et al. A comparison of medroxy-progesterone serum concentrations by the oral and intramuscular route in patients with persistent or recurrent endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:647-650.
158. Kauppila A. Progestin therapy of endometrial, breast and ovary carcinoma: A review of clinical observations. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984;63:441-450.
159. Thigpen T, Brady MF, Homesley HD, et al. Tamoxifen in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: A GOG study. *J Clin Oncol* 2001;19:364-367.
160. McMeekin DS, Gorden A, Fowler J, et al. A phase 2 trial of arzexifene, a SERM, in patients with advanced or recurrent endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003;90:64-89.
161. Pandya KJ, Yeap BY, Weiner LM, et al. Megesterol and tamoxifen in patients with advanced endometrial cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Study (E4882). *Am J Clin Oncol* 2001;24:43-46.

162. Fiorica J, Brunetto V, Hanjani P, et al. A phase 2 study (GOG 153) of advanced or recurrent endometrial carcinoma treated with alternating courses of MGA and tamoxifen citrate. *Proc ASCO* 2000;19:379a.
163. Sica G, Schinzari G, Angelucci C, et al. Direct effects of GnRH agonists in human hormone sensitive endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;176:121-128.
164. Asbury RF, Bruncho VL, Lee RB, et al. Goserelin acetate as treatment of recurrent endometrial carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2002;25:557-560.
165. Watanabe K, Sasona H, Harada N, et al. Aromatase in human endometrial carcinoma and hyperplasia: Immunohistochemical, in situ hybridization, and biochemical studies. *Am J Pathol* 1995;146:491-500.
166. Rose PG, Brunetto VL, VanLe L, et al. A phase 2 trial of anastrozole in advanced recurrent or persistent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2000;78:212-216.
167. Sindu K, Fyles A, Eisenhauer E, et al. Phase 2 study of the aromatase inhibitor letrozole in endometrial carcinoma-NCIC CTG IND 126. *Proc ASCO* 2001;20:192b.
168. Covens A, Brunetto VL, Markman M, et al. A phase 2 trial of danazol in advanced recurrent or persistent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2003;89:470-474.
169. Lissoni A, Zanetta G, Losa G, et al. Phase 2 study of paclitaxel on salvage treatment in advanced endometrial cancer. *Ann Oncol* 1996;7:861-863.
170. Woo HL, Swenerton KD, Hoskins PJ. Taxol is active in platinum-resistant endometrial adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 1996;19:290-291.
171. Burke TW, Munkarah A, Kavanagh JJ, et al. Treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma with single agent carboplatin. *Gynecol Oncol* 1993;51:397-400.

172. Thigpen JT, Blessing JA, Homesley H, et al. Phase 2 trial of Cisplatin as first line chemotherapy in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1989;33:68-70.
173. Thigpen JT, Buschbaum HJ, Mangan C, et al. Phase 2 trial of adriamycin in treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer Treat Rep* 1979;63:21-27.
174. Thigpen JT, Blessing JA, DiSaia PJ, et al. A randomized comparison of doxorubicin alone versus doxorubicin plus cyclophosphamide in the management of advanced or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1994;12:1408-1414.
175. Fleming GF, Brunetto VL, Mundt AJ, et al. Randomized trial of doxorubicin (DOX) plus Cisplatin (CIS) versus DOX plus CIS plus paclitaxel (TAX) in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group (GOG) study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:202.
176. Shrivastava A, Singh NK. Synthesis, Characterization and Antitumor Studies of Transition Metal Complexes of o-Hydroxydithiobenzoate. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002; 10:2693–2704.
177. Hickmann JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 1992; 11: 121-139.
178. Shim GS, Manandhar S, Shin DH, et al. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009; 47(11): 1619-163.
179. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control points of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 2009;10: 369-377.
180. Checinska A, Hoogeland BSJ, Rodriguez JA, et al. Role of XIAP in inhibiting Cisplatin-induced caspase activation in non-small cell lung cancer cells: A small molecule Smac mimic sensitizes for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing caspase-3 activation. *Experimental Cell Research*, 2007;313: 1215-1224.

181. Smith JA, Ngo H, Martin MC, et al. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 2005;98: 141-145.
182. Gagnon V, Themsche VC, Turner S, et al. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008;13:259-271.
183. Reynolds CP, Maurer BJ. Evaluating Response to Antineoplastic Drug Combinations in Tissue Culture Models. *Methods in Molecular Medicine*, 2005;110:pp.173-183.
184. Fritzer-Szekeres M, Novotny L, Romanova D, et al. Enhanced effects of adriamycin by combination with a new ribonucleotide reductase inhibitor, trimidox, in murine leukemia. *Life Sciences*, 1998;108:545-552.
185. Frankfurt OS, Krishan A. Apoptosis enzyme-linked immunosorbent assay distinguishes anticancer drugs from toxic chemicals and predicts drug synergism. *Chemico-Biological Interactions* 2003;145:89-99.
186. Kanzawa F, Akiyama Y, Saijo N, et al. *In vitro* effects of combinations of cis-amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer* 2003;40: 325-332.
187. Hoekstra AV, Ward EC, Hardt JL, et al. Chemosensitization of endometrial cancer cells through AKT inhibition involves FOXO1. *Gynecol Oncol* 2008;108: 609-618.
188. Sharma RK, Chalam VK. *In vitro* evaluation of bevacizumab toxicity on a retinal ganglion cell line. *Acta Ophthalmologica* 2009;87:618-622.
189. Carnerio A, Falcao M, Pirraco A, et al. Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Experimental Eye Research* 2009;88(3):522-527.
190. Spitzer MS, Sierra A, Yoeruek E, et al. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib on different ocular cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245:1837-1842.

191. Costa R, Angela C, Rocha A, et al. Bevacizumab and ranibizumab on microvascular endothelial cells: A comparative study. *J Cell Biochemistry*. 2009;108: 1410-1417.
192. Shiyin C, Johnathan M, Lancaster G, et al. Combination topotecan and bevacizumab causes growth inhibition of ovarian cancer cells that express VEGF. *Proc. Amer. Assoc. Cancer* 2006;47.
193. Argov M, Kashi R, Peer D, et al. Treatment of resistant human colon cancer xenografts by a fluoxetine-doxorubicin combination enhances therapeutic responses comparable to an aggressive bevacizumab regimen. *Cancer Letters*. 2009;274(1):118-125.
194. Wan X, Li J, Xie X, Lu W. PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer* 2007,17,808-812.
195. Longxiang W, Tongsheng C, Junle Q, et al. Quantitative analysis of caspase-3 activation by fitting fluorescence emission spectra in living cells. *Micron* 2009;40: 811–820.
196. Bae S, Lee Y, Kim M, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of CIZAR (zinc citrate compound) on human epithelial ovarian cancer cell line, OVCAR-3. *Gynecologic Oncology*, 2006;103: 127-136.
197. L. Hu, Hofman, Zaloudek N, et al. VEGF immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *Am. J. Pathol.* 2002;161:1917-1924.
198. Hung H, Ching C, Teo M, et al. Bevacizumab and rapamycin inhibit tumor growth in peritoneal model of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2007 6; 2959-2965.
199. Huynh Hung. Bevacizumab plus 5-fluorouracil induce growth suppression in the CWR-22 and CWR-22R prostate cancer xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(8); 2149-2157.
200. Kamat A, Merritt WM, Coffey D, et al. Clinical and biological significance of VEGF in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 7487-7495.

201. Paola A, Gehrig B, Victoria L, et al. Promising novel therapies for the treatment of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, In Press, Corrected Proof, Available online 10 November 2009. www.sciencedirect.com.
202. Argyriou A, Haralabos P, Kalofonos N. Recent Advances Relating to the Clinical Application of Naked Monoclonal Antibodies in Solid Tumors. *Mol. Med.* 2009;15(5-6):183-191.
203. Frederick PJ, Straughn M, Alvarez R, et al. Preclinical studies and clinical utilization of monoclonal antibodies in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2009;113:384-390.
204. Burger RA, Sill MW, Monk BJ, et al. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: A GOG Study. *J. Clin. Oncol.* 2007;25:5165-5171.
205. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007;25:5180-5186.
206. Bradley JM, Lyndsay J, Willmot, et al. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*, Article in Press. 2009. www.sciencedirect.com.
207. Wright JD, Viviano D, Powell A, et al. Bevacizumab combination therapy in heavily pretreated, recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2006;103: 489-493.
208. Monk BJ, Sill MW, Burger RA, et al. Phase II trial of bevacizumab in treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: A GOG Study. *J Clin Oncol* 2009;27:1069-1074.
209. Aghajanian C, Sill MW, Darcy KM, et al. A phase II evaluation of bevacizumab in the treatment of recurrent or persistent endometrial cancer. A Gynecology Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2009;27:5531.