

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Yavuz ANACAK

HORMONA DİRENÇLİ PROSTAT KANSERİ HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE (DU-145/PC-3) RADYOTERAPİYLE BİRLİKTE
UYGULANAN ZOLEDRONİK ASİT VE İBANDRONATIN
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ulviye NABİZADE

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Deniz YALMAN

İZMİR

2014

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, Bilimsel Araştırma Projesi olarak hazırlanması ve yazım aşamasında iş temposunun yoğunluğuna rağmen büyük bir özveriyle bana yardım eden tez danışmanım Prof. Dr. Deniz YALMAN'a,

Tezime konu bulunması ve çalışmanın oluşturulması sırasında benden yardımlarını ve bilgi paylaşımını esirgemeyen Doç. Dr. Burçak KARACA ve Doç. Dr. Serra ARUN KAMER'e,

Tıbbi biyoloji yüksek lisans öğrencileri Özge ÖZER ve Emir BOZKURT'a,

Fizik planlama sırasında yardımlarını esirgemeyen Fiz.Yüksek Mühendisi Hakan EREN'e, yoğun iş tempolarının arasında hücre hatlarını ışınlayan lineer hızlandırıcı teknisyenlerine,

Asistanlık hayatım boyunca bana destek olan tüm hocalarıma, birlikte çalıştığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ulviye Nabizade

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Normal kemiğin fizyolojisi-yeniden yapılanması (remodeling)	5
2.2. Prostat kanserinde kemik metastazlarının patofizyolojisi.....	6
2.3. Kemik metastazlarının klinik tablosu.....	9
2.4. Kemik metastazlarının tedavisinde radyoterapinin rolü ve etki mekanizması..	11
2.5. Kemik metastazlarının tedavisinde bifosfonatların rolü	14
2.5.1. Zoledronik asit	18
2.5.2. İbandronat	19
2.5.3. Zoledronik asit ve ibandronatın yan etki profilleri	19
2.6. İyonizan radyasyonun etkileri	21
2.6.1. Biyolojik etkiler	21
2.6.2. Direkt ve indirekt etkiler	22
2.7. İn vivo ve in vitro sağkalım eğrileri	23
2.8. Sitotoksosite ve değerlendirilmesi	25
2.8.1. IC ₅₀ (inhibitör konsantrasyon) oranı.....	26
2.8.2. MTT testi.....	26
2.8.3. XTT testi	27
2.9. Hormona dirençli prostat kanseri hücre hatları (PC3 ve DU-145)	28

3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Tümör hücre hatları ve kültür ortamı	31
3.2. Hücre hatlarının pasajlanması	32
3.3. Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	32
3.4. Deney planı	33
3.5. PC-3 ve DU-145 hücrelerinin sayımı, ekimi ve canlılık testinin uygulanması.	35
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	69
7. ÖZET	71
8. KAYNAKLAR.....	73

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir. Erken tanı çabalarına rağmen olguların %10-20'sinde tanı anında kemik metastazı görülürken ileri evre olguların %65-75'inde kemik metastazı gelişmektedir (1, 2). Kemik metastazları iskelet sistemi bütünlüğünün bozulması, ağrı, hareket kısıtlılığı, hiperkalsemi, patolojik fraktür, medulla spinalis veya sinir kökü basısı gibi morbiditelere yol açması nedeniyle onkolojik aciller içinde yer alır. Metastaza bağlı ağrı, vertebral çökme ya da deformasyon, patolojik kırık ve medulla spinalis basısı oranları sırasıyla %80, %18, %9 ve %6 olarak bildirilmektedir (3). Metastazları olan hastaların %49'unda iki yıl içinde iskelet ile ilişkili olayların ortaya çıkabileceği gözlemlenmiştir (4). Prostat kanserinin kemik metastazları sıklıkla osteoblastik lezyonlar ile karakterize olmasına rağmen, bu lezyonlar osteoklastların aracılık ettiği osteoliziste dramatik artış ile birliktedir (5)

Kemik metastazlarında tedavinin amacı hastanın yaşam kalitesini yükseltmek, yaşam süresini uzatmak, ağrı palyasyonu sağlamak, fraktür olasılığını azaltmak, mobilite ve fonksiyonları arttırmaktır. Kemik sağlığını koruyup morbiditeyi azaltmak için osteoklast-osteoblast yolağı hedef alınmalıdır. Osteoblastlar kemik formasyonunu sağlayan, kemik matriksi sentezleyen ve mineralizasyonu düzenleyen hücreler olup mezansimal kaynaklı osteoprogenitör hücrelerden köken aldıkları düşünülmektedir. Osteoblastlar, osteoklastlar tarafından daha önceden rezorbe edilen kemik yüzeylerinde yeni kemik dokusu oluştururlar. Osteoklastlar ise kemik rezorbsiyonundan sorumlu, morfolojik olarak oldukça büyük ve hareket edebilen hücrelerdir. Monosit-makrofaj sistemi ile hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar (6). Tedavide multidisipliner yaklaşımla radyoterapi, bifosfonatlar, sistemik ajanlar, radyonüklidler, analjezikler, gerektiğinde cerrahi gibi yöntemler uygulanmaktadır. Bu tedavi yöntemleri içinde en sık uygulananlar radyoterapi ve bifosfonatlardır.

Kemik korteksinde metastazın yol açtığı aşınma %50 düzeyine ulaşmadan radyoterapi uygulanması patolojik kırıkları önleyebilir, %80-90 hastada kemik ağrıları önemli derecede azalır, %50-60 hastada tam ağrı palyasyonu sağlanır (7, 8). Radyoterapinin tümör kitlesini küçülterek ve kimyasal ağrı medyatörlerinin salınımını inhibe ederek ağrı palyasyonu sağladığı düşünülmektedir (9). Radyoterapi uygulanan bölgede canlı tümör hücrelerinde belirgin azalma ile birlikte tümör küçülmekte, ayrıca kemikten tümör hücrelerinin kaybolması osteoblastik tamire fırsat sağlayarak hasarlı kemiğin yapısının yeniden düzenlenmesine olanak tanımaktadır. Radyoterapi osteoklast inhibisyonu yaparak da ağrıda azalma sağlar (10).

Kemik metastazlarında diğer bir önemli tedavi bifosfonatlardır. Bifosfonat uygulanması kırık oranını, palyatif radyoterapi gereksinimini ve hiperkalsemiyi azaltır (11). Kemik, bifosfonatları tutan tek dokudur. Bu seçici kemik tutulumu fizikokimyasal ve hücrel etkiden kaynaklanmaktadır. Bifosfonatlar kemiğin yeniden yapımı sırasında, kemik dokusundaki osteoklastik göç sonucu kalsiyum-fosfor kristallerinin açığa çıktığı aşınmış rezorbsiyon kavitelerine yapışırlar. Bu etkiler aminobifosfonatlar ve nonaminobifosfonatlar için benzerdir, ancak hücrel etkileri farklıdır. Nitrojen içeren bifosfonatların tümör hücrelerinin sağkalımını, proliferasyonunu, adhezyonunu, migrasyon ve invazyonunu azalttığı in vitro olarak gösterilmiştir (12).

Zoledronik asit ve ibandronat nitrojen içeren 3. kuşak en etkin bifosfonatlardır. Preklinik tümör modellerinde zoledronik asidin tümörün uyardığı osteolizisi, tümör hücresi proliferasyonunu ve canlılığını, tümör hücrelerinin metastatik davranışını baskıladığı, apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (13-15). Tüm bu yararlarının yanında zoledronik asitin en önemli yan etkisi nadir görülmekle birlikte renal toksisitedir. İntravenöz yol ile uygulanıyor olması, renal fonksiyon üzerine olan etkileri nedeniyle kreatinin klirensi <30 ml/dk olan hastalarda uygulanamaması, kreatinin klirensi <60 ml/dk olan hastalarda dikkatli kullanım zorunluluğu, platin içeren kemoterapi rejimleri ve nefrotoksik antibiyotikler ile kullanımının

sınırlı olması, uzun dönem kullanımda mandibulada osteonekroz gelişimi gibi yan etkiler farklı bifosfonat seçeneklerinin aranmasına neden olmuştur (16). Prostat kanserli hastalar genellikle 65 yaşın üzerindedir ve sıklıkla daha önce var olan renal hasar söz konusudur. Bu hastalarda diğer bir seçenek ibandronat olabilir. İbandronatın intravenöz veya peroral kullanımı ile uzun dönemde anlamlı serum kreatinin değişikliği gelişmediği bildirilmiştir, hafif-orta şiddette böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarı gerekli olmayıp, şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalarda da kullanılabilir. Ayrıca nefrotoksik ilaçlar kullanan hastalarda sınırlama yapılması önerilmemektedir (17).

İbandronatla ilgili verilerin çoğu kemik metastazlı meme kanserli hastalarla yapılan randomize çalışmalardan elde edilmiştir. İbandronatın bu hastalarda kemik metastazlarında iskeletle ilgili olayların insidansını azalttığı, ağrı skorunu düşürdüğü bildirilmiştir (18-23). İbandronatın in vitro ve meme kanserinin fare modellerinde yapılan in vivo çalışmalarında meme kanseri hücrelerinin büyümesini durdurduğu, apoptozu indüklediği, radyasyonla sinerjistik etki yaparak tümörü küçülttüğü gösterilmiştir (24-27).

Kemik metastazlı prostat kanserli hastalarda ibandronatın etkinliğiyle ilgili geniş hasta serileri içeren randomize çalışma bulunmaması, verilerin sınırlı olması nedeniyle prostat kanserinde rutin kullanıma girmemiş olup sadece zoledronik asid lisanslı üründür. İbandronatın prostat kanserinde etkinliğiyle ilgili in vitro veriler ve prelinik çalışmalar da sınırlıdır.

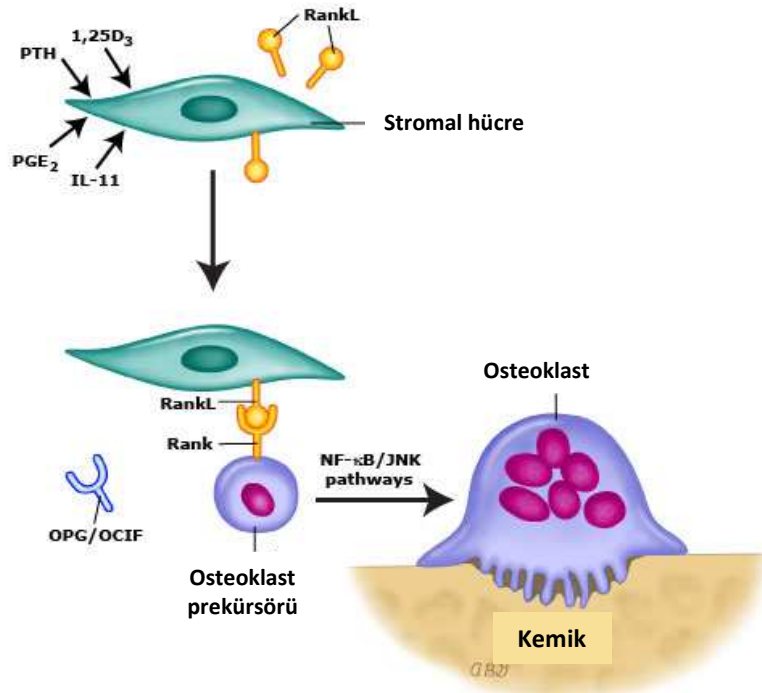
Klinik kullanımda bifosfonatlar çoğu zaman radyoterapiyle kombine uygulanmaktadır. Prospektif çalışmalarda radyoterapi ve bifosfonatların kombine kullanımı ile ağrı palyasyonu sağlandığı ve kabul edilebilir toksisite riski ile hasarlı kemiğin reossifikasyonunun arttığı gösterilmiştir (8, 28, 29). Zoledronik asitle radyoterapinin birlikteliği konusunda çok sayıda çalışma varken, ibandronatın radyoterapiyle kullanımı konusundaki veriler az sayıda hasta içeren çalışmalara dayanmaktadır. Zoledronik asitle yapılan çalışmalarda antitümöral etkinliğe bağlı sağkalım avantajı da gösterilmiş olup bu konuda ibandronatla ilgili yeterli veri yoktur. Bu

konudaki literatüre katkı amacıyla yapılan bu çalışmada hormona dirençli iki farklı insan prostat kanseri hücre kültüründe (DU-145 ve PC-3) zoledronik asid, ibandronat ve radyoterapinin etkinlikleri hem tek başlarına hem de birlikte kullanımlarında belirlenip ve birbiriyle karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal kemiğin fizyolojisi-yeniden yapılanması (remodeling)

Normal kemik homeostazı osteoblast tarafından yapım ve osteoklast tarafından yıkım dengesinin ürünüdür. Osteoklastlar monosit makrofaj prekürsör hücre kökenli olup, aktive olduklarında kemikte rezorpsiyona neden olmakta ve apoptozise uğramaktadırlar (30). Osteoklastların oluşumu ve aktivasyonu lokal salınımlı sitokinler ve sistemik hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Makrofaj koloni stimülasyon faktörü (M-CSF, CSF-1) ve “Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand” (RANKL) kemik iliğindeki stromal hücrelerden ve osteoblastlardan üretilmekte olup, osteoklast diferansiasyonu ve aktivasyonunu uyarır (31, 32). Paratiroid hormonu, 1,25-dihidroksi vitamin D3 ve prostaglandinler gibi sistemik faktörler kemik iliği stromal hücrelerinde ve osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu artırmakla indirekt olarak osteoklast oluşumunu tetiklemektedirler (Şekil 1).



Şekil 1. Osteoklastların oluşumu ve aktivasyonu.

RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B) RANK ligand (RANKL) tarafından aktive edilmektedir. RANKL prekürsör hücrelerde RANK reseptörlerine bağlanarak osteoklastların oluşumunu indüklemektedir. RANK “Tumor necrosis factor” (TNF) reseptör ailesinin üyesidir ve osteoklast diferansiyasyonu, aktivasyonu, yaşamı için esas sinyaldir (33). Osteoklastların kemik metastazlarının en sık semptomu olan ağrının oluşumuna büyük katkısı vardır. Osteoprotegerin (OPG) osteoblastlar ve diğer stromal dokular tarafından üretilen, TNF reseptör ailesinden bir proteindir, RANKL için tuzak reseptördür, RANK/RANKL etkileşmesini önleyerek osteoklast aktivitesini azaltır ve kemiği rezorpsiyondan korur. RANKL/OPG oranı osteoklast aktivitesini düzenlemektedir (32, 34, 35). Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden köken alan kemik yapım hücreleridir. Osteoklastlardan farklı olarak osteoblastların oluşum ve diferansiyasyonunda rolü olan faktörler net anlaşılmamıştır. Osteoblast diferansiyasyonu ile ilişkili olan transkripsiyon faktörü “Core binding factor alpha 1” (Cbfa 1) Runx-2 olarak da bilinmektedir. Cbfa1 osteoblast diferansiyasyonu ile ilişkili olan birçok genin ekspresyonundan sorumludur (36). “Platelet derived growth factor” (PDGF), “fibroblast growth factor” (FGF) ve “transforming growth factor beta” (TGF- β) gibi birçok ekstrasellüler faktörler osteoblastların büyüme ve farklılaşmasını artırmaktadır (37, 38).

2.2 Prostat kanserinde kemik metastazlarının patofizyolojisi

İleri evre prostat kanserinde metastazların en sık görüldüğü yer kemikler olup özellikle kırmızı kemik iliğinden zengin aksiyel iskelet, pelvis ve uzun kemikler etkilenir. Kemiğe metastaz hematogen yolla olur. Kemik metastazlarının biyolojisi karmaşıktır. Prostat kanserinin kemiğe olan afinitesine katkıda bulunan birçok faktör vardır. Genel olarak kemik iliğindeki kan akımı, kanser hücrelerinden adheziv moleküllerin salınımıyla kemik matriksi ve stromaya bağlanmanın kolaylaşması, kemik mikroçevresinin büyüme faktörlerinden zengin olması, osteoblastlar, osteoklastlar, fibroblastlar, kemik mikroçevresindeki diğer hücreler ve prostat kanseri hücreleri arasındaki sinyal yollarını aktive eden sitokinlerin, proteazların, büyüme

faktörlerinin salınmasıyla prostat kanseri hücrelerinin büyümesi gibi faktörlerin varlığı öne sürülmektedir (32). Prostat kanseri hücreleriyle kemiğin stromal hücreleri olan osteoblastlar, osteoklastlar ve fibroblastlar arasında simbiyotik etkileşim vardır. Kemik iliğine yüksek volümde kan akımının yanı sıra intratorasik ve intraabdominal basınç artışlarında kemiklere doğrudan akım prostat kanseri hücrelerinin adezyon olasılığını artırmaktadır. Prostat kanserinde kemik metastazları iki basamakta oluşur:

I. Basamak: Kemiğe metastaz yapma

Metastaz yapmış kanser hücreleri kemik iliği endoteli tarafından yakalanır ve kapiller yatakta immobilize edilir. Tümör hücreleri tümör hücresine özgül endotel hücrelerinin açıklık bağlantılarından göç ederler. Kemik dokuya yerleşebilmek için prostat kanseri hücreleri kemiğe afinitesi olan adezyon molekülleri salgılamaktadır. “Bone morphogenetic protein” (BMP) 4 gibi kemik kaynaklı faktörler prostat kanseri hücrelerinin kemik iliği endoteline adezyonunu artırmaktadır (39). Başka bir teoriye göre kemik iliği barındırdığı büyüme faktörlerinin zenginliği yönünden tümör hücreleri için metastaz açısından iyi bir ortam yaratır. Ayrıca kemik iliği hücreleri tümör hücreleri için bazı kemotaktik maddeler salgılar ve tümör hücrelerinin rahatça yerleşerek çoğalmasını sağlayan bir ortam oluşturur (tohum ve toprak teorisi) (40). Hayvan modellerinde “stromal cell derived factor 1” (SDF-1) gibi kemik matriksi faktörlerinin prostat kanseri hücrelerinin ekstrasvazasyonunu artırdığı gösterilmiştir (41). Adherans ve ekstrasvazasyona insan prostat hücre hattında yüksek seviyede ekprese olan trombin reseptörü gibi bilinen “protease-activated receptor 1” (PAR1) de yardımcı olabilir. PAR1 aktivasyonu metastatik hücrelerin ekstrasellüler matriks proteinine adezyonunu, hücrelerin hareketliliğini ve matriks metalloproteinazların (MMPs) sekresyonunu artırmaktadır. MMP’ların membranların tabanını bozarak metastatik yayılıma olanak sağlamaları çok önemlidir (42). Osteoliz sırasında salınan büyüme faktörleri sadece osteoblastların değil, kemiğe metastaz yapmış hücrelerin de büyümesini stimüle etmektedir. Kemik rezorpsiyonu esnasında yüksek yoğunlukta bulunan

TGF- β tümör hücreleri üzerindeki $\alpha 2\beta 1$ integrinin artarak düzenlenmesini uyararak kemik matriksindeki tip 1 kollajene bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (43).

II. Basamak: Kemikte metastatik lezyonlarının oluşumu

Prostat kanseri hücreleri ve kemik homeostazını koruyan hücreler kompleks etkileşim ile kemik metabolizmasını bozarak, tümörün büyümesine neden olurlar. Prostat kanseri hücreleri pro-osteojenik etki göstermektedir. Metastatik prostat kanseri hücrelerinin salgıladığı TGF- β ve “endothelin-1” (ET-1) kemik metabolizmasına lokal etki etmektedir (44). Prostat kanseri hücre hattında salınan “bone morphogenetic protein” (BMP), paratiroid-ilişkili hormon, prostat spesifik antijen (PSA), “insulin-like growth factor” (IGF) gibi mitojenik faktörler aracılığı ile osteoblastları uyarır (45). BMP-6 ekspresyonu diğer tümörlerin kemik metastazlarına göre primer prostat kanseri ve kemik metastazlarında yüksek seyretmektedir. Böylece BMP-6’nın prostat hücrelerinin kemiğe metastaz eğilimini artırdığı ve osteoblastik fenotipte kemik metastazları oluşturduğu iddia edilmektedir (46). BMP-6 ve diğer büyüme faktörlerinin PSA ve prostatın salgıladığı kallikrein-2 ile etkileşimi lokal kemik homeostazını değiştirerek osteoblastik karakterde metastaz oluşumuna neden olmaktadır (47). PSA’nın kendisinin de kemik metastazlarının osteoblastik fenotipde olması ile direkt ilişkisinin olduğu söylenmektedir (48). PSA kemik rezorpsiyonunu stimüle eden paratiroid hormon-ilişkili proteine bağlanarak kemik rezorpsiyonunu azaltmaktadır. Ayrıca PSA IGF-binding proteinleri hidrolize ederek, IGF-1’in osteoblast proliferasyonunu stimüle etmesine olanak sağlamaktadır.

Prostat kanseri hücrelerinden sentezlenen “urokinase-type plasminogen activator” (u-PA) osteoblast mitogenezini direkt veya indirekt olarak TGF- β aktivasyonu ile stimüle etmektedir. Hayvan modeli çalışmalarında u-PA’nın kemik metastazı gelişiminde önemli olduğu kanıtlanmıştır (49).

Prostat kanseri hücreleri tarafından salgılanan “endothelin-1” (ET-1) osteoblast stimülasyonundan sorumlu olan ana faktördür. Randomize plasebo-kontrollü bir çalışmada

endotelin antagonistinin hormona dirençli prostat kanserinde kemik metabolizma belirteçlerini baskıladığı gösterilmiş ve ET-1 antagonistlerinin yeni tedavi hedefi olabileceği sonucuna varılmıştır (44).

Prostat kanserinin kemik metastazları sıklıkla osteoblastik lezyonlar ile karakterize olmasına rağmen, bu lezyonlar osteoklastların aracılık ettiği osteoliziste artış ile birlikte. Radyografik olarak hiperdens görüntüye rağmen fraktür riskinin yüksekliği prostat kanserinin osteoblastik metastazlarının yapı olarak zayıf olmasıyla ilişkilidir (50). Prostat kanseri hücrelerinin osteoklastları uyarması ve osteolizisde artış histolojik ve biyokimyasal olarak kanıtlanmıştır. IL-6 osteoklastları stimüle eden sitokin olarak bilinmektedir ve metastatik prostat kanserli hastaların kanında yüksek düzeyde bulunmuştur (51). Prostat kanserinin osteoblastik kemik metastazlarında N-telopeptid ve kemik spesifik alkalen fosfataz gibi kemik rezorpsiyon belirteçlerinde artış görülmüştür (52).

Osteoblastların salgıladığı EGF, TGF- α ve PDGF parakrin etki oluşturarak osteoklastik aktiviteyi arttırıp kemik dokuda yıkıma yol açarlar. Tümörsüz alanlarda artan kemik yıkımı metastatik odaklarda artan kalsiyum kullanımının dengelenmesi içindir. Tüm bunların sonucunda barsaklardan kalsiyum emilimi de artacaktır. Kemik ağrılarının ve diğer kemik metastazlarına bağlı oluşan komplikasyonların etyolojisinde kemik yıkımı en önemli faktördür,

2.3. Kemik metastazlarının klinik tablosu

Prostat kanserinde osteoblastik lezyonlar patolojik yeni kemik oluşumu ile ilişkilidir, fakat bu yeni kemik oluşumu kemiğin dayanıklılığının artması anlamına gelmez. Tam tersi osteoblastik kemik metastazları lokal olarak osteolizisi tetiklemekle osteoblastların aşırı artmış aktivitesini dengede tutmasına neden olmaktadır. Böylece metastatik kemik lezyonları iskelet sistemi bütünlüğünün bozulmasına, şiddetli kemik ağrularına, hiperkalsemi, patolojik kemik

kırıklarının oluşmasına, medulla spinalis ve sinir kökü basısı gibi çeşitli morbiditelere yol açmaktadır (3).

Ağrı: En sık görülen semptomdur. Kemik metastazlı hastaların %60-80'inde ağrı görülmekte ve hayat kalitesini olumsuz olarak etkilemektedir. Kemik metastazlarında ağrının oluşma nedenleri kemiklerdeki yapısal hasar, mekanik stres, periostal gerilme, mikrofraktürler, komşu sinir veya dokulara bası, prostoglandin ve sitokinler (interleukin ve TNF) gibi kimyasal mediyatörlerin salgılanması olabilir. Bu sitokinlerin direkt olarak nosiseptörleri stimüle ettiği belirtilmektedir (53).

Patolojik fraktür: En önemli yan etkidir. Vertebra korpuslarındaki çökmeye daha sık rastlanmakta, sinir sıkışmasına bağlı semptomlar görülmektedir. Radyolojik yöntemlerle uzun kemikler değerlendirilip profilaktik cerrahi ve/veya radyoterapi uygulanabilir. Yaygın vertebra metastazlarında profilaktik radyoterapi ile gelecekte oluşacak medulla spinalis basıları önlenabilir.

Medulla spinalis basısı: Vertebral metastazlar medulla spinalis ve sinir kökü basısına, kompresyon fraktürlerine ve “cauda equina” sendromuna neden olabilir. Medulla spinalis basısı, medulla spinalis ve “cauda equina”yı çevreleyen tekal sakın spinal epidural metastazlar tarafından tamamen indentasyonu, kayması veya sarılması gibi tanımlanmakta ve şiddetli nörolojik hasarlara yol açmaktadır (54). Hastaların %37'sinde medulla spinalis basısı prostat kanserinin ilk semptomu olabilir ve kötü prognostik faktördür. Medulla spinalis basısı onkolojik aciller arasında yer almaktadır, hızlı bir şekilde değerlendirilip tedavisinin düzenlenmesi sonuçları iyileştirip genel sağkalımı arttırmaktadır (55).

Hiperkalsemi ve hipokalsemi: Prostat kanserinin kemik metastazları daha çok osteoblastik olduğu için, hiperkalsemi nadir görülmektedir. Hiperkalsemi poliüri, polidipsi, konstipasyon, anoreksi, depresyon, yorgunluk, letarji, karın ağrısı ile birlikte olabilir. Genel

durumunda bozulma ve dehidratasyon görülen olgularda sık kalsiyum düzeyi kontrolü yapılmalıdır (56).

Hipokalsemi prostat kanserinin kemik metastazlarında daha sık görülür, bifosfonatlar ve denosumab kullanımı ile ilişkili olabilir, fakat asemptomatik seyretmektedir. Prostat kanserinde sıklıkla kullanılan androjen deprivasyon tedavisi (ADT) osteoporozu ve buna bağlı fraktür riskini artırmaktadır. ADT'nin tedavi edici etkisi olan derin hipogonadizm kemik mineral dansitesinde azalmaya ve osteoporozuza neden olmaktadır. ADT süresi uzadıkça osteoporoz oranı artar (57). Kemik metastazları sonucu oluşmuş patolojik fraktürü osteoporotik fraktürlerden ayırmak önemlidir.

2.4. Kemik metastazlarının tedavisinde radyoterapinin rolü ve etki mekanizması

Kemik metastazlarında başlıca radyoterapi endikasyonları ağrı, yüksek patolojik fraktür riski ve medulla spinalis basısına bağlı gelişen nörolojik semptomların palyasyonudur. Radyoterapi kısa sürede oluşturduğu ağrı palyasyonu ve bunun çoğu zaman uzun etkili olması, bifosfonat kullanımıyla birlikte iyileşmeye yardımcı olması ve minimal toksik etkisi nedeniyle kemik metastazlarının tedavisinde ilk tercih edilen palyasyon yöntemidir (58). Radyoterapi ile hastaların %50-80'inde ağrı palyasyonu sağlanmakta, 1/3'ünden fazlasında ağrı tamamen kaybolmaktadır (59). Prospektif randomize çalışmalarda ağırlı kemik metastazlarında uygulanmış farklı doz şemalarında (30 Gy/10 fr, 24 Gy/6 fr, 20 Gy/ 5 fr, 8 Gy/1 fr) ağrı palyasyonunda benzer etkinlik görülmekle birlikte, tek fraksiyonlu şema uygulananlarda çoklu fraksiyonlu şemalara göre daha sık radyoterapi tekrarı gerekmektedir (sırasıyla %23-25 ve %7-10) (8, 60-64).

Sadece kemik metastazı olan hastaların sağkalım süresi, viseral organ metastazı olanlardan daha uzundur. Uzun sağkalım süresi ile birlikte iskelet sisteminde zaman içinde

progresyon ortaya çıkmakta, hastalarda ciddi ve başa çıkılamayan semptomlara neden olmaktadır. Bu nedenle performans durumu iyi ve beklenen yaşam süresi uzun olan hastalarda daha uzun tedavi rejimleri önerilmektedir (65). Uzun süreli sağkalım beklentisi olmayan hastalarda ise, hızlı palyasyon sağlamak amacıyla kısa süreli RT şemaları uygulanmalıdır. Ağrı palyasyonu hastaların yaşam kalitesine olumlu katkı sağlarken yaşam süresine anlamlı bir etkisi olmaz.

Her ne kadar vücudun her bölgesindeki patolojik fraktürler önemli ve ağrılı olsa da özellikle femur, humerus, pelvis ve vertebralardaki fraktürler hareket kısıtlılığı da yaptıklarından cerrahi fiksasyon gerekli olabilir (66). RT genelde cerrahi sonrası kırılmış kemiğin remineralizasyonu uyarmak ve osteosentetik protezi stabilize etmek için uygulanmaktadır (67). Eğer hasta komorbid hastalıkları nedeniyle inoperabl, genel durumu bozuk, veya fraktür önemli derecede komplike ise palyatif radyoterapi ağrıya azaltabilir ve hastaların büyük çoğunluğunda kemik iyileşmesine olanak sağlar.

Patolojik fraktürü önlemek için yüksek risk taşıyan hastalara elektif cerrahi uygulanması morbidite açısından çok önemlidir. Patolojik kırık sonucu hareketsiz kalan olgularda ağrıdan başka pnömoni, dekübitis ülserleri, kırık uçlarındaki hareketle hiperkalsüri ve buna bağlı renal, kardiyak kökenli ölümler meydana gelebileceğinden, fraktür riski yüksek olgularda profilaktik fiksasyon önerilmektedir. İntermedüller yerleşimli litik lezyonun kemik çapının %50'sinden fazlasını tuttuğu ya da korteksteki litik lezyonun aksiyel uzunluğunun 2,5 cm'den fazla olduğu olgular yüksek fraktür riski taşır (68).

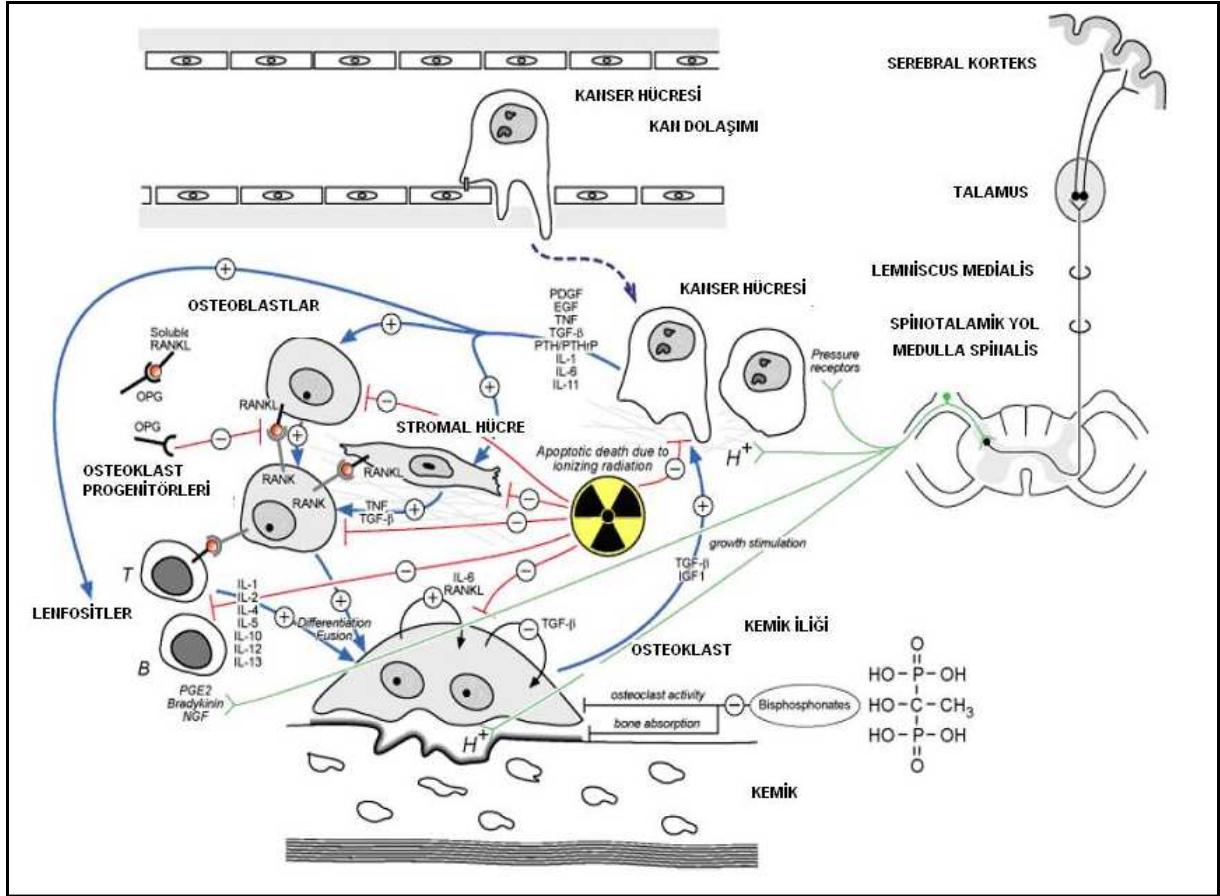
Prostat kanseri vertebra metastazına bağlı oluşan medulla spinalis basısıyla ortaya çıkan nörolojik hasarlara acil tedavi uygulanması çok önemlidir. Bu durumda RT ve dekompresif cerrahi en önemli iki tedavi seçeneğidir (69). Medulla spinalis basısında cerrahi endikasyon performansı iyi, sağkalım beklentisi 3 aydan uzun, sadece bir spinal segment tutulumu olan hastalarla sınırlıdır. Genel durumu kötü ve yaygın vertebral metastazları olan hastalar RT için

uygun adaylardır (70). Cerrahi fiksasyon sonrası adjuvan RT uygulanması metastatik destrüksiyonu daha da azaltır (71).

Medulla spinalis basısında erken tanı konulması prognozu iyi etkiler, spinal tutulum riski yüksek olan vertebra metastazlarında profilaktik radyoterapi yararlı olabilir (72). Bu hastaların RT bölümüne nakli ve tedavi masasında pozisyonunun ayarlanması sıklıkla hastalarda majör rahatsızlığa neden olabilir. Bu nedenle genel tedavi süresi 1x8 Gy ve 5x4 Gy gibi kısa RT şemaları özellikle yaşam beklentisi düşük hastalar için uygun görülmektedir. Performansı iyi, yaşam beklentisi uzun olgularda uzun RT şemaları tercih edilir.

İyonizan radyasyon kanser hücre fonksiyonlarını değiştirerek apoptotik hücre ölümünü tetikler. Tümörlü dokunun ortadan kalkmasının ardından osteoblastik aktivite hasarlanan kemik dokunun tamirini sağlar. Eksternal RT litik kemik metastazlarında %65-%85 oranında ossifikasyona neden olmaktadır. İyileşmiş kemik metastazında matür organize kemik oluşumu RT'nin direkt osteogenezi etkilemesi ile ilgilidir (73).

RT'nin hangi mekanizmayla ağrıyı giderdiği bilinmemektedir. Olası bir açıklama radyasyonun canlı tümör hücrelerinin sayısını azaltması ve buna bağlı tümörün boyutunda küçülme olmasıdır. Bununla beraber, doz-yanıt ilişkisinin kurulamaması ve tümör boyutunda belirgin küçülme olmaksızın ağrıda azalma olması ağrının giderilmesini tümüyle tümör boyutundaki azalma ile açıklayamamaktadır. RT'nin osteoklast inhibisyonu yaparak, ayrıca kimyasal ağrı mediatörlerinin salınımını inhibe ederek ağrı palyasyonu sağladığı düşünülmektedir. RT sonrası bazı hastalarda 24 saat içinde ağrıda azalma olması kemik metastazlarının mikroçevresindeki kimyasal ağrı mediatörleri salgılayan enflamatuvar hücrelerin azalması ile ilişkili olduğunu gösterir (53, 74) (Şekil 2).



Şekil 2. Kemik metastazına bağlı ağrı palyasyonunda radyoterapi ve bifosfonatların etki mekanizması (74).

2.5. Kemik metastazlarının tedavisinde bifosfonatların rolü

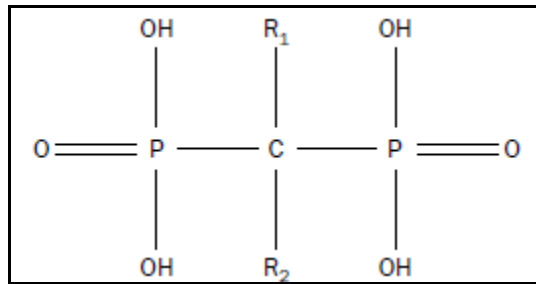
Bifosfonatlar kemik metastazlarına bağlı komplikasyonların önlenmesinde en etkili standart tedavi ajanları olup kemik metastazlarına bağlı gelişen iskeletle ilişkili olayları azaltmakta ve ağrı palyasyonu sağlayarak yaşam kalitesini artırmaktadırlar. Fosfat analogu olan bifosfonatlar kemik mineralizasyonunun doğal inhibitörüdür. Absorbe olarak kemiğin hidroksiapatit kristallerine bağlanır ve kemik mineral stabilizasyonunu sağlarlar. Yanısıra net olarak anlaşılammış çeşitli mekanizmalarla da osteoklast fonksiyonunu inhibe ederler (75).

Ondokuzuncu yüzyılın ortalarında Alman kimyagerler tarafından üretilen bisfosfonatlar, ilk olarak endüstride kalsiyum tuzlarının petrol borularını kaplamasını engellemek için kullanılmışlardır. Bindoküzyüztümü yıllarda bu ilaçların böbrek taşı oluşumunu engelleme

potansiyelini hedef alan çalışmalarla antirezorptif etkisi tanımlanmıştır (76). Bindokuzyüzyetmişli yılların sonunda kalsiyum fosfata yüksek afiniteleri sayesinde Tc-99m ile birlikte ossöz gamma-grafileri elde etmek için kullanılmışlardır. Ayrıca anti-tartar ve antiplak etkilerinden dolayı diş macunlarının içine katılmışlardır (77). Bifosfonatların in vitro olarak kalsiyum fosfat oluşumunu ve çözünmesini, in vivo olarak mineralizasyon ve kemik rezorbsiyonunu efektif bir şekilde kontrol ettiğinin keşfedilmesinden sonra osteoporoz, metastatik meme ve prostat kanseri, multiple myelom, Paget hastalığı ve diğer birçok metastatik hastalıklara bağlı oluşan komplikasyonları önlemede kullanımları dünya çapında yaygınlaşmıştır (78, 79).

Bifosfonatların osteoklastlar tarafından oluşturulan kemik rezorbsiyonunu inhibe ettikleri bilinmektedir. Prostat kanserinde gelişen kemik lezyonlarının birincil olarak osteoblastik karakterde olması bifosfonatların bu hastalıktaki kullanımını daha az kavranabilir hale getirmektedir. Ancak yapılan çalışmalar, prostat kanserinde önemli oranda kemik rezorbsiyonunun olduğunu ve bu olayın metastazların gelişimine zemin oluşturan kemik mikroçevresinde önemli rol oynadığını göstermiştir (80). Bifosfonat tedavisi kemik metastazı radyolojik olarak saptandığında, hastanın semptomu olmasa bile başlanmalıdır (81).

Bifosfonat çekirdeği merkezi karbon atomuna bağlanmış iki fosfat grubundan oluşur (Şekil 3).



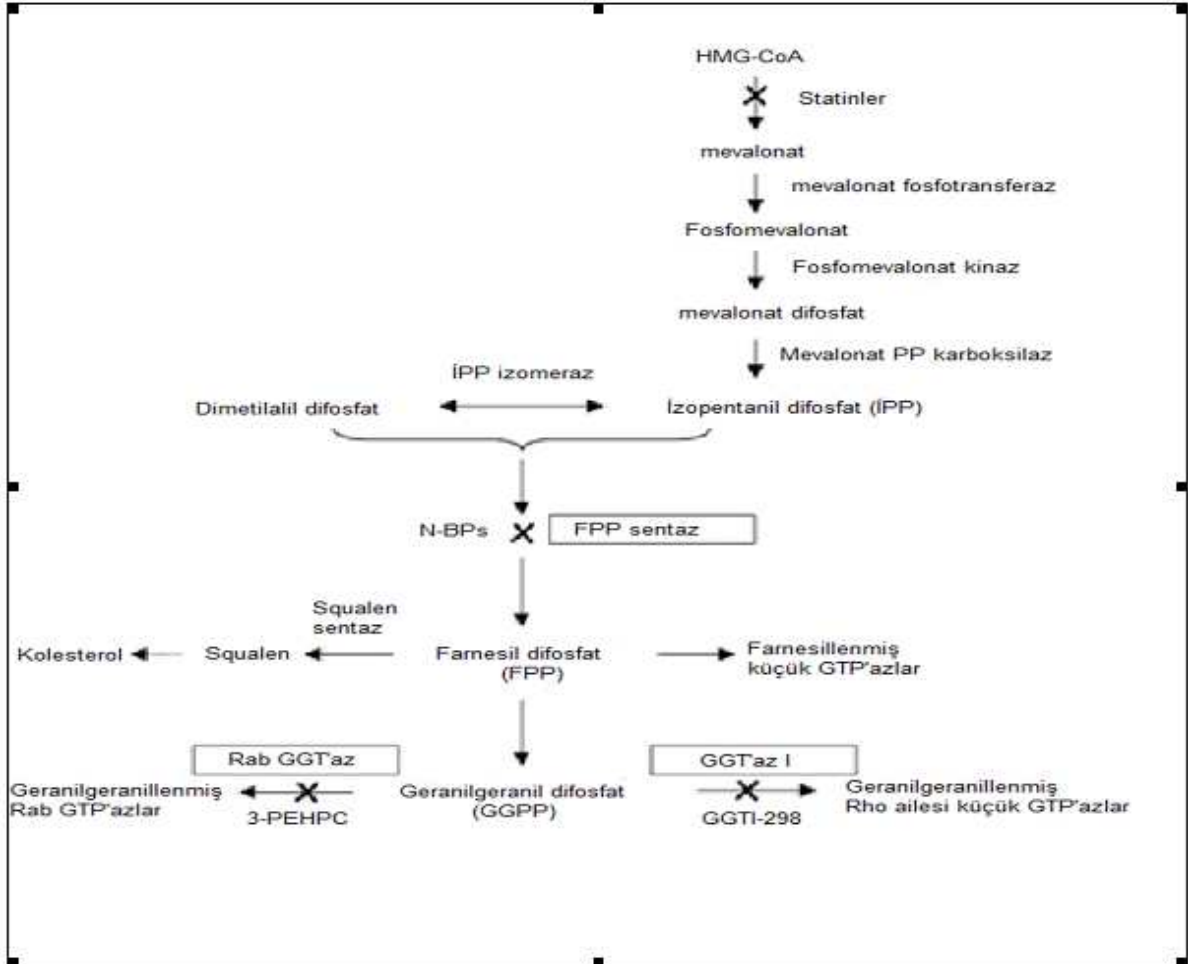
Şekil 3. Bifosfonatın temel yapısı.

Hiçbir enzim bu C-P bağıını ayıramadığı için bifosfonatlar vücutta metabolize edilemezler ve son derece stabil kalarak biyolojik aktivitelerini canlı dokularda uzun yıllar boyunca koruyabilirler. Farmakolojik özellikleri merkez karbon atomuna bağlı R1 ve R2 olarak bilinen yan zincirler tarafından kontrol edilir. In vitro olarak tüm bifosfonatlar osteoklast apoptozunu indüklerler (79, 82). Klodronat ve etidronat gibi nitrojen içermeyen bisfosfonatlar 1. jenerasyon bisfosfonatlar olarak da adlandırılan en eski bisfosfonatlardır. R2 zincirleri kısadır ve nitrojen içermezler. Kemik dokuya ulaştıkları zaman osteoklastlar tarafından yakalanarak hücre içinde ATP toksik analoglarına dönüştürülürler ve etkilerini bu yolla gösterirler (79, 83).

Nitrojen içeren bisfosfonatların (aminobifosfonatlar), nitrojen içeren uzun R2 zincirleri vardır. Nitrojen içermeyen bifosfonatlardan 100–2000 kat daha güçlüdürler. Antirezorptif etkilerini mevalonat yolu üzerinden gösterirler. Nitrojen içeren bifosfonatlar alendronat, risedronat, pamidronat, zoledronik asit ve ibandronattır.

Bifosfonatlar kemiğin yeniden yapımı sırasında, osteoklastik göç sonucu kalsiyum-fosfor kristallerinin açığa çıktığı aşınmış rezorbsiyon kavitelerine yapışırlar. Bu etkiler nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatlar için benzerdir, ancak hücrel etkileri farklıdır (84). Nitrojen içeren bisfosfonatlar ATP'nin toksik analoglarına metabolize edilmezler. Bunun yerine mevalonat yolunun anahtar enzimlerinden olan farnesil difosfat (FPP) sentetaz inhibisyonu yoluyla etki gösterirler. Bu enzim nitrojen içeren bifosfonatların nanomolar konsantrasyonları ile inhibe edilir. Rekombinan insan FPP sentetaz üzerinde yapılan çalışmalarda R2 yan zincirinin yapısal minör modifikasyonları ve biçimlendirilmesinin antirezorptif potansiyeli ve FPP sentetaz inhibisyonunu etkileyeceği gösterilmiştir (85). Nitrojen içeren bifosfonatlar enzimin bağlayıcı bölümündeki geranil difosfata (GPP) bağlanırlar (86). Nitrojen içeren bifosfonatlar FPP ve onun metaboliti olan geranilgeranil difosfatın sentezini önlerler. Bu isoprenoid lipitler dolikol ve ubikinon gibi birçok metabolitin üretiminde yapıtaş olmalarıyla beraber küçük GTPaz'ları da içeren proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları (prenilasyon) için gereklidir (87). Ras,

Rho ve Rab familyasından olan prenil olmuş küçük GTPaz'lar osteoklast fonksiyonu için önemli sinyal proteinleridirler ve iskelet sisteminin hücrel organizasyonu, hücre morfolojisi, apoptozis gibi çeşitli hücrel işlemleri düzenlerler. Nitrojen içeren bifosfonatların etkisiyle prenil olamayan proteinlerin, osteoklast prekürsörlerinde ve olgun osteoklastlarda birikmesi, bu hücrelerin farklılaşmasını ve aktivasyonunu engelleyerek apoptozisle hücre ölümüne yol açar (88). Şekil 4'de nitrojen içeren bifosfonatların mevalonat yolağı üzerinden etki mekanizması gösterilmiştir (89).

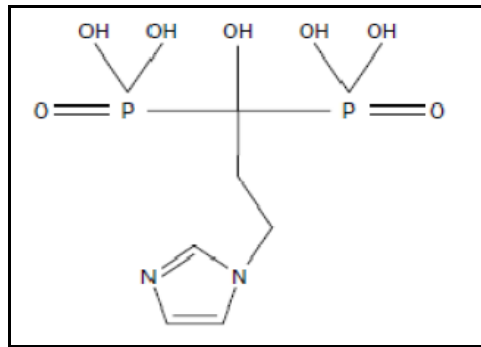


Şekil 4. Mevalonat yolu ve bifosfonatların etki mekanizması (89).

Bifosfonatlar osteoklast diferansiyasyon faktörlerinden olan RANKL salgılanmasını etkilerler. RANKL ekspresyonunu inhibe etmekle osteoklast aktivitesini sırasıyla azaltmaktadır. Osteoblast prekürsör hücrelerinden salgılanan RANKL osteoklastların multinükleer hücrelere füzyonu, aktivasyonu ve diferansiyasyonu için gereklidir (15). Bisfosfonatlar kemikteki tümör hücrelerinin intraselüler matrikse geçmesine engel olarak tümör invazyonunu engellerler. Ayrıca antianjiyogenik etkileri, metastazı önleyerek anti-tümoral etkilerine katkı sağlamaktadır. Bisfosfonatların endotel hücre proliferasyonunu, adezyonunu ve migrasyonunu bozduğu in vitro olarak gösterilmiştir (12).

2.5.1. Zoledronik asit

İmidazol halkalı yan zinciri olan, heterosiklik azot içeren üçüncü kuşak aminobifosfonattır. Kemik rezorpsiyonu üzerine etkisi pamidronattan 850 kat daha fazladır. Kimyasal olarak bifosfonik asit monohidrat (1 hidroksi 2 imidazol-1-yl-fosfono etil) olarak adlandırılır (Şekil 5).

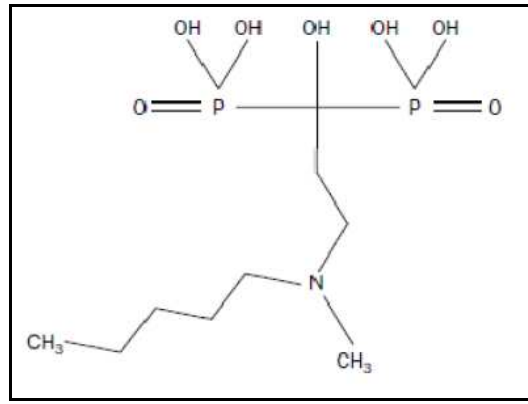


Şekil 5. Zoledronik asitin kimyasal yapısı.

Zoledronik asidin multipl myelomda ve prostat kanseri dahil solid tümörlerin kemik metastazlarının tedavisinde kullanımı 3000 hastayı içeren üç randomize kontrollü çalışmanın sonucuna dayanarak 2002 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (4, 90, 91).

2.5.2. İbandronat

R1 yan zincirinde iskeletsel yapışmanın kuvvetini arttıran ve hidroksiapatit kristalinin büyümesini önleyen hidroksil grubu içerir (92). R2 yan zincirinde en potent yan zincirlerden biri olan tersiyer nitrojen grubu antirezorptif potansiyelin esas belirleyicisidir (93) (Şekil 6). Yapısal özelliğinden dolayı ibandronat risedronat, alendronat, pamidronat ve klodronattan sırasıyla 2, 10, 50 ve 500 kat daha etkili bulunmuştur (94).



Şekil 6. İbandronatın kimyasal yapısı.

İbandronat renal fonksiyonlarda bozulmaya yol açmadan iskeletle ilişkili olayları ve kemik ağrılarını azaltmakta ve yaşam kalitesini arttırmaktadır (95, 96). Meme kanserinin kemik metastazlarına bağlı iskelet ile ilişkili olayların azalmasında ibandronatın etkinliğinin değerlendirildiği plasebo kontrollü faz III çalışmalarında iskeletle ilişkili olayların rölatif riskinde %40 azalma tesbit edilmiştir (18, 19, 96).

2.5.3. Zoledronik asit ve ibandronatın yan etki profilleri

Bifosfonatlar genelde iyi tolere edilirler. En sık yan etkileri ateş, artralji, myalji, dispne gibi grip benzeri semptomlar, kemik ağrısı ve güçsüzlüğü, anemi, bulantı gibi hafif-orta düzeyde semptomlardır. Zoledronik asit kullanımı sonrası sırt ağrısı (%12), bulantı (%14), yorgunluk

(%14) veya eklem ağrısı (%20) gibi nispeten sık görülen yan etkilerin yanı sıra ateş, düşük sıklıkta baş dönmesi, asteni ve renal tübüler nekroz görülebilir. Grip benzeri yakınmalar ilk uygulamadan sonra hastaların yaklaşık %20'sinde görülebilir. İbandronatın intravenöz uygulanmasında grip benzeri semptomlar %50 daha az görülmektedir (97). Bifosfonat uygulamasında kalsiyum desteği alan hastalarda hipokalsemi nadiren meydana gelir. Serum kalsiyum seviyesi düzenli olarak izlenmelidir.

Hafif ve orta dereceli böbrek yetmezliklerinde zoledronik asitin doz ayarlaması için kreatinin klirensi kullanılır. Böbrek yetmezliği gelişirse tedavi kesilir ve serum kreatinin seviyesi bazal seviyesine %10 yaklaşıncaya kadar tekrar başlanabilir (98). Zoledronik asitin renal fonksiyon üzerine olan etkileri nedeniyle kreatinin klirensi <30 ml/dk olan hastalarda uygulanamaması, kreatinin klirensi <60 ml/dk olan hastalarda dikkatli kullanım zorunluluğu bu ilacın dezavantajlarıdır. Zoledronik asitin 15 dakikalık infüzyonla uygulanması böbrek toksisitesi oranını azaltmakla birlikte yine de renal toksisite görülmektedir.

İbandronatın intravenöz veya peroral kullanımı ile uzun dönemde anlamlı serum kreatinin değişikliği gelişmediği bildirilmiştir (99). Hafif-orta şiddette böbrek yetmezliği olan hastalarda (kreatinin klirensi 30-80 ml/dk) doz ayarı gerekli değildir, şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalarda bile (kreatinin klirensi <30 ml/dk) kullanılabilir. Nefrotoksik ilaç kullanan hastalarda doz sınırlaması önerilmemektedir. Ciddi renal hasarı olan hastalarda kullanılacak tek bifosfonattır (100).

Bifosfonat tedavisinin en önemli yan etkilerinden birisi de çene osteonekrozudur. İlk kez 2003 yılında bildirilmiş ve kemiğin kanlanması bozulması ile oluşan avasküler bir nekroz olarak tanımlanmıştır (101). Bifosfonat tedavisinin süresi ile doğru orantılı olarak görülme sıklığı artmaktadır. En sık zoledronik asit, ikinci sıklıkta pamidronat kullanımı ile geliştiği bildirilmiştir (102). Çene osteonekrozu sıklıkla diş ile ilgili işlemlerden sonra veya diş protezi

kullanılarda görülmektedir. Çene osteonekrozunu önlemek için bifosfonat kullanımı öncesi diş muayenesi yapılmalı ve tedavi süresince elektif çene cerrahisinden kaçınılmalıdır.

2.6. İyonizan radyasyonun etkileri

2.6.1. Biyolojik etkiler

Atom veya moleküllerden elektron koparabilecek kadar yeterli enerjiye sahip radyasyona “iyonizan radyasyon” denir. En karakteristik özelliği içerisinde yüksek miktarda enerji barındırmasıdır. İyonizan radyasyon canlı organizmalar tarafından absorblandığında içerdiği enerji dokular ve hücreler içinde birikir. Bu enerji, bir kimyasal bağı kolaylıkla kırabilecek ve zincirleme biyolojik olayların başlamasıyla sonuçlanabilecek çok sayıda enerji paketine düzensiz olarak ayrılır (103). Bu etkileşme sırasında bir çok fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik olaylar zinciri sonucunda asıl biyolojik cevap oluşur.

İyonizan radyasyonun biyolojik etkisinin ilk kademesi olan **fiziksel kademe**de radyasyon enerjisi maddeye transfer edilir ve radyasyonu absorplayan maddenin moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılmalara yol açar. Bu sırada DNA molekülü ya da hücredeki diğer moleküllerde iyonlaşma ve uyarılma olayları meydana gelir. Bu iyonlaşmalar sonucunda oluşan serbest elektronlar, diğer komşu atomlarda da iyonlaşmalara yol açarlar, böylece zincirleme bir iyonlaşma meydana gelir. Ancak bu ilk reaksiyonlarda ortaya çıkan yeni ürünler, genelde son derece kararsızdırlar ve çok kısa sürede sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar. Bu reaksiyonların meydana geldiği ikinci kademe kimyasal kademedir.

Kimyasal kademede hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücresel yapılar ile reaksiyona girerler ve serbest radikallerin oluşmasına yol açarlar. Serbest radikal reaksiyonları radyasyonun absorpsiyonundan sonraki bir milisaniye içinde tamamlanır.

Üçüncü kademe olan **biyolojik kademe** radyasyonun son biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına neden olur. Bu kademe birtakım hasarlara yol açan enzim reaksiyonları ile başlar. DNA molekülünde hasarlar oluşur. Bunların bir kısmı onarılabilir, onarılamayan hasarlar ise hücrenin ölümüne yol açarlar. Aynı zamanda genetik bozukluklar ve kanser oluşumu gibi geç biyolojik etkilere de yol açabilirler (103).

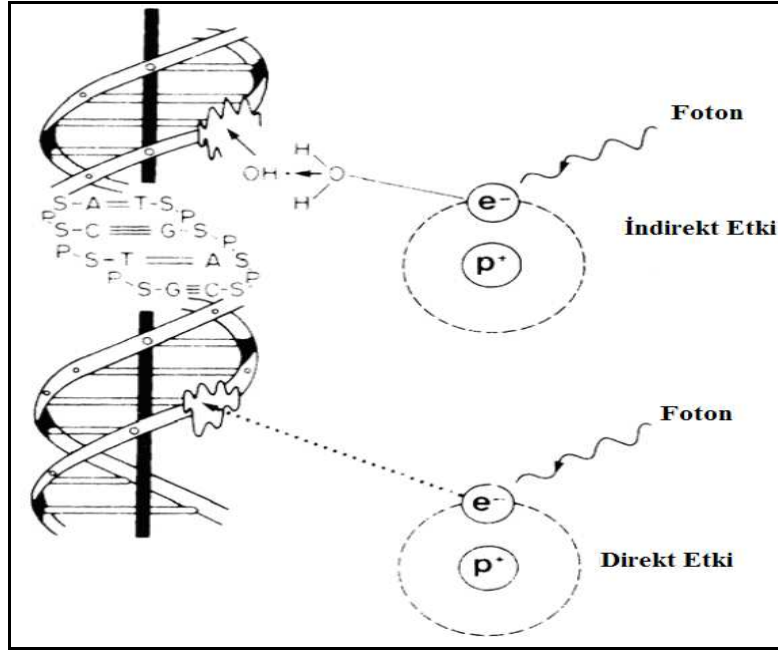
2.6.2. Direkt ve indirekt etkiler

İyonizan radyasyon farklı mekanizmalarla hasar oluşturur. Hücreler %70-90 oranında su içerdiğinden indirekt etkiler, direkt radyasyon etkilerinden daha önemlidir ve radyasyon hasarlarının büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu kabul edilmektedir. Radyasyon suyla etkileştiğinde su molekülünü bir arada tutan kimyasal bağlar kırılarak hidrojen ve hidroksiller açığa çıkar. Açığa çıkan bu moleküller diğer yapılarla tepkimeye girerek hücreye zarar verebilecek hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin oluşumuna neden olur.

Eğer iyonizan radyasyon DNA molekülünün atomlarıyla veya hücrenin yaşamı için önemli olan yapıların atomlarıyla doğrudan etkileşirse, buna direkt etki denir (Şekil 7). Böyle bir etkileşim hücrenin çoğalma ve yaşama yeteneğini etkiler.

Radyasyon etkisi ile oluşan serbest radikallerin bazıları modifiye etmesiyle ve DNA tek zincir kırıkları oluşumu ile de DNA hasarı meydana gelebilir. Bu hasarlar genellikle onarılabilir hasarlardır. Hücre için en ölümcül etki DNA'da çift zincir kırıklarının oluşmasıdır. Bir Gy radyasyon DNA'da ortalama 1000 baz hasarı, 1000 tek zincir kırığı hasarı, 40 çift zincir kırığı hasarı oluşturmaktadır (108). Bu kırıkların büyük bir bölümü diğer etkilerde olduğu gibi hidroksil radikali oluşması ve bu radikalın DNA ile etkileşmesi ile meydana gelir. Bir hücrede iyonizan radyasyonla oluşan tek zincir kırığı sayısı çift zincir kırığı sayısından 25 kat fazladır. İyonizan radyasyon ile karşılıklı iki DNA zincirinde de kırık oluşması, tamir için gerekli tamamlayıcı DNA dizisinin kaynak olarak kullanmasını engellemekte ve tamiri

zorlaştırmaktadır. Tamir edilemeyen veya hatalı tamir edilen çift zincir kırıkları, replikasyon ve transkripsiyon süreçlerinde bozukluklara, mutasyonlara ve kromozom anomalilerine, sonuçta genomik kararsızlığın artmasına ve kansere yol açabilir (104).

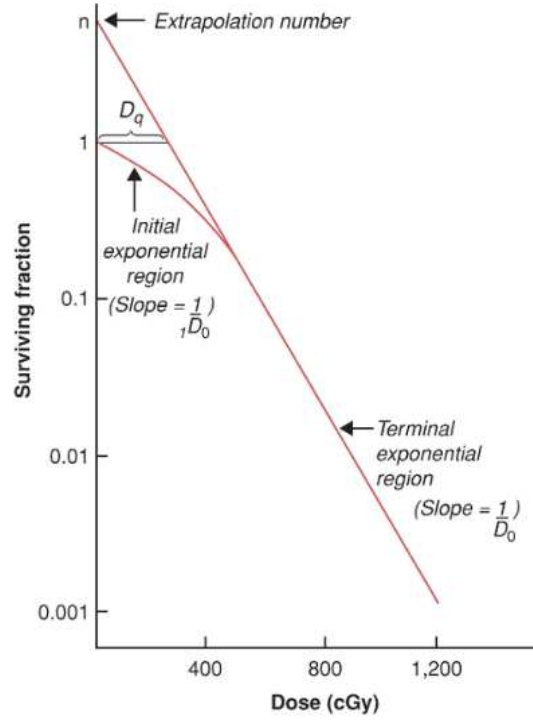


Şekil 7. Radyasyonun direkt ve indirekt etkisi.

2.7. İn vivo ve in vitro sağkalım eğrileri

Çeşitli radyasyon dozlarının uygulanmasından sonra sağkalabilen hücrelerin oranlarını gösteren eğrilere sağkalım eğrileri adı verilir. Bu eğriler absorblanan doz ile sağkalan hücrelerin oranları arasındaki ilişkiyi gösterir (103). İlk kez 1956 yılında Puck ve Marcus tarafından memeli hücrelerine değişik radyasyon dozlarının uygulanması ile elde edilen sağkalım eğrileri in vitro koşullarda yetiştirilen ve ışınlanan hücrelerde gösterilmiştir. Bu şekilde, iyonlaştırıcı radyasyonların memeli hücrelerindeki etkileri kantitatif olarak ilk kez gösterilmiş olmakla birlikte in vitro koşullarda yetiştirilen hücrelerden elde edilen sonuçların, in vivo koşullara, yani ait oldukları organizmanın içinde yaşayan hücrelere uygulanmasının

mümkün olmadığı da öne sürülmektedir. İn vivo koşullardaki hücrelerin büyümeleri ve çoğalmaları, birbirleri ile olan ilişkileri ve karşılıklı etkileşimleri kontrol edildiği halde, in vitro koşullarda genellikle hücreler izole edilmiş oldukları için büyüme ve çoğalmada karşılıklı etkileşim ve ilişkilerin in vivo koşullara göre çok daha düşük seviyede olduğu görülür. Buna bağlı olarak in vitro koşullardaki hücreler genellikle in vivo koşullardaki hücrelerden daha çabuk çoğalırlar. Bilindiği gibi memelilerin vücudundan ancak kemik iliği, barsak ve deri hücreleri gibi bazı özel doku hücreleri hızlı ve sürekli bölünürler, erişkinlerde bunların dışında kalan çoğu dokulardaki hücreler ise çok seyrek bölünürler veya hiç bölünmezler. Çoğalma ile ilgili bu farklılıkların yanında, başka farklar da bulunmaktadır. Örneğin in vitro koşullarda yetiştirilen hücreler yeterli oksijen ve besin içeren ortamlarda yaşarlar, sabit sıcaklık, nem ve pH gibi faktörler de sağlanmıştır. Bütün bunlar optimum düzeyde olduğundan bu hücreler genellikle sınırsız bir bölünme yeteneğine sahiptirler. İn vivo sistemlerde ise hücrelere bütün bu faktörleri sağlayan kan dolaşımının vücuttaki tüm hücrelere (özellikle tümör hücrelerine) bunları homojen bir şekilde dağıttığı söylenemez. Buna göre in vitro koşullardaki hücrelerin in vivo koşullardaki hücreler kadar homojen bir ortam içinde olmadıkları düşünülebilir. Ayrıca in vivo koşullardaki hücrelerin bazı immünolojik ve hormonal faktörlerin etkisi altında olduğu, buna karşılık bu faktörlerin doku kültürü koşullarında bulunmadıkları belirtilmiştir. Tüm bu farklılıklardan dolayı in vivo koşullarda sağkalım eğrileri elde edilmesi ile ilgili TD₅₀ (tümör dozu 50) yöntemi, dalakta kolonizasyon oluşturma yöntemi gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Gerek TD₅₀, gerek dalakta kolonizasyon oluşturma, gerekse diğer yöntemlerle elde edilen in vivo sağkalım eğrileri radyasyonun etkisiyle hücrelerin çoğalma yeteneklerini kaybetmesi olayının in vitro ve in vivo koşullarda aynı şekilde oluştuğunu ortaya koymuştur. Memeli hücrelerinin gerek in vivo gerekse in vitro koşullarda ışınlanması ile elde edilen bütün sağkalım eğrileri, düşük doz bölgelerinde bir omuza sahiptirler, ayrıca eksponansiyel bölgelerin eğimlerini aksettiren ortalama letal doz her zaman 1-2 Gy arasında olmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Memeli hücreleri için iki bileşenli sağkalım eğrisi. Bir omuz bölgesi ve takiben terminal eksponansiyel bölgeden (eğimi $1/D_0$) oluşur. Omuzun bir başlangıç eksponansiyel bölgesi vardır (eğimi $1/D_0$), ardından terminal eksponansiyel bölge ile birleşen aşağı doğru eğimli bir parçası vardır (103).

Buna göre, memeli hücrelerinin in vitro yöntemlerle elde edilen sağkalım eğrilerinin, in vivo koşullara uygulanabilir oldukları deneysel olarak açıkça kanıtlanmış durumdadır (105).

2.8. Sitotoksosite ve değerlendirilmesi

Hücre canlılığı, bir örnekteki canlı hücrelerin sayısı olarak, hücre proliferasyonu ise, bir kültürde bölünen hücrelerin sayısının belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Canlı hücre sayısı ve hücre proliferasyonunun doğru ve hızlı tesbiti, in vitro ve in vivo çalışmaların deneysel aşamalarında önemlidir. Canlı hücre sayısını belirlemede en çok tercih edilen yöntem, tripan mavisi ile otomatik hücre sayım cihazında sayım yapılmasıdır. Hücre proliferasyon yöntemleri genellikle hücre biyolojisinde çoğalma faktörlerini, sitokinleri ve ortam bileşenlerini çalışmak için sitotoksik ajanları ve lenfosit aktivasyonlarını gözlemlemek amacıyla yaygın olarak

kullanılmaktadır. Proliferasyonu ölçmek için kullanılan yöntemler plazma membranı permeabilitesindeki değişimler üzerine kurulmuştur. Bu yöntemlerde, hücreler irreversibl olarak hasara uğrattılır, plazma membranı ise hasar görmeden kalır. Bundan dolayı bu yöntemler, hücrel hasarın tesbitinde önemli bir yer oluşturmaktadır. Ölü hücreler çeşitli tetrazolyum tuzlarını metabolize etme yeteneğine sahip değildirler. Hücrelerin metabolik aktiviteleri azaldığında hücrel hasar ve ölümün çok geç basamaklarında, MTT, XTT, WST-1 gibi çeşitli kolorimetrik yöntemler kullanılmaktadır. Kolorimetrik yöntemlerin hücre kültüründe herhangi bir faktöre bağlı indüklenmiş sitotoksosite kantitasyonunda 24-96 saatlik döngüde çok hassas oldukları bilinmektedir. Hücre aracılı sitotoksositeyi ölçmede efektör ajanlar, hedef hücrelere bağlanarak aktive olmaktadır. Bu aktivasyon, efektör hücre tarafından oluşturulan formazan üretiminde artış ile sonuçlanmaktadır. Bu da, hedef hücre ölümünden kaynaklanan, azalmış formazanı maskeleyi hedeflemektedir. MTT, XTT, WST-1 genel olarak metabolik aktiviteyi ölçen testlerdir. Canlı yani metabolik olarak aktif hücreler, tetrazolyum tuzlarını formazan bileşiklerine indirgemektedirler. Bundan dolayı tetrazolyum bazlı kolorimetrik yöntemlerle, hücre canlılığı ölçülebilmektedir (112).

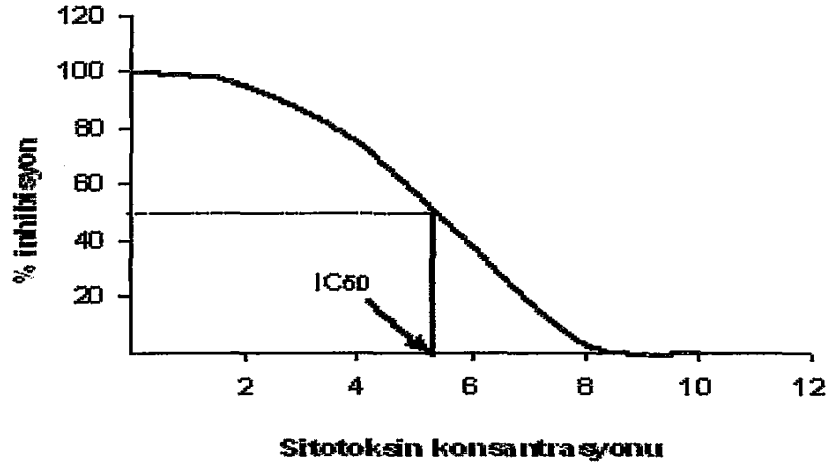
2.8.1. IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon) oranı

Koloni formasyonunda %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ olarak tanımlanmaktadır (Şekil 8). Duyarlılıktaki farklılıklar, eğri üzerinden tesbit edilebilmektedir.

2.8.2. MTT testi

MTT testi hücre canlılığı ve proliferasyonunun tesbit edilmesi için kullanılan tetrazolyum bazlı kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT'yi (C,N-diphenyl-N'-4,5-dimethyl thiazol 2 yl tetrazolium bromide) redüksiyon ile çözünmez mavi renkli formazan ürününe dönüştürme

prensibine dayanmaktadır. Bu enzim sistemi canlı hücrelerin mitokondrilerinde mevcuttur. Ölü hücreler bu dönüşümü gerçekleştiremez. Bu yöntem ile lizise uğramış hücrelerden ^{51}Cr salınımının veya ^3H -timidinin hücresel DNA ile birleşmesinin görüntülenmesi sağlanır. MTT yöntemi esas olarak kültüre edilmiş ve artan hücre sayısı ile karakterize hücre hatlarında tercih edilmektedir.



Şekil 8. IC₅₀ oranını gösteren grafik.

2.8.3. XTT testi

Diğer bir kolorimetrik yöntem olan XTT de tetrazolyum tuzları prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemin kullanımı proliferasyon ölçümü işlemini büyük ölçüde kolaylaştırmış, hücrelerin kantifikasyonunda ve radyoaktif izotoplar kullanmadan canlılıklarının tespitinde çözüm sağlamıştır. Bu yöntem, hücre proliferasyonunun çeşitli büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, TNF'nin sitotoksosite ölçümü için uygundur. XTT, hücrelerden ^{51}Cr salınımı temeline dayanan sitotoksik testlerin yerini almaktadır. Bu yöntemi kullanmanın avantajları şunlardır:

- Hızlıdır, çok kuyucuklu plakalar ve okuma için bir ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) okuyucuya ihtiyaç vardır.

- Kolay uygulanabilir, ek ajanlara veya hücre yıkama prosedürlerine ihtiyacı yoktur.
- Duyarlıdır, düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılabilir.
- Güvenilirdir, radyoaktif izotoplara ihtiyaç duymaz.

Normal olarak aktive edilmiş hücrelerin ve çeşitli sitokinlere bağımlı hücre hatlarının, hücre canlılığı veya proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan yeni bir kromojenik yöntem olması açısından da ayrı bir önem taşımaktadır. Metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır (112). Oluşan boya suda çözünebilir özellikte olup, boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla belirli dalga boylarında okutulabilmektedir. Yöntemin duyarlılığı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Çok kuyucuklu plakaların ve bir ELISA okuyucusunun kullanılması, çok sayıda örneğin çalışılıp, hızlı ve kolay sonuçlar alınabilmesini sağlamaktadır. Test prosedürü hücrelerin 96 kuyucuklu plakalarda kültüre edilip, XTT ajanının eklenip, 2-24 saat inkübasyonda bekletilmesi prensibine dayanmaktadır. İnkübasyon süresi boyunca, duyarlı bir spektrofotometre (ELISA okuyucusu) ile ölçülebilen turuncu renk oluşmaktadır. Kuyucuklardaki aktif hücrelerin sayılarının çokluğu, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin çokluğu ile orantılıdır.

2.9. Hormona dirençli prostat kanseri hücre hatları (PC3 ve DU-145)

PC-3 hücre hattı Kafkas ırkından, 62 yaşında, derece 1V prostat adenokarsinomlu bir hastanın kemik metastazından elde edilmiştir. Kültür hücreleri hem yumuşak agar süspansiyonundaki monomoleküler tabakalarında, hem de fındık faresinin subkutan dokularında üretilmiştir. Transplant tümör (hücre kültürü), ilk tümörden üretilen hücre hattının karakteristiğini yansıtmaktadır. Karakteristik olarak zemine yapışarak çoğalırlar. Bu nedenle hücrelerin başka yere aktarılması gerektiğinde yapıştığı yerden kaldırmak için tripsin EDTA (etilenediamintetraasetik asid) kullanılır. PC-3 prostat kanseri hücre hattı prostat epitelyum

hücreleri ile karşılaştırıldığında androjene, glukokortikoidlere, epidermal ve fibroblast büyüme faktörlerine cevap vermezler. Hormonoterapiye ve kemoterapiye dirençlidirler. Bu hücrelerde androjen reseptör fonksiyonu yoktur ve IL-6 reseptörü salgılar.

Tüm bu fonksiyon ve morfolojik karakteri, PC-3 prostat kanser hücresinin kötü diferansiyel adenokarsinom olduğu yönündedir. Bu hücreler ileri prostat kanser hücrelerinin biyokimyasal değişimlerinin araştırmalarında ve kemoterapötik ajanlara cevabı değerlendirmede kullanılmaktadır.

DU-145 hücre hattı prostat kanseri tanısı almış 69 yaşındaki bir erkek olgunun beyin metastazlarından üretilmiştir. Hormonoterapiye ve kemoterapiye dirençli olarak bilinir. “Nude” sıçanlara enjekte edildiğinde derece 2 prostat adenokarsinomu oluşturan tümorojenik etkisi vardır. Chakraborty ve Von Stein DU-145 prostat hücrelerinin hücresel iskelet yapılarını ışık, elektron ve immünfloresan mikroskopunda incelemişler ve insan prostat kanseri üzerinde yapılacak ileri çalışmalar için mükemmel in vitro model oluşturacağını bildirmişlerdir (113).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Aralık 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına bağlı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür.

Laboratuvar içerisinde hücre hatlarının en uygun koşulda yaşamlarını sürdürmelerini sağlayan iki adet inkübatör, steril ortamda çalışma imkanı sağlayan iki adet “hood” (Resim 1), bir büyük, bir küçük olmak üzere iki adet santrifüj, “inverted” ışık mikroskobu (Resim 2) ve immun floresan mikroskobu, hücre sayım cihazı (Resim 3), “ELISA Reader” cihazı (spektrofotometre) (Resim 4), bir adet vorteks cihazı, değişik boyutlarda pipetler, mikropipetler, flasklar, plakalar (6, 24, 48, 96 kuyucuklu) bulunmaktadır.



Resim 1. Steril ortamda çalışma imkanı sağlayan “hood”lar.



Resim 2. “Inverted” ışık mikroskobu.



Resim 3. Hücre sayım cihazı.



Resim 4. “ELISA Reader” cihazı

3.1. Tümör hücre hatları ve kültür ortamı

Çalışmada kullanılan PC-3 ve DU-145 hücre hatları “Interlab Cell Line Collection” (ICLC)’dan temin edilmiştir. Bu hücre hatları 75 cm² lik flasklara 10 mL RPMI 1640 besiyeri (Kibutz Beit Haemeh, 25115, İsrail) ile birlikte kültürde çoğaltılmak üzere yerleştirilmiş, ortama 2 µM glutamin (Kibutz Beit Haemeh, 25115, İsrail), %10 fetal bovin serumu (Life Technologist) ve %1 penisilin-streptomisin, %0,05 gentamisin, %1 partrisin eklenerek tek katman halinde çoğaltılmıştır. Hücre kültür işlemleri “hood” (NuAire,USA) ve inkübatörde (NuAire, USA) gerçekleştirilmiştir. İşlem öncesi “hood” 30 dakika ultraviyole lambası ile sterilize edilip ardından alkol ile silinmiştir. Sıvı nitrojende (-196⁰ C) saklanmış olan PC-3 ve DU-145 hücre örnekleri oda sıcaklığında eritilip 75 cm² lik flasklara steril şartlarda aktarılmış, üzerlerine 10 ml besiyeri eklenmiştir. Flask inkübatöre konmadan önce kapağı hafif gevşetilmiş ve hücreler nemli, 37⁰C’de %5 CO₂ ortamında çoğaltılmıştır. Kültür medyumunu haftada iki defa değiştirilmiştir. Pasajlar, hücrelerin çoğalma ve morfolojileri gözlemlenerek gerçekleştirilmiştir. Her pasaj sırasında ortalama 2 milyon hücre 10 ml besiyeri konmuş flasklara alınmıştır. Hücreler kaplardan tripsin-EDTA (Biological Industries Indianapolis) ile

muamele edilerek ayrıştırılmış, tripan mavisi ile boyanarak hem canlılık hem de enfeksiyon açısından değerlendirilmiştir.

3.2. Hücre hatlarının pasajlanması

Flask içindeki besiyeri dökülmüş, hücreler flask yüzeyine yapışmış olduğu için her flaska 4 ml tripsin-EDTA konmuştur. Her 2-4 dk'da bir hücrelerin yuvarlak hale gelip flask yüzeyinden kalkıp kalkmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden kalktığı mikroskopta görüldükten sonra tripsin-EDTA etkisini nötralize etmek için üzerine 4 ml RPMI besiyeri konmuştur (hücreler, tripsin-EDTA'da fazla bekletildiğinde ölür). Ardından falkon tüplere hücre, besiyeri, tripsin-EDTA alınıp RPM'de 1000 devirde 24⁰C'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Falkonun üzerindeki süpernatant dökülüp üzerine taze besiyeri konmuştur. Homojen süspansiyon haline gelmesi için hücreler vortekslenmiştir. Böylece hücreler iki ayrı flaska aktarılmıştır. İşlem her seferinde başa döndürülmüştür.

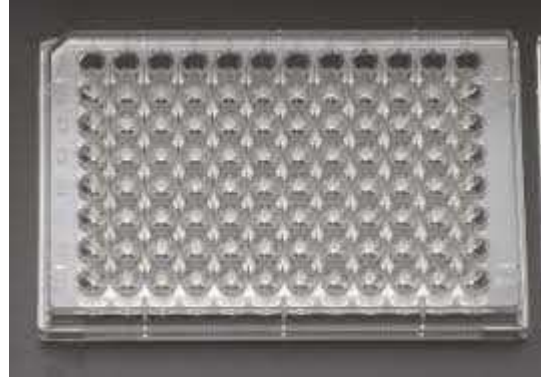
Hücre kültürlerinde inkübe edilecek Zoledronik asit Mustafa Nevzat İlaç Sanayi'nden, İbandronat Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.3. Hücre kültürü aşamasında kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler

Hücre kültürü aşamasında CO₂'li inkübatör, otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik), "inverted" mikroskop, ışık mikroskobu, steril kültür kapları (flask), çok kuyucuklu plakalar (6, 24, 48, 96'lık) (Resim 5, 6), "ELISA Reader" cihazı (spektrofotometre), flouresan mikroskop ve vorteks kullanılmıştır. Kullanılan kimyasal maddeler RPMI 1640 (Roowell Park Medium), dimetil sülfoksit (DMSO), tripan mavisi boyası (%0,5 fizyolojik tuz içinde), hücre canlılık testi (XTT) ve tripsin EDTA'dır.



Resim 5. 6 kuyucuklu plaka.



Resim 6. 96 kuyucuklu mikro plaka

3.4. Deney planı

Öncelikle PC-3 ve DU-145 prostat kanseri hücre hatlarında radyoterapi, ibandronat ve zoledronik asitin tekli etkileri, daha sonra iki ilacın radyasyonla ardışık ve eşzamanlı uygulanmasının etkileri araştırılmıştır.

1. **Basamak:** İbandronat ve zoledronik asitin hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi

- Stok solüsyonu 29 mM olan ibandronatın 40-80-120-160-200 μM ; stok solüsyonu 10^{-2} M olan zoledronik asitin 20-40-80-120-160-200 μM olacak şekilde çalışmada kullanılacak konsantrasyonlarının elde edilmesi,
- Bu çalışma konsantrasyonlarının her bir kuyucukta 10^4 hücre bulunan 96 kuyucuklu mikro plakalara 24, 48, 72. saatlerde değerlendirme yapılacak şekilde aktarılması (her bir çalışma konsantrasyonu için üç kuyucukta değerlendirme yapılmıştır),
- 24, 48, 72. saatlerde zoledronik asitin ve ibandronatın hücre canlılığına etkisinin “ELISA Reader” cihazında okunarak değerlendirilmesi,
- Zoledronik asitin ve ibandronatın IC_{50} 'sinin (%50 inhibisyon konsantrasyonu) ve IC_{50} 'ye en yakın olan iki konsantrasyonunun belirlenmesi.

2. Basamak: Radyoterapinin hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi

- PC-3 hücre hattının 4, 6, 8, 10, 12 Gy, DU-145 hücre hattının 1, 2, 3, 4, 6 Gy dozunda, her bir kuyucukta 5×10^5 hücre bulunan 6 kuyucuklu plakada 24, 48, 72. saatlerde değerlendirme yapılacak şekilde ışınlanması (her bir radyoterapi dozu için 3 kuyucukta değerlendirme yapılmıştır),
- 24, 48, 72. saatlerde radyoterapinin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin tripan mavisi yöntemiyle belirlenmesi,
- Radyoterapinin IC_{50} 'sinin (%50 inhibisyon konsantrasyonu) ve IC_{50} 'ye en yakın olan iki doz değerinin belirlenmesi,
- Radyoterapinin belirlenmiş olan dozları uygulandıktan sonra 24, 48, 72. saatlerde her bir kuyucukta 5×10^5 hücre bulunan 6 kuyucuklu plakalarda tripan mavisi yöntemi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi.

3. Basamak: İbandronat ve zoledronik asitin radyoterapi ile ardışık ve eşzamanlı (ilaç→RT; RT→ilaç; ilaç+RT) uygulanmasının hücre canlılığında azalma oranına etkisinin değerlendirilmesi

- İbandronat ve zoledronik asitin IC_{50} 'ye en yakın olan konsantrasyonları uygulandıktan sonra 24. saatte hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi ve radyoterapinin IC_{50} 'ye en yakın olan dozlarının uygulanması,
 - Aynı işlemin 48. ve 72. saatlerde tekrarlanması,
- İbandronat ve zoledronik asitin IC_{50} 'ye en yakın olan konsantrasyonlarının radyoterapinin IC_{50} 'ye en yakın olan dozları ile eşzamanlı uygulandıktan sonra 24. saatte hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi,
 - Aynı işlemin 48. ve 72. saatlerde tekrarlanması,

- İbandronat ve zoledronik asitin IC₅₀'ye en yakın olan konsantrasyonlarının radyoterapinin IC₅₀'ye en yakın olan dozlarından 24 saat sonra uygulanması ve hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi,
 - Aynı işlemin 48 ve 72. saatlerde tekrarlanması,
 - Radyoterapinin IC₅₀'ye en yakın olan dozlarının, ibandronat ile radyoterapinin ve zoledronik asit ile radyoterapinin ardışık uygulanmasında hücre canlılığında en çok azalmayı sağlayan kol ile karşılaştırılması.
- 4. Basamak:** Üçüncü basamakta elde edilen verilerin değerlendirilip etkin olmayan uygulamaların deneyin ileriki aşamalarında kullanılmaması.

3.5. PC-3 ve DU-145 hücrelerinin sayımı, ekimi ve canlılık testinin uygulanması

Hücre sayısı hücre kültürünün o andaki durumunun göstergesidir. Hücre sayımı pasaj yaparken, hücrelerin dondurulmasında veya deneysel işlemlerin hücrelere etkisini saptamada gereklidir. Hücre sayısı besiyerinin ml başına veya tutunulmuş yüzeyin cm³'ü başına düşen hücre sayısı olarak belirtilebilir.

Bu çalışmada inkübatörde bekleyen kültür kapları (flasklar) içindeki PC-3 ve DU-145 hücreleri zemine yapışık şekilde canlılığını sürdürebildiğinden, önce yapıştığı yerden kalkması için tripsin-EDTA ile 4-5 dakika muamele edildikten sonra "inverted" mikroskopla zeminden kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir (hücreler zeminden kalktıktan sonra yuvarlaklaşıp yüzmeye başlar). Hücreler zeminden kalktıktan sonra tripsin-EDTA'nın toksik etkisini nötralize etmek amacıyla aynı miktarda besiyeri eklenmiştir. Flasktaki hücre, tripsin-EDTA ve besiyerinden oluşan süspansiyonun tamamı 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücreler tabanda çökelti oluşturmuştur. Üstte kalan süpernatant dökülmüş ve kuyucuğa konulacak hücre sayısının az veya çok olması göz önünde bulundurularak uygun miktarda

besiyeri konularak dilue edilmiş ve vortekslenmiştir. Böylece homojen bir süspansiyon oluşturulmuştur.

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde tripan mavisi yöntemi ve XTT testi kullanılmıştır. Tripan mavisi yönteminde 50µl hücre süspansiyonundan alınıp, 50µl tripan mavisi boyası ile hücreler boyandıktan sonra hücre sayım cihazının lamına mikropipetler yardımıyla aktarılır ve sayılır (Cellometer, Nexcelom, ABD). Canlı hücreler tripan mavisi boyasına geçirgen olmadığından parlak görünürken ölü hücreler boyayı çeker ve mat mavi renkli görünür.

XTT testi için 96 kuyucuklu mikro plakaların her bir kuyucuğuna 10^4 hücre ekilmiştir. XTT ile sitotoksosite değerlendirmesi etken maddenin (ibandronat veya zoledronik asit) uygulanmasından sonra 24, 48, 72. saatlerde yapılmıştır. Değerlendirmenin yapılacağı saatte XTT solüsyonu için, elektron “coupling” 1 birim, “labeling” 50 birim olacak şekilde solüsyon hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 50µl konulmuş ve 5 saat sonra ELISA Reader’da okuma yapılmıştır. Her değerlendirme aynı saatteki pozitif kontrol grubundaki hücre sayısı ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak tanımlanmıştır. Hücre canlılığının ölçümünde hesaplanan sitotoksosite değerleri “CalcuSyn 2.1” yazılımına girilerek analiz edilmiş ve CI (kombinasyon indeksi) değerleri belirlenmiştir. CalcuSyn’de hesaplanan konsantrasyon-etki değerleri “Graphpad Prism 6.0” istatistik yazılımında istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Grafikler “Graphpad Prism 6.0 kullanılarak” çizilmiştir.

Radyoterapinin tekli ve ilaçlarla birlikte ardışık uygulaması için 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 5×10^5 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra (hücrelerin tabana yapışma zamanı kadar geçen süredir) ibandronat, zoledronik asit ve radyoterapi uygulamasının 24, 48, 72. saatlerde hücrelerdeki canlılık ölçümleri yapılmıştır. Her uygulama üçer kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır. Radyoterapi uygulanan plakalardaki canlı hücre sayısının ortalaması, kontrol plakasındaki canlı hücre sayısının ortalamasına oranlanmıştır. Bu oran 100 ile çarpılıp

“%” hücre canlılığı hesaplanmıştır. Yüzde sitotoksosite, ölçümlenen hücre canlılığı verilerinden dolaylı olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ sitotoksosite} = 100 - \left[\frac{(\text{ilaç (veya radyasyon) uygulanmış plakalardaki canlı hücre sayısının ortalaması}) \times 100}{\text{Pozitif Kontrol Plakalarındaki canlı hücre sayısının ortalaması}} \right]$$

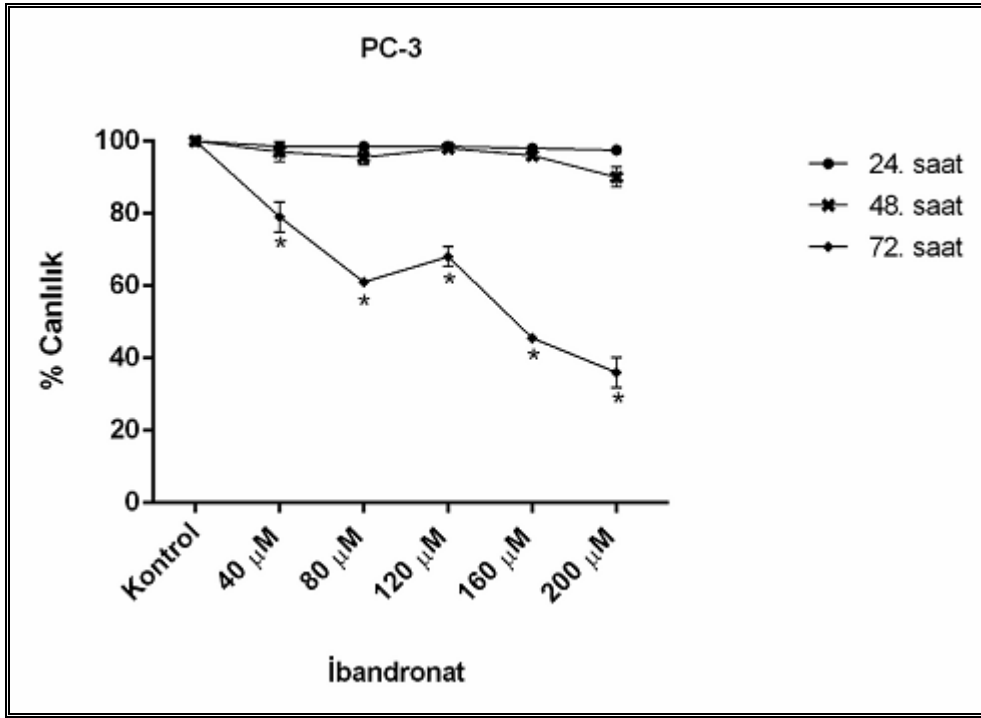
Hücrelerin bulunduğu plakaların radyoterapi cihazına gidene kadar dış ortam etkenlerinden korunması için her bir plaka parafilm ile kaplanmıştır. Radyoterapi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında, “Elekta Precise” lineer hızlandırıcıda 6 MV foton ile uygulanmıştır. Plaka kalınlığı ve parafilm göz önünde bulundurularak plakalar su eşdeğeri 30x30 cm alan boyutunda 1cm kalınlığında RW3 katı su fantomu üzerine oturtularak ışınlama yapılmıştır.

Ardışık uygulama deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında ilaçların XTT ve radyoterapi uygulaması sonuçlarına göre IC₅₀'den düşük ve IC₅₀'ye en yakın iki konsantrasyon seçilmiştir. Hücre ekimi 24 saat önce yapılmış olan plakaların her bir kuyucuğuna seçilen ilaç konsantrasyonları besiyerinde karıştırılıp uygulanmış ve %5 CO₂, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Işınlanacak plakalar için uygulama öncesinde kuyucuklardan ilaçlı besiyerleri çekilmiştir. Kuyucuklar 500 µl PBS ile yıkanıp üzerlerine 3000 ml taze besiyeri eklenmiştir. Radyasyon uygulamasından sonra ardışık uygulama deneyinin 24 saat ilaç – 24. saat radyasyon ve 24 saat ilaç – 48. saat radyasyon etkilerinin hücre canlılığına etkisi tripan mavisi yöntemiyle ölçülmüştür. Konsantrasyon-etki değerleri “Graphpad Prism 6.0” istatistik yazılımında istatistiksel analize tabi tutulmuş, grafikler yine aynı program kullanılarak çizilmiştir. İstatistiksel analizlerde ANOVA ve Dunnett's t-testleri kullanılmış, p değerinin <0,05 olması istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

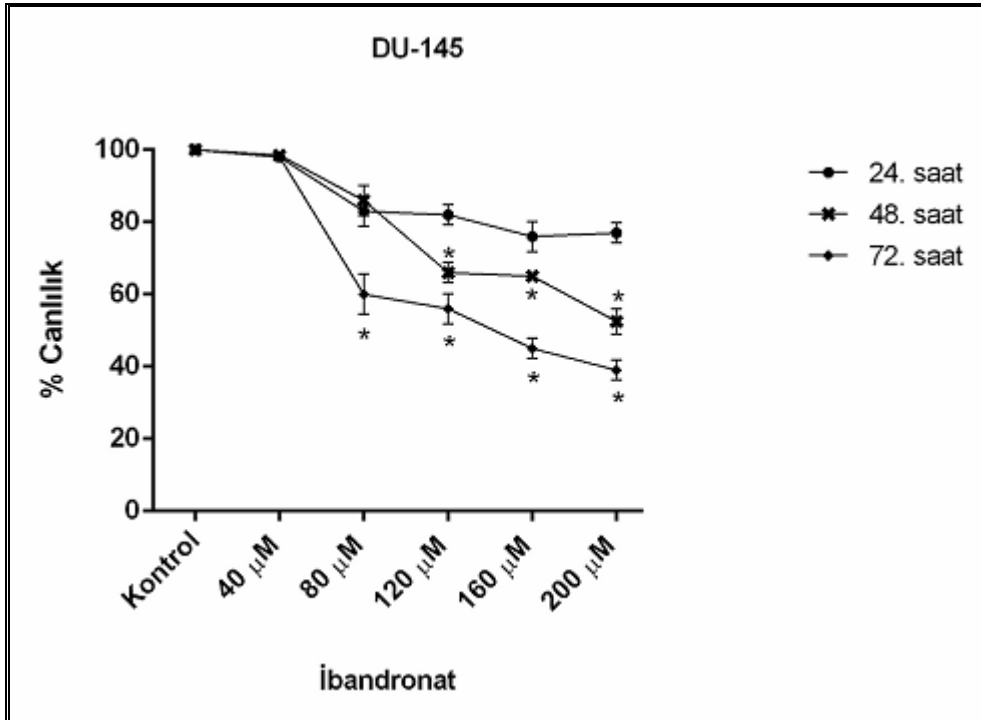
4. BULGULAR

Hormona dirençli PC-3 ve DU-145 prostat kanseri hücre hatlarında ibandronat, zoledronik asit ve radyoterapinin ayrı ayrı uygulanması, ibandronatla radyoterapinin ve zoledronik asitle radyoterapinin ardışık uygulanması ile oluşan sitotoksosite araştırılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir. İbandronat, zoledronik asit ve radyoterapinin ayrı ayrı, ardışık ve eşzamanlı uygulamalarından sonra yapılan değerlendirmede eşzamanlı uygulamanın etkin olmadığı belirlendiğinden eşzamanlı uygulama sonuçları kullanılmamıştır.

1. 96 kuyucuklu mikro plakalarda 10^4 hücreye uygulanan 40-80-120-160-200 μM ibandronat ve 20-40-80-120-160-200 μM zoledronik asit konsantrasyonlarının PC-3 ve DU-145 hücre hatlarındaki canlı hücre sayısı XTT ile “ELISA Reader”da 24, 48, 72. saatlerde değerlendirildiğinde:
 - PC-3 hücre hattında ibandronat uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde hücrelerin canlılığının değişmediği görülmüştür. Hücre canlılığı 72. saatte azalmaya başlamıştır (Grafik 1).
 - DU-145 hücre hattında ibandronat uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde en düşük ibandronat konsantrasyonlarında bile hücre canlılığında %20-30 azalma görülmüş, 72. saatte canlı hücre sayısında belirgin azalma gözlemlenmiştir (Grafik 2).
 - İbandronatın IC_{50} değeri “Calculusyn 2.1” yazılımı hesaplamalarına göre 72. saatte PC-3 hücre hattında 132 μM , DU-145 hücre hattında 153 μM konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Grafik 1, 2).
 - İbandronatın IC_{50} 'ye yakın en düşük konsantrasyonları PC-3 hücre hattında 40 ve 80 μM , DU-145 hücre hattında 80 ve 120 μM olarak belirlenmiştir.

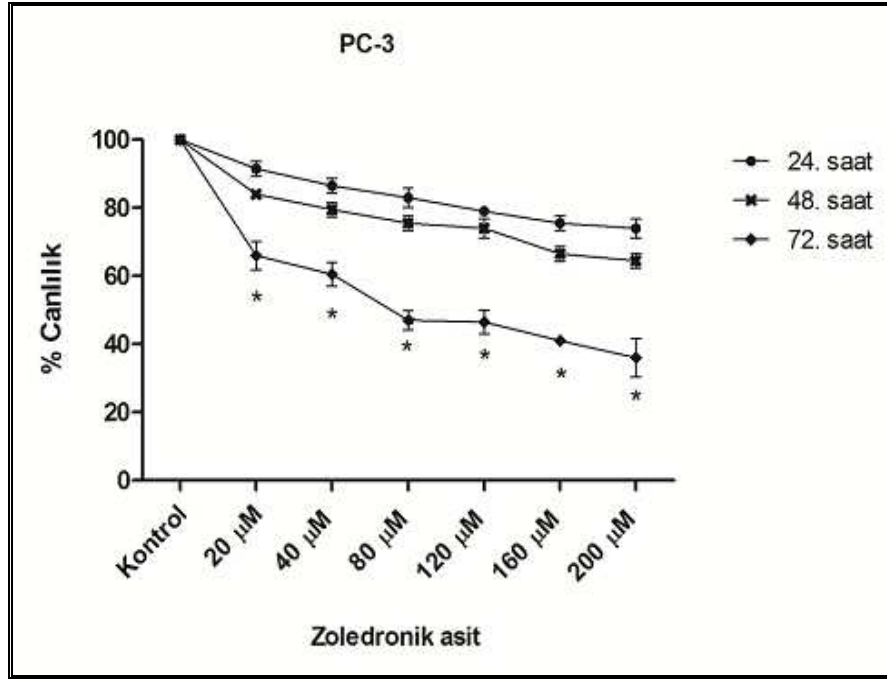


Grafik 1. PC-3 hücre hattına uygulanan çeşitli konsantrasyonlarda ibandronatın 24, 48, 72. saatlerde hücre canlılığına etkisi (*ANOVA, $p < 0,05$).



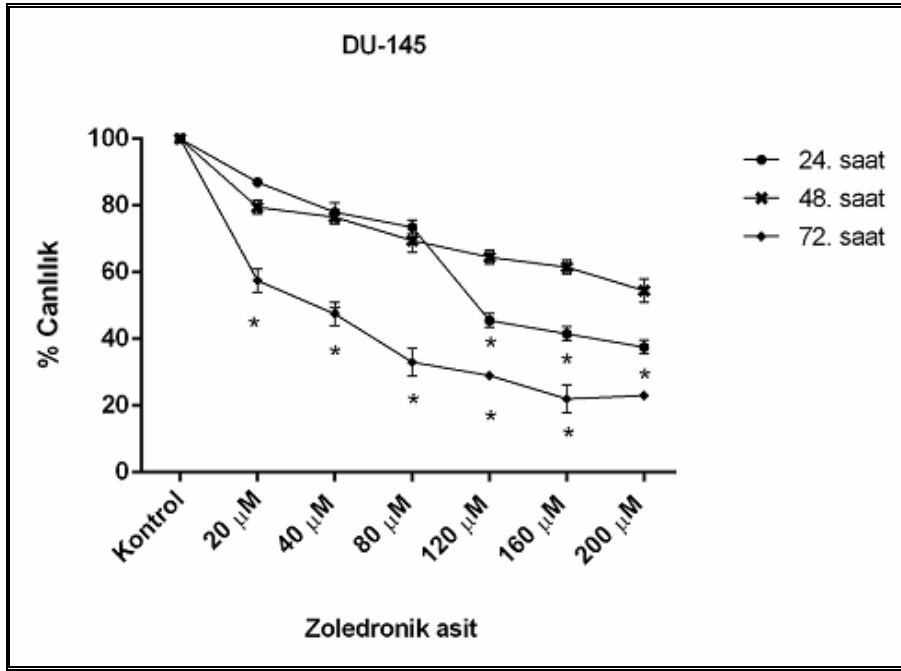
Grafik 2. DU-145 hücre hattına uygulanan çeşitli konsantrasyonlarda ibandronatın 24, 48, 72. saatlerde hücre canlılığına etkisi (*ANOVA, $p < 0,05$).

- PC-3 hücre hattında zoledronik asit uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde hücrelerin canlılığında %20-30 azalma görülmüş ve azalma yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur. 72. saatte ise canlı hücre sayısında belirgin bir azalma görülmüştür (Grafik 3).



Grafik 3. PC-3 hücre hattına uygulanan çeşitli konsantrasyonlarda zoledronik asidin 24, 48, 72. saatlerde hücre canlılığına etkisi (*ANOVA, p<0,05).

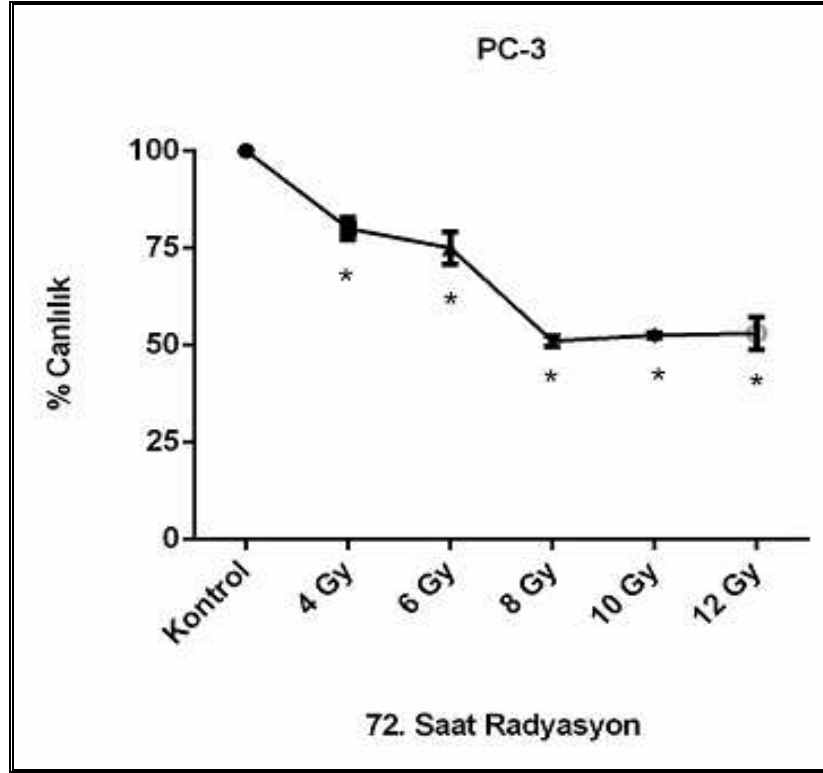
- DU-145 hücre hattında zoledronik asit uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde en düşük zoledronik asit konsantrasyonlarında bile hücre canlılığında %20'ye yakın azalma görülmüştür. 72. saatte hücre canlılığında belirgin azalma gözlemlenmiştir (Grafik 4).
- Zoledronik asitin IC₅₀ değeri "CalcuSyn 2.1" yazılımı hesaplamalarına göre 72. saatte PC-3 hücre hattında 75 µM konsantrasyon, DU-145 hücre hattında 39 µM konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Grafik 3, 4).
- Zoledronik asitin IC₅₀'ye yakın en düşük konsantrasyonları PC-3 hücre hattında 40 ve 80 µM, DU-145 hücre hattında 20 ve 40 µM olarak belirlenmiştir (Tablo 1).



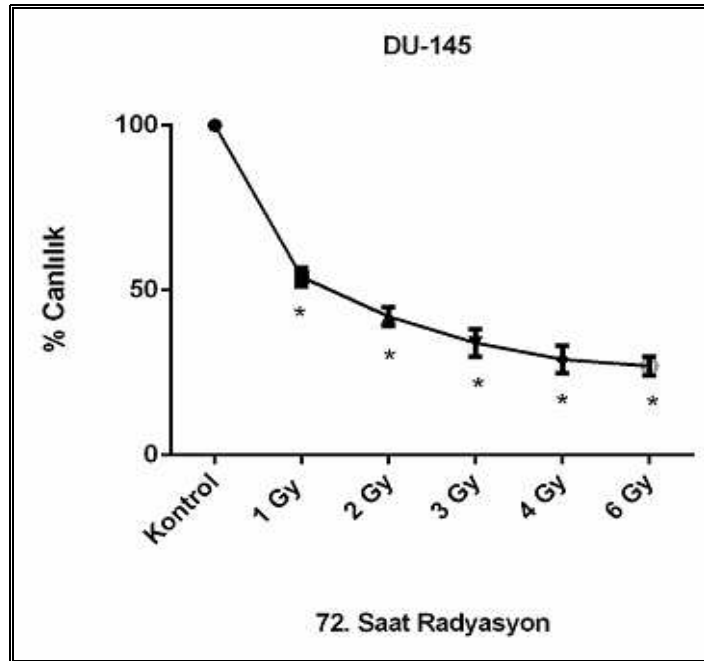
Grafik 4. DU-145 hücre hattına uygulanan çeşitli konsantrasyonlarda zoledronik asidin 24, 48, 72. saatlerde hücre canlılığına etkisi (*ANOVA, p<0,05).

2. 6 kuyucuklu plakalarda 5×10^5 hücreye uygulanan radyoterapinin PC-3 hücre hattı için 4, 6, 8, 10, 12 Gy, DU-145 hücre hattı için 1, 2, 3, 4, 6 Gy dozlarının hücre canlılığına etkileri tripan mavisi yöntemiyle 24, 48, 72. saatlerde değerlendirildiğinde:

- Her iki hücre hattında radyoterapi uygulandıktan sonra IC_{50} ve IC_{50} 'ye en yakın değerler 72. saatte görülmüştür. IC_{50} 'ye en yakın değerler PC-3 hücre hattı için 6 ve 8 Gy, DU-145 hücre hattı için 1 ve 2 Gy olarak belirlenmiştir (Grafik 5, 6. Tablo 1)



Grafik 5. PC-3 hücrelerine uygulanan çeşitli dozlarda radyoterapinin 72. saatte hücre canlılığına etkisi (*ANOVA, $p < 0,05$).



Grafik 6. DU-145 hücrelerine uygulanan çeşitli dozlarda radyoterapinin 72. saatte hücre canlılığına etkisi (*ANOVA, $p < 0,05$).

3. Ardışık uygulama deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında ilaçların IC₅₀'den düşük, IC₅₀'ye en yakın iki konsantrasyonu seçilmiştir. Buna göre PC-3 hücre hattında ibandronatın 40 ve 80 µM, DU-145 hücre hattında 80 ve 120 µM, zoledronik asitin PC-3 hücre hattında 40 ve 80 µM, DU-145 hücre hattında 20 ve 40 µM konsantrasyonları seçilmiştir. IC₅₀'ye yakın radyoterapi dozu olarak PC-3 hücre hattında 6 ve 8 Gy, DU-145 hücre hattında 1 ve 2 Gy seçilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Zoledronik asit, ibandronat ve radyoterapinin hücre hatlarına uygulanan konsantrasyon ve doz değerleri

	PC-3 hücre hattı	DU-145 hücre hattı
Zoledronik asit konsantrasyonları	40 ve 80 µM	20 ve 40 µM
İbandronat konsantrasyonları	40 ve 80 µM	80 ve 120 µM
Radyoterapi dozları	6 ve 8 Gy	1 ve 2 Gy

4. Prostat hücre hatlarında radyoterapi, zoledronik asit ve ibandronatın ayrı ayrı uygulanmasının hücre canlılığına etkileri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir) aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- PC-3 hücre hattında zoledronik asit ve ibandronat uygulandıktan 24 saat sonraki değerlendirmede 40 µM zoledronik asit ve 40 µM ibandronat konsantrasyonlarında hücre canlılığında az miktarda azalma olmuş, fakat her iki ilacın da 80 µM konsantrasyonları hücre canlılığında anlamlı azalmaya yol açmıştır (p<0,05) (Tablo 2).

Tablo 2. PC-3 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronat (İBA) uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, p<0,05)

PC-3 hücre hattı	
Uygulanan konsantrasyonlar	Hücre canlılığı (%)
40 µM ZA	97
80 µM ZA	60*
40 µM İBA	98
80 µM İBA	71*

- DU-145 hücre hattında zoledronik asit ve ibandronat uygulandıktan 24 saat sonraki değerlendirmede 20 µM zoledronik asit konsantrasyonu hücre canlılığında az miktarda azalmaya yol açmış, fakat 40 µM zoledronik asit, 80 ve 120 µM ibandronat konsantrasyonlarında hücre canlılığı anlamlı olarak azalmıştır (p<0,05) (Tablo 3).

Tablo 3. DU-145 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronat (İBA) uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, p<0,05)

DU-145 hücre hattı	
Uygulanan konsantrasyonlar	Hücre canlılığı (%)
20 µM ZA	87,5
40 µM ZA	76*
80 µM İBA	74*
120 µM İBA	68*

- PC-3 hücre hattında hem 6 Gy, hem de 8 Gy radyoterapi uygulanmasından 24 saat ve 48 saat sonraki değerlendirmelerde hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür (p<0,05) (Tablo 4).

Tablo 4. PC-3 hücre hattında ışınlama sonrası 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı (*ANOVA, p<0,05)

PC-3 hücre hattı		
	Hücre canlılığı (%)	
RT dozu (Gy)	24 saat sonra	48 saat sonra
6	56*	71*
8	47*	69*

- DU-145 hücre hattında hem 1 Gy, hem de 2 Gy radyoterapi uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılığı kontrol grubuna göre yüksek oranda azalmıştır (p<0,05). 1 ve 2 Gy'lik dozlar arasında 24. saatte hücre canlılığında anlamlı fark yok iken, 48. saatte yalnızca 2 Gy'lik doz ile anlamlı azalma tespit edilmiştir (p<0,0001) (Tablo 5).

Tablo 5. DU-145 hücre hattında radyoterapi sonrası 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı (*ANOVA, p<0,05)

	Hücre canlılığı (%)	
RT dozu (Gy)	24 saat sonra	48 saat sonra
1	54*	89
2	42*	51,5*

5. PC-3 hücre hattında zoledronik asit ve ibandronatın radyoterapi ile ardışık uygulanmasının hücre canlılığına etkileri değerlendirildiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:
- PC-3 hücre hattında 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 24. ve 48. saatlerde 6 ve 8 Gy radyoterapiyle ardışık uygulanması değerlendirildiğinde her iki kolda da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığında yüksek oranda azalma görülmüştür (p<0,0001) (Tablo 6).

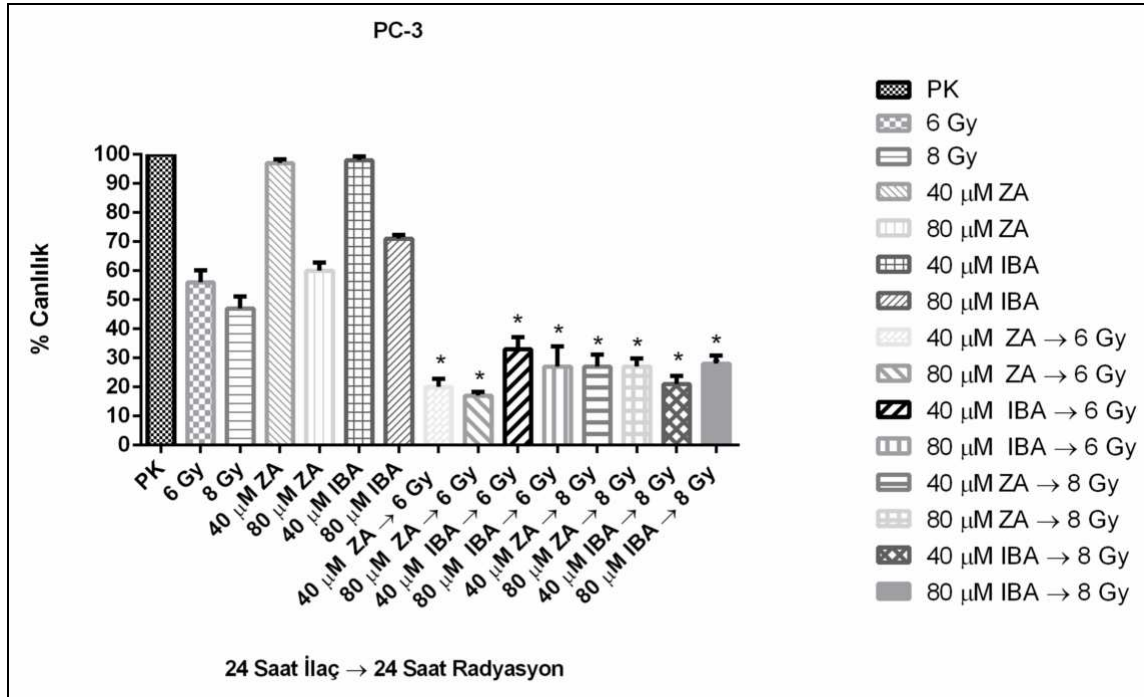
Tablo 6. PC-3 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) radyoterapi ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (ANOVA, tüm kollarda $p<0,0001$)

PC-3 hücre hattı			
24 saat ZA, İBA, 24. saat RT		24 saat ZA, İBA, 48. saat RT	
Uygulanan konsantrasyon-doza	Hücre canlılığı (%)	Uygulanan konsantrasyon-doza	Hücre canlılığı (%)
40 μ M ZA-6 Gy	20	40 μ M ZA-6 Gy	25
80 μ M ZA-6 Gy	17	80 μ M ZA-6 Gy	29
40 μ M İBA-6 Gy	33	40 μ M İBA-6 Gy	27
80 μ M İBA-6 Gy	27	80 μ M İBA-6 Gy	26
40 μ M ZA-8 Gy	27	40 μ M ZA-8 Gy	32
80 μ M ZA-8 Gy	27	80 μ M ZA-8 Gy	18
40 μ M İBA-8 Gy	21	40 μ M İBA-8 Gy	30
80 μ M İBA-8 Gy	28	80 μ M İBA-8 Gy	19,5

- PC-3 hücre hattında zoledronik asit ve radyoterapinin ardışık uygulanmasıyla ibandronat ve radyoterapinin ardışık uygulanması birbiriyle karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki azalma oranları birbirine yakın bulunmuştur ($p>0,05$). Benzer şekilde ardışık radyoterapinin 24. veya 48. saatlerde uygulanması hücre canlılığı bakımından belirgin fark yaratmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 6, Grafik 7, 8).
- PC-3 hücre hattında 24 saat ibandronat ve zoledronik asitin tek başına uygulanmasıyla 24 saat ibandronat ve zoledronik asitle 24. saat radyoterapinin ardışık uygulanması karşılaştırıldığında hücre canlılığında daha yüksek oranda azalma görülmüştür ($p<0,0001$) (Tablo 7, Grafik 7).
- PC-3 hücre hattında 24 saat ibandronat ve zoledronik asitin tek başına uygulanmasıyla 24 saat ibandronat ve zoledronik asitle 48. saat radyoterapinin ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada hücre canlılığında daha belirgin azalma görülmüştür ($p<0,0001$) (Tablo 8, Grafik 8)

Tablo 7. PC-3 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) tek başına ve 24. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, p <0,0001)

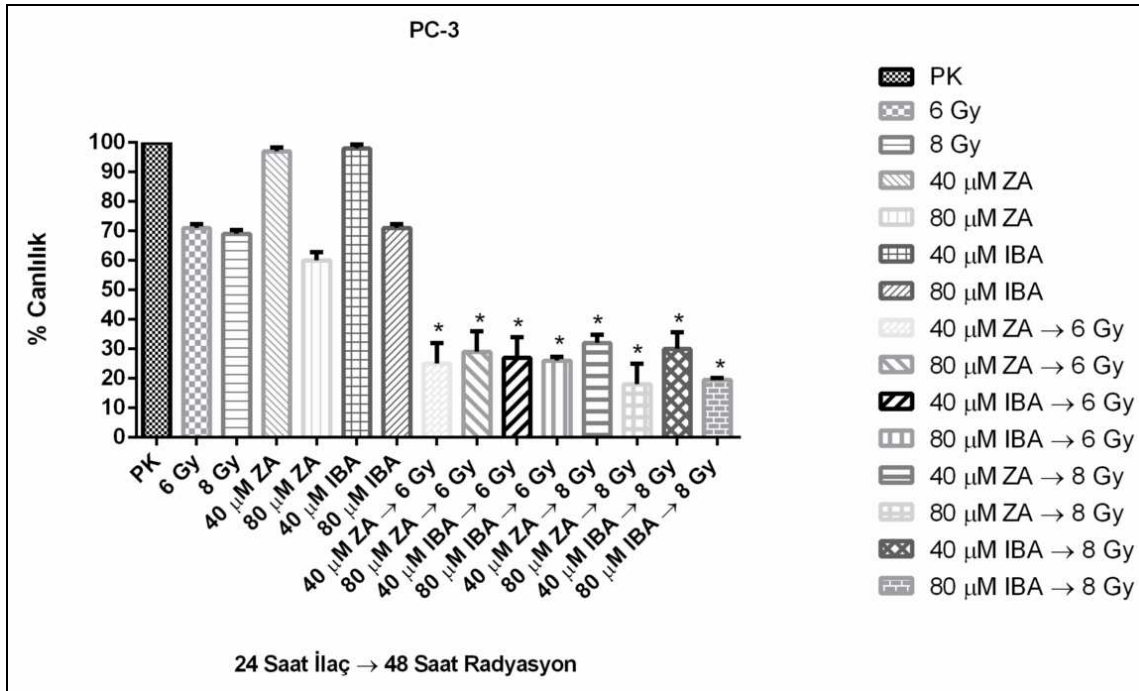
PC-3 hücre hattı	
24 saat ZA ve İBA	Hücre canlılığı (%)
40 µM ZA	97
80 µM ZA	60
40 µM İBA	98
80 µM İBA	71
24 saat ZA ve İBA, 24. saat RT	
40 µM ZA-6 Gy	20*
80 µM ZA-6 Gy	17*
40 µM İBA-6 Gy	33*
80 µM İBA-6 Gy	27*
40 µM ZA-8 Gy	27*
80 µM ZA-8 Gy	27*
40 µM İBA-8 Gy	21*
80 µM İBA-8 Gy	28*



Grafik 7. PC-3 hücre hattında 24. saat radyoterapi, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) ayrı ayrı ve 24. saat radyoterapiyle ardışık uygulanmasının hücre canlılığına etkisinin kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırılması (*ANOVA, p <0,05).

Tablo 8. PC-3 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) tek başına ve 48. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, p <0,0001)

PC-3 hücre hattı	
24 saat ZA ve İBA uygulanması	Hücre canlılığı (%)
40 µM ZA	97
80 µM ZA	60
40 µM İBA	98
80 µM İBA	71
24 saat ZA ve İBA, 48. saat RT	
40 µM ZA-6 Gy	25*
80 µM ZA-6 Gy	29*
40 µM İBA-6 Gy	27*
80 µM İBA-6 Gy	26*
40 µM ZA-8 Gy	32*
80 µM ZA-8 Gy	18*
40 µM İBA-8 Gy	30*
80 µM İBA-8 Gy	19,5*



Grafik 8. PC-3 hücre hattında 48. saat radyoterapi, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) ayrı ayrı ve 48. saat radyoterapiyle ardışık uygulanmasının hücre canlılığına etkisinin kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırılması (*ANOVA, p <0,05).

- PC-3 hücre hattında 24. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla, 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 24. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada canlı hücre sayısında daha belirgin azalma görülmüştür ($p < 0,0001$) (Tablo 9, Grafik 7). Ardışık uygulamada radyoterapi dozunun 6 veya 8 Gy olması hücre canlılığı bakımından anlamlı fark yaratmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 9. PC-3 hücre hattında 24. saat radyoterapinin tek başına, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) 24. saat radyoterapi (RT) ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, $p < 0,0001$)

PC-3 hücre hattı	
24. saat RT	Hücre canlılığı (%)
6 Gy	56
8 Gy	47
24 saat ZA ve İBA, 24. saat RT	
40 μ M ZA-6 Gy	20*
80 μ M ZA-6 Gy	17*
40 μ M İBA-6 Gy	33*
80 μ M İBA-6 Gy	27*
40 μ M ZA-8 Gy	27*
80 μ M ZA-8 Gy	27*
40 μ M İBA-8 Gy	21*
80 μ M İBA-8 Gy	28*

- PC-3 hücre hattında 48. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla, 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 48. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada canlı hücre sayısında daha belirgin azalma görülmüştür ($p < 0,0001$) (Tablo 10, Grafik 8). Ardışık uygulamada radyoterapi dozunun 6 veya 8 Gy olması hücre canlılığı bakımından anlamlı fark yaratmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 10. PC-3 hücre hattında 48. saat radyoterapinin tek başına, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatin (İBA) 48. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, $p < 0,0001$)

PC-3 hücre hattı	
48. saat RT	Hücre canlılığı (%)
6 Gy	71
8 Gy	69
24 saat ZA ve İBA, 48. saat RT	
40 μ M ZA-6 Gy	25*
80 μ M ZA-6 Gy	29*
40 μ M İBA-6 Gy	27*
80 μ M İBA-6 Gy	26*
40 μ M ZA-8 Gy	32*
80 μ M ZA-8 Gy	18*
40 μ M İBA-8 Gy	30*
80 μ M İBA-8 Gy	19.5*

6. DU-145 hücre hattında zoledronik asit ve ibandronatin radyoterapi ile ardışık uygulanmasının hücre canlılığına etkileri değerlendirildiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

- DU-145 hücre hattında 24 saat zoledronik asit ve ibandronatin 24. ve 48. saatlerde 1 ve 2 Gy radyoterapiyle ardışık uygulanması değerlendirildiğinde her iki kolda da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığında yüksek oranda azalma görülmüştür ($p < 0,0001$) (Tablo 11).
- DU-145 hücre hattında zoledronik asit ve radyoterapinin ardışık uygulanmasıyla ibandronat ve radyoterapinin ardışık uygulanması birbiriyle karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki azalma oranları birbirine yakın bulunmuştur ($p > 0,05$). Benzer şekilde ardışık radyoterapinin 24. veya 48. saatlerde uygulanması hücre canlılığı bakımından belirgin fark yaratmamıştır ($p > 0,05$). Sadece 24 saat zoledronik asit ve ibandronatin yüksek konsantrasyonları (sırasıyla 40 μ M ve 120 μ M) ile 48. saat yüksek doz (2 Gy) radyoterapinin ardışık uygulanmasıyla (yüksek konsantrasyon \rightarrow yüksek doz) elde edilen

hücre canlılığındaki azalma zoledronik asit ve ibandronatın düşük konsantrasyonları (sırasıyla 20 µM ve 80 µM) ile 48. saat düşük doz (1 Gy) radyoterapinin (düşük konsantrasyon→düşük doz) ardışık uygulanmasıyla elde edilenden daha fazla bulunmuştur (p <0,05) (Tablo 11, Grafik 9, 10).

Tablo 11. DU-145 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) radyoterapi (RT) ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (ANOVA, tüm kollarda p<0,0001)

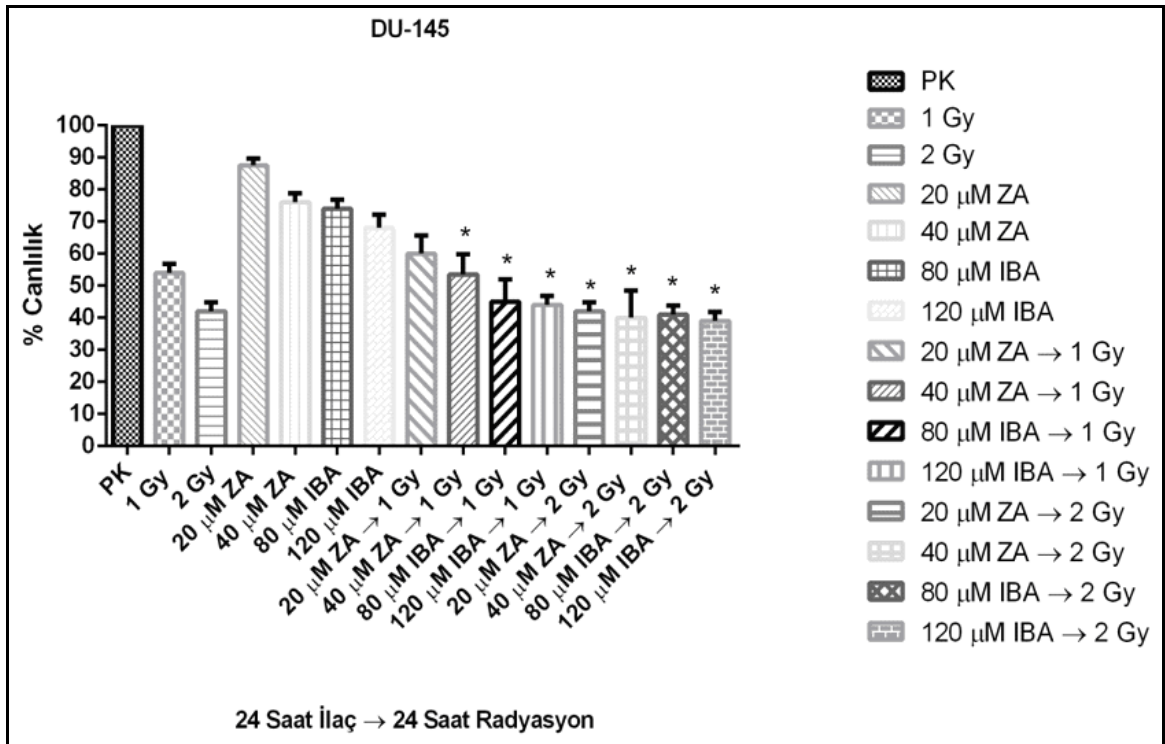
DU-145 hücre hattı			
24 saat ZA, İBA, 24. saat RT		24 saat ZA, İBA, 48. saat RT	
Uygulanan konsantrasyon-doza	Hücre canlılığı (%)	Uygulanan konsantrasyon-doza	Hücre canlılığı (%)
20 µM ZA-1 Gy	60	**20 µM ZA-1 Gy	**52
40 µM ZA-1 Gy	53,5	40 µM ZA-1 Gy	32
80 µM İBA-1 Gy	45	**80 µM İBA-1 Gy	**54
120 µM İBA-1 Gy	44	120 µM İBA-1 Gy	41
20 µM ZA-2 Gy	42	20 µM ZA-2 Gy	33
40 µM ZA-2 Gy	40	*40 µM ZA-2 Gy	*22
80 µM İBA-2 Gy	41	80 µM İBA-2 Gy	30
120 µM İBA-2 Gy	39	*120 µM İBA-2 Gy	*24

(**Düşük konsantrasyon→düşük doz) vs (*Yüksek konsantrasyon→yüksek doz)(p<0,05)

- DU-145 hücre hattında 24 saat ibandronat ve zoledronik asitin tek başına uygulanmasıyla 24 saat ibandronat ve zoledronik asitle 24. saat radyoterapinin ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada hücre canlılığında daha yüksek oranda azalma görülmüştür (p<0,0001) (Tablo 12, Grafik 9).

Tablo 12. DU-145 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) tek başına ve 24. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, p <0,0001)

DU-145 hücre hattı	
24 saat ZA ve İBA	Hücre canlılığı (%)
20 µM ZA	87,5
40 µM ZA	76
80 µM İBA	74
120 µM İBA	68
24 saat ZA ve İBA, 24. saat RT	
20 µM ZA-1 Gy	60*
40 µM ZA-1 Gy	53,5*
80 µM İBA-1 Gy	45*
120 µM İBA-1 Gy	44*
20 µM ZA-2 Gy	42*
40 µM ZA-2 Gy	40*
80 µM İBA-2 Gy	41*
120 µM İBA-2 Gy	39*



Grafik 9. DU-145 hücre hattında 24. saat radyoterapi, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) ayrı ayrı ve 24. saat radyoterapiyle ardışık uygulanmasının hücre canlılığına etkisinin kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırılması (*ANOVA, p <0,05).

- DU-145 hücre hattında 24 saat ibandronat ve zoledronik asitin tek başına uygulanmasıyla 24 saat ibandronat ve zoledronik asitle 48. saat radyoterapinin ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada hücre canlılığında daha belirgin azalma görülmüştür ($p < 0,0001$) (Tablo 13, Grafik 10).

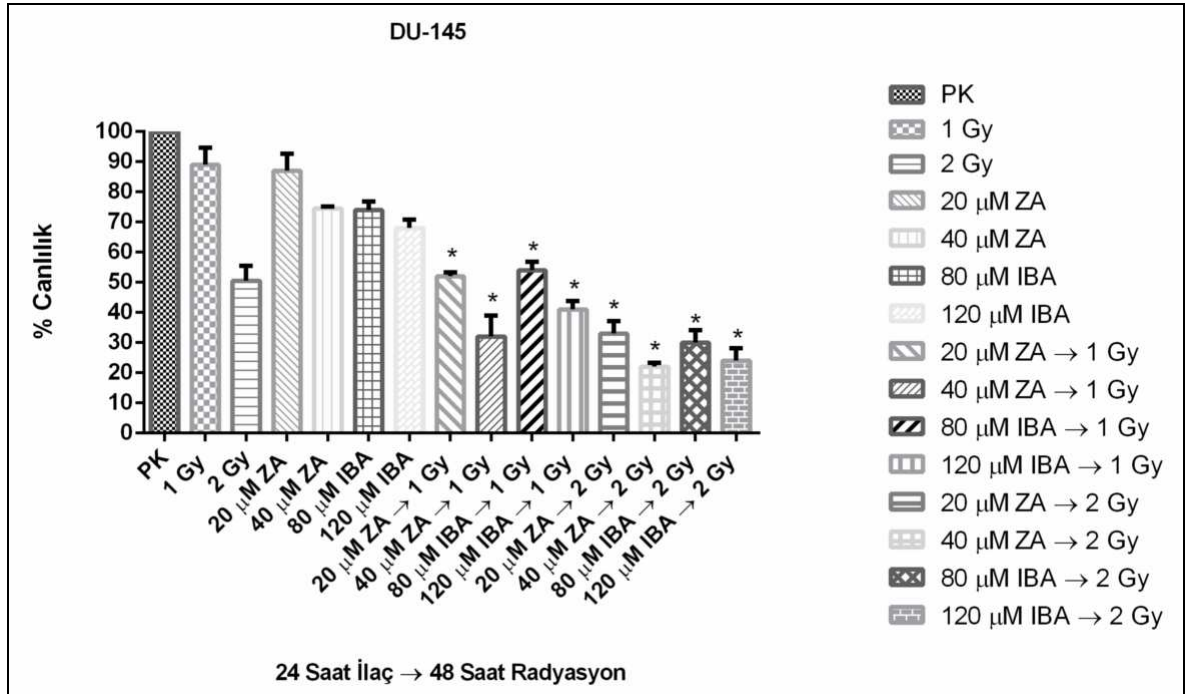
Tablo 13. DU-145 hücre hattında zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) tek başına ve 48. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (*ANOVA, $p < 0,0001$)

DU-145 hücre hattı	
24 saat ZA ve İBA	Hücre canlılığı (%)
20 μ M ZA	87,5
40 μ M ZA	76
80 μ M İBA	74
120 μ M İBA	68
24 saat ZA ve İBA, 48. saat RT	
20 μ M ZA-1 Gy	52*
40 μ M ZA-1 Gy	32*
80 μ M İBA-1 Gy	54*
120 μ M İBA-1 Gy	41*
20 μ M ZA-2 Gy	33*
40 μ M ZA-2 Gy	22*
80 μ M İBA-2 Gy	30*
120 μ M İBA-2 Gy	24*

- DU-145 hücre hattında 24. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla, 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 24. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada canlı hücre sayısında daha belirgin azalma olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Tablo 14).

Tablo 14. DU-145 hücre hattında 24. saat radyoterapinin tek başına, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) 24. saat radyoterapi (RT) ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (ANOVA, $p>0,05$)

DU-145 hücre hattı	
24. saat RT	Hücre canlılığı (%)
1 Gy	54
2 Gy	42
24 saat ZA ve İBA, 24. Saat RT	
20 μ M ZA-1 Gy	60
40 μ M ZA-1 Gy	53,5
80 μ M İBA-1 Gy	45
120 μ M İBA-1 Gy	44
20 μ M ZA-2 Gy	42
40 μ M ZA-2 Gy	40
80 μ M İBA-2 Gy	41
120 μ M İBA-2 Gy	39



Grafik 10. DU-145 hücre hattında 48. saat radyoterapi, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) ayrı ayrı ve 48. saat radyoterapiyle ardışık uygulanmasının hücre canlılığına etkisinin kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırılması (*ANOVA, $p < 0,05$).

- DU-145 hücre hattında 48. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla, 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 48. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada canlı hücre sayısında daha belirgin azalma görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 15, Grafik 10).
- Tek başına 2 Gy radyoterapi uygulanması ile 20 μ M zoledronik asit-1 Gy radyoterapi, 80 μ M ibandronat-1 Gy radyoterapi ardışık kollarının hücre canlılığı birbirine yakın bulunmuştur (sırasıyla %51,5, %52 ve %54) ($p > 0,05$) (Tablo 15, Grafik 10).

Tablo 15. DU-145 hücre hattında 48. saat radyoterapi tek başına, 24 saat zoledronik asit (ZA) ve ibandronatın (İBA) 48. saat radyoterapi (RT) ile ardışık uygulanması sonrası hücre canlılığı (ANOVA, $p < 0,05$)

DU-145 hücre hattı	
48. saat RT	Hücre canlılığı (%)
1 Gy	89
2 Gy	51,5
24 saat ZA ve İBA, 48. Saat RT	
20 μ M ZA-1 Gy	52*
40 μ M ZA-1 Gy	32*
80 μ M İBA-1 Gy	54*
120 μ M İBA-1 Gy	41*
20 μ M ZA-2 Gy	33*
40 μ M ZA-2 Gy	22*
80 μ M İBA-2 Gy	30*
120 μ M İBA-2 Gy	24*

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde kanserli hastaların 1,5 milyondan fazlasında kemik metastazı gelişmekte ve %80'den fazlasını meme ve prostat kanserli olgular oluşturmaktadır (106, 107). Özellikle prostat kanserinin kemiğe ayrı bir afinitesi olup hemen hemen tek metastaz yeri kemiktir. Hastalığın genel seyrinde kemik metastazları asemptomatiktir, ancak sonuçta hastaların en az %35-45'inde kemik ağrısı, %14-22'sinde patolojik fraktür, %3-7'sinde medulla spinalis basısı olacağı bildirilmektedir (108-110). Kemik metastazlarına bağlı nörolojik, metabolik ve fonksiyonel bozukluklar hastanın hayat kalitesini ve yaşam süresini olumsuz olarak etkilediğinden mutlaka tedavi edilmesi gerekir. Kemik metastazlarında tedavinin amacı hastanın yaşam kalitesini yükseltmek, ağrı palyasyonu sağlamak, fraktür olasılığını azaltmak, mobilite ve fonksiyonları arttırmak ve kısmen yaşam süresini uzatmaktır. Bu amaçla multidisipliner yaklaşımla radyoterapi, bifosfonatlar, sistemik ajanlar, radyonüklid tedaviler, analjezikler, gerektiğinde de cerrahi gibi tedavilere başvurulmaktadır. Bu tedavi yöntemleri içinde en sık uygulananlar ise radyoterapi ve bifosfonatlardır.

Radyoterapi kısa sürede oluşturduğu ağrı palyasyonu ve bunun çoğu zaman uzun etkili olması, bifosfonat kullanımıyla birlikte iyileşmeye yardımcı olması ve minimal toksik etkisi nedeniyle kemik metastazlarının tedavisinde ilk tercih edilen palyasyon yöntemidir. Radyoterapi ile hastaların %50-80'inde ağrı palyasyonu sağlanmakta, 1/3'ünden fazlasında ağrı tamamen kaybolmaktadır. Prospektif randomize çalışmalarda ağrılı kemik metastazlarında uygulanmış farklı doz şemalarında ağrı palyasyonunda benzer etkinlik görülmekle birlikte, tek fraksiyonluk şema uygulananlarda palyasyon süresinin daha kısa, yeniden ışınlama gereksiniminin iki-üç kat fazla olduğu belirtilmektedir (8, 60, 62-64).

Bifosfosfonatlar kemik metastazlarına bağlı komplikasyonların önlenmesinde en etkili standart tedavi ajanları olup kemik metastazlarına bağlı gelişen iskeletle ilişkili olayları

azaltmakta ve ağrı palyasyonu sağlayarak yaşam kalitesini artırmaktadırlar. Fosfat analogu olan bifosfonatlar kemik mineralizasyonunun doğal inhibitörüdür. Absorbe olarak kemiğin hidroksiapatit kristallerine bağlanıp kemik mineral stabilizasyonunu sağlarlar ve çeşitli mekanizmalarla osteoklast fonksiyonunu inhibe ederler (75, 92).

Meme kanserinin kemik metastazlarında oral klodronat, oral veya intravenöz ibandronat, intravenöz pamidronat ve zoledronik asid kullanılabılırken prostat kanserlerinde sadece zoledronik asid lisanslı ürün olup 2002 yılında kastrasyona dirençli metastatik prostat kanseri olan 643 hastada yapılan randomize çalışmanın sonucuna göre onay almıştır (14). Zoledronik asid kemik metastazı olan hastalarda iskeletle ilişkili olayları azaltmakta, kemik mineral dansitesini arttırıp N-telopeptidleri ve kemiğe özgül alkale fosfatazı baskılayarak kemik kaybını önlemekte, ayrıca androjen baskılanma tedavisi alan metastatik olmayan prostat kanserli olgularda kemik kaybını önlemektedir (4, 14, 111). Kanser hücre hatlarında üzerinde en yoğun çalışılan bifosfonat olup apoptozu indüklediği, proliferasyonu önlediği, doğrudan tümör hücrelerinin invazyonunu ve adhezyonunu önlediği gösterilmiş, aynı zamanda çeşitli fare modellerinde endotel hücre proliferasyonunu, adhezyonunu ve migrasyonunu indirekt olarak önlediği, kapiller dolaşımı engellediği, in vitro olarak ve hayvan modellerinde de vasküler endotelyal büyüme faktörlerinin düzeyini düşürdüğü ortaya konmuştur (112, 113, 114). Meme ve prostat kanseri hücre hatları ve in vivo tümör modellerinde zoledronik asidin kemoterapiyle sinerjistik etki edip tümör hücrelerinin büyümesini, invazyonunu ve sağkalımını önlediği, özellikle kemoterapinin zoledronik asidden önce uygulanmasının antikanser aktiviteyi daha çok arttırdığı ve kombine tedavilerin daha etkin olduğu gösterilmiştir (115, 116, 117). Zoledronik asidin yanı sıra ibandronat, pamidronat ve klodranat dahil birçok bifosfonatın antikanser aktiviteleri ve kemoterapiyle sinerjistik etkileri in vitro ve in vivo modellerde ispatlanmıştır (15, 114, 119). Zoledronik asidin antikanser aktivitesi prelinik düzeyde, translasyonel

çalışmalarda çok iyi bir şekilde ortaya konmuş olup randomize klinik çalışmalar da zoledronik asidin standart adjuvan tedaviye eklenmesinin klinik yararlarını ortaya koymuştur (120-124).

Nadir olmakla birlikte zoledronik asidin en önemli komplikasyonu nefrotoksisite olup faz III çalışmalarda %2,6-25 oranında bildirilmektedir (125-128). İbandronat (109 hasta) veya zoledronik asid (256 hasta) uygulanmış meme, prostat, multipl myelom ve akciğer kanserli 333 hastanın renal toksisite yönünden retrospektif olarak yapılan değerlendirmesinde zoledronik asid alanlarda bazal renal fonksiyonlar daha iyi olmasına rağmen rölatif risk ve renal yetmezlik insidensinin ibandronata göre 1,5 kat fazla olduğu belirlenmiş, çok değişkenli analizde de zoledronik asidin olumsuz etkisi gösterilmiştir (129). Prostat kanserli hastalar genelde 65 yaş üzerindedir ve bir kısmında renal yetmezlik bulguları vardır. Zoledronik asidi tolere edemeyecek veya renal yetmezlik nedeniyle alamayacak olgularda alternatif bifosfonata ihtiyaç vardır. Bu hastalarda bir seçenek renal toksisiteye yol açmayan ibandronat olabilir.

İbandronatla ilgili çalışmalar daha çok meme kanserlerinde yapılmıştır. İn vitro ve meme kanserinin fare modellerinde yapılan in vivo çalışmalarda ibandronatın meme kanseri hücrelerinin büyümesini durdurduğu, apoptozu indüklediği, hatta uzun süreli hücre kültürlerinde apoptozu zoledronik asidden daha fazla indüklediği ve radyasyonla sinerjistik etki yaparak meme kanseri hücrelerinin büyümesini durdurduğu gösterilmiştir (24-27). Kemik metastazlı meme kanseri olgularında yapılmış faz III randomize klinik çalışmalarda oral ve intravenöz ibandronatın metastatik kemik ağrısının uzun dönem kontrolunda etkili olduğu, iskeletle ilgili komplikasyonların riskini azalttığı, hayat kalitesini yükselttiği belirtilmiştir (18, 19-23). Çalışmaların hepsinde ibandronatın iyi tolere edildiği ve renal toksisiteye yol açmadığı da vurgulanmıştır.

Uzun dönem bifosfonat tedavisi alan hastalarda beklenmeyen bir yan etki olarak %1-10 oranında çene osteonekrozu da bildirilmektedir. Hem oral (risedronat, ibandronat, alendronat, pamidronat) hem de intravenöz bifosfonat (zoledronik asid) kullanımı çene osteonekrozuyla

ilişkili olmasına rağmen zoledronik asid ve pamidronat alanlarda risk daha yüksek bulunmuştur (130). Bu riskten kaçınmak için ibandronat iyi bir bifosfonat seçeneği olabilir.

İbandronatın kemik metastazlı prostat kanserli hastalarda klinik etkinliğini inceleyen az sayıda hasta içeren, az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Heidenreich ve arkadaşları randomize olmayan prospektif çalışmalarında hormon refrakter prostat kanserine bağlı ağrılı kemik metastazı olan 25 hastaya 4 haftada bir 6 mg intravenöz ibandronat uygulamışlardır (131). Hastaların %92'sinde ağrı skorunda anlamlı azalma tespit edilmiş ($p<0,001$), %39 hastada tam ağrı palyasyonu sağlanmış ve %92'sinde günlük analjezik ihtiyacında belirgin azalma olmuştur. Diğer klinik çalışma da Heidenreich ve arkadaşları tarafından kemik metastazlı ürolojik kanserli (prostat, böbrek, mesane) 53 olguda yapılmıştır. Olgulara üç gün üstüste bir saatlik 6 mg ibandronat infüzyonu uygulanmış ve 4 hafta aralarla aynı uygulama tekrarlanmıştır (132). Olguların %83'ü ikinci günden başlamak üzere ağrıda belirgin azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmanın başında ortalama ağrı skoru 6,8 iken üçüncü günde 2,5'e inmiş ve 20 hafta süren çalışma boyunca bazal seviyenin altında kalmıştır. İbandronatın yükleme dozunda uygulanmasına rağmen daha önce renal yetmezliği olan olgularda bile renal toksisiteye rastlanmamıştır.

Prostat kanserli hastalarda oral ibandronatın etkinliğini araştıran tek randomize çalışmada prostat kanserli 16, meme kanserli 77, myelomlu 3 ve diğer solid tümörlü 14 hastada ibandronat (5, 10, 20, 50 mg) ve plasebo karşılaştırılmış, kalsiyum eksresyonu ve kollajen yıkım ürünlerinin düzeyine bakılmıştır (133). Çalışmanın sonucunda kalsiyum eksresyonunda ve kollajen yıkım ürünlerinin düzeyinde doza bağlı olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir. Hasta sayısı az olmakla birlikte tüm tümör tiplerinde benzer sonuçlar bulunmuştur. İngiltere'de 2003 yılında başlatılan faz III RIB çalışması (A prospective randomized trial comparing radiotherapy with single dose ibandronate in metastatic bone pain) kemik metastazlı prostat kanserlerinde radyoterapi ve ibandronatın etkinliğini birbiriyle karşılaştırmak amacıyla

planlanmış ve 2009 yılında 470 hastayla kapatılmış, ancak sonuçları henüz yayınlanmamıştır (134). Olguların yarısına tek doz 8 Gy radyoterapi, yarısına tek doz intravenöz ibandronat uygulanmıştır. Tedaviden yarar görmeyenler diğer kola geçirilmiştir. İbandronat alanların 1/3'ü radyoterapi, radyoterapi alanların ¼'ü ibandronat koluna geçmiştir. Tedaviden bir ay sonra yapılan değerlendirmede radyoterapi uygulananların %53'ünde, ibandronat alanların %49'unda ağrı palyasyonu sağlanmış, 3 ay sonra yapılan değerlendirmede aynı oranlar radyoterapi ve ibandronat için sırasıyla %49 ve %56 olarak bulunmuştur. Altıncı ve 12. ayda yapılan değerlendirmede ise ağrı düzeyi bakımından iki grup arasında fark saptanmamıştır. İbandronat her ne kadar prostat kanserlerinin kemik metastazlarında etkin görünse de rutin kullanımı daha büyük çalışmalarla desteklenmelidir.

İbandronatın prostat kanserinde etkinliğiyle ilgili in vitro veriler ve prelinik çalışmalar da sınırlıdır. Boissier ve arkadaşları bifosfonatların prostat ve meme kanseri hücrelerinin mineralize ve mineralize olmayan ekstrasellüler kemik matriksine adhezyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında adhezyonun doza bağımlı olarak inhibe olduğunu, karşılaştırılan bifosfonatlar (ibandronat, NE-10244, pamidronat ve klodronat) arasında en etkin olanın ibandronat olduğunu ve bifosfonatların tümör hücrelerinin kemiğe adhezyonunu önleyerek direkt hücresel etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (135). Fournier ve arkadaşları erkek farelere subkutan zoledronik asid, ibandronat ve klodronat uygulayıp bifosfonatların dokulardaki dağılımını incelemişler ve bifosfonatların sadece kemikte değil prostat bezinde de geçici olarak biriktiğini göstermişlerdir. Daha sonra kastre farelere tek başına testosteronla zoledronik asid ve ibandronatla kombine testosteron uygulayıp revaskülarizasyona etkilerini araştırmışlar ve hem ibandronatın hem de zoledronik asidin prostat bezinde revaskülarizasyonu %50 azalttığını, bu şekilde ibandronat ve zoledronik asidin anjiogenezi inhibe ettiğini de göstermişlerdir (136).

Dumon ve arkadaşları PC-3 hücre hattında farklı yapıdaki bifosfonatların biyolojik etkisini araştırmışlardır (118). PC-3 hücre hattını klodronat, pamidronat, ibandronat ve

zoledronik asidin 1 μM -100 μM arasında değişen konsantrasyonlarıyla 1, 2, 4 ve 6 gün inkübe etmişler ve bifosfonatların PC-3 hücre büyümesine etkisini hücre dansitesi, total DNA içeriği ve hücre sağkalımlarını değerlendirerek belirlemişlerdir. Hücre sağkalımı MTT ile değerlendirilmiştir. Klodronat ile MTT değerleri anlamlı olarak değişmemiş, ancak diğer bifosfonatlar doza ve zamana bağımlı olarak hücre sağkalımını azaltmışlardır. En büyük etki ibandronat ve pamidronat için 100 μM konsantrasyonunda ve 4. gün görülürken zoledronik asidde 6. güne kadar hücre sağkalımında sürekli bir azalma tespit edilmiştir. Her üç aminobifosfonatla sitostatik etki görülürken belirgin apoptotik etki özellikle zoledronik asid inkübasyonundan sonra ortaya çıkmıştır. Her üç aminobifosfonatta hücre büyümesini baskılayıcı ve hücre ölümünü tetikleyici etki 100 μM konsantrasyonunda grlmştir. Bu alışma ilk kez pamidronat ve ibandronatın prostat kanseri hücre hattında apoptozu indüklediğini de göstermiştir. Çalışmamızda PC-3 hücre hattında zoledronik asid ve ibandronat için bulunan IC_{50} (sırasıyla 75 μM ve 132 μM) değerleri Dumon'un çalışmasındaki konsantrasyon değerlerine yakındır. Çalışmamızda benzer şekilde hücre sağkalımının doza ve zamana bağlı olarak azaldığı görülmekle birlikte ibandronat uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığının değişmediği, 72. saatte azalmaya başladığı, zoledronik asid uygulamasından sonra ise 24. saatten itibaren hücre canlılığının %20 azaldığı, azalmanın 72. saatte %60'lara ulaştığı tespit edilmiştir. Bu bulgular IC_{50} değerleriyle birlikte değerlendirildiğinde, zoledronik asidin daha etkin olduğunu düşündürmekle birlikte tek başına hücre canlılığına bakarak bu konuda kesin bir sonuca vamak mümkün değildir.

Küçükzeybek ve arkadaşları hormon ve ilaca refrakter prostat kanseri (DU-145) ve insan meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarında ibandronatın apoptotik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır (137). Sitotoksisite XTT yöntemiyle, apoptoz ELISA ile histon-DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3/7 enzim aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Değerlendirmeler 40, 80, 120 ve 160 μM ibandronat konsantrasyonları için 24, 48 ve 72. saatlerde yapılmıştır. DU-

145 hücre hattında ibandronatın IC₅₀ değeri 90 µM, MCF-7 hücre hattında 122 µM olarak belirlenmiş ve DU-145 hücrelerinin ibandronata daha duyarlı olduğu vurgulanmıştır. İbandronatın artan konsantrasyonlarıyla hücre sayılarında her iki hücre hattında da doz ve zamana bağlı anlamlı azalma gözlenmiştir (p<0,05). Çalışmamızda da sitotoksite XTT yöntemiyle 24, 48 ve 72. saatlerde belirlenmiş, ibandronat için 40, 80, 120, 160 ve 200 µM konsantrasyonları uygulanmış ve ibandronatın artan konsantrasyonlarıyla benzer şekilde doz ve zamana bağlı olarak hücre sayılarında hem DU-145 hem de PC-3 hücre hattında anlamlı azalma gözlenmiştir (p<0,05). Çalışmamızda farklı olarak DU-145 hattında ibandronatın IC₅₀ değeri 153 µM, PC-3 hattında 132 µM olarak bulunmuştur. Zoledronik asidin IC₅₀ değeri ise DU-145 ve PC-3 hatları için sırasıyla 39 µM ve 75 µM'dir. DU-145 hücre hattı zoledronik aside daha duyarlı görünmekle birlikte apoptoz ve DNA fragmentasyonu değerlendirmesi yapmadan kesin bir sonuca varmak mümkün değildir.

Kemik metastazlarında en sık uygulanan palyatif tedavi radyoterapi olup bifosfonatlarla karşılaştırıldığında daha az seçici olarak sadece osteoklast değil aynı zamanda osteoblast, tümör hücresi ve lokalize enflamatuvar hücreler üzerine de etki etmektedir. Osteoklast aktivitesi üzerindeki etkileri ise ağrı palyasyonunda additif olarak ortaya çıkmaktadır. Radyoterapiye bifosfonat eklenmesiyle mikroskobik veya asemptomatik hastalığın kontrol edilmesi, radyoterapi alanı dışında kalan bölgelerde progresyonun durdurulması gibi bazı etkileşimler de görülmektedir. Radyoterapi ve bifosfonatların birlikte kullanımı örtüşen yan etki profiline sahip olmamaları nedeni ile sorun yaratmamaktadır.

Yaygın kemik metastazlarının radyoterapisinde kemik iliğinin baskılanması sınırlayıcı yan etki olarak ortaya çıkmakta ancak kemik mineralizasyonu ve osteoklast aktivitesi üzerinde seçici etkisi olması nedeni ile bifosfonat grubu ilaçların kemik iliği depresyonu yapmaması eş zamanlı kullanımı güvenli kılmaktadır. Radyoterapi ve bifosfonatlar ayrı ayrı uygulandıklarında metastatik kemik ağrısını azaltmakla birlikte additif veya sinerjistik etkileri

olduğunu gösteren prelinik ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda daha çok zoledronik asidin etkinliği araştırılmıştır.

Ural ve arkadaşları MCF-7 meme kanseri hücre hattına 100 μM 'e kadar zoledronik asit ve 8 Gy'e kadar radyoterapiyi ayrı ayrı ve kombine olarak uygulayıp antiproliferatif etkileri değerlendirmişlerdir (138). Zoledronik asitin IC_{50} değeri 24 saatte 48 μM , 72 saatte 20 μM , radyoterapinin IC_{50} değeri 5 Gy bulunmuştur. Hücre canlılığında hem zoledronik asit hem de radyoterapi için doz ve zamana bağlı olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir. Radyoterapi zoledronik asitle kombine edildiğinde hücre canlılığında daha fazla azalma görülmüş ve kombinasyon indeksi <1 olduğundan kombinasyonun sinerjistik etkili olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar zoledronik asit ve radyoterapinin sinerjik etkisinin klinik uygulamada radyoterapi fraksiyon dozunun veya fraksiyon sayısının düşürülerek daha az yan etkiyle aynı terapötik etkinin sağlanabileceğini vurgulamışlardır. Ryu ve arkadaşlarının osteosarkom hücre hattında zoledronik asit ve radyasyon kombinasyonunun antitümör etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında Ural ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde düşük doz zoledronik asit ve düşük doz radyasyon kombinasyonunun sadece radyasyon veya sadece zoledronik asite göre osteosarkom hücre hattında büyümeyi önemli derecede inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (139). Algur ve arkadaşları da IM-9 myelom hücre hücre hattı ve C4-2 prostat kanseri hücre hattında 200 μM 'e kadar zoledronik asit ve 10 Gy'e kadar radyoterapinin sitotoksik etkilerini hem tek başlarına hem de kombine kullanımda araştırmışlar ve kombine kullanımın sinerjistik etkiyle sitotoksiteyi arttırdığını göstermişlerdir (140).

Multipl myelom ve küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında zoledronik asitle yapılan çalışmalarda hücre büyümesinin inhibisyonunda sadece apoptozun rolünün olmadığı, zoledronik asidin hem tek başına hem de diğer antikanser ajanlarla kombine edildiğinde hücre siklusunun süresini uzattığı, hücreleri G_2M fazında bloke ettiği ortaya konmuş ve potansiyel radyoduyarlayıcı olarak kabul edilmiştir (141-143). Fare modellerinde yapılan benzer

çalışmalarda da radyoterapiyle birlikte uygulanan zoledronik asidin osteolitik kemik lezyonlarında kemik dansitesini, mikroyapısını ve biyomekanik kuvvetini tek başına radyoterapiden daha çok arttırdığı gösterilmiştir (144).

Journé ve arkadaşları MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında ibandronatla iyonizan radyasyonun farklı sekans ve konsantrasyondaki kombinasyonlarının sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Radyoterapi tek doz olarak ibandronat öncesi, ibandronatla eşzamanlı veya sonrasında uygulanmıştır. Radyoterapi sonrası uygulanan ibandronatla her iki hücre hattında da daha belirgin sinerjistik etki elde edilmiştir (26).

Krempien ve arkadaşlarının çalışmasında in vivo hayvan tümörü modelinde bifosfonatların radyoterapi ile kombinasyonunun osteolitik kemik metastazlarının remineralizasyonunu ve stabilizasyonunu artırdığı görülmüştür (145). Çalışmada kontrol grubuna sadece radyoterapi, diğer iki gruba radyoterapiden önce veya eşzamanlı klodronat uygulanmıştır. Klodronatla radyoterapinin kombine kollarında etkinlik kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bifosfonatların radyasyondan önce kullanımını eşzamanlı kullanım koluna göre osteolitik kemik metastazında remineralizasyon ve restabilizasyonu anlamlı derecede artırmıştır.

Radyoterapinin de uygulandığı in vitro çalışmalarda farklı hücre kültürlerinde farklı doz değerleri elde edilmekle birlikte genel olarak 10 Gy'in altında olduğu görülmektedir. Çalışmamızda da radyoterapinin IC_{50} 'ye en yakın doz değerleri PC-3 ve DU-145 hücre hatları için farklı olup sırasıyla 6-8 Gy ve 1-2 Gy'dir. PC-3 hücre hattına tek başına 6 ve 8 Gy radyoterapi uygulandığında beklendiği üzere hücre canlılığında ilk 24 saatte belirgin azalma olmuş (sırasıyla %56 ve %47), bu azalma 6 Gy kolunda 48. saatte artarak devam etmiş (%56'dan %21'e düşüş) ancak 8 Gy kolunda hücre canlılığı yükselmiştir (%47'den %69'a yükselme). Bu da hücrelerin pasajlandığı plakaların boyutlarının hem 6 hem de 8 Gy için aynı olması sonucu 8 Gy radyoterapi ile ilk başta daha çok hücrenin ölmesi ve kalan az miktarda

hücresinin çoğalması için yeterli besin ortamının olması, 6 Gy radyoterapi ile daha çok canlı hücre kalıp besinin yetersiz gelmesi ve hücrelerin ölmeye devam etmesi ile açıklanabilir. DU-145 hücre hattında tek başına 1 ve 2 Gy radyoterapi uygulandığında PC-3 hattına benzer şekilde ilk 24 saatte hücre canlılığı belirgin olarak azalmış (sırasıyla %54 ve %42) ancak 48. saatte düşük doz radyoterapi kolunda daha belirgin olmak üzere hücre canlılığı artmıştır (1 Gy için %54'ten %89'a yükselme, 2 Gy için %42'den %51,5'e yükselme).

Çalışmamızda zoledronik asit ve ibandronatın radyoterapiyle eşzamanlı uygulanması etkisiz olduğundan karşılaştırmalar ardışık uygulamalar için yapılmış ve diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak ardışık uygulamaların hücre canlılığını azaltmada tek başına uygulamalardan daha etkin bulunmuştur. Gerek PC-3 gerekse DU-145 hücre hattında zoledronik asit/ibandronat+24. saat radyoterapi ve zoledronik asit/ibandronat+48. saat radyoterapi ardışık uygulaması ile hücre canlılığında anlamlı azalma tespit edilmiştir (her iki hücre hattı için $p < 0,0001$). Hücre canlılığı PC-3 hücre hattında 24. saat radyoterapi grubunda %17-33, 48. saat radyoterapi kolunda %18-32 arasında iken DU-145 hücre hattında 24. saat radyoterapi kolunda %39-60, 48. saat radyoterapi kolunda %30-54 arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar DU-145 hücre hattının bifosfonat+radyoterapi kombinasyonuna PC-3 hattından daha dirençli olduğunu düşündürmekle birlikte yalnız hücre canlılığına bakılarak kesin bir sonuca varılamamaktadır. Her iki hücre hattında da ardışık uygulamalar kendi içlerinde karşılaştırıldığında radyoterapinin 24. veya 48. saatlerde uygulanması hücre canlılığına etki bakımından anlamlı fark yaratmamıştır (her iki hücre hattı için $p > 0,05$). PC-3 hücre hattında 24. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla, 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 24. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada hücre canlılığında daha belirgin azalma görülmüş ($p < 0,0001$), radyoterapi dozunun 6 veya 8 Gy olması hücre canlılığı bakımından anlamlı fark yaratmamıştır ($p > 0,05$). Aynı sonuçlar 48. saat radyoterapi uygulamasında da elde edilmiştir. DU-145 hücre hattında da benzer şekilde

zoledronik asid ve ibandronatın tek başlarına uygulanması ile zoledronik asid/ibandronat+24. saat radyoterapi, zoledronik asid/ibandronat+48. saat radyoterapi ardışık uygulamaları karşılaştırıldığında kombine kolda anlamlı üstünlük vardır ($p<0,0001$). Ancak PC-3 hattından farklı olarak tek başına 24. saat radyoterapi ile zoledronik asid/ibandronat+24. saat radyoterapi ardışık uygulaması arasında hücre canlılığına etki yönünden anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Tek tek başına 48. saat radyoterapi ile zoledronik asid/ibandronat+48. saat radyoterapi ardışık uygulaması arasındaki fark ardışık kol lehine bulunmuştur ($p<0,05$). DU-145 hücre hattında tek başına 2 Gy radyoterapi (yüksek doz) uygulanması ile 20 μ M zoledronik asit-1 Gy radyoterapi (düşük konsantrasyon-düşük doz), 80 μ M ibandronat-1 Gy radyoterapi (düşük konsantrasyon-düşük doz) ardışık kollarının sitotoksitesi birbirine yakın bulunmuştur (sırasıyla %51,5, %52 ve %54) ($p>0,05$). Bu da klinik uygulamalarda yüksek doz radyoterapi yerine düşük doz radyoterapinin bifosfonatla kombine edilip benzer etkinlik sağlanması şeklinde yarar sağlayabilir.

Klinik kullanımda bifosfonatlar çoğu zaman radyoterapi ile kombine uygulanmakta ve bifosfonatların kemik metastazı tespit edilir edilmez erken dönemde başlanması tavsiye edilmektedir. Prospektif çalışmalarda radyoterapi ve bifosfonatların kombine kullanımı ile kemik ağrılarında palyasyonun sağlandığı ve kabul edilebilir toksisite riski ile hasarlı kemiğin reossifikasyonunun arttığı gösterilmiştir. Ancak kombine kullanımda radyoterapinin optimal fraksiyonasyonunu, bifosfonatların dozunu ve süresini belirlemek için daha geniş, prospektif randomize çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (8, 28, 29).

Berning ve arkadaşlarının randomize çalışmasında litik kemik metastazı yapmış çeşitli solid tümörlü 43 hastanın 20'sine radyoterapinin 1. günü 4 mg intravenöz ibandronat uygulanmış ve 28 günde bir bir yıl boyunca devam edilmiş, 23 hastaya radyoterapinin 1, 8, 15, 22. günleri 1 mg ibandronat uygulanmış ve 3 mg'la 28 günde bir bir yıl boyunca devam edilmiştir (29). İki grup arasında ağrıda azalma, rekalsifikasyon ve sağkalım açısından fark

görülmemiş, historik kontrol grubuyla (50 hasta) karşılaştırıldığında ağrı ve rekalsifikasyon bakımından kombine koldaki sonuçların daha iyi olduğu, radyoterapi ve ibandronat kombinasyonunun uzun dönem ağrı palyasyonu sağladığı sonucuna varılmıştır.

Manas ve arkadaşları kemik metastazı gelişmiş olan akciğer, meme ve prostat kanserli 139 hastada 8 Gy radyoterapi+zoledronik asid ve 6 Gy radyoterapi+zoledronik asid uygulamasını karşılaştırdıklarında her iki grupta da ağrı kontrolünün ve hayat kalitesinin arttığını ancak yüksek doz radyoterapi kolunda iskeletle ilgili olayların daha geç dönemde ortaya çıktığını belirtmişlerdir (146). Kemik metastazı olan renal hücreli karsinom tanılı olgularda yalnız radyoterapi ile radyoterapi+zoledronik asid uygulaması karşılaştırıldığında kombine kullanmanın iskeletle ilgili olayları daha uzun süre geciktirdiği ve daha uzun süreli ağrı palyasyonu sağladığı bildirilmiştir (147, 148). Atahan ve arkadaşlarının randomize prospektif faz 4 çalışmasında meme kanseri ve kemik metastazı tanısı almış olan 100 hastada yüksek doz radyoterapi (30 Gy/10 Fx) veya azaltılmış doz radyoterapi (15 Gy/5 Fx) ile eşzamanlı zoledronik asit uygulanmasının etkinliği objektif ve subjektif olarak değerlendirilmiş ve eşzamanlı uygulamada düşük doz radyoterapi ile yüksek doz radyoterapinin benzer yanıt oranları ortaya koyduğunu bildirmişlerdir (149).

Vassiliou ve arkadaşları 45 farklı solid tümörün kemik metastazı olan hastaları 30-40 Gy radyoterapi ve 10 kür aylık ibandronat kombine uygulanması sonrası klinik ve radyolojik olarak değerlendirmişlerdir (150). İbandronat infüzyonu radyoterapinin ilk fraksiyonunda uygulanmıştır. Opioid kullanımı kombine tedavi sonrası ilk 3 ayda %84'ten %24'e inmiştir ($p<0,001$). Üç ay sonra hastaların %69'unda ağrıya tam yanıt, %31'inde kısmi yanıt elde edildiği bildirilmiştir. Kemik dansitesinde ilk 3 ayda %20, 6 ayda %46, 10 ayda %73 radyolojik artış görülmüştür ($p<0,001$). Tedavi renal toksisite olmadan iyi tolere edilmiştir. Aynı çalışmacıların 52 hastalık ikinci serilerinde ve metastatik meme kanserli 32 hastalık serilerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (151, 152).

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatürdeki verilerle birlikte değerlendirildiğinde ibandronatın da prostat kanserinde etkin olduğu, her iki bifosfonatın da radyoterapiyle kombine kullanımlarında etkinliğin artacağı sonucuna varılabilir. Klinik çalışmalar da bifosfonatların radyoterapi ile kombine uygulanmasını desteklemektedir. Bu in vitro çalışmadan elde edilen verilerin klinik uygulamaya yansması klinik uygulamada bifosfonat radyoterapi kombinasyonunun sinerjik etkisi gözönünde bulundurulup radyoterapi dozunun veya fraksiyon sayısının düşürülüp benzer etkinlikte daha kısa süreli radyoterapi şemalarının uygulanması şeklinde olabilir. Böylelikle özellikle geniş tedavi alanları gerektiren, multipl kemik metastazlı hastalarda radyoterapinin olası yan etkileri azaltılabilir, sistemik tedavi alan hastalarda tedaviye ara vermeye gerek kalmaz, hasta yükü fazla olan radyoterapi kliniklerinde hasta sirkülasyonu arttırılabilir.

Çalışmamızın üstün yönleri zoledronik asidin, ibandronatın ve radyoterapinin hem ayrı ayrı, hem eşzamanlı, hem de ardışık olarak iki farklı prostat kanseri hücre kültüründe uygulanmış olması ve herbirinin etkinliklerini birbiriyle karşılaştırma olanağı sunmasıdır. Bilindiği kadarıyla iki ayrı prostat kanseri hücre kültüründe iki farklı bifosfonatı ve radyoterapiyi aynı anda karşılaştıran yayınlanmış in vitro çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın eksik yönü sadece hücre canlılığının değerlendirilmiş olmasıdır. Aynı çalışmada apoptoz ve DNA fragmantasyonu değerlendirmesinin de yapılması elde edilen verileri kuvvetlendirmek açısından önemlidir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda hormona dirençli prostat kanseri hücre hatlarında (PC-3 ve DU-145) zoledronik asit, ibandronat ve radyoterapinin ayrı ayrı ve ardışık uygulamalarının hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

Her iki hücre hattında da ardışık radyoterapinin 24. veya 48. saatlerde uygulanması sitotoksistide belirgin fark yaratmamıştır ($p>0,05$). DU-145 hattında yüksek konsantrasyon bifosfonat→yüksek doz radyoterapi ile düşük konsantrasyon bifosfonat→düşük doz radyoterapi uygulamaları karşılaştırıldığında aradaki fark yüksek doz lehine istatistiksel anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). PC-3 hücre hattında radyoterapinin tek başına uygulanmasıyla bifosfonatla ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamaların daha fazla sitotoksisteye yol açtığı belirlenmiştir ($p<0,0001$). ancak aynı karşılaştırma 48. saat tek başına ve ardışık uygulama için yapıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

- Her iki hücre hattında da zoledronik asit, ibandronatın tek başlarına uygulanmasında hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalmaktadır.
- Zoledronik asid her iki hücre hattında da hücre canlılığında daha fazla azalmaya neden olmuştur.
- Her iki hücre hattında da zoledronik asid ve ibandronatın radyoterapi ile ardışık uygulanması daha fazla sitotoksisteye yol açmaktadır.
- Her iki hücre hattında da zoledronik asid-radyoterapi ile ibandronat-radyoterapi ardışık uygulamasında sitotoksistite oranları birbirine yakın bulunmuştur
- Her iki hücre hattında da ardışık radyoterapinin 24. veya 48. saatlerde uygulanması arasında sitotoksistite bakımından fark yoktur.

- Her iki hücre hattında da ardışık uygulamalar tek başına bifosfonat ve tek başına radyoterapi uygulamalarından üstündür, ancak DU-145 hücre hattında 24. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla, 24 saat zoledronik asit ve ibandronatın 24. saat radyoterapi ile ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada hücre canlılığındaki azalma daha belirgin olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel anlamlı değildir, ancak aynı karşılaştırma 48. saat tek başına radyoterapi ve ardışık uygulama için yapıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur.
- DU-145 hücre hattı bifosfonat+radyoterapi kombinasyonuna PC-3 hücre hattından daha dirençli gibi görünmektedir.

7. ÖZET

Prostat kanserinin kemik metastazlarına bağılı semptomların palyasyonunda en sık kullanılan iki tedavi bifosfonatlar ve radyoterapidir. Zoledronik asidin tek başına veya radyoterapiyle birlikte prostat kanserinde kullanımı konusunda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte ibandronatın klinik kullanımı meme kanserinin kemik metastazlarıyla sınırlıdır. Bu çalışmada prostat kanserinde ibandronatın da etkinliğini araştırmak amacıyla hormona dirençli iki farklı insan prostat kanseri hücre kültürüne (DU-145 ve PC-3) zoledronik asid, ibandronat ve radyoterapi hem tek başlarına hem de eşzamanlı ve ardışık olarak birlikte uygulanmış ve sitotoksiteleri belirlenip birbiriyle karşılaştırılmıştır.

Çalışma Aralık 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına bağılı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür. Özel şartlarda hazırlanıp pasajlanan hücre kültürlerinde öncelikle zoledronik asid, ibandronat ve radyoterapinin IC_{50} (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri ve IC_{50} 'den düşük, IC_{50} 'ye en yakın iki değeri her iki hücre hattı için ayrı ayrı belirlenmiştir. Ardışık uygulama deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında ilaçların XTT ve radyoterapi uygulaması sonuçlarına göre belirlenen iki ayrı konsantrasyon ve doz değerleri hücre hatlarına önce ayrı ayrı uygulanmış, daha sonra her bir doz değeri için ibandronatla radyoterapinin ve zoledronik asitle radyoterapinin ardışık ve eşzamanlı uygulanması ile oluşan sitotoksite değerlendirilmiştir. Eşzamanlı uygulamanın etkin olmadığı belirlendiğinden eşzamanlı uygulama sonuçları kullanılmamıştır. Radyasyon uygulamasından sonra ardışık uygulama deneyinin 24 saat ilaç-24. saat radyasyon ve 24 saat ilaç-48. saat radyasyon etkilerinin hücre canlılığına etkisi tripan mavisi yöntemiyle ölçülmüştür. Konsantrasyon-etki değerleri "Graphpad Prism 6.0" istatistik yazılımında istatistiksel analize

tabi tutulmuş, istatistiksel analizlerde ANOVA ve Dunnett's t-testleri kullanılmıştır, p değerinin $<0,05$ olması istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde zoledronik asid, ibandronat ve radyoterapinin ayrı ayrı uygulanmasında her iki hücre hattında da ilaç konsantrasyonu ve radyoterapi dozu arttıkça sitotoksisite artmıştır ($p<0,05$). Her iki hücre hattında 24 saat ilaç-24. saat radyasyon ve 24 saat ilaç-48. saat radyasyon ardışık uygulamasında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Her iki hücre hattında da zoledronik asid-radyoterapi ile ibandronat-radyoterapi ardışık uygulamasında sitotoksisite oranları birbirine yakın bulunmuştur ($p>0,05$). Her iki hücre hattında da zoledronik asid ve ibandronatın tek başına uygulanmasıyla 24. saat ve 48. saatlerde ardışık radyoterapiyle birlikte uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamaların daha fazla sitotoksisiteye yol açtığı belirlenmiştir ($p<0,0001$). Her iki hücre hattında da ardışık radyoterapinin 24. veya 48. saatlerde uygulanması sitotoksisitede belirgin fark yaratmamıştır ($p>0,05$). DU-145 hattında yüksek konsantrasyon bifosfonat→yüksek doz radyoterapi ile düşük konsantrasyon bifosfonat→düşük doz radyoterapi uygulamaları karşılaştırıldığında aradaki fark yüksek doz lehine istatistiksel anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). PC-3 hücre hattında radyoterapinin tek başına uygulanmasıyla bifosfonatla ardışık uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamaların daha fazla sitotoksisiteye yol açtığı belirlenmiştir ($p<0,0001$). DU-145 hücre hattında 24. saatte tek başına radyoterapi uygulanmasıyla 24. saat ardışık radyoterapi uygulanması karşılaştırıldığında ardışık uygulamada sitotoksite daha belirgin olmakla birlikte aradaki farkın istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiş, ancak aynı karşılaştırma 48. saat tek başına ve ardışık uygulama için yapıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tüm bu veriler eşliğinde zoledronik asidle ibandronatın sitotoksik etkilerinin benzer olduğu ve radyoterapiyle birlikte ardışık uygulamaların her iki modalitenin ayrı ayrı uygulanmasından daha etkin olduğu söylenebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
2. Sathiakumar N, Delzell E, Morrissey MA, et al. Mortality following bone metastasis and skeletal-related events among men with prostate cancer: a population-based analysis of U.S. Medicare beneficiaries, 1999–2006. *Prostate Cancer Prostat Dis* 2011;14:177-83.
3. Berrutti A, Dogliotti L, Bitossi R, et al. Incidence of skeletal complications in patients with bone metastatic prostate cancer and hormone refractory disease: Predictive role of bone resorption and formation markers evaluated at baseline. *J Urol* 2000;164:1248-53.
4. Saad F, Gleason DM, Murray R, et al. Long term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:879-92.
5. Clarke NW, McClure J, George NJR. Morphometric evidence for bone resorption and replacement in prostate cancer. *Br J Urol* 1991;68:74-80.
6. Kutlu M, Odabası E. Kemik doku ve fizyolojisi. *Turkiye Klinikleri J Endocrin* 2004;4:73-89.
7. Hoskin PJ. Radiotherapy for bone pain. *Pain* 1995;63:137-9.
8. Lutz S, Berk L, Chang E, et al. Palliative radiotherapy for bone metastases: an ASTRO evidence-based guideline. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;79(4):956-76.
9. Di Lorenzo G, Autorino R, Ciardiello F, et al. External beam radiotherapy in bone metastatic prostate cancer: impact on patients' pain relief and quality of life. *Oncol Rep* 2003;10:399-404.
10. Hoskin PJ, Stratford MRL, Folkes LK, et al. Effect of local radiotherapy for bone pain on urinary markers of osteoclast activity. *Lancet* 2000;355:1428-9.
11. Ross JR, Saunders Y, Edmonds PM, Patel S, Broadley KE, Johnston SR. Systematic review of role of bisphosphonates on skeletal morbidity in metastatic cancer. *BMJ* 2003;327:413-69.
12. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004;9(Suppl 4):3-13.
13. Lee RJ, Saylor PJ, Smith MR. Treatment and prevention of bone complications from prostate cancer. *Bone* 2011;48:88-95.

14. Saad F, Gleason DM, Murray R, et al. A randomized, placebo controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1458-68.
15. Asahi H, Mizokami A, Miwa S, Keller ET, Koshida K, Namiki M. Bisphosphonate induces apoptosis and inhibits pro-osteoclastic gene expression in prostate cancer cells. *Int J Urol* 2006;13:593-600.
16. Launay-Vacher V, Oudard S, Janus N, et al. Prevalence of renal insufficiency in cancer patients and implications for anticancer drug management: The renal insufficiency and anticancer medications (IRMA) study. *Cancer* 2007;110:1376-84.
17. Pecherstorfer M, Rivkin S, Body JJ, Diel I, Bergström B. Long-term safety of intravenous ibandronic acid for up to 4 years in metastatic breast cancer: an open-label trial. *Clin Drug Investig* 2006;26(6):315-22.
18. Body JJ, Diel IJ, Lichinitzer M, et al. Oral ibandronate reduces the risk of skeletal complications in breast cancer patients with metastatic bone disease: results from two randomised, placebo-controlled phase III studies. *Br J Cancer* 2004;90(6):1133-7.
19. Body JJ, Diel IJ, Lichinitzer MR, et al. Intravenous ibandronate reduces the incidence of skeletal complications in patients with breast cancer and bone metastases. *Ann Oncol* 2003;14(9):1399-405.
20. Body JJ, Diel IJ, Bell R, et al. Oral ibandronate improves bone pain and preserves quality of life in patients with skeletal metastases due to breast cancer. *Pain* 2004;111(3):306-12.
21. Diel IJ, Body JJ, Lichinitzer MR, et al. Improved quality of life after long-term treatment with the bisphosphonate ibandronate in patients with metastatic bone disease due to breast cancer. *Eur J Cancer* 2004;40(11):1704-12.
22. Kurth AA, Seraphin J, Schütze F, Nusch A, Schäfer I, Meden H. Pain reduction with oral and intravenous ibandronate treatment for metastatic bone disease of breast cancer. *Bone* 2006;38(Suppl. 1):S77-8 [Abstract 89].
23. Lee-Barrett P, Casbard A, Abraham J, et al. Oral ibandronic acid versus intravenous zoledronic acid in treatment of bone metastases from breast cancer: a randomised, open label, non-inferiority phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(1):114-22.
24. Hiraga T, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T. The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Res* 2001;61:4418-24.

25. Journe F, Chaboteaux C, Magne N, Duvillier H, Laurent G, Body JJ. Additive growth inhibitory effects of ibandronate and antiestrogens in estrogen receptor-positive breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2006;8:R2.
26. Journe F, Magne N, Chaboteaux C. Sequence- and concentration-dependent effects of acute and long-term exposure to the bisphosphonate ibandronate in combination with single and multiple fractions of ionising radiation doses in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2006;23:135-47.
27. Neudert M, Fischer C, Krempien B, Bauss F, Seibel MJ. Site-specific human breast cancer (MDA-MB-231) metastases in nude rats: model characterisation and in vivo effects of ibandronate on tumour growth. *Int J Cancer* 2003;107(3):468-77.
28. Coleman RE. Future directions in the treatment and prevention of bone metastases. *Am J Clin Oncol* 2002;25(6 Suppl 1):S32–S38.
29. Berning D, Schafer U, Willich N, Horn K, Horst E, Micke O. Combination of radiotherapy and ibandronate in metastatic bone disease-results of a randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54(suppl.2):308-9 [Abstract 2171].
30. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27:1229-41.
31. Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasaki A. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* 1991;173:1291-4.
32. Morgans AK, Smith MR. Bone-targeted agents preventing skeletal complications in prostate cancer. *Urol Clin N Am* 2012;39:533-46.
33. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597-602.
34. Sethi N, Kang Y. Dysregulation of developmental pathways in bone metastasis. *Bone* 2011;48:16-22.
35. Sterling JA, Edwards RE, Martin TJ, Mundy GR. Advances in the biology of bone metastasis: How the skeleton affects tumor behavior. *Bone* 2011;48:6-15.
36. Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* 2002;8:340-5.
37. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N. Engl J Med* 2004;350:1655-64.
38. Juarez P, Guise TA. TGF- β in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases. *Bone* 2011;48:23-9.

39. Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD, et al. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 2003;97(suppl 3):739-47.
40. Higano CS. Understanding treatments for bone loss and bone metastases in patients with prostate cancer: a practical review and guide for the clinician. *Urol Clin N Am* 2004;31:331-52.
41. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor- 1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62:1832-7.
42. Lafleur MA, Hollenberg MD, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G, Edwards DR. Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochem J* 2001;357:107-15.
43. Kostenuik PJ, Singh G, Orr FW. Transforming growth factor + upregulates the integrin-mediated adhesion of human prostatic carcinoma cells to type I collagen. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:41-52.
44. Nelson JB, Nabulsi AA, Vogelzang NJ, et al. Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *J Urol* 2003;169:1143-9.
45. Bryden AA, Hoyland JA, Freemont AJ, Clarke NW, George NJ. Parathyroid hormone related peptide and receptor expression in paired primary prostate cancer and bone metastases. *Br J Cancer* 2002;86:322-5.
46. Autzen P, Robson CN, Bjartell A, et al. Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *Br J Cancer* 1998;78:1219-23.
47. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate* 1999;39:246-61.
48. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 2005;5:21-8.
49. Goltzman D. Mechanisms of the development of osteoblastic metastases. *Cancer* 1997;80(8 Suppl):1581-7.
50. Clarke NW, McClure J, George NJ. Osteoblast function and osteomalacia in metastatic prostate cancer. *Eur Urol* 1993;24:286-90.

51. Shariat SF, Andrews B, Kattan WM, et al. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology* 2001;58:1008-15.
52. Cook RJ, Coleman R, Brown J, et al. Markers of bone metabolism and survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:3361-7.
53. Mercadante S. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain* 1997;69:1-8.
54. Payne R. Mechanisms and management of bone pain. *Cancer* 1997;80(Suppl 8):1608-13.
55. Smith MR, Cook RJ, Coleman R, et al. Predictors of skeletal complications in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Urology* 2007;70:315-9.
56. Stewart AF. Clinical practice. Hypercalcemia associated with cancer. *N Engl J Med*.2005;352(4):373-9.
57. Morote J, Martinez E, Trilla E, et al. Osteoporosis during continuous androgen deprivation: influence of the modality and length of treatment. *Eur Urol* 2003;44:661-5.
58. Douglas P, Rossier P, Mirimanoff R-O, Coucke P A. Third-body irradiation as an effective palliative treatment for painful multiple bone metastases resistant to chemo or hormonal treatment. *Radiotherapy and Oncology* 1993;28:76-8.
59. Chow E, Harris K, Fan G, Tsao M, Sze WM. Palliative radiotherapy trials for bone metastases: A systematic review. *J Clin Oncol* 2007;25:1423-36.
60. Kasa S, Brenne E, Lund JA, Fayers P, Falkmer U, Holmberg M, et al. Prospective randomised multicenter trial on single fraction radiotherapy (8 Gy x 1) versus multiple fractions (3 Gy x 10) in the treatment of painful bone metastases. *Radiother Oncol* 2006;79:278-84.
61. Hartsell WF, Scott CB, Bruner DW, Scarantino CW, Ivker RA, Roach M 3rd, et al. Randomized trial of short- versus long-course radiotherapy for palliation of painful bone metastases. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:798-804.
62. Wong E, Hoskin P, Bedard G, et al. Re-irradiation for painful bone metastases: A systematic review. *Radiother Oncol* 2013;110(1):61-70.
63. Kristopher Dennis, Leila Makhani, Liang Zeng, et al. Single fraction conventional external beam radiation therapy for bone metastases: A systematic review of randomised controlled trials. *Radiotherapy and Oncology* 2013;106:5-14.

64. Chow E, Zeng L, Salvo N, et al. Update on the systematic review of palliative radiotherapy trials for bone metastases. *Clinical Oncology* 2012;24:112-24.
65. Wu JS, Wong RK, Lloyd NS, Johnston M, Bezjak A, Whelan T. Meta-analysis of dose-fractionation radiotherapy trials for the palliation of painful bone metastases. *Inter Journal Radiat Oncol Biology Phys* 2003;55:594-605.
66. Harrington KD. Orthopedic surgical management of skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997;80(8):1614-27.
67. Hipp JA, Springfield DS, Hayes WC. Predicting pathologic fracture risk in the management of metastatic bone defects. *Clin Orthop* 1995;312:120-35.
68. Özbarlas S, Ege A, Demirtaş M, Sağlık Y. Metastatik kemik tümörleri. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 1993;3(1):22-6.
69. Bach F, Larsen BH, Rohde K, et al. Metastatic spinal cord compression. Occurrence, symptoms, clinical presentations and prognosis in 398 patients with spinal cord compression. *Acta Neurochir (Wien)* 1990;107:37-43.
70. Helweg-Larsen S, Sørensen PS, Kreiner S. Prognostic factors in metastatic spinal cord compression: a prospective study using multivariate analysis of variables influencing survival and gaitfunction in 153 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46(5):1163-9.
71. Masala S, Lunardi P, Fiori R et al. Vertebroplasty and kyphoplasty in the treatment of malignant vertebral fractures. *J Chemother* 2004;16(suppl 5):30-3.
72. Rades D, Stalpers LJA, Veninga T, et al. Evaluation of five radiation schedules and prognostic factors for metastatic spinal cord compression. *J Clin Oncol* 2005;23:3366-75.
73. Hartsell WF, Yajnik S. Palliation of bone metastasis. *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*. 6th Edition. Eds: Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW. Walters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2013;1778-92.
74. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003;83:337-76.
75. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002;4:30-4
76. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011;49:34-41.
77. Reid IR. Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2008;19:473-8.

78. Francis MD, Valent DJ. Historical perspectives on the clinical development of bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7(1):2-8.
79. Graham R, Russell G. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* 2011;49:2-19.
80. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis *Mol Cancer Ther* 2007;6(10):2609-17.
81. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 2008;19(3):420-32.
82. Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:367-401.
83. Senel FC, Tekin US, Durmus A, Bagis B. Severe osteomyelitis of the mandible associated with the use of non-nitrogen containing bisphosphonate (Disodium Clodronate): Report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:562-5.
84. Mashiba T, Mori S, Burr DB, et al. The effects of suppressed bone remodelling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Metab* 2005;23:36-42.
85. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003;9:2643-58.
86. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure- activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:235-42.
87. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-30.
88. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 2003;72:80-4.
89. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006;12:6222-30.
90. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma. *Cancer* 2003;98:1735-44.

91. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian S, et al. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial-the zoledronic acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol* 2003;2:3150-7.
92. Van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Löwik C, Papapoulos S. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9(12):1875-82.
93. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
94. Mühlbauer RC, Bauss F, Schenk R, et al. BM. 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res* 1991;6:1003-11.
95. Bauss F, Bergström B. Preclinical and clinical efficacy of the bisphosphonate ibandronate in cancer treatment. *Curr Clin Pharmacol* 2008;3(1):1-10.
96. Devitt B, McLachlan SA. Use of ibandronate in the prevention of skeletal events in metastatic breast cancer. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2008;4(2):453-8.
97. Bergstrom B, Lichinitser M, Body JJ. Intravenous and oral ibandronate have better safety and tolerability profiles than zoledronic acid: evidence from comparative phase II/III trials. *Bone* 2006;38(Suppl 1):S68.
98. Berenson JR. Recommendations for zoledronic acid treatment of patients with bone metastases. *Oncologist* 2005;10:52-62.
99. Pecherstorfer M, Rivkin S, Body JJ, Diel I, Bergström B. Long-term safety of intravenous ibandronic acid for up to 4 years in metastatic breast cancer: an open-label trial. *Clin Drug Investig* 2006;26(6):315-22.
100. Jackson GH. Renal safety of ibandronate. *Oncologist* 2005;10(1):14-8.
101. Hoff AO, Toth B, Altundag K, et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008;23:826-36.
102. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008;44(9):857-69.
103. McBride WH, Withers HR. Mc Bride WH, Withers HR,. Biologic basis of radiation therapy. *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*. 6th Edition. Eds: Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW. Walters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia,2013:61-88.

- 104.** Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 2007;1(6): 923-35.
- 105.** Özalpan A. Bölünen hücreler ve sağkalım kavramı. *Temel Radyobioloji*. 1. Basım (Ed: Atilla Özalpan)'da. Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 2001;96-114.
- 106.** Brown JE, Neville –Webbe H, Coleman RE. The role of biphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:207-24.
- 107.** Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001;27:165-76.
- 108.** Fizazi K, Carducci M, Smith M, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 2011;377(9768):813-22.
- 109.** De Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010;376(9747):1147-54.
- 110.** Autio KA, Scher HI, Morris MJ. Therapeutic strategies for bone metastases and their clinical sequelae in prostate cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 2012;13:174-88.
- 111.** Smith MR. Zoledronic acid to prevent skeletal complications in cancer: corroborating the evidence. *Cancer Treat Rev* 2005;31(Suppl 3):19-25.
- 112.** Clézardin P. Biphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 2011;48:71-9.
- 113.** Green J, Clézardin P. The molecular basis of bisphosphonate activity: a preclinical perspective. *Semin Oncol* 2010;37(Suppl 1):S3-11.
- 114.** Gnant M, Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature. *Cancer Treatment Reviews* 2012;38:407-15.
- 115.** Clyburn RD, Reid P, Evans CA, Lefley DV, Holen I. Increased anti-tumour effects of doxorubicin and zoledronic acid in prostate cancer cells in vitro: supporting the benefits of combination therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:969-78.
- 116.** Neville-Webbe HL, Rostami-Hodjegan A, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Sequence- and schedule-dependent enhancement of zoledronic acid induced apoptosis by doxorubicin in breast and prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2005;113:364-71.

- 117.** Neville-Webbe HL, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Mechanisms of the synergistic interaction between the bisphosphonate zoledronic acid and the chemotherapy agent paclitaxel in breast cancer cell lines in vitro. *Tumour Biol* 2006;27:92-103.
- 118.** Dumon JC, Journe F, Kheddoumi N, Lagneaux L, Body JJ. Cytostatic and apoptotic effects of bisphosphonates on prostate cancer cells. *Eur Urol* 2004;45:521-8.
- 119.** Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, et al. Bisphosphonates inhibits breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000;60:2949-54.
- 120.** Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Hampton JM. Bisphosphonates for osteoporosis treatment are associated with reduced breast cancer risk. *Br J Cancer* 2010;102:799-802.
- 121.** Chlebowski RT, Chen Z, Cauley JA, et al. Oral bisphosphonate use and breast cancer incidence in postmenopausal women. *J Clin Oncol* 2010;28:3582-90.
- 122.** Rennert G, Pinchev M, Rennert HS, Gruber SB. Use of bisphosphonates and reduced risk of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1146-50.
- 123.** Saad F. New research findings on zoledronic acid: Survival, pain and anti-tumour effects. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(2):183-92.
- 124.** Denham JW, Joseph D, Lamb DS, et al. Short-term androgen suppression and radiotherapy versus intermediate-term androgen suppression and radiotherapy, with or without zoledronic acid, in men with locally advanced prostate cancer (TROG 03.04 RADAR): an open-label, randomised, phase 3 factorial trial. *Lancet Oncol* 2014;15(10):1076-89.
- 125.** Johnson K, Gable P, Kaime E, Luiken G, Castillos T, Hu J. Significant deterioration in renal function with the new bisphosphonate, zoledronic acid. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22[Abstract 2968].
- 126.** McDermott RS, Kloth DD, Wang H, Hudes GR, Langer CJ. Impact of zoledronic acid on renal function in patients with cancer: Clinical significance and development of a predictive model. *J Support Oncol* 2006;4:524-9.
- 127.** Diel IJ, Bergner R, Grotz KA. Adverse effects of bisphosphonates: Current issues. *J Support Oncol* 2007;5:475-82.
- 128.** Barot K, Wu S, Zhu X. Risk of renal dysfunction with zoledronic acid in patients with metastatic solid tumors. *J Clin Oncol* 2008;26(15 Suppl)[Abstract 20530].

- 129.**Diel IJ, Weide R, Köppler H, et al. Risk of renal impairment after treatment with ibandronate versus zoledronic acid: a retrospective medical records review. *Support Care Cancer* 2009;17:719-25.
- 130.**Barasch A, Cunha-Cruz J, Curro FA, et al. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *J Dent Res* 2011;90:439-44.
- 131.**Heidenreich A, Elert A, Hofmann R. Ibandronate in the treatment of prostate cancer associated painful osseous metastases. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2002;5:231-5.
- 132.**Heidenreich A, Ohlmann C, Olbert P, Hegele A. High-dose ibandronate is effective and well tolerated in the treatment of pain and hypercalcaemia due to metastatic urologic cancer. *Eur J Cancer* 2003;1(Suppl. 5):S270.[Abstract 897].
- 133.**Coleman RE, Purohit OP, Black C, et al. Double-blind, randomised, placebocontrolled, dose-finding study of oral ibandronate in patients with metastatic bone disease. *Ann Oncol* 1999;10:311-6.
- 134.**Hoskin PJ. The RIB Trial. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2004 Oct;16(7):445-6.
- 135.**Boissier S, Magnetto S, Frappart L, et al. Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res* 1997;57(18):3890-4.
- 136.**Fournier P, Boissier S, Filleur S, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002;62(22):6538-44.
- 137.**Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Cengiz E, et al. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of ibandronic acid on hormone and drug-refractory prostate cancer cells and human breast cancer cells. *The Journal of International Medical Research* 2010;38:1663-72.
- 138.**Ural AU, Avcu F, Candir M, Guden M and Ozcan MA: *In vitro* synergistic cytoreductive effects of zoledronic acid and radiation on breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 8: R52, 2006.
- 139.**Ryu K, Murata H, Koto K et al. Combined effects of bisphosphonate and radiation on osteosarcoma cells. *Anticancer Research* 2010;30:2713-20.
- 140.**Algur E, Macklis RM, Hafeli UO. Synergistic cytotoxic effects of zoledronic acid and radiation in human prostate cancer and myeloma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61(2):535-42.

- 141.**Ural AU, Yilmaz MI, Avcu F, et al. The bisphosphonate zoledronic acid induces cytotoxicity in human myeloma cell lines with enhancing effects of dexamethasone and thalidomide. *Int J Hematol* 2003;78:443-9.
- 142.**Matsumoto S, Kimura S, Segawa H, et al. Efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 2005;47:31-9.
- 143.**Milas L, Hunter NR, Mason KA, Kurdoglu B, Peters LJ. Enhancement of tumor radioresponse of a murine mammary carcinoma by paclitaxel. *Cancer Res* 1994;54:3506-10.
- 144.**Arrington SA, Damron TA, Mann KA, Allen MJ. Concurrent administration of zoledronic acid and irradiation leads to improved bone density, biomechanical strength, and microarchitecture in a Mouse model of tumor-induced osteolysis. *J Surg Oncol* 2008;97(3):284-90.
- 145.**Krempien R, Huber PE, Harms W, Treiber M, Wannemacher M, Krempien B. Combination of early bisphosphonate administration and irradiation leads to improved remineralization and restabilization of osteolytic bone metastases in an animal tumor model. *Cancer* 2003;98(6):1318-24.
- 146.**Manas A, Casas F, Ciria JP, et al. Randomised study of single dose (8 Gy vs 6 Gy) of analgesic radiotherapy plus zoledronic acid in patients with bone metastases. *Clin Transl Oncol* 2008;10(5):281-7.
- 147.**Kijima T, Fujii Y, Suyama T, et al. Radiotherapy to bone metastases from renal cell carcinoma with or without zoledronate. *BJU Int* 2009;103(5):620-4.
- 148.**Takeda N, Isu K, Hiraga H, Shinohara N, Minami A, Kamata H. Zoledronic acid enhances the effect of radiotherapy for bone metastases from renal cell carcinomas: more than a 24-month median follow-up. *J Orthop Sci* 2012;17(6):770-4.
- 149.**Atahan L, Yildiz F, Cengiz M, et al. Zoledronic acid concurrent with either high- or reduced-dose palliative radiotherapy in the management of the breast cancer patients with bone metastases: a phase IV randomized clinical study. *Support Care Cancer* 2010;18:691-8.
- 150.**Vassiliou V, Kalogeropoulou C, Christopoulos C, Solomou E, Leotsinides M, Kardamakis D. Combination ibandronate and radiotherapy for the treatment of bone meatstases: Clinical evaluation and radiologic assessment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:264-72.

- 151.** Vassiliou V, Kalogeropoulou C, Giannopoulou E, Leotsinidis M, Tsota I, Kardamakis D. A novel study investigating the therapeutic outcome of patients with lytic, mixed and sclerotic bone metastases treated with combined radiotherapy and ibandronate. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:169-78.
152. Vassiliou V, Kalogeropoulou C, Mihael L, et al. Management of symptomatic bone metastases from breast cancer with concomitant use of external radiotherapy and ibandronate: results of a prospective, pilot study. *Breast J* 2010;16:92-4.