

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

OVCAR 3 HÜCRE KÜLTÜRÜNDE *EPİGALLOCATECHİN 3 GALLATE*
İSİMLİ MADDENİN TEK BAŞINA YA DA KLASİK
KEMOTERAPATİKLERLE KOMBİNE YA DA TEK BAŞINA
KULLANIMININ ETKİLERİ

Dr. Nagihan ESKİN

Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2012

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

OVCAR 3 HÜCRE KÜLTÜRÜNDE *EPİGALLOCATECHİN 3 GALLATE*
İSİMLİ MADDENİN TEK BAŞINA YA DA KLASİK
KEMOTERAPATİKLERLE KOMBİNE YA DA TEK BAŞINA
KULLANIMININ ETKİLERİ

Dr. Nagihan ESKİN

Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof.Dr. S. Sinan ÖZALP

ESKİŞEHİR
2012

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Nagihan ESKİN'e ait 'Ovcar 3 hücre kültüründe *Epigallocatechin 3 gallate* isimli maddenin tek başına ya da klasik kemoterapötiklerle tek başına ya da kombine kullanımının etkileri' adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı	Prof.Dr. Sabit Sinan ÖZALP Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.
Üye	Prof.Dr. Ömer Tarık YALÇIN Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.
Üye	Prof.Dr. Hüseyin Mete TANIR Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.

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

Prof.Dr. Bekir YAŞAR
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Hikmet HASSA'ya, tez danışmanım Prof.Dr. S. Sinan ÖZALP'e, Prof.Dr. K. Turgay ŞENER'e, Prof.Dr. Başar TEKİN'e, Prof.Dr. Ö. Tarık YALÇIN'a, Prof.Dr. H. Mete TANIR'a, Ydr Doç Dr. Tufan ÖGE'ye, Öğr Gör Dr Yunus AYDIN'a, tezimin her aşamasında birlikte çalıştığımız Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç Dr A. Tansu KOPARAL'a, doktora öğrencisi R. Beklem BOSTANCIOĞLU'na yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Eskin, N. Ovcar 3 hücre kültüründe *Epigallocatechin 3 gallate* isimli maddenin tek başına ya da klasik kemoterapötiklerle kombine yada tek başına kullanımının etkileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012.

Over kanseri; gelişmiş ülkelerde kadınlarda rastlanan kanserler sıralamasında beşinci en sık kanserle ilişkili ölüm sebebidir ve kadın genital sistem kanser ölümlerinde birinci sırayı almıştır (1). Bunun nedeni, hastalığın çoğunlukla ileri evrelerde tanınması ve erken semptom vermemesi olarak söylenebilir. Epitelyal over kanserlerinde tedavi asıl olarak; cerrahi ve medikal tedavidir. Over kanseri jinekolojik kanserlerin içerisinde kemoterapiye en iyi cevap veren kanserler arasındadır. Standart tedavi platin tabanlıdır. Erken evre over kanserli hastalarda da ilk yapılan cerrahi rezeksiyona genellikle kemoterapi eklenir. Tüm evreler göz önünde bulundurulduğunda ilk tedavi sonrasında da relaps ihtimali % 60'lar civarında saptanmış olup, ileri evrelerde bu oran % 80-85'tir. Bu yüzden dikkatler karsinogenezle alakalı kritik hücre yollarını hedef alan biyolojik ajanlara çevrilmiştir (4-8). Tez kapsamında kemoterapötiklerle kombine kullanımlarda alternatif olması amaçlı kullandığımız yeşil çay derivativesi olan EGCG'nin (*epigallocatechin 3 gallate*) Ovcar-3 hücre kültüründe apoptotik etkisini tespit için Tetrazolium Testi (MTT testi) ve DAPI (4-6 diamidino- phenylindole) boyama yaptık. Ardından dört farklı gen üzerindeki etkilerini değerlendirdik. Ovcar-3 hücre kültürü üzerinde EGCG'nin farklı dozlarının, hem tek başına uygulandığında hem de klasik kemoterapötikler olan paklitaksel ve karboplatinin farklı dozlarıyla yapılan kombine uygulamaları sonucunda kanser hücrelerini anlamlı şekilde yok ettiğini saptadık. Üstelik kombine kullanımda tek başına olan etkileri potansiyelize ederek toplamda daha fazla hücreyi apoptozise uğrattı. Yine proliferasyondan sorumlu olduğu bilinen VEGF ve Ki-67 üzerinde de anlamlı azalmaya sebep oldu. Klasik kemoterapötiklere direnç gelişen olgularda, kemoterapötiklerin EGCG ile kombine kullanılmasının tedavi etkinliğini arttırdığını saptadık. Bu bulgumuzun etkinliğinin klinik çalışmalarla desteklenmesinin uygun olduğu sonucuna vardık.

Anahtar Kelimeler: Over kanseri tedavisi, ovcar-3, EGCG, MTT, DAPI

ABSTRACT

Eskin, N. The effect of *epigallocatechin 3 gallate* in Ovarcar 3 cell culture which was used solely or in combination with conventional chemotherapeutics Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, medical specialty thesis in Department of Gynecology and Obstetrics, Eskişehir, 2012. Ovarian cancer is the most common cause of death among women with gynecologic cancer and fifth leading cause of death after lung, breast, colorectal and pancreas cancers in women living in developed countries (1). The reason is considered to be its being diagnosed generally in its late stages and not giving any symptoms in the early stages. Primary treatment for ovarian cancer consist of surgical cytoreduction and paclitaxel/carboplatin combination chemotherapy. Supportive therapy is applied to patients in terminal stage of the disease. Ovarian cancer responds the best to the chemotherapy among the other gynecologic cancers. Taking into account the frequency of each stage of disease and its projected relapse rate, the overall likelihood of relapse after initial therapy for all stages of disease for women with ovarian cancer is 62 percent, it is 80-85 percent for women who present with stage III or IV disease. Fort this reason, a variety of emerging agents with novel targets are currently in development of ovarian cancer (4-8). EGCG; is an extract of green tea, and can inhibit tumorigenesis during the initiation, promotion and progression stages. In this thesis, we performed Tetrazolium test (MTT test) and DAPI to demonstrate the apoptotic effect of EGCG on Ovarcar-3 cell culture. Then, we evaluated its effects on four different genes with real time PCR. The resulting observations are; different doses of EGCG which was used both solely and in combination with paclitaxel and carboplatin, resulted in a significant eradication in cancer cells. Furthermore, when it is used in combination, could potantiate the effects of paclitaxel and carboplatin and would induce apoptosis in more ovarian cancer cells. In addition It also caused a significant decrease on VEGF and Ki-67 which are known to be responsible for proliferation. These results show that EGCG, when used in combination with other conventional chemotherapeutics, is a promising candidate as an alternative treatment.

Key Words: Ovarian cancer treatment, ovarcar-3, EGCG, MTT, DAPI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Over Kanseri ile İlgili Genel Bilgiler	3
2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	3
2.1.2. Over Kanseri Risk Faktörleri	3
2.1.3. Etyoloji ve Patogenez	6
2.1.4. Histopatolojik Sınıflandırma	7
2.1.5. Semptom ve Bulgular	10
2.1.6. Tanı	11
2.1.7. Yayılım Yolları	12
2.1.8. Evreleme	13
2.2. Tedavi	13
2.3. Cerrahi Tedavi	15
2.4. Kemoterapi	18
2.4.1. Adjuvan Kemoterapi	19
2.4.2. Neoadjuvan Kemoterapi	19
2.4.3. Kemoterapatik Ajanların Sınıflandırılması	20
2.4.4. Epitelyal Over Kanserlerinde Kemoterapi	23
2.5. Prognoz	24
2.6. Over Kanserinin Moleküler Biyolojisi	26
2.7. Apoptoz	28

	Sayfa
2.7.1. Apoptoz Belirleme Yöntemleri	29
2.8. COX-2	29
2.9. Anjiogenez-VEGF	30
2.10. Ki 67 (Kinaz inhibitörü 67)	33
2.11. IRS-1	35
2.12. Yeşil Çay	35
2.12.1. Yeşil Çayın Antioksidan-Prooksidan Etkisi	37
2.12.2. Apoptoz ve Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyonu	39
2.13. Hücre Kültürü	40
2.13.1. Çalışmada Kullanılan OVCAR 3 Hücre Kültürünün Özellikleri	41
2.14. Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi	41
2.14.1. Kantitatif Real-Time PCR için kullanılan Problar	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan Aletler	44
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	44
3.4. Kullanılan Araç Gerecin Hazırlanması	45
3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması	45
3.6. Kullanılan Hücreler	45
3.7. Yöntem	46
3.7.1. İn Vitro Sitotoksisite Testi (MTT)	46
3.7.2. Apoptozun Tespiti	47
3.7.3. Real Time PCR	48
3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi	50
4. BULGULAR	51
4.1. MTT Test Sonuçları	51
4.2. DAPI Boyama Sonuçları	56
4.3. Real Time PCR Sonuçları	65
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ark	Arkadaşları
BMI	Body mass index
BRCA	Meme kanseri geni
COX-2	Siklooksijenaz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECM	Ekstraselüler matriks
EGCG	Epigallocatechin 3 gallate
EGFR	Epidermal büyüme faktörü
ET-1	Endoletin 1
ET _A R	Endotelin reseptör
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas
HE4	Human Epididimal Protein
HIF1	Hypoxia inducible factor-1
HNPCC	Hereditör Non Polipozis Kolorektal Kanser Sendromu
IC50	Hücrelerin yarısına etkili konsantrasyon
IGFR	İnsülin benzeri büyüme faktör reseptörü
IL6	İnterleukin 6
IL8	İnterleukin 8
IRS-1	İnsülin reseptör substrat-1
Kd	Kilodalton
Ki-67	Kinaz inhibitör-67
KT	Kemoterapi
LNCaP	Prostat kanseri hücre kültürü
LN	Lenf Nodu
ml	Mililitre
MMP	Matrix metalloproteinaz
mRNA	Messenger Ribonükleik asit
MTT	Tetrazolium Testi
MyD88	İnsan myeloid değişim faktörü 88

TIMP	Matrix metalloproteinaz doku faktörü
TLR-4	Toll benzeri reseptör 4
TSP-1	Trombospondin
RASSF1A	Ras bağlantılı domaine sahip protein ailesi 1A
USG	Ultrasonografi
USA	United States of America
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1.Epigallocatechin 3 gallate	36
5.1. EGCG'nin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	51
5.2. Paklitaksel'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	51
5.3. Karboplatin'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	52
5.4. EGCG ve Paklitaksel'in farklı dozlarının birlikte uygulanmasının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	52
5.5. EGCG ve Karboplatin'in farklı dozlarının birlikte uygulanmasının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	53
5.6. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları A) Kontrol (B) DMSO	56
5.7. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları C. EGCG 150 µM C1) EGCG 250 µM	57
5.8. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları C2) EGCG 350 µM C3) EGCG 450 µM	58
5.9. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları C4) EGCG 550 µM D) Paklitaksel 1,25 Nm	59
5.10. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları D1) Paklitaksel 2,5 nM D2) Paklitaksel 5 Nm	60
5.11. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları E) Karboplatin 50 µM E1) Karboplatin 100 µM	61
5.12. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları E2) Karboplatin 150 µM F) EGCG 350 µM + Paklitaksel 2,5 nM	62
5.13. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları F1) EGCG 450 µM + Paklitaksel 2,5 Nm F2) EGCG 350 µM + Karboplatin 100 µM	63

	Sayfa
5.14. Ovcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları F3) EGCG 450 µM + Karboplatin 100 µM	64
5.15. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde house keeping gene (18S rRNA) ait amplifikasyon eğrileri	66
5.16. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde IRS-1 genine ait amplifikasyon eğrileri	66
5.17. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde KI-67 genine ait amplifikasyon eğrileri	66
5.18. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde COX-2 genine ait amplifikasyon eğrileri	67
5.19. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde VEGF genine ait amplifikasyon eğrileri	67

TABLULAR

	Sayfa
2.1. Over kanseri risk faktörleri	5
2.2. Over kanseri histolojik alt tipleri	8
2.3. Malign epitelyal over tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması	9
2.4. Over kanserinde evreleme	14
2.5 Evreye göre sağkalım oranları	24
4.1. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği	49
4.2. RT PCR için miks içeriği	50
5.1:Test maddelerinin uygulandığı genler ve değişim oranları	68

1. GİRİŞ

Kanser ; teşhis , korunma yöntemleri ve tedavilerdeki gelişimlere rağmen bütün dünyada milyonlarca hastayı etkilemekte ve ölüm nedenlerinin başında gelmektedir.

2010 yılında ABD’de 21880 yeni over kanseri ve 13850 over kanseri nedeniyle beklenen ölüm gerçekleşmiş, bu da over kanserini en önemli jinekolojik malignite haline getirmiştir. Gelişmiş ülkelerde kadın genital sisteminin en sık rastlanan ikinci tümörü olmasına rağmen kadın genital sistem kanser ölümlerinde birinci sırayı almıştır (1). Primer ovaryen tümörlerin büyük bir kısmı (%90) epitelyal hücrelerin köken alırken germ hücreli ve sex kord stromal tümörler overlerde bulunan diğer hücre türlerinden köken alırlar (2, 3).

Over kanserinin primer tedavisi cerrahidir. Cerrahinin amacı; tanıyı doğrulamak, erken evrelerde doğru bir cerrahi evreleme yapmak, ileri evrelerde ise maksimum düzeyde tümör çıkartmaktır (*sitoredüktif cerrahi, debulking*). Epitelyal over kanserlerinde tedavi asıl olarak cerrahidir. Cerrahi sonrası gerekli hastalarda adjuvan tedavi uygulanır. Terminal dönem ve performans durumu iyi olmayan hastalarda destekleyici tedavi de uygulanır. Jinekolojik kanserlerin içerisinde kemoterapiye en iyi cevap veren kanser over kanseridir. Kemoterapi ile kür sağlanabilmesi en mükemmel sonuç olmakla birlikte, tek başına kemoterapi ile kür sağlanması yeni tanı almış tüm kanserlerin ancak % 20’sinde ulaşılabilen bir sonuçtur. Antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör ilaç direncidir. Çeşitli durumlarda etki mekanizması ve yan etki profili farklı ilaçlar kombinasyonlar halinde kullanılırlar. Bunun amacı; ilaç direncinin gelişimini engellemek, tümör hücrelerinin daha geniş kitlesine etkili olabilmek ve kullanılan ilaçların tek başına yüksek doz kullanılmalarıyla ortaya çıkabilecek yan etki spektrumunu hafifletmektir. Epitelyal over kanserinde standart tedavi platin tabanlıdır. Platin içermeyen tedavilere yanıt % 40 iken, platin içeren tedavilere yanıt % 60-80 civarındadır. Kombine kemoterapi rejimlerinde platin bulunması cevap oranlarını, hastaliksız yaşam sürelerini arttırmaktadır. Platin esaslı kemoterapi epitelyal over kanseri olan hastalarda sağ kalımı iyileştirir. Yüksek (%70-80) oranda primer yanıtla rağmen hastaların %75’inde klinik nüks görülür. Tüm evreler göz önünde bulundurulduğunda ilk tedavi sonrasında da relaps ihtimali % 60’lar

civarında saptanmış olup, ileri evrelerde bu oran % 80-85'tir. Bu yüzden dikkatler karsinogenezle alakalı kritik hücre yollarını hedef alan biyolojik ajanlara çevrilmiştir (4-8). Çalışmamızda; over kanseri hücre kültürü olan Ovc3-3 hücreleri üzerinde klasik kemoterapötikler olan paklitaksel ve karboplatinin değişen dozlarıyla, yeşil çay derivativesi EGCG'nin (*Epigallocatekin 3 gallate*) farklı dozlarının kombine kullanımını değerlendirmeyi amaçladık. Kullandığımız EGCG'nin Ovc3-3 hücre kültüründe apoptotik etkisini Tetrazolium Testi (MTT testi) ve DAPI boyama ile belirledik. Ardından dört farklı gen üzerindeki etkilerini değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Kanseri İle İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Over kanseri ; gelişmiş ülkelerde kadınlarda rastlanan kanserler sıralamasında akciğer, meme, kolorektal ve pankreas kanserlerinden sonra beşinci sıradadır. Kadın genital sisteminin uterin korpus kanserinden sonra en sık rastlanan ikinci kanser türüdür. Ayrıca kadın genital sistem kanser ölümlerinde birinci sırada yer alır (1). Over kanseri kadınlarda görülen kanserlerin % 4'ünü, jinekolojik kanserlerinde % 25'ini oluşturur. Bu nedenle jinekolojik onkolojide çok önemli bir yer tutar (1).

Genel popülasyonda hayat boyunca over kanserine yakalanma riski % 1.4'tür. A.B.D.'de 2003 ve 2007 yılları arasında over kanserinin median görülme yaşı 63' tür (9). Hereditör ovaryen kanser sendromu olan kadınlarda median yaş daha erken tespit edilmiştir. Yaşla birlikte epitelyal over kanserinin görülme sıklığı artar. 30 yaş altında epitelyal over kanseri riski çok azdır. 40 yaş üzeri kadınların ölümlerinin ortalama % 2'sinden over kanseri sorumludur. En yüksek görülme sıklığına 75-79 yaş grubunda ulaşır (2-3). Epitelyal over kanseri insidansı coğrafik yerleşime göre de farklılıklar gösterir.

2.1.2. Over Kanseri Risk Faktörleri

Over kanserinin asıl nedeni belli değildir. Ancak epidemiyolojik çalışmalar sonucunda risk faktörleri belirlenmiştir. Bu faktörler başlıca çevresel, endokrin, genetik ve diğer faktörler olarak sınıflandırılırlar. Erken menarş (12 yaşından önce), geç menopoz (50 yaşından sonra), infertilite, nulliparite, 40 yaş üzeri popülasyon, beyaz ırk, ailede over kanseri hikayesi gibi faktörlerin riski arttırdığı bildirilmiştir (10-12). Yüksek parite, oral kontraseptif kullanımı, emzirme hikayesi, tüp ligasyonu ve histerektomi hikayesi de riskte azalma ile karşımıza çıkar (11, 13, 14). Gebeliğin over kanseri üzerindeki koruyucu etkisinin nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Fakat değişik mekanizmalarla bu koruyucu etkinin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlardan en popüler olanı gebelikte ovulasyonun engellenmesi

suretiyle over yüzeyinde neoplaziye yol açacak alanların gelişmesinin önlenmesi görüşüdür. Oral kontraseptiflerin over kanseri gelişim riskini % 30-60 oranında azalttığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan bir çalışmada oral kontraseptif kullanımının süresi ile risk azalması arasında yakın bir ilişki bulunduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, 5 yıl ve üzerinde oral kontraseptif kullanan kadınlarda over kanseri gelişme riski % 50 oranında azalmaktadır (10). Tüp ligasyonu ve histerektominin over kanseri gelişme riskini azaltması bu görüşü destekleyen diğer bulgulardır. Bu azalmanın nedeni olarak vajinal yolla gelen karsinojenlerin overlere ulaşmasının engellenmesi düşünülmektedir.

Kohort çalışmalarında; endometriozisin epitelyal over kanseri için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir ve %2.5 oranında malign transformasyon riski gösterdiği düşünülmektedir(15-19). Son zamanlarda, retrograd menstürasyon sonucu gelişen endometriozis alanlarından epitelyal; özellikle de endometrioid ve clear cell over kanseri gelişiminin arttığı yönünde değişik görüşler ileri sürülmektedir (20). Endometriozis zemininde gelişen over kanseri olgularının genç yaşlarda ve nulliparlarda görüldüğü, iyi diferansiye erken evre tümörler olduğu da belirtilmiştir (21, 22). Son yıllarda endometriozisli hastaların over kanserine yakalanmasını öngörmede human epididimal protein 4 (HE 4) gibi yeni belirteçler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (23). Polikistik over sendromu olanlarda da over kanserine yakalanma riskinin arttığına dair çalışmalar bulunmaktadır (24).

Çevresel faktörler arasında hayvansal yağ içeriği yüksek diyetler riski artırabilirken, sebzedden zengin beslenme, vitamin A ve vitamin C alımı ile risk azaltılabilmektedir. Literatürde talk maruziyetinin risk faktörü olduğunu gösteren ve göstermeyen çalışmalar mevcuttur (25, 26). Huncharek ve arkadaşları (ark.) yapmış oldukları geniş bir vaka kontrol çalışmasından sonra perineal talk maruziyeti sonucunda over kanserine yakalanma riskinin % 30-60 oranında arttığını öne sürmüşlerdir (27). Sigara içen kadınlarda içmeyenlere oranla müsinoz over kanseri riskinde artış tespit edilmiştir (28-31).Yine yüksek *body mass indeksine* sahip kadınlarda (BMI 30 kg/m² ve üzeri) düşük oranda da olsa over kanserine yakalanma riskinde artış saptanmıştır (30, 32, 33).

Tüm over kanserlerinin % 10'u herediterdir (34, 35). Over kanseri ile ilgili sendromların çoğu otozomal dominant kalıtıma sahip ancak penetransı değişken

heterojen bir gruptur. Jinekolojik onkoloji pratiğinde karşımıza çıkan kalıtsal sendromlar; meme – over kanseri sendromu, herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromu ve site spesifik over kanseridir (34).

Meme – Over Kanseri Sendromu : BRCA (meme kanseri) gen mutasyonları herediter over kanseri vakalarının % 90'ında, tüm over kanser vakalarının da % 10'unda saptanırlar (36, 37). Vakaların büyük kısmı BRCA 1 geni, daha küçük bir kısmı ise BRCA 2 geni ile ilişkilidir. Son yıllarda over kanserine yakalanmış olanlarda üç yeni gen daha belirlenmiştir. Bunlar RAD 51c, RAD 51d ve BRIP1 genleridirler (38). BRCA 1 ve BRCA 2 gen ürünlerinin DNA tamiri bozulmuştur. BRCA 1 geninde kanıtlanmış mutasyonu bulunan kadınlarda hem meme (%45-85) hem de over (% 20-45) kanseri gelişme riski artmıştır (36-41). BRCA geni taşıyan over kanseri olgularında seröz adenokarsinom en sık görülen histopatolojik fenotiptir (42).

Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanseri Sendromu (HNPCC); Lynch II olarak da bilinir. Otozomal dominant geçiş gösteren bu kanserle birlikte endometrium, over, ürogenital trakt ve gastrointestinal sistemin diğer kanserlerine karşı da ailevi yatkınlık mevcuttur. HNPCC sendromlu kadınların hayatları boyunca endometrium kanserine yakalanma riski % 22-60 , over kanserine yakalanma riski ise % 9-12' dir (43, 44).

Site spesifik over kanseri; tüm kalıtsal over kanserlerinin % 10- 15'ini oluşturur.

Tablo 2.1 Over kanseri risk faktörleri

Nulliparite
Erken menarş
Geç menopoz
Beyaz ırk
İleri yaş
Aile öyküsü
Kuzey Amerika ya da Kuzey Avrupa'da yaşama

2.1.3. Etyoloji ve Patogenez

Over kanseri etyolojisi multifaktöryeldir. Büyük bir kısmı yüzeyinde bulunan epitelyal hücrelerden köken almakla birlikte germ hücreli, sex cord stromal, mikst tip tümörler gibi diğer hücre gruplarından da köken alan tümörleri mevcuttur. Over kanserinin patogenezini tam olarak açıklanamamış ancak çeşitli hipotezler öne sürülmüştür.

Sürekli Ovulasyon Teorisi

Bu ilk olarak Fathalla ve ark. (45) tarafından öne sürülmüş bir teoridir. Ovulasyon over yüzey epitelinde sürekli travmalara yol açar. Devamlı ovulasyon over epitelinde ovulasyon olan noktalarda rejenerasyon sırasında inklüzyon cisimleri oluşumuna ve yüzey epitelinin proliferasyona uğrayarak kriptler ve papillalar oluşturmasına neden olur, mitotik aktivitede artış görülür. Bu değişikliklerin en belirgin olduğu dönem ovulasyondan hemen sonraya uyar. Bu teoriyi destekleyen faktörler arasında; düşük parite, erken menarş, geç menopoz ile over kanseri riskinin artması, kombine tip oral kontraseptif kullanımı, doğum sayısında artış ve laktasyon süresinin uzun olmasıyla over kanseri oluşum riskinin azalması sayılabilir. Ovulasyon yokluğu nedeniyle puberte öncesinde ve gonadal disgenezili hastalarda epitelyal over neoplazileri çok nadir olarak görülür. Her ovulasyonla meydana gelen tekrarlayan travma over kanseri ile sonuçlanabilecek spontan mutasyonlara yol açabilir. Sonuç olarak ovulatuvar siklus sayısı arttıkça over kanseri riski artar (45-49).

Pelvik Kontaminasyon Teorisi

Çevresel faktörler overlere asendan bir yolla ulaşırlar. Bunlar over yüzey epitelinde ve diğer mezotelde histopatolojik değişikliklere yol açabilir. Üstelik menstrüel ürünlerin transtubal geçişinin endometriozis ve endometriozis zemininde de clear cell kanserin gelişimine neden olduğu ileri sürülmektedir. Tüp ligasyonu ve histerektomi ile riskin azalması bu hipotezi desteklemektedir (50).

Gonadotropin Teorisi

Fathalla'nın sürekli ovulasyon teorisi hipooovulasyon veya anovulasyon görülen infertilite hastalarındaki over kanseri riski artışı açıklayamaz. Vakaların %81'i 50 yaş üzerinde postmenopozal olması ve bu dönemde de gonadotropinlerin çok yüksek seviyede olması ovarian karsinogenezde FSH ve LH yüksekliğinin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Normal over yüzey epiteli FSH ve LH

reseptörlerini eksprese eder ve bunlar epitelin proliferasyonu ve büyümesini regüle edebilir; bu reseptörlerin uyarılması epitelyal over kanseri gelişiminde ve progresyonunda rol alabilir (51-57). Yine ovulasyon indüksiyonu için verilen ekzojen gonadotropin tedavisi ile over kanseri arasında bir ilişkinin son yıllarda ortaya çıkması bu hipotezi desteklemektedir (58, 59).

Moleküler değişiklikler: Over kanserlerinde kromozom bozuklukları ilk kez 6 no'lu kromozomun uzun kolunda delesyonla ortaya konmuştur. Sonra kromozom 14'te delesyon ve kromozom 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 15, 19'da yapısal anomaliler saptanmıştır. Moleküler biyolojik çalışmalar daha ziyade protoonkogenler ve tümör süpresör genler üzerine yoğunlaşmıştır. Over kanserinde tespit edilen protoonkogenler C-mos, c-fms, c-erbB-1, her-2/neu ve ras genleridir. Yine tümör süpresör bir gen olan p53'ün baskılanması over hücrelerinde neoplastik değişikliklere yol açabilmektedir (60-63)

2.1.4. Histopatolojik Sınıflandırma

Malign over tümörlerinin % 80-90'ını epitelyal over tümörleri oluşturur. Epitelyal over tümörlerinin over yüzey epitelinin stromaya yaptığı invajinasyonlardan köken aldığı düşünülmektedir. Embriyolojik olarak bu epitel çöloomik epitelden gelişir ve mezotelyum ile devam eder. Over kanseri heterojen bir hastalıktır ve çeşitli histolojik alt tipleri barındırır (Tablo 2.2).

Bütün epitelyal over tümörleri benign, borderline (atipik proliferatif) ve malign (karsinom) olarak sınıflandırılırlar. Malign epitelyal over tümörlerinin histopatolojik sınıflaması tablo şeklinde gösterilmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.2. Over kanseri Histolojik alt tipleri

Çölomik Epitelden Kaynaklananlar
Seröz karsinom
Endometrioid karsinom
Berrak hücreli karsinom
Transizyonel hücreli karsinom
İndifferansiye karsinom
Karsinosarkom ve mikst mezodermal tümör
Germ hücrelerinden kaynaklananlar
Teratom
Matür kistik teratomdan köken alan malign neoplaziler
İmmatür teratom
Disgerminom
Embriyonel karsinom
Endodermal sinüs tümörü
Koryokarsinom
Özelleşmiş Gonadal Stromadan Kaynaklananlar
Granulosa hücreli karsinom
Sertoli leydig hücreli karsinom
Jinadoblastom
Lipid hücreli tümörler
Non Spesifik Mezenkimden Kaynaklanan Tümörler
Sarkomlar
Lenfomalar
Metastatik Tümörler

Tablo 2.3. Malign epitelyal over tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması

Histolojik Tip	Benzediği hücre tipi
Seröz	Endosalpings
Müsinöz	Endoservikal
Endometrioid	Endometrial
Brenner	Transizyonel
Clear cell	Müllerian
İndifferansiye	Anaplastik
Mikst	Mikst

Borderline Over Tümörleri

Epitelyal tümörlerin % 15 kadarı düşük malignite potansiyelli tümörler olarak isimlendirilen borderline tümörler olarak kategorize edilirler. Karsinomlardan ayıran en önemli özelliği invazyon olmamasıdır (64). Metastazları nadiren invaziv karakterde olabilir.

Benign adenomlardan ise gösterdikleri atipi ile ayrılırlar. İnvaziv over kanserlerine göre 15 yıl daha önce, 40'lı yaşlarda görülürler. Borderline tümörler, epitelyal over tümörlerinin % 10-15 kadarını oluşturur. En sık olarak seröz alt tip görülür. Hastaların neredeyse % 50 kadarında CA-125 düzeyleri normal olarak bulunur (65).

Karsinomlar

Seröz karsinom, en sık görülen over malignitesidir; over karsinomlarının % 60-80'ini oluşturur. Overin benign ve malign tümörlerinin üçte biri, tüm over kanserlerinin de % 50'sinden fazlası seröz tiptir. Seröz karsinomların % 85-90'ı evre III-IV hastalıkla gelir ve vakaların % 50-70 kadarı bilateraldir. En fazla bilateral görülen epitelyal over kanseridir. Histolojik önemli bir özelliği *psammoma* cisimlerinin görülmesidir (vakaların %30 kadarında). Seröz karsinomlar agresif lezyonlardır. 5 yıllık sağ kalım % 10 civarındadır (66, 67).

Müsinöz karsinom; endoservikal gland hücrelerini andıran hücrelerce oluşturulmuştur. Tüm over tümörlerinin % 15'ini, epitelyal over kanserlerinin ise % 10'unu müsinöz tümörler oluştururlar. Yavaş ve sinsi büyümeleri nedeniyle tüm abdominal kaviteyi dolduracak şekilde çok büyük boyutlara ulaşabilirler. Son

çalışmalar, müsinöz over tümörlerinin sıklıkla ekstraovaryen kaynaklı olup overe metastaz yaptığı yönündedir. Neoplastik hücrelerin intraabdominal implantlar ile birlikte abdominal kaviteye çok fazla miktarda müsinöz materyal salgılaması ile oluşan bir durum olarak tanımlanan *pseudomiksoma peritonei*'de, özellikle intestinal hücreler ve bilateral over tutulumu sık görülür (68-70).

Endometrioid karsinom; epitelyal tümörlerin % 6'sını oluştururlar. Saf endometrioid karsinomların % 84'ü evre I ve II'dir. Mikst karsinomlar ise genellikle ileri evredirler. Prognozu daha erken evrede tanı almalarından dolayı daha iyidir (68-70).

Clear cell (Berrak hücreli) karsinom; mezonefroid karsinom olarak adlandırılır. Epitelyal over kanserlerinin % 3'ünü oluştururlar. Bu tümörler over tümörleri arasında en kemorezistan kanserler olup; daha agresif davranırlar. Berrak hücreli karsinom over maligniteleri arasında 5 yıllık yaşam beklentisinin % 40 olması ile en kötü prognozlusudur. Hiperkalsemi ve endometriozisle en sık birlikte olan tümörlerdir (68-70).

Brenner tümörü; tüm over tümörlerinin % 2'sini oluşturur. Hücre nükleusları '*coffee bean*' şeklinde görülebilir ve *reinke kristalleri* bu tümörde görülür (68-70).

Mikst tip tümörler; birden fazla histolojik tipi % 10'dan fazla oranlarda içerirler. Özellikle seröz epitelyal komponentin bulunması prognaz açısından kötüdür (68-70).

Metastatik Over Kanseri

Over tümörünü taklit edebilecek birçok metastatik tümör vardır. Daha erken yaşta görülürler. En sık gastrointestinal kaynaklıdır (68-70).

2.1.5. Semptom ve Bulgular

Over kanserinin seyri sırasında geç ve nonspesifik semptom verdiği düşünüldüğünden ve tanı anında da genellikle ileri evrede olduğundan tarihte 'sessiz katil' olarak adlandırılmıştır. En sık görülen semptomlar dolgunluk hissi, karında basınç hissi ve karın çevresinde artış, bulantı kusma, anoreksi, konstipasyon, erken tokluk hissi, sık idrara çıkma olarak sayılabilir. İntraabdominal basınç artışından veya abdominal sıvının peritoneal kaviteye transüde olmasından dolayı respiratuar

semptomlar da görülebilir. Anormal vaginal kanama ise nadir görülen bir semptomdur. Tümörün torsiyon, enfeksiyon ve rüptürüne bağlı akut karın semptomları da gelişebilir (71-74).

Abdominal muayenede palpe edilebilen irregüler kontürleri olan kitle, asit varlığını gösteren yer değiştiren matite bulunabilir.

2.1.6. Tanı

Epitelyal over kanserlerinin jinekolojik tümörler içerisinde en sık ölüm sebebi olmasının nedeni olarak, hastalığın erken semptom vermemesi ve daha çok ileri evrelerde tanı alması sayılabilir. Tanıda en çok kullanılan metod pelvik muayene, transvaginal USG ve serum CA-125 değerleridir. Pelvik muayenede; kitlenin bilateral, solid ve/veya semisolid olması, çevre dokulara fikse, konturları düzensiz, beraberinde asit olması, kitlenin üst abdomene kadar uzanması ve rektovaginal muayenede nodülarite saptanması kitlenin malign olabileceğini düşündürür (71-74).

USG, over kanseri tanısında en sık kullanılan görüntüleme yöntemidir. Malignite tanısı koymada pelvik muayene ve USG'nin değeri benzerdir. USG'de dikkat edilen karakteristik özellikler arasında over boyutu (premenopozal kadınlarda > 20 cm, postmenopozal kadınlarda >10 cm), yüzey özellikleri, septa bulunması ve kalınlığı, papiller projeksiyonlar, multiokülarite, solid nodül ve asit varlığı yer alır (75-78). Kitlenin doppler incelemesinde, pulsatilite ve rezistans indekslerinin düşük saptanması malignite lehinedir. İndekslerdeki düşüklük; tümörde ortaya çıkan neovaskülarizasyon nedeni ile kan akımının artması ve akım önündeki direncin azalması sonucundadır.

CA 125; epitelyal over kanserlerinin tümör belirteci olmakla birlikte, asıl kullanım şekli tanısı koyulmuş tümörün takibi ve tedaviye yanıtının değerlendirilmesi amacıyla. Glikoprotein yapısında olan bu molekül, epitelyal kanserlerin yanısıra birçok benign olayda da yükselebilir. Endometriozis, gebelik, enfeksiyonlar, benign jinekolojik tümörler, karaciğer ve pankreas hastalıkları bunlar arasında sayılabilir. Refarans değeri 35 IU/ml olarak kullanılır (79-83). Malignite olmayan hastalarda CA-125 düzeyleri genellikle stabil seyrederken veya azalırken, malignite olanlarda yükselme olduğu görülür. Premenopozal hastalarda yalancı

pozitiflik oranı yüksektir ve pozitif prediktif değeri düşüktür. CA-125 epitelyal over kanserlerinin birçoğunda artmasına rağmen, prelinik hastalığı yakalamada yetersizdir. İnvaziv evre 1 epitelyal over kanseri olan hastaların % 23- 40'ında CA-125 artar, Fakat sonraki evrelerde % 88 oranında pozitiflik vardır. 40 yaşın altındaki hastalarda germ hücreli over tümörlerini ekarte etmek için AFP, beta-HCG, LDH gibi tümör belirleyicileri istenmelidir (80, 84-88).

Bilgisayarlı tomografinin (BT); asit, mezenterik ve omental hastalığı saptamada sensitivitesi yüksektir (84, 89).

2.1.7. Yayılım Yolları

Transperitoneal Yayılım

Peritoneal kaviteye dökülen hücrelerle yayılır. En erken ve en sık görülen yayılım şeklidir. Hücreler peritoneal sıvıların dolaşım yolunu izlemeye eğilimlidirler. Sıvı; solunum güçleriyle pelvisten özellikle sağdan parakolik kanallar boyunca yukarı ince barsak mezenterine oradan da sağ hemidiafragmaya gider. Bu yüzden metastazlar sıklıkla parakolik alanlarda, sağ hemidiafragmada, karaciğer kapsülünde, barsak ve mezenterin peritoneal yüzeyinde ve omentumda görülür (90, 91).

Lenfatik Yayılım

Overlerin major lenfatik drenajı sefalik yönde aortik nodlara infundibulopelvik ligamentler aracılığıyla olur. Özellikle ileri evre hastalıkta pelvik ve paraaortik lenf nodlarına yayılım olur. Diafragma ve retroperitoneal lenf nodlarına yayılım, diafragma üstü özellikle de supraklavikular lenf nodlarına yayılıma öncülük eder (92, 93).

Hematojen Yayılım

Tanı anında akciğer, karaciğer gibi vital organ parankimlerine hematojen yayılım hastaların yalnızca % 2-3'ünde görülür. Hematojen yolla akciğer ve karaciğere metastaz olur (90, 91).

2.1.8. Evreleme

Hastalığın evresi herhangi bir tedavi öncesi yani ilk tanı esnasındaki tümör yayılımı ile belirlenir. Over kanseri International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) tarafından geliştirilen evreleme sistemi ile cerrahi olarak evrelendirilir (Tablo 2.4). Klinik olarak overe sınırlı bir tümör belirlense bile, olguların çoğunda metastaz saptanacaktır. Bu nedenle, tedaviye yön göstermek için doğru cerrahi evreleme çok önemlidir. Hastaların yaklaşık üçte biri cerrahi evre I ya da evre II'dir.

2.2. Tedavi

Over kanserlerinin primer tedavisi cerrahidir. Cerrahinin amacı, tanıyı doğrulamak, erken evrelerde doğru bir cerrahi evreleme yapmak, ileri evrelerde ise maksimum düzeyde tümör çıkartmaktır. Epitelyal over kanserlerinde asıl olarak birincil tedavi cerrahidir. Cerrahi sonrası olguların çoğunda kemoterapi uygulanır. Terminal dönem ve performans durumu iyi olmayan hastalarda destekleyici tedavi de uygulanır. Epitelyal over kanserlerinde yapılan ilk cerrahi girişim çok önemlidir. Eğer operasyonda tümöral rezeksiyon optimal boyutlarda uygulanmazsa; daha sonra tekrarlayan veya persiste eden tümörleri temizlemek amacıyla yapılan sekonder operasyonlar hastanın yaşam süresine ve kalitesine bir katkıda bulunmamaktadır. Radyoterapi ile ilgili küçük çaplı bazı çalışmalar olsa da günümüzde rutin değildir. Bazı merkezlerde intraperitoneal kemoterapi de uygulanmaktadır. Ayrıca son yıllarda biyolojik ve *targeted* gibi tedaviler denenmektedir (5, 8, 94, 95).

Tablo 2.4. Over ca' da evreleme

<p>Evre 1: Overde sınırlı tümör</p> <p><i>Evre 1a)</i> Tek overde sınırlı tümör; dış yüzeyde tümör yada malign hücre içeren asit yada yıkama sıvısı yok, kapsül intakt</p> <p><i>Evre 1b)</i> Her iki overde sınırlı tümör; dış yüzeyde tümör yada malign hücre içeren asit yada yıkama sıvısı yok, kapsül intakt</p> <p><i>Evre 1c)</i> Tek veya her iki overde sınırlı tümör; ancak malign hücre içeren asit yada yıkama sıvısı yada dış yüzeyde tümör mevcut veya kapsül yırtılmış</p> <p>Evre 2: Pelvik yayılım gösteren tek veya her iki overle sınırlı tümör</p> <p><i>Evre 2a)</i> Uterus ve/veya tüplere yayılım gösteren tümör</p> <p><i>Evre 2b)</i> Diğer pelvik dokularda yayılım gösteren tümör</p> <p><i>Evre 2c)</i> Tümör 2a veya 2b ; ancak malign hücre içeren asit veya yıkama sıvısı veya dış yüzeyde tümör mevcut; veya kapsül yırtılmış</p> <p>Evre 3: Pelvis dışında peritoneal implantlar ve/veya retroperitoneal ve/veya inguinal lenf nodu tutulumu mevcut (karaciğer üzerinde metastatik implantlar evre 3 olarak kabul edilir.)</p> <p><i>Evre 3a)</i> Abdominal peritoneal yüzeylerde histolojik olarak kanıtlanmış mikroskobik yayılım, lenf nodu tutulumu yok</p> <p><i>Evre 3b)</i> Abdominal peritoneal yüzeylerde 2 cm'i aşmayan makroskobik implantlar mevcut, lenf nodu tutulumu yok</p> <p><i>Evre 3c)</i> Abdominal peritoneal yüzeylerde 2 cm üzerinde implantlar mevcut ve/veya retroperitoneal veya inguinal lenf nodları tutulmuş</p> <p>Evre 4: Uzak metastaz (malign hücre içeren plevral efüzyon veya parankimal karaciğer metastazı)</p>
--

2.3. Cerrahi Tedavi

Erken Evre Hastalıkta Cerrahi Tedavi

Erken evre olarak düşünölen over kanserlerinde cerrahi evreleme ile hastalığın overlere veya pelvise sınırlı olup olmadığı belirlenmektedir. Prognoz ve daha sonraki tedavi yaklaşımları primer cerrahi evrelemeden elde edilecek olan bilgilere bağılıdır. Cerrahi evreleme midline insizyon ile yapılmalı ve üst abdomen mutlaka tümörün yayılımı açısından inspeksiyon ve palpasyon ile değerlendirilmelidir. Erken evre over kanserlerinde belirgin oranda mikroskopik okült metastazlar vardır. Bu nedenle tümör tek overe sınırlı bile olsa mutlaka cerrahi evreleme yapılmalı ve olası okült metastazlar saptanmalıdır. Erken evrelerde saptanan okült metastazlar hem hastaların prognostik değerlendirmesinde hem de adjuvan tedavi gerekliliğine karar vermede önemlidir. Evre 1 hastaların % 10-36 kadarında pozitif sitoloji saptanır. Tüm evreler değerlendirildiğinde hastaların % 64'ünde pozitif sitoloji bulunur. Küçük metastazların kaçırılmaması için dikkatli inspeksiyon ve palpasyon yapılmalıdır. Evre 1 sanılan hastalarda % 5 oranında omentum metastazı olabildiği için tüm hastalara infrakolik omentektomi yapılmalıdır. Erken evre hastalıkta yapılan; evreleme cerrahisidir. Hastaların yaklaşık % 25-30'u erken dönemde (Evre I-II) yakalanır (96). Erken evrelerde adjuvan tedavi ihtiyacı, tümörün düşük veya yüksek riskli olmasına göre belirlenir. Düşük riskli, erken evre tümörlerde hastalısız sağ kalım % 95'lere kadar çıkmaktadır. Erken evre over kanserlerinde cerrahi evreleme ve adjuvan tedavinin değerlendirildiği iki önemli çalışma vardır; ICON ve ACTION. Her iki çalışmanın beraber değerlendirilmesinde özellikle Evre Ia Grade I-II hastalıkta tam anlamıyla yapılmış cerrahi evreleme ile adjuvan tedavinin ek bir faydası görölememiştir (5, 96-99). Buna karşın erken evre yüksek riskli grupta rekürrens oranları % 40'ın üstüne çıkmaktadır. Bu hastalarda adjuvan tedavinin sağkalımı arttırdığı kanıtlanmıştır.

Evre la grade 1-2 hastalarda fertilitte koruyucu cerrahi yapılabilir. Bu durumda uterus ve kontralateral over korunur.

İleri Evre Hastalıkta Cerrahi Tedavi

Sitoredüktif Cerrahi

İleri evre over kanserlerinde amaç mümkün olduğunca fazla tümör dokusunu çıkartmaktır (sitoredüksiyon, debulking). Tümöral dokunun çıkarılması ile fizyolojik

faydalar elde edilir. Gastrointestinal sistem üzerindeki baskı kalktığı için daha iyi bir beslenme sağlanabilir. Asit azalır. Tümör perfüzyonu ve büyüme fraksiyonu artar. Bunun sonucunda adjuvan tedavilere yanıt oranı yükselir. Hastanın immünolojik cevabı artar. Genel olarak over kanserinin yayılımı peritoneal kavite ile sınırlıdır ve yayıldığı organlarda derinlere invaze olmaz, cerrahi olarak rezeksiyona imkan tanır. Yayılımın genelde yüzeysel olması birçok vakada major rezeksiyon gerektirmeden sitoredüksiyona imkan tanımaktadır. Cerrahi sonrası kalan rezidüel tümör hacmi 1 cm'den küçük olan hastaların yaşam süreleri daha büyük rezidü kalan hastalara göre çok daha iyidir. Optimal olarak sitoredüksiyon yapılmış olan hastalarda *median survival* 36.7 ay iken, optimal sitoredüksiyon yapılamayanlarda *median survival* 16.6 ay olarak bulunmuştur . Optimal sitoredüksiyon durumunda hastalığın boyutu 1 cm'nin altındadır. Suboptimal sitoredüksiyonda ise rezidüel hastalık 1 cm'nin üzerindedir (8, 89, 100-102).

İleri evre over kanserlerinde cerrahın amacı tümörün tamamını çıkartmaktır. Eger bu mümkün değilse; kalan rezidü tümör çapını 1 cm altına indirmektir (89). Eger rezidü tümör çapı 1 cm altına indirilemiyorsa; barsak rezeksiyonu, splenektomi, karaciğer rezeksiyonu gibi agresif cerrahi işlemler yapılmamalıdır. Sitoredüktif cerrahinin incelendiği 925 hasta içeren 7 çalışmanın derlemesinde bu hastaların % 42'sinde optimal sitoredüksiyonun yapılabildiği gösterilmiştir (4, 8, 103-108). Bir çalışmada ise bu oran % 87 olarak rapor edilmektedir (8). Hastalık pelvise sınırlı ise genellikle optimal olarak rezeksiyon edilebilmektedir. Optimal rezeksiyon için hastaların hemen tamamı total abdominal histerektomi + bilateral salpingooforektomi + omentektomi + peritoneal yüzeylerden veya barsaktan metastatik lezyonların rezeksiyonunu gerektirmektedir. Over kanserinin pelvise sınırlı olduğu fakat çevre organları dens bir şekilde invaze ettiği bazı olgularda radikal pelvik cerrahi gerekebilmektedir. Bu durumda retroperitoneal yaklaşım ve pelvik peritonun rezeksiyonu, kardinal ve uterosakral ligamentlerin, sigmoid kolon ve rektum ile alt üriner traktın bir kısmının rezeksiyonu gerekebilmektedir (106). İleri evre over kanserlerinde sitoredüksiyon amacıyla histerektomi ve ooforektomiye ilaveten en çok uygulanan ek cerrahi girişim sigmoid kolon ve/veya rektumun bir kısmının rezeksiyonudur (8, 106).

Evreleme cerrahisi, hastanın tedavisinin planlanmasında ve prognozun

belirlenmesinde çok önemlidir. Buna rağmen, evreleme cerrahisinin optimum yapılamaması hastalığın gerçek evresini ortaya koymadığı gibi, birçok hastaya yeterli tedavi olanağı da sağlamamaktadır. Over kanserinde lenfadenektomi; evreleme ve tedavi amaçlı yapılmaktadır. FIGO Ia-Ib/grade 3 ile Ic hastalarda ve FIGO II-IV hastalarda yapılan cerrahiye pelvik paraaortik lenfadenektomi de eklenmesi önerilmektedir. Lenfatik diseksiyonun sınırları; prekaval, parakaval, interkaval, yüzeysel ve derin aortik, preaortik, paraaortik, retrokaval ve retroaortik lenf nodu gruplarını içermeli ve renal damarlar seviyesine kadar çıkmalıdır. Yapılan bazı çalışmalarda tedavi başlangıcında evrenin tam olarak bilinmesinin, prognozun daha net bir şekilde belirlenmesine olanak tanıyacağından, eğer bir kontrendikasyon yok ise, tüm over kanserli hastalarda rutin lenf nodu diseksiyonu uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Yine buna ek olarak lenfadenektomi yapıldığında hastalısız sağ kalımda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (7, 109-113). Ancak son yıllarda yapılan başka çalışmalarda ise evre 3 ve 4 over kanserlerinde lenfadenektominin yaşam süresine bir katkısı olmadığı ileri sürülmüştür (114).

Sıklıkla primer tümörün ve geniş omental kekin çıkarılmasıyla asit tamamen kaybolur. Omental kekin çıkarılması bulantıyı ve dolgunluğu ortadan kaldırır. İntestinal metastazların alınması, yeterli intestinal fonksiyonun sağlanmasını ve hastanın nutrisyonel durumunun düzelmesini sağlar. Böylece hastanın sonraki kemoterapiyi tolere etmesi kolaylaşır (8).

Sekonder Sitoredüktif Cerrahi

Sekonder sitoredüksiyon, primer cerrahisi optimal veya suboptimal yapılmış ve kemoterapisini almış hastalarda uygulanacak olan ek tedavinin başarı şansını arttırmak ve/veya hastanın semptomlarını gidermek için uygulanan cerrahi girişime verilen genel bir isimdir (6). Randomize prospektif çalışmaların olmaması nedeniyle yaşam süresi uzamasının hastalığın biyolojik özelliklerinden mi yoksa sitoredüksiyondan mı kaynaklandığı henüz net olarak bilinmemektedir. Second-look laparotomi esnasında optimal sitoredüksiyon yapılan ve yapılmayan hastalar arasında yaşam sürelerinin farklı olmadığını rapor eden yazarlar da vardır. Sekonder sitoredüksiyon, başlıca primer kemoterapi uygulandıktan sonra uzun bir süre hastalısız yaşadıkten sonra izole rekürrens gösteren hastalarda faydalı olabilir. Bu tanıma uyan hastalarda uygulanan agresif sitoredüktif cerrahi girişimlerin median

yaşam süresini uzatabileceği düşünülebilir (115). Sekonder sitoredüktif cerrahinin başarısı hastalısız dönemin 12 aydan uzun olması ve sitoredüksiyondan sonra kalan rezidüel hastalığın miktarı ile yakından ilişkilidir (116-119).

İnterval Sitoredüktif Cerrahi

Birkaç siklus kemoterapi sonrası uygulanan primer sitoredüktif cerrahi tanımlar. Beraberinde morbiditeyi artıran hastalığı olanlar, masif effüzyona bağlı genel durumu iyi olmayan ve cerrahi için kötü hastalar, ileri evre epitelyal over kanserlerinde suboptimal rezeksizyon yapılabileceği düşünülen hastalar için alternatif tedavi seçeneğidir (120).

2.4. Kemoterapi

Kemoterapi sitotoksik veya sitosidal aktiviteye sahip ilaçlarla yapılan tedavinin genel adıdır. Jinekolojik kanserlerin içerisinde kemoterapiye en iyi cevap veren kanser over kanseridir. İlk kemoterapi uygulamaları 1940'lı yıllarda başlamıştır. Kemoterapi ilk zamanlar yalnızca yaygın veya metastatik hastalıkta kullanılırken, bugün erken evre kanserlerde de tedavi yaklaşımının önemli bir parçası haline gelmiştir. Kemoterapik ajanların jinekolojide kullanımı 1970'li yıllarda başlamıştır. Kemoterapi ile kür temin edebilmek en mükemmel sonuç olmakla birlikte, tek başına kemoterapi ile kür temini yeni tanı almış tüm kanserlerin % 20'sinde sağlanabilmektedir. Kemoterapi over kanserlerinde küratif ve palyatif amaçlı olarak kullanılmaktadır. Birçok sitotoksik ajanın etkinliği vardır. Bunlar arasında platin bileşikleri (sisplatin, karboplatin), klasik alkilleyici ajanlar (ifosfomad, siklofosamid, melfelan, tiotepa, klorambusil), taksanlar (doretaksel, paklitaksel), antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin, mitoksantron), heksametilmelamin, 5-fluorourasil, etoposid, metotraksat, mitomisin-C yer alır.

Antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör ilaç direncidir. Bazı tümörler kemoterapiye hiç yanıt vermezler. Bu durum birincil direnç olarak adlandırılır. Diğer bir tanım da kemoterapi alırken direnç gelişmesidir ki; buna ikincil direnç adı verilir. Yapılan çalışmalarda epitelyal over kanserlerinde özellikle paklitaksele karşı meydana gelen dirençten PI3k/AKT yolağında meydana gelen değişimlerin sebep olduğu rapor edilmiştir (121). Epitelyal over kanserleri kemosenitif tümörlerdir. İlaç direncinin gelişimini engellemek, tümör hücrelerinin

daha geniş kitlesine etkili olabilmek, kullanılan ilaçların tek başına yüksek doz kullanılmalarıyla ortaya çıkabilecek yan etki spektrumunu hafifletmek amacıyla o tümörde etkili fakat etki mekanizması ve yan etki profili farklı ilaçlar kombinasyonlar halinde kullanılırlar. Çalışmamızın da ana temelini oluşturan yeni kombinasyon alternatifleri üzerine birçok çalışma yapılmaktadır.

2.4.1. Adjuvan Kemoterapi

Lokal hastalığın klinik olarak saptanabilir rezidüel tümör bırakılmayacak şekilde cerrahi tedavisinden hemen sonra uygulanan sistemik kemoterapidir. Tedavinin amacı lokal kontrolü artırmak, subklinik rezidüel hastalığı ve olası uzak metastazları kontrol etmek, palyatif tedaviyi küratif hale getirmektir. Jinekolojik tümörlerden over kanserinde 1970’li yıllardan itibaren adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. Erken evre epitelyal over kanseri olup yüksek risk grubunda yer alan hastalara ve ileri evre epitelyal over kanserlerinde debulking cerrahiyi takiben adjuvan kemoterapi önerilmektedir (122, 123).

2.4.2. Neoadjuvan Kemoterapi

Lokal tedavi öncesi uygulanan sistemik tedavi anlamına gelmektedir. İndüksiyon tedavisi olarak da adlandırılmaktadır. İlk uygulamalar 1980’li yıllarda başlamıştır. Avantajları, primer lokalizasyondaki tümör yükünü azaltmak, lokal kontrol şansını artırmaktır. Hastalığın tedaviye yanıtını izleme imkanı vardır. Bu, lokal tedavi sonrası adjuvan tedavi seçiminde yardımcı olacaktır. Mikrometastazlar elimine edilebilir. Dezavantajları, maliyet ve tedavinin akut toksisitesidir. Etkisiz kalırsa lokal tedavinin gecikmesine ve metastazlara neden olabilir. Postoperatif yara iyileşmesini geciktirebilir. Neoadjuvan kemoterapi öncesinde görüntüleme yöntemleriyle ileri evre hastalık belirlenmeli, sitolojik veya histolojik tanı konmalıdır. Neoadjuvan kemoterapi amaçlı olarak platin tabanlı kombine tedavi önerilmektedir, fakat tolere edemeyecek hastalarda tek ajan platin tedavisi de uygulanabilir (122, 123).

2.4.3. Kemoterapötik Ajanların Sınıflandırılması

Antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi hastanın veya konağın sağlıklı hücrelerine zarar vermeksizin tümörün büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki benzerlik antineoplastik ilaçların seçiciliğini olumsuz etkilemektedir. Antineoplastik ilaçlar kimyasal yapılarına, hücre siklusuna etkilerine, orjinleri ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır.

Hücre siklusuna etkiye göre sınıflama

Hücre siklusuna etkisine göre antikanser ilaçlar iki gruba ayrılmaktadırlar:

1) Siklus spesifik ajanlar

a)Siklus spesifik-faz nonspesifik ajanlar: Hücre siklusundaki her fazdaki hücreye etkilidirler.

b)Siklus spesifik-faz spesifik ajanlar: Hücre siklusundaki belirli fazdaki hücrelere etkilidirler.

2) Siklus nonspesifik ajanlar

Bölünmeyen hücrelere etkilidirler. Steroid hormonlar ve bleomisin harici antitümör antibiotikler bu gruba girerler.

Orjinler ve Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflama

- 1) Alkilleyici ajanlar
- 2) Antitümör antibiotikler
- 3) Antimetabolitler
- 4) Mitotik ağ inhibitörleri
- 5) Sınıflandırılmayan ajanlar

Bu grupların dışında hormonal ajanlar, biyolojik cevabı modifiye eden ajanlar, monoklonal antikolar, gen tedavileri, tümör oluşumu ve gelişiminin farklı aşamalarına, mekanizmalarına yönelik yeni tedavi alternatifleride kanser tedavisinde son yıllarda kullanılmaktadır.

Alkilleyici ajanlar

En sıklıkla DNA ve RNA nükleik asitleri ve proteinlerin aminokarboksil, sülfhidril, fosfat grupları yerine alkil gruplarını transfer ederek hücre

fonksiyonlarını bozarlar. DNA ve RNA'nın yedi pozisyonundaki guanin en sık alkilenen bölgedir. Anti kanser açısından en önemli etkileri DNA bütünlüğünü ve fonksiyonlarını bozmalarıdır. Bu grupta yer alan ilaçlar kemik iliği hücreleri ve germ hücreleri gibi hızla çoğalan hücrelere toksiktirler. Ortak yan etkileri myelosüpresyon, sterilite, sekonder lökomogen etkidir. Bu grupta; nitrogen mustard, siklofosfamid, ifosfamid, etilen iminler, sülfonik asit esterleri, nitrozürealar, platin bileşikleri, halojenli heksitoller yer almaktadır.

Platin Bileşikleri: Yapısı bakımından diğer antineoplastiklere benzemeyen platin türevi ilaçlardır. Tedaviye ilk giren sisplatindir. DNA çift ipliğinde, iplikler arası ve iplik içi çapraz bağlanma yapar. Bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ajanlara benzer. Döneme özgü değildir. Sadece intravenöz uygulanırlar. Gastrointestinal sistemden absorbe edilmezler. Dokulara, plazma proteinlerine %90 oranında ve kısmen geri dönüşümsüz bağlanırlar. Geniş spektrumludurlar. Myelosupresyon özelliği orta düzeyde olduğundan kombinasyon rejimleri için elverişlidirler. En ciddi yan etkileri doza bağımlı olarak böbrek yetmezliği tablosu oluşturabilmeleridir. Karboplatin ve Sisplatin bu grubun jinekolojik malignitelerinde kullanılan aynı antitümör spektruma ve etkiye sahip üyeleridirler.

Karboplatin; sisplatine nazaran daha az nefrotoksik, nörotoksik ve emetojenik bir ajan olan ikinci kuşak platin türevidir. Sisplatinin aksine, doz kısıtlayıcı etkisi myelosupresif olarak özellikle trombositopeni yapmasıdır. Trombositopeni ortaya çıkarsa düzelmesi 5-6. haftalara kadar devam edebilir. Trombositopeninin şiddet ve süresine doz modifikasyonları yapılmalıdır. Jinekolojik tümörlerde sisplatin yerine yaygın olarak kullanılmaktadır. Yan etkiler kısmen farklıdır. Nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite ve bulantı kusma sisplatine göre daha azdır.

Antitümör Antibiyotikler

Özellikle yavaş büyüyen, büyüme fraksiyonu düşük tümörlerde etkilidirler. DNA ile interkalasyon yaparlar, serbest radikaller oluşur, topoizomeraz I ve 2'yi inhibe ederler. Bunların sonucunda DNA replikasyonunu ve mRNA yapımını engellerler. DNA kırıklarına neden olurlar. Bleomisin DNA tamir enzimleri olan ligazları inhibe eder. Bu grupta; doksorubisin, daktinomisin, bleomisin, mitomisin C

yer alır.

Antimetabolitler

Pürin ve pirimidin sentezinde rol oynayan enzimleri bloke ederek etki gösterirler. Sonucunda da DNA sentezi bloke olmuş olur. Bu grupta metotreksat, 5-florourasil yer alır.

Bitki Alkaloidleri:

Doğal ürünlerdir. Esas olarak metafazda etkili olan ajanlardır. Bu grupta vinka alkaloidleri ve epipodofilotoksinler yer almaktadır. Vinka alkaloidleri mitozda kromozomların migrasyonunu sağlayan tübülün proteinine bağlanır ve tahrip ederler. Bu grupta vinkristin, vinblastin, etoposid, paklitaksel yer alır.

Paklitaksel, Pasifik porsuk ağacının (*Taxus brevifolia*) kabuğundan elde edilen doğal bir bileşiktir. Paklitaksel meme, over ve akciğer, baş-boyun ve özefagus kanserleri gibi epitelyal orjinli kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan taksan grubu bir kemoterapatik ajandır. Son zamanlarda lenfoma ve germ hücreli tümörler gibi genç yaşta ortaya çıkan kanserlerin tedavisinde de başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Antitümör etkilerini, mikrotübüllere yüksek bir afiniteyle bağlanıp onları stabilize ederek birbirlerine bağlanmalarını ve depolarize olmalarını engelleyerek gösterirler. Böylece amaç hücre bölünmesini G2/M safhasında durdurarak hücre proliferasyonunu engellemek ve migrasyonunu önleyerek apoptozisi başlatmaktır.

Paklitaksel düşük dozlarda apoptozu başlatırken, yüksek dozlarda hücre büyümesini engellemektedir. Doza bağlı olarak özellikle matür oositleri hasara uğratmaktadır. Matür oositlerde mayotik maturasyonda gecikme ve iğ defektlerine neden olup anoploid oositlerin gelişimine neden olmaktadır. In vitro çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda bile anjiogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Platinyum içeren ajanlarla kombine edilerek ileri evre over kanserinin tedavisinde altın standart olarak kabul edilen birinci basamak kemoterapide kullanılmaktadır.

Bir memebren reseptörü olan TLR-4 (Toll benzeri reseptör) epitelyal over kanserinde oldukça yüksek oranda bulunmaktadır. Paklitakselin TLR-4 reseptörü ile ligand oluşturduğu, bunun da hücre hatlarında bulunan insan myeloid değişim faktörü 88 (MyD88) üzerinden sinyalizasyonla kanser hücrelerinin ilaca yanıtında

rol aldığı öne sürülmektedir. Yine yapılan bir çalışmada ATP bağımlı ilaç eksport pompasında görevli ve protein sentezi için gerekli genler olan MDRL ile CYP2C8'in over ekspresyonu paklitaksele karşı düşük yanıtta ve kemorezistanstan sorumlu olduğu belirtilmiştir. Ek olarak GSTM1-T1 genindeki polimorfizm de kemorezistanstan sorumlu olarak bulunmuştur (124).

Paklitakselin doz kısıtlayıcı yan etkileri myelosüpresyon, aritmiler, nörotoksisite ve hipersensitivite reaksiyonudur. Hipersensitivitenin önlenmesi için kortikosteroidler, difenhidramin ve H2 reseptör antagonistleri ile premedikasyon yapılmaktadır. Periferik nöropati görülebilir. Bulantı, kusma, ishal diğer yan etkileridir.

2.4.4. Epitelyal Over Kanserlerinde Kemoterapi

Standart tedavi platin tabanlıdır. Platin içermeyen tedavilere yanıt % 40 iken, platin içeren tedavilere yanıt % 60-80 civarındadır. Kombine kemoterapi rejimlerinde platin bulunması cevap oranlarını, hastalısız yaşam sürelerini arttırmaktadır. Paklitaksel-platin ile siklofosfamid-platin karşılaştırıldığında taksol grubunda klinik yanıt % 59 iken, siklofosfamid grubunda % 48, tam remisyon taksol grubunda % 41, siklofosfamid grubunda % 27 olarak görülmüştür. Kombine kemoterapide platin ile birlikte taksanların (paklitaksel, dosetaksel) kullanımı hastalarda sağ kalımı belirgin olarak uzattığından ilk basamak tedavi olarak taksan + platin kullanılmaktadır. Paklitaksel ile dosetaksel arasında yanıt oranları arasında fark bulunamamıştır. Ayrıca diğer tedavilere yanıt alınamayan hastalarda platin tabanlı tedaviye % 30-40 oranında yanıt alınabilir. Sıklıkla karboplatin; daha az nefrotoksik, nörotoksik ve emeojenik olduğundan sisplatinden daha iyi tolere edilir. Platin esaslı kemoterapi epitelyal over kanseri olan hastalarda sağkalımı iyileştirir. Yüksek (% 70-80) oranda primer yanıtta rağmen hastaların % 75'inde klinik nüks görülür. Platin tabanlı birincil tedaviye alınan cevap doğrultusunda belirlenen "platine hassasiyet" ile verilmesi planlanan platin içeren ikincil tedaviye alınacak yanıt tahmin edilebilir. Genel olarak, tedavi esnasında progresyon gösteren, stabil hastalığı olan veya ilk 6 ay içinde yineleme gösteren hastalar "platine rezistan" olarak sınıflandırılırlar (125). 12 aydan uzun bir sürede yineleme göstermeyen hastalar ise "platine sensitif" olarak sınıflandırılırlar. 6-12 ay arasında yineleme

görülen olgular ise ara grupta olan hastalar olup, yarı duyarlı olgulardır. İkincil tedaviye verilen cevap oranları duyarlı ve dirençli grup arasında büyük farklılık göstermektedir. Blackledge ve ark. (126) beş değişik geçiştirme tedavisi ile 92 hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarında platin tedavisi ile elde edilen cevabın tedaviler sonucundaki başarıyı güçlü bir şekilde etkilediğini bulmuşlardır. Tedaviden geçen 6 aydan daha kısa sürede yineleme görülen hastalarda % 10'dan az cevap oranı görülürken bu sürenin 21 ay üzerine çıktığı hastalarda artarak % 90'a ulaşmaktadır (126).

2.5. Prognoz

Epitelyal over kanserlerinde tüm gelişmelere rağmen yaşam oranları istenilen düzeylere ulaşamamıştır. Kemoterapiye direnç over kanseri hastalarında en büyük sorunlardan biridir. Tedaviye yanıtın öngörülmesi kemoterapinin bireyselleştirilmesine, yanıt oranlarının yükseltilmesi ve gereksiz kemoterapilerden kaçınılmasına imkan tanıyacaktır. Günümüzde kemoterapi yanıtını öngörececek bir biyolojik belirleyici mevcut değildir.

Prognozu etkileyen temel faktörler; tanı anındaki evre, histolojik tip ve grade, cerrahi sonrası rezidü tümör büyüklüğü olarak sayılabilir.

Evre; FIGO evre, 5 yıllık sağkalımla ters orantılıdır. Tüm evreler göz önüne alındığında 5 yıllık sağ kalım % 37 civarındadır.

Tablo 2.5 Evreye göre sağkalım oranları

Evre	5 Yıllık sağ kalım
Evre I	% 72-93
Evre II	% 42-70
Evre III	% 17-37
Evre IV	% 6-25

Yaş: Hasta yaşı ve performans durumu over kanserinde sonuç ile yakın ilişki göstermektedir. 45 yaş altındaki hastalarda 5 yıllık sağ kalım daha uzun, aynı zamanda hastaların performans statüleri daha iyidir ve de 45 yaş altında hastalarda

sıklıkla iyi diferansiye tümörler görülür. 45 yaş altında evre I % 54 oranında görülürken, 55 yaş üzerinde % 24 oranında görülür. Performans durumunu kategorize eden *Karnofski skalasına* göre skoru % 70'in üzerinde olan hastalar, tedaviye daha iyi yanıt vermekte ve daha az toksisite ile karşılaşmaktadırlar. Yaşla birlikte hastalığın görülme sıklığı artar. 20 yaşın altında nadirdir. Mortalite oranları yaşla birlikte değişir ve yaş birçok çalışmada bağımsız prognostik değer olarak gösterilmiştir. Genç hastalar ilk tanıyı daha erken evrede almakta ve tedaviye daha iyi yanıt vermektedirler.

Grade: Evreden bağımsız olarak kanser hücresinin farklılaşma derecesi, prognozu etkilemektedir. Over tümörleri histopatolojik değerlendirmede, farklılaşma derecesine göre, iyi diferansiyasyon (grade 1), orta diferansiyasyon (grade 2) ve kötü diferansiyasyon (grade 3) olmak üzere üç farklı grade'e ayrılırlar. Grade 3 tümörlerde prognoz daha kötüdür. Özellikle evre I hastalarda tümörün grade'i önemlidir. Grade 1 tümörlerde 5 yıllık süreye % 75-81 iken, grade 2'de % 53-60 ve grade 3'de % 42-48 olarak belirlenmiştir (5, 95, 127).

Rezidüel tümör: Sitoreduksiyon sonrası rezidüel hastalığın hacmi ileri evre over kanserlerinde önemli bir prognostik faktördür. Rezidü tümör 1cm'nin altında ise ortalama sağ kalım 37 ay, 1-2 cm arasında ise 31 ay ve eğer rezidü tümör 2 cm üzerinde ise ortalama sağ kalımın 21 aya düştüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur (128-131).

Histolojik tip: Her tümör tipinin biyolojik davranışı, metastaz ve prognozu diğerinden farklıdır. Over tümörlerinin % 90'dan fazlası over yüzey epitelinden ortaya çıkar. Seröz tümör histolojisi bulunanlarda mortalite 1,7 kat daha fazladır. Müsinöz ve endometriyal tipte over tümörleri ilk tanı aldıklarında genellikle overle sınırlıdır, bu yüzden prognozları daha iyidir. Berrak hücreli over tümörleri ise genellikle Evre I'de yakalanmasına rağmen agresif bir davranışa sahiptir ve adjuvan KT verilmesini gerektirir (132).

DNA içeriği: Yapılan çalışmalar bazı over kanserlerinin aneuploid olduğunu göstermişlerdir (133, 134). Düşük evreli over kanserlerinin diploid, yüksek evreli hastaların aneuploid olduğu, diploid tümürlü hastalarda ortalama yaşam süresinin 5 yıl, aneuploid tümürlülerde ise 1 yıl olduğu saptanmıştır (135).

Asit volümü: Batında ne kadar fazla asit var ise, prognoz o kadar

kötüleştirmektedir. Ayrıca asitin birikme hızı da prognozu etkilemekte, kısa sürede biriken asit varlığında prognoz daha kötü seyretmektedir (132).

Onkogenler: Günümüzde 60 civarında onkogen tanımlanmıştır. Bunların içinde bazılarının ve özellikle C-erb-b2'nin fazla eksprese olduğu olguların prognozunun daha kötü olduğu bilinmektedir.

Prognoz: Pelvik peritona olan yoğun yapışıklık ve preoperatif olarak rüptüre olan tümörlerde prognoz daha kötüdür. Dembo ve ark. (131), evre I hastalardaki prognostik faktörleri araştırdıkları çalışmalarında tümörün gradenin ve pelvik peritona olan yoğun yapışıklıklarının prognozu kötü etkilediğini, bunun yanı sıra operasyon anında tümörün rüptürü veya tümör hücrelerinin dökülmesinin prognozu etkilemediğini bildirmektedir (131, 132). Sjovall ve ark. (136) da preoperatif olarak rüptüre olduğu saptanan tümörlerin prognozunun, intraoperatif rüptür ve yayılımı olan tümörlere oranla daha kötü olduğunu bildirmişlerdir.

2.6. Over Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Normal over hücrelerinde promotor metilasyonunda yaşa bağlı değişiklikler saptanmıştır. Erken evre over ca' ların % 40'ında tümör supressör gen olan RASSF1A (Ras bağlantılı domaine sahip protein ailesi 1A) geninin promotor bölgesinde metilasyonda artış gözlenmiştir. Dolayısıyla ovarian tümör gelişiminde epigenetik değişiklikler ilk basamak olabilir. Ayrıca BRCA1 geninin promotor bölgesinin metilasyonunun yaşam süresinin azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Over kanserinde tümör supresör gen olan p53 geninde mutasyonlar saptanmıştır.(137, 138) Genomik kararsızlık belirtisi olan kromozomal değişiklikler gözlenmiştir. Örneğin 3q, 10q26, 19q12 ve 20q12 kollarında kopya sayısı artışı, 5q11 ve 16q kollarında kopya sayısında azalma saptanmıştır. Bu kromozom bölgelerinin tümörün ilerlemesinde rol alan genleri taşıdığına dair ön bulgular mevcuttur. Oksidaz enzimi kodlayan VWOX geni homozigot olarak delesyona uğramıştır. Ayrıca in vitro çalışmalarda VWOX geninin artan ekspresyonunun over tümör hücrelerinin çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir.

Over kanseri oluşum mekanizmalarından sürekli ovulasyon teorisinde; ovulasyon over yüzey epitelinde sürekli travmalara yol açar. Devamlı ovulasyon ile over epitelinde inklüzyon cisimleri oluşur ve yüzey epiteli proliferasyona uğrayarak

kriptler ve papillalar oluşturur. Mitotik aktivitede artış gözlenir (45). Bu teorinin ortaya atılmasındaki asıl dayanak ovulasyonun iltihabi mediatörler olan $TNF\alpha$, IL-6 ve IL-1 moleküllerinin seviyesini yükseltmesidir. Bu moleküller hücre çoğalmasında, oksidatif strese ve damar geçirgenliğinde önemli rol oynamaktadırlar. IL-6 üzerinde yapılan bir çalışmada IL-6/ IL-6 reseptör aracılı yolağın over kanseri tedavisinde yeni bir hedef olduğu belirtilmiştir. IL-6 ve IL-6R'ünün over kanserli hastanın serumunda ve asit sıvısında yüksek saptandığı, artmış düzeylerinin kemorezistanstan ve kötü prognozdan sorumlu olduğu öne sürülmüştür (139). Over kanserlerinin % 30-70'inde EGFR (epidermal büyüme faktörü)'de artış saptanmıştır. Over kanserlerinde CC ve CXC motifli kemokin reseptör ekspresyonu kanser hücrelerinin tutunmasını, göçünü ve invazyonunu doğrudan etkiler. $TNF-\alpha$, CXC-r4 ekspresyonunu artırarak kanser hücrelerinin invazyonunu teşvik eder. Yine epitelyal over kanserlerinde CD24 overekspresyonunun; tümör metastazını, hastalığın kötü prognozunu ve kısa yaşam süresini öngörmede yeni bir markır olarak kullanılabileceği, CD24'ün benign ovarian tümörlerde artmadığı ve P53 ekspresyonu ile korele olarak yüksek saptandığına yönelik yeni çalışmalar mevcuttur (140).

Over kanseri metastazında diğer bir fenomende neovaskülarizasyondur. Normal ovulasyon sürecinde gözlenen anjiogenezin oluşumuna sebep olan faktörlerin birçoğunun tümör anjiogenezinde de rol aldığı tespit edilmiştir. Halbuki ovulasyonun fizyolojik anjiogenezisi sınırlıdır. İnvaziv özellik kazanan kanser hücrelerinde ise proanjionik moleküller olan FGF (fibroblast büyüme faktörü), VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü), IL8 (interleukin 8), MMP (matriks meatlloproteinaz), TSP-1 (trombospondin), TIMP (matriks metalloproteinaz doku faktörü)'nin sürekli sentezi söz konusudur (141, 142).

Primer ve metastatik over kanserlerinde ET-1 (endoletin 1) ve ET_AR (ET_A reseptör) normal over dokusuyla karşılaştırıldığında açık ara artmış miktarda bulunurlar. İkisinin birleşmesi sonucunda tümör hücre proliferasyonu artar, apoptozdan korunma, invazyon özelliği ve anjiogenezisi tetikleyen prognostik faktörlerden VEGF'nin aşırı eksprese edildiği tespit edilmiştir. Diğer bir prognostik faktörde COX-2 (siklooksijenaz) enzimidir. ET-1'in proanjionik ve invazyon yetenekleri COX-1 ve COX-2'yi uyararak prostaglandin E2 sentezindeki artıştan kaynaklanmaktadır. Yine COX-2 sentezindeki artışın kolorektal karsinoma

hücrelerinde VEGF üretimini arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca COX-2'nin MMP sentezini uyardığı, E-cadherin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (143).

2.7. Apoptoz

Canlılık birbirini takip eden doğma, büyüme, üreme, yaşlanma evrelerini içerip ölümle sonlanan bir yaşam döngüsüdür. Canlılığın sürdürülmesi sırasında organizmanın yapı ve fonksiyonunun fizyolojik gereksinimleri yerine getirilmektedir. Bu süreçte hücrelerin çoğalma ve ölüm oranlarının denge içerisinde bulunması önemli yer tutmaktadır. Apoptoz hücre-içi ve hücre-dışı pek çok sinyal tarafından iki temel yolak üzerinden aktifleşen ve pek çok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir. Apoptoz mekanizması potansiyel zararlı hücrelerin yok edilmesi görevini üstlendiğinden pek çok hastalık ile yakın ilişkilidir. Aşırı apoptoz, fazla hücre kaybı nedeniyle iskemik ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olurken, yetersiz apoptoz otoimmün hastalıklara ve kansere neden olabilmektedir. Apoptoz; hormonlar, fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşamaması veya serbest radikaller kaynaklı oksidatif hasar, hipoksi, viral enfeksiyonlar, ionize radyasyon ya da ilaç uygulamaları gibi farklı etmenlerce uyarılmaktadır (144).

Morfolojik olarak apoptoz süreci; plazma membranının tomurcuklanması, fosfatidil serin kalıntılarının membranın dış yüzeyine yönelmesi, hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve hücre içeriğinin çoklu membran kaplı parçacıklar halinde dağılarak komşu hücreler ve fagositler tarafından yutulmasını kapsayan bir süreçtir (145). Morfolojik değişimler, hücresel bütünlük ve canlılık için gerekli olan polipeptidlerin proteolitik yıkımı ile gerçekleşmektedir. Yıkım süreci spesifik sistein proteazlar olan kaspazların aktivitesi sayesinde meydana gelmektedir (146). Hasarlanmış hücrelerin yok edilmesini hedefleyen terapilerde çoğunlukla spesifik olarak apoptozun tetiklenmesi tercih edilmektedir (145).

Pek çok farklı molekül tarafından hassas bir şekilde kontrol edilen apoptoz mekanizması, kaspazların bir kaskad oluşturacak şekilde aktifleşmelerini sağlayan iki yolak tarafından tetiklenmektedir; hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile karakterize edilen ekstrinsek yolak ve mitokondri-

apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile karakterize edilen intrinsek yolak. Apoptozun vazgeçilmezi kaspaz enzimlerinin aktivitesi; apoptozun tetiklenmesinden DNA fragmentasyonuna, plazma membranının tomurcuklanmasından, fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar birçok önemli fonksiyona sahiptirler.

Kaspaz enzimleri, apoptoz sürecindeki rolleri göz önünde bulundurularak iki ana grupta incelenebilir. Başlatıcı (*initiator*) kaspazlar, çeşitli hücre içi ya da hücre dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirerek kaspaz kaskadının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Cellat (*executioner*) kaspazlar ise hücre içerisindeki spesifik polipeptid hedeflerini proteolitik olarak fragmente edip apoptoz mekanizmasının tamamlanmasını sağlayan enzimlerdir (146). Cellat kaspazların arasında fonksiyonu en iyi tanımlanmış olan kaspaz-3 proteininin aktifleştikten sonra yüzlerce substratı seçici olarak fragmanlarına ayırdığı bilinmektedir. Bu enzimin aktivasyonu apoptozun en karakteristik morfolojik değişimlerinden olan plazma membranında tomurcuklanmaya neden olmaktadır. Kaspaz 3 aynı zamanda hücre içi sito-iskelet elemanlarının fragmentasyonundan da sorumludur. Bu proteinlerin temel fonksiyonunun hücrenin şeklinin korunması olduğu düşünüldüğünde, kaspaz-3 aktivitesi ile bu proteinlerin fragmente edilmesinin apoptotik süreçteki morfolojik değişim açısından önemli olduğu söylenilebilir (147). Farklı proteinlerin kaspaz aracılı degradasyonu ile başta DNA tamir mekanizmaları ve protein translasyon sistemi olmak üzere hücresel sağ kalım için gerekli olan pek çok mekanizma inhibe edilerek hücre mutlak bir ölüm sürecine sürüklenir.

Yaklaşık 15 yıldır devam eden çalışmalar, kanser tedavisinde kullanılan tüm ilaçların apoptozu tetikleyebildiğini göstermektedir. Apoptotik yolların aktifleştirilmesi kanser terapisinin temel ilkelerinden biridir. Çoğu kanser ilacı neden oldukları DNA hasarı üzerinden etki göstermektedir ve kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarındaki yetersizlikten yararlanarak hücreleri apoptotik sürece sürüklemektedir (148). Kanser ilaçlarının etkinliğini arttırabilmek ve olası direnç mekanizmalarının önüne geçebilmek amacıyla antineoplastik ajanların aktifleştirdikleri apoptotik yolların tanımlanması güncel araştırma konusudur.

2.7.1. Apoptoz Belirleme Yöntemleri

Hücre tarafından birçok noktada denetlenen apoptoz sürecinin

incelenmesinde, ilişkili birçok protein bulunmaktadır.

Morfolojik değişimin gözlenmesinde apoptoz invitro olarak; ışık mikroskobu, floresan mikroskobu ve elektron mikroskobu aracılığıyla değerlendirilebilir.

İmmünohistokimyasal markırların kullanımı, çalışmaları kolaylaştırmaktadır. Anneksin V, TUNEL yöntemi, ISEL tekniği, kaspas-3 yöntemi, MP30, PARP kullanılabilir yöntemlerdendir. Biokimyasal yöntemler; agaroz jel elektroforezi, western blot, flow sitometri yöntemleri olarak sayılabilir

ELİSA ve fluometrik yöntemler; apoptozun immünojenik olarak belirlenmesinde kullanılırlar. Bu yöntemlerle hem hücre kültürlerinde hem de plazmada meydana gelen DNA fragmentasyonunun ölçümü mümkündür. Hücre kültürlerindeki kaspaz aktivitesinin belirlenmesine yönelik yöntemlerdir.

Moleküler biyoloji yöntemlerinden olan DNA mikroarray tekniği, hücre ve dokularda spesifik genleri, gen polimorfizmini, gen ekspresyonlarını, oluşan global değişimleri inceleyen tekniktir.

2.8. COX-2 (Siklooksijenaz-2 Enzimi)

Kemoterapiye direnç, over kanseri hastalarında en büyük sorunlardan biridir. Tedaviye yanıtın öngörülmesi kemoterapinin bireyselleştirilmesine, yanıt oranlarının yükseltilmesi ve gereksiz kemoterapilerden kaçınılmasına imkan tanıyacaktır. Günümüzde kemoterapi yanıtını öngörececek bir biyolojik belirleyici mevcut değildir.

Son çalışmalarda, hem hastalığın patogenezinde,prognozunda hem de kemoterapiye yanıtta rol oynadığı ileri sürülen COX enzimi ilgi odağı olmuştur. COX, arasıdonik asitten prostoglandin sentezleyen enzim olup, bu yolla tümör oluşumu ve progresyonunda kritik aşamalarda yer almaktadır. Bu enzimin kanser patogenezindeki yeri, COX inhibitörü olduğu bilinen non-steroid antienflamatuvar ilaçları (NSAID) düzenli alanlarda kolorektal, meme, prostat kanserlerine daha az yakalandığı epidemyolojik çalışmalarla ortaya konulduktan sonra önem kazanmıştır. COX enziminin iki izoformu olduğu gösterilmiştir. COX-1; hemen hemen bütün dokularda salgılanıp, homeostatik fonksiyonlarda yer almakta, COX-2; enflamasyon sırasında salgılanmaktadır. Son zamanlarda, invitro ve prelinik çalışmalarda COX-2 enzimi, kolorektal kanserde apoptozun inhibisyonu, artmış ekstrasellüler matrikse adezyon, artmış metastatik potansiyel ve neoanjiogenez ile ilişkili bulunmuştur.

COX-2 enziminin kolorektal kanserlerden başka, diğer solid tümörlerde de aşırı salgılandığı ortaya çıkarılmış, aynı zamanda bu enzimin kötü prognoz ve agresifliğin klinik ve patolojik parametreleri ile ilişkisi gösterilmiştir. COX-2 enziminin kanserli dokularda overekspresyonu ile hücre bölünmesinin artması, artan adezyon oranları, hücre motilitesinde artış, apoptozda azalma, anjiogenezin indüklemesi sayılabilir (149). Jinekolojik kanserlerden serviks kanseri hastalarında COX-2 enziminin fazla salgılanmasının kemoterapiye direnç ve kötü prognozun güçlü prediktörü olduğu belirlenmiştir.(150, 151)

Prostaglandinler araşidonik asit metabolizması sonucu oluşmaktadırlar. Sentezledikleri memeli dokularında birçok metabolik aktivitelere katılmaktadırlar. Vazokonstriksiyon, trombosit aktivasyonu ya da inhibisyonu, immünolojik değişimler özellikle de immünosüpresyon rol aldıkları biyolojik aktiviteler arasındadır. Tümör gelişimi ve büyümesi üzerine etkileri vardır. Hem normal dokularda hem de tümörlü dokularda sitotoksik ajanlara, iyonize radyasyona karşı verilen tepkilerde görev almaktadırlar. COX enzimi hücre zarında bulunan fosfolipidlerden araşidonik asit oluşumunda ve araşidonik asitten de prostaglandin yapımında görev almaktadır. COX-2 enzimi prostaglandinlerin prekürsörü olan PGH₂ (prostaglandin H₂) oluşumunda hız kısıtlayıcı bir enzimdir. PGH₂ tromboksan gibi diğer birçok endojen moleküllerin öncüsüdür (54).

COX-2'nin tümörlerdeki fazla ekspresyonu VEGF miktarında artışa neden olduğundan anjiyogeneze neden olmaktadır. Ayrıca COX-2 ekspresyonu görülen bazı tümör tiplerinde agresif bir fenotip oluşumu gözlemlenmektedir. Göğüs, kolon ve diğer tümörlerde COX-2 ekspresyonu olumsuz prognoza neden olmaktadır. Epitelyal over kanserinde % 31'den % 89'a varan sentezinin olduğu yapılan immünohistokimyasal çalışmalarca belirlenmiştir. Artan COX-2 düzeyi ile VEGF, kılcal damar oluşumu, tümör büyümesi ve anjiyogenez arasında istatistiksel bir bağlantı bulunmaktadır. Bundan dolayı epitelyal over tümörlerinde görülen VEGF düzeyindeki artışın neden olduğu anjiogenezin COX-2 ile bağlantılı olduğu düşünülürken; COX-2 artışı ile epitelyal büyüme faktörü ya da p53 seviyeleri arasında bir bağlantı olmadığı rapor edilmiştir (152).

Yapılan bazı çalışmalar paklitaksel gibi mikrotübüllere etki eden ajanların, COX-2 ve prostaglandin biosentezinde artışa neden olduğunu savunmaktadır. Bu

artış paklitakselin kanser tedavisindeki etkinliğinin azalmasına da neden olmaktadır. Ayrıca artan COX-2 düzeyi ile kemorezistans ve çoklu ilaç direnci oluşumu arasında bağlantı olduğu da belirtilmiştir (152-154).

Over kanseri ve COX-2 ile ilgili yapılan sınırlı sayıda çalışmada COX-2 salgılanmasının over kanseri hücre serilerinde apoptozu engellediği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan farklı birkaç çalışmada artan COX-2 seviyesinin radyasyon ve kemoterapi tedavisine cevap vermeyen, agresif yayılım gösteren over kanserlerinin belirlenmesinde markır olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (154).

İleri evre over kanseri hastalarında görülen platin direncinin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Birçok farklı mekanizmanın bu direnç üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. COX enzim miktarının over kanseri hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunması, platin tabanlı ilaçlara gösterilen direncin önemli bir sebebi olarak gösterilmektedir (152, 155).

2.9. Anjiogenez- VEGF

Vasküler desteğin sağlanması, normal ve neoplastik dokuların büyüme ve gelişimindeki en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Tümörlerin büyümesi ve yayılması komşu damarlardan sağlanan kan akımına bağlıdır. Moleküler düzeyde anjiogenik gelişim, tümör hücrelerinin ürettiği spesifik anjiogenik stimülatör moleküller ile başlatılır ve spesifik anjiostatik inhibitör moleküller tarafından durdurulur. Anjiogenik ve anjiostatik moleküller endotel hücre döngüsü sırasında devamlı olarak ve birlikte faaliyet gösterirler (156, 157). Tümör gelişiminin erken döneminde anjiogenezisi kontrol eden genlerin mutasyonuyla, pozitif düzenleyicilerin aşırı ekspresyonu ve inhibitörlerin baskılanması tetiklenir.

Anjiogenez direkt olarak VEGF bağlantılı, çok basamaklı bir süreçtir. VEGF, intrasellüler işaret transdüksiyon mekanizmasını başlatıcı birer kaskat olan endotel VEGF reseptörü 1 ve 2'ye bağlanarak yeni kan damarlarının oluşumunu ve hücre çoğalmasını sağlar. VEGF ekspresyonunun artışı, insan kanserlerinde sıklıkla gözlenen bir durumdur. Tüm bu bağlantılar göz önüne alındığında VEGF, uzun süredir kanser için potansiyel bir tedavi olarak görülmektedir.

VEGF, 40-45 kd'lik homodimerik bir protein olup, sinyal dizini çok çeşitli hücreler ve insan tümör hücrelerinin çoğu tarafından sekrete edilen, endotel hücreleri

üzerinde üç tane reseptörü olan güçlü bir mitojendir. VEGF'nin ekspresyonu, embriyogenez sırasında kan damarlarının gelişimi ve kadın genital sisteminin siklik değişimleri ile tümörlerinin angiogenezi ile ilişkilidir. Bu faktör artmış vasküler permeabiliteye ve protein ekstravazasyonuna neden olur. VEGF'nin permeabiliteyi arttırması, endotel hücrelerinin göç ettiği interstisyuma protein difüzyonuna neden olur. Kapillerler üzerindeki permeabilite arttırıcı etkisi histaminden çok daha güçlüdür. VEGF, epitelyal over kanserlerinin de dahil olduğu pek çok tümöral doku tarafından salgılanan anjiogenik bir faktördür ve beyin tümöründe ödem, over kanserinde asit oluşumu ve metastaz gelişmesinin önemli mediatörlerinden biridir. VEGF-B, VEGF-C gibi VEGF ailesinin diğer üyelerinin overdeki fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte Sowter ve ark. (156) normal over dokusu ve epitelyal over kanserli hastaları VEGF yönünden karşılaştırdıkları çalışmada, sadece VEGF ile VEGF-B düzeylerinin tümörü over dokusunda daha yüksek seviyede bulunduğunu saptamışlardır (158-160).

Anjiogenik gelişim; hipoksi, endojen angiogenez inhibitörleri ve konağın genetik yapı sı gibi çevresel koşullarla da modifiye edilebilir. Tümörün ortasındaki mikrodamarların bası altında kalması sonucunda tümörde santral nekroz meydana gelir. Oluşan hipoksik ortam hücre içinde bulunan, üretim ve eliminasyonu sürekli değişiklik gösteren *hypoxia inducible factor-1* (HIF1) olarak tanımlanan sitokin artmasını sağlar (161). HIF-1, VEGF'nin transkripsiyonuna neden olan genin aktivasyonunu sağladığı gibi, kanser biyolojisi üzerinde 60'a yakın genin transkripsiyonunda, hücre içi glukoz metabolizmasında, hücre invazyonunda ve anjiogenezde etkili bir faktördür. HIF-1'in aşırı ekspresyonu meme, mide, serviks, endometrial ve over kanserlerinde artmış mortaliteyle ilişkilidir. HIF-1, başta VEGF olmak üzere, anjiogenez ile ilişkili diğer faktörlerin üretimine de neden olur. HIF-1 stimülasyonu ile aktive olan VEGF geni, messenger Ribonükleik asit'in (mRNA) transkripsiyonuna ve VEGF üretiminin artışına yol açar. Günümüzde HIF-1 geni hedef alınarak anjiogenez inhibisyonu üzerinde farklı kanser türleri için yeni tedavi alternatifleri denenmektedir (161).

2.10. Kİ 67 (kinaz inhibitör-67)

Ki-67 (MIB-1), nonhiston nükleer proteindir. 345 ve 395 kd ağırlığındaki iki

molekülden oluşur ve geni 10. kromozom üzerinde yer alır. Ki-67 nükleer antijeni; devam eden hücre siklusunun G₁, S, G₂ ve mitoz fazlarında eksprese edilir. Fakat G₀ fazındaki hücrelerde bulunmaz. Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteinidir (162). Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik indeks ve tümör gradelemesinde sıklıkla kullanılır (163).

Kontrolsüz oğalma, malign transformasyonunun belirlenmesi için önemli bir anahtardır. Immunohistokimya ile Ki-67 için pozitif nükleer boyanma gösteren hücre yüzdesi, proliferasyon indeksini gösterir. Agresif tümörlerde bu oran yüksektir. Ki-67'nin ekspresyon seviyesi hücre çoğalmasıyla bağlantılı olarak, uygulanan kemoterapatiğe kanser hücrelerinin verdiği cevabın değerlendirilmesinde önemlidir. Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, over, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler vs.) yüksek Ki-67 oranı, kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (164).

Endometriyal proliferasyon ve endometriyal karsinom hücrelerinin diferansiasyonu hücre siklusunu destekleyen ve engelleyen çeşitli faktörlerle düzenlenir. Bir proliferasyon belirleyicisi olan Ki-67 proliferatif faz boyunca ve sekretuar fazın ilk yarısında endometriyum epitel hücrelerinde pozitif nükleer boyanma gösterir (162).

Endometriyum malignitelerinde Ki-67 proliferasyon indeksi ile mitotik indeksin karşılaştırıldığı bir çalışmada Ki-67 ile mitotik indeks arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (165).

Ki-67 genellikle tümör hücrelerinde % 1-6 oranında, yayılma hızı yüksek olan kanser türlerinde ise % 44 oranında sentezlenmektedir. Artmış Ki-67 sentezi genellikle lenf nodlarına yayılma gösteren tümör tiplerinde görülmektedir. Over kanserinde Ki-67, p53 ve p16 sentez oranları oldukça fazladır. Yapılan bir çalışmada Ki-67 sentezinin hücrelerin G₁, S, G₂ ve M fazlarından her birinde etkin olarak rol aldığı rapor edilmiştir. Ki-67 miktarı ile hastalığın evresi orantılıdır denilmiştir. Over kanserinde artmış Kİ-67 sentezinin metastaz aşamasında olan tümör tiplerinde fazla olduğu sonucu çıkarılmıştır (162, 166, 167).

2.11. IRS-1

İnsülin ve insülin büyüme faktörleri (IGF) birçok biyolojik aktivitelere katılmaktadır. İnsülin reseptör proteinleri (IRS)'nin dört farklı substratı vardır. Bunlar hücre içi katalitik reaksiyonlara katılmazlar. IGF-1 birçok epitelyal orjinli tümör hücresinde sentezlenmemektedir. Fakat nöroektodermal ve over kanser türlerinde sentezinin olduğu belirlenmiştir. IGF'lerin over kanserli hücrelerin büyümesinde etkin rol aldığı düşünülmektedir. Over kanser türlerinde salınan IGF-IR'e yönelik hedef tedavi belirlenmesinin umut verici olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu reseptör apoptozu baskılayan yolları aktive etmekte, hücre çoğalmasını arttırmakta, hücre sağkalımını sağlayacak yeni yolların oluşumuna neden olmaktadır. IGF-IR'nin fosforillenmesinin ve aktivasyonunun engellenmesinin, over kanserinde hücre büyümesini engellediği rapor edilmiştir (168, 169).

Ölüme neden olan jinekolojik tümörlerin başını çeken over kanserlerinin tedavisinde çok daha etkili ilaçların bulunması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalar, doğal bir retinoid olan ATRA'nın büyümekte olan over kanser hücrelerini G₀-G₁ fazında durdurduğunu göstermektedir. Çeşitli tümör tiplerinde IRS-1 faktörün proliferasyonda işe karıştığı bilinmektedir. IRS-1, gerçekte önemli bir büyüme düzenleyici moleküldür ve retinoidlerin de aralarında olduğu büyüme baskılayıcı ajanlarla birlikte potansiyel etkiye sahip bir kemoterapatiğe dönüşmektedir.

2.12. Yeşil Çay

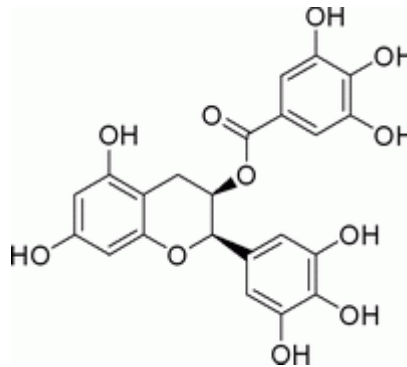
Çay tüm dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir. Çay, Güneydoğu Asya'ya özgü bir bitki olan *Camellia sinensis*'den elde edilir. Tüm dünyada üretilen ve tüketilen çay çeşitlerinin % 78'i siyah çay, % 20'si yeşil çay ve % 2'den azı oolong çayıdır (170). Siyah çay başlıca batı ülkeleri olmak üzere bazı Asya ülkelerinde tüketilmektedir. Yeşil çay ise başlıca Çin, Japonya, Hindistan ve Kuzey Afrika'daki ve Orta Doğu'daki bazı ülkelerde tüketilmektedir.

Yeşil çay, *Camellia sinensis*'in taze harmanlanmış yapraklarındaki enzimlerin etkisiz hale gelmelerini ve fermentasyona uğramalarını önlemek amacıyla hızla buhara tutulması ya da kızartılmasıyla, kuru ve stabil bir ürün olarak elde edilir. Epikatekinler, yeşil çayın karakteristik renginden ve tadından sorumlu olan temel

bileşikleridir.

Siyah çay ile oolong çayının üretimi için, *Camellia sinensis*'in taze harmanlanmış yaprakları nem içeriği yaklaşık % 55'e düşene kadar kurutulur; bu işlem yapraklardaki polifenol içeriğinin yoğunlaşmasını sağlar (170). Kurutulmuş olan yapraklar daha sonra yuvarlanır ve ezilir; bu işlem polifenollerin fermentasyonunu başlatır. Bu süreçler esnasında katekinler teaflavinlere ve tearubiginlere dönüşür. Çay yapraklarının bileşimi; iklim, mevsim, tarım uygulamaları, bitkinin türü ve yaşı gibi çok çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir (171).

Yeşil çay ekstraktları geleneksel Çin tıbbında kronik hastalıkların tedavisinde ve engellenmesinde yüz yıllardır kullanılmaktadır (172). Yeşil çay ekstraktından elde edilen temel katekin, toplam polifenollerin % 50-80'ini oluşturan *epigallocatechin-3-gallate*'tir (EGCG) (Şekil 2.1). Bir bardak demlenmiş yeşil çayda (200mL suda kaynatılan 2g çay yaprağı) 500-700 mg katekin, bununda yaklaşık 200-300 mg'ı EGCG'dir (170). Siyah çayın ise sadece %3-10'u katekindir. Çay yapraklarında ayrıca %2-5 oranında kafein de bulunmaktadır. Her ne kadar EGCG'nin moleküler hedefleri ve EGCG tarafından regüle edilen hücre içi sinyal yolları tamamen belirlenmemiş olsa da EGCG'nin antikanser etkisinde birden fazla mekanizmanın geçerli olduğu öne sürülmektedir. EGCG'nin pek çok kanser türünde hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre yaşam döngüsünde duraksamaya yol açtığı ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (173).



Şekil 2.1 *Epigallocatechin-3-gallate*

Çeşitli invitro ve invivo deneysel araştırmalar ile çay tüketiminin insanlar

üzerindeki etkilerini araştıran epidemiyolojik araştırmalar, vaka kontrol araştırmaları ve klinik araştırmalarda yeşil çayın kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, inflamatuvar hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar için önleyici ve/veya tedavi edici potansiyele sahip olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Bu da yeşil ayı son zamanlarda özellikle batı ülkelerinde tüketimi artan popüler bir içecek haline getirmiştir.

ay tüketimi ile kanser gelişimi arasında ters ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Yeşil ayın bolca ve sıklıkla tüketildiği Asya ülkeleri başta olmak üzere çeşitli ülkelerde yürütölmüş olan epidemiyolojik çalışmalar, yeşil çayın gastrointestinal, özofageal, mide, göğüs, akciğer, kolon, karaciğer ve prostat kanserinin önlenmesinde faydalı olabileceği yönünde olumlu sonuçlar göstermiştir.

Yeşil ayın anti karsinojenik etkileri üç temel başlık altında incelenebilir:

- 1)Antioksidan-prooksidan etki
- 2)Anti-anjiyogenez etki
- 3)Apoptotik-hücre yaşam döngüsünü düzenleyici etki

2.12.1. Yeşil ayın Antioksidan-Prooksidan Etkisi

Günümüzde kanserin DNA, lipid ya da proteinlerin oksidatif stres sonucunda hasar görmesine bağlı olarak gelişebildiği bilinmektedir. EGCG'nin oksidatif lipid ve DNA hasarını anlamlı ölçüde düşürdüğu gösterilmiştir (174-176). Ayrıca EGCG'nin lipid peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu bir molekül olarak davrandığı öne sürölmektedir (177).

EGCG ve diğer polifenol türevi antioksidanlar oksidatif hasarı çeşitli mekanizmalar aracılığı ile engeller. Öncelikle antioksidanlar; reaktif azot ve oksijen türevlerini hücre bileşenlerine zarar vermeden nötralize ederek, buldukları ortamdaki serbest radikalleri temizlerler. Bunun ötesinde bazı metal iyonlarına karşı yüksek afiniteye sahip olduklarından metal şelatlayıcı olarak davranırlar ve serbest radikal oluşumunu tetikleyecek redoks-aktif geçiş metalleri inaktive ederler. Yapılan alışmalar EGCG'nin; peroksidaz aktiviteleri nedeniyle oksidatif hasara neden olabilecek lipoksigenaz, siklooksigenaz ve ksantin oksidaz enzimlerini inhibe ederek oksidatif hasarı engellediğini göstermiştir (171).

Bazı durumlarda antioksidan moleküller metal iyonlarını indirgeyerek hidrojen peroksit oluşumuna neden olabilir. Benzer şekilde EGCG'nin, Cu(II) ve Fe(III) komplekslerinin varlığında prooksidan olarak davranarak DNA hasarına neden olduğu savunulmaktadır (178, 179). EGCG'nin hücre ölümünü tetikleme özelliğinin, en azından in-vitro koşullarda, bu prooksidan aktiviteye bağlı olduğu düşünülmektedir (180).

Yeşil Çayın Anti-Anjiogenez Etkisi

Tümör gelişimi için çok önemli olan anjiogenez, yeni kan damarlarının oluşturulduğu bir süreçtir. Kanser tedavisinde gelecek vaat eden çalışma alanlarından biri de anjiogenez inhibisyonunun kullanımıdır. İlk oluşumu sırasında tümör ihtiyaç duyduğu besin ve suyu difüzyon ile alabilir, fakat 0,5mm çapından büyük bir tümörde çoğalan tümör hücrelerinin oksijen ve besin ile beslenebilmesi için kan damarlarına gerek vardır. Anjiogenez, bu süreci aktive ya da inhibe eden proteinlerin görev aldığı kompleks bir seri biyokimyasal tepkimeden meydana gelmektedir. Kanser hücrelerinde bu aktivatör ve inhibitör proteinler arasındaki denge bozulur (181). EGCG'nin son yıllarda araştırılan özelliklerinden biri de anti-anjiogenez özelliğidir. Çeşitli çalışmalar EGCG'nin meme ve kolon kanser hücre kültürlerinde VEGF ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. VEGF en önemli anjiogenez aktivatörlerinden biridir ve inhibisyonu çoğunlukla anjiogenezin engellenmesi anlamına gelmektedir (182-185). Maiti ve ark.'nın (186) yaptıkları bir çalışmada EGCG'nin anjiogenin aracılı anjiogenezini engelleyebildiği gösterilmiştir. EGCG gibi anti-anjiogenik ajanların, farklı fazlardaki tümörlerin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (186).

ECM (ekstraselüler matriks) bileşenlerinin proteolitik degradasyonu, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerinin minimize edilmesi ve de hücrenin bazal membrana göçünü kapsayan bir süreçtir. MMP ailesi ECM bileşenlerinin parçalanmasında görev alan bir protein ailesidir ve tümör invazyonundan sorumlu oldukları bilinmektedir. EGCG'nin çeşitli MMP'ları inhibe ettiğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (187-190).

2.12.2. Apoptoz ve Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyonu

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri de programlı hücre ölümünden kaçabilmeleridir. Apoptoz kompleks genetik olaylar ile regüle edilen bir süreçtir. Bu süreçteki en önemli transkripsiyon faktörlerinden biri de p53'tür. Genomun gardiyanı olarak adlandırılan p53 hücre yaşam döngüsünün regülasyonunda, apoptozun tetiklenmesinde ve DNA tamir mekanizmalarının işleminde kritik öneme sahiptir. p53 proteini DNA hasarını belirleyerek ve hücre yaşam döngüsünde duraksamanın gerçekleşmesini sağlamak ve redoks potansiyel değişikliklerine cevap olarak apoptozu tetiklemektedir. Solid tümörlerin % 50'den fazlasında p53 delesyonu ya da nokta mutasyonu mevcuttur (191).

Çay polifenollerinin p53 aktivasyonuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla belirtilmektedir (192). EGCG normal hücreleri etkilemeden farklı kanser hücre kültürlerinde p53 aktivasyonu üzerinden apoptozu tetikleyebilmekte ve hücre yaşam döngüsünde duraksamaya neden olmaktadır (193). Yapılan çalışmalar sonucunda akciğer, kolon, pankreas, deri ve prostat kanserlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (194). Prostat kanseri hücre kültüründe (LNCaP) gerçekleştirilen bir çalışmada, p53 aktivasyonun p21 ve Bax ekspresyon artışına, NF-κB inhibisyonun Bcl-2 ailesi proteinlerinde ekspresyon azalışına ve böylece Bax/Bcl-2 oranındaki artışa bağlı olarak apoptozun tetiklendiği ve hücrelerin G0/G1 fazında duraksadığı gösterilmiştir. p53 aktivasyon mekanizmasında, p53'ün kritik serin kalıntılarının fosforilasyonu söz konusudur. Bu nedenle molekülün yarı ömrü artmaktadır (195). Hatsak ve ark. (195) LNCaP hücre hattında 20-80µM EGCG ile tetiklenen apoptozun p53 bağımlı olduğunu ve p53 mutasyonu olan hücrelerde apoptozun gerçekleşmediğini göstermiştir. Bax ve p21'in siRNA ile inhibisyonu sonucunda apoptozun önlenemediği aynı çalışmada gösterilen diğer bir özelliktir.

Bunun dışında, EGCG'nin lipid sentezinden sorumlu olan yağ asidi sentaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Enzim normal hücrelerde düşük düzeylerde eksprese edilir. Prostat, meme, over, endometrium, akciğer ve kolon kanseri gibi pek çok kanser tipinde enzimin ekspresyonu artmaktadır. EGCG hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Ancak sadece kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Bu durumun, malonil-CoA gibi toksik özellik gösteren lipid öncüllerinin birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bütün çalışmalar göz önüne alındığında EGCG'nin anti-kanser mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır ve dolayısıyla güncel araştırma konusudur (196).

2.13. Hücre Kültürü

Biolojik çalışmalarda canlılar ya bir bütün olarak ya da organ, doku veya hücre gibi yapıları alınarak *in vitro* şartlarda incelenmektedir. Hücrelerin dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların kontrollü şartlarda (CO₂ basıncı, nem, sıcaklık) büyüme faktörleri ve metabolik substratlar içeren besiyerleri ile cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan *in vitro* olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir. Hücre kültürü, yaşam bilimlerinin pek çok alanı için vazgeçilmez bir teknoloji haline gelmiştir. Kökleri gelişimsel biyoloji ve patolojiye dayanmasına rağmen, hücre kültürü moleküler genetikçiler, immünologlar, cerrahlar, biyomühendisler ve ilaç üreticileri için önemli bir araç haline gelmiştir.

Hücre veya doku kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların gerçek ortamlarına benzer şekilde hazırlanmış steril besi ortamlarında yaşatılmalarıdır. Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürler primer kültürler adı verilir. Primer kültürler, buldukları yerde çoğalıp başka bir yere bölünerek aktarıldıktan (hücre pasajı) sonra *cell line* (hücre hattı) yada sürekli kültür hücresi adını alırlar. Secunder kültür; primer kültür sonucu elde edilen hücrelerin enzimatik yolla başka bir ortama aktarılması ile elde edilen hücrelerin oluşturduğu kültürdür.

Hücre suşları ve hücre soyları diploid veya heteraploid olabilirler, hücrelerin heteraploid oluşları onların malign hücreler oldukları veya *in vitro* çoğalmalarının sınırsız olduğu anlamına gelmez. Hücre kültürlerinde sınırsız çoğalan hücre soy veya suşları, devamlı hücre soyları (*established cell line*) şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteraploid hücre soylarından ayrılırlar. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılabilen hücre soyları “devamlı hücre soyu” olarak kabul edilmektedirler.

Günümüzde, hücre kültürleri esas olarak tek tabaka ve süspansiyon halinde hücre kültürleri olmak üzere iki yolla üretilmektedir. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde buldukları ortamda sürdürebilir. Hücre kültürleri; temel hücre biyolojisi, hastalığa neden olan ajanlar ile hücreler arasındaki etkileşim, ilaçların hücreler üzerine etkileri, yaşlanma süreci ve tetikleyicileri, beslenmeye ilişkin çalışmalarda iyi bir model sistemi sağlamaktadırlar.

Hücre kültürü yöntemiyle etkiler doğrudan değerlendirilmekte ve sonuca kısa sürede ulaşılabilmektedir. İstatistiki olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılmayacak kadar fazla hücre kullanılabilen ve çok sayıda hayvanın deney amacıyla öldürülmesi önlenmektedir

2.13.1. Çalışmada Kullanılan Ovcar 3 Hücre Kültürünün Özellikleri

Ovcar 3; ilk olarak beyaz ırktan 60 yaşındaki over kanserli hastanın asit sıvısından elde edilmiştir. Hücreler atimik farede tümör oluşturabildikleri gibi, agarozda klonlar oluşturabilmektedirler. Kültüre edilen hücreler epitelyal morfolojide olup, kendilerine özgü steroid hormon reseptörleri olan stoplazmik androjen ve östrojen bağlama molekülleri içermektedirler. 17-beta-estradiol ile muamelesi sonucu progesteron reseptörlerinin indüklendiği gösterilmiştir. Hormon reseptörlerinin varlığı hormonal tedavi çalışmaları içinde kullanılabilmesine olanak sağlar (197).

Ovcar 3; yüksek metastaz yeteneğine ve anormal karyotipe sahip, ilaç rezistansı gösteren hücre kültürüdür. Bu yüzden birçok antikanser ajanın etki ve mekanizmalarının çalışılmasında uygun bulunmaktadır.

2.14. Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalar sonucunda nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde oldukça etkili bir yöntem olan Real-time PCR tekniği geliştirilmiştir. Nükleik asit miktarını kantitatif olarak ölçebilen ‘Kantitatif Real-Time PCR Yöntemi’ ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılarak belirlenebilmekte, reaksiyon süreci boyunca, oluşan ürünün miktarını Real-time PCR

sırasında gözlemek mümkün olmaktadır. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi, Real-time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinden tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Real time PCR tekniği, seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve arkadaşlarının geliştirdiği PCR'ın ileri bir versiyonudur.

2.14.1. Real-Time PCR İçin Kullanılan Problar

Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flouresan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışmaktadır. Flouresan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziyeye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flouresan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziyeye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılır.

Dizi spesifik olmayan flouresan boyalar: Bu tip boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğu DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green I' in sinyali artacaktır.

Dizi spesifik flouresan problemler: Oldukça yüksek hassasiyete sahip florofoforlar ile işaretli dizi spesifik problemlerdir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise flöresan artışı gözlenir. Bu reaksiyonlarda ürünün belirlenmesi için *melting curve* analizine genellikle ihtiyaç duyulmaz. Bu hassas dizi spesifikliğinden dolayı primer dimerleri gibi ürünlere bağlı ekstra görüntüler elde edilmeyecektir. Buna rağmen reaksiyon sırasında bu tip görüntülerle karşılaşılabilen ve bu durum PCR hassasiyetini ve verimliliğini düşürmektedir. Dizi spesifik flöresan problemler de yapılmak istenen çalışmaya göre çeşitlilik gösterir.

Kantitatif Real-Time PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren, hassasiyeti iyi olan bir uygulamadır. Pek çok uygulaması kanser araştırmaları için fırsat yaratmış olmasıyla birlikte, tümör davranışıyla ilgili araştırmacıya ve klinisyene büyük ölçüde bilgi sağlamaktadır.

Bu çalışmada, kanser araştırmalarında oldukça yaygın olarak kullanılan Ki-67, VEGF , COX-2 ve IRS-1 genleri araştırılmıştır. 18S rRNA geni, real time PCR bilgisinin normalizasyonunda potansiyel kuantitatif referans geni olarak seçilmiştir. Gen ekspresyonu ve durağanlığı iki farklı kanser tipine ait hücrede belirlenen maddelerin uygun dozlarına bağlı olarak 18S rRNA geninin ekspresyon seviyesiyle karşılaştırılmıştır.

18S rRNA geni bütün hücrelerde devamlı olarak ekspresse edilen bir '*house keeping*' genidir. *House keeping* genler; rutin hücre fonksiyonları için gerekli proteinleri kodlayan ve bu yüzden bütün hücrelerde her zaman eksprese edildiği bilinen genlerdir. Kanser araştırmalarında yapılan RT-PCR çalışmalarında sıklıkla tercih edilen internal kontrol genlerinden birisi 18S rRNA'dır. Relatif gen ekspresyonu karşılaştırma çalışmalarında en iyi sonuç; endojen/internal kontrolün örnek içerisinde fazla ve sabit oranda (total RNA'ya göre) bulunmasıyla elde edilir. Her bir reaksiyondaki farklı hedef mRNA'ların kuantifikasyonu için değişmeyen bir endojen kontrol kullanılabilir. Bu amaç için genellikle 18S rRNA, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas) ve β -actin seçilir. İnternal kontrol seçimi konusunda GAPDH ekspresyonu, bölünmekte olan hücrelerde ve agresif kanser hücrelerindeki artmış ekspresyonu nedeniyle, referans olarak kullanılması sakıncalıdır. β -aktinin aktif referans olarak kullanılmasını hücre tipi, hücrenin proliferasyon seviyesi, hücre döngüsünün aşamaları gibi şartlara göre değişkenlik göstermesi nedeniyle tavsiye etmemektedirler. Yapılan çalışmalar, farklı hücrelerde mRNA seviyelerinin karşılaştırılması sırasında standart kontrol olarak 18S rRNA'nın seçilmesinin uygun olabileceğini, çeşitli kanser dokularında, hüresel metabolizmadan bağımsız olarak, kararlı bir şekilde eksprese edildiğini göstermektedir.

Test maddelerinin özellikle kanserli hücrelerde apoptoz mekanizmasını çalıştırması ve kanserli hücrelerin seçici olarak ölmesini sağlaması durumunda, bu maddelerin kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılabilmesi için yapılacak diğer çalışmalara olanak sağlayacaktır

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, karbuz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), eliza cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), fluoresan mikroskobu (Olympus BX50), inverted mikroskop (Olympus IX71), nanodrop (Nanovue), Rotor-Gene Q Series Software Version 2.0.2 (Corbett Research), CG palm-cycler (CG1-96), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

RPMI 1640 (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Tripsin-EDTA solution (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), % 3,7 Formaldehit (Merck), Dimethyl Sulfoxide (Riedel de Haen), Formaldehit, CaCl, KCl, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, EDTA, MTT (Sigma), DAPI (Sigma), Caspase-3 kiti (Chemicon APT165), LDH kiti (Roche), Carboplatin (Sigma), Paklitaksel (Sigma), EGCG (Sigma), Sıvı Azot.

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

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

3.4. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1.5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar

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

3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

Paklitaksel, karboplatin, EGCG, DMSO: Medyum (1:40 oranında) çözülerek dozlar hazırlanmıştır. Dozlar hazırlanır hazırlanmaz kullanılmıştır.

3.6. Kullanılan Hücreler

Ovcar-3 hücreleri ATCC (American Type Culture Collection)'den satın alınmıştır. Ovcar-3 hücreleri % 20 Fetal Bovine Serum, penisilin-streptomisin, sodyum bikarbonat, MEM-Non-essential amino acid solution, insülin, sodyum pirüvat içeren RPMI 1640 with L-glutamine medyumda 37°C'de % 5 CO₂ içeren bir ortamda kültüre edilerek çoğaltılmışlardır. Bu çalışmanın yapılabilmesi için Üniversite Etik Kurulu'ndan 19/12/2011 tarih ve 284 sıra numarası ile izin alınmıştır.

3.7. Yöntem

3.7.1. In Vitro Sitotoksosite Testi (MTT Testi)

Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı MTT Testi

Kültürdeki yaşayan hücre sayısını belirlemek için direk ve indirek olmak üzere iki yöntem vardır. Direk yöntemde tüm hücreler sayılırken indirek yöntem ise yaşayan hücrelerin kültür parametrelerindeki değişikliğine dayanır. Tetrazolyum boyasının (MTT) hücre sayısını belirleyen bir indikatör olarak kullanımı ilk olarak 1980'li yılların başında rapor edilmiştir. MTT deneyi, sık sık hücre poliferasyonunu ölçen indirek indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür. MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir. Birçok araştırmacı tarafından sitotoksosite araştırmalarında kullanılmaktadır. MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Hızlı ve doğrudan dehidrogenaz aktivitesini ölçer. Tetrazolyum tuzlarının formazan ürünlere dönüşümü, NADH veya NADPH'in azalmasıyla meydana gelir. (198)

Çalışmamızda; OVCAR-3 hücreleri üzerinde EGCG, karboplatin ve paklitakselin ayrı ayrı ve kombinasyonlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MTT [3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] deneyi yapılarak etkili dozlar saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yetiştirilen hücrelerin canlılıkları *Trypan Blue* boyaması yapılarak belirlendikten sonra hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^3 olacak şekilde ekilerek 48 saat kültüre edilmişlerdir. 48 saatin sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılarak farklı konsantrasyonlardaki test maddelerini içeren medyumlar plakalara konulmuştur. Test maddeleri ile belirlenen süreler (24 ve 48 saat) muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml^{-1} MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondriyal metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının

çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Hücrelerin, deney setlerinde her test maddesi dozu için 8 paralel halinde ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır. MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3.7.2. Apoptozun Tespiti

EGCG, karboplatin ve paklitakselin ayrı ayrı ve kombinasyonlarının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla fluoresan boyama ile morfolojik inceleme yapılmıştır. MTT deneyleri sonucunda belirlenen EGCG, karboplatin ve paklitakselin ayrı ayrı ve kombinasyon dozlarının OVCAR-3 hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla DAPI boyama yapılmıştır. İçlerine steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş olan 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler, 24 saat CO₂ inkübatöründe kültüre edilmişlerdir. Bu süre sonunda kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılarak, maddelerin sitotoksikite testleri sonucunda belirlenen etkili dozları, lameller üzerine yapışan hücrelere 12 saat süresince uygulanmıştır. 12 saat sonrasında kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılmış, steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH₂PO₄, 8 µM NaHPO₄; PH 7.3) ile yıkamaları yapılan lameller, PBS'de çözülmüş olan % 3.7'lik paraformaldehit çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika tespit edilmişlerdir. Tespit işleminin ardından lameller 3 kez PBS ile yıkanarak, 30 dakika 37 °C'de 1mg/ml DAPI (4'6-diamidino-2 fenilindol) ile karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir. Lameller daha sonra PBS ile yıkanarak kapatılmış ve fluoresan mikroskopunda DAPI filtre kullanılarak incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.7.3. Real Time-PCR

RNA izolasyonu

1) 75 cm² lik flasklara 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat hücrelerin yapışması için inkübasyona bırakılmıştır.

2) 48 saat inkübasyonun ardından MTT deneyinin sonuçlarından elde edilen veriler ışığında hücreler, maddelerin belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır.

3) Hücreler 24 saat süresince maddelerle muamele edildikten sonra (kombinasyon çalışmaları için 24 saat katekinin belirli dozlarına maruz bırakılan hücrelerin medyumunu değiştirilmiş, hücreler PBS ile yıkanmış, daha sonra karboplatin ya da paklitakselin belirlenmiş dozları 24 saat süre ile verilmiştir) süpernatantla birlikte, PBS, PBS-EDTA, tripsin yardımı ile hücreler santrifüj tüpüne toplanmış, thoma lamı 4x10⁶ hücre kullanılmak üzere alınıp 1250 rpm'de 6 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır.

4) Hücrelerin üzerine Buffer RTL plus + Beta merkaptolanol karışımı konarak yavaş yavaş pipetlenmiş ve genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece genomik DNA'nın kolonda kalması sağlanmıştır.

5) Alttaki genomik DNA'nın bulunmadığı lizatın üzerine 350 µl % 70'lik etanol ekleyerek pipetlenmiş ve pembe renkli kolonlara konarak 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

6) Altta kalan sıvı atılarak kolona 700 µl RW1 eklenmiş, 15 sn 10 000 rpm de santrifüj edilmiş ve sıvı yine dökülmüştür.

7) Pembe kolonların üzerine 500 µl Buffer RPE konulmuş, 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

8) Daha sonra pembe kolonlar yeni bir toplama tüpünün üzerine koyulup aynı işlem tekrarlanarak 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

9) Kolon yeni bir toplama tüpüne koyulup, hiçbir şey eklemeyen kuruması için 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

10) Kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklenmiş ve 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir.

11) Üstteki kolon atılarak, altta kalan RNA'lar nano dropta ölçülmüş ve real time PCR için işlem yapılana kadar (-80)^oC'de saklanmıştır.

RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole edilen RNA nanodrop cihazında ölçülmüş 1 ngr DNA'ya ulaşacak şekilde DNase, RNase free su ile dilue edilmiştir.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlanmış ve cDNA sentez işlemi palm cyclor cihazında yapılmıştır.

Tablo 4.1. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

Quantiscript reverse transcriptase	1
Quantiscript reverse transcriptase Buffer	4
Reverse transcriptase primer mix	1
RNA	14
Toplam	20

Tablo 4.2. RT PCR için miks içeriği

<i>Karışım</i>	<i>Miktar(μl)</i>
Primer prob	10
Master Mix	1
RNase Free Water	4
cDNA	5
Toplam	20

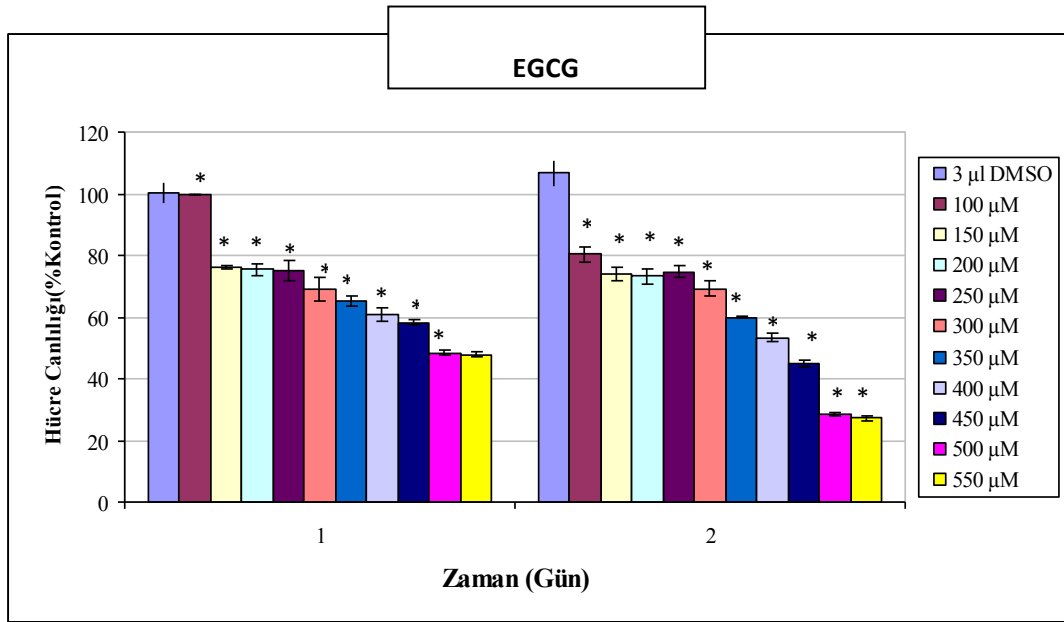
3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

Cp değeri, PCR içindeki her bir eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan, bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder.

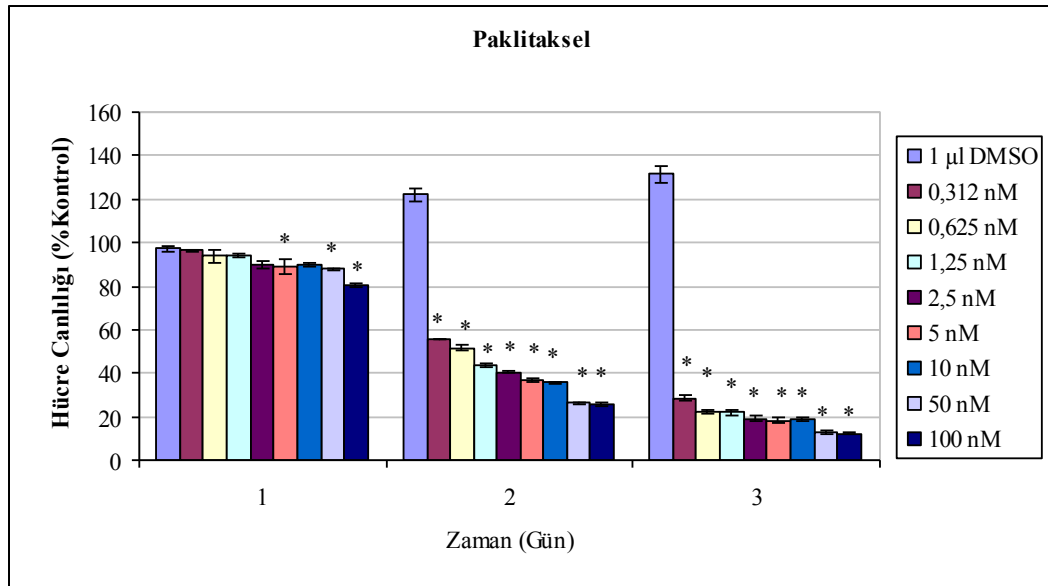
Rölatif kantifikasyon (Relative Quantification): Hedefin konsantrasyonu, hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur. Çalışmamızda real time pcr sonuçlarımızı yorumlarken, hedef genlerimizin konsantrasyon değerini referans genin konsantrasyon değerine oranlayarak elde ettiğimiz sonuçların kontrol grubuna göre ne kadar değiştiği incelenmiştir.

4. BULGULAR

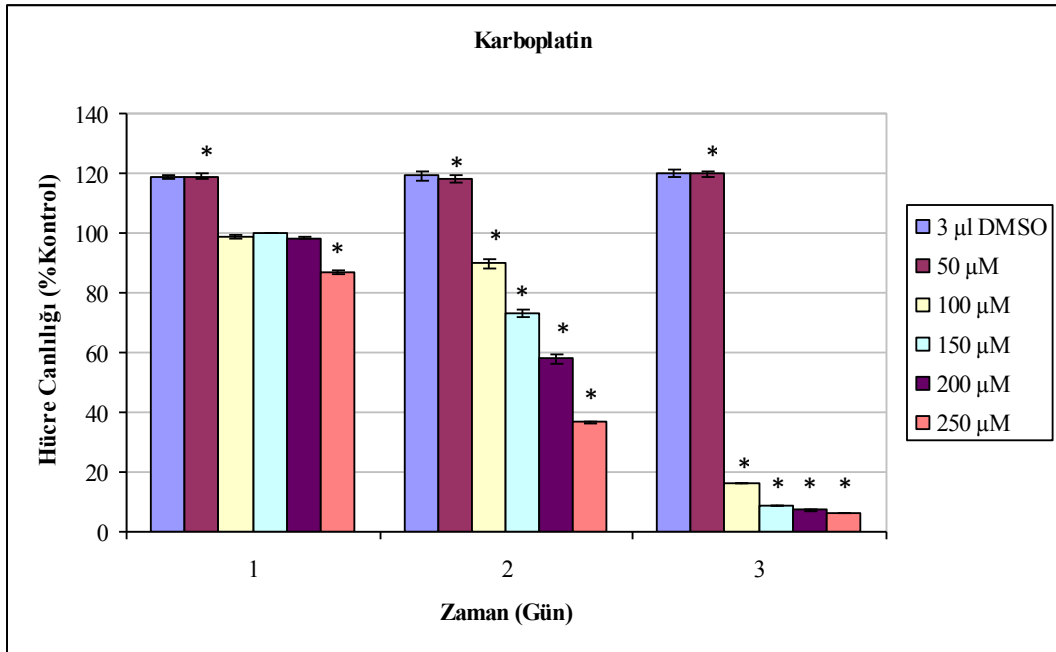
4.1. MTT Test Sonuçları



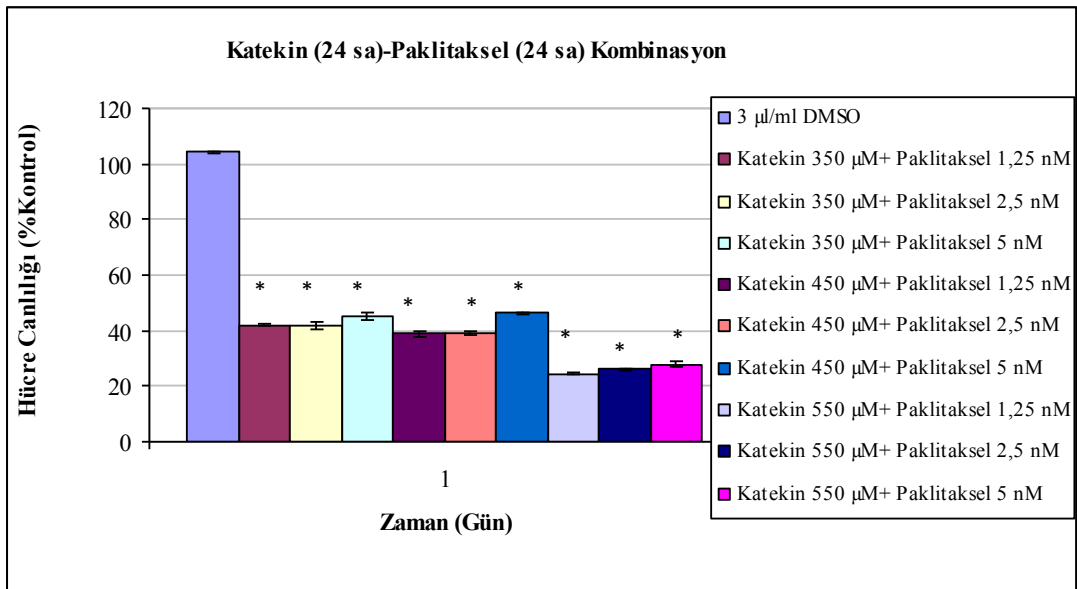
Şekil 5.1 EGCG'nin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ IC₅₀ : 350 µM (48.saat)



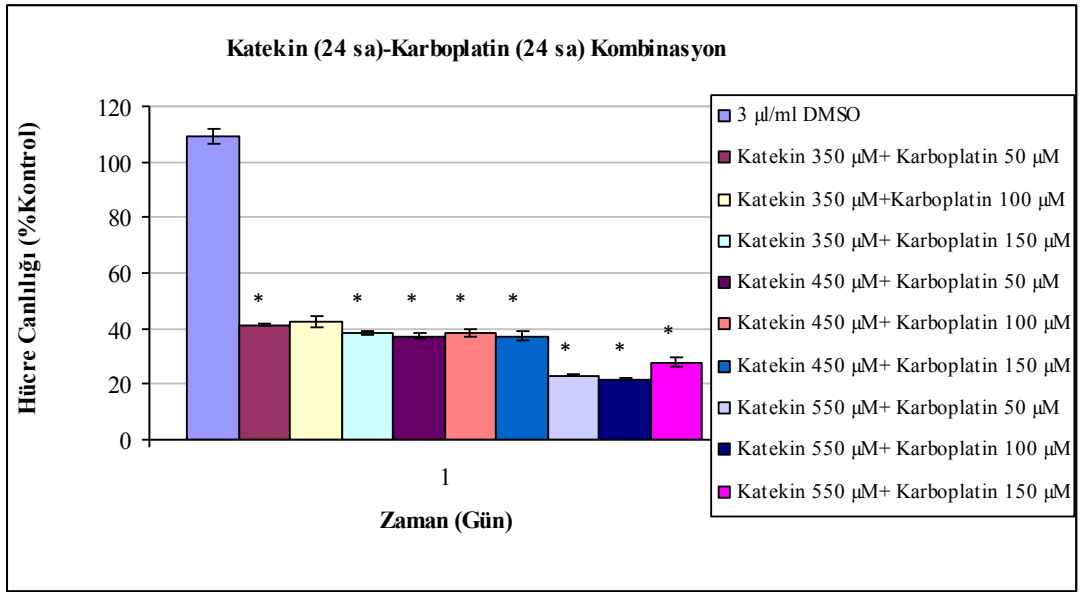
Şekil 5.2. Paklitaksel'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ IC₅₀ : 2.5nM (48.saat)



Şekil 5.3. Karboplatin'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ IC₅₀ : 150µM (48.saat)



Şekil 5.4. EGCG ve paklitaksel'in farklı dozlarının birlikte uygulanmasının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 5.5. EGCG ve karboplatin'in farklı dozlarının birlikte uygulanmasının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Karboplatin ve paklitaksel antikanser ilaç olarak uzun zamandır kullanılmaktadır. EGCG, karboplatin ve paklitaksel tek başına kullanıldığında OVCAR-3 hücrelerinde, doza ve zamana bağlı olarak hücre sayısında azalma görülmüştür.

EGCG, MTT deneylerinde 100 μM ile 550 μM aralığında uygulanmıştır. İlk gün 100 μM 'lık doz hücre sayısında bir düşüş meydana getirmezken, 150 μM 'lık dozdan başlamak üzere hücre sayısında doza bağlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 5.1). 150 μM 'lık dozda hücre sayısında ilk gün % 24 oranında bir düşüş saptanmıştır. En yüksek doz 550 μM 'da hücre sayısındaki azalma % 53 oranındadır. 100 μM 'lık EGCG dozu ikinci gün hücre sayısında % 20'lik düşüşe neden olmuştur. 550 μM 'lık doz ikinci gün hücre sayısında % 73'lük bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 5.1) ($p<0,05$).

İlk gün OVCAR-3 hücreleri üzerine farklı dozlarda tek başlarına uygulanan paklitaksel ve karboplatin hücre sayısında önemli bir azalma meydana getirmemişlerdir (Şekil 5.2 ve 5.3). Bu nedenle paklitaksel ve karboplatinin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla MTT deneyleri 3 günlük yapılmıştır.

Paklitakselin en yüksek dozu (100 nM) ilk gün hücre sayısında % 19,5'lik bir düşüşe neden olmuştur. Paklitakselin en düşük dozu olan 0,312 nM'lık doz ikinci gün % 45 oranında hücre sayısında azalma meydana getirmiştir (Şekil 5.2).

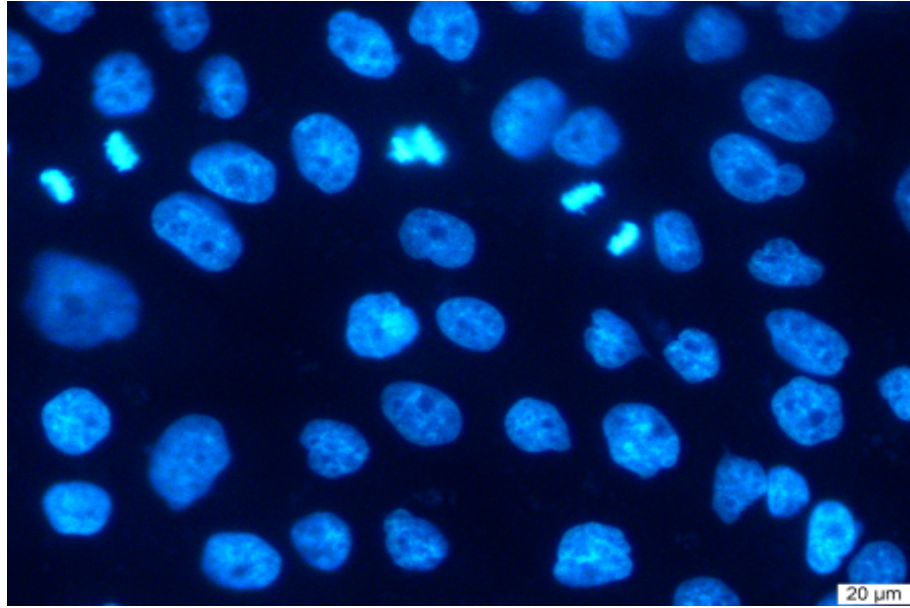
Karboplatinin en yüksek dozu olan 250 μM 'lık doz ilk gün hücre sayısında % 14'lük bir düşüş meydana getirmiştir. Karboplatinin en düşük dozu olan 50 μM 'lık doz hücreler üzerinde 3 gün boyunca sitotoksik bir etki meydana getirmemiştir. 100 μM 'lık dozun ikinci gün hücre sayısında meydana getirdiği azalma % 11'dir, bu oran 250 μM 'lık dozda % 64'tür (Şekil 5.3) ($p<0,05$).

EGCG (350 μM) önce 24 saat uygulanıp sonraki 24 saat paklitakselin 1,25 nM dozunun birlikte uygulanması sonucunda ilk gün hücre sayısında % 58 oranında bir düşüş belirlenmiştir (Şekil 5.4). Oysa EGCG (350 μM) tek başına ilk gün hücre sayısında % 35 oranında azalma meydana getirirken (Şekil 4.1), paklitaksel (1,25 nM) tek başına % 6'lık düşüşe neden olmuştu (Şekil 4.2). EGCG ve paklitakselin farklı dozlarının birlikte uygulandığı MTT deneylerinde hücre sayısında önemli bir düşüş olduğu Şekil 5.4'de görülmektedir ($p<0,05$).

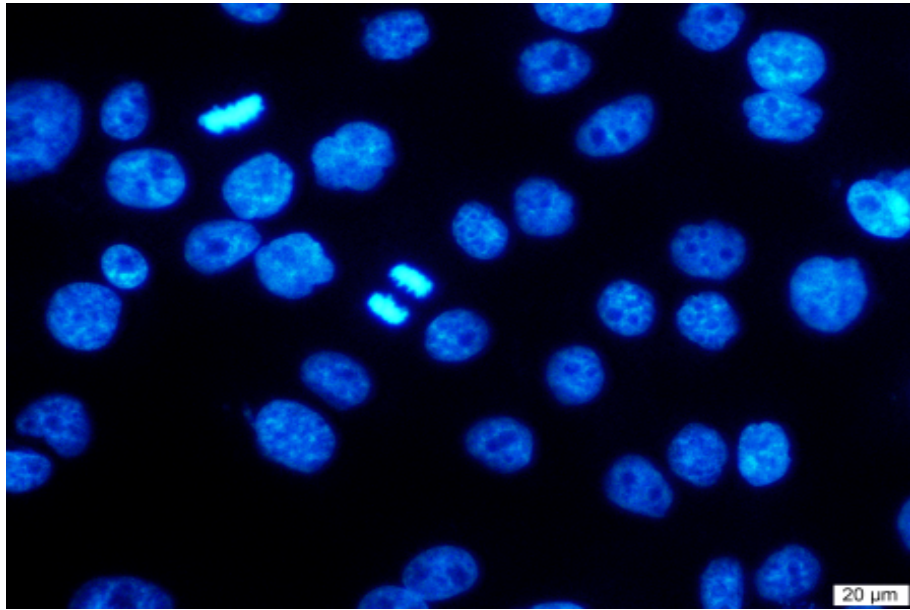
EGCG (350 μ M) ve karboplatinin (50 μ M) birlikte uygulanması sonucunda ilk gün hücre sayısında % 59 oranında bir düşüş meydana gelmiştir (Şekil 5.5). EGCG (350 μ M) tek başına ilk gün hücre sayısında % 35 oranında azalma meydana getirirken (Şekil 5.1), karboplatin 50 μ M ilk gün hücre sayısında hiç azalmaya neden olmamıştır (Şekil 5.3). EGCG ve karboplatinin farklı dozlarının birlikte uygulanması sonucunda meydana gelen sitotoksik etkinin her iki maddenin ayrı ayrı uygulandığında meydana gelen etkiden daha fazladır (Şekil 5.5) ($p < 0,05$).

EGCG ve paklitakselin birlikte uygulanması ile ortaya çıkan etki ile (Şekli 5.4) EGCG ve karboplatinin birlikte uygulanması ile ortaya çıkan etki birbirine çok benzerdir. Paklitaksel ve karboplatin tek başlarına uygulandığında hücre sayısında önemli bir azalma görülmezken, her iki madde EGCG ile birlikte uygulandığında ilk gün hücre sayısında önemli oranda bir azalma olduğu Şekil 5.4 ve Şekil 5.5’de gözlenmektedir.

4.2. DAPI Boyama Sonuçları



A) Kontrol



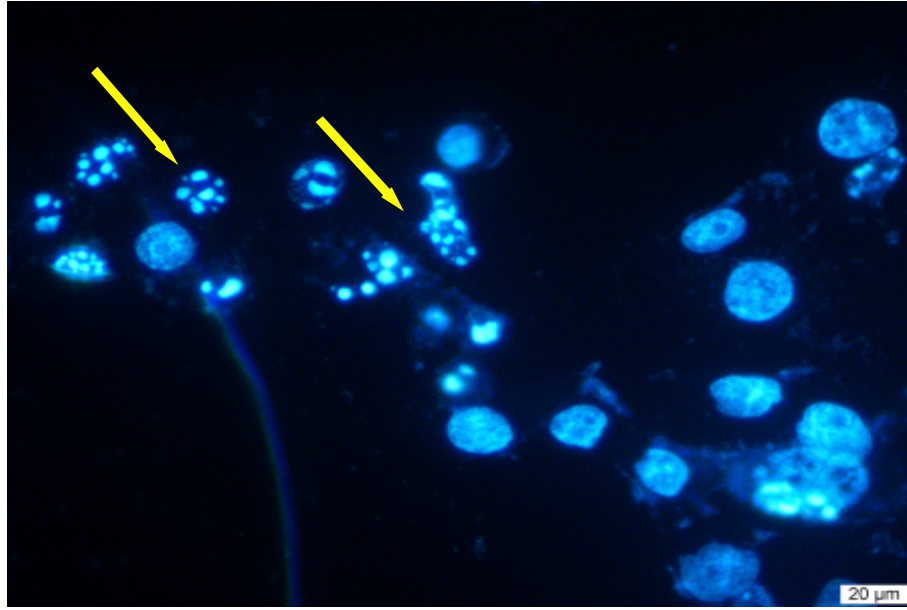
B) DMSO

Şekil 5.6. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları

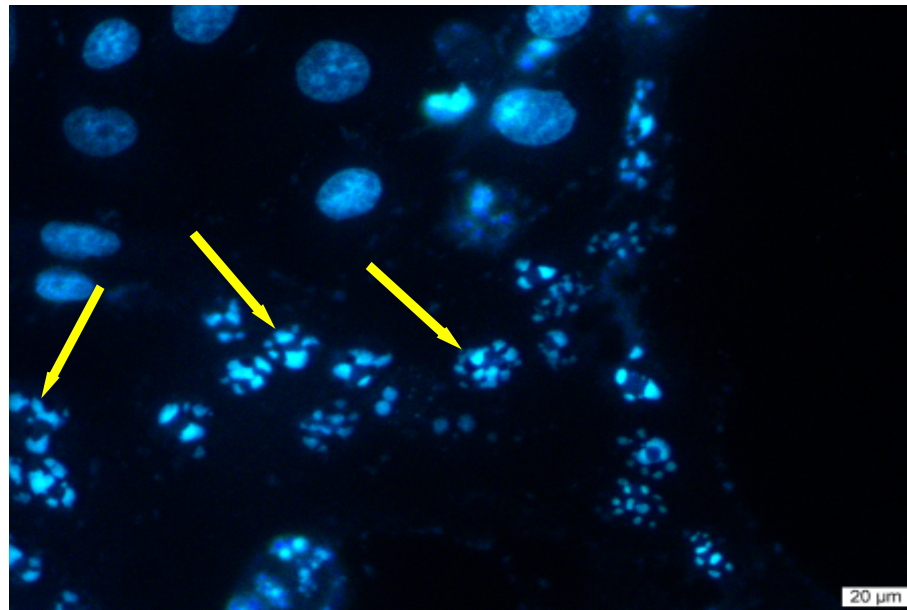
A) Kontrol (B) DMSO

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



C. EGCG 150 µM



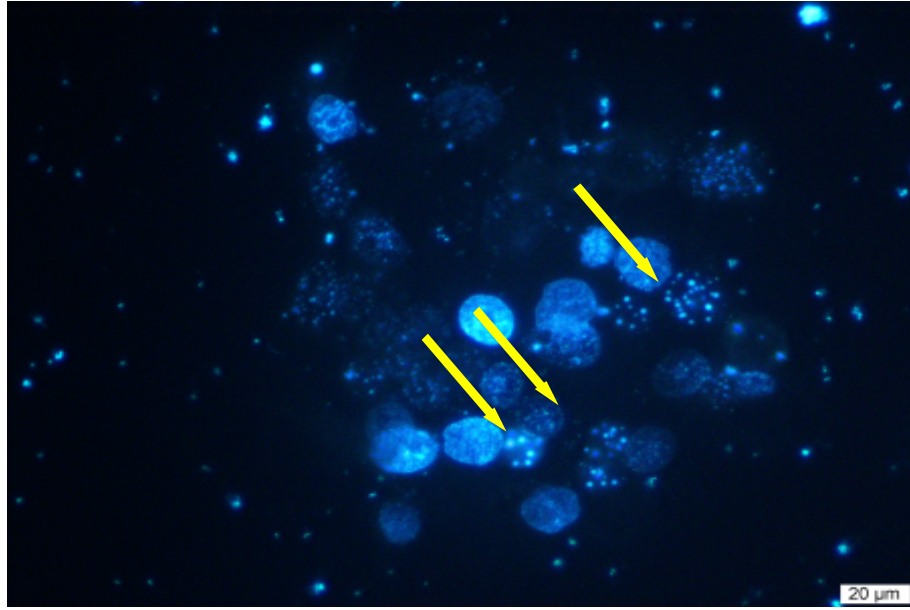
C1) EGCG 250 µM

Şekil 5.7. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları C. EGCG 150 µM

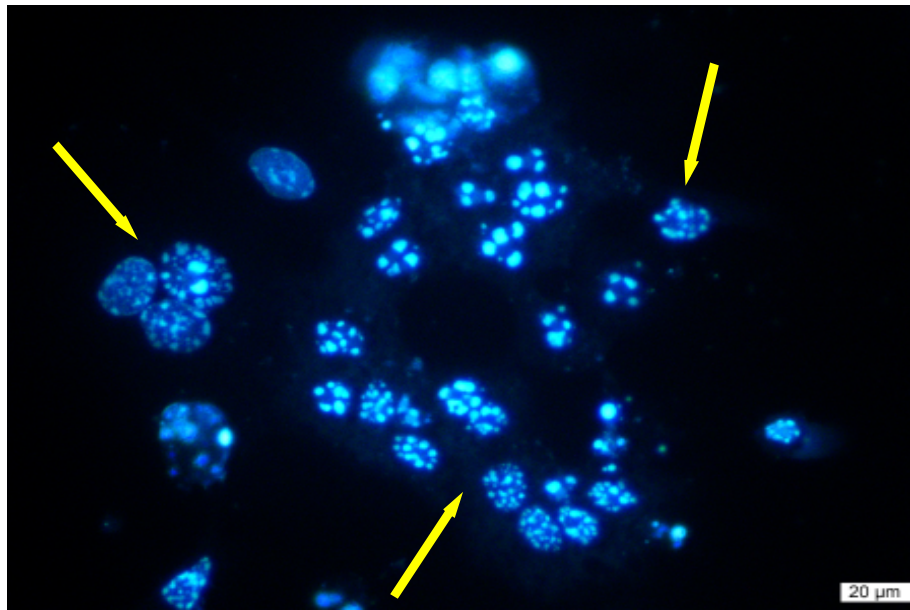
C1) EGCG 250 µM

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



C2) EGCG 350 µM

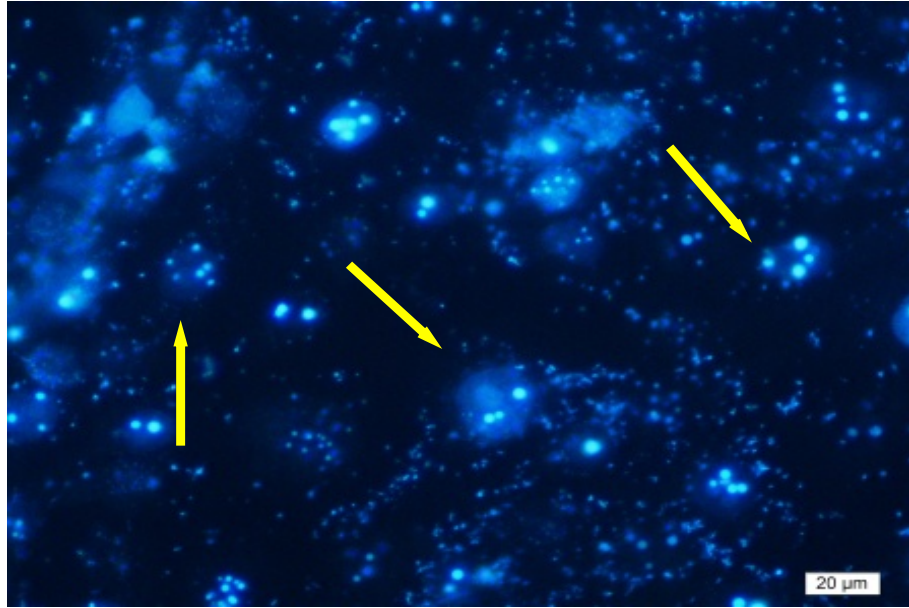


C3) EGCG 450 µM

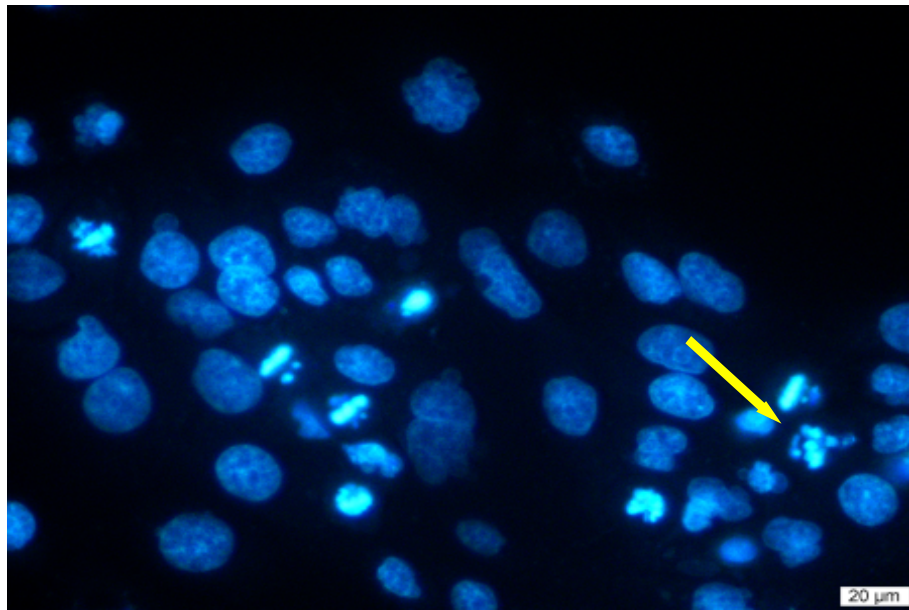
Şekil 5.8. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları C2) EGCG 350 µM
C3) EGCG 450 µM

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



C4) EGCG 550 µM



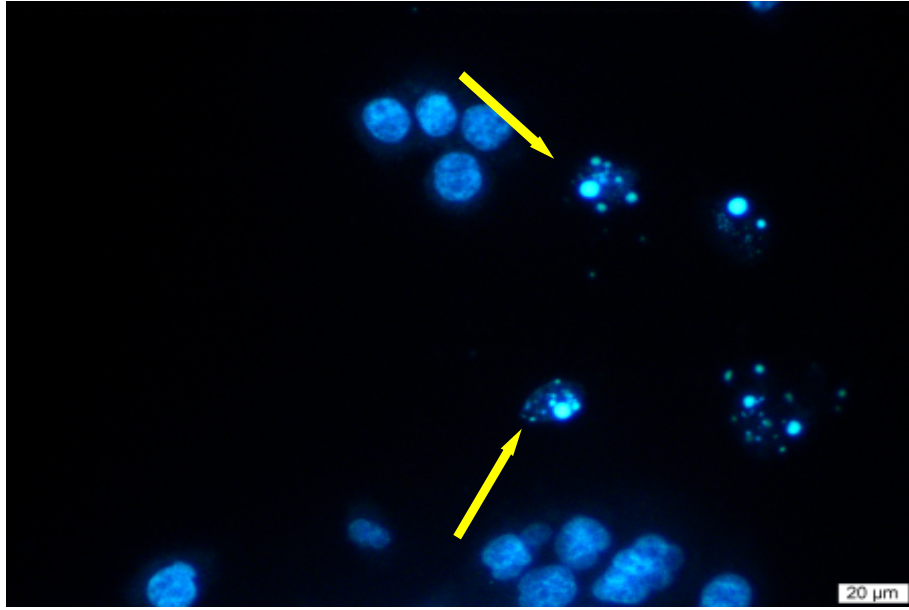
D) Paklitaksel 1,25 Nm

Şekil 5.9. Ovarcar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları C4) EGCG 550 µM

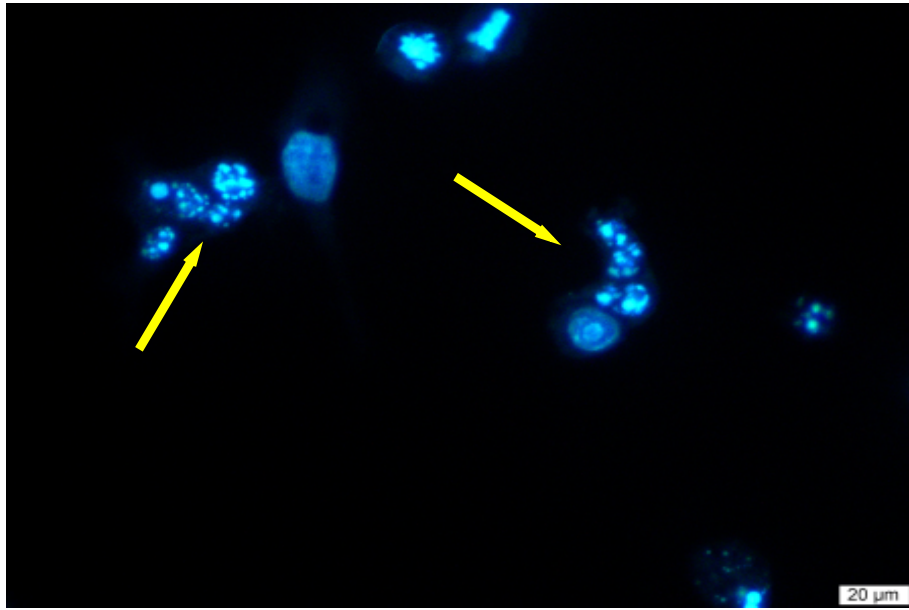
D) Paklitaksel 1,25 Nm

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



D1) Paklitaksel 2,5 nM



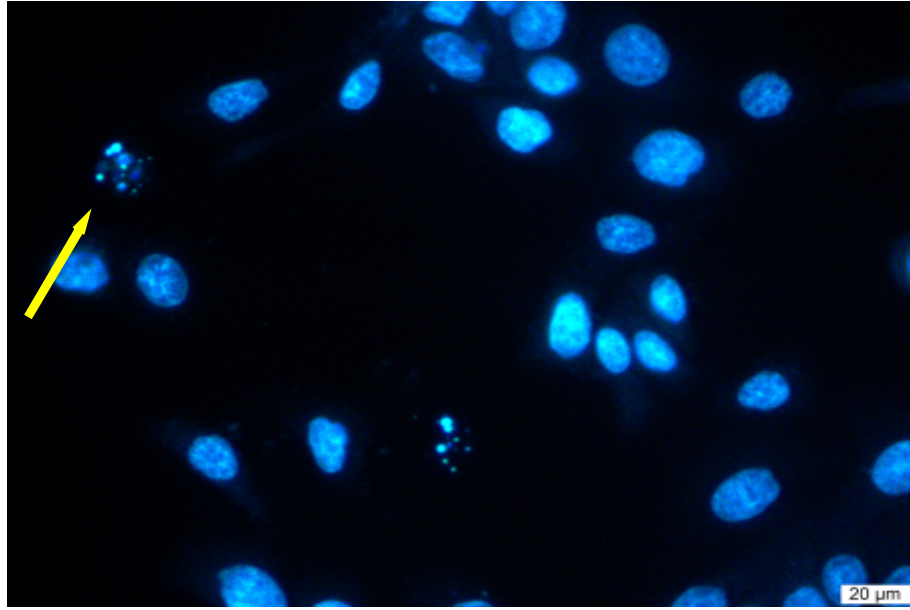
D2) Paklitaksel 5 nM

Şekil 5.10. Ovarc 3 hücrelerinin DAPI boyamaları D1) Paklitaksel 2,5 nM

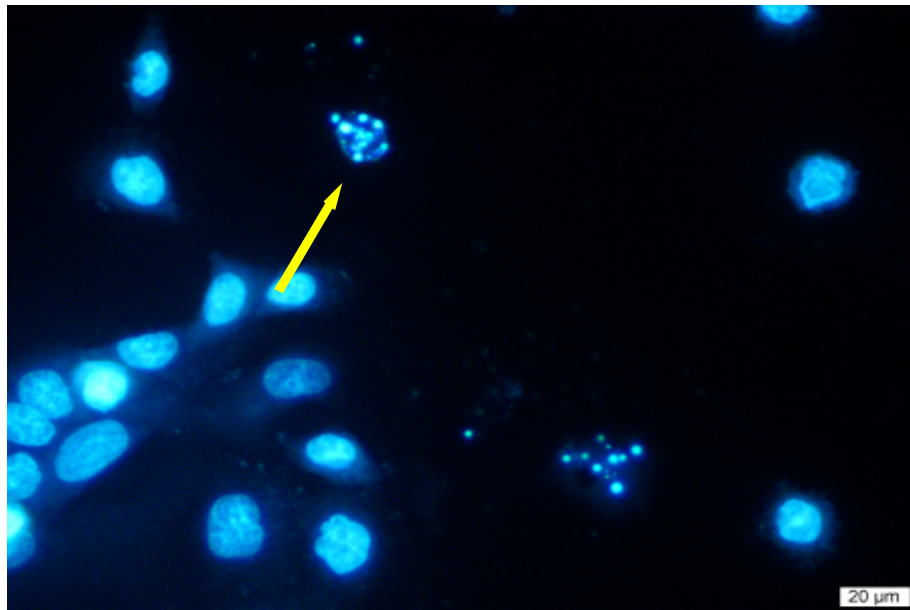
D2) Paklitaksel 5 nM

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



E) Karboplatin 50 µM



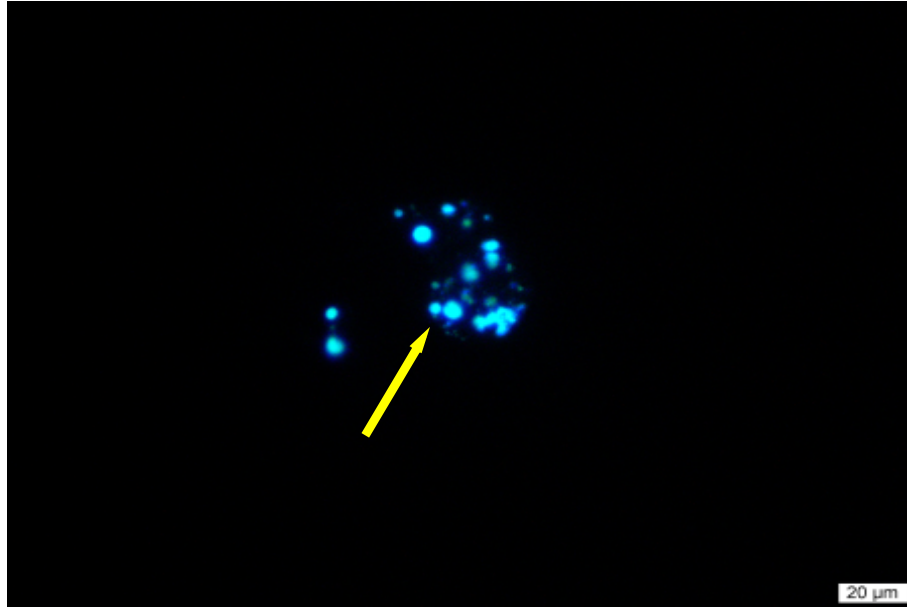
E1) Karboplatin 100 µM

Şekil 5.11. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları E) Karboplatin 50 µM

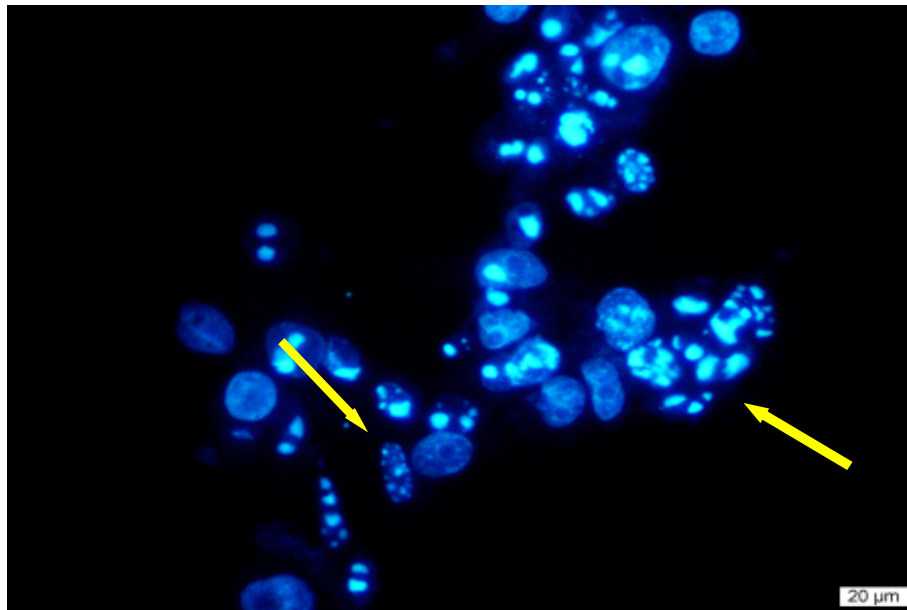
E1) Karboplatin 100 µM

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



E2) Karboplatin 150 µM



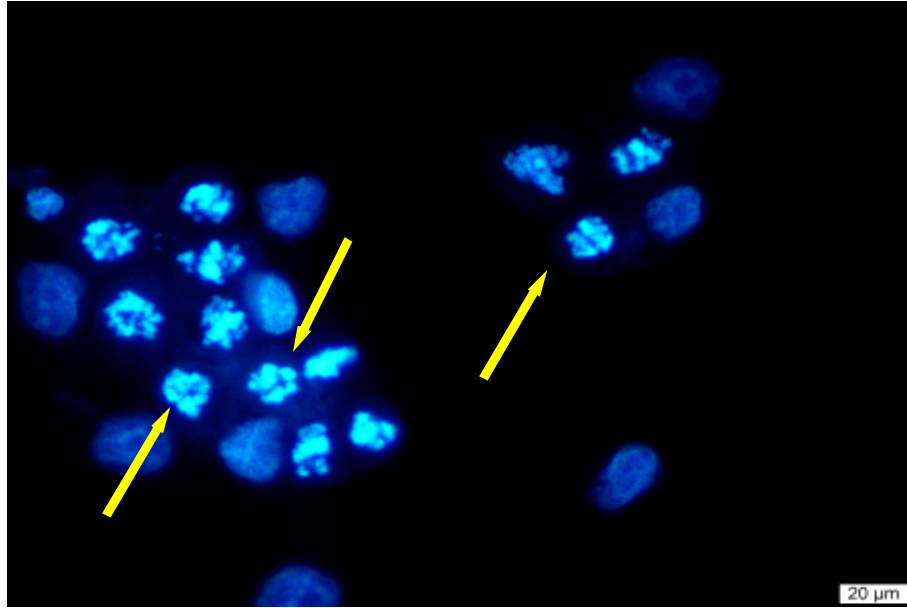
F) Katekin 350 µM + Paklitaksel 2,5 nM

Şekil 5.12. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları E2) Karboplatin 150 µM

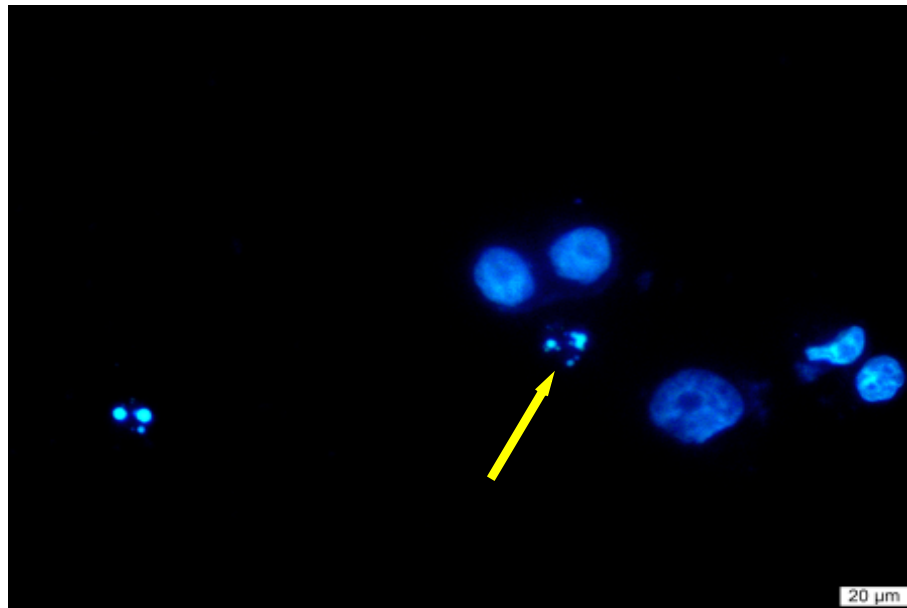
F) Katekin 350 µM + Paklitaksel 2,5 nM

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

DAPI Boyama Sonuçları



F1) EGCG 450 μ M + Pakltaksel 2,5 Nm

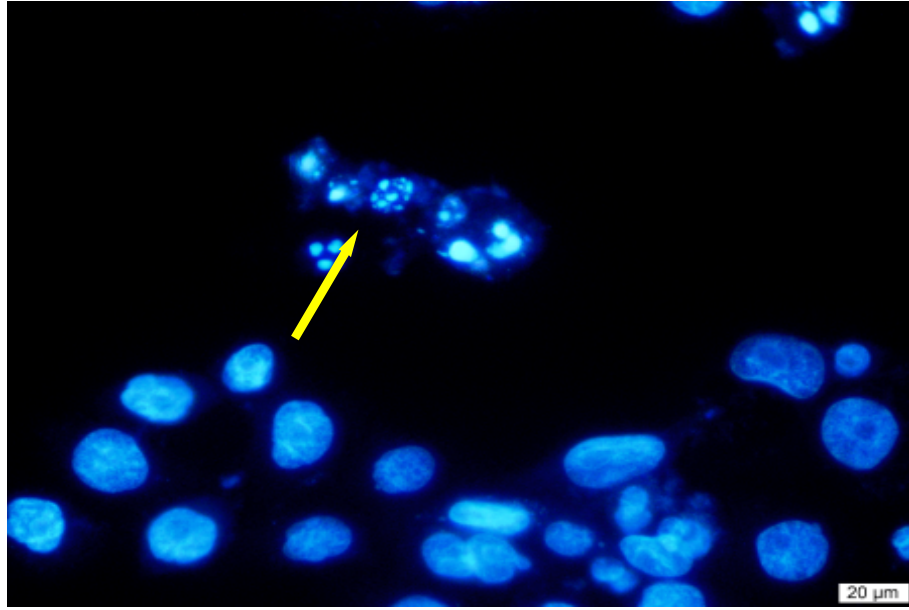


F2) EGCG 350 μ M + Karboplatin 100 μ M

Şekil 5.13. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları F1) Katekin 450 μ M + Pakltaksel 2,5 Nm F2) EGCG 350 μ M + Karboplatin 100 μ M

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir

DAPI Boyama Sonuçları



F3) EGCG 450 μ M + Karboplatin 100 μ M

Şekil 5.14. Ovar 3 hücrelerinin DAPI boyamaları F3) Katekin 450 μ M +
Karboplatin 100 μ M

*Hücrelerde sarı oklar apoptotik etkileri göstermektedir.

EGCG, karboplatin ve paklitaksel'in tek başlarına ve birlikte OVCAR-3 hücreleri üzerinde meydana getirdikleri apoptotik etkilerin morfolojik olarak saptanması için, MTT testleri sonucunda etkili görülen dozlar hücrelere uygulanmış ardından DAPI boyama yapılmıştır. EGCG, karboplatin ve paklitakselin tek başlarına ve birlikte uygulandığı hücrelerinin çekilen fotoğraflarında bulunan oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. DAPI uygulanmış ve kondanse olmuş nükleus morfolojisi apoptotik olarak ifade edilmektedir. DAPI plasma membranından geçerek kromatini maviye boyamaktadır. Apoptotik hücrelerde, hücre çekirdeklerinin küçük parçalara ayrıldığı ve çekirdeklerin kondanse olduğu gözlenmiştir. Test maddelerinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO, OVCAR-3 hücre morfolojisinde değişiklik meydana getirmemiştir (Şekil 5.6 B). EGCG dozlarının 12 saat süreyle uygulandığı OVCAR-3 hücrelerinde hücre çekirdeklerindeki fragmentasyonun doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Katekin 350 μ M + Paklitaksel 2,5 nM (Şekil 5.12 F) ve Katekin 450 μ M + Paklitaksel 2,5 nM (Şekil 5.13 F1) uygulanan kombine dozlarda apoptotik etki gözlenmiştir.

4.3. Real Time PCR Sonuçları

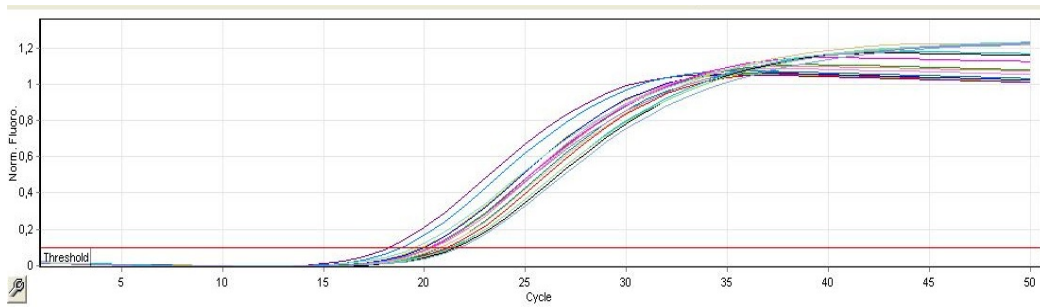
Katekinle 24 saat muamele edilen hücrelerin VEGF gen ekspresyon seviyesinde housekeeping gen 18S rRNA'ya oranlandığında belirgin oranda düşüş görülmektedir. Bir proliferasyon markerı olan Ki-67 gen seviyesinde de VEGF'ye yakın oranda düşüş gözlenmiştir. IRS-1 gen ekspresyonu seviyesinin kontrol grubu da dahil olmak üzere diğer genlere oranla çok düşük olduğu görülmektedir. Katekin uygulamasıyla seviyenin daha da düştüğü görülmektedir. Ancak COX2 gen seviyesinde göze çarpan bir değişim görülmemektedir.

Paklitaksel uygulanan hücrelerde VEGF ve Ki-67 seviyesinde 3 kat düşüş meydana gelirken COX-2 ve IRS1 seviyelerinde belirgin düşüş görülmemiştir.

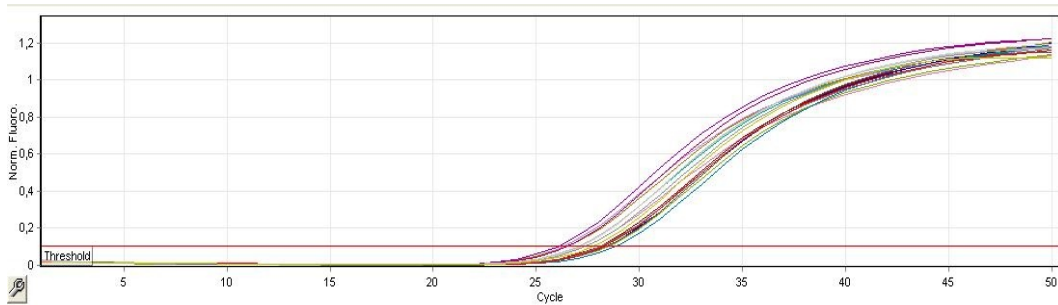
24 saat karboplatin ile muamele edilen hücrelerden elde edilen sonuçlara göre gen seviyesinde madde etkisiyle belirgin bir düşüş görülmemektedir.

Bu sonuçlara göre EGCG ve paklitaksel VEGF ve Ki-67 ekspresyon seviyesini düşürmesine rağmen COX-2 ve IRS-1 geni üzerinde anlamlı bir etki meydana getirmemiştir.

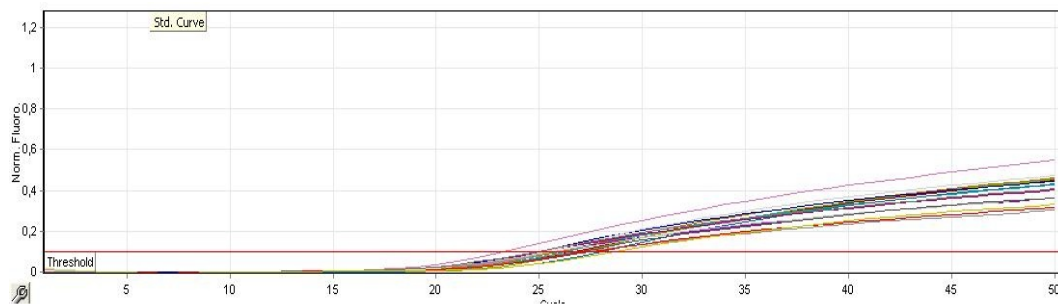
Diğer yandan maddelerin kombinasyonlarının uygulanması da gen ekspresyon seviyelerinde tek başına uygulanan gruplara göre anlamlı bir fark meydana getirmemiştir. Maddelerin tek başına uygulandığı gruplardakine benzer şekilde hem EGCG ve karboplatin kombinasyonu, hem de EGCG ve paklitaksel kombinasyonu VEGF ve Ki-67 gen ekspresyon seviyesini yaklaşık 4 kat düşürmüş, COX-2 ve IRS-1 genleri üzerinde ise anlamlı bir fark oluşturmamıştır.



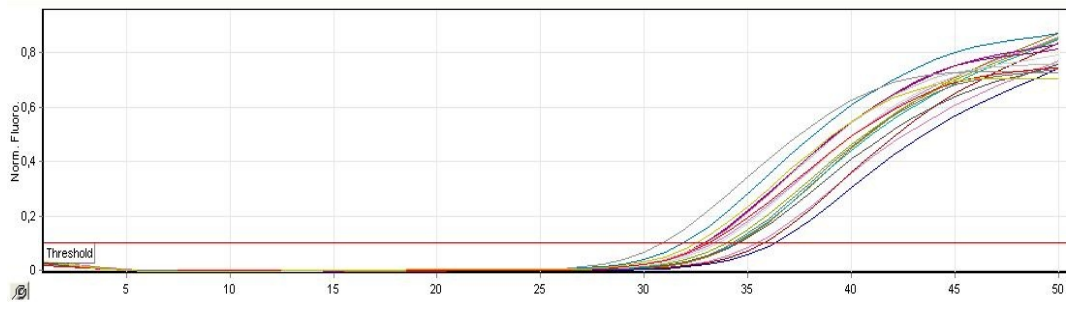
Şekil 5.15. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde house keeping gene (18S rRNA) ait amplifikasyon eğrileri



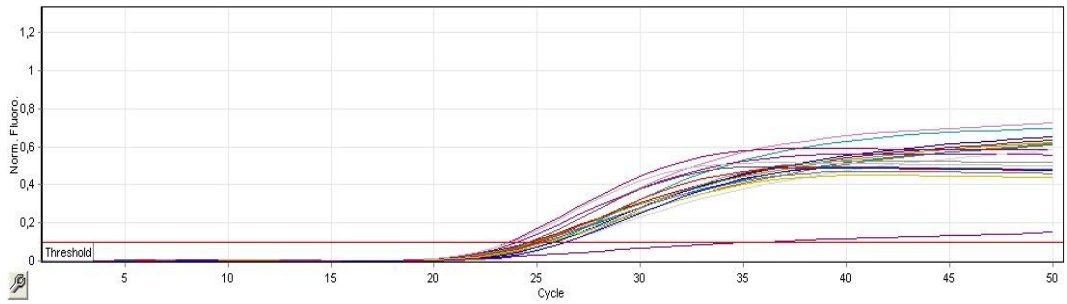
Şekil 5.16. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde IRS-1 genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 5.17. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde KI-67 genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 5.18. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde COX-2 genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 5.19. Test Maddelerinin uygulandığı örneklerde VEGF genine ait amplifikasyon eğrileri

Tablo 5.1 Test maddelerinin uygulandığı genler ve değişim oranları

İsim /Genler	VEGF/18SrRNA	Ki-67/18SrRNA	Cox-2/18SrRNA	IRS1/18SrRNA
Kontrol	0,1120	0,1295	3,4E-05	0,0029
DMSO	0,1201	0,1238	3,0E-06	0,0027
Katekin 150	0,0360	0,0258	2,0E-07	0,0014
Katekin 250	0,0180	0,0124	3,0E-07	0,0018
Katekin 350	0,0272	0,0249	2,9E-05	0,0026
Katekin 450	0,0197	0,0208	7,8E-06	0,0022
Katekin 550	0,0383	0,0293	1,3E-04	0,0036
Pakli 1,25	0,0137	0,0312	5,3E+01	0,0041
Pakli 2,5	0,0355	0,0581	3,1E-05	0,0093
Pakli 5	0,0388	0,1200	3,1E-05	0,0065
Karbo 50	0,0794	0,0962	1,4E-05	0,0045
Karbo 100	0,0698	0,0523	2,0E-06	0,0046
Karbo 150	0,0337	0,0971	4,2E-05	0,0116
Katekin 350, Pakli 2,5	0,0346	0,0729	3,2E-06	0,0013
Katekin 450 Pakli 2,5	0,0074	0,0108	1,5E+01	0,0045
Katekin 350 Karbo 100	0,0254	0,0316	4,0E-06	0,0041
Katekin 450 Karbo 100	0,0216	0,0409	2,5E-05	0,0041

5. TARTIŞMA

Over kanseri kadınlarda görülen kanserlerin % 4' ünü, jinekolojik kanserlerinde % 25'ini oluşturur ve kadınlarda jinekolojik kanserler içerisinde en sık ölüme sebep olan kanserdir (1). Over kanseri tanısı koyulan hastaların yaklaşık % 75'i evre 3 ya da evre 4 olarak karşımıza çıkar. Önerilen terapatik yaklaşım cerrahi sitoredüksiyon, bunu takip eden paklitaksel ve platin grubundan oluşan sistemik kemoterapidir. Erken evre over kanserli hastalarda da ilk yapılan cerrahi rezeksiyona genellikle kemoterapi eklenir. Çünkü büyük bir kısmında cerrahi tek başına yeterli olmazken ek tedaviye ihtiyaç duyulur. Tüm evreler göz önünde bulundurulduğunda ilk tedavi sonrasında da relaps ihtimali % 62 olarak saptanmış olup, ileri evrelerde bu oran % 80-85'tir. Bu yüzden dikkatler karsinogenezle alakalı kritik hücre yollarını hedef alan biyolojik ajanlara çevrilmiştir.Yine bu durum çalışmaları yeni tedavi rejimleri aramaya ve ilk tedavi sonrası ortaya çıkan ilaç direnci karşısında alternatif hedef moleküller geliştirmeye yönlendirmiştir (4-8).

Yeni kemoterapi alternatifi olarak kullandığımız EGCG'nin antikarsinojenik etkileri; antioksidan-prooksidan etki, antianjiogenetik etki, apoptotik-hücre yaşam döngüsünü düzenleyici etki olmak üzere literatür çalışmalarıyla belirlenmiştir. Çalışmamızda bu mekanizmalarda apoptotik etkisinin üzerinde durarak ulaştığımız sonuçlar; Ovcar-3 hücre kültürü üzerinde EGCG'nin farklı dozlarının hem tek başına uygulandığında hem de klasik kemoterapatikler olan paklitaksel ve karboplatinin farklı dozlarıyla yapılan kombine uygulamaları sonucunda kanser hücrelerini anlamlı şekilde yok ettiği, üstelik kombine kullanımda tek başına olan etkileri potansiyelize ederek toplamda daha fazla hücreyi apoptoza uğrattığını gördük. Yine proliferasyondan sorumlu olduğu bilinen VEGF ve Ki-67 üzerinde de anlamlı azalmaya sebep olduğu ulaştığımız diğer bir sonuçtu.

Çalışmamızda kullanılan Ovcar 3 hücre kültürü; yüksek metastaz özelliği gösteren, anormal karyotipe sahip, hormon reseptörleri içeren, ilaç rezistansını gösteren hücre kültürüdür. Bu yüzden birçok antikanser ajanın etki ve mekanizmalarının çalışılmasında uygun bulunmaktadır. Skov3, PA-1 gibi diğer benzer ovaryen kültürlerden farkı da p53 mutanti bulundurmasıdır. Çalışmamızda P53 mutantı bulundurmasından faydalanmasakta bu özelliği kullanılarak farkı hücre

kültürleriyle yapılmış çalışmalarda EGCG'nin etki mekanizması araştırılmak istenmiştir

Hücre canlılığını tespit etmek amacıyla XTT,MTS,WST1 ve MTT gibi uygulaması kolay olan yöntemler benzer çalışmalarda sık olarak kullanılırlar. Biz de çalışmamızda birçok araştırmacı tarafından sitotoksisite çalışmalarında kullanılan MTT testini tercih ettik (199). Yine bu testin en büyük avantajı hem basit ve hızlı bir yöntem olması hem de ilaçların birden fazla konsantrasyonlarının aynı anda çalışılabilmesidir. Bu yöntemle hücre proliferasyonuna ve ölümüne neden olabilen birçok etmen belirlenebilmektedir. EGCG'nin farklı kanser türleriyle yapılan çalışmaların MTT sonuçlarına göre apoptozu tetikleyici etkisi hem konsantrasyon hem de süreye bağlı olarak artmaktadır.

Çalışmamızda öncelikle apoptotik-hüce yaşam döngüsünü düzenleyici etkisi üzerinde yoğunlaştık. Apoptozun tayini için kullanılan yöntemler apoptozun tetiklenmesi sırasında meydana gelen karakteristik olayların ölçümü prensibine dayanır. Özellikle de DNA fragmentasyonu ve fosfatidilserin kalıntılarının hücre membranının dış yüzeyine çıkması apoptozun belirlenmesinde en çok kullanılan özelliklerdir (199). Bu amaçla yani apoptozu belirlemek için kullandığımız bir yöntem DAPI boyama oldu. Bu yöntemde kullanılan boya flouresan bir madde olup DNA'ya bağlanabildiğinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir, sonuç olarak ise ölü hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Bu boyama yöntemindeki prensip; canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının intakt olup olmadığıdır. Bu şekilde boyanan hücreler ise bir flouresan mikroskobu ile kolaylıkla tanınabilirler. Farklı çalışmalarda kullanılan bir yöntem olan TUNEL yöntemini, nekrotik hücreleri de apoptotik hücre olarak değerlendirdiğinden kendi çalışmamızda tercih etmedik (200).

Son yıllarda farklı kanser türlerinde ilaç direncine karşı alternatif denenen hedef moleküllerden birisi de EGCG'dir. EGCG yeşil çay'da bulunan, toplam polifenollerin % 50-80'ini oluşturan ve kanser büyümesini engellediği bilinen bir polifenol yapıtaşıdır. Fakat over kanseri üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmalar sınırlıdır (201). İnvitro çalışmalar meme, prostat, akciğer, pankreas, kolon kanseri ve lenfoma hücreleri üzerinde yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir.

Çalışmamızda EGCG'nin over kanseri üzerindeki etkisini farklı ilaç kombinasyonlarıyla birlikte değerlendirdik.

EGCG'nin apoptotik mekanizması ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; etkisinin hücre kültürüne ve kullanılan katekin konsantrasyonuna göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Çalışmamızda EGCG'yi , MTT deneylerinde 100µM ile 550µM aralığında uyguladık. İlk gün 100µM'lık doz hücre sayısında bir düşüş meydana getirmezken, 150µM'lık dozdan başlamak üzere hücre sayısında doza bağlı bir azalma meydana geldi (Şekil 5.1). 150 µM'lık dozda hücre sayısında ilk gün % 24 oranında bir düşüş saptandı. En yüksek doz 550µM'da hücre sayısındaki azalma % 53 oranındaydı. 100µM'lık EGCG dozu ikinci gün hücre sayısında % 20'lik düşüşe neden olmuşken, 550µM'lık doz ise ikinci gün hücre sayısında % 73'lük bir azalmaya neden oldu. Sonuç olarak tek başına EGCG uygulamasında 48 saat sonra saptanan IC 50 değeri bizim çalışmamızda 350µM'ın biraz üzerindeydi. Literatürde EGCG ile yapılan çalışmaların çoğunda apoptoz EGCG'nin 50µM'dan yüksek konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir (194). HPV-16 ile ilişkili servikal kanser hücre hattında (CaSki) Ahn ve ark. (202) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 24 saatte 35µM EGCG konsantrasyonunda hücre yaşam döngüsünün G1 fazında duraksadığı belirlenmiştir. Apoptoz ise aynı sürede ancak 100µM konsantrasyonda gözlenebilmiştir (202). MCF7 meme kanseri hücre kültüründe yapılan bir çalışmada 24 saat 30µM EGCG ile muamele edilen hücrelerde akış sitometrik DNA analizi ile G0/G1 duraksaması gösterilmiştir (203). Hsuuw ve ark.'nın (201) yaptıkları bir çalışmada ise, insan meme kanseri hücre kültüründe (MCF-7) 50µM EGCG konsantrasyonunda apoptozun, 100µM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda ise nekrozun tetiklendiği gösterilmiştir (204). Bu çalışmalar EGCG'nin anti-kanser mekanizmasında apoptoz kadar hücre yaşam döngüsünde duraksamanın ve nekrozun da etkin olabileceğini göstermektedir. Islam ve ark.'nın (205) yaptığı çalışmada insan kondrosarkoma (HTB-94) hücre kültüründe EGCG'nin düşük konsantrasyonlarda dahi (5µM) hücrelerde DNA fragmantasyonu ile belirlenen apoptoz tetiklenmesine ve kaspaz-3 aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (205). Aynı çalışmada genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD-FMK) ve spesifik kaspaz-3 inhibitörü (DEVD-CHO) kullanılarak apoptozun engellendiği de belirlenmiştir. Qanungo ve ark. (203) yaptıkları çalışmada çeşitli pankreatik kanser hücre kültürlerinde 100µM EGCG ile

24 saat inkübasyon sonucu apoptoz tetiklendiğinde; mitokondriden sitokrom c salınması, aktif kaspaz-3 ve kaspaz-9 immünofluoresan mikroskopisi ve western blot yöntemleri ile belirlenmiştir (206). Gupta ve ark. (204) yaptıkları çalışmada da epidermoid karsinom (A431) hücre kültüründe EGCG ile apoptoz tetiklendiğinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekspresyonlarında artış olduğu western blot analizi ile belirlenmiştir (207). EGCG'nin Kaspaz-9 aktivasyonunu ve sitokrom c salınmasını sağladığına dair çalışmalar mevcuttur (194). Roy ve ark. (205) yaptıkları bir çalışmada 20-60µg/ml EGCG'nin insan meme kanser hücre kültüründe (MDA-MB-468) Bcl-2 anti-apoptotik proteininin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu ve Bax pro-apoptotik proteinin ekspresyonunda da artışa yol açtığı belirlenmiştir (208). Sağlıklı insan lenfositlerinde Kanadzu ve ark. (209) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, EGCG'nin 10µM ve daha düşük konsantrasyonlarda DNA kırıklarını engellediği, 1000µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda DNA kırıklarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (209).

Biz çalışmamızda en yüksek EGCG dozu olarak 550µM kullandık. Ama toksik sınırın ne olduğu konusunda yüksek dozlar uygulamadığımızdan ve invitro bir deney olduğundan fikir sahibi olamadık. Bu konuda bildirilen bazı çalışmalar yeşil çay deriveleri ile karaciğer toksisitesi arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Joshua ve ark. (210) yüksek dozda EGCG verdikleri farelerde hepatotoksik etkilerini çalışmışlar ve tek yüksek dozda (1000mg/kg) karaciğer fonksiyonlarında 138 kat artış gözlemlemişlerdir. EGCG hepatotoksitesinin hepatik lipid peroksidasyonunu artırmasıyla meydana gelen oksidatif stres sonucu meydana geldiğini öne sürmüşlerdir (210). Bu çalışmayla ileride muhtemel yapılacak olan hayvan ve insan çalışmalarında dikkat edilmesi gereken önemli bir ayrıntı belirtilmiştir.

Over kanserinde standart tedavi platin tabanlıdır. Platin içermeyen tedavilere yanıt % 40 iken, platin içeren tedavilere yanıt % 60-80 civarındadır. Hastaların % 70 inde platin ve paklitaksel tabanlı kemoterapiye yönelik olumlu ilk cevaba rağmen, çoğu ilerleyen zamanlarda kemoterapiye direnç artışı ile karşımıza çıkarlar. Tedavinin başarısızlığında çoklu kemoterapik ajanlara direnç başlıca nedenlerdendir. Tedavi nedeniyle DNA tamirine yapılan müdahaleler kanser hücrelerinin ilaca direnç geliştirmesinin başlıca nedenlerindendir. Fakat, ilk başlangıçtaki ilaca karşı dirençliliğin asıl sebebi henüz bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada S100P'nin

(kalsiyum binding protein ailesinden) overekspresyonunu, ilaca karşı dirençli over kanserli hastalarda gözlemlenen zayıf bir prognoz ile ilişkilendirmişlerdir. Aynı çalışmada, S100P'nin up-regule edilmesiyle, over kanseri hücre kültürleri olan SKOV3 ve OVCAR-2'nin karboplatin ve paklitaksel'e karşı hassaslığının arttığını göstermişlerdir. S100P'nin, over kanser hücrelerinin ilaca karşı direnç fenotipinde önemli bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Bu araştırma sonucunda, S100P'nin over kanser hücrelerinde faydalı bir kemosenitivite markırı olduğu düşünülmektedir. Over kanserinin paklitaksele karşı gözlenen direnci hakkında çeşitli potansiyel mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunların içinde hedef protein beta-tubulindeki mutasyonlar ve ABCB1 genindeki tek nukleotid polimorfizmleri de bulunmaktadır. ABCB1 transport protein olan P-glikoproteinini şifreler. Ote yandan, ilaca karşı direnç hakkında bilinen mekanizmalar, karboplatin ve platin kaynaklı sitoplazmik detoksifikasyon nedeniyle oluşmuş, artmış DNA tamirini içerir. Daha güncel çalışmalar göstermiştir ki platin ve paklitaksel tedavileriyle iyileşmiş over kanser hücreleri daha yüksek p53 ve mdr-1 seviyeleri göstermişlerdir (211, 212).

Klasik tedavi protokolümüzde paklitaksel ve karboplatin birlikte yer aldığından öncelikle çalışmamızda OvcAR-3 hücre kültüründe bu iki kemoterapitik ajanın tek başlarına etkilerini ve IC 50 değerlerini belirledik. Paklitaksel 0,312nM ile 100nM arasında uygulandı. IC 50 değeri 48 saat için 2.5 nM olarak belirlendi. Karboplatin 50µM ile 250µM arasında uygulandı. IC 50 değeri 150 µM'ın biraz üzerindeydi. Bir çalışmada farklı kemoterapi alternatifi olarak, over kanseri hücre kültürlerinde birçok hücre sinyal yolağında görev alan, proliferasyondan , sağkalımından non reseptor tirozin kinaz olan SRC'yi engelleyen dasatinib denenmiş, paklitakselin IC50 değeri 3nM, karboplatinin IC50 değeri 320nM olarak belirlenmiştir. Bu değerler kısmen bizim çalışmamızdakine benzerdi. Dennah ve arkadaşlarının farklı hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmasında dasatinib gibi SRC inhibitörlerinin over kanserli hastaların tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (213).

Çalışmamızda paklitakselin en yüksek dozu (100 nM) ilk gün hücre sayısında % 19,5'lik bir düşüşe neden olmuşken, en düşük dozu olan 0,312 nM'lık doz ikinci gün % 45 oranında hücre sayısında azalma meydana getirmiştir. Karboplatinin en yüksek dozu olan 250 µM'lık doz ilk gün hücre sayısında % 14'lük bir düşüş

meydana getirip, karboplatinin en düşük dozu olan 50 μM 'lık doz hücreler üzerinde 3 gün boyunca sitotoksik bir etki meydana getirmemiştir. 100 μM 'lık dozun ikinci gün hücre sayısında meydana getirdiği azalma % 11'dir, bu oran 250 μM 'lık dozda % 64'tür.

Tek tek uygulanan ilaçlar, sonrasında ikili kombinsayonlar halinde uygulanıp sonuçlar değerlendirildi. EGCG'nin farklı dozları 24 saat uygulandıktan sonra paklitaksel ve karboplatinin farklı dozları kültüre eklenmiştir. EGCG (350 μM) ve paklitakselin (1,25 nM) farklı dozlarının birlikte uygulanması sonucunda ilk gün hücre sayısında % 58 oranında bir düşüş belirlenmiştir (Şekil 5.4). Oysa EGCG (350 μM) tek başına ilk gün hücre sayısında % 35 oranında azalma meydana getirirken (Şekil 5.1), paklitaksel (1,25 nM) tek başına % 6'lık düşüşe neden olmuştu (Şekil 5.2). EGCG ve paklitakselin farklı dozlarının birlikte uygulandığı MTT deneylerinde hücre sayısında önemli bir düşüş olduğu olduğu Şekil 5.4'te görülmektedir. EGCG (350 μM) ve karboplatinin (50 μM) farklı dozlarının birlikte uygulanması sonucunda ilk gün hücre sayısında % 59 oranında bir düşüş meydana gelmiştir (Şekil 5.5). EGCG (350 μM) tek başına ilk gün hücre sayısında % 35 oranında azalma meydana getirirken (Şekil 5.1), karboplatin 50 μM ilk gün hücre sayısında hiç azalmaya neden olmamıştır (Şekil 5.3). EGCG ve karboplatinin farklı dozlarının birlikte uygulanması sonucunda meydana gelen sitotoksik etki her iki maddenin ayrı ayrı uygulandığında meydana gelen etkiden daha fazladır (Şekil 5.5).

EGCG ve paklitakselin birlikte uygulanması ile ortaya çıkan etki ile EGCG ve karboplatinin birlikte uygulanması ile ortaya çıkan etki birbirine çok benzerdir. Paklitaksel ve karboplatinin tek başlarına uygulandığında hücre sayısında önemli bir azalma görülmezken, her iki madde EGCG ile birlikte uygulandığında ilk gün hücre sayısında önemli oranda bir azalma olduğu Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'te gözlenmektedir. Elde edilen verilerden hareketle tek ajan ilaç kullanımı yerine kombine kullanımın sonuç olarak tek tek etki toplamından daha yararlı olacağı söylenilebilir. Yani EGCG, paklitaksel ve karboplatinin etkilerini potansiyalize etmiştir. Literatürde EGCG'nin over kanserinde kombine tedavide kullanımıyla ilgili henüz sınırlı sayıda çalışma mevcutken, farklı kanser türleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan birisi Ting Luo ve ark. (214) yaptığıdır. Çalışmada öncelikle üç meme kanseri hücresinin paklitaksele karşı sensitivitesi belirlenmiş. Sonra EGCG eklenerek

hücrelerin yaşam oranları WST assay yöntemi ile belirlenip, dramatik bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar paklitakselin apoptoz üzerindeki etkisinin JNK aktivasyonu ile ilgili olduğunu göstermiştir. Çalışmada da EGCG'nin bu mekanizmayı potansiyalize ettiği söylenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada EGCG'nin Ehrlich asit karsinomasında doksorubisinin etkilerini potansiyelize ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada EGCG'nin, sulindak ve tamoksifenle kullanıldığında sinerjistik etkiyle akciğer kanserinde de inhibisyon özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir (214).

VEGF, epitelyal over kanserlerinin de dahil olduğu pek çok tümöral doku tarafından salgılanan anjiogenik bir faktördür ve beyin tümöründe ödem, over kanserinde asit oluşumu ve metastaz gelişmesinin önemli mediatörlerinden biridir. VEGF ailesinin diğer üyelerinin (VEGF-B, VEGF-C gibi) overdeki fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte Sowter ve ark. (160) normal over dokusu ve epitelyal over kanserli hastaları VEGF yönünden karşılaştırdıkları çalışmada, sadece VEGF ile VEGF-B düzeylerinin tümörü olan over dokusunda daha yüksek seviyede bulunduğunu saptamışlardır (158-160). Bizim çalışmamızda da EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerin VEGF gen ekspresyon seviyesinde *housekeeping gen* 18S rRNA'ya oranlandığında belirgin oranda düşüş görülmektedir. Yine bir çalışmada EGCG ve curcumin birlikte meme kanseri hayvan modelinde kullanıldığında VEGFR-1'i de azaltarak büyümeyi anlamlı durdurmuştur (214).

Çalışmamızda bir proliferasyon markırı olan Ki-67 gen seviyesinde VEGF'ye yakın oranda düşüş gözlenmiştir. IRS-1 gen ekspresyonu seviyesinin kontrol grubu da dahil olmak üzere diğer genlere oranla çok düşük olduğu görülmektedir. Katekin uygulamasıyla seviyenin daha da düştüğü görülmektedir. Ancak COX2 gen seviyesinde göze çarpan bir değişim görülmemektedir. Paklitaksel uygulanan hücrelerde VEGF ve Ki-67 seviyesinde 3 kat düşüş meydana gelirken COX-2 ve IRS1 seviyelerinde belirgin düşüş görülmemiştir. 24 saat karboplatin ile muamele edilen hücrelerden elde edilen sonuçlara göre gen seviyesinde madde etkisiyle belirgin bir düşüş görülmemektedir.

Bu sonuçlara göre EGCG ve paklitaksel VEGF ve Ki-67 ekspresyon seviyesini düşürmesine rağmen COX-2 ve IRS-1 geni üzerinde anlamlı bir etki meydana getirmemiştir.

Diğer yandan maddelerin kombinasyonlarının uygulanması da gen ekspresyon seviyelerinde tek başına uygulanan gruplara göre anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Maddelerin tek başına uygulandığı gruplardakine benzer şekilde hem EGCG ve karboplatin kombinasyonu, hem de EGCG ve paklitaksel kombinasyonu VEGF ve Ki-67 gen ekspresyon seviyesini yaklaşık 4 kat düşürmüş, COX-2 ve IRS-1 genleri üzerinde ise anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Sonuç olarak hem bizim çalışmamız hem yapılan çalışmalar; EGCG'nin kanser önleyici etkisi genetik polimorfizmle alakalı olduğunu göstermiştir.

Bütün çalışmalar göz önüne alındığında EGCG'nin anti-kanser mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır ve dolayısıyla güncel araştırma konusudur (196). EGCG tümör progresyonu üzerine farklı kanser hücre kültürlerinde farklı mekanizmalar üzerinden etki etmektedir. Altta yatan mekanizmalar oldukça kompleks gibi görülmektedir.

Fizyolojik bir süreç olan apoptoz, enflamasyona neden olmadığından ve çevre dokulara zarar vermediğinden kanser terapisinde tercih edilen bir yoldur. EGCG'nin potansiyel antikanser etkisinin daha derinlemesine anlaşılabilmesi için çalışmamızın temel oluşturabileceğine inanmaktayız. EGCG'nin normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerine daha fazla hasar vermesi bu maddenin kanser hücrelerine yönelik kullanım potansiyelini arttırmaktadır.

Çalışmalar sırasında her üç maddeninde aynı anda hücre kültürü üzerine verildiğinde normalde beklenen etkinin ikili kombinasyonlardan yola çıkarak hücrelerin büyük bir kısmını yok etmiş olması gerekirken hücre sayısında artma olması şaşırtıcı bir sonuç olmuştur. Bu sonucun ardından EGCG ile 24 saat muamele edilen hücreler paklitaksel ve karboplatinle muamele edilmiş ama bu seferde MTT testi uygulanabilecek yada DAPI boyama yapılabilecek materyale ulaşamamıştır. Çalışmamızda sonrasında yapmamız gereken maddelerin dozlarını azaltarak deneyi tekrarlamak olabilirdi. Ama kullandığımız dozlarımız literatürde kullanılan dozlardan yola çıkılarak belirlendiğinden her üç maddeninde dozlarını düşürerek deneyi tekrarlamadık. Sonraki çalışmalarda yeniden doz ayarlaması yapılarak kombinasyonun denenmesi ve sonuçların yeniden değerlendirilmesini önerebiliriz. Çalışmamızda EGCG'nin etkilerini sadece dört gen üzerinde araştırmış olmamız da çalışmamızın bu yöndeki sonuçlarını sınırlayıcı olmakla beraber kanser önleyici

etkisinin genetik polimorfizmle de alakalı olduğunu söyleyebiliriz. Bu konunun da gelecekteki çalışmalarla farklı genlerle destekleneceğini öngörüyoruz.

Sonuç olarak EGCG'nin tek başına olduğu gibi kombine kullanımının OVCAR-3 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı olarak etki gösterdiğini, apoptotik etkisinin olduğunu, büyümeyi inhibe ettiğini, kombine kullanımlarda bu etkisinin potansiyalize olduğunu, klasik kemoterapatlere direnç gelişen ya da ilaç toksisitesi gelişen durumlarda, tabiki öncelikle invitro, ardından hayvan ve insan çalışmaları sonucunda verilerimiz desteklenirse kombine kullanımda yeni bir ilaç olabileceğini söyleyebiliriz

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Kanser; insan sağlığını hem sosyal yönden hem ekonomik yönden etkileyen, yaşam kalitesini olumsuz yönde değiştiren ciddi bir problemdir.
2. Over kanseri; gelişmiş ülkelerde kadınlarda rastlanan kanserler sıralamasında akciğer, meme, kolorektal ve pankreas kanserlerinden sonra beşinci en sık kanserle ilişkili ölüm sebebidir ve kadın genital sistem kanser ölümlerinde birinci sırayı almıştır.
3. Genel olarak bakıldığında kadınların % 2-3'ünde yaşamları boyunca malignite gelişecektir.
4. Over kanserlerinde asıl olarak birincil tedavi cerrahidir. Cerrahi sonrası olguların çoğunda kemoterapi uygulanır.
5. Epiteyal ovaryen kanserde kullanılan klasik kemoterapi karboplatin ve paklitaksel kombinasyonudur.
6. Hücre kültürü tekniği kullanılarak yapılan araştırmalar, çalışmaların hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle yeni alternatiflerin geliştirilmesine olanak sağlar
7. Fizyolojik bir süreç olan apoptoz, enflamasyona neden olmadığından ve çevre dokulara zarar vermediğinden kanser terapisinde tercih edilen bir yoldur.
8. EGCG, son yıllarda kanser türleri üzerinde farklı mekanizmalar kullanarak antikanser etkisi önem kazanan yeşil çay derivesidir.
9. Tez kapsamında EGCG'nin karboplatin ve paklitakselle kombinasyonlarının ovarca 3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi MTT testi ve DAPI boyama ile değerlendirilmiştir.
10. Çalışmamızın konusu olan EGCG nin over kanseri üzerine kullanımı üzerine henüz sınırlı sayıda çalışma vardır. Kombine kullanımıyla ilgili çalışmalar literatür taramasında saptanmamıştır.
11. EGCG ile muamele sonucunda çalışılan gen düzeyleri göstermiştir ki; EGCG'nin kanser önleyici etkisi genetik polimorfizmle de alakalıdır.
12. Çalışmamız doğrultusunda EGCG'nin tek başına olduğu gibi klasik kemoterapitiklerle kombine kullanımının OVCAR-3 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı olarak etki gösterdiğini, apoptotik etkisinin olduğunu, büyümeyi inhibe ettiğini, kombine kullanımlarda bu etkisinin potansiyalize olduğunu söyleyebiliriz.

13. Kanser hastalarına uygulanan kemoterapatlere direnç karşılaşılan önemli bir sorundur. Klasik kemoterapatlere direnç gelişen ya da ilaç toksisite gelişen durumlarda, öncelikle invitro, ardından hayvan ve insan çalışmaları sonucunda verilerimiz desteklenirse kombine kullanımda EGCG'nin yeni bir ilaç olabileceğini söyleyebiliriz

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
2. Auersperg N, Ota T, Mitchell GW. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12(6):691-703.
3. Edmondson RJ, Monaghan JM. The epidemiology of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11(6):423-9.
4. Ang C, Chan KK, Bryant A, Naik R, Dickinson HO. Ultra-radical (extensive) surgery versus standard surgery for the primary cytoreduction of advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(4):CD007697.
5. Benjamin I, Rubin SC. Management of early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1994;21(1):107-19.
6. Chang SJ, Bristow RE. Evolution of surgical treatment paradigms for advanced-stage ovarian cancer: redefining 'optimal' residual disease. *Gynecol Oncol* 2012;125(2):483-92.
7. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ. Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 1998;69(2):103-8.
8. Elattar A, Bryant A, Winter-Roach BA, Hatem M, Naik R. Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(8):CD007565.
9. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(5):277-300.
10. MacLennan AH, Baber R. Hormone therapy use and risk of ovarian cancer. *JAMA* 2009;302(20):2203
11. Morch LS, Lokkegaard E, Andreasen AH, Kruger-Kjaer S, Lidegaard O. Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA* 2009;302(3):298-305.
12. Salehi F, Dunfield L, Phillips KP, Krewski D, Vanderhyden BC. Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11(3-4):301-21.

13. Titus-Ernstoff L, Perez K, Cramer DW, Harlow BL, Baron JA, Greenberg ER. Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk. *Br J Cancer* 2001;84(5):714-21.
14. Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, Kauppila A. Incidence of ovarian cancer of grand multiparous women--a population-based study in Finland. *Gynecol Oncol* 2006;103(1):207-11.
15. Vercellini P, Somigliana E, Buggio L, Bolis G, Fedele L. Endometriosis and ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2012;13(5):e188-9.
16. Sundaralingam A. Endometriosis is associated with an increased risk of ovarian cancer, study shows. *BMJ* 2012;344:e1363.
17. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol* 2012;13(4):385-94.
18. Munksgaard PS, Blaakaer J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol* 2012;124(1):164-9.
19. Guo SW, Zilberberg MD, Hummelshoj L. Endometriosis and ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2012;13(5):e189-90; author reply e190.
20. Gourley C. Link between endometriosis and ovarian-cancer subtypes. *Lancet Oncol* 2012;13(4):326-8.
21. Orezza JP, Russell AH, Oliva E, Del Carmen MG, Eichhorn J, Fuller AF. Prognostic implication of endometriosis in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 2008;110(3):336-44.
22. Wei JJ, William J, Bulun S. Endometriosis and ovarian cancer: a review of clinical, pathologic, and molecular aspects. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30(6):553-68.
23. Kadija S, Stefanovic A, Jeremic K, Radojevic MM, Nikolic L, Markovic I, et al. The utility of human epididymal protein 4, cancer antigen 125, and risk for malignancy algorithm in ovarian cancer and endometriosis. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22(2):238-44.

24. Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2009;19(3):398-405.
25. Huncharek M, Geschwind JF, Kupelnick B. Perineal application of cosmetic talc and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 11,933 subjects from sixteen observational studies. *Anticancer Res* 2003;23(2C):1955-60.
26. Heinonen PK. Vitamin A, gonadotropins and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1991;27(5):669.
27. Huncharek M, Muscat J. Perineal talc use and ovarian cancer risk: a case study of scientific standards in environmental epidemiology. *Eur J Cancer Prev* 2011;20(6):501-7.
28. Nagle CM, Bain CJ, Webb PM. Cigarette smoking and survival after ovarian cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(12):2557-60.
29. Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM. Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. *Gynecol Oncol* 2006;103(3):1122-9.
30. Kjaerbye-Thygesen A, Frederiksen K, Hogdall EV, Glud E, Christensen L, Hogdall CK, et al. Smoking and overweight: negative prognostic factors in stage III epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(4):798-803.
31. Gram IT, Lukanova A, Brill I, Braaten T, Lund E, Lundin E, et al. Cigarette smoking and risk of histological subtypes of epithelial ovarian cancer in the EPIC cohort study. *Int J Cancer* 2012;130(9):2204-10.
32. Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2007;43(4):690-709.
33. Protani MM, Nagle CM, Webb PM. Obesity and Ovarian Cancer Survival: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012.
34. Boyd J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol* 2003;88(1 Pt 2):S8-10; discussion S11-3.

35. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 2009;3(2):97-137.
36. de Pauw A, Jolissaint L, Freneaux P, Rouleau E, Stoppa-Lyonnet D, Buecher B. Hereditary forms of ovarian cancer. *Bull Cancer* 2012;99(4):453-62.
37. Barks P, Goldgar C. Hereditary breast and ovarian cancer. *JAAPA* 2012;25(3):63-5.
38. Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol* 2012;124(2):347-53.
39. Van der Meer LB, van Duijn E, Wolterbeek R, Tibben A. Adverse childhood experiences of persons at risk for Huntington's disease or BRCA1/2 hereditary breast/ovarian cancer. *Clin Genet* 2012;81(1):18-23.
40. Singer CF, Tea MK, Pristauz G, Hubalek M, Rappaport C, Riedl C, et al. [Guideline for the prevention and early detection of breast and ovarian cancer in high risk patients, particularly in women from HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) families]. *Wien Klin Wochenschr* 2012;124(9-10):334-9.(Article in German)
41. Drohan B, Roche CA, Cusack JC, Jr., Hughes KS. Hereditary breast and ovarian cancer and other hereditary syndromes: using technology to identify carriers. *Ann Surg Oncol* 2012;19(6):1732-7.
42. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* 2005;104(12):2807-16.
43. Maul JS, Warner NR, Kuwada SK, Burt RW, Cannon-Albright LA. Extracolonic cancers associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Utah Population Database. *Am J Gastroenterol* 2006;101(7):1591-6.
44. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71(3):677-85.
45. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2(7716):163.
46. Cramer DW, Welch WR, Cassells S, Scully RE. Mumps, menarche, menopause, and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147(1):1-6.

47. Rosenblatt KA, Thomas DB, Noonan EA. High-dose and low-dose combined oral contraceptives: protection against epithelial ovarian cancer and the length of the protective effect. The WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Eur J Cancer* 1992;28A(11):1872-6.
48. Epithelial ovarian cancer and combined oral contraceptives. The WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Int J Epidemiol* 1989;18(3):538-45.
49. Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, et al. A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1995;76(2):284-90.
50. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;19(1):3-10.
51. Parrott JA, Doraiswamy V, Kim G, Mosher R, Skinner MK. Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2001;172(1-2):213-22.
52. Smith ER, Xu XX. Etiology of epithelial ovarian cancer: a cellular mechanism for the role of gonadotropins. *Gynecol Oncol* 2003;91(1):1-2.
53. Nowak-Markwitz E, Jankowska A, Spaczynski M. [Gonadotropins and ovarian cancer]. *Ginekol Pol* 2005;76(2):153-62. (Article in Polish)
54. Lau MT, Wong AS, Leung PC. Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* 2010;151(7):2985-93.
55. Konishi I, Kuroda H, Mandai M. Review: gonadotropins and development of ovarian cancer. *Oncology* 1999;57 Suppl 2:45-8.
56. Feng Y, Zhang X, Ge B. [Gonadotropins stimulate the proliferation of human epithelial ovarian cancer cell]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1996;31(3):166-8. (Article in Chinese)
57. Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev* 2007;28(4):440-61.
58. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(4):717-21.

59. Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Gordon GB, Longcope C, Bush TL, Hoffman SC, et al. Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. *JAMA* 1995;274(24):1926-30.
60. Lee JH, Kavanagh JJ, Wildrick DM, Wharton JT, Blick M. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 6q, 11, and 17 in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1990;50(9):2724-8.
61. Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A. Molecular aspects of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(4):483-97.
62. Runnebaum IB, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(2):73-9.
63. Canevari S, Gariboldi M, Reid JF, Bongarzone I, Pierotti MA. Molecular predictors of response and outcome in ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;60(1):19-37.
64. Gershenson DM. Clinical management potential tumours of low malignancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(4):513-27.
65. Zikan M, Pinkavova I, Slama J, Freitag P, Janousek M, Fischerova D, et al. [Molecular characterization of epithelial ovarian borderline tumors with respect to clinical management and prognosis]. *Ceska Gynekol* 2009;74(6):427-30. (Article in Czech)
66. Christie M, Oehler MK. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc* 2006;12(2):57-63.
67. Tornos C, Silva EG. Pathology of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1994;21(1):63-77.
68. Yemelyanova AV, Cosin JA, Bidus MA, Boice CR, Seidman JD. Pathology of stage I versus stage III ovarian carcinoma with implications for pathogenesis and screening. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18(3):465-9.
69. Seidman JD, Kurman RJ. Pathology of ovarian carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17(4):909-25, vii.
70. Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol* 2009;40(9):1213-23.
71. Goff B. Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55(1):36-42.

72. Lim AW, Mesher D, Gentry-Maharaj A, Balogun N, Jacobs I, Menon U, et al. Predictive value of symptoms for ovarian cancer: comparison of symptoms reported by questionnaire, interview, and general practitioner notes. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(2):114-24.
73. Stavrika C, Ford A, Ghaem-Maghami S, Crook T, Agarwal R, Gabra H, et al. A study of symptoms described by ovarian cancer survivors. *Gynecol Oncol* 2012;125(1):59-64.
74. Webb PM, Purdie DM, Grover S, Jordan S, Dick ML, Green AC. Symptoms and diagnosis of borderline, early and advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):232-9.
75. Fleischer AC, Lyshchik A, Hirari M, Moore RD, Abramson RG, Fishman DA. Early detection of ovarian cancer with conventional and contrast-enhanced transvaginal sonography: recent advances and potential improvements. *J Oncol* 2012;2012:302858.
76. Van Nagell JR, Jr., DePriest PD, Ueland FR, DeSimone CP, Cooper AL, McDonald JM, et al. Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened. *Cancer* 2007;109(9):1887-96.
77. DePriest PD, Gallion HH, Pavlik EJ, Kryscio RJ, van Nagell JR, Jr. Transvaginal sonography as a screening method for the detection of early ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1997;65(3):408-14.
78. Granberg S, Wikland M, Jansson I. Macroscopic characterization of ovarian tumors and the relation to the histological diagnosis: criteria to be used for ultrasound evaluation. *Gynecol Oncol* 1989;35(2):139-44.
79. Hempling RE. Tumor markers in epithelial ovarian cancer. Clinical applications. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1994;21(1):41-61.
80. Casper S, van Nagell JR, Jr., Powell DF, Dubilier LD, Donaldson ES, Hanson MB, et al. Immunohistochemical localization of tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149(2):154-8.
81. Di Cocco B, Calabretta F, Alghisi F, Salesi N, Bossone G. [Tumor markers in epithelial ovarian cancer]. *Minerva Ginecol* 2003;55(4):327-32.(Article in Italian)

82. Holubec L, Jr., Finek J, Topolcan O, Bouda J, Rokyta Z. [Clinical relevance of tumor markers in epithelial ovarian cancer]. *Ceska Gynekol* 2004;69(3):225-8.
83. Husseinzadeh N. Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review. *Gynecol Oncol* 2011;120(1):152-7.
84. Kim HS, Kim JW, Cho JY, Chung HH, Park NH, Song YS, et al. The role of serum CA-125 levels in early-stage epithelial ovarian cancer on preoperative CT and MRI. *Eur J Surg Oncol* 2009;35(8):870-6.
85. Patsner B. Preoperative serum CA-125 levels in early stage ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 1990;11(5):319-21.
86. Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM. The role of CA125 in clinical practice. *J Clin Pathol* 2005;58(3):308-12.
87. Fields MM, Chevlen E. Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs* 2006;10(1):77-81.
88. Duffy MJ. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract* 2012.
89. Kebapci M, Akca AK, Yalcin OT, Ozalp SS, Calisir C, Mutlu F. Prediction of suboptimal cytoreduction of epithelial ovarian carcinoma by preoperative computed tomography. *Eur J Gynaecol Oncol* 2010;31(1):44-9.
90. Barber HR. Spread and treatment of advanced ovarian cancer. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1989;3(1):23-9.
91. Pickel H, Lahousen M, Stettner H, Girardi F. The spread of ovarian cancer. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1989;3(1):3-12.
92. Vinnitskaia VK. [Pathways of the lymphogenic spread of ovarian cancer]. *Pediatr Akus Ginekol* 1977(6):55-7. (Article in Ukrainian)
93. Tsuruchi N, Kamura T, Tsukamoto N, Akazawa K, Saito T, Kaku T, et al. Relationship between paraaortic lymph node involvement and intraperitoneal spread in patients with ovarian cancer--a multivariate analysis. *Gynecol Oncol* 1993;49(1):51-5.
94. Ivanov S. [Modern kind of treatment for ovarian tumors with low malignant potential/summarized our and foreign experience]. *Akush Ginekol (Sofia)* 2011;50(1):19-21. (Article in Bulgarian)

95. Soper JT. Management of early-stage epithelial ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37(2):423-38.
96. Cress RD, Bauer K, O'Malley CD, Kahn AR, Schymura MJ, Wike JM, et al. Surgical staging of early stage epithelial ovarian cancer: results from the CDC-NPCR ovarian patterns of care study. *Gynecol Oncol* 2011;121(1):94-9.
97. Bamias A, Karadimou A, Soupos N, Sotiropoulou M, Zagouri F, Haidopoulos D, et al. Prognostic factors for early-stage epithelial ovarian cancer, treated with adjuvant carboplatin/paclitaxel chemotherapy: a single institution experience. *Gynecol Oncol* 2011;123(1):37-42.
98. Huntsman DG, Gilks CB. Surgical staging of early stage epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011;122(2):460-1; author reply 461-2.
99. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(2):113-25.
100. Peiretti M, Zanagnolo V, Aletti GD, Bocciolone L, Colombo N, Landoni F, et al. Role of maximal primary cytoreductive surgery in patients with advanced epithelial ovarian and tubal cancer: Surgical and oncological outcomes. Single institution experience. *Gynecol Oncol* 2010;119(2):259-64.
101. Gerestein CG, Damhuis RA, Burger CW, Kooi GS. Postoperative mortality after primary cytoreductive surgery for advanced stage epithelial ovarian cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2009;114(3):523-7.
102. Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;61(4):413-20.
103. Schorge JO, Bradford LS, del Carmen MG. Primary cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer: is it the past, present, or future? *Clin Adv Hematol Oncol* 2011;9(12):912-8.
104. Gerestein CG, Eijkemans MJ, Bakker J, Elgersma OE, van der Burg ME, Kooi GS, et al. Nomogram for suboptimal cytoreduction at primary surgery for advanced stage ovarian cancer. *Anticancer Res* 2011;31(11):4043-9.

105. Schorge JO, Garrett LA, Goodman A. Cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer: quo vadis? *Oncology (Williston Park)* 2011;25(10):928-34.
106. Stefanovic A, Jeremic K, Kadija S, Milincic N, Mircic A, Petkovic S, et al. Intestinal surgery in treatment of advanced ovarian cancer--review of our experience. *Eur J Gynaecol Oncol* 2011;32(4):419-22.
107. Stoeckle E, Boubli B, Floquet A, Brouste V, Sire M, Croce S, et al. Optimal timing of interval debulking surgery in advanced ovarian cancer: yet to be defined? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;159(2):407-12.
108. Chereau E, Ballester M, Lesieur B, Selle F, Coutant C, Rouzier R, et al. [Complications of radical surgery for advanced ovarian cancer]. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;39(1):21-7. (Article in French)
109. Hoskins WJ, McGuire WP, Brady MF, Homesley HD, Creasman WT, Berman M, et al. The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(4):974-9; discussion 979-80.
110. Sakai K, Kajiyama H, Umezu T, Shibata K, Mizuno M, Suzuki S, et al. Is there any association between retroperitoneal lymphadenectomy and survival benefit in advanced stage epithelial ovarian carcinoma patients? *J Obstet Gynaecol Res* 2012.
111. Panici PB, Maggioni A, Hacker N, Landoni F, Ackermann S, Campagnutta E, et al. Systematic aortic and pelvic lymphadenectomy versus resection of bulky nodes only in optimally debulked advanced ovarian cancer: a randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(8):560-6.
112. Fagotti A, De Iaco P, Fanfani F, Vizzielli G, Perelli F, Pozzati F, et al. Systematic Pelvic and Aortic Lymphadenectomy in Advanced Ovarian Cancer Patients at the Time of Interval Debulking Surgery: A Double-Institution Case-Control Study. *Ann Surg Oncol* 2012.
113. Abe A, Furumoto H, Irahara M, Ino H, Kamada M, Naka O, et al. The impact of systematic para-aortic and pelvic lymphadenectomy on survival in patients with optimally debulked ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36(5):1023-30.

114. Kigawa J, Minagawa Y, Ishihara H, Kanamori Y, Itamochi H, Terakawa N. Evaluation of cytoreductive surgery with lymphadenectomy including para-aortic nodes for advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 1993;19(3):273-8.
115. Ozalp S, Yalcin OT, Dundar E, Hassa H, Yildirim A, Okur A. Second-look laparotomy; factors affecting the results and the prognosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999;20(5-6):398-402.
116. Chi DS, McCaughty K, Diaz JP, Huh J, Schwabenbauer S, Hummer AJ, et al. Guidelines and selection criteria for secondary cytoreductive surgery in patients with recurrent, platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2006;106(9):1933-9.
117. Onda T, Yoshikawa H, Yasugi T, Yamada M, Matsumoto K, Taketani Y. Secondary cytoreductive surgery for recurrent epithelial ovarian carcinoma: proposal for patients selection. *Br J Cancer* 2005;92(6):1026-32.
118. Scarabelli C, Gallo A, Carbone A. Secondary cytoreductive surgery for patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;83(3):504-12.
119. Eisenkop SM, Friedman RL, Spirtos NM. The role of secondary cytoreductive surgery in the treatment of patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2000;88(1):144-53.
120. Vergote I, de Wever I, Tjalma W, Van Gramberen M, Decloedt J, Van Dam P. Interval debulking surgery: an alternative for primary surgical debulking? *Semin Surg Oncol* 2000;19(1):49-53.
121. Tang MK, Zhou HY, Yam JW, Wong AS. c-Met overexpression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neoplasia* 2010;12(2):128-38.
122. Thigpen T, Vance R, Punecky L, Khansur T. Chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: current standards of care based on randomized trials. *Gynecol Oncol* 1994;55(3 Pt 2):S97-107.
123. Harries M, Gore M. Part II: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment of recurrent disease. *Lancet Oncol* 2002;3(9):537-45.

124. Vella N, Aiello M, Russo AE, Scalisi A, Spandidos DA, Toffoli G, et al. 'Genetic profiling' and ovarian cancer therapy (review). *Mol Med Report* 2011;4(5):771-7.
125. Pinato DJ, Graham J, Gabra H, Sharma R. Evolving concepts in the management of drug resistant ovarian cancer: Dose dense chemotherapy and the reversal of clinical platinum resistance. *Cancer Treat Rev* 2012.
126. Blackledge G, Lawton F, Redman C, Kelly K. Response of patients in phase II studies of chemotherapy in ovarian cancer: implications for patient treatment and the design of phase II trials. *Br J Cancer* 1989;59(4):650-3.
127. Hoskins WJ. Epithelial ovarian carcinoma: principles of primary surgery. *Gynecol Oncol* 1994;55(3 Pt 2):S91-6.
128. Zivanovic O, Barakat RR, Sabbatini PJ, Brown CL, Konner JA, Aghajanian CA, et al. Prognostic factors for patients with stage IV epithelial ovarian cancer receiving intraperitoneal chemotherapy after second-look assessment: results of long-term follow-up. *Cancer* 2008;112(12):2690-7.
129. Brun JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocke C. Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000;78(1):21-7.
130. Wen HW, Liu SW. [Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1994;29(4):235-7, 255. (Article in Chinese)
131. Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K. Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1990;75(2):263-73.
132. Chi DS, Liao JB, Leon LF, Venkatraman ES, Hensley ML, Bhaskaran D, et al. Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;82(3):532-7.
133. Capo-chichi CD, Cai KQ, Simpkins F, Ganjei-Azar P, Godwin AK, Xu XX. Nuclear envelope structural defects cause chromosomal numerical instability and aneuploidy in ovarian cancer. *BMC Med* 2011;9:28.
134. Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Okada S, Matsuura S, Hirohashi S. High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with

- nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA aneuploidy. *Jpn J Cancer Res* 1992;83(9):978-84.
135. Ozalp S, Yalcin OT, Gulbas Z, Tanir HM, Minsin T. Effect of cellular DNA content on the prognosis of epithelial ovarian cancers. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52(2):93-7.
136. Sjovall K, Silfversward C, Einhorn N. Ovarian cancer: the challenge of local tumor control and its impact on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12(4):567-71.
137. Ozalp S, Yalcin OT, Minsin TH. Expression of p53 in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;71(3):277-8.
138. Ozalp SS, Yalcin OT, Basaran GN, Artan S, Kabukcuoglu S, Minsin TH. Prognostic significance of deletion and over-expression of the p53 gene in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000;21(3):282-6.
139. Dijkgraaf EM, Welters MJ, Nortier JW, van der Burg SH, Kroep JR. Interleukin-6/interleukin-6 receptor pathway as a new therapy target in ovarian cancer. *Curr Pharm Des* 2012.
140. Zhu JL, Zhang GL, Lu HJ. CD24, COX-2, and p53 in epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:2745-51.
141. Sadlecki P, Walentowicz-Sadlecka M, Szymanski W, Grabiec M. [Comparison of VEGF, IL-8 and beta-FGF concentrations in the serum and ascites of patients with ovarian cancer]. *Ginekol Pol* 2011;82(7):498-502. (Article in Polish)
142. Ozalp S, Tanir HM, Yalcin OT, Kabukcuoglu S, Oner U, Uray M. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003;24(5):417-20.
143. Spinella F, Rosano L, Elia G, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 stimulates cyclooxygenase-2 expression in ovarian cancer cells through multiple signaling pathways: evidence for involvement of transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44 Suppl 1:S140-3.
144. Khanna N, Singh N. Role of caspases in apoptosis and disease. *Indian J Physiol Pharmacol* 1999;43(2):151-9.
145. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.

146. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
147. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278(5336):294-8.
148. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1):42-9.
149. Kiefer W, Dannhardt G. Novel insights and therapeutical applications in the field of inhibitors of COX-2. *Curr Med Chem* 2004;11(24):3147-61.
150. Liu H, Xiao J, Yang Y, Liu Y, Ma R, Li Y, et al. COX-2 expression is correlated with VEGF-C, lymphangiogenesis and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Microvasc Res* 2011;82(2):131-40.
151. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, Lauriola L, Poerio A, Zannoni GF, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemoradiation plus surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(1):21-7.
152. Menczer J. Cox-2 expression in ovarian malignancies: a review of the clinical aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146(2):129-32.
153. Menczer J, Schreiber L, Kravtsov V, Berger E, Golan A, Levy T. Cox-2 immunohistochemical expression in epithelial ovarian carcinoma and platin sensitivity. *Eur J Gynaecol Oncol* 2009;30(5):531-5.
154. Athanassiadou P, Grapsa D, Athanassiades P, Gonidi M, Athanassiadou AM, Tsipis A, et al. The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. *Pathol Res Pract* 2008;204(4):241-9.
155. Barnes AP, Miller BE, Kucera GL. Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2007;104(2):443-50.
156. Bamias A, Pignata S, Pujade-Lauraine E. Angiogenesis: A promising therapeutic target for ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012.
157. Schmitt J, Matei D. Targeting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2012;38(4):272-83.

158. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60(2):203-12.
159. Tempfer C, Obermair A, Hefler L, Haeusler G, Gitsch G, Kainz C. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;92(3):360-3.
160. Sowter HM, Corps AN, Evans AL, Clark DE, Charnock-Jones DS, Smith SK. Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Lab Invest* 1997;77(6):607-14.
161. Shan B, Gerez J, Haedo M, Fuertes M, Theodoropoulou M, Buchfelder M, et al. RSUME is implicated in HIF-1-induced VEGF-A production in pituitary tumour cells. *Endocr Relat Cancer* 2012;19(1):13-27.
162. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3):311-22.
163. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol* 2003;123(3):377-82.
164. Dahmoun M, Boman K, Cajander S, Westin P, Backstrom T. Apoptosis, proliferation, and sex hormone receptors in superficial parts of human endometrium at the end of the secretory phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1737-43.
165. Ioffe OB, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum Pathol* 1998;29(10):1150-9.
166. Buchynska LG, Nesina IP, Kashuba EV. Different trends of p53, MDM2 and p14 ARF expression patterns in endometrial adenocarcinomas versus hyperplasia. *Exp Oncol* 2007;29(4):287-94.
167. Buchynska LG, Nesina IP, Yurchenko NP, Bilyk OO, Grinkevych VN, Svintitsky VS. Expression of p53, p21WAF1/CIP1, p16INK4A and Ki-67 proteins in serous ovarian tumors. *Exp Oncol* 2007;29(1):49-53.

168. Luo X, Fan S, Huang W, Zhai S, Ma Z, Li P, et al. Downregulation of IRS-1 promotes metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2012;28(2):659-67.
169. Reiss K, Del Valle L, Lassak A, Trojanek J. Nuclear IRS-1 and cancer. *J Cell Physiol* 2012;227(8):2992-3000.
170. Ju J, Lu G, Lambert JD, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin Cancer Biol* 2007;17(5):395-402.
171. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003;133(10):3275S-84S.
172. Liao S. The medicinal action of androgens and green tea epigallocatechin gallate. *Hong Kong Med J* 2001;7(4):369-74.
173. Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:25-54.
174. Ellinger S, Muller N, Stehle P, Ulrich-Merzenich G. Consumption of green tea or green tea products: is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? *Phytomedicine* 2011;18(11):903-15.
175. Kravchenko LV, Trusov NV, Aksenov IV, Avren'eva LI, Guseva GV, Lashneva NV, et al. [Effects of green tea extract and its components on antioxidant status and activities of xenobiotic metabolizing enzymes of rats]. *Vopr Pitan* 2011;80(2):9-15. (Article in Russian)
176. Forester SC, Lambert JD. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(6):844-54.
177. Erba D, Riso P, Colombo A, Testolin G. Supplementation of Jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. *J Nutr* 1999;129(12):2130-4.
178. Herbert V. Prooxidant effects of antioxidant vitamins. Introduction. *J Nutr* 1996;126(4 Suppl):1197S-200S.
179. Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol* 2003;66(9):1769-78.

180. Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 2003;133(10):3262S-3267S.
181. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med* 2003;14(8):459-469.
182. Masuda M, Suzui M, Lim JT, Deguchi A, Soh JW, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol* 2002;2(6):350-9.
183. Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, et al. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J Nutr* 2002;132(8):2307-11.
184. Xu H, Becker CM, Lui WT, Chu CY, Davis TN, Kung AL, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. *Fertil Steril* 2011;96(4):1021-8.
185. Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, et al. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;84(6):844-50.
186. Maiti TK, Chatterjee J, Dasgupta S. Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308(1):64-7.
187. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papatsoris AG, Papavassiliou AG. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1156-68.
188. Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308(2):767-73.
189. Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of

- matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J Oral Pathol Med* 2007;36(10):588-93.
190. Isemura M, Saeki K, Minami T, Hayakawa S, Kimura T, Shoji Y, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases by tea catechins and related polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:629-31.
191. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(12):979-87.
192. Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM. Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr* 2003;133(10):3268S-3274S.
193. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(24):1881-6.
194. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 2006;66(5):2500-5.
195. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 2003;22(31):4851-9.
196. Ayhan A, Taskiran C, Yigit-Celik N, Bozdog G, Gultekin M, Usubutun A, et al. Long-term survival after paclitaxel plus platinum-based combination chemotherapy for extraovarian peritoneal serous papillary carcinoma: is it different from that for ovarian serous papillary cancer? *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(2):484-9.
197. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 1983;43(11):5379-89.
198. Kim YW, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, Lee BR, et al. Activity of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate against ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res Treat* 2004;36(5):315-23.
199. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13(8):795-808.

200. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44(9):959-68.
201. Rao SD, Pagidas K. Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2010;30(7):2519-23.
202. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, Lee IP, Lee JM, Namkoong SE, et al. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol* 2003;22(3):217-24.
203. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem* 1999;75(1):1-12.
204. Hsuw YD, Chan WH. Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1095:428-40.
205. Islam S, Islam N, Kermodé T, Johnstone B, Mukhtar H, Moskowitz RW, et al. Involvement of caspase-3 in epigallocatechin-3-gallate-mediated apoptosis of human chondrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(3):793-7.
206. Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26(5):958-67.
207. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene* 2004;23(14):2507-22.
208. Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther* 2005;4(1):81-90.

209. Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K. Dual function of (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Lett* 2006;241(2):250-5.
210. Lambert JD, Kennett MJ, Sang S, Reuhl KR, Ju J, Yang CS. Hepatotoxicity of high oral dose (–)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food Chem Toxicol* 2010;48(1):409-16.
211. Wang Q, He Z, Gao J, Hu S, Huang M, Liu M, et al. S100P sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and paclitaxel in vitro. *Cancer Lett* 2008;272(2):277-84.
212. He Z, Gao J, Wang Q, Liu M, Li Y, Li X, et al. S100P contributes to chemosensitivity of human ovarian cancer cell line OVCAR3. *Oncol Rep* 2008;20(2):325-32.
213. Teoh D, Ayeni TA, Rubatt JM, Adams DJ, Grace L, Starr MD, et al. Dasatinib (BMS-35482) has synergistic activity with paclitaxel and carboplatin in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2011;121(1):187-92.
214. Luo T, Wang J, Yin Y, Hua H, Jing J, Sun X, et al. (–)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2010;12(1):R8.

