



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANA BİLİM DALI

**PAKLİTAKSEL VE SİSPLATİN KEMOTERAPİSİNİN  
RATLARDA NEDEN OLDUĞU OVARYAN HASARIN  
GnRH ANALOGU KULLANILARAK  
ÖNLENEBİLİRLİĞİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. M. ÇAĞDAŞ TÜRKYILMAZ**

KAYSERİ-2008



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANA BİLİM DALI

**PAKLİTAKSEL VE SİSPLATİN KEMOTERAPİSİNİN  
RATLARDA NEDEN OLDUĞU OVARYAN HASARIN  
GnRH ANALOGU KULLANILARAK  
ÖNLENEBİLİRLİĞİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. M. ÇAĞDAŞ TÜRKYILMAZ**

DANIŞMAN

**Doç. Dr. BÜLENT ÖZÇELİK**

KAYSERİ-2008

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yapılmasında emeğini esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. Bülent Özçelik'e, yardımlarından dolayı Prof. Dr. Saim Özdamar, Yard. Doç. Dr. Tuncay Özgün, Dr. Tolga Atakul, Dr. Gönül Erkan ve biyoistatistik uzmanı Ahmet Öztürk'e ayrıca emeği geçen tüm hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan eőim, küçük Alp ve aileme teşekkür ederim.

Dr. M. Çağdaş Türkyılmaz

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
KISALTMALAR .....	iii
TABLO LİSTESİ .....	iv
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	viii
GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
OVER FİZYOLOJİSİ.....	3
FOLLİKÜLER GELİŞİM EVRELERİ.....	4
GONODOTROPİN SALGILATICI HORMON VE ANALOGLARI .....	5
KEMOTERAPOTİK AJANLAR VE OVARYAN SİTOTOKSİSİTE .....	7
GnRH ANALOGLARININ OVERLERİ KEMOTERAPOTİK AJANLARIN HASARINDAN KORUMADAKİ YERİ .....	10
GnRH ANALOGLARI VE OVER KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ÖNEMİ .	12
PAKLİTAKSEL.....	13
SİSPLATİN .....	13
MATERYAL METOT .....	14
BULGULAR .....	20
TARTIŞMA.....	25
SONUÇLAR .....	32
KAYNAKLAR.....	33
TEZ ONAY SAYFASI .....	40

## KISALTMALAR

**GnRH:** Gonadotropin salgılatıcı hormon

**GnRH<sub>a</sub>:** Gonadotropin salgılatıcı hormon analogları

**FSH:** Follikül stimüle edici hormon

**LH:** Luteinize edici hormon

**PMF:** Primordial follikül

**PF:** Primer follikül

**SF:** Sekonder follikül

**TF:** Tersiyer follikül

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> Kemoterapik ajanların tipi ve toksisite derecesi .....	9
<b>Tablo 2:</b> Grupların dağılımı .....	15
<b>Tablo 3:</b> Kontrol grubununa göre tüm tedavi alan grupların follikül sayılarının değerlendirilmesi .....	20
<b>Tablo 4:</b> PMF, PF, SF, TF açısından tüm grupların birbirleriyle karşılaştırılması.	22

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1:</b> Primordial follükülün görünümü.....	17
<b>Şekil 2:</b> Primer follükülün görünümü .....	17
<b>Şekil 3:</b> Sekonder follükülün görünümü.....	18
<b>Şekil 4:</b> Tersiyer follükülün görünümü.....	18
<b>Şekil 5:</b> Kontrol grubu ile tedavi grupları arasında follükül sayılarının ortalama standart sapma değerlerinin grafiksel gösterimi.....	21

# PAKLİTAKSEL VE SİSPLATİN KEMOTERAPİSİNİN RATLARDA NEDEN OLDUĞU OVARYAN HASARIN GnRH ANALOGU KULLANILARAK ÖNLENEBİLİRLİĞİ

## ÖZET

**AMAÇ:** Bu çalışmanın amacı paklitaksel ve sisplatin tedavisi sırasında gonadotropin salgılatıcı hormon agonistinin (leuprolide asetat) ovaryan follikülleri korumadaki koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

**MATERYAL VE METOT:** Ratlar randomize olarak her grup 10 rat içerecek şekilde 7 gruba ayrıldı; kontrol (grup 1), 7,5 mg/kg paklitaksel tek doz (grup 2), 5mg/kg sisplatin tek doz (grup 3), 7,5 mg/kg paklitaksel ve 5 mg/kg sisplatin tek doz (grup 4), 7,5 mg/kg paklitaksel tek doz ve 2,5 µg leuprolide asetat/gün (grup 5), 5mg/kg sisplatin tek doz ve 2,5 µg leuprolide asetat/gün (grup 6), 7,5 mg/kg paklitaksel ve 5 mg/kg sisplatin tek doz ve 2,5 µg leuprolide asetat/gün (grup 7). GnRHa içeren gruplardaki ratlara (grup 5, 6, 7) kemoterapi öncesi anovulasyon elde edebilmek için 4 hafta boyunca günlük leuprolid asetat uygulandı. Kemoterapi uygulanmasından 1 hafta sonra ratlar sakrifiye edilerek folliküller primordial, primer, sekonder, tersiyer follikül şeklinde histolojik olarak sınıflandırıldı. Tedavi gruplarındaki follikül sayıları kontrol grubu ve kendi aralarında karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz Tukey ve Tanhane testleri ile yapıldı ve çalışmanın gücü 0.99 olarak tespit edildi.

**SONUÇLAR:** Kontrol grubuna göre grup 5'deki primordial, primer, tersiyer follikül sayıları ile grup 2 ve grup 3'deki tersiyer follikül sayılarında azalma yok iken ( $p>0.05$ ) diğer tedavi gruplarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. ( $p<0.001$ ). Grupların kendi aralarında karşılaştırmalarında, grup 2'deki primordial follikül sayısı kontrol grubuna göre kemoterapötik ajandan etkilenmemiş olarak görülmesine rağmen, grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma mevcuttu.



**TARTIŞMA:** Tek ajan paklitaksel ile birlikte uygulanan GnRHa tedavisi, ovaryan folliküler rezervin önemli bir bölümünü oluşturan primordial folliküllerin azalmasını engelleyerek, gelecekte fertilité arzusu olan hastaların tedavisinde uygun bir seçenek olabilir. Bu ön çalışma umut verici olup randomize kontrollü çalışmalarla desteklenmelidir.

**Anahtar kelimeler:** GnRH analogu, ovaryan folliküller, paklitaksel, sisplatin

**PREVENTION OF PACLITAXEL AND CISPLATIN INDUCED OVARIAN  
DAMAGE IN  
RATS BY A GONADOTROPHIN RELEASING HORMONE AGONIST**

**ABSTRACT**

**AIM:** The purpose of this study was to evaluate the protective effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist (leuprolide acetat) on the prevention of ovarian follicles during the treatment with paclitaxel and cisplatin.

**MATERIALS AND METHODS:** Animals were randomly assigned to seven groups each consisting of 10 rats and studied: control (group 1), 7,5 mg/kg paclitaxel single dose (group 2), 5 mg/kg cisplatin single dose (group 3), 7,5 mg/kg paclitaxel and 5 mg/kg cisplatin single dose (group 4), 7,5 mg/kg paclitaxel single dose and 2,5 µg leuprolide acetate daily (group 5), 5 mg/kg cisplatin single dose and 2,5 µg leuprolide acetate daily (group 6), 7,5 mg/kg paclitaxel and 5 mg/kg cisplatin single dose and 2,5 µg leuprolide acetate daily (group 7). The animals in GnRH $\alpha$  groups (group 5,6,7) also received daily leuprolide acetate for four weeks prior to chemotherapy to achieve anovulation. Animals were sacrificed after 1 week of the administration of chemotherapeutics and follicles were histologically classified as primordial, primary, secondary and tertiary follicles. Follicular numbers of treatment groups with or without anovulatory agent were compared with control and each other's. Statistical analysis was made using Tukey and Tanhane tests and the power of the study was 0.99.

**RESULTS:** The number of primordial, primary and tertiary follicles in group 5 and tertiary follicles in groups 2 and 3 also were not decreased ( $p>0.05$ ) while there was a significant decrease in other treatment groups compared to the control ( $p<0.001$ ). In the comparisons between groups, although the numbers of primordial follicle in group 2 seemed not affected from chemotherapeutic agent according to control, there was a significant decrease when compared with group 5.

**CONCLUSION:** Paclitaxel monotherapy together with GnRHa treatment may be an appropriate protocol in patients, who deserve further fertility, in the prevention of decrease in primordial follicles as an important part of the ovarian follicular reserve. The results of our preliminary study are promising and needs further elucidation in randomized controlled trials.

**Keywords:** Cisplatin, GnRH analog, ovarian follicles, paclitaxel

## GİRİŞ-AMAÇ

Kombine kemoterapi rejimlerinin kullanımı ve geliştirilmesi lenfoma, lösemi, koryokarsinom, meme ve over kanseri gibi tümörlerde hastaların ortalama sağ kalım sürelerini uzatarak yaşam kalitelerinin anlamlı derecede artmasına neden olmuştur. Bu kanserlerin birçoğunun reproduktif yaş grubunda ortaya çıktığı ve tedaviyle birlikte hastaların sağ kalım sürelerinde uzadığı göz önünde bulundurulursa, hastaların önemli bir bölümü prematür ovaryan yetmezlik ve infertilite gibi kemoterapinin neden olduğu uzun dönem komplikasyonlarla karşı karşıya gelmeye başlamıştır. Kemoterapi sonrası düzenli adet görme yada normal reproduktif fonksiyonların devam etmesi, tedavinin etkili olmadığı ve over rezervinin etkilenmediği anlamına gelmemelidir (1). Kemoterapi sonrası ovaryan hasarı belirlemede reproduktif performans önemli değildir. En önemli parametre follikül havuzunun en önemli bölümünü oluşturan primordial folliküllerin sayısıdır (2).

Epitelyal over kanserleri sıklıkla postmenopozal dönemde ortaya çıkmakta ve hastalar ileri evrede tanı almaktadır. Teşhis edildiği zaman epitelyal over kanserli hastaların % 3–17'si 40 yaşın altındadır. Tüm evre 1 epitelyal over kanserlerinin % 7-8'i 35 yaşın altındadır ve bu hastaların birçoğu fertilitésinin korunmasını istemektedir (3). Cerrahi evreleme ile birlikte yapılan optimal sitoredüksiyon ve sisplatin tabanlı adjuvan kemoterapi uygulaması over kanserinin standart tedavisini oluşturmaktadır. Ancak erken evre seçilmiş hasta gruplarında, iyi bir cerrahi evreleme ile birlikte, sağ kalım oranı ve prognozu etkilemeksizin, fertilité koruyucu cerrahi uygulanabilmektedir (4). Fertilité koruyucu cerrahi uygulanan evre 1a grade 2–3 yada kapsül invazyonu olan hastalarla, evre 1c tek overe sınırlı tümörü olan ve periton sitolojisi pozitif olan hastalara sisplatin tabanlı adjuvan kemoterapi uygulanması gerekmektedir (5).

Fertilite koruyucu cerrahi uygulanan hastalara postoperatif başlanan sisplatin tabanlı kemoterapiler ovaryan yetmezliğe neden olup hastaların gelecekteki fertilitelerini olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Görüldüğü gibi fertilite koruyucu cerrahi uygulanıp tek over bırakılsa bile uygulanan kemoterapilerle hastalar prematür ovaryan yetmezlik ve infertilite gibi problemlerle karşı karşıya kalacaktır. Böylelikle bu hastaların sağ kalım sürelerini ve tedavi sonuçlarını olumsuz yönde etkilemeden over fonksiyonlarını ve gelecekteki fertilitelerini koruyucu tedaviler son zamanlarda ön plana çıkmaya başlamış ve birçok klinisyen hastaların fertilitelerini göz önünde bulundurarak bu tip tedavileri hastalara teklif etmeye başlamışlardır. Pek çok kanser türünde, uygulanan kemoterapilerle meydana gelen ovaryan yetmezliği engellemek için yeni tedavi modaliteleri geliştirilmeye başlanmıştır. Günümüzde oosit donasyonu, embriyo dondurulması ve in vitro fertilizasyon uygulamaları prematür ovaryan yetmezlik gelişme riski yüksek olan hastalarda tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Ancak daha basit, ucuz ve non-invaziv bir uygulama olan ve reversible medikal kastrasyon sağlayan gonadotropin salgılatıcı hormon analogları (GnRHa) ile ovaryan baskılama yapılarak, kemoterapinin over üzerine yapmış olduğu sitotoksik etki engellenebilmektedir.

Paklitaksel ve sisplatin kemoterapisinin tek başına kullanımı ovaryan rezervin önemli bir bölümünü oluşturan primordial follikülleri hasara uğrattığı rat çalışmalarında gösterilmesine rağmen kombine olarak uygulanan bu iki kemoterapotik ajanın hem primordial hem de matür folliküller üzerine olan etkileri literatürde ilk olarak bu çalışmada incelenmiş ve yine ilk olarak bu çalışmada paklitaksel ve sisplatin kemoterapisinin over üzerinde yapmış olduğu sitotoksik etkilerin bir GnRH analogu olan leuprolid asetat ile engellenip engellenemeyeceğinin rat modeli kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **OVER FİZYOLOJİSİ**

Kemoterapinin overler üzerine olan etkisini daha iyi anlayabilmek için over fizyolojisini iyi bilmek gerekmektedir. Primordial germ hücreleri konsepsiyondan 4 hafta sonra vitellus kesesi içinde allantoise komşu alanlarda farklılaşmaya başlar ve yaklaşık 6. hafta sonunda gelişmekte olan gonadlara ulaşır ve primer seks kordonlarının içine sokulurlar. Primordial germ hücreleri 7. hafta sonunda mitoz ile bölünmeye başlar ve oogonyum adını alır. Böylece ortada bir oogonyum ve onu çevreleyen tek sıralı yassı epitel hücrelerinden oluşan primordial folliküller oluşur. Mitoz devam ederken primordial folliküllerden bazıları irileşerek primer oositleri oluşturur ve 1. mayoz bölünmeye başlarlar. Oogonyumlar 20. haftanın sonlarına kadar bölünmeye devam ederler. Bu dönemde sayıları pik yapar ve 6–7 milyona kadar ulaşır. Bu dönemden sonra hem oogonyumlarda hem de oluşmuş primer oositler içinde atrezi başlamaktadır.

Doğumda follikül sayısı ortalama 700.000–2.000.000 arasındadır. Doğumdan sonra puberteye kadar bu oositlerin büyük çoğunluğu atretik olmaya devam etmektedir. Puberte başlangıcında ovaryumlarda 400.000 civarında follikül bulunduğu zannedilmektedir. Reprodüktif yaşam boyunca bunlardan yalnızca 500–600 tanesi olgunlaşıp ovulasyona gidecektir. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde atretik folliküler haline gelir. Doğumdan önce primordial folliküllerin içlerindeki tüm oogonyumlar 1.mayoz bölünmenin profaz safhasına girip primer oositlere dönüşürler

ve dinlenme dönemine geçerek beklerler. Puberte ile birlikte gonadotropik hormonların aktif hale geçmesi ovaryan siklusları başlatmakta ve her ay 5–15 arasında primordial follikül olgunlaşmaktadır. Böylece ovaryumlarda her  $28 \pm 7$  günde bir tekrarlanan, folliküllerin gelişip olgunlaşmasını, ovulasyon ve korpus luteum oluşumunu içine alan sikluslar başlamaktadır (6).

### **FOLLİKÜLER GELİŞİM EVRELERİ**

Overlerde folliküler gelişim, primordial follikülden, primer follikül, sekonder follikül = pre-antral follikül, erken antral ve pre-ovulatuvar = antral follikül = graafian follikül = tersiyer follikül dönemlerine kadar olan morfolojik ve histolojik değişimleri kapsamaktadır. Bir ovaryum follikülünün gelişmesi ortalama 4 evrede olmaktadır. Bu evreler, primer oositin büyümesi ve farklılaşması, follikül hücrelerinin çoğalması, zona pellusida oluşumu ve teka follikülü denilen bağ dokusu kapsülün gelişmesini kapsamaktadır (7). Primordial folliküllerin çevresi tek kat mekik şeklinde granüloza hücresi ile çevrilidir. Folliküler gelişimin ilk evresi olan bu folliküller inaktifirler ve puberteden önce bulunan tek follikül tipidir. Oosit nükleusunun çapı  $19 \mu\text{m}$ 'den küçük olan bu primordial folliküller dinlenme fazında olan folliküllerdir (8). Primordial folliküllerde, follikül stimüle edici hormon (FSH) reseptörü olmadığından, dinlenme fazındaki folliküllerin aktivasyonunda tek başına FSH'nin rolü bulunmamaktadır. Folliküllerin aktifleşmesinde granüloza hücrelerinden lokal olarak salınan birçok faktörün rolü olduğu düşünülmektedir.

Folliküller aktif faza geçip büyümeye başladıklarında, oosit 2–3 kat büyür ve granüloza hücre proliferasyonu ile birlikte oositin çevresinde 2–3 kat granüloza hücresi oluşur. Bu dönemdeki follikül primer follikül adını alır (9). Gelişme devam ettikçe over follikülünün büyümesi sırasında, primer folliküldeki granüloza hücreleri de tabakalar halinde çoğalır. Granüloza hücrelerinin etrafında zona pellusida belirginleşmeye başlar. Zona pellusida, granüloza hücreleri tarafından sentezlenen ve yüzeyinde sperm reseptörleri taşıyan glikoprotein yapıda bir kılıftır. Bu kılıf ovumun birden fazla sperm tarafından döllenesini önler. Bu safhadaki oositin içinde geniş germinal vezikül seçilir hale gelir. Çevresinde 600 civarında granüloza hücresi bulunan 110–120 milimikron çaplı bu pre-antral folliküle sekonder follikül de denmektedir (10). Bu döneme kadar folliküler büyüme gonadotropinlerden bağımsız olup, gelişim lokal intraovaryan büyüme faktörleri ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Daha sonra gelişen antral folliküllerde büyüme artık gonadotropinlerin etkisi altına

girmektedir. Granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu bir boşluk (antrum) oluşur ve folliküler sıvı birikimi başlar. Bu evre sırasında, follikül hücreleri arasında görülen boşluklar (Call-Exner cisimleri) sıvı (liquor folliculi) ile dolmaya başlar. Bu boşluklar birbirleriyle birleşerek antrum adı verilen tek bir boşluk yapar ve erken antral follikülü oluştururlar.

Yine bu evrede teka follikülü 2 tabaka oluşturmaktadır. Bunlardan teka interna, bol miktarda agranüler endoplazmik retikulum ile steroid sentezleyen kübik hücrelerden oluşur ve bol miktarda kan damarı içerir. Diğer tabaka olan teka externa ise başlıca vasküler bağ dokusundan oluşmaktadır. Follikül büyümeye devam ettikçe çevresindeki stromada bu iki tabaka gittikçe belirginleşir. Sekonder follikül içerisinde oosit yavaş yavaş büyümeye devam ederken yapı bir vezikül haline gelmektedir. Ovulasyondan hemen önceki bu evrede, antrum giderek büyür. Oosit follikülün bir tarafına çekilir ve etrafını birkaç sıra follikül hücresi (corona radiata) çevreler. Bu yapı, cumulus oophorus denilen bir kaide üzerine oturur. Oosit, granüloza hücrelerinden oluşan cumulus oophorus içinde yer alır ve follikül çapı 16–20 mm büyüklüğünde olup pre-ovulatuvar follikül=antral follikül= tersiyer follikül adını alır (11).

### **GONADOTROPİN SALGILATICI HORMON VE ANALOGLARI**

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), gonadotropin sekresyonunu kontrol eden en önemli faktördür. Hipotalamusta nükleus arkuatus içinde bulunan nöronlar tarafından üretilen bir dekaeptiddir. Normal menstruel siklusun devamlılığı için hipotalamustan pulsatil olarak salgılanan GnRH ile hipofizden follikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salgılanmasının uyarılması yapılmaktadır. Pulsatil olarak salınımdan farklı olarak devamlı salınımı ile down regülasyon elde edilerek, hipofizden gonadotropinlerin salgılanması azalmakta ve östrojen seviyeleri prepubertal ve menopozal seviyelere kadar çekilmektedir.

İnsanda günümüze kadar 3 tip GnRH izole edilmiş olup, bunlardan GnRH tip 1'in fonksiyonları tam olarak ortaya çıkarılmıştır (12). GnRH tip 1 hipotalamusta diensefalon tarafından sentezlenip aksonlar tarafından pulsatil biçimde hipofizer portal sisteme salınmaktadır. GnRH reseptörleri GnRH'nin bağlandığı bir ekstrasellüler parça içermekte ve bu transmembranal parça ile G-proteinin bağlandığı intrasellüler kısma bağlanmaktadır. GnRH tip 1 reseptör geni 4. kromozomun kısa



kolunda ve tip II reseptör geni 1. kromozomun kısa kolunda gösterilmiştir (13). GnRH'nin klasik GnRH reseptörüne bağlanması (tip I) gonadotropik hücrelerde aktivasyona neden olmakta ve G-proteini stimülasyonu ile inozitol 4,5 trifosfat ve diaçilgliserol aktivasyonuna neden olarak protein kinaz C salgılanmasını başlatmaktadır. Bu olay  $Ca^{+2}$  iyonlarının intrasellüler havuza boşalmasını ve FSH ile LH'nin salgılanmasını başlatmaktadır. Tip II reseptör sinyal mekanizması halen net olarak anlaşılamamıştır.

GnRH hızlı proteolitik yıkımı nedeniyle çok kısa bir yarılanma ömrüne sahip olduğundan (2–4 dak.), sürekli olarak pulsatil şekilde salgılanması gereklidir. Gonadotropin salgılatıcı hormon analogları in vivo koşullarda gonadotropin salgılatıcı hormon gibi davranmakta ve hem FSH ve hem LH sekresyonunu hipofizer gonadotropik hücrelerden indüklemektedir. Klinikte kullanılan GnRH agonistleri (GnRHa) orjinal molekülün reseptör afinitesini artırmak ve yıkımını azaltmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu nedenle kullanıldıklarında GnRH reseptörleri sürekli olarak GnRH'a maruz kalıyormuş gibi devamlı aktif olmakta ve gonadotropin sekresyonunu supresyona uğratmaktadır.

Gonadotropinlerde başlangıçta bir yükselme (flare up) ve ardından sekresyonda şiddetli bir azalma olmaktadır. Gonadotropinlerde başlangıçta görülen yükselme, reseptöre bağlanma ve aktivasyonunun sonucunda hipofizdeki depoların serbest bırakılmasına bağlıdır. Bu flare up etki ortalama 24-48 saat sürmekte ve daha sonra down regülasyon oluşmaktadır (14). Reseptörlerin uyarılmaya devam edilmesiyle birlikte oluşan down regülasyon sonucu reseptör sayısı azalmakta ve bu azalma gonadotropin sekresyonunun azalmasına, serum östrojen seviyelerinin menopozal düzeylere inmesine ve hipoöstrojenik bir ortam oluşmasına neden olmaktadır. Bu olaya medikal ooferektomi adı verilmektedir. Bu hipogonadotropik ortam GnRHa kullanımından ortalama 2–3 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. En önemli avantajı reversible olması ve ilacın kesilmesiyle menstruel fonksiyonların geri dönmesidir.

## **KEMOTERAPOTİK AJANLAR VE OVARYAN SİTOTOKSİSİTE**

Kemoterapotik ajanlar bir yandan tümöral dokuları yok ederken bir yandanda over gibi çoğalan hücrelerin germinal epitelinde hasara neden olmaktadır. Sitotoksik ajanların kemik iliği ve timus gibi hızlı bölünen hücrelerde yapmış olduğu hasar reversible iken rejenerasyon yeteneği olmayan primordial follüküllerde yapmış olduğu hasar progresif ve irreversible'dir. Bu nedenle ovaryan follüküllerin hasara uğraması prematür ovaryan yetmezliğe ve infertiliteye neden olmaktadır. Kemoterapi sonrası ovaryan hasarı belirlemede reproduktif performans önemli değildir. En önemli parametre primordial follüküllerin sayısıdır (15, 16).

Primordial follüküllerde meydana gelen kemoterapiye bağlı olan azalmanın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak kemoterapi sonrası oluşan ovaryan yetmezliğe neden olan 2 mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlardan ilk ve en önemli basamağı oositlerin apoptozisi oluşturmaktadır. İn vitro yapılan çalışmalarda paklitaksel kullanımının, follüküllerin en önemli komponenti olan granüloza hücrelerinde apoptozisi indüklediği ve primordial follükülerde destrüksiyona neden olduğu gösterilmiştir (17).

Paklitaksel aynı zamanda matür oositlerde mayotik maturasyonda gecikmeye ve iğ defektlerine neden olup, anoploid oositlerin oluşumuna neden olmakta ve ovaryan follükül sayısını azaltmaktadır (18). Histolojik çalışmalar kemoterapinin damar duvarlarında diffüz hyalinizasyon oluşturarak lümen içinde daralma ve diffüz kortikal fibrozis meydana getirerek overlerde atrofiye neden olduğunu ve primordial follükül sayısını anlamlı derecede azalttığını göstermiştir (19). Kemoterapinin neden olduğu amenore hastanın yaşına, kullanılan kemoterapotik ajanın tipine, uygulama dozu ve uygulama biçimine bağlıdır. Uygulama süresi ve uygulama yolu ise bağımsız faktörler olarak bilinmektedir (20 – 23).

### **Hastanın yaşı**

Yaşlı hastalarda genç hastalara göre ovaryan yetmezlik gelişme riski çok yüksektir. Bu olay yaşla birlikte azalan primordial follükül rezervine bağlıdır. Yaşla birlikte ovaryan rezervin azalması ileri yaştaki hastaların kemoterapotik ajanların toksik etkilerine karşı daha hassas hale gelmesine neden olmaktadır. Özellikle genç hastalarda ovaryan rezerv daha fazla olup kemoterapi ile birlikte follükül havuzunda meydana gelen kayıplar kolaylıkla tolere edilebilmektedir. Kısa dönem içerisinde

ovaryan fonksiyonlar etkilenmeyebilir. Ancak uzun vadede prematür ovaryan yetmezlik gelişeceği aşikârdır (24, 25).

Siklofosfamid kullanımı ile 40 yaşından önce prematür ovaryan yetmezlik gelişme riski % 35 iken, 40 yaşından sonra uygulanımı ile ovaryan yetmezlik gelişme riski % 80'lere kadar yükselmektedir (26). Bu nedenle uygulanacak herhangi bir kemoterapotik ajanın 40 yaşından sonra uygulanımı zaten azalmış olan folliküler havuzun daha fazla etkilenmesine neden olarak hastalarda daha kısa sürede ovaryan yetmezlik gelişimine neden olacaktır.

### **Kemoterapinin tipi**

Kemoterapinin meydana getirdiği amenore gelişimine neden olan diğer önemli bir faktör ise kullanılan kemoterapotik ajanların tipidir. Reprodüktif fonksiyonları önemli derecede etkilediği bilinen en önemli grup alkilleyici ajanlardır. Alkilleyiciler follikül sayısını belirgin olarak azaltmakta ve overde fibrozise neden olmaktadır. Siklofosfamid ve diğer alkilleyici ajanlar overe en toksik olan ajanlardır ve artan dozlarla birlikte primordial follikül sayısını anlamlı oranda azaltmaktadırlar.

Alkilleyici ajanlar hücre sikluslarına spesifik olmayan ajanlar olduğu için primordial follikül sayısını azaltmaktadır (27,28). Ancak metotreksat ve 5-flouraurasil gibi anti-metabolitler hücre sikluslarına spesifik oldukları için ovaryan rezerv üzerine herhangi bir yan etkileri bulunmamaktadır (tablo 1) (29). Diğer kemoterapotiklerle karşılaştırıldığında bir alkilleyici ajan olan siklofosfamid içeren rejimler 4 kat daha kısa sürede ovaryan yetmezliğe neden olmaktadır. Hastaların yaklaşık % 77'sinde 1 yıl içinde ovaryan yetmezlik gelişmektedir.

Sisplatin folliküller üzerine orta derecede sitotoksik etki gösterirken paklitakselin risk sınıflaması tam olarak belirlenememiştir (tablo 1). Ancak Gücer ve arkadaşları (30) matür ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada paklitakselin artan dozlarda kullanımının primordial folliküller üzerinde daha fazla sitotoksik etki yaptığını tespit etmişlerdir Yücebilgin ve arkadaşları (16) da hem paklitakselin hemde sisplatinin tek başına uygulanmasının ratlarda primordial folliküller üzerinde sitotoksik etki yaptığını ancak her iki grup arasında primordial follikül sayısını azaltma açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermişlerdir

**Tablo 1. Kemoterapotik ajanların tipi ve toksisite derecesi**

<b>YÜKSEK RİSK</b>	<b>ORTA RİSK</b>	<b>DÜŞÜK RİSK</b>
Siklofosfamid Melfelan Busulfan Nitrojen mustard Klorambusil	<b>Sisplatin</b> Adriamisin <b>Paklitaksel ?</b>	Metotreksat 5-Fluorourasil Vinkristine Bleomisin

### **Kemoterapi dozu**

Kemoterapotik ajanların artan dozlarda kullanımı primordial follikül sayısında progresif olarak azalmaya neden olmaktadır. Yapılan bir rat çalışmasında, ratlara siklofosfamid artan dozlarda uygulanmış (20–100 mg/kg ) ve siklofosfamid en düşük uygulama dozunda bile primordial follikül sayısında anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Siklofosfamid veriliş dozunda yapılan artışlarla birlikte primordial follikül sayısında azalma ve ovaryan yetmezlik gelişme riski daha da artmıştır (31).

Yine bir deneysel çalışmada ratlara artan dozlarda (2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg) paklitaksel uygulanmasıyla tüm dozlarda primordial follikül sayısında azalma elde edilmiş ancak primordial folliküllerde istatistiksel olarak en anlamlı azalma 7,5 mg/kg uygulama dozunda elde edilmiştir (30).

### **Kombinasyon kemoterapisi**

Kemoterapotik ajanların birçoğu sinerjistik etkilerinden faydalanmak, tedavideki etkinliklerini artırmak ve ilaca karşı rezistans gelişimini engellemek amacıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. Böylece over rezervi üzerinde meydana getirecekleri toksik etki profilleride giderek artmaktadır. Kombine olarak uygulanan kemoterapotik ajanlar primordial follikül sayısını belirgin olarak azaltmaktadır (32). Böylelikle tek ajan kemoterapisine göre over rezervi üzerinde meydana getirdiği hasar belirgin olarak daha fazladır.

Paklitaksel ve sisplatinin tek ajan olarak uygulandıkları ratlarda primordial folliküller üzerinde sitotoksik etki yaptıkları bilinmesine rağmen bu iki ajanın kombine olarak uygulanmasının folliküller üzerinde yaptıkları sitotoksik etkinin derecesi bilinmemektedir.

## **GnRH ANALOGLARININ OVERLERİ KEMOTERAPOTİK AJANLARIN HASARINDAN KORUMADAKİ YERİ**

Sürekli bölünen hücreler alkilleyici tip kemoterapotik ajanların toksik etkilerine, istirahat halindeki hücrelerden daha fazla hassas olduğu bilinmektedir. Hipotalamus-hipofizer-over aksınının inhibe edilmesiyle oogenezin azaltılması, overin germinal epitelini kemoterapotik ajanların toksik etkilerine karşı daha az hassas hale getirecektir. GnRHa'nın overleri kemoterapotik ajanların sitotoksik etkilerinden nasıl koruduğu tam olarak bilinmemesine rağmen çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür.

Bu mekanizmalar şunlardır;

**1-Hayvan çalışmalarında GnRHa'nın devamlı olarak kullanılmasının, overin granüloza hücreleri içerisine timidin nükleotidinin girmesini engelleyerek siklofosfamidin neden olduğu ovaryan hasarı azalttığı gösterilmiştir ( 33,34).**

**2-GnRHa'nın aynı zamanda periferik GnRH reseptörleri vasıtasıyla overler üzerinde direkt olarak koruyucu etki gösterdiği de bildirilmiştir (35).**

**3-Alkilleyici ajanların folliküllerde apoptozisi başlatarak follikül sayısını azaltmasıyla overlerde seks steroidleri ve inhibin üretimi belirgin olarak azalacak ve negatif feed-back mekanizmasıyla hipofizden FSH salınımı artacaktır. Böylelikle, artan FSH geride kalan folliküllerin gelişerek maturasyonuna ve kemoterapotik ajanların sitotoksik etkilerine karşı daha hassas hale gelmesine neden olacaktır. Bu döngü GnRHa uygulanımı ile kırılarak hipogonadotropik ortam sağlanmakta ve folliküler gelişim inhibe edilerek folliküllerin maturasyonu engellenmektedir. Matür folliküllerin primordial folliküllere göre kemoterapiye daha fazla hassas olduğu da göz önünde bulundurulursa, GnRHa ile bu etki sağlanarak kemoterapinin neden olabileceği sitotoksik etkiden overler kolaylıkla korunmuş olacaklardır (36).**

**4-GnRHa ile oluşturulan hipoöstrojenik ortam nedeniyle utero-ovaryan perfüzyon azalmaktadır. Böylece uterus ve overlere giden kan akımında meydana gelen azalma ile kemoterapotik ajanların overdeki seviyeleri belirgin olarak düşmekte ve overlere yapmış oldukları toksik etkileri azalmaktadır (37).**

**5-GnRHa, GnRH I ve II reseptörleri vasıtasıyla overleri direkt etkileyerek apoptozisi engellemektedir (36).**

**6-GnRHa** intragonadal anti-apoptotik etki gösteren Sfingozin-1-Fosfat (S-1-P) adı verilen molekülün up-regülasyonunu sağlamakta ve apoptozisi engellemektedir (38).

Dişi ratlarla yapılan çalışmalar gonadotropin salgılatıcı hormon agonistlerinin kemoterapinin neden olduğu toksik etkilerden overleri koruyabileceğini göstermiştir. Ancak yukarıda anlatılan koruyucu mekanizmaların yanında GnRHa'nın koruyucu etkileriyle ilgili çeşitli şüpheler bulunmaktadır.

Çeşitli biyolojik farklılıklardan dolayı GnRHa uygulanmasına rat oositleri insan oositlerinden farklı cevap verebilmektedir. Kadınlarda menstruel siklus  $28 \pm 7$  gün iken ratların östros siklusları ortalama 4 gün sürmektedir. Ratların östros sikluslarında herhangi bir kanama ile endometrial dökülme olmazken kadınlarda kanama ile birlikte endometrial dökülme mevcuttur. Son olarak rat overleri çok sayıda GnRH reseptörleri içerirken insanlarda bu reseptörlerin sayısı oldukça düşüktür (39). Ovaryan folliküllerin önemli bir bölümünü oluşturan ve ovaryan follikül rezervini yansıtan primordial folliküller insanlarda gonadotropik kontrol altında değildir ve aynı zamanda hem FSH hemde GnRH 1 reseptörleri içermezler. Bu nedenle GnRHa ile sağlanan hipogonadotropik ortam ile primordial folliküllerde direkt bir koruyucu etki sağlanmayabilir. Ancak insanlarda tespit edilen GnRH reseptörlerinde eksiklik, maymunlarda da gösterilmesine rağmen, kemoterapi öncesi maymunlara uygulanan aylık GnRHa tedavisinin folliküller üzerine koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir (40) Bu farklılıklardan dolayı rat ve maymun modellerinde elde edilen sonuçların mutlaka insan çalışmalarıyla desteklenerek sonuca gidilmesi gerekmektedir.

Başka bir önemli nokta ise GnRHa uygulaması ve kemoterapiye başlama arasındaki zaman diliminin uzunluğudur. Hastalığın tanımlanmasından sonra bir an önce kemoterapiye başlanması kritiktir. Ancak GnRH analogları ovaryan supresyon yapmadan önce ortalama 1-2 hafta flare-up etki göstererek gonadotropik aktiviteyi artırmakta ve folliküler gelişimi uyarılmaktadır. Böylece bu dönemde kemoterapi uygulanırsa overler sitotoksik etkilere daha fazla maruz kalacaklardır. Ovaryan supresyonun ortalama 3 hafta içerisinde başladığı düşünülürse kemoterapinin geciktirilmesinin hastalığın ilerlemesine ve occult metastazların gelişmesine neden olabileceği düşünülebilir. Ancak yapılan çalışmalarda ileri evre over kanserli hastalara uygulanan optimal sitoredüktif cerrahi sonrası, cerrahi ile kemoterapi arası

geçen sürenin kısa yada uzun olmasının survive ve prognoz üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir (41).

## **GnRH ANALOGLARININ OVER KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ÖNEMİ**

Over kanserinin genetik, çevresel ve endokrinolojik faktörlerin birlikte rol aldığı multifaktöryel bir zeminden geliştiği düşünülmektedir. En önemli teorilerden birisi sürekli ovulasyon teorisi olup düzenli ovulasyon ile over yüzey epitelinde meydana gelen sürekli hasar-onarım işlemleri bu epiteli karsinojen ve mutajen ajanlara karşı daha hassas olmaya zorlayarak over kanseri gelişimine zemin hazırlamaktadır. Aynı zamanda infertil hastalarda over kanseri riskinin yüksek oluşu ve overi stimüle eden ilaçların over kanseri riskini artırması gonadotropin teorisinin oluşmasına neden olmuştur. Menopozla birlikte over kanseri insidansının artması ve bu dönemde gonadotropin düzeylerinin yüksek olması bu teoriyi desteklemektedir (42).

Aynı zamanda in vivo ve in vitro çalışmalarda gonadotropin uyarısı ile birlikte over kanseri hücrelerinde anormal büyüme saptandığı gösterilmiştir (43). Epitelyal over kanserli hastaların % 80'inde GnRH reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. GnRHa'nın anti-tümöral etkileri GnRH reseptörleri vasıtasıyla olmaktadır (44). Bu teorilerden yola çıkılarak GnRHa ile bu hormonal aks ortadan kaldırılıp hipogonadotropik ortam oluşturularak over kanseri tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

GnRHa aynı zamanda hücre siklusunun G0/G1 fazında hücreleri durdurduğu ve G2/S fazı gibi çoğalma safhasına giren hücre sayısını azaltarak antiproliferatif etki yaptığı gösterilmiştir (45). Böylece kanser hücrelerinin çoğalması ve hastalığın ilerlemesi önlenmiş olacaktır. Buna karşılık Emons ve arkadaşları (46) debulking cerrahisi yapılan ve kemoterapi alan ileri evre over kanserli hastalarda bir GnRHa olan triptorelin ile yaptıkları çalışmada, endojen gonadotropinlerin baskılanmasının survive üzerine herhangi bir olumlu etkisinin olmadığını göstermişlerdir

İleri evre kemoterapiye dirençli over kanserli hastalarda yapılan çalışmada kullanılan bir GnRHa olan leuprolid asetatın, hastalar tarafından iyi tolere edilmesine ve kemoterapotik ajanların etkilerini azaltmamasına rağmen, survive üzerine olumlu sonuçları olmamıştır (47). Genel olarak yapılan çalışmalarda, ileri evre ve

kemoterapiye rezistans over kanserli hastalarda GnRHa kullanımının ortalama sağ kalım sürelerine olumlu etkilerinin olmadığı belirtilse de bunu doğrulamak için prospektif randomize çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **PAKLİTAKSEL**

Paklitaksel meme, over ve akciğer, baş-boyun ve özefagus kanserleri gibi epitelyal orjinli kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan taxan grubu bir kemoterapotik ajandır. Son zamanlarda lenfoma ve germ hücreli tümörler gibi genç yaşta ortaya çıkan kanserlerin tedavisinde de başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Anti-tümör özelliğini mikrotubüller üzerinden göstermektedir. Mikrotubüllere yüksek bir afiniteyle bağlanmakta ve onları stabilize ederek birbirlerine bağlanmasını ve depolarize olmasını engellemektedir. Böylece hücre bölünmesini, proliferasyonunu ve miğrasyonunu engelleyerek apoptozisi başlatmaktadır.

Paklitaksel düşük dozlarda apoptozisi başlatırken, yüksek dozlarda hücre büyümesini engellemektedir. Paklitaksel doza bağlı olarak özellikle matür oositleri hasara uğratmaktadır. Matür oositlerde mayotik maturasyonda gecikme ve iğ defektlerine neden olup anoploid oositlerin gelişimine neden olmaktadır.

İn 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.

### **SİSPLATİN**

Sisplatin ilk jenerasyon platinyum bileşiklerinden olup over, meme, testis ve mesane kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Sisplatin DNA üzerinde guanin ve adenin nükleotidlerine kovalent olarak bağlanıp transkription ve DNA replikasyonunu engelleyerek sitotoksik etki göstermektedir (48). Aynı zamanda hücre içinde nükleer ve sitoplazmik proteinlere bağlanarak toksik etkiler gösterirler. Hücre büyümesi ve proliferasyonunu azaltarak, apoptozisi artırarak antitümöral aktivite göstermektedir (49).



## MATERYAL-METOT

Bu çalışma etik kurul onayı alındıktan sonra Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yapıldı. Çalışmada ortalama ağırlıkları 200–250 gr arasında olan matür, 70 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar 12 saatlik aydınlatma periyodu uygulanan barınaklarda, sürekli havalandırılma yapılan ortamda,  $19\pm 1$  C ortam içi sıcaklığında, % 50–60 barınak içi ortalama nem değerlerinde barındırıldı. Ratlar atlibutum beslenme yöntemiyle beslendi.

Ratlar biri kontrol ve altısı tedavi grubu olmak üzere toplam 7 gruba ayrıldı. Grupların dağılımı tablo 2’de gösterilmiştir. Paklitaksel (Anzatax, Orna İlaç, Avustralya) serum fizyolojik ile sulandırılarak 7.5 mg/kg tek doz steril bir şekilde intraperitoneal olarak toplam 1 ml uygulandı. Sisplatin (Cisplatin, Orna İlaç, Avustralya) serum fizyolojik ile sulandırılarak 5 mg/kg tek doz steril bir şekilde intraperitoneal olarak toplam 3.5 ml uygulandı. Leuprolid asetat 2,5µg/gün olarak her bir rata subkutan olarak uygulandı. Kontrol grubuna da eşit volümde steril serum fizyolojik uygulandı.

Anestezi uygulaması 60 mg/kg Ketamin (Ketalar, Eczacıbası, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazin’in (Rompum %2, Bayer, Almanya) birlikte intraperitoneal uygulanması ile yapıldı. Anestezi altında overler çıkarıldıktan sonra ratlar servikal dislokasyon yapılarak sakrifiye edildi.

**Tablo 2: Grupların dağılımı**

Grup 1	Kontrol
Grup 2	Paklitaksel
Grup 3	Sisplatin
Grup 4	Paklitaksel + Sisplatin
Grup 5	Paklitaksel + GnRHa
Grup 6	Sisplatin + GnRHa
Grup 7	Paklitaksel + Sisplatin + GnRHa

Bu çalışma 5 hafta olarak planlandı. İlk 4 hafta boyunca GnRHa içeren gruplara (grup 5, 6, 7) kemoterapiler verilmeden önce anovulasyon sağlanarak ovaryan supresyon elde edebilmek için 2,5µg leuprolid asetat subkutan olarak günlük uygulandı (50). Bu dönem içinde kontrol grubu dahil diğer gruplara da aynı dozda steril serum fizyolojik subkutan olarak uygulandı.

Çalışmanın 28.gününde kemoterapi uygulanan gruplara (grup 2, 3, 4, 5, 6, 7) kemoterapotik ajanlar intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna ise aynı dozda steril serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı. Ratların östros sikluslarının uzunluğu ortalama 5 gün olması ve kemoterapik ajanların follüküller üzerine etkisini değerlendirmek için kemoterapi uygulanımından 1 hafta sonra overlerin çıkarılması gerektiğinden, kemoterapi uygulanımından sonra GnRHa uygulanan gruplara 1 hafta daha GnRHa uygulanımına devam edildi. Bu süre zarfında diğer gruplara da aynı dozda steril serum fizyolojik subkutan olarak verildi. Kemoterapi uygulanmasından 1 hafta sonra çalışmanın 35.gününde tüm ratlar ooferektomize edilerek overleri çıkarıldı ve overler Bouin solüsyonuna konuldu.

Bouin solüsyonuna konulan overler yaklaşık olarak 24 saat bekletildi ve ardından parafin bloklar hazırlanmaya başlandı. Follüküler toksisiteyi değerlendirmede seri kesitler alarak morfometrik analizler yapmak hem zaman alıcı hemde pahalı bir yöntem olduğundan daha önce yapılan bir çalışmadaki benzer metot kullanılarak her bir overden randomize alınan 5 seri kesitle follüküler toksisite değerlendirildi (51). Tüm kesitler tek araştırmacı tarafından değerlendirildi.

Değerlendirme sırasında incelemeyi yapan araştırmacı grupları bilmiyordu. Her ne kadar over rezervini belirlemede en önemli parametre rejenerasyon kapasitesi olmayan primordial folliküllerin sayısı olsa da matür folliküllerin primordial folliküllere göre kemoterapiye daha fazla hassas olduğu göz önünde bulundurularak bu çalışmada alınan kesitlerde primordial follikül, primer follikül, sekonder follikül ve tersiyer folliküller ayrı olarak sayıldı. Overler çıkarılıp değerlendirme aşamasına kadar geçen basamaklar aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

Doku parçaları alınıp mikroskop altında incelenebilecek hale getirilinceye kadar birbiri ardına birçok işlemde geçirildi. Bu basamaklar; dokunun alınması, tespit edilmesi, sudan kurtulması, şeffaflandırılması, gömülmesi, kesit alınması, boyama ve kapatılmasını içermekteydi (52).

Bu çalışmada overler, ratlar canlı iken alındıktan sonra daha iyi bir tespit sağlayan Bouin solüsyonu içerisine konuldu ve bu solüsyonda 24 saat bekletildikten sonra sudan kurtarma yani dehidratasyon işlemine geçildi. Bu işlemde dokunun birbirini takip eden % 50'den başlayıp % 100'e dereceli olarak artan etanol ile dehidratasyonu sağlandı. Daha sonra şeffaflandırmaya geçildi. Dokular 3 seri ksilenden geçirilerek 60 C' lik etüvde eriyik parafin içinde bir gece bekletildi. Böylece ısının etkisiyle çözücünün buharlaşması sağlanırken yerine parafinin geçmesi sağlandı. Daha sonra gömme işlemine geçildi. Parafin bloklamada bir gece etüvde eriyik parafin içinde bekletilmiş olan dokular eriyik parafinin döküldüğü kalıplara yerleştirildi ve eriyik parafinin oda ısısında donup katılaşması sağlanarak yarı sert ve kolayca istenilen yönde kesilebilen bloklar elde edildi ve kesit alma işlemine geçildi.

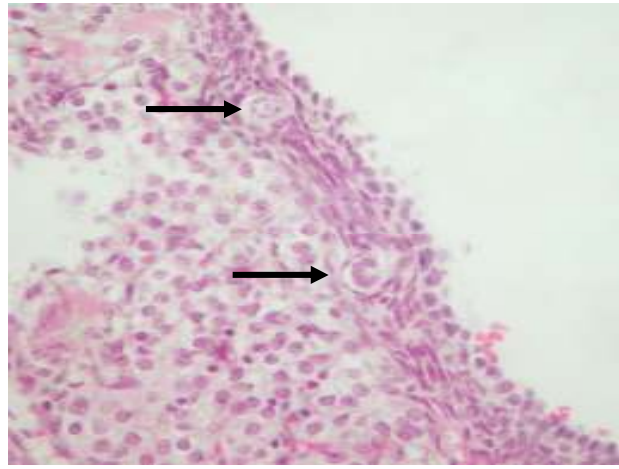
Mikrotom denilen kesme cihazı ile 6µm boyutlarında kesitler alınarak ılık su içeren havuza aktarıldı. Böylelikle dokuda kesit sırasında oluşan kırıksıklıkların sıcaklık etkisiyle açılması ve bir miktar parafinin de ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Ilık su banyosundan lam üzerine aktarılan kesitler etüvde 24 saat bekletildi. Daha sonra lamlar parafinin uzaklaştırılması için tekrar 3 seri ksilenden geçirildi. Azalan alkol serilerinde (% 100-% 50) yeniden suya doyurulan dokular çeşme suyu ile yıkanarak boyama işlemine alındı. Dokular hemotoksilen ile 8 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar çeşme suyu ile yıkanarak Eozin ile 4 dakika bekletildi ve tekrar çeşme suyu ile yıkandı. Boyamadan sonra dokular yeniden artan alkol serisinden

geçirilip dehidrate edilerek ksilenden geçirildi ve Kanada Balzamu yardımıyla lamelle kapatılarak kurumaya bırakıldı ve bir gün sonra follikül sayımları yapıldı.

Kesitlerde primordial follikül, primer follikül, sekonder follikül ve tersiyer folliküller ayrı olarak sayıldı. Histolojik preparatlarda folliküller aşağıda belirtilen şekilde tanımlandı:

### **Primordial Follikül**

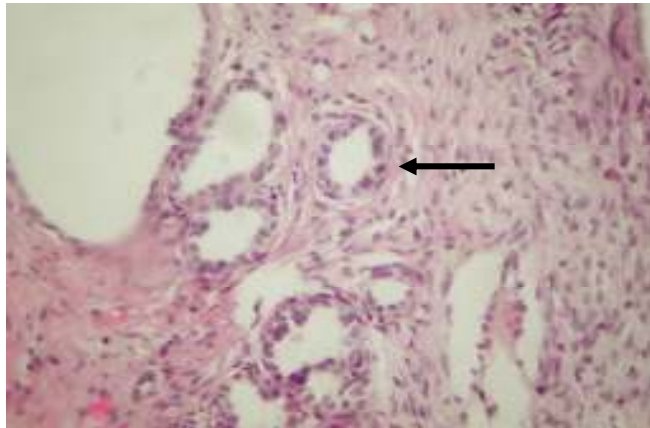
Primordial folliküller korteksin hemen altında yer almaktadır ve histolojik kesitlerde oosit bazal lamina üzerine oturmuş, tek katlı yassı epitel ile sarılı olarak görülmektedir (şekil 1)



**Şekil 1:** Primordial follikülün histolojik olarak görünümü

### **Primer follikül**

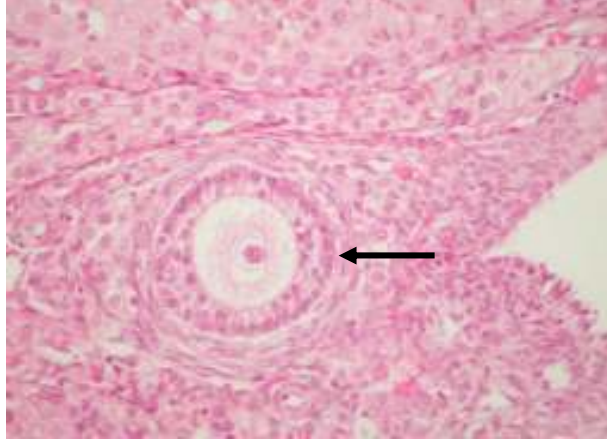
Primer follikül düzensiz iki ya da 3 katlı granüloza hücre tabakası ile çevrilidir. Follikül kalın bir bazal laminayla sarılıdır. (şekil 2)



**Şekil 2:** Primer follikülün histolojik olarak görünümü

### **Sekonder follikül (Pre-antral follikül)**

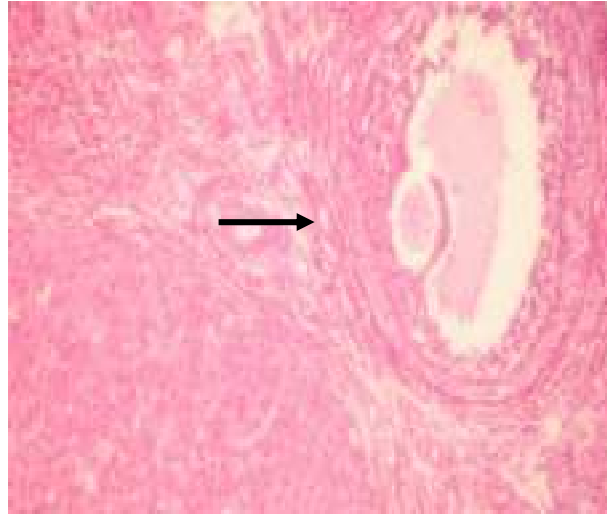
Primer folliküller büyürlerken granüloza hücreleri hızla çoğalmakta ve granüloza hücreleri oosit etrafında 6–10 sıra oluşturduklarında granüloza hücreleri arasında oosit içerisinde geniş germinal vezikül seçilir (şekil 3).



**Şekil 3:** Sekonder follikülün histolojik olarak görünümü

### **Tersiyer follikül = Pre-ovulatuvar follikül = Graaf follikül**

Sekonder follikül içerisinde oosit yavaş yavaş büyümeyi devam ettirirken yapı bir vezikül haline gelmekte ve oosit artık kumulus ooforus adı verilen hücre grubuyla follikül duvarına birleşmektedir. Gelişmesini tamamlayan olgun follikül artık 10–15 mm çapa erişmiştir (şekil 4)



**Şekil 4:** Tersiyer follikülün histolojik olarak görünümü

## **İSTATİSTİK**

Verilerin analizi IBM uyumlu kişisel bilgisayarda SPSS for Windows 10,1 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc. Chicago, IL) istatistik program paketi kullanılarak yapıldı. Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde kontrol grubu ile çalışma gruplarının karşılaştırılmasında çoklu karşılaştırma testi olan Tukey testi uygulandı. Grupların birbirine göre durumlarının değerlendirilmesinde çoklu karşılaştırma testi olan Tanhane testi uygulandı. Çalışmanın gücü 0.99 olarak tespit edildi.

## BULGULAR

Çalışmanın sonunda uygulanan kemoterapötik ajanlarla ilişkili olarak ratlarda herhangi bir komplikasyon meydana gelmemiştir. Çalışma 70 rat ile sonlandırılmıştır. Primordial follikül, primer follikül, sekonder follikül ve tersiyer follikül sayıları ve kontrol grubu ile çalışma grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar tablo 3’de verilmiştir. Kontrol grubu ile tedavi grupları arasında follikül sayılarının ortalama standart sapma değerlerinin grafiksel gösterimi şekil 5’de gösterilmiştir. Grupların birbirleri ile yapılan ikili karşılaştırmalarının sonuçları ise tablo 4’de gösterilmiştir.

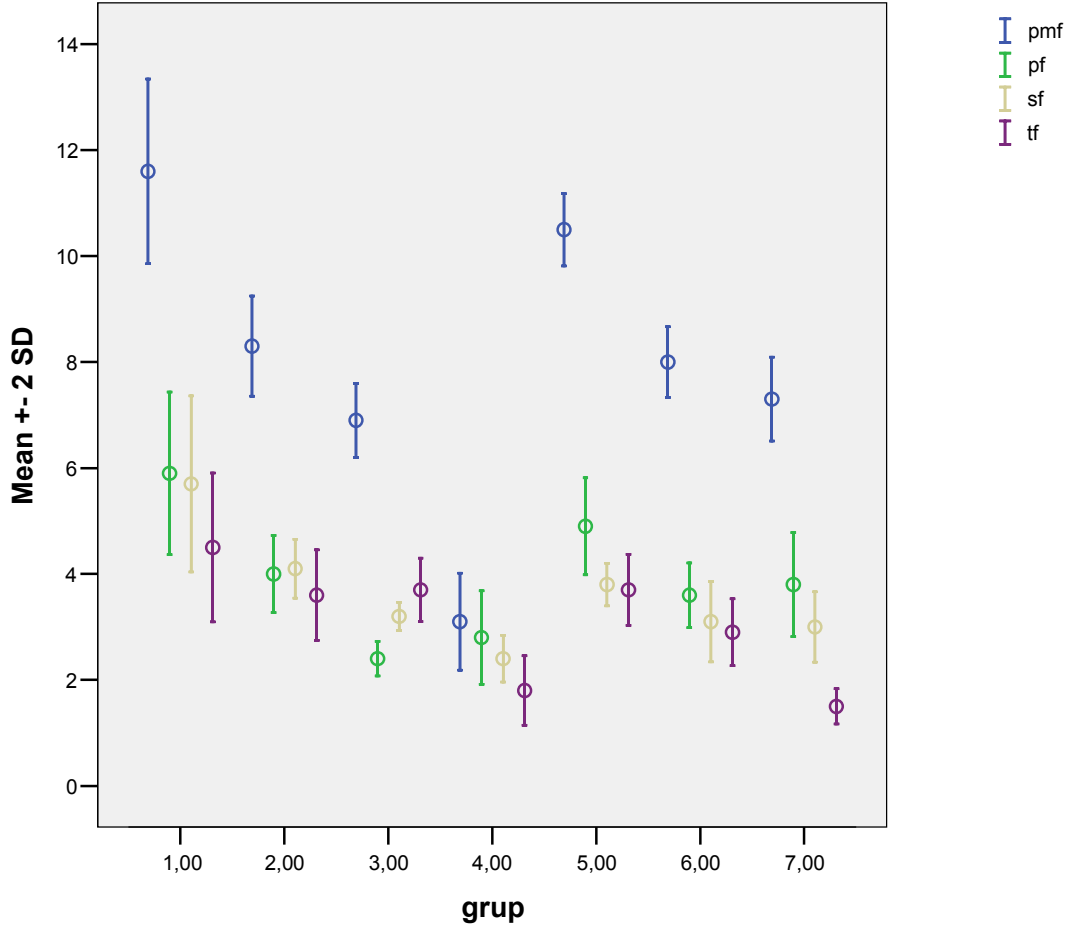
**Tablo 3. Kontrol grubuna göre tüm tedavi alan grupların follikül sayılarının değerlendirilmesi**

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
PMF	11,6 ± 2,7	8,3 ± 1,4*	6,9±1,1*	3,1 ± 1,4*	<b>10,5 ± 1,0</b>	8,0 ± 1,1*	7,3 ± 1,2*
PF	5.9 ± 2,4	4,0 ± 1,1 <sup>q</sup>	2,4±0,5*	2,8 ± 1,3*	<b>4,9 ± 1,4</b>	3,6 ± 0,9 <sup>q</sup>	3,8 ± 1,5 <sup>q</sup>
SF	5.7 ± 2,6	4,1 ± 0,8 <sup>q</sup>	3,2±0,4*	2,4 ± 0,6*	3,8 ± 0,6 <sup>q</sup>	3,1 ± 1,1*	3,0 ± 1,0*
TF	4.5 ± 2,2	<b>3,6 ± 1,3</b>	<b>3,7±0,9</b>	1,8 ± 1,3*	<b>3,7 ± 1,1</b>	2,9 ± 0,9 <sup>q</sup>	1,5 ± 0,5*

PMF: Primordial follikül PF: Primer follikül SF: Sekonder follikül TF: Tersiyer follikül

\*p<0,001. Kontrol grubuna göre tedavi alan gruplarda meydana gelen follikül sayılarındaki azalmanın istatistiksel değeri

<sup>q</sup>p<0.05. Kontrol grubuna göre tedavi alan gruplarda meydana gelen follikül sayılarındaki azalmanın istatistiksel değeri



Şekil 5. Kontrol grubu ile tedavi grupları arasında follikül sayılarının ortalama standart sapma değerlerinin grafiksel gösterimi



**Tablo 4. PMF, PF, SF, TF Açısından Tüm Grupların Birbirleriyle Karşılaştırılması**

Gruplar	PMF P	PF P	SF P	TF P
1-2	0.101	0.608	0.877	0.999
1-3	<b>0.007</b>	<b>0.026</b>	0.269	1.000
1-4	<b>0.000</b>	0.069	0.063	0.084
1-5	0.998	0.999	0.661	1.000
1-6	<b>0.049</b>	0.298	0.258	0.722
1-7	<b>0.014</b>	0.530	0.205	<b>0.041</b>
2-3	0.465	<b>0.034</b>	0.220	1.000
2-4	<b>0.000</b>	0.670	<b>0.003</b>	0.078
2-5	<b>0.033</b>	0.961	1.000	1.000
2-6	1.000	1.000	0.647	0.992
2-7	0.936	1.000	0.359	<b>0.014</b>
3-4	<b>0.000</b>	1.000	0.145	<b>0.009</b>
3-5	<b>0.000</b>	<b>0.006</b>	0.401	1.000
3-6	0.525	0.079	1.000	0.835
3-7	1.000	0.350	1.000	<b>0.000</b>
4-5	<b>0.000</b>	0.081	<b>0.004</b>	<b>0.015</b>
4-6	<b>0.000</b>	0.972	0.949	0.425
4-7	<b>0.000</b>	0.965	0.970	1.000
5-6	<b>0.001</b>	0.490	0.939	0.887
5-7	<b>0.000</b>	0.929	0.713	<b>0.001</b>
6-7	0.989	1.000	1.000	<b>0.032</b>

PMF: Primordial follükül PF: Primer follükül SF: Sekonder follükül TF: Tersiyer follükül

### **Primordial Follükül**

Primordial follükül sayıları açısından kontrol grubu ile çalışma grupları arasında yapılan toplu karşılaştırmaların sonuçlarına bakıldığında (tablo 3), beşinci grupta primordial follükül sayısı anlamlı bir değişiklik göstermezken, diğer tüm tedavi gruplarında follükül sayılarının istatistiksel anlamlılıkta düşüş gösterdiği görülmektedir ( $p < 0.001$ ).

Grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında, primordial folliküllerde beşinci gruba ek olarak ikinci grupta da follikül sayısının kontrol grubuna göre korunmuş olduğu görülmüştür (kontrol:  $11,6 \pm 2,7$ ; grup 2:  $8,3 \pm 1,4$ ; grup 5:  $10,5 \pm 1,0$ ) ( $p > 0,05$ ) (şekil 5). Bu iki grup haricindeki tüm çalışma gruplarında primordial follikül sayıları kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermektedir. Bunun yanısıra GnRHa ile birlikte yada tek başına sisplatin uygulamasının tek başına paklitaksel kullanımına göre primordial folliküller üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Paklitakselin GnRHa ile birlikte kullanımı (grup 5) ile diğer tüm tedavi grupları (grup 2, 3, 4, 6, 7) arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda, grup 5’de primordial follikül sayısının anlamlı bir şekilde diğer tüm tedavi gruplarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla  $10,5 \pm 1,0$ ;  $8,3 \pm 1,4$ ;  $6,9 \pm 1,1$ ;  $3,1 \pm 1,4$ ;  $8,0 \pm 1,1$ ;  $7,3 \pm 1,2$ ) (şekil 5).

### **Primer Follikül**

Primer follikül sayıları açısından kontrol grubu ile tedavi gruplarının karşılaştırıldığı tablo 3’e bakıldığında, kontrol grubuna göre yine beşinci grup olan paklitaksel + GnRHa grubu haricinde tüm tedavi gruplarında follikül sayılarında belirgin bir azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Bu azalma özellikle üçüncü ve dördüncü gruplarda istatistiksel olarak en yüksek değere sahiptir ( $p < 0,001$ ). Burada da beşinci grupta ortalama primer follikül sayısı kontrol grubuna yakın olarak bulunmuştur (kontrol:  $5,9 \pm 2,4$ , grup 5:  $4,9 \pm 1,4$ ) ( $p > 0,05$ ).

Grupların birbirleriyle yapılan ikili karşılaştırmalarına bakıldığında (tablo 4) tek başına sisplatin kullanılan grup 3 haricindeki tüm tedavi gruplarında primer follikül sayılarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olmadığı görülmektedir. Yine grupların birebir karşılaştırmalarında sadece sisplatin kullanılan grup 3’ün, tek başına paklitaksel kullanılan grup 2 ve paklitaksel + GnRHa kullanılan grup 5’e göre primer follikül sayısında anlamlı bir azalmanın olduğu (sırasıyla  $2,4 \pm 0,5$ ;  $4,0 \pm 1,1$ ;  $4,9 \pm 1,4$ ) tespit edilmiştir.

### **Sekonder Follikül**

Kontrol grubu ile tedavi gruplarının karşılaştırıldığı tablo 3'e bakıldığında sekonder follikül sayıları üzerine tüm tedavi şemalarının toksik etkisinin olduğu görülmektedir.

Gruplar arası tekli karşılaştırmalara bakıldığında tedavi gruplarının kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmaları neticesinde sekonder follikül sayılarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (tablo 4). Buna karşılık paklitaksel + sisplatin kombinasyonunun (grup 4), tek başına paklitaksel (grup 2) ve paklitaksel + GnRHa (grup 5) kullanımına göre sekonder follikül sayısında anlamlı bir azalmaya yol açtığı görülmüştür (sırasıyla  $2,4 \pm 0,6$ ;  $4,1 \pm 0,8$ ;  $3,8 \pm 0,6$ ) ( $p < 0,01$ ).

### **Tersiyer Follikül**

Kontrol grubuna göre tedavi gruplarının karşılaştırıldığı analiz sonucunda grup 4, 6 ve 7'de tersiyer follikül açısından anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir (tablo 3).

Grupların tekli karşılaştırmalarında kontrol grubuna göre sadece paklitaksel + sisplatin + GnRHa uygulanan grup 7'de anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (tablo 4). Grup 7'nin grup 2, 3, 5 ve 6'ya göre de tersiyer folliküller üzerinde en fazla düşüşe sebep olduğu görülmüştür (sırasıyla  $1,5 \pm 0,5$ ;  $3,6 \pm 1,3$ ;  $3,7 \pm 0,9$ ;  $3,7 \pm 1,1$ ;  $2,9 \pm 0,9$ ) ( $p < 0,01$ ). Ayrıca grup 4'de grup 3 ve 5'e göre tersiyer folliküller açısından anlamlı bir azalma mevcuttur (sırasıyla  $1,8 \pm 1,3$ ;  $3,7 \pm 0,9$ ;  $3,7 \pm 1,1$ ) ( $p < 0,01$ ).

## TARTIŞMA

Reproduktif dönemdeki kanserli hastalar tedavilerinde yaşam sürelerinin uzaması kadar gelecekteki fertilitelerinin de korunmasını istemektedirler. Genital kanserli genç hastaların fertilitate isteği bu hastaların yönetiminde oldukça önemlidir. Son yıllarda kemoterapi alanında gelişmelerin artması, yeni ajanların ortaya çıkması ve bu ajanların tedavideki etkinlikleri nedeniyle genital kanserli hastalarda fertilitate koruyucu cerrahi tedaviler ön plana çıkmaya başlamış ve bu hastaların üreme fonksiyonları korunmaya çalışılmıştır. Ancak seçilmiş hasta grubuna postoperatif olarak uygulanan adjuvan kemoterapiler germ hücreleri ve primordial folliküllerin azalmasını hızlandırarak zaten fertilitate arzusu olan ve fertilitate koruyucu cerrahi uygulanmış bu hastalarda prematür menopoza neden olmaktadır.

Kemoterapiye bağlı olarak gelişen prematür over yetmezliğinin ortaya çıkmasında, uygulanan kemoterapotik ajanın tipi en önemli faktörler olarak göze çarpmaktadır. Alkilleyici tip kemoterapotik ajan olan ve epitelyal orjinli tümörlerin tedavisinde başarı ile kullanılan siklofosfamid, günümüzde over rezervi üzerine en fazla sitotoksik etki gösteren ajan olarak bilinmektedir. Alkilleyici tip ajanların oluşturduğu bu sitotoksitenin en önemli basamağını oositlerin apoptozunun oluşturduğu düşünülmektedir. İn vitro yapılan çalışmalarda hem paklitaksel hemde sisplatinin de apoptozisi artırarak primordial folliküllerde hasara neden olduğu gösterilmiştir.

Over rezervinin en önemli bölümünü oluşturan primordial folliküllerde meydana gelen bu hasarlanma ile ileri dönemde prematür ovaryan yetmezlik gelişimi kaçınılmaz bir sonuç olarak görülmektedir. Her ne kadar over rezervinin önemli bir bölümünü primordial folliküller oluştursada matür folliküllerde ovaryan rezervin oluşmasına katkıda bulunurlar. Kemoterapotik ajanların sitotoksik etkilerinden matür folliküllerde etkilenerek over rezervinin azalmasına neden olurlar.

Bines ve arkadaşları (31) yaptıkları bir çalışmada erken evre meme kanserli hastalara uyguladıkları 3 ay polikemoterapi sonucu kemoterapiye bağlı gelişen amenore oranını %20–100 arasında tespit etmişlerdir. Bu oranın bu kadar geniş aralıklı olmasını hastaların menapozal durumu, yaşı ve uygulanan kemoterapi rejimlerine bağlamışlardır.

Reichmann ve arkadaşları (53) ise meme kanserli hastalara uyguladıkları polikemoterapi (siklofosfamid, metotreksate, fluorourasil) ile kemoterapiye bağlı amenore gelişme oranını ilk siklustan sonra % 10–33, 6 siklustan sonra % 33–81, 12 siklustan sonra % 61–95 olarak tespit etmişlerdir. Kemoterapiye bağlı olarak gelişen amenorenin en önemli nedenini polikemoterapi rejimlerinde bulunan alkilleyici ajanlara bağlamışlardır.

Chapmann ve arkadaşları (54) ise reproduktif dönemde olan Hodking lenfomalı hastalarda 6 kür uyguladıkları MOPP (meklorektamin, vinkristine, prokarbazin, prednizolon) rejimi ile hastaların % 40-70'inde prematür over yetmezliği geliştiğini bildirmişlerdir.

Yukarıdaki klinik çalışmalarda da görüldüğü gibi ovaryan yetmezlik kemoterapinin en önemli ve en sık görülen uzun süreli komplikasyonudur (31, 53, 54). Antitümöral tedaviden sonra normal menstrüel sıklusa yeniden dönen hastalar, folliküllerin zarar görmesine bağlı azalan over rezervlerinden dolayı daha erken menapoza girerler. Kemoterapinin oluşan bu yan etkisi hastalar için ciddi bir sorundur. Çünkü hastaların çoğu gençtir ve normal fertil bir yaşam istemektedir.

Kemoterapinin over üzerine yapmış olduğu sitotoksik etkiyi engelleyebilmek, kanser tedavisi alacak hastaların reproduktif performanslarını korumak ve gelecekteki fertilitelerini olumsuz etkilememek için birtakım tedavi modaliteleri geliştirilmeye başlanmıştır. Asiste reproduktif teknikteki gelişmelerle beraber kemoterapi öncesi oosit, embriyo ve over dokusunun çoğaltılması ve dondurularak

saklanması özellikle fertilité isteği olan kanserli hastaların fertilitelerinin devam ettirilmesinde umut ışığı olmuştur. Ancak bu tekniklerin invaziv, pahalı ve maliyetinin fazla olması kemoterapi öncesi GnRH analogları ile yapılan ovaryan baskılamayı daha popüler hale getirmiştir. Bu koruyucu önlemlerden non-invaziv ve uygulaması kolay olan, tedavi maliyeti diğerlerine göre daha ucuz olan ve ovaryan supresyona neden olan GnRHa ile kemoterapinin over üzerine yapmış olduğu sitotoksik etkinin önlenebildiği klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (39,55–60).

Ataya ve Moghissi (39) yaptıkları çalışmada GnRHa uyguladıkları ratlarda tedavinin 13.gününde ovaryan hücre mitotik aktivitesinde belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. Aynı zamanda immatür folliküllerin gelişip matür follikül haline gelmelerinin ve böylece kemoterapotik ajanların sitotoksik etkilerine daha duyarlı olmalarının GnRH analogları ile engellendiğini göstermişlerdir.

Ataya ve arkadaşları (55) yaptıkları başka bir çalışmada ise siklofosfamid verilen dişi ratlarda kemoterapiye başlamadan önce uyguladıkları ve tedavi süresince devam ettikleri, günde iki kez 2,5µg subkutan GnRHa uyguladıkları grubun total follikül sayısını, kontrol ve siklofosfamid uygulanan gruplara göre daha yüksek tespit etmişlerdir.

Bokser ve arkadaşları (56) siklofosfamid verilen dişi ratlarda total follikül sayısında azalma, granüloza hücrelerinde parçalanma ve destrüksiyon tespit etmişlerdir. Ancak kemoterapiye başlamadan önce uyguladıkları ve tedavi süresince devam ettikleri GnRHa ile yalnız siklofosfamid uygulanan gruba göre total follikül sayısında bir azalma olmadığını ve kemoterapi ile birlikte uygulanan GnRH analogunun ovaryan rezervi koruduğunu göstermişlerdir.

Yuan ve arkadaşları (57) ise siklofosfamid uyguladıkları ratlarda meydana gelen total follikül sayısında azalmanın GnRHa kullanımıyla engellendiğini, siklofosfamid ve GnRHa kombine tedavisinin kemoterapinin yapmış olduğu folliküller hasarı önlediğini göstermişlerdir.

Franke ve arkadaşları (58) ise Hodking lenfomalı hastalara uygulanan polikemoterapik ajanların meydana getireceği prematür ovaryan yetmezliğin, eşzamanlı uygulanan bir GnRHa olan goserelin asetat ile önlenebileceğini ortaya koymuşlardır. Kemoterapiye başlamadan 2 hafta önce depo şeklinde subkutan olarak

goserelin asetat uyguladıktan sonra tedavi bitimine kadar aylık olarak analog uygulamasına devam etmişlerdir. GnRHa uygulaması hastalar tarafından iyi tolere edilmiş ve kemoterapinin başlamasını geciktirmemiştir. Hastaların % 80'i yeniden düzenli adet görmeye başlamasına rağmen yalnızca bir hastada geçici bir ovaryan yetmezlik geliştiğini bildirmişlerdir

Blumenfeld ve arkadaşları (59) lenfomalı hastalarda siklofosfamid ile birlikte verilen ve tedavi süresince uygulamaya devam edilen aylık depo şeklinde kullanılan bir GnRH analogu olan dekapeptil ile 6 ay boyunca ovaryan supresyon yapmışlardır. Tedavi sonrası hastaların % 94'ünün 3-8 ay içinde yeniden düzenli adet görmeye başladığı, % 6'sında ise geçici bir ovaryan yetmezlik geliştiğini bildirmişlerdir.

Recchia ve arkadaşları (60) ise erken evre meme kanserli hastalara uygulanan polikemoterapinin (siklofosfamid, metotreksate, florourasil, antrasiklin) overlere yapacağı hasarı önlemek için bir GnRHa olan goserelin asetatı kemoterapi ile beraber aylık depo şeklinde uygulamışlardır. Yapılan 55 aylık takipte hastaların % 86'sının düzenli bir şekilde adet görmeye başladığını ve GnRHa tedavisinin hastalar tarafından iyi tolere edildiğini bildirmişlerdir.

Siklofosfamid içeren rejimlerle birlikte uygulanan GnRH analoglarının over rezervi üzerine olumlu etkilerinin olduğu yukarıda belirtilen hem deneysel hemde klinik çalışmalarda gösterilmişken literatürde paklitaksel ve sisplatinin over rezervi üzerinde yaptığı olumsuz etkinin GnRH analogları ile önlenebileceği hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer taraftan üreme çağında sıklıkla karşımıza çıkan meme ve over kanseri, lösemi ve lenfoma gibi malign hastalıklarda, paklitaksel ve sisplatin tek başına ya da kombine olarak uygulanmaktadır. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda ise paklitaksel ve sisplatinin tek başına uygulanmasının over rezervinin önemli bir bölümünü oluşturan primordial follikül sayısını anlamlı derecede azaltmış olduğu da göz önünde bulundurulursa paklitaksel ve sisplatin ile birlikte GnRH analogu uygulamasının over rezervi üzerinde olumlu etki yapıp yapmadığının bilinmesi son derece önemlidir. Buradan yola çıkarak paklitaksel ve sisplatinin tek başına ve kombine olarak uygulanmasının hem primordial hem matür folliküller üzerine olan sitotoksik etkileri, hemde GnRH analoglarının bu sitotoksik etkiyi önlemedeki yeri literatürde ilk olarak bu çalışmada incelenmiştir.

Bu çalışma paklitaksel ve sisplatin kemoterapisinin tek başına yada kombine edilerek uygulanmasının folliküler gelişim evresindeki tüm folliküller üzerine sitotoksik etki gösterdiğini, bu etkinin en fazla kombine tedavi kolunda elde edildiğini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Bu çalışmada paklitaksel ve sisplatin ister tek başına isterse kombine olarak uygulanmasının over rezervinin önemli bir bölümünü oluşturan primordial folliküller üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Kombine kemoterapi rejimlerinin over üzerine en fazla sitotoksik etki oluşturduğu bu çalışmada da tespit edilmiş olup, paklitaksel ve sisplatin kombine tedavisi hem primordial hemde matür folliküller üzerine en fazla sitotoksik etkiyi yapmıştır. Tek ajanlı rejimlerde follikül sayısında meydana gelen azalma kombine rejimlere göre daha az bulunduğundan, fertilitate isteği olan hastalarda, eğer tedaviyi olumsuz etkilemeyecekse, daha çok tek ajanlı kemoterapi rejimleri tercih edilmesi alternatif bir yaklaşım olarak düşünülebilir.

Folliküller havuzun ve over rezervinin büyük bir bölümünü oluşturan primordial folliküllerin kemoterapotik ajanların sitotoksik etkisinden korunması fertilitate arzusu olan hastalar için son derecede önemlidir. Over rezervinin önemli bir bölümünü oluşturan primordial folliküllerin azalması ile hastalar ileri dönemde kemoterapinin olumsuz etkileri olan prematür over yetmezliği ve infertilite gibi komplikasyonlarla karşı karşıya gelmektedir. Bu çalışmada tüm tedavi gruplarında primordial follikül sayıları anlamlı olarak azalma gösterirken, paklitaksel ve GnRHa uygulanan grupta primordial follikül sayısı kontrol grubuna yakın bulunmuş, paklitaksel ve GnRHa'nın birlikte kullanılmasıyla primordial folliküller üzerinde meydana gelen koruma daha belirgin hale gelmiştir. Paklitaksel ve GnRHa tedavisi aynı zamanda hem primer ve hem tersiyer folliküller üzerine de koruyucu etki oluşturmuştur. Böylelikle, bu çalışma reproduktif dönemdeki fertilitate isteği olan kanserli hastaların alacakları paklitaksel ve sisplatin içeren kemoterapi rejimlerinde, over rezervlerini koruması açısından, paklitaksel ve GnRHa tedavisini, rat modeli baz alınarak insanlarda da araştırılması gerçeğini ön plana çıkarmıştır.

Paklitaksel ve sisplatin kemoterapisinin tek tek uygulanımının primordial folliküller üzerine olan sitotoksik etkileri bilinmesine rağmen kombine tedavinin matür folliküller üzerine olan sitotoksik etkileri ve GnRH analoglarının bu sitotoksik etkileri önlemedeki yeri bilinmemektedir. Bu etkiler literatürde ilk olarak bu



çalışmada incelenmiş ve paklitaksel ve sisplatin kemoterapisi ister tek ister kombine olarak uygulansın, matür folliküller üzerine de sitotoksik etki yaptığı ve bu sitotoksik etkinin en fazla kombine tedavi kolunda olduğu gösterilmiştir.

Primer folliküller üzerinde yalnızca paklitaksel ve GnRHa tedavisinin kontrol grubuna göre follikül sayısını koruduğu gözlenirken gruplar arası ikili karşılaştırmalarda yalnızca sisplatin kemoterapisinin primer follikül sayılarını azalttığı ve diğer tüm tedavi modalitelerinin primer follikül sayısında anlamlı bir azalma meydana getirmediği gösterilmiştir. Sisplatin ile birlikte kullanılan GnRH analogunun tek başına sisplatin uygulanan gruba göre primer follikül sayısında anlamlı bir farklılık meydana getirmediği de göz önünde bulundurulursa primer folliküllerin sitotoksik etkilerden korunması için sisplatin harici kemoterapi rejimleri tercih edilmelidir.

Uygulanan tüm kemoterapi rejimleri sekonder follikül sayılarını anlamlı olarak azaltmış ve tedaviye eklenen GnRHa ile bu sitotoksik etki geri döndürülememiştir. Tersiyer follikül sayılarına bakıldığında ise tek ajan kullanılan gruplarda ve paklitaksel ve GnRHa uygulanan grupta tersiyer follikül sayılarında anlamlı bir azalma görülmemiştir. Over rezervini direkt olarak etkilediğine yönelik yorum yapabilmek açısından tersiyer follikül sayıları önemli olmamakla birlikte bu çalışmada meydana gelen istatistiksel farklılığın tek ajan uygulanan gruplarda verilen kemoterapotik ajanların yapmış olabileceği indüksiyon etkisinden ortaya çıkmış olduğunu düşünmekteyiz (50). Ancak gerek paklitaksel ve gerekse sisplatin ile ilgili olarak over üzerinde indüksiyon açısından net bir bilgi olmadığı için bu konunun araştırılması gerektiği kanaatindeyiz.

Bu çalışmada görüldüğü üzere paklitaksel ve sisplatin kemoterapisinin de over rezervini azalttığı ve reproduktif dönemde bu kemoterapiyi alacak fertilitte isteği olan hastaların, over fonksiyonlarını korumak için koruyucu önlemler alınması gerekliliğini ortaya koymuştur. GnRHa ile kemoterapi öncesi yapılan ovaryan supresyonla yalnızca paklitaksel uygulanan grupta folliküler hasarın engellenmiş olduğu gösterilmiş ve fertilitte isteği olan hastalarda bu tedavinin over fonksiyonlarını koruması nedeniyle alternatif olarak düşünülmesi gerekliliğini ön plana çıkarmıştır.

Fertilite isteği olan organ koruyucu cerrahi uygulanıp en az bir overi bırakılan erken evre epitelyal over kanserli hastalarla bu iki kemoteropik ajanın birlikte uygulanmak zorunda olduğu reproduktif dönemde ortaya çıkan meme kanseri, lösemi ve lenfoma gibi malign hastalıklarda hastaların over rezervini korumak için kemoterapiden 4 hafta önce başlanacak GnRHa ile paklitakselin birlikte uygulamasının fertilite isteği olan hastalar için araştırılması ve insan modellerinde çalışılması gereken alternatif bir tedavi rejimi olduğu görüşündeyiz.

## SONUÇLAR

1. Paklitaksel ve sisplatin kombine kemoterapisi, over rezervi üzerine sitotoksik etki gösteren kemoterapi rejimlerinden biridir.
2. Paklitaksel ve sisplatin, hem primordial hemde matür folliküller üzerine sitotoksik etki göstermektedir.
3. GnRH analogları, kemoterapi alan hastalarda ovaryan follikülleri sitotoksik etkiden koruyabilecek, alternatif bir tedavi yöntemi olarak araştırılmalıdır.
4. Kemoterapi öncesi hastaların over rezervini korumak için, GnRH analogları ile ovaryan supresyon yapılabilir.
5. GnRH analoglarının flare-up etkilerinden dolayı, kemoterapiye başlamadan yaklaşık 2 hafta önce, bu ajanlarla ovaryan supresyona başlanmalıdır. Aksi takdirde daha fazla follikül kemoterapiden zarar görebilir.
6. Kemoterapi süresince de GnRH analogları ile ovaryan supresyona devam edilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Bath LE, Wallace WHB, Fitzpatrick C, Shaw P, Anderson RA. Depletion of the ovarian reserve in young women following treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003;18: 2368–2374
2. Marhhom E, Cohen I. Fertility preservation options for women with malignancies. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62: 58–72
3. Duska L, Chang Y, Flynn C, et al. Epithelial ovarian carcinoma in the reproductive age group. *Cancer* 1999; 85: 2623–9
4. Zanetta G, Chiari S, Rota S, et al. Conservative surgery for stage I ovarian carcinoma in women of childbearing age. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;8: 1030–5
5. Shimada M, Kigawa J, Kanamori Y. Outcome of patients with early ovarian cancer undergoing three courses of adjuvant chemotherapy following complete surgical staging. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15: 601–5
6. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004;pp 15-19.
7. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986;1: 81–5
8. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 1996;17: 121
9. Zeleznik A. Gonadotropic control of folliculogenesis: The threshold theory. *Basic science and clinical advances, Excerpta Medica*;1994: 37–4

10. Peters H, Byskov AG, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries in humans and other primates. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;7: 469–85
11. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. *Fertility and Sterility* 2001;76:943-9
12. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. Second gene for gonadotropin releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 305-9
13. Kotler ML, Lorenzo F, Bergametti F, Commercon P, Souchier C, Counis R. Subregional mapping of the human gonadotropine releasing hormone receptor (GnRH-R) gene to 4q between the markers D4S392 and D4S409. *Hum Genet* 1995;96: 477–80
14. Vickery BH, Nestor JJ. Luteinizing hormone-releasing hormone Analogs. Development and mechanism of action. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1987;5: 353–5
15. Meiorow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod* 1999;14: 1903–7.
16. Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A ve ark. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004;44: 6–9
17. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death. Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000;1988:2619 –28
18. Mailhes JB, Carabatsos MJ, Young D, London SN, Bell M, Albertini DF. Taxol-induced meiotic maturation delay, spindle defects, and aneuploidy in mouse oocytes and zygotes. *Mutat Res* 1999;423: 79 –90.

19. Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini M, Di Benedetto MR, Motta P.M. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease, *Hum Reprod* 1993; 2080–2087
20. Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1997–2008.
21. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol* 1999;17: 2365–2370.
22. Bonadonna G, Valagussa P. Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol* 1985;3: 259–275.
23. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10: 251–266.
24. Grigg AP, McLachlan R, Zaja J, Szer J. Reproductive status in long-term bone marrow transplant survivors receiving busulfan-cyclophosphamide (120 mg/kg). *Bone Marrow Transplant* 2000;26: 1089–1095
25. Viviani S, Santoro A, Ragni G, Bonfante V, Bestetti O, Bonadonna G. Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21: 601–605
26. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;352:930–942.
27. Byrne J, Fears TR, Gail MH, et al. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:788–793
28. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7: 535–543.

29. Lo Prestia A, Ruvoloa G, Gancitanoa RA, Cittadini E. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer A. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004;11;33–40
30. Gucer F, Balkanli-Kaplan P, Doganay L ve ark. Effect of paclitaxel on primordial follicular reserve in mice *Fertil Steril*. 2001 Sep;76(3):628–9
31. Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14: 1718 –29
32. Behringer K, Breuer K, Reineke T, et al: German Hodgkin's Lymphoma Study Group; Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen and the use of oral contraceptives during therapy. *J Clin Oncol* 2005;23: 7555–7564
33. Karashima T, Zalatnai A, Schally AV. Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against chemotherapy-induced testicular damage in rats. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85: 2329–33.
34. Ataya K, McKanna JA, Wintraub AM, Clark MR, LeMaire W. A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. *Cancer Res* 1985;45: 3651– 6.
35. Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PC. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosaluteal cells. *Endocrinology* 1994;135:1740–6
36. Blumenfeld Z. Gynecologic Concerns for young women exposed to gonadotoxic chemotherapy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003; 15: 359 – 70
37. Grundker C, Emons G. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 65 – 71
38. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz- Friedman. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid

sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000; 6: 1109 – 14

39. Ataya K, Moghissi K. Chemotherapy induced premature ovarian failure: Medications and prevention. *Steroids* 1989;54: 607– 26.
40. Ataya K, Rao L.V, Lawrence E, Kimmel R, Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamideinduced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol. Reprod.* 1995;52: 365–372
41. Alletti GD, Long HJ, Podratz KC, Cliby WA. Is time to chemotherapy a determinant of prognosis in advanced-stage ovarian cancer? *Gynecol Oncol* 2007; 104:212–6.
42. Stadel BV. The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975;123:772–774
43. Ohtani K. Effects of gonadotropin on the growth of malignant ovarian neoplasms assessed by subdural capsule assay. *Nippon Sanka Fujinka Gakki Zasshi* 1990; 42: 579 –585
44. Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T: Gonadotropin releasing hormone receptor in gynecologic tumors, frequent expression in adenocarcinoma histologic types. *Cancer* 1994;74: 2555–2561
45. Kim JH, Park DC, Kim JW, et al. Antitumor effect of GnRH agonist in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 170–80.
46. Emons G, Ortmann O, Teichert H, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin in combination with cytotoxic chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma. A prospective double blind randomized trial. Decapeptyl ovarian cancer study group. *Cancer* 1996;78: 1452–1460
47. Miller DS, Brady MF, Barrett RJ. A phase II trial of leuprolide acetate in patients with advanced epithelial ovarian carcinoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Am J Clin Oncol* 1992; 15: 125–128



48. Gerschenson M, Paik CY. Cisplatin exposure induces mitochondrial toxicity in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 525–531
49. Kalil NG, McGuire WP. Chemotherapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2002;16:553–7
50. Letterie GS. Anovulation in the prevention of cytotoxic-induced follicular attrition and ovarian failure. *Human Reprod.*2004;4: 831–7
51. Smith BJ, Plowchalk DR, Sipes IG, Mattison DR. Comparison of random and serial sections in assessment of ovarian toxicity. *Reprod Toxicol* 1991;5: 379–83.
52. Özdamar Saim. Histoloji ve Embriyoloji Ders Notları. Histolojik Teknikler. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri 2000, no:36 sayfa: 2–7
53. Reichman BS, Green KB. Breast cancer in young women: effect of chemotherapy on ovarian function, fertility, and birth defects. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994;16: 125–129.
54. Chapman RM, Sutcliffe SB, Malpas JS. Cytotoxic-induced ovarian failure in women with Hodgkin’s disease. I. Hormone function. *J Am Med Assoc* 1979;242:877–81.
55. Ataya KM, McKanna JA, Weintraub AM, Clark MR, LeMaire WJ A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. *Cancer Res* 1985; 45: 3651–6
56. Bokser L, Szende B, Schally AV. Protective effects of D-Trp6 luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. *Br J Cancer* 1990;61: 861–5.
57. Yuan GW, Shen K, Yang JX. Study of the prevention of chemotherapy-induced ovarian damage by gonadotropin-releasing hormone agonist in rat model. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2005; 40: 666–9

58. Franke HR, Smit WM, Vermes T. Gonadal protection by a gonadotropin-releasing hormone agonist depot in young women with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. *Gynecological Endocrinology*, 2005; 20: 274 – 278
59. Blumenfeld Z. Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and –B as markers. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 93–105
60. Recchia F, Sica G, De Filippis S et al. Goserelin as ovarian protection in the adjuvant treatment of premenopausal breast cancer: a phase II pilot study. *Anticancer Drugs* 2002;13: 417–424

TC.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

M. GÜNÖZ TÜRKÜMAYIŞI Aİ. PAKIŞTAKIŞI TIP-0714

Kemoterapi Rehbere Giderirken Sıvı Hızını Edli Çalışma, jüriimiz  
Grafik ve çizimler kullanılarak değerlendirilmiştir.  
tarafından Erciyes Üniversitesi Kadın Hastalıkları Bilim Dalı

Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 07/01/2008

İmza

Başkan M. İbrahim Başkaya İmza

Üye Bülent Özalp İmza

Üye Serdar Sarı İmza

Üye Erhan Dayer İmza

Üye Ömer Elmekci İmza