

49022.

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**KASTRE RAT UTERUS MODELLERİNDE ESTROJEN
VE PROGESTERON RESEPTÖR MANİPÜLASYONU
VE KLİNİK ADAPTASYONU**

UZMANLIK TEZİ

Dr. UĞUR SAYGILI

İSG. YÜKSEKÖĞRETİM REKTÖRLÜĞÜ
DOKÜMANTASYON MENREZİ

**TEZ YÖNETİCİSİ
DOÇ. DR. TURHAN USLU**

İZMİR - 1996

T. 49022

İÇİNDEKİLER

1- Giriş ve Amaç.....	1 - 4
2- Genel Bilgiler.....	5 - 23
3- Gereç ve Yöntem.....	24 - 30
4- Bulgular.....	31 - 34
5- Tartışma.....	35 - 39
6- Özet.....	40 - 41
7- Kaynaklar.....	42 - 47

ÖNSÖZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve prensiplerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Oktay ERTEN'e, Prof. Dr. Ata ÖNVURAL'a, Prof. Dr. Berrin ACAR'a, Doç. Dr. Namık DEMİR'e, Doç. Dr. Turhan USLU'ya, Doç. Dr. Bülent GÜLEKLİ'ye, Yard. Doç. Dr. Tijen ERÇAL'a, Yard. Doç. Dr. Atakan TOPUZ'a, Uzm. Dr. Cemal POSACI'ya ve Uzm. Dr. Yakup ERATA'ya teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda yardımlarını benden esirgemeyen başta tez yöneticim Doç. Dr. Turhan USLU olmak üzere Doç. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU'na, Doç. Dr. Sedef GİDENER'e, Prof. Dr. Ataman GÜRE'ye, Vet. Dr. Çetin PEKÇETİN'e ve Tıbbi Biyolog Mehmet ATEŞ'e ayrıca teşekkür ederim.

İhtisas hayatım boyunca bana umutalmaz anılar bırakan tüm çalışma arkadaşlarıma başarılar dilerim.

Dr. Uğur SAYGILI

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Steroid hormonlar, endometriumdaki etkilerini spesifik reseptörleri üzerinden gerçekleştirirler. Histolojik veriler, hormonal etkinliğin intrensek steroid reseptör aktivitesinin koordinasyonu ile direkt bağlantılı olduğunu göstermektedir. Estrojen ve progesteronun endometriumdaki hücelere etkileri dokuda çeşitli olayların oluşmasına yol açar. Burada önemli olan faktör dolaşımdaki steroid hormon miktarı ve hedef dokudaki spesifik reseptör konsantrasyonudur. Estrojen endometriumdaki hücelere proliferasyona yol açarken progesteron, estrojen etkisi altındaki bu endometriumu siklusun luteal fazında görülen sekretuar doku tipine döndürür. Bu doku değişimleri üreme çağındaki normal bir kadında siklik olarak devam eder. Siklus içerisinde endometrial steroid hormon reseptör düzeyleri de değişiklikler göstermektedir. Geç folliküler fazda estrojen reseptörleri bütün endometrial ve myometrial hücelerde maksimuma erişir. Erken luteal fazda bu reseptör konsantrasyonu azalır ve daha sonra orta ve geç luteal dönemde tekrar artış gösterir. Progesteron reseptörleri ise endometrial bez epitelinde geç folliküler ve erken luteal fazda maksimuma ulaşır ve daha sonra düşer. Reseptör konsantrasyonlarında görülen bu değişiklikler estrojen ve progesteronun siklik değişikliklerini yansıtır. Estrojen kendi reseptörlerini ve progesteron reseptörlerini artırırken, progesteron hem kendi hemde estrojen reseptör düzeylerini azaltıcı etki göstermektedir(1,2).

Genel olarak progesteron, estrojen uyarısı ile oluşan proliferasyon ve metabolizmayı inhibe eder. Bu blokaj, progestinlerin estrojen reseptör konsantrasyonunu azaltmaları, hücelerdeki estrojen salgılatan enzimleri ve estrojen bağımlı onkojen transkripsiyonu baskılamaları ile izah edilebilir. Bu özelliklerinden dolayı hedef dokularda progestasyonel ajanlarla estrojen reseptörlerinin tüketilmesi, estrojen tedavi programlarına progestinlerin eklenmesinin temel nedenidir.

Progestinlerin estrojen reseptörleri üzerine bu tür etkileri, etyolojisinde estrojenlerin sorumlu tutulduğu bazı patolojilerin tedavisinde kullanılmasını gündeme getirmiştir. Bu açıdan progestinlerin kullanılabileceği en önemli klinik durumlardan biri endometrial adenokarsinomlardır.

Endometrium kanseri günümüzde en sık karşılaşılan jinekolojik kanser türüdür. American Cancer Society'ye göre Amerika'da her yıl 34000 yeni vaka beklenmektedir. Bu nedenle, bu tümörler, serviks ve over karsinomlarına kıyasla, bunların iki katından daha fazla sıklıkla belirmektedir. Olguların %95'inden fazlasını endometrium kaynaklı tümörler oluştururken, yaklaşık %5'lik kısmını mezenkimal veya mikst tip tümörler oluşturmaktadır. Endometrium kanseri genel popülasyonda, postmenopozal kadınlar arasında yılda 1-2 / 1000 oranında görülür. Kadınlarda meme, bağırsak ve akciğer kanserlerinden sonra en sık görülen tümördür (3,4).

Araştırmalarda olguların çoğunda görülme yaşı 50-59 olarak bildirilmekle beraber ortalama yaş olarak 61 kabul edilmektedir. Hastaların % 20-25'i premenopozal dönemde, % 4-5'i ise 40 yaş altındadır.

Endometrium kanserinin etyolojisi kesin olarak bilinmemekle beraber uzun süreli karşılanmamış estrogen stimülasyonunun major bir faktör olduğu kabul edilmektedir (5). Bu şekilde kanser oluşumu estrogen etkisi ile basit hiperplaziden endometrium kanserine kadar giden geniş bir spektrum göstermektedir. Bazı olgularda ise karsinom endometrial hiperplazilerle ilişkili olmaksızın direkt meydana gelebilmektedir. Otörler tarafından kabul edilen görüş, estrojene bağımlı olarak oluşan tümörlerin, bağımsız olanlara göre daha iyi prognoza sahip olduğu yönündedir.

Endometrium karsinomlu olguların çoğu, tümörün erken belirti vermesi nedeni ile erken evrelerde (Evre I) yakalanmaktadır. Bu olgularda prognoz oldukça iyidir ve beş yıllık sağ kalım % 75-80 civarındadır. Ancak ileri evrelerde tanı konulduğunda prognoz dramatik olarak kötüleşmektedir. Beş yıllık sağ kalım oranları; evre II olgularda yaklaşık %55, evre III olanlarda %30 ve evre IV tümörlerde sadece %10'dur (6). İleri evre tümörlerde kötü prognozla doğru orantılı olarak rekürrens oranları da artmaktadır. Görüldüğü gibi endometrium kanserleri jinekolojik onkolojinin önemli problemlerinden biridir.

Endometrium kanseri tanısı konulduğunda hekimin elinde bir kaç tedavi seçeneği vardır. En başta gelen seçenek cerrahi olarak tümör dokusu ile beraber overlerin çıkarılması, yanı total abdominal histerektomi + bilateral salpingo-ooferektomi uygulanması ve cerrahi evreleme yapılmasıdır. Bu işlem sayesinde hem tümöral doku mümkün olduğunca çıkarılacak, hemde lenf nodu örnekleme ile beraber adjuvan

tedavinin gerekliliğini ortaya koymaya yarıyan evreleme yapılabilecektir. Bu işlem sonrasında myometrial invazyon derecesi, tümörün histolojik diferansiasyonu, evresi, histopatolojik tipi, lenfatik metastaz durumu, peritoneal sitoloji sonucu ve adneksial metastaz durumu gibi prognostik faktörler göz önünde bulundurularak ilave tedavinin gerekip gerekmeyeceğine karar verilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar tümörde reseptör düzeylerinin prognoz ile yakından ilişkili olduğunu göstermesi ve hormon tedavisine yanıtılığın anlaşılmasında çok önemli bilgiler vermesi üzerine pek çok klinik tarafından tümörün reseptör içeriği prognostik faktörler arasına girmiştir(7).

Prognostik faktörlerin değerlendirilmesini takiben genellikle verilen adjuvan tedavi kararı radyoterapi olmaktadır. Ancak, radyoterapinin kontrendike olduğu olgularda ya da adjuvan radyoterapiye rağmen rekürrens gösteren olgularda seçilecek tedavi şekli hormonal tedavi ya da sitotoksik kemoterapidir. Bu iki seçenektan hangisinin kullanılacağına belirlenmesinde tümörün reseptör içeriğinin bilinmesi çok önemlidir. Estrojen ve progesteron reseptörleri pozitif olan endometrium karsinomlu olgularda hormon tedavisi iyi bir seçim iken, bu iki reseptör negatif olanlarda sitotoksik kemoterapi tercih edilmelidir. Teorik olarak jinekolojik kanser alanları steroid bağımlı dokulardır ve bu hormonlar tedavide etkili olabilir. Hormon tedavisinin gerek kolay uygulanabilirliği, gerekse düşük toksiteye sahip olmaları, seçilmiş endometrium karsinomlu olgularda potansiyel olarak kullanılabilir hale gelmelerine yol açmıştır. Ancak, pratikte ne yazık ki durum bu kadar iç açıcı değildir. Bu tür olgularda hormonal tedavi amaçlı tercih edilen progestinlerin başarısı sınırlı kalmakta ve cevaplılığı %30-40 civarında olmaktadır. Progestinlere ortalama cevap süresi 20 ay olup tedaviye yanıt veren hastalar, vermeyenlere göre 4 kat daha uzun yaşamaktadırlar. Cevap alan hastaların %30'u 5 yıl yaşarken, cevap alınmayan hastaların tamamı bu süre içinde ex olmaktadır. Progesteron tedavisinin etkinliği rekürrens intervali uzun, iyi diferansiye ve genç hastalarda daha belirgin olmaktadır(8.9).

Yapılan çalışmalarda, progesteronun kendi reseptörleri üzerine inhibitör etki yarattığı ve uzun süreli kullanımda reseptörlerini azalttığı gösterilmiştir(10,11). Progesteron tedavisinin kısıtlı etkinliğide muhtemelen buna bağlıdır. O halde progesteron tedavisi alan hastalarda progesteron tedavisi ile beraber progesteron reseptörlerini arttıracak ajanların kullanılması prognozu ve sağ kalım oranını arttırabilecektir.

Bu çalışmada, bu mantıktan hareket edilerek progesteron reseptörlerini arttırabilecek ve aynı zamanda antiestrojenik etki yaratabilecek ajanların sıçanlara uygulanarak endometriumdaki estrogen ve progesteron reseptörleri üzerindeki etkilerini inceleyerek, elde edilen verilerin kliniğe adapte edilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Çalışma ile yakından ilgili konular açısından bu bölümde genel bilgiler verilmeye çalışılacaktır.

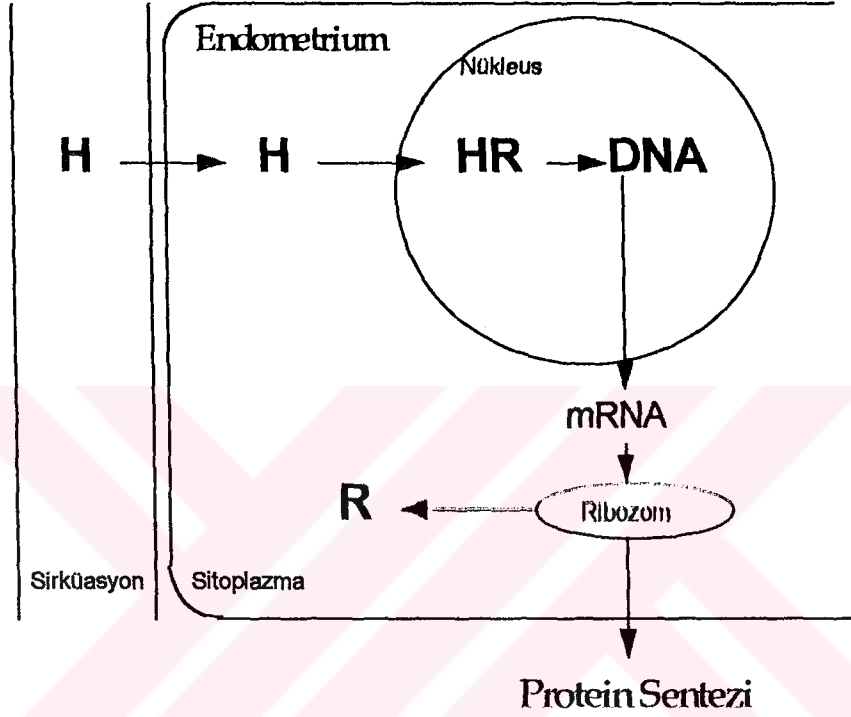
Reseptörler Hakkında Genel Bilgiler ve Sterod Hormonların Etki Mekanizması

Endometrium, hormonlara cevap veren bir doku tabakasıdır. Estrojen ve progesteronun reseptör proteinleri ile etkileşimleri endometriumda büyüme etkisi ile sonuçlanır. Estrojen hücrel proliferasyona yol açar. Normal estrojen etkisine maruz kalan endometrium, progesteron etkisi ile menstrual siklusun luteal fazında görülen tipik sekretuar doku tipine dönüşür. Progesteronun siklik etkisi, normal endometriumun hiperplaziye gidişini engeller. İşte bu etkileşimler arasındaki ince ayarın bozulması, değişik klinik görünümle ortaya çıkmaktadır.

Endometrium kanseri oluşumunda estrojenin, korunmasında da progesteronun yeri artık iyi bilinmektedir. Bu steroid hormonlar dokulardaki spesifik etkilerini intraselüler özel reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirmektedirler. Karaciğer, böbrek ve uterus gibi değişik dokularda benzer şekilde etki ederler (12). Etki mekanizmaları şu şekildedir ;

1. Hormon hücre membranını basit difüzyonla geçer
2. Nükleus membranına kadar ilerler ve burada reseptör proteine bağlanarak hormon-reseptör kompleksini oluşturur.
3. Nükleusta nükleer DNA ile hormon-reseptör kompleksi etkileşir.
4. mRNA sentezi olur.
5. mRNA nükleustan çıkarak ribozomlara taşınır
6. Spesifik hücre aktivitesini oluşturacak protein sentezi burada gerçekleşir.

Estrojenler, progesteron ve androjenler bu genel mekanizma ile etki ederler. Şekil 1'de bu hormonların etki mekanizmaları özetlenmiştir.



Şekil 1 : Sex steroid hormonların endometriumdaki hüresel etkileri (R=Reseptör, H=Sex Steroid Hormon).

Steroid hormonlar hücre membranını basit difüzyonla hızlı bir şekilde geçerler. Bu transferin gerçekleşmesinde sorumlu faktörler bilinmemekle beraber kan dolaşımındaki serbest hormon konsantrasyonunun hüresel fonksiyonun sınırlanmasında etkili ve önemli olduğu kabul edilmektedir(13).

Hücre içinde sex steroid hormonu nükleustaki spesifik reseptörüne bağlanır. Bu işlem sırasında reseptörde transformasyon veya aktivasyon olur. Böylece nükleus içinde hormon-reseptör kompleksi oluşur.

Oluşan hormon-reseptör kompleksi DNA üzerindeki spesifik bölgesine bağlanır ve hormona duyarlı genleri spesifik proteinler için kodlayıp, RNA kopyalanmasını sağlayan RNA polimerazı aktive ederek transkripsiyonu başlatır. Progesteron reseptörü α ve β olmak üzere iki subünite ayrılır(11). β subünit kromatin bağlayıcı alan içerir ve kromatindeki alıcı alana bağlanır. Bu kromatine bağlanmanın ardından bir DNA bağlayıcı alan içeren α subüniti DNA'ya bağlanır ve RNA transkripsiyonu başlar. Oluşan mRNA nükleustan çıkarak ribozomlara gelir ve buraya spesifik protein sentezinin şifrelerini getirerek, spesifik hücre aktivitesini oluşturacak protein sentezi gerçekleşir.

Hormonların biyolojik aktiviteleri sadece hormon-reseptör kompleksinin nükleer bölgede birleşmesiyle gerçekleşir. Reseptörler protein yapısındadırlar ve sentezleri sitoplazmada olmaktadır. Hormon bu esnada sitoplazmadaki reseptörlerle birleşilsede bu birleşim etkisizdir. Hormon ve reseptörlerin ayrılma oranları, nükleer kromatine bağlı kompleksin yarılanma ömrü gibi faktörler biyolojik cevapta önemli rol oynarlar. Hormon reseptör ilişkisinde önemli olan hormonun dozundan çok hormona maruz kalma süresidir (14). Estrojen-reseptör kompleksinin yarılanma ömrü uzun olduğu için dolaşımdaki az bir miktar estrojen etki oluşturmak için yeterlidir. Buna karşın progesteron reseptörlerinin yarılanma ömürleri kısa olduğundan daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç gösterir. Değişik östrojenlerin (E₁, E₂, E₃) farklı etki potansiyelleri, nükleusta hormon-reseptör kompleksinin devamlılık süresinin uzunluğu ile yakından ilişkilidir. Zayıf estrojen olan estriolün devamlılık oranı yüksektir. Bu durumu devamlı hormon uygulaması ile kompanse edilebilir.

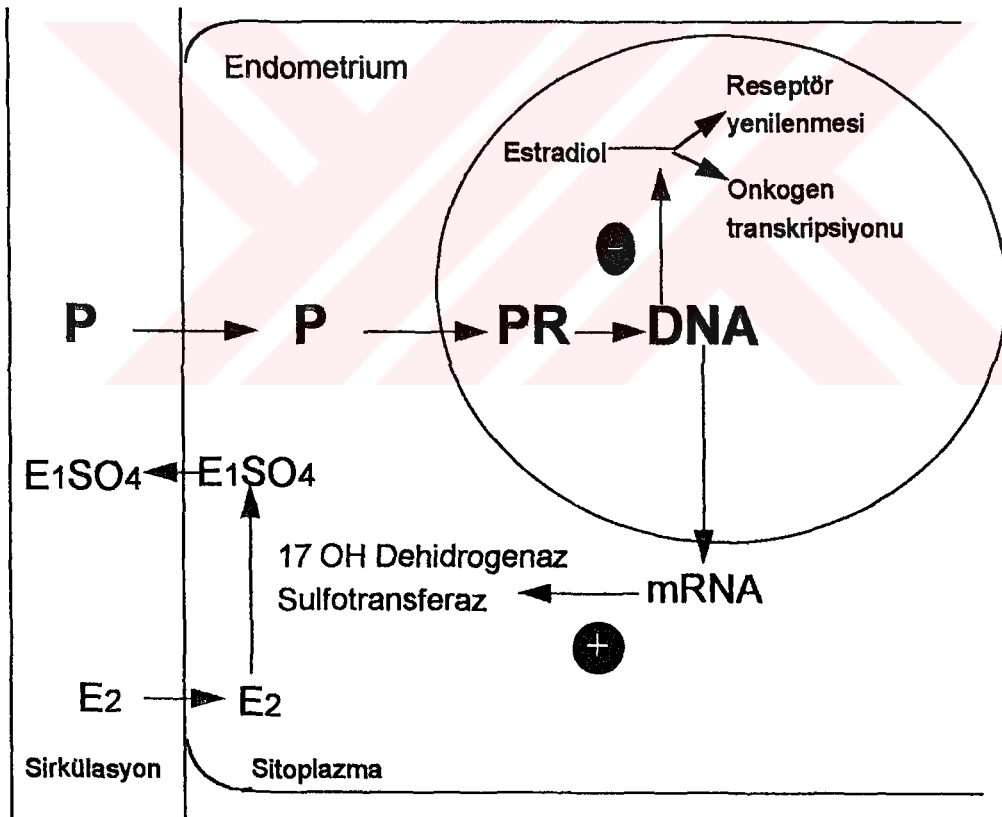
Estrojenin önemli bir etkisinde reseptör konsantrasyonlarını etkileyerek, kendisinin ve diğer steroid hormonların aktivitelerini değiştirebilmesidir. Estrojen, hedef organdaki kendisinin ve diğer steroid hormonların (progesteron ve androjenler) cevaplılığını, bu hormonların ve kendisinin intraselüler reseptör konsantrasyonunu artırarak etki gösterir. Progesteron, estrojenin bu etkisini bloke ederek reseptör konsantrasyonunu azaltır.

Steroid hormon reseptörleri devamlı olarak nükleustan dışarı çıkarak sitoplazmaya geçerler ve tekrar nükleusa dönerler.

Estriol estrojen reseptörüne estradiole oranla %20-30 daha az afinite gösterir ve bu nedenle hücreden daha hızlı temizlenir. Ancak estriol, estradiol ile oluşturulan etki

düzeyinde konsantrasyona ulaşırsa, eşit biyolojik cevap yaratabilmektedir (15). Diğer bir deyişle estriolün reseptöre karşı zayıf olan afinitesi dozu artırılarak kompanse edilebilir.

Progestasyonel ajanların hedef dokudaki estrogen reseptörlerini azaltması, estrogen tedavisi programlarına progestinlerin ilave edilmesini gündeme getirmiştir. Progestinler, reseptörler oluşmadan önce yıkımlarını artırarak etkilerini gösterirler. Böylece estrogenin indüklediği reseptör sentezini inhibe ederler. Bu etkilerinin yanında 17 hidoksisteroid dehidrogenaz ve sulfotransferaz enzimlerini indükleyerek, sitoplazmada bulunan ve potent estrogen olan estradiolün daha zayıf etkili olup, hücreden daha çabuk elimine edilen estron-sülfat haline dönüşümünü sağlarlar. Ayrıca estrogenin düzenlediği onkogen mRNA transkripsiyonunu süprese ederek, estrojene bağlı onkogenik büyümeleri inhibe ederler. Progesteronun hücresel düzeydeki etkileri şekil 2’de görülmektedir.



Şekil 2 : Progesteronun hücresel düzeydeki etkileri. (P=Progesteron, R=Reseptör, E2= Estradiol, E1SO4= Estron-Sülfat)

Progesteron reseptörleri estrogenler tarafından transkripsiyon fazında indüklenir. Progesterinler kendi reseptörlerini hem transkripsiyon hemde translasyon evresinde, muhtemelen reseptör fosforilasyonu yolu ile inhibe ederler (16).

Jinekolojik kanser alanları steroid bağımlı dokulardır ve bu hormonlar ile kontrol altına alınabilirler. Hormon tedavisinin gerek kolay uygulanabilirliği, gerekse düşük toksiteye sahip olmaları, seçilmiş jinekolojik kanserli olgularda potansiyel olarak kullanılabilir hale gelmelerine yol açmıştır.

Estrojen reseptörünün keşfi, hormon sensitif dokulardaki tümör biolojisinin anlaşılmasında önemli bir ilerleme olmuştur. Radiospektrometre gibi yeni teknolojilerin gelişmesi ile reseptör ölçümleri yapılabilmiş ve klinik kullanıma girmiştir. Radioaktif estradiol probunun geliştirilmesinden sonra steroid hormon reseptörlerinin aktiviteleri ve kantitatif ölçümleri yapılabılır hale gelmiştir. Reseptör varlığı önce meme kanserinde gösterilerek endokrin tedaviye yanıtla, estrojen reseptörü içeriği arasında iyi bir korelasyon olduğu bildirilmiştir(17). Ardından yapılan çalışmalarda, normal endometrium, hiperplastik endometrium, endometrial karsinom ve over karsinomlarında da bu reseptörlerin var olduğu ortaya konmuştur(18-19).

Endometrium Kanseri

Endometrium kanseri 1950 yıllarından itibaren tüm dünyada, özellikle gelişmiş ülkelerde bir artış göstermiş ve 1970'li yıllardan sonra kadın üreme organlarının en sık karşılaşılan tümörü haline gelmiştir. Olguların büyük bir kısmını endometrium kaynaklı tümörler oluştururken, az bir kısmını mezenkimal veya mikst tip tümörler oluşturmaktadır. Endometrium kanseri genel popülasyonda, postmenopozal kadınlar arasında yılda bin kadında 1-2 oranında görülür ve meme, bağırsak ve akciğer kanserlerinden sonra kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser türüdür(3,4). Endometrium kanseri doğurganlık yıllarında ve menopoz döneminde her zaman görülebildiği halde özellikle postmenopozal bir hastalıktır ve çoğunlukla kendisini postmenopozal kanama ile belli eder. Görülme yaşı 50-59 olarak bildirilmekle beraber, genellikle kabul edilen ortalama yaş 61'dir. Hastaların % 20-25'i premenopozal dönemde, % 4-5'i ise 40 yaş altındadır.

Endometrium karsinomlu hastalarda estrojen metabolizmasında değişikliklerin olması ve dışarıdan estrojen alan kadınlarda görölmesi nedeni ile estrojenler etken faktör olarak gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, karşılanmamış estrojen kullanan kadınlarda endometrial kanser insidansında kesin artış olduğunu göstermiştir. Kanser riski estrojen dozu ve kullanılma süresi ile ilişkili bulunmuştur. Bunun yanında hiç estrojen alımı ile ilişkisi bulunmayan kişilerde de bu hastalığa rastlanmaktadır. Bu olgularda kanserin estrojen stimülasyonundan bağımsız olarak oluştuğu düşünölmekte ve prognozusunun estrojene bağlı gelişenlerden daha kötü olduğu kabul edilmektedir.

Endometrium karsinomlu olgular diğer jinekolojik tümörlü olgulara oranla daha şanslıdırlar. Çünkü, tümörün erken dönemde klinik olarak semptom vermesi, erken evrede tanı konulmasına yol açmakta, bu da direkt olarak sağ kalım oranını yükseltmektedir. Olguların yaklaşık %75'i evre I iken tanı almaktadır. Ancak, ileri evreli olgular gerek rekürrens oranları, gereksede sağ kalım oranları açısından diğer jinekolojik tümörlerle hemen hemen aynı şansa sahiptirler.

Endometrium kanseri için belirlenen major ve minor risk faktörleri vardır.

Major Risk Faktörleri :

1. Obesite
2. Geç Menopoz
3. Eksojen Estrojen Kullanımı

Minör Risk Faktörleri :

1. İnfertilite (Nulliparite)
2. Polikistik Over Sendromu
3. Anovulatuvar Siklus
4. Diabetes Mellitus
5. Hipertansiyon

Obes, nulliparı ve 52 yaşından sonra menopoza giren kadınlarda, bu özellikleri olmayan kadınlara göre endometrium kanseri riski 5 misli yükselmektedir. Obes kadınlarda riskin, özellikle yağ dokusunda androstenedionun estrona, bunun da daha etkili estradiole dönüşmesi ve ayrıca sex hormon bağlayıcı globulinin bu kadınlarda

azalması nedeniyle serbest estrojenin artmasına bağlı olarak arttığı öne sürölmektedir(20). Diabetes mellitusu olan kadınlarda bu riskin 2.8 kat arttığı ve endometrium kanseri tanısı konulan kadınların % 25'inde hipertansiyon gözleendiğinin bildirilmesine rağmen, bu iki klinik tablonun yaşı ilerledikçe görölme oranlarında arttığından risk faktörü olup olmadıkları tartışma konusudur (21).

Endometrium kanserinde prognozu etkileyen faktörler vardır. Bu faktörler prognoz hakkında bilgi verdikleri gibi, seçilecek tedavinin belirlenmesinde ve ilave tedavi gerekliliğinin ortaya konmasında çok faydalıdır.

Bunlar :

- Tümörün histolojik diferansiasyonu
- Tümörün evresi
- Tümörün histopatolojik tipi
- Myometrial invazyon derecesi
- Lenfatik metastaz
- Peritoneal sitoloji
- Adneksial metastaz
- Servikal invazyon
- Reseptör düzeyi

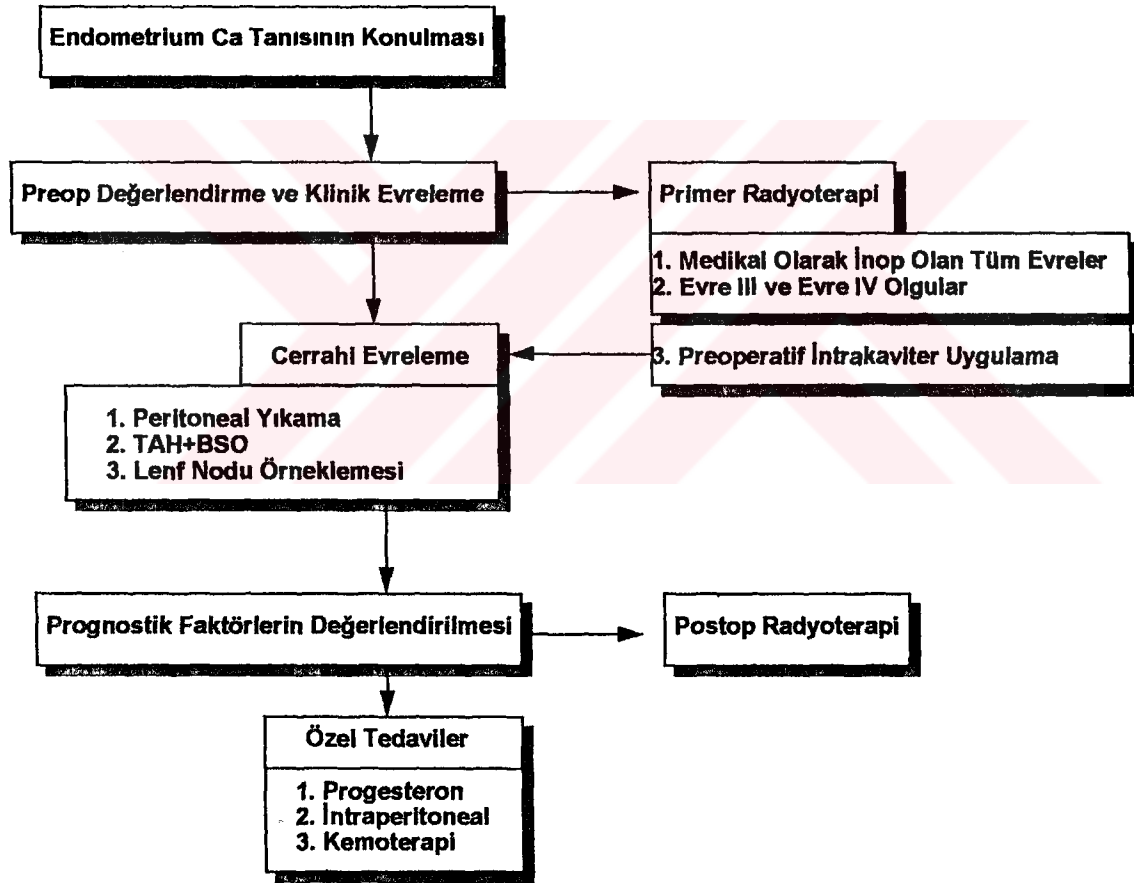
Endometrium kanserinde progestin tedavisi yaklaşık 20 yıldır gerek primer tedavide rekürrenslerin önlenmesi amacı ile, gereksede rekürrens olgularda tedavi amacı ile kullanılmıştır. Progestin tedavisinin değişik duyarlılıkları bildirilmekte ve pek çok faktörün bu duyarlılığı etkilediği düşünölmektedir. Bu faktörler şu şekilde özetlenebilir ;

1. Histolojik diferansiasyonun derecesi
2. Hastanın yaşı
3. Metastazın lokalizasyonu ve yaygınlığı
4. Önceden radyoterapi aldığı bölgede rekürrens ortaya çıkması
5. Primer tedavi ile rekürrens tanısı konulması arasında geçen zaman
6. Progestin tedavisinin dozu ve tipi

7. Progesteron tedavisinin süresi

Endometrium kanserinde erken evrelerde primer tedavide tercih edilen yöntem cerrahidir. Medikal nedenlerle inoperabl olan ya da evre III veya IV olan olgularda primer olarak radyoterapi uygulanır. İleri evre ya da rekürrens gelişen olgularda progesteron tedavisi düşünülebilir. Özellikle estrogen ve progesteron reseptörü pozitif olan tümörlerde progesteron tedavisi daha başarılı olmaktadır.

Endometrium karsinomu tanısı konulan olgularda tedavi yönlendirmesi şekil 3’de görülmektedir.



Şekil 3 : Endometrium Karsinomunda Tedavi Şeması

Endometrium kanserinde rekürrenslerin çoğu üst vagina sınırlarının dışında görülmekte ve cerrahi veya radyoterapi için uygun bölgelerde bulunmamaktadır. Bu hastalarda radyoterapi, özellikle primer tedavi olarak kullanılmışsa sınırlı etkinliğe

sahiptir. Böyle durumlarda, endometrium rekürrent karsinomunda hormonal tedavi veya kemoterapi seçilecek tedavi şekli olabilmektedir.

Progestinler ilave bir tedavi şeklinde, endometrium kanserinde rekürrensleri önleyebilmede bir ümit kaynağı olarak düşünülmüştür. Lewis ve arkadaşlarının bir randomize çalışmalarında, endometrium karsinomlu hastalar postoperatif iki gruba ayrılarak, bir gruba medroksiprogesteron asetat, diğer gruba plasebo verilmiş ve dört yıllık sağ kalım açısından bakıldığında her iki grubun benzer olduğu bildirilmiştir (22). Kauppila ve arkadaşları 1100 den fazla endometrium karsinomlu hastaya cerrahi veya radyoterapiden sonra iki yıl süre ile progestin tedavisi verdiklerini, evre I, iyi diferansiye tümörlü olgularda rekürrensin görülmediğini, bu nedenle bu hastalarda profilaktik progestin tedavisinin etkili olmadığı inancında olduklarını bildirmişlerdir(23). Yine DePalo ve arkadaşlarının bir prospektif çalışmalarında adjuvant medroksiprogesteron asetat tedavisi alan 363 evre I endometrium karsinomlu hasta ile 383 ilave tedavi almayan evre I olgu, rekürrens ve sağ kalım açısından karşılaştırıldıklarında iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılığın olmadığı gözlenmiştir(24). Macdonald ve arkadaşlarının İngiltereden bildirdikleri bir randomize çalışmalarında evre I veya evre II endometrium karsinomlu 429 hastadan, 214'üne postoperatif medroksiprogesteron asetat verildiği, 215 olguya ise herhangi bir ek tedavi verilmediği bildirilmiş ve beş yıllık sağ kalım bakımından incelendiğinde iki grup arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir(25).

Progestinler yirmi yıldan uzun süredir kullanılan, endometriumun rekürrent karsinomlarına cevaplılığı kanıtlanmış ajanlardır. Tüm rekürrent endometrium karsinomlu olguların yaklaşık üçte birinin bu hormona cevap verdiği kabul edilmektedir. Progestinlere cevap verme oranı tümörün diferansiyasyonu ile yakından ilişkilidir. Kohorn ve arkadaşlarının bir çalışmalarında, 103 endometrium karsinomlu olgu tümör diferansiyasyonuna göre gruplandırılıp progestin tedavisine yanıtılığı incelenmiş ve sonuçta grade I olgularda cevaplılığın % 51.7, grade III olgularda ise %15.5 olduğu gözlenmiştir (26). Bu çalışmada da görüldüğü gibi iyi diferansiye tümörler, orta veya kötü diferansiye olanlara oranla daha iyi cevap vermektedir. Jinekolojik Onkoloji Grubu tarafından bildirilen bir çalışmada ileri evre veya rekürrent endometrium karsinomu olan 420 hastaya günde 3 kez 50 mg peroral medroksiprogesteron asetat verilmiş, hastalıkları

objektif olarak değerlendirilebilen 219 hastadan sadece 17 (%8) sinde tam cevaplılık 13 (%6) ünde kısmi cevaplılık, dörtte birinden fazlasında hastalık stabil kalmış, üçte birinde ise ilerleme göstermiştir. Ortalama sağ kalım 10.5 ay olarak bildirilmiş ve iyi diferansiye grade I lezyonların, kötü diferansiye grade III lezyonlara oranla daha fazla cevap verdiği bildirilmiştir. Yine Jinekolojik Onkoloji Grubu tarafından bildirilen başka bir randomize çalışmada medroksiprogesteron asetat dozu 1000mg verilenlerle, 200mg verilenler cevap oranı ve sağ kalım açısından karşılaştırılmış ve iki grup arasında anlamlı farklılık olmadığı bildirilmiştir(27).

Son zamanlarda neoplastik insan uterin dokusunda spesifik estrogen ve progesteron reseptörlerinin varlığının gösterilmesi bu konuya olan ilgiyi arttırmıştır. Bu reseptörlerin varlığı tümörden tümöre değişiklik göstermektedir. İyi diferansiye tümörlerde estrogen ve progesteron reseptörlerinin her ikisinin birden yüksek oranda görülmesine karşın, kötü diferansiye tümörlerde daha düşük oranlarda pozitif olmaktadır.

Estrogen ve progesteron reseptörü içeren olguların sadece üçte birinde rekürrent kansere rastlanması ve rekürrent endometrium kanserli olgularda progesteronun reseptör pozitifliğinde daha etkili olması, reseptör varlığının önemli bir prognostik faktör olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar progesteron tedavisinin başarısı ile progesteron reseptörü pozitifliği arasında mükemmel bir korelasyon göstermektedir. Görülen bu başarı, araştırmacıların konu üzerine daha çok eğilmelerine neden olmuştur. 1980 yılında Creasman ve arkadaşlarının bir çalışmasında 24 grade I, 24 grade II, 16 grade III ve 14 rekürrent endometrium adenokarsinomlu olguda reseptör düzeylerine bakılmış ve grade I de %83, grade II de %58, grade III de %31 ve rekürrent tümörlerde %36 oranlarında estrogen ve progesteron reseptörleri pozitif bulunmuştur(28). 1985 yılında yine Creasman ve arkadaşlarının 168 evre I ve II endometrium karsinomlu olgu üzerinde yaptıkları diğer bir çalışmalarında reseptör içeriğinin histolojik ve nükleer diferansiyasyon, klinik evre, miyometriyal invazyon, peritoneal sitoloji, ektrauterin metastaz ve servikal tutulum gibi diğer prognostik faktörlerle ilişkilerini incelemişler ve şu sonuçlara varmışlardır(29) ;

- Estrogen reseptör durumu, histolojik diferansiyasyon, nükleer diferansiyasyon ve ektrauterin metastazların varlığı ile ilişkili bulunmuş diğer faktörlerle ilişkisiz olduğu bildirilmiştir.

- Progesteron reseptör durumu, sadece histolojik diferansiyasyon ve histolojik hücre tipi ile ilişkili bulunmuştur.
- Estrojen ve progesteron reseptörlerinin durumunu birlikte değerlendirdiklerinde, peritoneal sitoloji, ekstrauterin metastaz, histolojik diferansiyasyon ve histolojik hücre tipi ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

İki yıllık hastalıksız sağ kalım göze alındığında, estrojen, progesteron ve hem estrojen hem de progesteron reseptörleri pozitif olan olgularda negatif olanlara oranla daha iyi olduğu gözlenmiştir (Tablo 1).

	İki Yıllık Sağ Kalım	<i>p</i>
	%	
Estrojen Reseptörü (n:168)		
Pozitif	90	<0.01
Negatif	67	
Progesteron Reseptörü (n:105)		
Pozitif	92	<0.001
Negatif	56	
Estrojen+Progesteron Reseptörü(n:105)		
Her İkisi Pozitif	94	<0.01
Diğer	66	

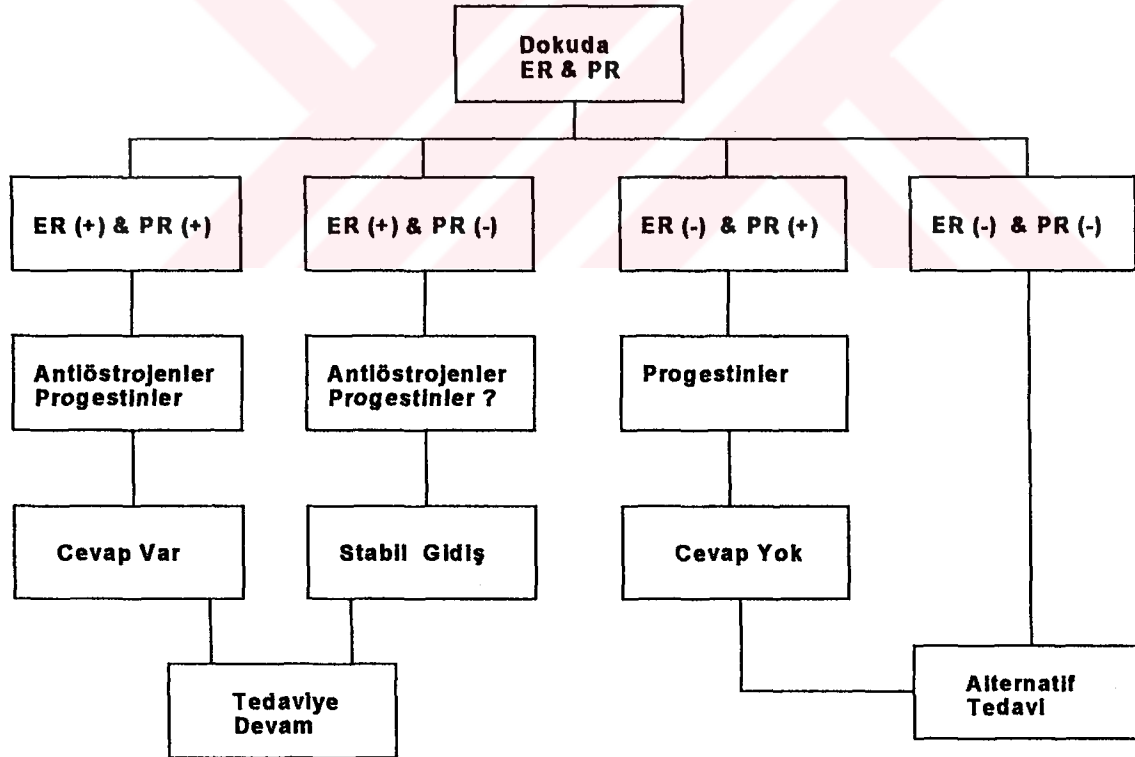
Tablo 1 : Endometrium kanserinde reseptör durumuna göre 2 yıllık sağ kalım oranları (Creasman ve ark. Am J Obstet Gynecol, 151 : 922, 1985).

Ehrlich ve arkadaşlarının daha güncel bir çalışmalarında 175 endometrium karsinomlu olguda tespit edilen steroid reseptörlerinin klinik sonuçlarla ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre progesteron reseptörünün tümörün histolojik diferansiyasyonu, adneksiyal yayılımı, hastanın yaşı ve daha önemlisi rekürrens oranı ile ilişkili olduğu, estrojen reseptörünün ise sadece rekürrens oranı ve adneksiyal tutulum bakımından önemli olduğu gözlenmiştir. Ortalama olarak 27.3 ay takip edilen olgularda progesteron reseptörü pozitif olanlar için rekürrens oranı %7 iken, negatif olanlar da bu oranın %37.2 ye çıktığı bildirilmiştir. Benzer bir şekilde estrojen reseptörü pozitif

olanlarda rekürrens oranı %12.7 iken, negatif olanlarda bariz bir artış izlenerek %41.2'ye çıktığı bildirilmiştir(30). Yine aynı çalışmada sağ kalım oranı açısından bakıldığında progesteron reseptörü pozitif olanlarda daha yüksek iken, estrogen reseptörü ile arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Endometrium karsinomunda prognostik faktör olarak estrogen ve progesteron reseptörünün önemini gösteren Benraad(31), Quinn(32) ve Kauppila(33) nın ayrı çalışmaları değerlendirildiğinde Ehrlich ve Creasman'ın çalışmalarında bulunan korelasyon aynı şekilde izlenmektedir. Tüm bu çalışmalara göre progesteron reseptörü pozitif olan endometrium karsinomunda progestinlere cevaplılık %80'lere ulaşabiliyorken, reseptör bulunmayanlarda cevaplılık %5'lerde kalmaktadır. Bu rakamlar reseptörlerin prognoz üzerindeki önemli rolünü göstermektedir.

Dokudaki estrogen ve progesteron reseptörü durumuna göre tedavinin yönlendirilmesi şekil 4 te gösterilmiştir.



Şekil 4 : Tümöral dokulardaki estrogen ve progesteron reseptör içeriğine göre seçilecek tedavi yolları.

Rekürrent endometrium kanseri tedavisinde seçilecek tedavi şeklinin belirlenmesinde steroid reseptörlerinin tespit edilmesi önemlidir. Eğer tümörde estrogen ve progesteron reseptörleri bulunur ise kötü diferansiye bile olsa progestinlere yanıt şansı yüksekken, reseptör olmayanlarda bu cevaplılık düşük olacaktır. Bu nedenle reseptör bulunmayan olgularda düşük başarı şanslı progestin tedavisine hiç başlanmadan direkt sitotoksik tedaviye başlamak zaman kaybetmemek bakımından önemlidir. Kauppila ve arkadaşları bir çalışmada estrogen ve progesteron reseptöründen fakir endometrium karsinomlu olguların, yüksek reseptör düzeyli olgulara oranla sitotoksik kemoterapiye daha iyi yanıt verdiğini bildirmektedir(34). Yine bu çalışmada endometrium kanserinde ilave tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde ve uygulanacak ajanın seçilmesinde reseptör analizinin önemi ortaya konmaktadır.

Kauppila'nın literatürdeki beş çalışmayı derlediği bir yazısında progesteron reseptörü pozitif olguların %89'unda tedaviye yanıt izlenirken, negatif olanlarda bu oran sadece %17 olarak bildirilmiştir(35). Ancak Jinekolojik Onkoloji Grubunun verilerine bakıldığında durum bu kadar iç açıcı değildir. Buna göre estrogen ve progesteron reseptörü pozitif olanlarda progestin tedavisine yanıt %40 iken, negatif olanlarda bu oran %12 olarak bulunmuştur. Ama yinede bu çalışmalar tümördeki reseptör içeriğinin tedavi yönlendirmede önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Progestin tedavisi bir kaç farklı şekilde verilebilmektedir. Bunlar içinde 400 mg medroksiprogesteron asetat haftalık intramusküler enjeksiyonlar, peroral 150 mg / gün medroksiprogesteron asetat veya 160 mg / gün megestrol asetat en çok tercih edilenlerdir. Tedaviye eğer objektif cevap gözleniyorsa devam edilmeli, şayet tedaviye rağmen ilerleme izleniyorsa kesilip kemoterapi düşünülmelidir.

Progesteron tedavisinin sınırlı başarısı muhtemelen kendi reseptörlerini azaltmasına bağlıdır. Endometrial adenokarsinomlu olgularda uzun süreli medroksiprogesteron asetat kullanıldığında progesteron reseptörlerinin çok azaldığı gözlenmektedir(36). Progesteron reseptör konsantrasyonunun yükseltilmesi tedavi etkinliğinin artırılması açısından önemli olabilir. Endometrium karsinomlarında progesteron reseptörlerinin artırılmasına ilişkin literatürde çalışma yoktur ancak değişik amaçlarla bazı ajanların progesteron reseptörleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu konuda en çok üzerinde durulan maddeler danazol ve tamoxifendir.

GnRH analogları son yıllarda jinekolojik kanserlerin tedavisinde yeni bir umut olarak denenilmektedir. Etkili olduğunu bildiren araştırmalar olsada etki mekanizması konusunda çelişkiler vardır.

Aşağıda, çalışmada kullanılan bu üç madde hakkında genel bilgiler verilmiştir.

Danazol

Danazol, ilk kez 1963 yılında Manson ve arkadaşları tarafından bulunan 17 α etiniltestosteronun bir isoxasole derivesi olup, kadın üreme sisteminde değişik etkilere yol açan bir maddedir (37). En popüler klinik kullanımı endometriozis tedavisi olmakla birlikte çeşitli meme patolojileri, puberte prekoks, premenstrüel sendrom, herediter anjioödem tedavisi gibi değişik amaçlarla da kullanılmaktadır(38).

Danazolün etkileri şu şekilde özetlenebilir(39) :

- Hücresel düzeyde androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak agonistik ve antogonistik etkiler oluşturur.
- İntraselüler estrogen reseptörlerine bağlanmaz.
- Sex hormon bağlayıcı globuline bağlanarak serbest testosteronda, kortikosteroid bağlayıcı globuline bağlanarakta serbest kortizolde yükselmeye yol açarlar.
- Karaciğerden Sex hormon bağlayıcı globulin sentezini azaltırlar.
- Siklus ortası FSH ve LH pikini engeller, ancak bazal FSH ve LH düzeylerini önemli derecede etkilemez.
- Aşağıdaki enzimler üzerinde inhibitör etki gösterir.

Kolesterol Klivaj Enzim

3 β hidroksisteroid dehidrogenaz

17 β hidroksisteroid dehidrogenaz

17,20 desmolaz

17 α hidroksilaz

11 β hidroksilaz

21 hidroksilaz

- Aromatizasyon üzerine etkisizdir.

Danazol bu etkileri sonucunda hipoestrojenik ve hiperandrojenik bir durum yaratmaktadır.

Barbieri ve arkadaşlarının çalışmalarında danazolün sıçan uterusunda bulunan steroid reseptörlerle etkileşimleri incelenmiş ve danazolün hedef organda progesteron ve androjen reseptörlerine kuvvetli, estrogen reseptörlerine ise çok zayıf bağlandığı gözlenmiştir(40). Chamness ve arkadaşlarının aynı amaçla yaptıkları diğer bir çalışmada ise yine danazolün progesteron ve androjen reseptörlerine bağlandığı, estrogen reseptörlerine hiç bağlanmadığı bildirilmiştir(41). Danazolün progesteron reseptörleri üzerine etkilerini araştırmada endometrial kanser hücre kültürleri önemli faydalar sağlamıştır. Bu kültür ortamı kullanılarak Terakawa ve arkadaşlarının çalışmalarında danazolün kanser hücre gelişimini yavaşlattığı, bu etkisini progesteron reseptörlerini artırarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (42). Gledhill ve arkadaşlarının sıçan uterusunda ve meme kanser hücre kültüründe, danazolün progesteron reseptörü üzerine etkilerini araştırdıkları güncel çalışmalarında, meme kanser hücre kültüründe danazol verilen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında danazol grubundaki progesteron reseptör düzeyi kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada danazolün sıçan uterusundaki progesteron reseptör konsantrasyonunu iki kat arttırdığı gözlenmiştir (43). Kastre sıçanlarda oluşturulan endometriotik odaklardaki steroid reseptörler üzerine danazol ve GnRH analoglarının etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, danazolün hem estrogen hem de progesteron reseptörlerini anlamlı düzeyde arttırdığı buna karşın GnRH analogunun bu reseptör düzeylerini etkilemediği tespit edilmiştir (44). Endometrial kanser hücrelerinin bazal membrana olan migrasyon potansiyelleri üzerine danazol, progesteron, tamoxifen ve estrogenin etkilerini araştıran Fujimoto ve arkadaşları, estrogenin kanser hücrelerinin invazyon yeteneğini estrogen reseptörü aracılığı ile arttırdığını, buna karşın diğer üç ajanın bu yeteneği azalttığını gözlemlemişlerdir (45).

Bütün bu çalışmalar danazolün gerek antiöstrojenik etkisiyle, gerekse de progesteron reseptör konsantrasyonunu artırarak endometrium karsinomlarında etkin bir

tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir. Ancak günümüzde endometrium karsinomlarının tedavi protokollerinde danazol yer almamaktadır.

Tamoxifen

Tamoxifen sentetik, nonsteroidal, trimetiletilen derivesi olan, uzun etkili antiestrojenik bir maddedir ve yapısal olarak dietilstilbestrole benzer. Tamoxifen estrogen reseptörlerine bağlanarak estrogenin reseptöre bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ederler. In Vitro olarak estrogenin kendi reseptörüne bağlanma kapasitesi tamoxifene oranla 100 -1000 kat daha fazladır. Diğer bir deyişle tamoxifenin kanser hücreleri üzerine inhibitör etki göstermesi için estrojenden 100 - 1000 kat daha fazla konsantrasyonlarda olması gerekmektedir(46). Hem antagonistik hemde agonistik etki yapabilir. Bu mixt davranış türe, organa, dokuya ve hücre çeşidine göre değişmektedir. Tamoxifen tek başına verildiğinde fare uterusunu büyütürken, estrogenle birlikte verildiğinde bu büyümenin durduğu görülür. Bu stimülatör ve inhibitör fonksiyonlar endometriumun epitel hücrelerine olup, stroma ve myometrium hücrelerine etkisi hemen hemen hiç yoktur. Oysa ki esradiol tek başına üç bölgeye de etki yapmaktadır. Tamoxifenin neden bazı hücrelerde agonistik, bazı hücrelerde ise antagonistik etki gösterdiği anlaşılammıştır. Ancak bu ilaçlar estrogen reseptörlerine bağlanırlar ve çekirdekte birikerek antagonist-reseptör kompleksi oluştururlar. Bu birikime sitozolik reseptörlerin azalması ve çekirdekteki antagonist-reseptör kompleksinin artışı eşlik etmektedir. Coezy ve arkadaşları endometrial hücre kültüründe tamoxifenin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, tamoxifenin DNA polimerazın timidin ile bağlantısını inhibe ederek hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir(47).

Meme kanserinin adjuvant tedavisinde tamoxifenin önemli bir yeri vardır. Bu konu hakkında pek çok çalışma yapılmıştır ve hala da yapılmaktadır (48). Estrogen reseptörü pozitif postmenopozal meme kanserli oguların adjuvan tedavisinde geniş çapta kullanılan etkili ajanlardır. Yan etkilerinin minimal olması nedeni ile güvenle uygulanabilmektedir. Adjuvan tamoxifen tedavisi, hastalısız dönem intervalini ve sağ kalım oranını önemli ölçüde düzeltir. Ancak son zamanlarda yapılan pek çok çalışmada tamoxifenin çeşitli uterin patolojilere yol açtığı bildirilmektedir(49,50).

Tamoxifen estrogen antagonisti etki meydana getirir, etki mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır. Antiestrogenik etkisi sistemik dolaşımdaki estrogen düzeyine ve endometrial hücrelerdeki estrogen reseptörlerinin kapasitesine bağlıdır(49). Ancak menopoza gibi düşük estrogenli durumlarda estrogen reseptörü üzerine agonistik etki yaratabilmektedir (50,51). Tamoxifen değişik dokularda değişik etkiler oluşturabilmektedir. Örneğin meme dokusunda inhibitör etki yaratırken, endometrial dokuda bu etki stimülatör olabilmektedir. Estrogen yokluğunda endometrium hücrelerinin büyümesini artırırken, estrogen bulunduğunda hücre büyümesini inhibe etmektedir. Endometrium üzerindeki olumsuz etkilerinin progesteron tarafından engellenebileceği, ancak bu kombine kullanımdan hastanın lipid profilinin kötü yönde etkileneceğinin unutulmaması gerektiği bildirilmiştir (52).

Endometrium ve meme, morfolojik ve fonksiyonel olarak estrogen ve progesteron için hedef teşkil etmektedir. Bu hedef organlar için karsinojen kabul edilen estrogenlerin endometriumun ve memenin primer karsinomları, bunların metastazları ve rekürrensleri ile ilişkili bulunmuştur. O halde meme karsinomlarının tedavisinde yerini almış ve hakkında pek çok araştırma yapılmış tamoxifenin endometrium etkileri araştırılırken, meme karsinomu ile ilgili çalışmalar, örnek olarak düşünülebilir. Bunun tam tersine tamoxifenin memede oluşturacağı etkileri araştırmada endometrium da kullanılabilir. Bu mantıkla Lopez ve arkadaşlarının memenin fibrokistik hastalıklarında tamoxifenin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, doku incelemelerinde endometrium kullanılmıştır(53). Shinzaburo ve arkadaşları meme karsinomlu hastalarda tamoksifen kullanımı sonrası progesteron reseptör düzeylerini incelediklerinde belirgin artış izlediklerini bildirmişlerdir(54). Tamoxifenin endometrial reseptörler üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, tamoxifenin estrogen reseptörünü azalttığı, progesteron reseptörünü ise tedaviden önce tespit edilemeyecek düzeyde iken tedaviden sonra tespit edilebilecek düzeylere çıkarttığı gösterilmiştir(55). Satyaswaroop ve arkadaşlarında tamoxifenin progesteron reseptörlerini indüklediğini bildirmişlerdir(56).

Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonistleri (Gonadotrophin Releasing Hormone Agonist-GnRHa)

Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH), nukleus arkuatus ve hipotalamus anterior preoptik bölgesinde üretilir ve pulsatil bir şekilde salınır. Buradan portal sistemle ön hipofize taşınarak erkek ve dişilerde luteinizan hormon (LH) ve folikül stimulan hormon (FSH) sentez ve sekresyonunu stimüle eder. On aminoasitten oluşmuş bir dekapeptildir. Yarı ömrü 2-4 dakikadır. Bu dekapeptilin 6 ya da 10. sıradaki aminoasitlerin yerlerine başka bir aminoasitin getirilmesi ile agonist özellikli analogları, 2 ya da 3. sıraya yerleştirilmesi antagonistik özellikli analogların oluşmasına neden olur. GnRH agonisti uygulanması öncelikle hipofizer gonadotropin salınımını stimüle eder, ancak bir agonistin uygun olmayan şekilde (non pulsatil) ya da fizyolojik olmayan dozlarda sürekli veya tekrarlayıcı olarak uygulanması, hipofiz-gonad eksenini inhibe eder. Bu inhibisyonla oluşan fonksiyonel değişimler arasında, hipofiz GnRH reseptörünün azaltıcı regülasyonu, gonad gonadotropin reseptörünün azaltıcı regülasyonu, gonadotropin sekresyonunun azalması, steroidogenez ve gametogenezin azalması bulunur. Sonuçta hipogonadotropik hipogonadik bir durum yaratırlar. Doğal GnRH'nin yarı ömrü çok kısa iken, agonistlerinki 1.5 - 2 saat arasındadır. Analogların inhibitör etkileri tamamen reversibldir.

1980'li yılların başında yüksek doz GnRH agonisti uygulanması ile gonadotropin salınımının baskılanmasının meme, over, endometrium ve prostatta görülen bazı hormona bağımlı malign tümörlerin tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur(57,58). Srkaloviç ve arkadaşları 29 endometrial karsinom, 13 normal endometrium materyalinde spesifik GnRH bağlanma bölgesi araştırdıkları daha güncel çalışmalarında, endometrium karsinomlarında %77, normal endometriumda %23.1 spesifik bağlanma bölgesi tespit etmişlerdir(59). 1991 yılında Gallagher ve arkadaşları 17 rekürrent endometrium karsinomlu olguya GnRH agonisti tedavisi verdiklerinde %35'lik bir başarı elde etmişlerdir(60). Imai ve arkadaşları da endometrium kanser hücre kültüründe GnRH reseptörü tespit etmişler ve reseptör pozitifliğinin histolojik diferansiyasyonla alakalı olduğunu bildirmişlerdir(61). Bu çalışmalarda GnRH agonistlerinin endometrium karsinomlarında faydalı olabileceği söylenmekte ancak etki mekanizmaları tam olarak ortaya koyulmamaktadır. Örneğin GnRH agonisti ile tedavi sonrasında estrogen ve progesteron reseptör durumları belirlenmemiştir. Myomda ve myometriumda GnRH agonisti ile tedaviden sonra estrogen ve progesteron reseptör düzeylerinin incelendiği çok

güncel bir çalışmada, myomlarda progesteron reseptör düzeyinin tedavi alan grupta tedavi almayanlara oranla anlamlı yüksek olduğu ortaya konmuştur(62).

Ratlarda Genital Organ Anatomi Ve Histolojisi

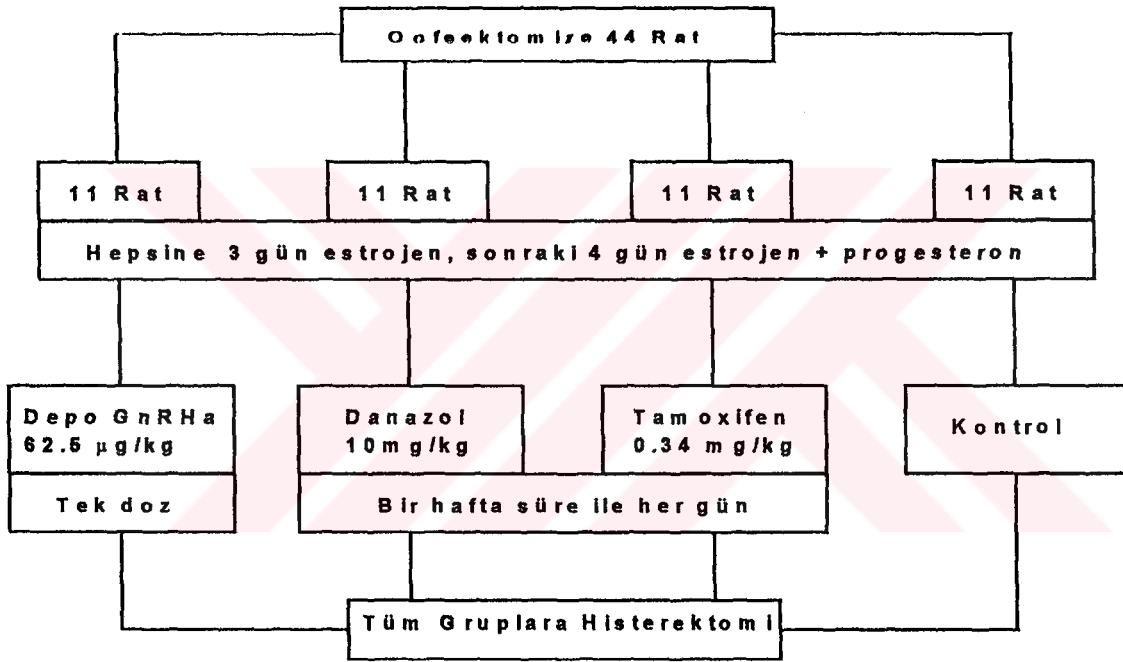
Rat vaginası 2 cm uzunluğunda 3-5 mm çapında dar lümenli bir tüptür. Vagina duvarı mukoza, muskularis ve adventisya olmak üzere üç bölümden meydana gelir. Müköz membran değişik sayıda longitudinal katlantılardan ve bezlerden meydana gelir ve üzeri ovarian siklusa göre değişen stratifiye skuamöz epitel ya da kolumnar epitel ile çevrilidir. Estrus fazında vagina stratifiye skuamöz epitel ile döşelidir. Metaestrus fazında stratifiye kolumnar musiparoz epitel ile yer değiştirerek deskuamasyon oluşur. Proestrusun sonunda tekrardan stratifiye skuamöz epitel oluşur. Subepitelyal konnektif doku serviks uteriye benzer. Musküler tabaka oldukça incedir ve elastik fibriller içerir.

Rat uterusu diğer kemirgenlerde olduğu gibi Y şeklinde bikornuattır. İki kısımdan oluşur. Birinci kısım iki boynuzsu uzantının olduğu kısımdır. İkinci kısım ise bu boynuzsu uzantılar ile vagina arasında bulunan kısımdır. Boynuz kısımları 4.5-5 cm uzunluğunda olup 2-3 mm çapındadırlar. Her boynuzun posterior kısmında uterusun damarlarını ve sinirlerini bulunduran mezenter vardır. Uterin boynuzlar mukoza (endometrium), muskularis (myometrium) ve seroza olmak üzere 3 tabakadan meydana gelir. Endometrium tek katlı kolumnar veya küboidal epitel ile döşeli olup, yer yer glandüler yapılar içerir. Myometrium tabakası içte sirküler ve dışta longitudinaldır. Myometriumun dış yüzü kollajen lifler ve mezotelden oluşan ince bir zar ile örtülüdür. Kornuların birleştiği ve vagina ile aralarında bulunan uterusun ikinci kısmı yaklaşık olarak 5 mm boyundadır ve 2 kavite içerir. Her bir kavite boynuzların bir uzantısıdır ve vagina ile ağzlaşır. Vajenle komşu olan alt kısmı stratifiye epitel ile örtülüdür. Burasıda aynı vagina gibi siklus içinde değişiklikler göstermektedir.

Ratların uterusu şekil olarak olmasa da, histolojik olarak insan uterusuna büyük benzerlikler göstermektedir. Bu nedenle de experimental deneylerde en çok tercih edilen hayvanlardan biri olmaktadır(63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İleri evre ya da rekürrens endometrium kanserli olguların tedavisinde kullanılan progesteronun daha etkili olmasını sağlamak için progesteron reseptörlerinin artırılması mantığı ile planlanan bu tez çalışmasında ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 90-120 günlük toplam 44 adet Sprague-Dawley ratı kullanılmıştır. Danazol, tamoxifen ve GnRH agonisti uygulamaları sonrasında estrogen ve progesteron reseptör düzeyleri, hiç bir tedavi uygulanmayan kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılması planlanmıştır. Şekil 5 de çalışma grupları ve uygulanan ilaçlar şematize edilmiştir.



Şekil 5 : Çalışma programını gösteren şema.

Çalışma için kullanılacak ratlar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ından temin edilerek kısırsız rat yemi ile beslenmişlerdir.

Çalışmada ilk olarak tüm ratlar, endokrin fonksiyonlarını aynı düzeye getirmek için cerrahi olarak kastre edildi. Cerrahi işlem maksimum steriliteye dikkat edilerek yapılmış olup preop ya da postop antibiyotik tedavisi verilmedi. Ratlar entran inhalasyonu ile sedatize edildikten sonra sodyum nembital (Sodyum Pentobarbital) intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi sağlandı. Anestezi verildikten sonra sırt üstü supine pozisyonunda yatırılarak karınları traş edildi. Ardından karına yaklaşık olarak 4 cm'lik bir

insizyon uygulandı. Uterus ve overler gözlemlendikten sonra bilateral ooforektomi uygulanmış ve takibinde batin usulüne uygun olarak kapatıldı. (Resim 1,2,3) Yaklaşık bir aylık bekleme sırasında haftalık vajinal sitolojik incelemeler yapılarak hormonal değişiklikler gözlemlendi.

Tüm ratlara bir hafta süre ile ilk 3 gün, içinde 10 mg estradiol valerianat bulunan Progynon® ampul (Schering) etanol içinde çözülüp distile su ile dilüe edilerek 0.17 mg/kg dan hesaplanan dozlarda ve daha sonraki 4 gün, içinde 12.5 mg progesteron ve 2.5 mg estradiol benzoat bulunan Di-Pro® oleosum ampul (Organon) aseton ile çözülüp distile su ile dilüe edilerek 0.20 mg/kg dan hesaplanan dozlarla intraperitoneal yolla verildi. Beşinci günden itibaren tüm ratlara günlük vajinal smear yapılarak estrus fazına girenler çalışmanın ikinci kısmına alındı (*Resim 5'te kastre dönemdeki, 6'da ise estrogen+progesteron verildikten sonra estrus fazına girmiş ratlardaki vajinal smearler görülmektedir*). Ratların hepsi ilaç verimine başladıktan sonraki 7-10. günler arasında estrus fazına girdiler.

Çalışmanın ikinci kısmında ratlar 4 gruba ayrıldı ;

Danazol Grubu (1. Grup) : Bu gruba giren 11 rata, içinde 100 mg danazol bulunan Danasin® kapsül (Koçak) tozu mineral oil (Sigma) içinde çözülerek 10 mg/kg dozda bir hafta süre ile her gün intraperitoneal enjeksiyonlar şeklinde verildi.

Tamoxifen Grubu (2. Grup) : Bu gruba giren 11 rata, içinde 20 mg tamoxifen sitrat içeren Nolvadex® tablet (ICI-Abdi İbrahim), mineral oil (Sigma) ile çözülerek 0.35 mg/kg dozda 1 hafta süre ile her gün intraperitoneal enjeksiyonlar şeklinde uygulandı.

GnRHa Grubu (3. Grup) : Bu gruba giren 11 rata, içinde 3.75 mg triptorelin bulunan Decapeptyl®CR kendi çözücüsü ile çözülerek 62.5 µg/kg dozda tek enjeksiyon olarak intramusküler uygulandı.

Kontrol Grubu (4. Grup) : Bu gruba giren 11 rat sadece kastre edildi ve hiç bir ilaç uygulaması yapılmadı.

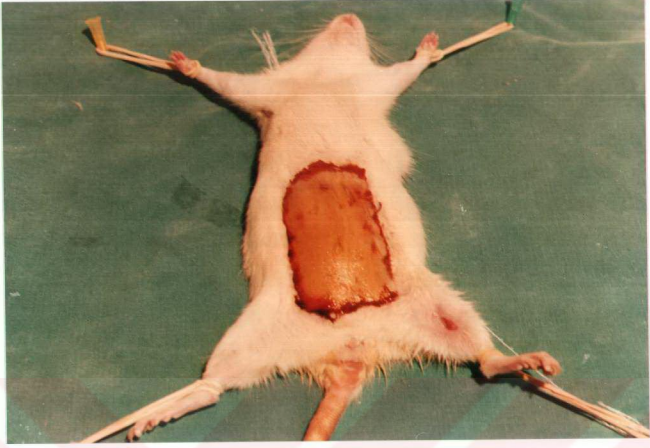
Ratlara verilen farmakolojik ajanların dozları DEÜTF Farmakoloji Laboratuvarında 60 kg'lık bir kadına eş değer doz hesaplanıp, hassas ölçüm aletleri kullanılarak hazırlandı.

İlaç uygulamalarının bitimini takiben ratlar 2. kez operasyona alınarak histerektomi uygulandı.

Dokulardaki reseptör içeriği bazı faktörlerden etkilenmektedir. Örneğin alınması ile analizi arasında geçen süre önemlidir. Analizin geciktirilmesi reseptör proteinlerin kaybına yol açabilmektedir. Bu nedenle uterus, operasyondan hemen sonra servikal os boyunca açılarak %10 tamponlu formolin solusyonda 24 saat tespit edildi. Rutin doku takibinden sonra parafine gömülen dokulardan, 5 mikrometrelik kesitler dökülmeyi engellemek için 3-aminopropyltriethoxy-silane (APES-SIGMA A-3648) kaplı lamlara alındı(64). En az 24 saat oda sıcaklığında bekletilen kesitler ksilen ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, immün boyama öncesi antijen kazanma (antigen retrieval) işleminden geçirildi(65). Bunun için kesitler plastik coplin şalelere alındı ve üzerlerine 0.1 mol/L sodyum sitrat tampon kondu. Mutfak tipi mikrodalga fırında (Frigidaire, model : RCM 5130 F, maksimum 1400 W ve 50 Hz frekansta %100 güç ile) kaynatıldıktan sonra 15 dakika süre ile kendi halinde soğumaya bırakıldı. Antijen kazanma işleminden sonra kesitler fosfat tuzlu tamponda (PBS) yıkandı. Ardından %0.5 hidrojen peroksit içeren fosfat tuzlu tampon pH 7.2 ile 10 dakika muamele-inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İmmün boyama işlemi ise oda sıcaklığında streptavidin-biotin yöntemi (Histostain Bulk, Zymed, USA) kullanılarak uygulandı (66). Kesitler normal serumda 10 dakika bekletilerek nonspesifik zemin boyanması engellendi. PBS ile yıkama işlemi yapılmadan primer antikolar (Estrojen reseptörü : Novocastra, NCL-ER-LHZ, 1:80 dilüsyonda, Progesteron reseptörü : Novocastra, NCL-PR, 1:40 dilüsyonda) 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkadıktan sonra kromojen olarak %0.02 3,3'- diaminobenzidine içeren 0.05 mol/L PBS içine %0.05 hidrojen peroksit ile renk değişimi gözlenene kadar tutulan kesitler daha sonra çeşme suyu ile yıkandı ve Mayer hematoksileni ile zıt boyanma yapıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede sadece nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi ve sadece epitelyal hücreler sayıldı, stromal hücreler değerlendirmeye alınmadı. Boyanan nükleuslar sayılarak toplam nükleus sayısına oranlandı (Resim 7,8).

Çalışmanın istatistik analizlerinde SPSS bilgisayar programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ile ilaç uygulanan grupların reseptör düzeylerinin karşılaştırmasında "Mann-Whitney U Test" kullanılırken, gruplar içinde reseptör düzeylerinin korelasyonu "Spearman Correlation Coefficients Test" ile hesaplanmıştır.



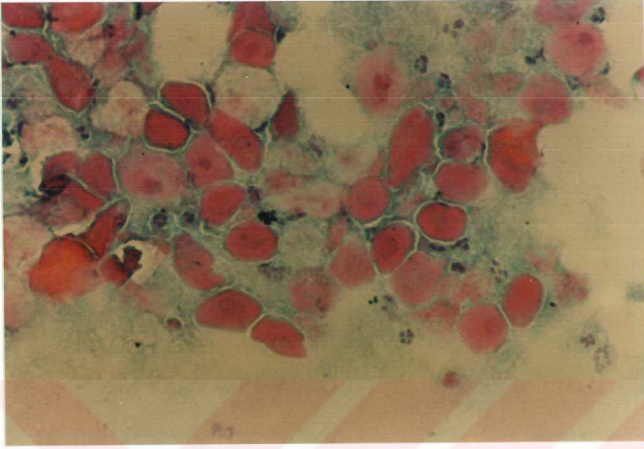
Resim 1 : Anestezi verildikten sonra batin traşlanıp antiseptik solusyonla boyandı



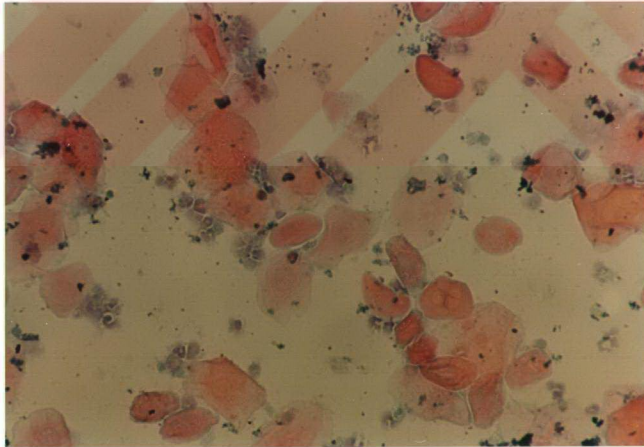
Reşim 2 : Batına 4 cm insizyon uygulandıktan sonra uterus ve adneksler bulundu.



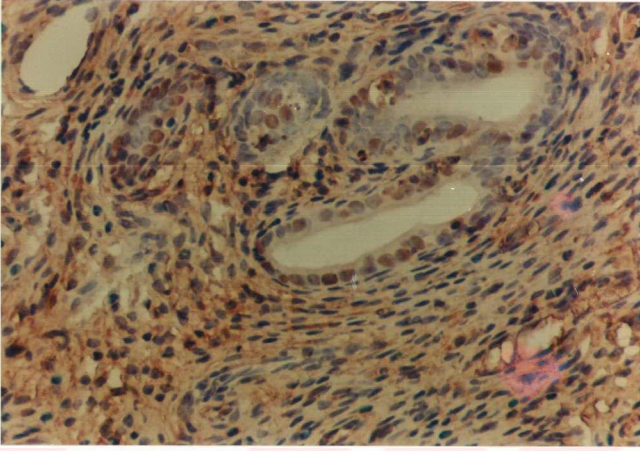
Resim 3 : Ratın uterusu çıkarıldıktan sonra



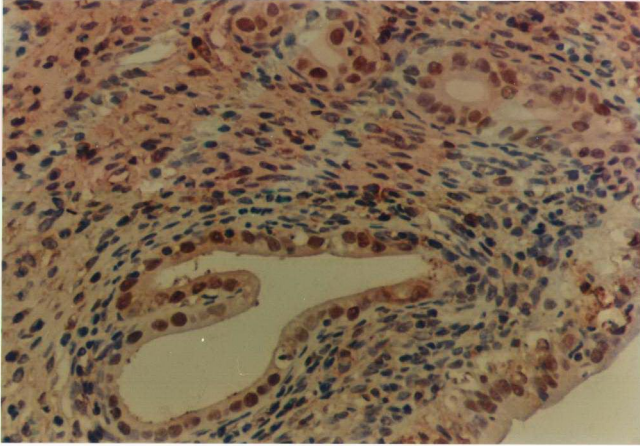
Resim 4 : Kastre rattan alınan vajinal smear. Parabazal hücreler dikkat çekiyor.
(Papanicolaoa boyası x 200)



Resim 5 : Estrojen + progesteron verdikten sonra alınan vajinal smear. Süperfisial ve intermedier hücreler yoğunlukta. (Papanicolaoa boyası x 200)



Resim 6 : Endometrial bez epitel hücrelerinin nükleuslarında progesteron reseptörü ile olumlu kahverengi boyanma. Aralarda boyanmamış nükleuslar seçilebiliyor. (İmmünohistokimyasal boyama, x 200)



Resim 6 : Endometrial bez epitel hücrelerinin nükleuslarında estrogen reseptörü ile olumlu kahverengi boyanma. Hemen tüm hücrelerde boyanma dikkati çekiyor. (İmmünohistokimyasal boyama, x 200)

4. BULGULAR

Çalışma sırasında gruplar içerisinde her gruptan üçer olmak üzere toplam 12 rat çeşitli sebeplerle ex oldu. Bu nedenle reseptör her grupta 8 rat olmak üzere toplam 32 rat uterusunda yapılabildi. Her grupta bulunan 8'er ratın immünohistokimyasal yöntemle bakılıp, yüzde cinsinden elde edilen reseptör düzeyleri tablo 2 de verilmiştir.

Ratlar	Danazol		Tamoxifen		Triptorelin		Kontrol	
	ER(%)	PR(%)	ER(%)	PR(%)	ER(%)	PR(%)	ER(%)	PR(%)
1	85	67	84	75	82	73	76	68
2	74	82	83	72	71	62	63	66
3	90	73	92	90	69	69	62	60
4	71	81	85	75	75	75	70	70
5	83	90	76	78	64	81	61	69
6	69	79	72	88	87	80	58	73
7	77	62	83	78	90	68	69	81
8	68	77	80	66	68	74	70	72

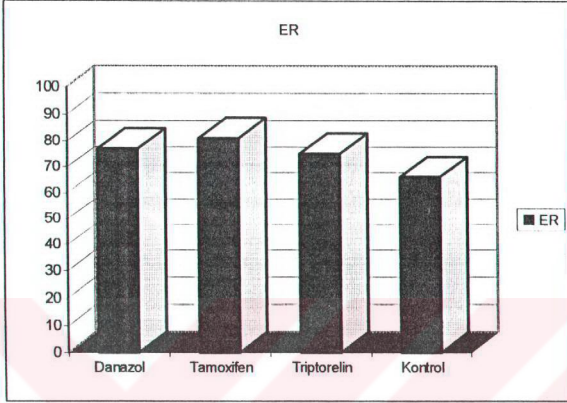
Tablo 2 : Reseptör yüzdeleri.

Mikroskopik inceleme sonrasında elde edilen reseptör düzeylerinin ortalamaları ve standart sapmaları tablo 3 de görülmektedir.

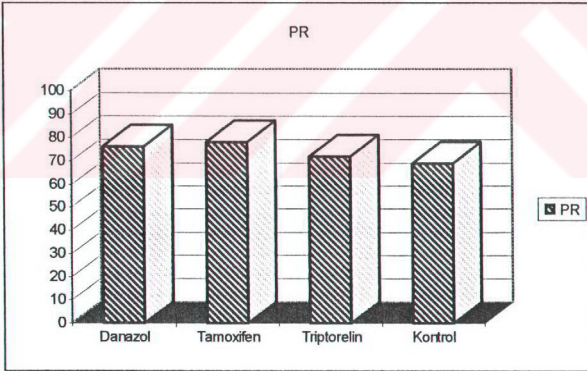
Grup	ER	PR
	Ortalama \pm SD	Ortalama \pm SD
Danazol	77.1 \pm 8.1	76.4 \pm 8.9
Tamoxifen	81.9 \pm 6.0	77.7 \pm 8.5
Triptorelin	75.7 \pm 9.5	72.7 \pm 6.3
Kontrol	66.1 \pm 6.0	69.9 \pm 6.0

Tablo 3 : Grupların reseptör ortalamaları ve standart sapmaları.

Kontrol ve diğer grupların estrogen ve progesteron reseptör ortalamalarını gösteren grafikler aşağıda görülmektedir (Grafik 1 ve 2).



Grafik 1: Grupların estrogen reseptör ortalamaları.



Grafik 2 : Grupların progesteron reseptör ortalamaları.

Danazol, tamoxifen ve triptorelin verilen ratların uteruslarındaki estrogen ve progesteron reseptör yüzdeleri, kontrol grubunu oluşturan ratların reseptör yüzdeleri ile karşılaştırıldığında, estrogen reseptörü açısından danazol grubu kontrol grubundan anlamlı

düzeyde yüksek bulunurken($p<0.05$), progesteron reseptörlerinde danazol grubunda yükselme olmakla beraber aradaki fark anlamsızdı($p>0.05$).

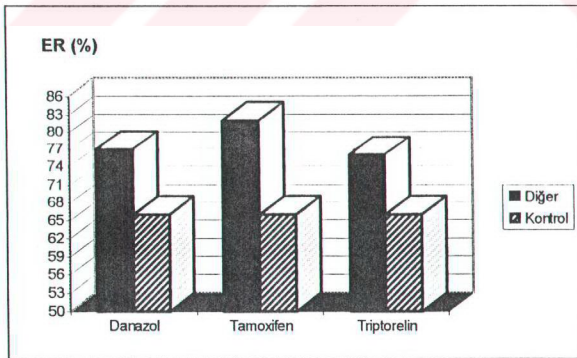
Tamoxifen grubu ile kontrol grubu estrogen ve progesteron reseptörleri açısından karşılaştırıldığında her iki reseptör düzeyinin tamoxifen grubunda anlamlı oranda yüksek olduğu bulundu($p<0.05$).

Triptorelin grubu ile kontrol grubu estrogen ve progesteron reseptör düzeyleri karşılaştırıldığında her iki reseptörde de anlamlı fark bulunmadı($p>0.05$). Bu karşılaştırmalar sonucu elde edilen p değerleri tablo 4 de gösterilmiştir.

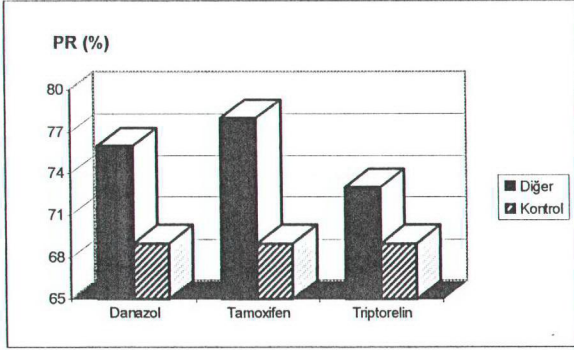
	ER (p Değeri)	PR (p Değeri)
Danazol & Kontrol	0.018*	0.114
Tamoxifen & Kontrol	0.013*	0.045*
Triptorelin & Kontrol	0.051	0.292

Tablo 4 : Kontrol grubu ile ilaç gruplarının karşılaştırılmaları sonucunda elde edilen p değerleri. (*) İstatistiksel olarak anlamlı.

Her üç grupta da gerek estrogen reseptörleri gerekse de progesteron reseptörleri kontrol grubundan yüksek bulundu. Bu ilişkiyi göstermek bakımından aşağıda grafik 3 ve 4 verilmiştir.



Grafik 3 : Kontrol grubu ile diğer grupların estrogen reseptör oranlarının kıyaslanması.



Grafik 4 : Kontrol grubu ile diğer grupların estrogen reseptör oranlarının kıyaslanması.

Her grupta bulunan ratların estrogen ve progesteron reseptörleri arasındaki korelasyona bakıldığında hiç bir grupta reseptör düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı (Tablo 5).

	r	p
Danazol	-0.316	0.40
Tamoxifen	0.054	0.89
Triptorelin	-0.183	0.63
Kontrol	-0.012	0.97

Tablo 5 : Gruplar için estrogen ve progesteron reseptörleri arasındaki korelasyon değerleri (r) ve anlamlılığı (p).

5. TARTIŞMA

Teorik olarak özellikle ovarian hormonlar olmak üzere, steroid hormonların jinekolojik onkolojide kullanılması mantıklıdır. Kanalis uterovaginalis ve sinüs ürogenitalisten köken alan bütün organlar , meme ve overler morfolojik ve fonksiyonel olarak estrogen ve progesteragenler için hedef teşkil etmektedir. Daha da ötesi, bu hedef organlar için karsinojen veya ko-karsinojen olarak kabul edilen estrogenler, endometrium ve memenin primer karsinomları , bunların metastazları ve rekürrensleri ile ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle, endometrial adenokarsinomlar ve meme kanserleri kısmen hormon bağımlıdır ve doğal antiestrogenlere , progesterona, sentetik progesteragenlere ve sentetik bir antiestrogen olan tamoxifene yanıt verir. Hedef organda malignensi gelişimi, tümörün hormonal duyarlılığını tamamen kaybetmesi anlamına gelmez. Embriyolojik olarak analog olmaları nedeni ile servikal, tubal ve mezonefroid adenokarsinomlarda progesteragenlere ve antiestrogenlere duyarlıdır. Teorik ve deneysel olarak belirlenen jinekolojik malignensilerin hormon bağımlılığı veya hormon tedavisine yanıtı, steroid reseptörlerin tayini ile gösterilebilmiştir. Endometriumun üzerinde estrogenlerin karsinojenik etkisinin, endometrial ve meme karsinomları başta olmak üzere tüm jinekolojik kanserlerde hormon bağımlılığı ve hormon tedavisine yanıtta bir model teşkil etmektedir. Estrojenler endometrial adenokarsinomdaki tümör hücreleri üzerine direkt etki ederler. Endometrial adenokarsinom içeren bir organotipik hücre kültürüne estrogen ilave edildiğinde mitotik indekste belirgin artış olmakta ve diferansiyasyon azalmaktadır. Endometrial adenokarsinomun estrojene bağımlılığından yola çıkılarak progesteragenler ve antiestrogenler ile hormonal tedaviler geliştirilmiştir(36).

Progesterinler hücre içindeki estrogen reseptör içeriğinde hızlı ve anlamlı bir düşüşe neden olurlar. Hormona bağımlı kanser hücrelerinde DNA sentezini inhibe ederler. Ortalama dozda uygulandıklarında (150 mg/gün) estrogen reseptör düzeyi orta veya yüksek olan endometrial adenokarsinomlarda estrogen reseptör konsantrasyonunu sistematik olarak düşürürken reseptör negatif ya da düşük düzeyde bulunan karsinomlarda reseptör konsantrasyonunu etkilemez. Özellikle MPA başta olmak üzere tüm progesteragenler daima progesteron reseptör konsantrasyonunu azaltarak tespit

edilemeyecek düzeylere getirir. Progesteron reseptör değerleri üzerindeki bu negatif kontrol, uzamış progestin tedavisi esnasında endometrial adenokarsinom üzerindeki devamlı hormonal etkiyi olumsuzlaştırabilir.

Endometrial adenokarsinomda antiestrogenlerin estrogen reseptör konsantrasyon üzerindeki etkisi orjinal reseptör düzeyleri ile ilişkilidir. Günlük 40mg tamoxifen uygulanması estrogen reseptör düzeyi yüksek adenokarsinomlarda belirgin bir azalma yaparken bu durumun aksine düşük estrogen reseptör içeren tümörlerde reseptör konsantrasyonunda artışa neden olurlar. Estrogen reseptörü negatif tümörlerde ise hiçbir değişiklik yapmayabildiği gibi reseptör sentezine de neden olabilirler. Progesteron reseptörü negatif veya düşük düzeyli olan adenokarsinomlarda tamoxifen, progesteron reseptör konsantrasyonunu artırıcı etki gösterir. Yüksek progesteron reseptör konsantrasyonlu karsinomlarda ise bu artış daha sınırlı olmaktadır(36).

Hedef hücrelerin progestagenlere yanıtlılığı, estrogen öncülüğünde progesteron reseptörlerinin varlığı ile belirlenir ve estrogenlerin, progesteron reseptörlerinin sentezini uyarma kapasitesi ile ilişkilidir. Kanser dokusunun progestagenlere duyarlılığı, mantiken estrojene bağlı tümör ve hasta karakteristikleri ile ilişkilidir. Progestagenlere iyi yanıt veren grupta, erken, yavaş büyüyen ve iyi diferansiye malignensiler mevcut olup bunlar estrogen ve progesteron reseptöründen zengindirler.

Endometrium adenokarsinomları ve meme karsinomları başta olmak üzere hormon bağımlı tümörlerde reseptör düzeylerinde manipölasyonlar yapılarak, hormonal tedavinin etkinliğini arttırmak amacı ile bazı ilaçların kullanımı denensede, bu konuyu aydınlatmak bakımından yetersiz gibi görünmektedir. Bu açıdan en çok adı geçen ajan tamoxifen olmakla beraber, bu ajanla ilgili çalışmaların büyük bir çoğunluğu meme karsinomları üzerinedir. Shinzaburo ve arkadaşları meme karsinomlu hastalarda tamoxifen kullanımı sonrasında progesteron reseptör düzeylerinin, önemli oranda arttığını bildirmişlerdir. Bu artış özellikle postmenopozal hastalarda daha bariz olup kontrol grubundan 4.6 kat daha fazladır. Premenopozal hastalarda da artış bulunmuş ancak bu sadece iki kattır. Ancak bu çalışmada dikkati çeken önemli bir özellik vardır. Tamoxifen progesteron reseptörlerini ilacın uygulandığı ilk 3-7 günde maksimum arttırmış, 14. günde ise kontrol grubu ile aynı düzeylere getirmiştir. Bu durum muhtemelen tamoxifenin ilk günlerdeki estrojenik, daha sonraki günlerde antiestrogenik

etkisine bağlıdır(54). Meme karsinomunda tamoxifenin başarısı tek başına kullanıldığında %40 civarında iken, tamoxifen tedavisine progesteron eklendiğinde bu oranın %60 ların üzerine çıktığı bildirilmiştir(54). Aynı kombinasyonun, endometrium adenokarsinomu tedavisinde kullanımında birbiri üzerine sinerjik etki yaptığı Swenerton ve arkadaşları tarafından bildirilmiş ve bu durumun, tamoxifenin zayıf estrogenik etkisinden dolayı progesteron reseptörlerini arttırmasına bağlanmıştır(67). Ancak tamoxifenin zayıf estrogenik etkisi ile progesteron reseptörlerini arttırdığı düşüncesine ters düşen çalışmalar da vardır. Sadyaswaroop ve Dell'acqua in vivo ve in vitro çalışmalarında tamoxifenin estrogen reseptörlerinde bir miktar azalma yarattığını, bunun yanında progesteron reseptör düzeyini arttırdığını bildirmişlerdir(56,68). Bizim çalışmamızda tamoxifen verilen ratlarda hem estrogen, hem de progesteron reseptör değerleri kontrol grubuna oranla anlamlı oranda yüksek bulunmuştur($p<0.05$).

Danazol hücre içinde progesteron reseptörlerine bağlanarak agonistik ve antagonistik etkiler yaratabilmektedir. Bunun yanı sıra teorik olarak danazolün estrogen reseptörlerine bağlanmadığı kabul edilmektedir. Danazolün sonuç etkisi hipoestrogenik olduğundan, estrogenin neden olduğu değişik patolojilerde kullanımı gündeme gelebilir. En iyi bilinen kullanım alanı endometriozis olmakla beraber son zamanlarda değişik patolojilerde kullanılmak üzere denenmektedir. Bu patolojilerden biri endometrium adenokarsinomudur. Danazolün bu hastalıkta faydalı olup olmayacağını anlamada, steroid reseptörleri üzerine etkilerinin iyi bilinmesi gerekir. Henig ve arkadaşları kastre sıçanlarda oluşturdukları endometriotik odaklarda danazolün hem estrogen hem de progesteron reseptör konsantrasyonunu anlamlı oranda arttırdığını bildirmişlerdir(44). Benzer sonuçlar Sanfilippo ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir(68). Bu çalışmada ratlara 10 mg/kg danazol verimini takiben 6 saat, 24 saat ve 6 gün sonra reseptör düzeylerine bakılmış ve estrogen reseptörlerinde artış izlenmiştir. Musih ve arkadaşları tarafından immatür ratlarda 4 günlük danazol tedavisinin uterin estrogen reseptör konsantrasyonunu arttırdığını ancak, 14 gün verildiğinde zıt etki oluşturduğu bildirilmiştir(38). Bizim çalışmamızda da danazol verilen grupta estrogen reseptör düzeyleri, kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek bulundu($p<0.05$). Progesteron reseptörlerinde kontrol grubuna oranla yüksekti ancak, aradaki fark anlamsızdı($p>0.05$). Danazol bir antiestrogenik olduğu halde estrogen reseptörlerini arttırıcı özelliği, bir diğer

etkisi olan androjenik etkiden kaynaklanıyor olabilir. Henig ve Sanfilippo bu olayı danazolün, androjenik etkisi ile estrojen ve progesteron reseptör yenilenmelerini (replenishment) indükliyerek gerçekleştirebileceği düşüncesini ortaya atmışlardır(44,68).

GnRH agonistleri hipogonadotropik hipogonadizm etkileri ile pek çok patolojide kullanım alanına girmiştir. Bu etkilerinden dolayı hormon bağımlı tümörlerde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir(58,59). Gallagher ve arkadaşları tarafından 17 rekürrent endometrium karsinomlu olguda GnRH agonisti ile tedavi sonuçları bildirilmiş ve 17 olgudan birinde tam, beşinde kısmi remisyon olmak üzere %35'lik bir başarı elde edilmiştir. Buradaki başarı çok iyi gibi görünmesinde bu olguların daha önceden cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiye rağmen rekürrens gelişen kötü prognozlu tümörlere sahip olduğu göz önünde bulundurulursa hiçte küçümsenmeyecek bir başarıdır(61). Araştırmacılar bu çalışmalarında GnRH agonistlerinin etkilerinin hipofizin dışında tümöral dokuya direkt olabileceğini ortaya koymuşlardır. GnRH agonistleri hormon bağımlı tümörlerin tedavisinde başarı sonuçlar versede, etki mekanizması bilinmemektedir. Daha çok tümör dokusundaki spesifik GnRH reseptörleri üzerinde durulmaktadır(60,62). Acaba GnRH agonistleri endometrial estrojen ve progesteron reseptörlerini etkiliyordu düşüncesi ile çalışmamıza dahil ettiğimiz bu grupta gerek estrojen gerekse de progesteron reseptör düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı fark gözlenmedi($p>0.05$).

Olası hormonal manipülasyonlar yapılarak, jinekolojik malignensilerde alternatif hormonal yaklaşım sağlanabilir. Bunlardan biri, progestin dozunun artırılması olabilirse de, kendi reseptör düzeylerini azalttıkları için çok iyi bir yaklaşım olarak görülmemektedir. Antiestrojenik bir ilaç olan tamoxifen, progesteron reseptör konsantrasyonunu artırarak progestin tedavisinin etkinliği üzerinde olumlu etkiler oluşturabilmektedir. Progestagenler ile tedavi öncesinde tamoxifen uygulanması ile hedef hücrelerde estrojenik etki sağlanmış olur. Böylece, kombine hormonal yaklaşım gerçekleştirilebilir. Tümörün reseptör içeriği göz önüne alınarak eş zamanlı veya ardışık tedaviler uygulanabilir. Yüksek derecede hormon bağımlı kanserlerde (ER+,PR+) kombine, eş zamanlı tamoxifen ve progestin uygulanması ile optimal sonuçlar elde edilebilir. Hormon bağımlılığı kısıtlı olan tümörlerde (ER+,PR-) ve otonom, potansiyel olarak hormon bağımlılığı olan tümörlerde kombine ardışık tedavi tercih edilmelidir.

Çalışmamızda rekürrent veya ileri evre endometrium adenokarsinomu tedavisinin etkinliğini arttırmada reseptör manipülasyonu maksatlı kullanılan ajanlar içinde tamoxifen etkili bulundu. Bu tür hayvan deneylerinin genel problemi, hayvan modellerinin insana adaptasyonunda bir takım zorluklarının olmasıdır. Örneğin hayvana uygulanan ilacın dozu ve süresinin insana adapte edilmesi oldukça güçtür. Tamoxifenin bir hafta süre içerisinde reseptör düzeylerini arttırdığını gözlemledik. Ancak, daha değişik dozlarda ve daha değişik sürelerde reseptör düzeylerinin ne şekilde etkileneceği daha tam açık değildir. Bu maksatlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca tamoxifenin hormonal tedavi protokollerindeki yerini sağlamlaştırmak için endometrium karsinomlu olgular üzerinde kullanımı sonucu oluşturduğu reseptör manipülasyonları ile ilgili geniş çapta araştırmalar gereklidir.

Estrojen ve progesteron reseptörleri kötü diferansiye tümörlerde daha az bulunduğu bilinen bir gerçektir. Tamoxifenin az reseptör içeren tümörlerde, reseptör seviyelerini daha fazla indüklemesi relatif bir durum gibi görünse de kötü diferansiye tümörlü olguların sağ kalım oranlarını arttırmada faydalı olabilir.

Amacın, rekürrent veya ileri evre endometrial adenokarsinomlu olgularda sağ kalım oranını arttırmak olduğu hormonal tedavilerde tamoxifen bu özelliği ile orta veya kötü diferansiye tümörlü olguların sağ kalım oranını iyi diferansiye tümörlü olguların düzeyine getirmede etkin bir ilave tedavi şekli olabilir. Bunu belirlemek için de tamoxifenin optimal etki yaratacağı doz ve uygulanım süresinin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Steroid hormonlar, endometriumdaki etkilerini spesifik reseptörleri üzerinden gerçekleştirirler. Estrojen normal bir endometriumda proliferasyona yol açarken, progesteronun etkisi, endometriumu sekreteruar doku tipine döndürür. Bu, hormon ve reseptörler arasındaki ince ayarın bozulması bazı klinik patolojilerle karşımıza çıkar. Bunlardan bir tanesi endometrial adenokarsinomlardır.

Endometrium karsinomları kadın genital sisteminin en sık, kadınlarda görülen tüm kanserler içinde de 4. sırada yer alan önemli bir hastalıktır. Erken evrelerde yakalanıldığında uygun tedavi ile sağ kalım oranları oldukça iyi olmakla beraber, ileri evrelerde veya rekürrent olgularda ilave tedavilerin etkinliği maalesef sınırlı olmaktadır. Bu tür hastalarda adjuvan olarak uygulanan hormonal tedavilerin etkinliği %30-40 civarındadır. Başarıdaki sınırlılığın en önemli sebeplerinden biri tümörün reseptör içermemesi veya az içermesi, diğeri de uzun süreli uygulanan progestogen tedavisinin kendi reseptör düzeylerini azaltmasıdır. O halde, reseptör düzeylerinin manipülasyonu ile hormonal tedavilerin etkinliğinin artırılabilceği düşüncesi mantıklıdır. İşte bu mantıktan hareket ederek progesteron reseptörlerini arttırabilecek ve aynı zamanda antiestrogenik etki yaratabilecek ajanların sıçanlara uygulanarak endometriumdaki estrojen ve progesteron reseptörleri üzerindeki etkilerini inceleyerek, elde edilen verilerin kliniğe adapte edilmesi amaçlanarak bu çalışma düzenlenmiştir.

Çalışmada ağırlıkları 250-300gr. arasında değişen 90-120 günlük 44 adet Sprague Dawley ratı kullanıldı. Önce tüm ratlar, endokrin fonksiyonlarını aynı düzeye getirmek için cerrahi olarak kastre edildi. Tüm ratlara ilk 3 gün 0,17mg/kg'dan estradiol valerianat, sonraki 4 gün 0,20mg/kg'dan progesteron verildi. Vajinal smear bakılarak estrus fazına girenler çalışmanın 2. kısmına alındı. Bu kısımda ratlar 4 gruba ayrıldı. 1.gruba 7 gün süre ile 10mg/kg'dan danazol intraperitoneal enjeksiyonlarla verildi. 2. gruba 7 gün süre ile 0,35mg/kg'dan tamoxifen intraperitoneal olarak verildi. 3. gruba 62,5mg/kg dozda triptorelin tek doz olarak intramuskuler olarak uygulandı. 4. gruptaki ratlara herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı ve kontrol grubu olarak kabul edildi. İlaç uygulamasının bitimini takiben ratlar 2. kez operasyona alınarak histerektomi uygulandı.

Alınan uteruslar patoloji laboratuvarında immünohistokimyasal metotla incelenerek reseptör düzeyleri yüzde olarak belirlendi.

Elde edilen sonuçlarda, tamoxifen uygulanan grupta estrojen ve progesteron reseptör düzeyleri kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Danazol uygulanan grupta ise sadece estrojen reseptör konsantrasyonu kontrol grubundan anlamlı oranda yüksekti($p<0,05$). Triptorelin grubunda ise gerek estrojen gerekse progesteron reseptör düzeyleri kontrol grubu değerlerine yakındı($p>0.05$).

Sonuçta hormonal reseptör manipülasyonunda tamoxifenin, diğer ajanlara göre daha etkili olduğu bulundu. Klinikte, rekürrent veya ileri evre endometrial karsinomlu olgularda progesteron tedavisi ile birlikte uygulanmasının, progestinlerin tek başına uygulanmasından daha faydalı olabileceği kanısına varıldı. Ancak bu düşüncüyü güçlendirmek ve optimal başarıyı sağlayabilecek tamoxifen dozunun ve uygulanma süresinin tespiti için daha fazla sayıda experimental ve insan deneylerine ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Lessey BA, Killiam AP, Metzger DA et al : Immunohistochemical analysis uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 67 : 334-8, 1988.
2. Snijders MPML, de Goeij AFPM, Debets-Te Baerts et al : Immunohistochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J Reprod Fertil*, 94 : 363-8, 1992.
3. Silverberg E, Lubera JE : Cancer statistics. *CA-Cancer J Clin*, 38 : 5, 1988.
4. Silverberg E, Boring CC, Squires BA : Cancer statistics. *CA*, 90 : 40, 1990.
5. Morrow CP : The benefits of estrogen to the menopausal woman outweigh the risks of developing endometrial cancer. *CA-Cancer J Clin*, 34 : 220-31, 1984.
6. Thompson JD, Rock JA : *Operative Gynecology*. Seventh Edition, J. P. Lippincott Company, Philadelphia, 1286-7, 1992.
7. Borazjani G, Twiggs LB, Leung BS et al : Prognostic significance of steroid receptors measured in primary metastatic and recurrent endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 161 : 1253-7, 1989.
8. Reifenstein EC : Treatment of advanced endometrial cancer with hydroxyprogesterone correate. *Gynecol Oncol*, 2 : 377-414, 1974.
9. Kleine W, Maier T, Geyer H, Pfliderer A : Estrogen and progesterone receptors in endometrial cancer and their prognostic relevance. *Gynecol Oncol*, 38 : 59-65, 1990.
10. DeSombre ER, Kuivanen PC : Progestin modulation of estrogen dependent marker protein synthesis in the endometrium. *Seminars Oncol*, 12 : 6-11, 1985.
11. Song JY, Fraser IS : Effects of progestogens on human endometrium. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 50 : 385-94, 1995.
12. Speroff L, Glass RH, Kase NG : *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Williams & Wilkins. Baltimore, 52, 1994.
13. Press MF, Greene GL : Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. *Endocrinology*, 122 : 1165-75, 1988.

14. Webb P, Lopez GN, Greene GL, Baxter JD, Kushner PJ : The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. *Mol Endocrinol*, 6 : 157-67, 1992.
15. Katzenellenbogen BS : Biology and receptor interactions of estriol and estriol derivatives in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem*, 20 : 1033-7, 1984.
16. Chauchereau A, Savouret JF, Milgrom E : Control of biosynthesis and post-transcriptional modification of the progesterone receptor. *Biol Reprod*, 46 : 174-7, 1992.
17. Sundaram GS, Manimekalai S, Wenk RE, Goldstein PJ : Estrogen and progesterone receptor assays in human breast cancer: a brief review of the relevant terms, methods and clinical usefulness. *Obstet Gynecol Surv*, 39 : 719-23, 1984.
18. Martin PM, Rolland PH, Gammerre M : Estradiol and progesterone receptors in normal and neoplastic endometrium : correlations between receptors, histopathological examinations and clinical responses under progestin therapy. *Int J Cancer*, 23 : 321-9, 1979.
19. Schwartz PE, ViVolsi VA, Hildreth N : Estrogen receptors in human ovarian epithelial carcinoma. *Obstet Gynecol*, 59 : 229-38, 1982.
20. DiSaia PJ : Risk factors in recurrent patterns in stage I endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 151 : 1009-15, 1985.
21. DiSaia PJ, Creasman W : *Clinical Gynecologic Oncology*. The C.V. Mosby Company. London, 158, 1993.
22. Lewin GC, Slack NH, Mortel R : Adjuvant progestogen therapy in primary definitive treatment of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2 : 368-76, 1974.
23. Kauppila A : Progestin therapy of endometrial, breast and ovarian carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 63 : 441-50, 1984
24. DiSaia PJ, Creasman W : *Clinical Gynecologic Oncology*. The C.V. Mosby Company. London, 184, 1993.
25. Macdonald RR, Thorogood J, Mason MK : A randomized trial of progestagens in the primary treatment of endometrial carcinoma. *Br J Obstet Gynaecol*, 95 : 166-74, 1988.
26. Kohorn EI : Gestagens and endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 4 : 398-411, 1976.
27. DiSaia PJ, Creasman W : *Clinical Gynecologic Oncology*. The C.V. Mosby Company. London, 185, 1993.

28. Creasman WT, McCarty KS Sr, Barton TK, McCarty KS Jr : Clinical correlates of estrogen and progesterone binding proteins in human endometrial adenocarcinoma. *Obstet Gynecol*, 55 : 363-70, 1980.
29. Creasman WT, Soper JT, McCarty KS et al.: Influence cytoplasmic steroid receptor content on prognosis of early stage endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 151 : 922-32, 1985.
30. Ehrlich CE, Young PCM, Stehman FB, Sutton GP, Alford WM : Steroid receptors and clinical outcome in patients with adenocarcinoma of the endometrium. *Am J Obstet Gynecol*, 158 : 796-807, 1988.
31. Benraad TJ : Do estrogen and progesterone receptors (E2R and PR) in metastasizing endometrial cancer predict the response to progestin therapy? *Acta Obstet Gynecol Scand*. 59 : 155-9, 1980.
32. Quinn MA, Couchi M, Fortune V : Endometrial carcinoma : steroid receptors and response to medroxyprogesterone acetate. *Gynecol Oncol*, 21 : 314-9, 1985.
33. Kauppila A, Kausansuu E, Vihko R : Cytosol estrogen and progestin receptors in endometrial carcinoma of patients treated with surgery, radiotherapy and progestin. *Cancer*, 50 :2157-62, 1982.
34. Kauppila A, Janne O, Kausansuu E, Vihko R : Treatment of advanced endometrial adenocarcinoma with a combined cytotoxic therapy : predictive value of cytosol estrogen and progestin receptor levels. *Cancer*, 46 : 2162-7, 1980.
35. Kauppila A, Gornroos N, Nieminen U : Clinical outcome in endometrial cancer. *Obstet Gynecol*, 60 : 473-80, 1982.
36. Vanderstappen D, Bonte J : New trends in the use of medroxyprogesterone acetate as a chemotherapeutic agent in gynecologic malignancies. *Eur J Gynaecol Oncol*, 13 : 113-23, 1992.
37. Manson AJ, Stonner FW, Neumann HC et al. : Steroidal heterocycles VIII, Androsteno (2,3-d)-isoxazole and related compounds. *J Med Chem*, 6 : 1, 1963.
38. Musich JR, Behrman SJ, Menon KMJ : Estrogenic and antiestrogenic effects of danazol administration in studies of estradiol receptor binding. *Am J Obstet Gynecol*, 140- :62-6, 1981.

39. Speroff L, Glass RH, Kase NG : Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Williams & Wilkins. Baltimore, 860, 1994.
40. Barbieri RL, Lee H, Ryan KJ : Danazol binding to rat androgen, glucocorticoid, progesterone and estrogen receptors: correlation with biologic activity. *Fertil Steril*, 31 : 182-6, 1979.
41. Chamness GC, Asch RH, pauerstein CJ : Danazol binding and translocations of steroid receptors. *Am J Obstet Gynecol*, 136 :426-9,1980.
42. Terakawa N, Tkegami H, Shimizu T, Aono T, Tanizawa O : Growth inhibition by danazol in human endometrial cancer cell line with estrogen independent progesterone receptors. *J Steroid Biochem*, 28 : 571-4, 1987.
43. Gledhill JM, Barker S, Wanless C, Hinson JP et al. : Progesterone receptor induction by danazol in cultured cancer cells and rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43 :289-96, 1992.
44. Henig I, Rawlins RG, Weinrib HP, Dmowski WP : Effects of danazol, gonadotropin releasing hormone agonist and estrogen / progesteron combination on experimental endometriosis in the ovariectomized rat. *Fertil Steril*, 49 : 349-55, 1988.
45. Fujimoto J, Hori M, Tchigo S, Morishita S, Tamaya T : Estrogen activates migration potential of endometrial cancer cells through basement membrane. *Tumour Biol*, 17 : 48-57, 1996.
46. Jordan VC, Murphy CS : Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. *Endocr Rev*, 11 : 578-612, 1990.
47. Coezy E, Borgna JL, Rocheford H : Tamoxifen and metabolites in MCF-7 cells : correlations between binding to estrogen and cell growth inhibition. *Cancer Res*, 42 : 317-23, 1982.
48. Early Breast Cancer Trialists "Colloborative Group" : Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. *Lancet*, 339 : 1-15, 1992.
49. Ugwumadu AHN, Bower D, Kin-Hoi-Ho P : Tamoxifen induced adenomyosis and adenomyomatous endometrial polyp. *Br J Obstet Gynecol*, 100 : 386-8, 1993.
50. Gusberg SB : Tamoxifen for breast cancer : Associated endometrial cancer. *Cancer*, 65 :1463-70, 1990.

51. Gorodeski GI, Beery R, Lunenfeld B et al. : Tamoxifen increased plasma estrogen binding equivalents and has an estradiol agonistic effect on histologically normal premenopausal and postmenopausal endometrium. *Fertil Steril*, 57 : 320-7, 1992.
52. Cohen I, Altaras MM, Shapira J, Tepper R, Beyth Y : Postmenopausal tamoxifen treatment and endometrial pathology. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 49 : 823-9, 1994.
53. Lopez FRP, Comenge CB : Effects of tamoxifen on endometrial estrogen and progesterone receptor concentrations in women with fibrocystic disease of the breast. *Gynecol Endocrinol*, 7 : 185-9, 1993.
54. Shinzaburo N, Keisuke M et al. : Induction of progesterone receptor with tanoxifen in human breast cancer with special reference to its behavior over time. *Cancer*, 61 : 1345-9, 1988.
55. Schwartz PE, MacLusky N, Naftolin F, Eisenfeld A : Tamoxifen induced increase in cytosol progesterone receptor levels in a case of metastatic endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 16 : 41-8, 1983.
56. Satyaswaroop PG, Zaino RJ, Mortel R : Estrogen like effects of tamoxifen on human endometrial carcinoma transplanted into nude mice. *Cancer Res*, 44 : 4006-10, 1984.
57. Sandow J : Clinical applications of LHRH and its analogues. *Clin Endocrinol*, 18 : 571-92, 1983.
58. Parmar H, Phillips RH, Austin G et al. : Therapy of advanced ovarian cancer with D-Trp-6-LHRH (decapeptyl). *Biomed Pharmacother*, 42 : 531-8, 1988.
59. Sirkalovic G, Wittliff JL, Schally AV : Detection and partial characterization of receptors for (D-Trp6)-luteinizing hormone -releasing hormone and epidermal growth factor in human endometrial carcinoma. *Cancer Research*, 15 : 1841-6, 1990.
60. Gallagher CJ, Oliver RTD, Oram DH et al. : A new treatment for endometrial cancer with gonadotrophin-releasing-hormone analogue. *Br J Obstet Gynaecol*, 98 : 1037-41, 1991.
61. Imai A, Ohno T, Fuseya T, Furui T, Tamaya T : Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its mRNA in endometrial carcinoma and endometrium. *Gynecol Oncol*, 55 : 144-8, 1994.

62. Montoli MEF, Gibert OD, Samaniego JM, Balaguero L, Navaro MA : Total and unbound cytosolic estrogen and progesterone receptors in myometrium and fibroid after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Fertil Steril*, 63 : 522-7, 1995.
63. Anisimov VN, Nikonov AA : Tumors of the vagina, uterus and oviduct. In : Turusov US, Mohr U editors. *Pathology of tumours in laboratory animals (Vol I-2nd ed)*, Oxford, Oxford University Press, 445-46, 1990.
64. Taylor CR, Shi SR : Fixation, processing, special applications. In. *Immunomicroscopy : A diagnostic tool for the surgical pathologist* : Taylor CR, Cote RJ (eds), *Major Problems in Pathology (Vol.19)*. W.B. Saunders, Philadelphia. 2nd. ed. 50, 1994.
65. Werner M, von Wasielewski R, Kominoth P : Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, 105 : 253-60, 1996.
66. Taylor CR, Shi SR : Fixation, processing, special applications. In. *Immunomicroscopy : A diagnostic tool for the surgical pathologist* : Taylor CR, Cote RJ (eds), *Major Problems in Pathology (Vol.19)*. W.B. Saunders, Philadelphia. 2nd. ed. 421, 1994.
67. Swenerton KD : Treatment of advanced endometrial adenocarcinoma with tamoxifen. *Cancer Treat Rep*, 64 : 7-16, 1980.
68. Sanfilippo JS, Teichman J, Melvin JR, Wittliff JL : Influence of danazol on cytoplasmic and nuclear estrogen binding capacity in the uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 147 : 364-8, 1983.