

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ÇOCUKLUK ÇAĞINDA KANSER NEDENİ İLE KEMOTERAPİ VE RADYOTERAPİ
ALAN KIZ ÇOCUKLARINDA OVER REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Bertan AKAR

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

2013

KOCAELİ

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ÇOCUKLUK ÇAĞINDA KANSER NEDENİ İLE KEMOTERAPİ VE RADYOTERAPİ
TEDAVİSİ ALAN KIZ ÇOCUKLARINDA OVER REZERVİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Bertan AKAR

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eray ÇALIŞKAN

Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. İzzet YÜCESOY

Etik kurul onay no: KOU KAEK 2009/80

2013

KOCAELİ

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini ve şefkatini hep hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. İzzet YÜCESOY'a, ihtisas süresince sabır ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olan Doç. Dr. Eray ÇALIŞKAN'a, hekimliği ve tecrübeleri ile eğitimimde çok büyük payı olan kliniğimiz öğretim üyeleri; Prof. Dr. Aydın ÇORAKÇI, Prof. Dr. Birol VURAL, Prof. Dr. Gülseren YÜCESOY, Doç. Dr. Sebiha ÖZDEMİR ÖZKAN'a, eğitimim süresince bilgilerinden, deneyimlerinden her zaman faydalandığım hocalarım, abilerim Yrd. Doç. Dr. Emek DOĞER ve Yrd. Doç. Dr. A. Yiğit ÇAKIROĞLU'na, uzmanlık tezim sırasında yardımlarını esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Nazan SARPER ve Prof. Dr. Funda ÇORAPÇIOĞLU, Uzm. Dr. Meriban KARADOĞAN'a;

Yaşamımın en önemli dönemlerinden birini paylaştığım ve her aşamada desteklerini gördüğüm sevgili asistan arkadaşlarıma, birlikte çalıştığım hemşire ve ebe arkadaşlarıma, tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve bana güç veren canım aileme, eşime ve ilham kaynağım oğlum Kuzey Aras' a

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dr. Bertan AKAR

KOCAELİ, 2013

İÇİNDEKİLER

1. AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.a. ÇOCUKLUK ÇAĞI KANSERLERİ	11
2.a.1. ÇOCUKLUK ÇAĞI LÖSEMİLERİ.....	12
2.a.1.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL).....	13
2.a.1.2. AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ (AML).....	13
2.a.2. ÇOCUKLUK ÇAĞI LENFOMALARI.....	13
2.a.2.1. HODGKİN LENFOMA (HL).....	13
2.a.2.2. NON-HODGKİN LENFOMA (NHL).....	13
2.a.3. SANTRAL SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİ.....	14
2.a.4. KEMİK TÜMÖRLERİ.....	15
2.a.5. DİĞER SOLİD TÜMÖRLER.....	16
2.b. ÇOCUKLUK ÇAĞI KANSERLERİNDE SIK KULLANILAN KEMOTEROPÖTİKLER.....	17
2.c. OVER FİZYOLOJİSİ VE KEMOTEROPÖTİKLERİN OVER FİZYOLOJİSİ VE FOLİKÜL GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ.....	20
2.c.1. OVER GELİŞİMİ VE FOLİKÜLOGENEZ.....	20
2.c.2. KEMOTERAPİ VE RADYOTERAPİNİN GONADAL FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ.....	27
2.d. OVER REZERV TESTLERİ.....	30
2.e. FERTİLİTE KORUYUCU TEDAVİLER.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	41
4. SONUÇLAR	47
5. TARTIŞMA	56
6. ÖZET	67
7. İNGİLİZCE ÖZET	69
8. KAYNAKLAR	71

KISALTMALAR DİZİNİ

ÇÇK	: Çocukluk Çağı Kanserleri
RT	: Radyoterapi
KT	: Kemoterapi
FSH	: Follikül Stimulan Hormon
LH	: Luteinizan Hormon
AMH	: Anti-mülleryan Hormon
E2:	: Estradiol
AFS	: Antral folikül sayımı
POY	: Prematür Ovaryan Yetmezlik
AOY	: Akut Ovaryan Yetmezlik
PM	: Prematür Menapoz
GnRH:	: Gonadotropin Releasing Hormon
KSCT	: Klomifen Sitrat Challenge Test
EFORT	: Ekzojen FSH Ovaryan Rezerv Test
HCG	: Human Koryonik Gonadotropin
IVF:	: In vitro Fertilizasyon
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
mIU	: Mili-internasyonel ünite
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
kDa	: Kilo dalton
kg	: Kilogram

Gy	: Gray
ALL	: Akut Lenfoblastik Lenfoma
AML	: Akut Myeloblastik Lenfoma
HL	: Hodgkin Lenfoma
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
KİBAS	: Kafa İçi Basınç Artışı Sendromu
AİDS	: Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu
CMV	: Sitomegalo Virüs
EBV	: Ebstein-Barr Virüsü
BMP	: Kemik morfogenetik protein
DNA:	: Deoksiribonükleik Asit
RNA:	: Ribonükleik Asit
mRNA:	: Messenger Ribonükleik Asit
c-AMP:	: Siklik Adenozin Monofosfat
CFLIP	: Hücre İçi Apoptozis Düzenleyen Protein
MIS	: Mülleryan İnhibe Edici Substrat
ZP	: Zona Pellusida
GDF	: Büyüme Farklılaşma Faktörü
IGF	: İnsülin Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
OIM	: Oosit Mayoz İnhibitörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
bFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
GAST	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonist Uyarı Testi

TNF-alfa : Tumor Nekrosis Faktör Alfa

TNF-beta : Tumor Nekrosis Faktör Beta

TNFR : Tumor Nekrosis Faktör Reseptör



TABLolar ve GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo-1. Çocukluk çağı kanserlerinde sık kullanılan kemoterapi protokolleri.

Tablo-2. Çalışma grubundaki malignitelerin dağılımı.

Tablo-3. Çalışma grubundaki malignitelere göre uygulanan kemoterapötikler ile radyoterapi tedavilerinin dağılımı.

Tablo-4. Çalışma grubunun seçilmiş verilerinin dağılımı.

Tablo-5. Puberteye erişmiş solid ve hematolojik tümörlü olguların over rezervi ve hormon değerlerinin değerlendirilmesi.

Tablo-6. Çalışma ve kontrol gruplarının demografik verileri.

Tablo-7. Çalışma ve kontrol gruplarının Tanner evreleri ve menarş durumları.

Tablo-8. Çalışma ve kontrol gruplarında menstrüel siklusun 2-4. günlerinde bakılan over hacimleri ve hormon değerleri.

Tablo-9. Prepubertal olguların over hacimleri ve hormon değerleri.

Tablo-10. Tedavi sırasında prepubertal olan olgularla, mensturasyon gören olguların AMH, İnhibin B ve toplam antral folikül sayımlarının karşılaştırılması.

Grafik-1. Çalışma grubu pubertal hastalar ile kontrol grubu AMH değerlerinin dağılımı.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağı kanserleri (ÇÇK) gelişmiş ülkelerde 1-14 yaş grubu çocuklarda travmalardan sonra en sık ikinci ölüm sebebidir (1). Hematolojik veya solid kanserler olarak sınıflanan ÇÇK'nin en sık görülen formları Akut Lenfoblastik Lösemi, Hodgkin ve Non-Hodgin lenfoma, Wilms tümörü, Nöroblastoma, santral sinir sisteminin diğer tümörlerdir (1). Bu malignitelerin tedavisinde, kanserin hematolojik veya solid karakterine göre cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombinasyonları kullanılır. Son yıllarda kanser genetiği ve biyolojisindeki gelişmeler ile modern çok ajanlı sitotoksik kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin tedavide yer bulması sayesinde hem ülkemiz hem de dünyada pediatrik popülasyonu etkileyen sık kanser türlerinde 5 yıllık sağ kalım oranlarında belirgin artış gözlenmiştir. Ülkemizde ÇÇK tedavisinden sonra 5 yıllık sağ kalım oranları 1975-1977 yılları arasında %58'den, 1996-2002 yıllarında %79'a yükselmiştir (2). Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir tahmin çalışmasında 2030 yılında her 250 erişkinden 1 tanesinin ÇÇK'nden sağ kalan birey olacağı hesaplanmıştır (3).

Pediatrik dönem kanserlerinde sağ kalım oranlarındaki artış, günümüze dek göz ardı edilen yaşam kalitesi ve fertilitate gibi konuların ön plana çıkmasına neden olmuştur. Ne yazık ki her yıl reproduktif döneme yaklaşan veya bu dönemin başında olan binlerce çocuk ve genç kız kanser tedavisi için gonadal tahribat yapıcı etkisi belirgin olan alkilleyici ajanlara ve ovarian radyasyona maruz kalmakta ve sağ kalan çocukların bir bölümünde ileriki yıllarda over yetmezliği görülebilmektedir (1). Over dokusunda, over rezervini temsil eden primordial foliküllerin kemo/radyoterapiye bağlı erken ve kitlesel kaybı nedeniyle ortaya çıkan bu durum reproduktif yaşlarda fertilitenin kaybına neden olmakta, çocuk sahibi olmayan çiftlerde psikolojik yıkıma ve sonraki yıllarda erken menopoza bağlı erken yaşlanma, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalık riskinde artışa neden olmaktadır (4). Bunun ötesinde gerek infertilite tedavisi gerek ise erken menopoza bağlı hastalıkların tedavisi için ciddi boyutta maddi kaynak harcanması sağlık ekonomisi için yük oluşturmaktadır (5). Tüm bu sebeplerden dolayı son yıllarda over foliküllerinde daha az tahribat yapan kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi hedeflenmekte, ayrıca over rezervini koruyacak medikal yöntemler araştırılmaktadır. Gonadotropinler ile folikül siklusunun

baskılanması, oosit ve over dokusu kryopreservasyonu gibi yöntemler denenmekle birlikte henüz güvenilir, yaygın kullanılabilir ve ucuz bir metod elde etmek mümkün olmamıştır. Çocukluk çağı kanserlerinden sağ kalanlarda fertilitenin korunmasında arzu edilen sonuçlara ulaşmak için folikül fizyolojisinin ve kemo/radyoterapötik ilaçları folikül üzerinde yarattığı hasarın daha iyi anlaşılması gerektiği açıktır. Over rezervini belirlemek için pratikte kullanılmakta olan biyokimyasal parametrelerden folikül stimülan hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), antimüllerian hormon (AMH), İnhibin B ve ultrasonografik parametrelerden antral folikül sayımı (AFS) ve over hacmi gibi belirteçlerin bu hasta grubunda kullanımının fizyopatolojik süreçler ile korelasyonu ve klinik sonuçlara etkisini daha iyi anlaşılması ile over rezervini belirlemede güvenilir yöntemler tanımlanabilmesi ve standart yaklaşımların belirlenebilmesi mümkün olacaktır.

Biz çalışmamızda çocukluk çağı kanserlerinden dolayı kemoterapi ve radyoterapi alan ve almış kız çocuklarında, anamnezden elde edilen güncel veriler, klinik bulgular, over rezervini belirlemek için yaygın olarak kullanılan laboratuvar testleri ve ultrasonografik belirteçleri kullanarak, sitotoksik kemo/radyoterapi yöntemlerinin akut dönemde over rezervi ve folikül havuzu üzerindeki olası etkilerini prepubertal ve pubertal hasta gruplarında kontrol grupları ile karşılaştırarak araştırmayı ve bu testlerin over hasarının boyutlarını değerlendirmede kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçladık .

2. GENEL BİLGİLER

2. a. ÇOCUKLUK ÇAĞI KANSERLERİ

Çocukluk çağı kanserlerinin sıklığı 15 yaş altında 130/1.000.000 olarak bildirilmektedir (6). Batı ülkelerinde çocukluk çağı kanser sıklığı yıllar içerisinde aynı kalmıştır ancak 1980 yıllardan itibaren santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinde hafif bir artış gözlenmektedir. Bu kanserler ABD’nde 1-14 yaş grubu çocuklarda ölüm nedenleri arasında %10.8 ile ikinci sırada kanser yer alırken, ülkemizde infeksiyöz hastalıklar, kalp hastalıkları ve kazaların ardından 4. sırada yer alırlar ve bu yaş grubunda ki ölümlerin %5’ini oluştururlar (1). Yaş gruplarına göre dağılımına baktığımızda ilk 4 yaşa kadar Nöroblastom, Willms tümörü ve Retinoblastom gibi solid tümörler en sık görülen kanserleri oluştururken, 10 yaşından sonra hematolojik maligniteler artar ve Hodgkin lenfoma, Osteosarkom ve Ewing sarkom daha sık görülür.

Solid tümörlerde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombine edildiği tedaviler ön planda düşünülürken, hematolojik malignitelerde ise kemoterapötik kombinasyonlarının yanı sıra radyoterapide başarı ile kullanılır. Son yıllarda gelişen tedavi modaliteleri sayesinde çocuklardaki kanserlerin başarı ile tedavi edilmesi şansı belirgin olarak yükselmiştir. Gelişmiş ülkelerde uzun süreli yaşam hızlarının %75-80’lere ulaştığı düşünülürse, her yıl 2500-3000 civarında çocukluk çağı kanserinin beklendiği ülkemizde kanserli çocukların yaşam hızlarının iyileştirilmesi için disiplinler arası işbirliğinin yanı sıra, devlete ve diğer örgütlere önemli görevler düşmektedir (6). Aynı zamanda bu yüz güldürücü sonuçların ardından tedavi şekli planlanırken çocukları sadece yaşatmak değil, onları geç yan etkilerinden korumak da amaçlanabilir hale gelmiştir.

2.a.1. ÇOCUKLUK ÇAĞI LÖSEMİLERİ

Ülkemizde her yıl yaklaşık 900 çocuk lösemiye yakalanmaktadır. Hemotopoetik hücrelerin kanseri olan lösemnin patogenezinde aşağıdaki etkenler suçlanmaktadır (7);

1. Radyasyon: İyonize radyasyon veya elektromanyetik radyasyon; atom bombasından sağ kalanlarda lösemi insidansı artmıştır,
2. Kimyasal maddeler: Ebeveynlerin alkol, tütün kullanımı, pestisit maruziyeti,
3. İlaçlar: Bazı kemoterapötikler (Melfalan),
4. Virüsler: Ebstein Barr virüsü (EBV), insan T lenfosit virüsü (HTLV), Parvo virüs ve Varisella,
5. Genetik faktörler: Tek yumurta ikizlerinin birisinde ilk 5 yaşta lösemi gelişmesi durumunda, diğesinde risk %20 olarak bildirilmiştir. Kardeşlerde lösemi riski genel popülasyondan 4 kat fazladır. Kromozom bozuklukları (Trizomi 21, Bloom sendromu, Fanconi anemisi) ve genetik hastalıklar (Li-Fraumeni, Nörofibromatozis gibi) genetik faktörler arasında rol oynar.

2.a.1.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL): Çocukluk çağında en sık görülen lösemi tipi Akut Lenfoblastik Lösemidir (ALL). Ülkemizde yılda 750 yeni olgu görülmektedir. En sık 2-6 yaşları arasında görülen bu kanserlerde erkek/kız oranı 1/1.1 ile 1/1.5 arasında bildirilmektedir. Sık görülen yakınmalar; ateş (%60), yorgunluk (%50), solukluk (%40) ve kemik ağrısı (%23) iken bu yakınmalara hepatosplenomegali (%68) ve lenfadenopati (%50) gibi bulgular da eşlik edebilir (8).

ALL genel olarak tedavisinde yüz güldürücü sonuçlar elde ettiğimiz kanserlerinden biridir. Tedavini başarısı açısından en önemli 2 faktör başvuru yaşı ve lökosit sayısıdır. Bu malignitelerde genel sağ kalım oranı %85, nüks oranı ise %5'dir. Tedavide kullanılan kemoterapi çeşitli evrelere ayrılarak incelenebilir; indüksiyon evresinde hastayı blast yükünden kurtarmak ve eski performansına döndürmek amaçlanırken, konsolidasyon/intensifikasyon evresi remisyon sağlandıktan sonraki yoğunlaştırma tedavisidir. Ardından idame tedaviye geçilerek minimal kalıntı hastalığın yok edilmesi amaçlanır. İntratekal kemoterapi/radyoterapi MSS profilaksisinde uygulanırken, seçilmiş yüksek riskli olgulara veya nüks vakalarda kemik iliği tansplantasyonu gerekli olur (8).

2.a.1.2. AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ (AML): AML, kemik iliğinde lenfoid hücreler dışında kalan hücre grubunun kanseridir. Çocukluk çağı lösemilerinin %20'sini oluşturur ve ALL'nin aksine her iki cinsiyette de benzer sıklıkta ve daha büyük çocuklarda görülür. AML'nin tedavi prensipleri ALL tedavisi ile benzerdir ancak sağ kalım oranları daha düşük olduğu için daha yoğun bir tedavi uygulanmaktadır. Beş yıllık sağ kalım %40-50 arasındadır. Tedavi evreleri remisyon indüksiyonu ve intensifikasyondan oluşur. Yüksek riskli olgularda allojenik kök hücre nakli uygulamaları sağ kalımı artırmıştır (9).

2.a.2. ÇOCUKLUK ÇAĞI LENFOMALARI

Ülkemizde çocukluk çağında görülen maligniteler içerisinde ikinci sırada olan lenfomaların %60'ı Hodgkin ve %40'ı non-Hodgkin lenfoma olarak gözlenmektedir. Yetmişli yıllardan bu yana lenfoma tedavisinde %80-90'a varan sağ kalım oranları elde edilmiş ve tekrarlayan hastalıklarda dahi kür şansı sağlanmıştır (10).

2.a.2.1. HODGKİN LENFOMA (HL): Yıllık insidansı 5-7/1.000.000 olarak bildirilen HL'nın görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelerde adolesan öncesi dönemde, gelişmiş ülkelerde ise adolesan sonrası dönemde pik yapar. İmmün yetmezlik [Ataksi-Telenjektazi Sendromu, Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu (AİDS)], Human Herpes Virüsü Tip 6, Sitomegalovirüs (CMV), EBV enfeksiyonları etyolojide suçlanmaktadır. En sık başvuru yakınması ağrısız, lastik kıvamlı, asemptomatik servikal ya da supraklavikular lenfadenopatidir. Ateş, gece terlemesi, kilo kaybı yakınmalara eşlik eder (11).

Pulmoner, nörolojik, kemik, karaciğer, böbrek ve kemik iliği tutulumu gözlenebilen bu hastalığın tedavisi kemoterapi ve radyoterapiden oluşur. Yanıtsız ya da nüks hodgkin lenfoma hastaları yüksek doz kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonuna yönlendirilirler. Uygun tedavi sayesinde erken evre hastalıkta %90'ın üzerinde, ileri evre hastalıkta %70-90 hastaliksız sağ kalım elde edilebilir (11).

2.a.2.2. NON-HODGKİN LENFOMA (NHL): NHL'lar en sık 5-9 yaşları arasında görülür ve olguların %80'i ileri evrede ve %90'ı yüksek derecelidir. Ailevi

olguların yanı sıra immün yetersizlik durumunda, fenitoin, pestisit ve solventler gibi kimyasallara maruz kalma, özellikle EBV gibi viral enfeksiyonlar etiyojide suçlanmaktadır. Yüksek proliferasyon hızına sahip bu tümörler kitle oluşturabilirler, lenfadenopati ile tanınabilirler.

NHL tedavisinde ana yöntem kemoterapidir. Kitleye bağlı bası semptomları olduğunda radyoterapi, cerrahi veya steroid tedavisi düşünülebilir. Ortalama sağ kalım %70-80 civarındadır (12).

2.a.3. SANTRAL SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİ

SSS tümörleri ülkemizde lösemi ve lenfomalardan sonra en sık görülen kanser tipidir. İnsidansı 25/1.000.000 olup erkeklerde hafifce sıktır. Ailevi kanser sendromları, iyonize radyasyona maruziyet, edinsel ya da doğumsal immün yetmezlik durumlarında sıklığı artar. Çocukluk çağında en sık glial kökenli tümörlere rastlanır. Astrositomlar %40 (Serebellar astrositom %10-20 ve supratentoryal astrositom %15), PNET-Medullablastom %15, Ependimoma %8-9, beyin sapı gliomları %10-20, diğer tümörler %10 oranında gözlenirler. En sık görülen klinik bulgular Kafa İçi Basınç Artışı Sendromu (KİBAS) ile ilişkilidir ve baş ağrısı ile konvülsiyonlar sıktır. Hiçbir nörolojik bulgu olmaksızın süt çocukluğunda baş çevresinde artış ve sabah baş ağrısı şikayeti kranial görüntüleme endikasyonu oluşturur (13, 14).

2.a.3.1. MEDULLOBLASTOM: Posterior fossada yerleşim gösteren, primitif nöroektodermal tümörlere medulloblastom adı verilir. Glial tümörlerden daha hızlı klinik seyir, metastaz ve kötü prognoza sahiptir. Tedavide ilk basamak cerrahidir ve tam rezeksiyon sağ kalımla bire bir ilişkilidir. Cerrahi sonrasında hastalara mutlaka radyoterapi ve kemoterapi uygulanır (13, 14).

2.a.3.2. ASTROSİTOMLAR: Düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak ikiye ayrılan bu tümörlerde, KİBAS dahil olmak üzere tümörün yerleşim yerine göre değişen çeşitli klinik tablolar gözlenir. Düşük dereceli gliomalarda ana tedavi cerrahidir. Ancak nüks ya da ilerleyici hastalık durumunda ek olarak radyoterapi ya da kemoterapi uygulanır. Düşük dereceli gliomlarda 5 yıllık sağ kalım %70-100'dür. Yüksek dereceli gliomalarda ana tedavi yine cerrahidir ancak nüksün engellenmesi

amacıyla ek radyoterapi ve/veya kemoterapi uygulanır. Prognoz oldukça kötüdür (13, 14).

2.a.3.3. OPTİK GLİOMLAR: Çocukluk çağı MSS tümörlerinin %5'ini oluşturan bu tümörler, görme bozukluğu, nistagmus, proptoz, papil ödem, optik atrofi gibi bulgular ile tanınırlar. Günümüzde radyoterapinin yan etkilerinden korunmak amacı ile kemoterapi gittikçe daha sık kullanılmaktadır (13, 14).

2.a.3.4. EPENDİMOMA: Sıklıkla 4. ventrikülden köken alan glial kökenli bu tümör hidrosefali ile kendini belli eder. Tedavisi tümörün tam olarak çıkarılması olmak ile beraber tümörün derecesine göre radyoterapide cerrahiye ek olarak uygulanabilir ancak kemoterapinin rolü tartışmalıdır. Tam cerrahi yapılabilen olgularda 5 yıllık sağ kalım %60-80 iken, subtotal cerrahi uygulana hastalarda 5 yıllık sağ kalım %20-40 arasında bildirilmektedir (13, 14).

2.a.3.5. BEYİN SAPI GLİOMLARI: Diffüz ya da fokal tipte görülebilen bu tümörlerin çoğunda diffüz tipte tutulum gözlenir ve bu durum genellikle tam cerrahiye engel olur. Tedavide radyoterapi ve kemoterapi uygulansa da diffüz beyin saps tümörlerinde ortanca sağ kalım süresi 1 yıldan azdır. 5 yıllık sağ kalım %5-20 arasındadır (13, 14).

2.a.3.6. İNTRAKRANYAL GERM HÜCRELİ TÜMÖRLER: Nadir (%1-3) görülen bu tümörler daha ileri çocukluk döneminde görülürler. Germinom (%55), teratom ve mikst germ hücreli tümörler nispeten sık görülen alt tipleridir. Matür ve selim yapıdaki tümörlerde cerrahi yeterliyken, diğer tiplerde tedaviye kemoterapi ve radyoterapi de eklenir (13, 14).

2.a.4. KEMİK TÜMÖRLERİ

2.a.4.1. OSTEOSARKOM: Osteoblastik farklılaşma gösteren ve osteoid üreten mezenkim hücrelerinin kanseridir. Ülkemizdeki çocukluk çağı tümörleri arasında 7. sıklıkta görülür. Erkek çocuklarda, lineer büyümenin hızlandığı 15-19 yaşlar arasında, distal femur (%50), proksimal tibia (%25), proksimal humerus (%10) gibi kemiklerin metafizlerinde daha sık görülür. Genetik eğilimin yanı sıra malignite tedavisinde uygulanan radyoterapi ve alkilleyici ajanlar da etyolojide suçlanmaktadır.

Şişlik ve ağrı ile tanınan bu tümörler en sık akciğerlere metastaz yapar. Tanı anında hastaların %20'inde metastaz vardır. Tedavisi cerrahi ve kemoterapiden oluşur; genel olarak radyoterapi etkili değildir. Tümörün kemoterapiye verdiği nekroz oranı sağ kalımla doğru orantılıdır. Metastazsız sağ kalım %50-70 arasındadır (15).

2.a.4.2. EWING SARKOMU: Kemiğin indiferansiye nöronal kaynaklı tümörüdür. Hastaların %87'sinde kemik, %8'inde kemik dışı, %5'inde periferik primitif nöroektodermal tümör izlenir. Adölesan dönemde daha sık görülen bu tümörler ağrı (%85), şişlik (%60), ateş ve patolojik kırık ile tanınırlar ve pelvis ile alt ekstremitte en sık tutulan alanlardır. Tedavi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiden oluşur. Beş yıllık sağ kalım yaklaşık %50'dir (16).

2.a.5. DİĞER SOLİD TÜMÖRLER

2.a.5.1. RETİNOBLASTOM: Embriyonik nöral retinanın kanseridir ve çocukluk çağının en sık görülen intraokuler tümörüdür. En sık görülen orbita tümörü ise rabdomyosarkomdur. Retinoblastom ülkemizde 15 yaş altı kanserler sıklık sırasında 8. sıradadır. İnsidansı 20.000 canlı doğumda 1 olan bu tümörlerin %60 sporadik ve %40 aileseldir ve olguların %90'ı 4 yaşın altındadır. En sık görülen bulgu lökokori iken, %20 oranında strabismus ve 3. sıklıkta üveitis görülür. Tedavide ileri evre tümörde enükleasyonu takiben kemoterapi ve/veya radyoterapi kullanılır. Erken göz içi evrelerde kemoreduksiyon ile beraber laser fotokoagülasyon, plak gibi radyoterapi seçenekler kombine edilerek uygulanır. Sağ kalım erken evrelerde %100 iken ileri evre tümörlerde bu oran %30'a düşer (17).

2.a.5.2. NÖROBLASTOM: Adrenal medullayı ve sempatik ganglion hücrelerinin öncülü ilkel nöral krest hücrelerden kaynaklanan tümörlere nöroblastom adı verilir. Çocukluk çağının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Yıllık sıklığı 7000'de 1'dir. Ancak 3 ayın altında farklı sebeplerle ölen süt çocuklarının otopsilerinde nöroblastom sıklığı 1/259 olarak bildirilmiştir (18). Bu fark, inutero gelişen nöroblastom olgularının zamanla matüre olup normal doku haline geldiğini düşündürmektedir. Aşırı katekolamin üretimine bağlı terleme, kızarma, solukluk atakları, baş ağrısı, çarpıntı ve hipertansiyon görülebilir. Prognozu belirleyen en önemli iki faktör yaş (<1 yaş en iyi seyirli gruptur) ve evredir. Tedavide cerrahi,

kemoterapi ve radyoterapi birlikte uygulanır. Evre IV tümörlerde özellikle büyük çocuklarda yaşam şansı yok denecek kadar azdır.

2.a.5.3. WILMS TÜMÖRÜ: Wilms tümörü ya da nefroblastom çocukluk çağında görülen böbrek kanserine verilen addır. 15 yaş altı kanserleri arasında %6.5 oranıyla 4. sırada görülür ve büyük çoğunluğu ilk 5 yaş içerisinde tespit edilir. Genelde sporadik olarak görülmek ile birlikte %1 olguda ailesel gen mutasyonlarıyla birlikte dir. En sık görülen belirti karında kitledir. Hipertansiyon, hematüri, polisitemi, kanama diyatezi, kilo kaybı, diare görülebilir. Prognozda ve tedavi seçiminde önemli olan faktörler; tümörün evresi, histolojik anaplazi derecesidir. Tedavi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir. Evre I ve II'de sağ kalım %90'ın üzerinde iken ileri evrede % 50-70 arasındadır (19).

2.a.5.4. RABDOMYOSARKOM: Çocukluk çağının en sık görülen yumuşak doku sarkomudur. Çizgili kas hücrelerinden köken almakla birlikte çizgili kas hücrelerinin olmadığı mesane, safra kanalı ve farinkste de görülebilir. Dört yaş civarı ergenlik yaşları tümörün en sık görüldüğü iki yaş dönemidir. Histolojik tipleri prognozda ve tedavi planlamasında önemlidir. Embriyonal (%57), alveolar (%24), botroid (%6) en sık görülen histolojik tiplerdir. Yerleşim yeri sıklık sırası ile; baş-boyun (%40), genitoürüner (%20), ekstremiteler (%20), gövde (%10) ve retroperitondur (%10). Hastalar en çok ağrısız kitle yakınması ile başvururlar. Tedavide cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi birlikte kullanılır. Beş yıllık sağ kalım %70 civarındadır (20).

2.b. ÇOCUKLUK ÇAĞI KANSERLERİNDE SIKLIKLA KULLANILAN KEMOTERAPÖTİK İLAÇLAR

Çocukluk çağı kanserlerinde kemoterapi, kanseri tedavi etmek, kanseri kontrol etmek veya kanserin yol açtığı belirtileri gidermek ya da hafifletmek için kullanılabilir. Bu ilaçlar kimyasal yapılarına, hücre siklusuna etkilerine, orijinleri ve etki mekanizmalarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır (21, 22).

A. Kemoterapötik ilaçların hücre siklusuna etkisine göre sınıflaması:

1. Siklusa spesifik ajanlar;

a. Siklus spesifik, faz nonspesifik ajanlar hücre siklusunda her fazdaki hücreye etkilidirler,

b. Siklus spesifik, faz spesifik ajanlar ise hücre siklusunun belli fazlarına etkiler. G1: hücre siklusunun başlangıç fazıdır. Süresi değişkendir ve bu fazda RNA ile proteinler sentezlenir. L-asparajinaz ve kortikosteroidler bu fazda etkilidir. S fazı: DNA sentez fazıdır ve süresi 4-24 saat arasında değişir. Antimetabolitler, heksametilmelamin, hidroksiüre, prokarbazin S fazına etkili kanser ilaçlarıdır. G2: bu fazda DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi devam eder. 2 saat süren bu fazda mitotik ağ için mikrotubuler prekürsörler yapılır. Bleomisin, mitoksantron ve topoizomera 1 inhibitörleri bu fazda etkilidir. M fazı: bu fazda ise RNA ve protein sentezi durur. Genetik materyal ikiye bölünür. Süresi 0,5-2 saattir. Vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinler ve taksanlar bu fazda etkilidir. G0 fazı: Bu faz istirahat fazıdır. Bu fazdaki hücreler genellikle kemoterapiye dirençlidir. Siklus spesifik faz spesifik ajanlarda doz artırılması etkiyi arttırmaz ancak ilaç verilme süresinin uzatılması etkiyi artırır.

2. Siklus non-spesifik ajanlar: Alkilleiyici ajanlar, antibiyotikler siklusa spesifik olmayan ilaçlardır. Bu grup ve siklus spesifik faz nonspesifik ajanlar lineer doz cevap ilişkisine sahiptir yani ilaç dozunun artırılması antitümör etkiyi artırır. Hem solid tümörler gibi yavaş büyüyen hem de hematolojik kanserler gibi hızlı çoğalan tümörlere etkilidir.

B. Kemoterapötik ilaçların orijinleri ve etki mekanizmalarına göre sınıflaması:

1. Alkilleiyici ajanlar: Sıklıkla DNA ve RNA nükleik asitleri ve proteinlerin amino, karboksil, sülfhidril, fosfat grupları yerine alkil gruplarını (CH₂) transfer ederek hücre fonksiyonlarını bozarlar. 7 pozisyonundaki guanin en sık alkilenen bölgedir ve sonuçta mRNA yanlış kodlanır ve DNA sarmalında kırıklar oluşur. Bu ilaçlar kemik iliği ve germ hücrelerine toksiktirler. Nitrojen mustardlar (örnek: Siklofosfamid), thiotepa, busulfan, karmustin, cisplatin gibi ilaçlar bu gruba örnek verilebilir.

2. Antitümör antibiyotikler: Özellikle yavaş büyüyen tümörlere etkili olan bu ilaçlar DNA ile interkalasyon yaparlar. Topoizomera 1 ve 2'yi inhibe ederek DNA replikasyonu ve mRNA yapımı engellenir. DNA kırıkları oluşur. Bleomisin,

aktinomisin, dounorubisin ve mitomisin-C bu gruba örnek verilebilir. Bleomisin DNA tamir enzimleri olan ligaz'ları inhibe eder.

3. Antimetabolitler: Purin ve pirimidin sentezinde rol oynayan enzimleri bloke ederek etki gösteren bu kemoterapötikler DNA sentezini bloke ederler. 6-tiyoguanin, fludarabin, merkaptopürin pürin analoglarına, ayrıca kapesitabin, sitozil-arabinozid, gemsitabin pirimidin analoglarına örnek olarak verilebilir. Folat analogu olan methotreksat da antimetabolit grubundandır.

4. Bitki alkaloidleri: Esas olarak metafazda etkili olan vinka alkaloidleri mitozda kromozomların migrasyonunu sağlayan tübülün proteinine bağlanır. Epiodofilotoksinlerin DNA'ya direkt toksik etkileri mevcuttur. DNA kırıkları oluşturur ve topoizomeraz 2 enzimini bloke ederler. Taksanlar mikrotübüllerin tübüline depolimerizasyonunu engelleyerek etkilerini gösterirler.

5. Topoizomeraz 1 inhibitörleri: İrinotekan ve topotekan bu gruptadır.

6. Diğer kemoterapötikler: Hidroksiüre, heksametilmelamin, streptozosin gibi çeşitli etki mekanizmaları olan ilaçlardır (21, 22).

Sık görülen solid ve hematolojik çocukluk çağı kanserlerinde yaygın olarak kullanılan çoklu kemoterapi protokolleri Tablo-1'de sunulmuştur.

Tablo-1. Sık Görülen Bazı Çocukluk Çağı Kanserlerinde Sık Kullanılan Kemoterapi Protokolleri

ALL	BFM protokolü (dounomisin,vinkristin,prednizolon,siklofosamid,sitozin arabinozid)
AML	BFM protokolü (dounomisin,vinkristin,prednizolon,siklofosamid,sitozin arabinozid)
HODGKİN LENFOMA	MOPP protokolü (nitrojen mustard, vinkristin, prokarbazin, prednizolon) ABVD protokolü

	(adriamisin, bleomisin, vinblastin, dekarbazin) COPP protokolü (siklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednizolon)
NONHODGKİN LENFOMA	BFM protokolü (dounomisin, vinkristin, prednizolon, siklofosfamid, sitozin arabinozid)
MSS TÜRÖRLERİ	SIOP-PNET tedavi protokolü (karboplatin, vinkristin, CCNU)
OSTEOSARKOM	Metotreksat, adriamisin, sisplatin ve ifosfamid

2.c. OVER FİZYOLOJİSİ VE KEMOTERAPÖTİKLERİN OVER FİZYOLOJİSİ VE FOLİKÜL GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

2.c.1. OVER GELİŞİMİ ve FOLİKÜLOGENEZ

Üreme biyolojisinin ana organı olarak görülen overin başlıca iki fizyolojik görevi vardır. Bunlardan ilki ovaryen follikülogenez olarak da bilinen gametogenez ki, düzenli biçimde oosit olgunlaştırma ve olgunlaşan oositleri overden salgılama işlemidir. Diğeri ise oositlerin gelişme basamakları sırasında steroid hormon salgılanmasıdır (23).

2.c.1.1. Germ hücre gelişimi: Primordiyal germ hücreleri embriyo gelişiminin 11. basamağında yapısal hücrelerden büyüklükleri ve kromatin içerikleri bakımından ayrılırlar. Vitellüs kesesi duvarında kaudal bölgede yerleşik durumda bulunan bu hücreler daha sonra dorsal mezenter aracılığıyla gonodal kabartıya göç eder (24, 25). Üreme sisteminin gelişiminde ilk dönem olan indifferent veya ambiseksual dönem erkek ve dişi üreme sisteminin embriyolojik gelişiminde tamamen aynıdır. İlerleyen dönemde paramezonefrik kanalların gelişim yönü cinsiyet hakkında belirleyici rol oynamaya başlar (25, 26). Gestasyonun 6-8. haftalarında ovaryen farklılaşmanın ilk işaretleri, 16-20. haftalarda maksimum kapasitesi olan 6-7 milyon oogoniaya ulaşmasını sağlayacak germ hücrelerinin hızla mitotik çoğalmaya başlamasıdır (27, 28). Bu dönemden sonra germ hücre sayısı giderek azalacak ve yaklaşık 50 yıl sonra

ise oosit rezervi tamamen tükenecektir (29). Germ hücrelerinin mitoz bölünmeler ile oogoniya dönüşmesinin ardından, oogoniyalar ilk mayotik bölünmeye girip profaz evresinde durakladıkları oositlere dönüşürler. Bu süreç 11-12. haftalarda başlar (30). Mayozun diploten evresine ilerlemesi ancak gebeliğin geri kalanında olmakta ve doğumda tamamlanmaktadır. Gestasyonun 18-20. haftalarında, hücreden oldukça zengin olan korteks daha derindeki medullar bölgeden kaynaklanan vasküler kanallar tarafından yavaş yavaş delinir ve bu folikül oluşmasının başlangıcını belirtir (31). Parmak şeklindeki vasküler çıkıntılar kortekse girmesiyle korteks sekonder seks kordlarının görüntüsünü alır. Kan damarlarının invazyonu yoğun kortikal hücre kütlelerini gittikçe daha küçük kısımlara ayırır. Mezenşimal ya da epitelyal kaynaklı perivasküler hücreler de damar ile birlikte sürüklenir ve bu hücreler mayozun birinci evresini tamamlamış olan oositleri çevreler. Sonuçta oluşan birim primordial folikül - mayozun profaz evresinde duraklamış olan bir oosit ve onun etrafında bir bazal membran tarafından çevrelenen tek katlı ağ şeklinde öncül granüloza hücreleridir. Sonunda bütün oositler bu şekilde kaplanırlar. Granüloza hücreleri çölemik epitelyum veya mezenşim öncülerinin farklılaşmasından oluşur.

2.c.1.2. Overde foliküler gelişim: Puberte ve menopoz arasında, siklik ovarian aktivite her 28 günde bir adet matür folikül salınmasına izin verir. Ortalama bir kadında reproduktif hayatı boyunca ovum gelişimi yaklaşık 400'dür (32). Folikülogenez over korteksinde meydana gelmektedir. Dört majör gelişim evresi bulunmaktadır;

- 1 - Primordial folikül seçimi
- 2 - Preantral folikül gelişimi
- 3 - Antral (Graafian) folikül gelişimi
- 4 - Folikül atrezisi

2.c.1.3. Primordial folikül seçimi; Over korteksinde gerçekleşen folikülogenezis uzun bir süreçtir ve bir primordial folikülün ovulasyon evresine büyüüp gelişmesi için yaklaşık olarak bir yıllık bir gelişimi gerektiren primordial foliküllerden seçilmektedir (33). Primordial foliküller overin temel reproduktif birimleri olarak

görülmektedir. Çünkü tüm dominant foliküllerin dolayısıyla da menstruel siklusun kaynağını oluşturmaktadırlar. Primordial folikül, mayozun profaz evresinde arrest olmuş küçük bir primer oosit (25µm çaplı), tek katlı yassı veya kollumnar dizilim gösteren granüloza hücresi ve bazal lamina içermektedir. Bazal lamina sayesinde granüloza hücresi ve oosit mikro çevrede bulunan diğer hücrelerle direkt temasta olmazlar, bağımsız bir kanlanmaya sahip değildirler ve dolayısıyla endokrin sistemden daha sınırlı olarak etkilenmektedirler. Tüm primordial foliküller (oositler), insan fetusunda gebeliğin 6. ve 9. ayları arasında gelişmektedir. Dolayısıyla, kadın yaşamının reproduktif sürecinde yer alan tüm oositler doğumdan itibaren vardır. (34). Recruitment ise bazı primordial foliküllerin gelişim için uyarılması durumudur. Granüloza hücrelerinin mitotik potansiyel kazanması ve şekillerinde yassıdan küboidal epitele dönüşüm folikül seçiminin histolojik göstergeleri olarak değerlendirilmektedir. Bu süreçte gen aktivasyonu ve oosit gelişimi izlenir. Hayvanlarda, granüloza-orijinli kit ligant (35), teka-orijinli kemik morfogenetik protein (BMP)-7 (36) yüksek pituiter FSH düzeyi (37) gibi aktivatörler ve mülleryan inhibe edici madde (MIS) gibi inhibitörler recruitmenti kontrol eder (38). Klinik önemine rağmen kadında folikül seçiminin nasıl kontrol edildiği hakkında henüz bilgi yoktur. Recruitment menopoz sonrasında primordial foliküller tükenene kadar sürmektedir. Primordial foliküllerin recruitmenti kadın yaşamının ilk üç dekadı boyunca istikrarlı bir şekilde devam eder; bununla birlikte over rezervinin kritik sayı olan 25000 olduğu 37.5±1.2 yaşından sonra, primordial folikül kaybı yaklaşık olarak 2 kat artmaktadır (34).

2.c.1.4. Preantral folikül gelişimi, primer folikül; Preantral gelişim fazı üç grupta incelenmektedir: Primordial, primer ve sekonder folikül evresi. Primordial folikülden tamamıyla gelişmiş bir sekonder folikül oluşumu için yaklaşık 290 gün veya 10 düzenli menstruel siklus kadar süre gerekmektedir. Primer folikül, oosit etrafında tek kat olarak dizilen bir veya daha fazla küboidal granüloza hücresi görülmesi ile tanımlanır. Primer folikülde izlenen major gelişmeler FSH reseptörü ekspresyonu ve oosit büyümesi ve farklılaşmasıdır. Primer folikül gelişimi süresince granüloza hücreleri FSH reseptörü eksprese ederler (39). Preantral folikül gelişimi süresince granüloza hücrelerinin FSH reseptörleri eksprese etmesi, FSH'ın preantral folikül gelişiminde rol oynadığını düşündürse bu durum ispatlanmış değildir (40). Primer

folikül gelişimi oositte meydana gelen dikkat çekici değişikliklere eşlik etmektedir. Preantral period boyunca oosit 25 µm'den 120 µm'ye büyümektedir. Oosit genomu aktive olur ve mRNA'larının genetik okunması sonucunda proteinler oluşur. Örneğin, zona pellusida (ZP) proteinlerini kodlayan ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 genleri aktive edilir. Sekrete edilen ZP proteinleri yumurtanın etrafında koruyucu bir tabaka oluşturmak üzere oosit yüzeyinde polimerize olur. ZP-3 yüzey spesifik sperm-bağlayıcı moleküldür. İnsan oositleri yüksek düzeylerde GDF-9 ve BMP-15 eksprese ederler ve invitro olarak GDF-9'un insan preantral foliküllerinin gelişimi üzerinde sitümüle edici etkisinin olduğu gösterilmiştir (41, 42). Preantral folikülogenezisin devamında otokrin ve parakrin faktörlerin etkisi ile sekonder folikül ortaya çıkar. Bu sırada görülen majör değişiklikler granüloza hücre sayısındaki artış ve teka hücrelerinin ortaya çıkışıdır. Granüloza hücreleri küboid epitelden stratifiye veya psödöstratifiye epitele değişim gösterir (43). Sekonder folikül gelişimi aynı zamanda teka gelişimi ile karakterizedir. İki primer teka tabakası oluşmaktadır; interstisyel hücrelere değişen içteki internal teka tabakası ve düz kas hücrelerine değişen dıştaki eksternal teka tabakası, teka gelişmesi ayrıca anjiogenezis yoluyla çok sayıda küçük damar yapılarının gelişmesi ile birlikte olmaktadır. Sonuçta, gonadotropinlerin ve besinlerin buraya ulaşmasına ve artıkların, sekrete edilen maddelerin buradan uzaklaştırılmasına olanak sağlamak üzere, folikül çevresinde kan dolaşımı başlar. Preantral fazın sonucunda tam gelişmiş bir sekonder folikülde şu temel yapılar seçilebilmektedir; Zona pelusida ile çevrelenmiş tamamiyle gelişmiş bir oosit, yaklaşık 9 katlı bir granüloza hücre tabakası, bazal lamina, teka interna, teka eksterna ve teka dokusu içinde kapiller ağ içerir (43).

2.c.1.5. Antral folikül gelişimi: Antral faz ise dört gruba ayrılmaktadır: küçük (klas 2, 3, 4, 5), orta (klas 6), büyük (klas7) ve preovulatuvar graafian folikül evresi (klas 8). Antrum formasyonu ile 20 mm preovulatuvar folikül arasında yaklaşık olarak 60 gün veya iki düzenli menstruel siklus bulunmaktadır (44). Graaf folikülü, içerisinde folikül sıvısı olarak adlandırılan bir sıvı olan bir kavite veya antrum ile karakterizedir. Foliküler sıvı plasma karakterlidir ve oosit ve granüloza hücrelerinin sekresyonları ile oluşmaktadır. Graafian folikül gelişmesinin başlaması, oositin bir kutbunda sıvı dolu bir kavitenin belirmesi ile karakterizedir (45). Graaf folikülü, gelişimi büyümesi ve anlaşılmasını kolaylaştırabilmek amacıyla boyuta göre dört

evreye ayrılmaktadır. Her dominant folikülün sırasıyla küçük (1-6mm), orta (7-11mm), büyük (12-17mm) ve preovulatar (18-23) evreleri tamamlamak için bir şansı vardır (45). Folikül atrezisi genellikle küçük veya orta evresinde görülmektedir. Teka internanın ultrastüktürel özellikleri, aktif olarak steroid sentezleyen hücrelerdeki gibidir. Teka interstisyel hücreler LH ve insulin reseptörleri bulundurulur ve bunları stimülasyonu ile yüksek düzeylerde androjen sentezi, özellikle de androstenedion sentezi gerçekleştirilir (46). Graaf folikülünde dört farklı granüloza subünitesi ortaya çıkar; Membran, perantral alan, kumulus ooforus ve korona radiata (43). Dominant folikül menstruel siklusta luteal fazın sonunda klas 5 foliküllerden seçilmektedir (47). Foliküler faz ilerledikçe dominant folikül büyümesi hızlanır; 1-5. günlerde $6,9 \pm 0,5$ mm iken, 6-10.günlerde $13,7 \pm 1,2$ mm ve 11-14. günlerde $18,8 \pm 0,5$ mm olarak ölçülmektedir (45). Seleksiyonun altında yatan mekanizma plazma FSH düzeyinde görülen sekonder artıştır. Menstrüel siklus boyunca, luteal fazın sonunda plazma progesteron düzeyinin bazal seviyeye düşmesinden birkaç gün önce sekonder FSH artışı başlamaktadır. Korpus luteumda üretilen estriol ve inhibin A miktarının azalmasının, sekonder FSH düzeyinin artışı ve dominant folikül seçimi için en önemli nedenler olduğuna inanılmaktadır. Foliküler sıvı içerisine FSH'nun girmesi seleksiyon için gerekli stimülasyonu başlatır. Kohort foliküllerden sadece birisinin mikroçevresinde FSH'nu konsantre edebilme kapasitesini nasıl kazandığı sorusu, cevabı henüz bulunmamış önemli bir sorudur (45).

2.c.1.6. Ovulasyon oluşumu: Preovulatar olgun bir folikül 18-20 mm çapında geniş antrumludur. Etrafında iyi vaskülarize teka hücreleri vardır. Teka tabasında foliküle ait düz kas hücreleri vardır. Ovarian stroma içindeki bağ dokusu arasında yer alan dominant folikül giderek overin korteksine yaklaşarak over yüzeyinde çıkıntı yapar ve folikül tepe noktası açılarak sekonder oosit çevre kumulus kompleksi ile dışarı atılır. Ovulasyon sonrası geride kalan granüloza ve teka hücreleri korpus luteumu oluşturur (48, 49). Ovulasyonu tetikleyen ana olay over ile hipotalamo-hipofizer sistem arasındaki hormonal etkileşimdir. Bu dönemde salgılanan günlük östrojenin %80'i dominant folikülden, kalan kısmı ise immatür foliküllerden, periferik testesteron, androstenedion ve östriol'un dönüşümünden elde edilir. Serumda yeterli (50 saat süreyle, 200 pg/ml'nin üzerinde) östrojen eşik değerine

ulaşınca, östrojen pikinden yaklaşık 12-24 saat sonra pozitif feedback etki ile LH sekresyonu stimüle olur. LH artımı ile dominant folikül sıvısında bulunan ve primer oositin'in mayoz bölünmenin 1. fazında duraklamasını sağlayan oosit mayoz inhibitörü (OIM) devre dışı bırakılarak, mayoz bölünme tekrar başlatılır. Ovulasyon sırasında overden salınan oosit, 1. mayoz bölünmesi tamamlanmış, kromozom sayısı yarıya düşmüş olan 23 kromozomlu sekonder oosit'tir. Ovulasyon, LH atım başlangıcından 34-36 saat, LH pikinden 10-12 saat sonrasına denk düşer. LH yüksekliği dominant folikülde granüloza hücre LH reseptörleri üzerinden progesteron yapımını artırır. Progesterondaki az fakat önemli olan kısa süreli yükselişin pozitif feedback etkisi ile LH piki ortaya çıkışı ve midsiklus FSH pikinin oluşumu hızlanır. LH artışı oositte durmuş olan mayozun yeniden başlamasını, granüloza hücrelerinin luteinizasyonunu, oosit ile çevresindeki kumulus tabasının serbestleşmesini ve folikül rüptürü için gerekli olan prostaglandinlerin ve diğer eikozanoidlerin sentezini sağlamaktadır (49). FSH, LH, progesterondaki bu fizyolojik değişimleri folikül duvar kollajeninin dejenerasyonuna, folikül duvarının ince ve gergin hale gelmesine ve sonuçta da rüptürüne neden olduğu üzerinde durulmaktadır. Gonodotropinlerin etkisi altında foliküler sıvıda plazminojen aktiviteörlerinin sentezi artar, plazminojenden oluşan plazmin etkisi ile folikül duvarının gerilim gücü zayıflar. Prostaglandinler; folikül duvarından proteolitik enzimlerin serbestleşmesine, histamin ve bradikinin oluşumuna ve anjiogenezis ile hiperemik, inflamatuvar bir ortam oluşmasına, folikül çevresindeki teka tabasındaki düz kasların kasılmasını sağlayarak ovulasyona yardımcı olurlar (49).

2.c.1.7. Korpus luteum: Korpus luteum luteinize olmuş granüloza hücreleri ile teka interna ve teka eksterna tabakalarından oluşur. Korpus luteumun asıl görevi oositi desteklemek ve endometriumu implantasyona hazırlamak için progesteron hormonu salgılamaktır. Progesteron salgısı, LH salgısından 6-8 gün sonra en yüksek noktasına ulaşır (48, 49). Granüloza hücrelerine endositoz yoluyla alınan LDL-Kolesterol serbest kolesterol ve aminoasitlere hidroliz olur. Serbest kolesterol mitokondride pregnanolon, progesteron ve az miktarda androjene dönüşür. Progesteronun, östrojen ve inhibinin de katkısı ile yeni folikül gelişimini durdurucu etkisi vardır. Gebelik olmazsa ovulasyondan 9-11 gün sonra korpus luteum hızla küçülmeye başlar ve progesteron, östrojen ve inhibin seviyeleri düşer. Menstuel kanama olur diğer

tarafından inhibinin etkisinden kurtulan FSH artmaya başlar. Böylelikle yeni menstrual siklus başlar. Gebelik olduğu takdirde korpus luteumun gelişimi, ilk 3 ay gebelikte artan HCG tarafından desteklenmektedir (49).

2.c.1.8. Foliküler gelişimin ve atrezinin kontrolü: Menstrual siklusun başında FSH konsantrasyonunun artmasıyla granuloza hücresinde estrogen ve inhibin üretilmeye başlar. Negatif feedback nedeniyle inhibin FSH sekresyonunun azalmasına neden olur. Sonuçta kalan küçük foliküller atreziye gider. Memelilerdeki foliküllerin (oositlerin) %99'u atrezi ile kaybedilir (50). Atrezideki temel nokta oosit ve granuloza hücrelerinde apoptozisin aktivasyonudur (45). Foliküler gelişim sürecine granuloza hücreleri apoptozise daha duyarlı hale gelir. Folikül büyümesi, gelişmesi ve atrezisi, folikül uyarıcı ve atrotejinik faktörler arasındaki karışık bir dengeye bağlıdır (51). Uyarıcı faktörler; FSH, insulin-benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), interleukin-1 β (IL-1 β), epidermal büyüme faktörü (EGF), Bcl-2, Bcl-X ve atrotejinik faktörler ise; inhibin, Bax, FasL, TNF alfa, kaspas'dır.

FasL sistemi bir çok canlının granuloza hücresinde tanımlanmıştır ve invitro ortamda FasL-Fas sinyali ile bu hücrelerde apoptozis gözlenir (52, 53). İnsanlarda erken dönem atrezi fazı süresince antral folikül granuloza hücrelerinde Fas salınımı olur ve salınımı atrezinin ilerlemesiyle artar (54). Fas aktivatör antibody ile tedavi edilen dişi farelerde granuloza hücrelerinde apoptozis hızlanmış ve atrezi olmuştur (47, 55). CFLIP (cellular FLICE-Inhibitory Protein) fas'a bağlı apoptozisi inhibe eden antiapoptotik olarak bilinir. CFLIP ve Fas proteinleri sağlıklı preantral ve antral folikülden salgılanmasına rağmen antral folikülün sağlıklı devam edebilmesi için Fas sinyali inhibe edilmelidir (56).

TNF alfa, hem proliferatif hem de apoptotik etkilere sahiptir. TNF alfa ya apoptozisi uyaran TNFR-1 reseptörüne ya da anti-apoptotik TNFR-2 reseptörüne bağlanarak bu etkileri gösterir (57, 58). Domuz overi granuloza hücresi kültüründe TNF alfa hem hücre proliferasyonunu hem de hücre ölümünü uyarır (59).

Bcl-2 ailesi üyesi proteinler de granuloza hücrelerinde apoptozisi düzenler. Bcl-2'nin ovarian apoptozisteki rolü birçok deneyde gösterilmiştir. Bcl-2 eksik farelerde folikül sayısı azalmıştır (55) ve aşırı salgılanması foliküler atrezi ve

apoptozisin azalmasına neden olur (56, 57). Atretik folikül sağlıklı folikül ile karşılaştırıldığında Bax salgısının atretik olanda çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (59). Murin, caspas-9 ve Apaf-1'in de folliküler atreziye neden olduğu gösterilmiştir (60).

IGF-1 ovaryan gelişimde önemli rol oynar. Rat overinden alınan foliküllerin kültürüne IGF-1 eklenmesi spontan başlayan apoptozisi engeller (61). IGF-1 eksik fareler; küçük antral folikül evresinde folikül gelişimi durduğu için infertildir (62, 63). Ek olarak IGF-1, EGF, bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü) ve IL-1 β sitokinleri granüloza hücrelerinde apoptozisi inhibe eder (64).

2.c.2. KEMOTERAPİ VE RADYOTERAPİNİN GONADAL FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

Kemoterapi ve radyoterapinin over dokusu üzerindeki uzun dönem etkisi, infertiliteye neden olan over rezervi azalması ve sonucunda ortaya çıkan prematür ovaryan yetmezliktir. Belli başlı ajanların overde yarattığı hasara bakarak tedavi sırasında veya hemen tedavi sonrasında gelişen tabloya akut ovaryan yetmezlik daha uzun dönemde ortaya çıkan ve 40 yaşından önce menapoza girmekle sonuçlanan durum ise prematür over yetmezliği olarak tanımlanmıştır. Akut ovaryan yetmezlik ve prematür menapoz farklı tanımlar ama risk faktörleri yüksek doz alkilleyici, pelvik radyasyon olmak üzere aynıdır.

Sitotoksik antikanser ilaçları bunu apoptozisi indükleyerek yaparlar. Apoptozis ya reseptör bağlı (ekstrinsik) ya da bağımsız (intrinsik veya mitokondrial) yoldan olabilir. Mitokondrial DNA hasarı hücre ölümlerinde merkezi rol oynar ve birçok organelin etkilenmesi (endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve lizozomlar) ile ortaya çıkar. Mitokondrial hücre ölüm yolu Bcl-2 proteinleri ile kontrol edilir ve bu gruptaki proteinler şunlardır; antiapoptotik, proapoptotik protein; küçük moleküller pasajla kontrol edilen (örneğin: stromalin c, Smac/diablo) apoptozis indükleyen faktör, kaspas kaskadını aktive eder (65).

Kız hastaların cinsel gelişim açısından prognozları erkeklere göre daha iyidir. RT ve KT sonucu oluşan infertilite erkeklere göre çok azdır. Overler alkilleyici ajanlara testislere göre çok daha dirençlidir (66).

Ovaryen rezervin göstergesi primordial follikül sayısıdır. Kemoterapi ile indüklenmiş ovaryan hasarın ultrastrüktürel göstergesi yaygın follikül kaybı ve ovaryen fibrozistir. Bununla birlikte kanser tedavilerinin endokrin fonksiyon gören ovaryen stromal hücrelere etkisi de önemlidir. Stromal hücreler büyük olasılıkla kemoterapi sonrası hasarın tamirinde de rol oynar (67). Kemoterapi sonrası ovaryan yetmezliğe etki eden faktörler arasında hasta yaşı, kemoterapi ajanının türü, ilacın kümülatif dozu ve kemoterapi öncesi ovaryen rezerv durumu sayılabilir (68). Yaşlı hastalarda ovaryen yetmezlik gelişmesi, aynı doz kemoterapi alan genç hastalara göre daha olasıdır. Örneğin ovaryen yetmezliğe sebep olan kümülatif siklofosfamid dozu 40'lı yaşlardaki bir hasta için 5.2 gr iken 30'lu yaşlarda 9.3 gr, 20'li yaşlarda 20.4 gr olmaktadır (69). Alkilleiyici ajanlar en yüksek follikül kaybına sebep olmaktadır. Hücre siklusuna spesifik değillerdir yani hücre bölünme sırasında olmasalar da tek sarmal yada çift sarmal DNA kırıklarına neden olarak etki gösterirler. Folliküler hasar yanında, DNA cross-link oluşturarak, steroid sentezinin azalmasıyla karakterize yaygın granuloza hücre hasarına da neden olurlar (56, 67, 69, 70).

Kemoteropatik ajanların gonadotoksisite riskleri (67):

1. Yüksek gonadotoksisite riski; Cyclophosphamide, Busulfan, Melphalan, Procarbazine, Nitrogen mustard, Chlorambucil
2. Orta derecede gonadotoksisite riski; Cisplatin, Adriamycin, Paclitaxel
3. Düşük gonadotoksisite riski; Methotrexate, 5-Fluorouracil, Actinomycin D, Bleomycin, Vincristine.

İyonize radyasyon tüm yaş gruplarında gonadal fonksiyonlarını bozar. Testislerin aksine, overler radyasyona daha dirençlidir ve yaş küçüldükçe direnç artar ve fraksiyon sayısı arttıkça, overin radyasyona duyarlılığı azalır (50). Tüm vücut ışınlaması sırasında 1000 cGy tek fraksiyon RT uygulanan kız çocuklarının çoğunda primer amenore veya sekonder seks karakterlerinin gelişmediği görülmüştür (71). Çocukluk döneminde pelvik RT uygulanan hastalarda erken menapoz bildirilmiştir (72). Bu çalışmada batın tümörü nedeniyle cerrahi ve RT uygulanmış 53 kız çocuğun değerlendirilmesinde tüm batına 2000-3000 cGy RT alan 38 hastanın 27'sinde

püberte gelişememiş, 10'unda ise erken menapoz olmuştur. Aynı dozu sadece tümör bölgesine alan 15 hastanın sadece birinde over yetmezliği gözlenmiştir.(73) ALL tedavisinin bir parçası olan kranial düşük doz radyoterapi erken menarşa neden olabilir.(74, 75). Lumbal ve sakral bölgesine radyasyon alanlarda ise gecikmiş menarş riski artar. Bu muhtemelen overlerin indirekt olarak ışınlanmasıyla ilişkilidir. Bununla beraber bu hastalarda ayrıca beyinde ışınlanıyorsa gonadotropin yetersizliği geç menarş nedeni olabilir (76, 77). Bu konuda Bath ve ark. çalışmalarında 18-24 gy intrakranial radyasyon almış ALL'den sağ kalan kızlarda azalmış LH salınımı, azalmış LH artışı ve luteal fazda kısalma olduğunu gösterdiler. Bu nedenle korpus luteumdan progesteron üretimi azalmakta gecikmiş endometrial maturasyon infertiliteye yol açmaktadır. Benzer olarak bu kadınlarda düşük riski 1.4 -1.8 kat artar (78, 79).

Hasarın derecesi ve persistansı doza, radyasyon alanına ve hastanın yaşına bağlıdır. Hipotalamik-pituiter bölgeyi içeren 30 Gy kranial radyasyon çocuklarda hipogonadotropik hipogonadizme neden olabilir (80). Çocukluk çağında sık görülen hipotalamo-hipofizer sistemi direkt ilgilendirmeyen beyin tümörlerinde kraniospinal RT ve KT sonucu gonad harabiyeti gelişmektedir.(81,82) RT ve KT'nin beraber uygulandığı hastalarda özellikle KT'nin RT'ye göre daha gonadotoksik olduğu saptanmıştır (81). Stillman ve ark. çalışmalarında abdominal radyasyon alan ancak overlerin ışınlanma sahası dışında kaldığı olgularda hiçbir hastada ovaryan yetmezlik görülmezken, overlerin ışınlanma sahasının tam sınırında olduğu olgularda %14, overlerin ışınlanma sahasında olduğu olgularda ise %68 oranında ovaryan yetmezlik tespit ettiler.

Overler, servikal ve rektal kanserler nedeniyle yapılan pelvik radyasyona da maruz kalabilir. Hodgkin lenfoma gibi hematolojik nedenli pelvik lenf nodu irradyasyonu ve kemik iliği transplantasyonu öncesi tüm vücut radyasyonuna maruz kalabilir. 40 yaş altı kadınların radyasyon kaynaklı ovaryen yetmezliğe girme olasılığı yaşlı olanlara göre daha azdır. Bu, muhtemelen genç kadınlarda oosit sayısının çok daha fazla olmasından kaynaklanır. Aynı zamanda genç kadınların oositlerinin radyasyona daha dirençli olması da bu etkiye yol açar. 40 yaş altı kadınlarda kalıcı ovaryen yetmezlik olması için 20 Gy dozlara gereksinim varken,

daha yaşlı kadınlarda 6 Gy dozlar bu etkiye sebep olmaktadır. Oositlerin yarısını öldürmek için gerekli doz (LD50) 2 gy dir (83,84). Radyasyon ayrıca uterus hacmini, myometrial elastisiteyi azaltarak ve uterus damar yapısını bozarak uterus fonksiyonlarını bozabilir. 14-30 gy radyasyonla tedavi edilen hastalarda uterus uzunluğunda azalma, estradiol tedavisine cevap olarak endometrium kalınlığında azalma ve uterin arter doppler kan akımlarında bozulma izlenmiştir (85, 86, 87). Puberte öncesi radyasyon verilmesi uterusu geri dönüşü olmayan zararlarla ilişkilidir. Ayrıca radyasyon tedavisi görmüş kadınlarda spontan abortus, düşük doğum ağırlığı gibi obstetrik sonuçlar daha sık olmaktadır (56, 70).

2.d. OVER REZERV TESTLERİ

Over rezervi, overlerdeki geriye kalan foliküllerin sayı ve kalitesi olarak tanımlanır (88).

2.d.1. Folikül Stimulan Hormon ve Luteinizan Hormon: FSH iki subünit içeren glikoprotein yapı, moleküler kitlesi 35.500 dalton olan hipofiz kaynaklı bir hormondur. Alfa subünitesi LH ve TSH gibi diğer pitüiter hormonlara benzer olmakla birlikte beta subünitesi moleküle spesifiktir ve biyolojik aktivitesini sağlar. Bu hormon hipotalamus kaynaklı GnRH etkisinde salgılanır ve etkisini gösterdiği overlere kan yolu ile taşınır. FSH overlerde granüloza hücrelerine etki ve steroidogenezi stümüle eder. Aynı zamanda folüküler fazı ilerletir. Oosit sayısının azalması ve ovaryan hormon üretimindeki (estrodol) azalma hipotalamik/hipofizer FSH sekresyonu üzerindeki negatif feedback etkisini kaldıran FSH yükselmesine neden olur. FSH titresi oosit kalitesini yansıtabilir. FSH testi mensesin ikinci veya üçüncü günü yapılır. Bazal FSH ölçümünün değeri, net bir eşik değeri olmaması, aylık farklılıklar göstermesi ve farklı laboratuvar değerleri arasında farklılıklar olması nedeniyle sınırlıdır. Çocukluk döneminde Hodgkin lenfoma nedeniyle sadece ChIVPP protokolü alan 32 kız hastanın 10 yılı aşan izleminde, %53'ünün gonadotropin düzeyleri yüksek bulunmuş ve bunların yarısında gonad yetmezliğinin klinik bulguları gözlenmiştir (54). Clark ve ark.'nın (52) çalışmasında MVPP veya ChIVPP/EVA protokolleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Benzer olarak başka bir çalışmada, beyin tümörü nedeniyle kraniyospinal RT ve KT alan 29 çocuğun

hepsinde FSH düzeyinde artış gözlenmiş, ancak hastaların puberteleri normal seyretmiştir (59).

LH, glikoprotein yapılı iki subünite içeren ve moleküler kitlesi 30.000 dalton olan hipofizer kaynaklı bir hormondur. Alfa subünitesi diğer hipofiz kaynaklı hormonlara benzemekle birlikte moleküle biyolojik aktivitesini sağlayan beta subünitesi hormona özgüdür.

2.d.2. Bazal FSH/LH oranı: Menopozda FSH ile birlikte LH değerleri de artış göstermektedir. Ancak FSH'daki yükselme LH'dan birkaç yıl önce gerçekleşmektedir. Bu bağlamda FSH/LH oranındaki artış over rezervindeki azalmanın ilk belirtisi olabilir (21).

2.d.3. Serum estradiol seviyesi: 17- β Estrodiol esas olarak overler, placent ve küçük miktarlarda adrenal bez ve testislerden üretilen 18 karbonlu steroid hormondur. Kadın estradiol seviyesinin önemli bir kısmı ovaryan granüloza hücresinden kaynaklanır. Adipoz dokuda testesteronun estradiola çevrilmesi ise non gonadal kaynaktır. Ayrıca E2 az miktarda adrenal korteks, beyin ve endotel hücrelerinde üretilir. Bazal E2 seviyesi overin gonadotropine olan cevabıyla ters korelasyon gösterir.

2.d.4. Serum progesteron düzeyi: Zayıflamış foliküler faz, erken LH yükselişi ve prematür progesteron yükselmesi azalmış ovaryan rezerv ile ilişkilidir. Ovarian rezerv taramada bağımsız bir rolü gözükmemektedir (74).

2.d.5. İnhibin B: İnhibin, Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) ailesinden, hipofizden FSH salımını inhibe eden yapısal olarak AMH'a benzeyen 32 kDa heterodimerik bir proteindir (89). İnhibin subünitleri tüm siklus boyunca overde salgılanır (90). İnhibin B erken ve midfoliküler fazda dominant olarak salgılanır iken inhibin A geç foliküler ve luteal fazda dominant olarak salgılanır (91, 92). İnhibinlerin FSH ile ilişkisi tanımlanmasının ardından ovaryan rezerv testi olarak yoğun şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Yong ve ark. inhibin B nin tek doz FSH uygulanması sonrasında küçük sağlıklı foliküllerde granüloza hücrelerinin fonksiyonlarının stümülasyonu ile artışının over rezervini değerlendirmek için değerli olduğunu gösterdiler. Yalnız bu sonuçlar hastalar ve kontrol grupları arasında

istatistiksel açıdan farklı değildi. İnhibin B konsantrasyonu 35 yaş üzerinde azalır (93). Ancak inhibin B'nin yalancı pozitifliği yüksektir (88).

2.d.6. Anti müllerian hormon: Antimüllerian hormon, TGF- β ailesine ait, homodimerik disülfid bağla bağlı, molekül ağırlığı 140 kDa olan bir glikoproteindir (94). AMH erkeklerde testiküler sertoli hücrelerinden, kadınlarda daha az derecede doğumdan menopoza kadar granüloza hücrelerinden salgınır (95, 96). AMH yalnızca reproduktif organlara spesifik gibi görünmektedir (96). En önemli özelliği bayan internal reproduktif organların öncüsü olan müllerian duktusun regresyonuna neden olmasıdır ve AMH yokluğunda her iki seks organları da gelişir (97, 98). Pubertede preantral ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinden FSH ile olan foliküler rekrutmenti inhibe ederek folikül gelişimini düzenlemek için sentezlenir (99). Atretik hücrelerden ve teka hücrelerinden sentezlenmez (100, 101). AMH mRNA'sı sentezi, erken preantral, geç preantral ve preovulatuvar foliküllerin granüloza hücrelerinde oosit kontrolünde gerçekleşir. (102). Oositin salınımını düzenlediği AMH, erken dönem folikül gelişimini negatif yönde etkiler (103). AMH'nın primordial follikül üzerine olan etkisini değerlendiren bir çalışmada AMH-null farelerden alınan overler invitro AMH varlığında kültüre edildiğinde, foliküler büyümenin %50 daha az olduğu gösterilmiştir (103). AMH yokluğunda foliküllerin FSH'a olan duyarlılığı artmıştır. Düşük ve yüksek FSH serum konsantrasyonunda AMH-null farelerde normal farelere göre folikül büyüklüğü yüksek, gelişimi hızlıdır (104).

AMH diğer testlere göre farklı birçok avantaj sağlamasına rağmen over rezerv testi olarak kullanılmaya başlanması nispeten yenidir. AMH'nın yaşa bağlı olarak en erken değişen belirteç olduğuna inanılır ve rezerv azalmasını geleneksel tarama testlerinden daha erken tespit eder. FSH'dan farklı olarak AMH ölçümü için menstrüel siklusta belirli bir güne gerek yoktur ve sikluslar arasında çok az değişkenlik gösterir. Bunun sebebi de hipotalamo-hipofizer aksın feedback mekanizmalarına bağımlı olmamasıdır. GnRH agonisti alan hastalarda da siklus boyunca ölçülebilir (105).

2.d.7. Antral folikül sayımı (AFS): Yaşlanma ile ovaryan rezervinin azalması antral folikül sayısının azalması ile ilişkilidir. Siklusun 1-2. günlerinde 2-5 mm çapındaki

antral folikül sayısı ovaryan rezervi tahmin etmek için kullanılmıştır. Primordial havuzdan dinlenme fazındaki foliküller çağrıldıktan 3 ay sonra 2 mm çapa erişerek antral folikül sayımı için kullanılabilir (106, 107). 25-34 yaşlar arası ortalama antral folikül sayısı 15'tir. 41-46 yaşları arası ise antral folikül sayısı 4'e düşer (108). AFS 5'den küçük olması rezerv azalmasının bulgusudur (109, 110). AFS gözlemci içi ve gözlemciler arasındaki farklılık testin kullanılabilirliğini düşürür. Kemoterapi almış çocuk ve gençlerde pelvik ultrasonografi ile AFS değerlendirmek güç olabilir. Yine prepubertal olgularda antral folikül bulunmaması da kullanımını sınırlayan faktörler içerisinde yer alabilir.

2.d.8. Ovaryan vaskülarite: Yüksek ovaryan vaskülarite overlerin ve dolayısı ile foliküllerin iyi kanlanması ve kemo/radyoterapiye bağlı fibrozis olasılığının düşük olması lehine değerlendirilebilse de bu konuda henüz görüş birliği oluşmamıştır. Pelvik ultrasonografi ile uygulaması zordur. Transvajinal pulse doppleri doğal ve stimüle IVF sikluslarda ovarian kan akımını değerlendirmek için kullanılmaktadır (111).

2.d.9. Ovaryan volüm: Ovaryan volüm genellikle ilerleyen yaş ile birlikte azalır. Premenopozal over hacmi ortalama 4.9 cm³ ancak postmenopozal over hacmi 2.2 cm³ olarak tanımlanmıştır (112). Bu durum folikül sayısı ve stromal vaskülaritedeki yaşa bağlı azalma ile ilgilidir (113). Bazı çalışmalarda ovaryan volümün 3. gün FSH ve E2 değerinden daha değerli bir test olduğu sonucuna varılmıştır (114). Ancak metaanalizler ovaryan volümün rutin test olarak kullanımını desteklememektedir (88). Ancak bu çalışmalar invitro fertilizasyon (IVF) hastaları üzerinde yürütülmüş testler olup uygulamayı yapan kişilere, tekniğe ve kullanılan cihazların özelliklerine göre farklılıklar gösterebilir.

2.d.10. Provakatif ovaryan rezerv testleri:

2.d.10.1. Klomifen sitrat challenge test (KSCT): (115) Siklusun 5-9. günler arası oral verilen 100 mg klomifen öncesi bazal (siklusun 2.-3.günü) ve sonrası cevap (siklusun 9-11.günü) FSH, LH ve E2 seviyeleri ölçülmesine dayanır. Testin başlangıç FSH bazal değeri normal fakat siklusun 9-11. günü bakılan FSH değeri yüksek ise azalmış over rezervi vardır. Bir çok kontrollü karşılaştırmalı çalışma

KSCT'nin ovaryan cevap tahminindeki başarısı, AFS veya FSH'dan iyi bulunmamıştır (110, 115).

2.d.10.2. Ekzojen FSH ovaryan rezerv testi (EFORT): Siklusun 3. günü bazal FSH ve E2 seviyesi ölçülür, 300 IU FSH enjeksiyonu sonrası, 24 saat sonra tekrar E2 seviyesi alınır. Estrodioldaki artışa göre değerlendirilir. IVF programına alınacak olgular arasında iyi veya kötü yanıt verecek olanları belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Düşük veya gecikmiş cevap azalmış over rezervinin belirtisidir (116).

2.d.10.3. Gonadotropin salgılatıcı hormon agonist (GnRH) uyarı testi (GAST): Fizyolojik olarak GnRH agonist cevabı başlangıçta E2 yükselmesi, bunu takiben E2 seviyesinde supresyonla gitmektedir (117). GnRH verildikten sonra kaydedilen endojen gonadotropinler ve E2 seviyeleri over rezervi hakkında bilgi verir (118). 1 mg GnRH verildikten sonra 2. gün seviyelerine göre iki kat artan E2 seviyesi tesbit edildiğinde over rezervinin nispeten iyi olduğu söylenebilir.

2.d.11. Ovaryan biyopsi: Reprodüktif potansiyel overin korteksindeki primordial follikül sayısıdır. Over biyopsisi direkt follikül dansitesini direkt olarak göstermeye dayanır ve diğer indirekt yöntemlerden daha fazla bilgi verir (119). Folliküler dağılımı çok fazla değişkenlik gösterdiği için araştırmacılar tarafından ovaryan biyopsinin over rezervi değerlendirilmesinde yeri olmadığına karar verilmiş olup invaziv işlemler gerektirmesi de dezavantaj olarak kabul edilir. (120).

2.e. FERTİLİTE KORUYUCU TEDAVİLER

Kanser tedavisi over rezervinde azalmaya ya da ovülasyonun tamamen bozulmasına yol açabilir. Günümüzde güvenilir tedavi sınırlı sayıdadır. Bununla birlikte son dönemde farmakolojik, cerrahi ve laboratuvar bazlı güven veren yeni tedaviler ortaya çıkmaktadır (121).

2.e.1. Farmakolojik tedavi ile over fonksiyonlarının baskılanması: Fertilitenin korunması için bir tedavi modalitesi olarak over fonksiyonlarının baskılanması, hala tartışmalıdır. İlk olarak Blumenfeld ve Hain (122), hipofizden gonadotropin salınımını engelleyen GnRH agonisti ile over fonksiyonlarının baskılanması yoluyla, sitotoksik terapi esnasında gonadal hasarın azaltılabileceğini veya tamamen

önlenebileceğini gösterdiler. Böyle bir tedavi, kemoterapiden 10 gün önce başlamalı ve tedavi periyodu boyunca devam etmelidir (122, 123). Bununla birlikte GnRH tedavisinden koruyucu bir etki elde etmeye çalışan bazı çalışmalar da başarısız olmuştur (124, 125). GnRH analogu tedavisinin güvenilirliğini ve etkinliğini kanıtlayacak nihai veri henüz mevcut değildir ve GnRH analogunun verilmesinin yararları, uzun dönemli etkileri ve hipofizer mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olduğundan bu tedavinin yalnızca ileriye yönelik araştırmaların bir parçası olarak ve etik komitelerin onayladığı protokoller dahilinde kullanılması tavsiye edilmektedir (126). Gelecekte, hipofizer-overyal desensitizasyonun daha hızlı sağlanması için GnRH agonistleri yerine GnRH antagonistleri de kullanılabilir (123).

Gonadotoksik kemoterapi gören genç kadınlarda yapılan retrospektif bir çalışmada, oral kontraseptiflerin (OKS) olası bir koruyucu etkisi ortaya konulmuştur (127). Oral kontraseptif ilaçlar hipofizdeki gonadotropin sekresyonunu baskılamakta, böylece folliküler büyümeyi önlemektedirler (122). Ancak bu yöntem hastalara önerilmeden önce prospektif onaylayıcı çalışmalara ihtiyaç vardır. Yine de düşük maliyeti, önemli yan etkilerinin ve risklerinin olmaması, OKS'leri kontrendikasyonu olmayan hastalar için çekici kılmaktadır (126).

2.e.2. Apoptozis inhibitörleri: Apoptozis sürecine genetik programlama ve çok sayıda hücreyel yolak dahil olur (128). Çeşitli kemoterapötik ilaçlar, oosit tükenmesine ve prematür over yetmezliğine yol açan bu apoptotik yolları aktive edebilirler. Bir apoptozis inhibitörü olan sphingozin-1-fosfat (S1p), farelerde, fetal ovaryan gametogenez esnasındaki oosit ölümlerini azaltmaktadır. S1p, ayrıca radyasyona maruz bırakılmış farelerde, bilinen bir apoptozis tetikleyicisiyle (doxorubicin) kullanıldığında, apoptozise etki yapmakta ve fertilitiyi koruyabilmekteydi (129). Yapılan daha ileri çalışmalar, dişi farelere radyasyon öncesi S1p terapisi uygulanmasının, bu farelerin sonraki nesillerinde genomik bir hasara yol açmadığını da ortaya koymuştur (132). Eldeki veriler ışığında, apoptozis inhibitörleri, kemoterapi ve radyoterapi kaynaklı apoptozisin önlenmesi ve hastaların erken menopozdan korunması için potansiyel bir farmakolojik araç olarak kullanılabilir. Apoptozis inhibitörlerinin fertilitiyi korumasındaki

rollerinin daha iyi saptanması ve tedavi oranlarının gerilemeyeceğinin kesinleştirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (130).

2.e.3. Over transpozisyonu: Bazı ÇÇK'leri radyasyon terapisiyle iyileştirilebilirler. Bununla birlikte, pelvik radyasyon terapisiyle overlere uygulanan standart radyasyon dozu, kesin bir şekilde over fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Overlerin pelvik radyasyon terapisinden önce, radyasyon uygulanacak alanın dışına, pelvis girişinin üst kısmına cerrahi olarak taşınması bunların, taşınmayan overlerin aldıkları radyasyonun yalnızca %5 ila %10'u oranında radyasyona maruz kalmasını sağlayabilmektedir (131). 40 yaşın altında olup, overleri bu şekilde taşınmış olan kadınların %88.6'sı, overler yerine geri taşınmasa bile over fonksiyonlarını tekrar kazanabilmekte, bunların da %75'i spontan olmak üzere, %89'u yeniden hamile kalabilmektedirler. Takip eden jenerasyonlarda, ölü doğum, düşük doğum ağırlığı, konjenital malformasyonlar, anormal karyotipler ya da kanser gelişimi oranlarında herhangi bir artış söz konusu olmamaktadır (132, 133).

Yapılan bir çalışmada pelvik radyasyon ve MOPP tedavisi almış 103 Hodgkin lenfomalı hastanın %31'inde amenore saptanmıştır (134). Bu hastaların hepsine orta hat ooforopeksi yapılmıştır. Ooforopeksi, overlerin aldığı toplam RT dozunu %6-14 oranında azaltarak fertilité şansını artırmaktadır (135). Çocukluk döneminde alkileyici ajanlar ve/veya pelvik RT alan kadınlarda erken menapoz riskinin artmış olduğu gösterilmiştir (135, 136). Bir başka çalışmada Green ve ark orta hat ooforopeksi ile tedavi dozu 4400 cgy olan bir hastada pelvik radyasyon ile overlerin aldığı doz 220 ile 550 cgy arasında sınırlandırılabilirliğini belirtti. Bu işlemin ÇÇK için kullanımı henüz açıklığa kavuşmamıştır.

2.e.4. Kriyoprezervasyon: Vücuttan alınmış doku ya da organların çok düşük ısılarında saklanarak yaşama kabiliyetlerinin korunması anlamına gelen kriyoprezervasyon, cerrahi teknikler ve/veya IVF ile birlikte uygulandığında fertilitenin korunması için kanserden kurtulmuş hastalara değişik olanaklar vermektedir (126).

2.e.4.1. Embriyo Kriyoprezervasyonu: Bugüne kadar, prematür menapoz riski altındaki kadınların çocuk sahibi olabilme potansiyelini korumak için

başvurulabilecek yöntemler arasında, yalnızca over transpozisyonu, donör oositleriyle yapılan IVF ve embriyo kriyoprezervasyonu ile yapılan IVF kabul edilmiş yöntemlerdir. Eritilen embriyoların yaşama oranı %35 ila %90 arasında, implantasyon oranları da %8 ila %30 arasındadır. Bu nedenle kümülatif gebelik oranları %60'ın üzerine çıkabilir (137). 2005 yılında Birleşik Devletlerdeki kriyoprezervasyonla korunmuş embriyoların taşınmasıyla elde edilen gebelik oranları %28 iken, taze embriyolarla elde edilenlerin oranı %34'tür (138).

2.e.4.2. Oosit kriyoprezervasyonu: Fertilize olmamış oositlerin dondurulmasıdır. Ancak oositler dondurmaya aşırı derecede hassastır ve mayoz bölünmede içciklerin oluşması, sitoskeleton, kortikal granüller ve zona pellusida özellikle risk altındadır (139). Konvansiyonel yavaş-dondurma protokolleri ile elde edilen canlı doğum oranları, taze oositlerle yapılan IVF sikluslarında elde edilen oranlardan anlamlı düzeyde düşüktür ancak sitoplazma içinde kristal oluşumuna engel olacak şekilde ultra hızlı bir dondurma protokolü olan vitrifikasyon kriyoprezervasyonu, taze oositlerle elde edilen canlı doğum oranlarını yakalamaktadır (140).

2.e.4.3. Over dokusunun kriyoprezervasyonu: Embriyo ya da oositlerin kriyoprezervasyonu mümkün olmadığında, bir diğer deneysel teknik olan over dokusunun kriyoprezervasyonu bir seçenek olabilir. Over dokusu, laparoskopi ya da laparoskopide birkaç over biyopsisi ya da uni ya da bilateral ooforektomi yapılarak elde edilebilir. Over kortikal dokusundan alınan küçük parçalar, daha sonra, hasta iyileşmeye başladığında kullanılmak üzere kriyoprezerve edilirler (141). Over korteksi, kriyoprezervasyon için antral follikül oositlerine göre daha avantajlıdır. Primordial folliküller içindeki oositler, ilk mayoz bölünmenin diploten fazında arrest olmuşlardır ve göreceli olarak daha yüksek yüzey/hacim oranına, daha düşük metabolizma oranına sahiptirler ve zona pellusida yoktur ki, bu da onların kriyohasar açısından daha dayanıklı olmalarına olanak verir. Vitrifikasyon over dokusu kriyoprezervasyonunun başarısını yükseltebilir ancak, bu yöntem halen başlangıç aşamasındadır. Taze vitrifiye etme ve yavaş dondurma kriyoprezervasyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, morfolojik olarak tam olgunlaşmış primordial follikül oranının vitrifikasyon grubunda, yavaş dondurma grubundakinden daha yüksek başarı olduğu bulunmuştur (sırasıyla %80.3'e karşı %72.6). Her iki grup da, invitro

kültürde saklandıkları 14 gün boyunca sürekli olarak estradiol ve progesteron salgılamışlardı (141). Kadınlarda kriyoprezervasyon ve transplantasyonu takiben over endokrin fonksiyonlarının geri kazanıldığı gösterilmiştir (142, 143). Yakınlarda, kriyoprezerve edilmiş over dokusunun subkutan heterotopik transplantasyonu ardından IVF uygulanması ile ilk insan embriyosu üretilmiş (144) ve ortotopik transplantasyon sonrasında 2 insan gebeliği elde edildiği rapor edilmiştir (145). Bu izole başarılar bir başlangıç sayılmalı ve tekniğin kendisi de deneysel kabul edilmelidir. Transplantasyon için en uygun yöntemin hangisi olduğu da hala tanımlanamamıştır (146). Bahsi geçen nedenlere ek olarak etkinliği, güvenilirliği ve uygulanabilirliği tartışma konusu olan bu yöntemin henüz reproduktif çağda olmayan kanserli çocuklarda uygulanması diğer bir kısıtlama nedenidir.

2.e.4.4. Ototransplantasyon: Dondurularak saklanmış overyan korteks parçalarının hastaya geriye ototransplantasyonu için 2 yöntem vardır, ortotopik ve heterotopik transplantasyon. Ortotopik transplantasyon işlemi esnasında, over dokusundan hazırlanan bant ekilli parçalar, over fossasına ya da fonksiyonel olmayan bir over üzerine transplante edilebilirler. Alternatif olarak, heterotopik transplantasyonda, over dokuları, ön kol ve abdominal duvar da dahil olmak üzere çeşitli lokalizasyonlara subkutan olarak greftlenirler. Metastatik hücre gelişimi ya da malign transformasyon endişesi varsa, overlerin daha iyi izlenebilmesi için heterotopik transplantasyon tercih edilmelidir. Ortotopik over dokusu ototransplantasyonu sonucu sağlıklı olarak doğmuş 2 bebek bulunmaktadır (145, 147). Bu raporlar hakkında, fertilize oositlerin kaynağının hala fonksiyonel olması muhtemel olan overler olabileceğine yönelik, çok sayıda ihtilaf vardır (146). Rosendahl ve ark. (148), kriyoprezerve edilmiş over dokularının heterotopik ototransplantasyonundan elde edilmiş oositler kullanılarak yapılan bir IVF aracılığıyla biyokimyasal bir gebelik oluşturulduğunu bildirdiler (126). Kanserleri overlerle ilgili olmayan kanser hastası kadınlarda, teorik bile olsa, ototransplantasyon esnasında orijinal tümörden kaynaklanan metastatik hücrelerin reimplante edilmesi riski hala mevcuttur. Kan kaynaklı malignansiler, lösemi, Burkitt lenfoması ve nöroblastoma gibi kanserler overlere metastaz yapabilirler. Hasta, donör farelerden sağlıklı alıcılara bir over dokusu grefti aracılığıyla lenfoma taşındığı rapor edilmiştir (149). Bununla birlikte, doğurganlık çağında karşılaşılan tümörlerin büyük bir

çoğunluğunun overe metastaz yapma potansiyeli düşüktür (150). Over dokusu transplantasyonundaki bir diğer risk de, BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonlu kadınlarda transplante edilen overlerde malignan değişikliklerin ortaya çıkmasıdır. Suppresör genler olan BRCA-1 ve BRCA-2'deki mutasyonlar, kadınları meme ve over kanserine yatkın hale getirir ve böylesi hastalarda ortotopik transplantasyon yaklaşımı teklif edilmemelidir (126).

2.e.5. Ksenogreft transplantasyonu: Ovaryen doku vaskülarizasyonu arttırmak amacıyla immun sistemi baskılanmış farelere, intramuskuler, subkutan ya da böbrek kapsülü altına olmak üzere ksenogreft edilebilir. İmmatür oositler ksenotransplante edildikleri bu hayvanlarda olgunlaşabildikleri ve ovülasyon geliştirebildikleri halde, matürasyon sürecinde gözlenen anormal mikrotübül organizasyonu ve kromatin paternleri ciddi sorunlardır (151, 152). Bu metodun avantajları, dokunun geriye transplante edilmesi için yeni bir cerrahi girişime ihtiyaç göstermemesi ve kanser hücrelerinin yeniden vücuda verilmesi riskinin bertaraf edilmesidir. Bugüne dek, ksenogreft yöntemiyle hiç bir gebelik oluşturulamamıştır (126).

2.e.6. Donör oositleri ve yapay gametler: Çok sayıda kadın, bir erkek partnerleri olmaması ya da IVF'ye yeterli zamanlarının olmaması nedenlerine bağlı olarak, yukarıda bahsi geçen seçeneklerden yararlanamamaktadırlar. Otolog over dokusu transferiyle kanser hücrelerinin hastaya geri verilmesi riski ise kabul edilemez bulunabilir. Çoğu hasta da deneysel tedavileri, özellikle de cerrahi müdadale gerektirenleri kullanmak istememektedir. Bu hastalar için, donör oositleriyle yapılan IVF, çok yüksek başarı oranlarıyla standart bir tedavi seçeneği sunmaktadır (138).

Yeni ortaya çıkan doğurganlık teknolojileri gamet ve embriyo kaynakları için yeni alternatifler sunabilirler ve böylece bu infertil hastalarımız sonunda kendi çocuklarına sahip olabilirler (153, 154). Somatik hücre nükleusu transferi (klonlama), hali hazırda memelilerde başarıyla uygulanmış bulunmaktayken, Takeuchi ve ark. tarafından yeniden düzenlenmiş insan oositlerinin üretimi ve fertilizasyon başarıyla uygulanmıştır (155). Bu yöntem kısaca, immatür oosit karyoplastının germinal vesikal aşamada yerinden çıkarılması ve enükleee edilmiş oositin previtellin boşluğu içerisine bir somatik hücre yerleştirilmesi şeklinde özetlenebilir (157). Mayoz bölünmeye uğramaya programlanmış olan bu diploid

hücrenin bir sitoplazma içerisine yerleştirilmesiyle haploidasyon ve en sonunda da yapay bir oosit elde edilir (156). Hastaların kendisinden oosit sağlanamayabileceği için, enükle edilmiş donör oositleri kullanılmalıdır. Bu işlem, üç kaynaktan gelen genetik bilgilerin sonraki nesillere aktarılmasına sebep olur; yani babanın, annenin ve donörün ooplazmasının (mitokondrial DNA). Yapay olarak yapılandırılmış oosit oluşturma fikri, ulaşılabilir birşeydir fakat, halen daha deneysel bir safhadadır; bununla birlikte, kanseri başarıyla tedavi edilmiş kadın hastalara kendi nesillerini devam ettirebilmeleri için en iyi seçeneği sunabilecektir.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma 2009-2012 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın hastalıkları ve Doğum AD. ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. kliniklerinde yürütüldü. Yerel etik komitesinin 80-2009 sayılı kararının ardından hasta kabulüne başlandı. Tüm katılımcılara çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildi ve yazılı aydınlatılmış onamları elde edildi.

Çalışma grubunu ÇÇK nedeniyle Pediatrik Hematoloji ve Pediatrik Onkoloji klinikleri tarafından takip edilen kemoterapi almakta olan veya almış çocuk ve genç kızlar oluşturdu. Çalışmaya dahil olma kriterleri 10 yaşından büyük 16 yaşından küçük olmak, çocuk çağı kanseri nedeniyle kemoterapi almakta veya almış olmak, overleri cerrahi olarak eksize edilmemiş olmak, çalışmaya katılmayı kabul etmek olarak belirlendi. Çalışma grubu oluşturulurken kemoterapinin akut etkileri değerlendirmek amacı ile en az 3 kür kemoterapi almış ve halen kemoterapi almakta olan hastalar ve kemoterapisi bitmiş hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastanede yatarak tedavi görece kadar genel durumu kötü olanlar ve 1 veya 2 overi cerrahi olarak eksize edilmiş olanlar ve katılmak istemeyen hastalar çalışmaya kabul edilmediler. Bu çalışmaya katılan hastaların demografik verileri, fizik muayene bulguları, kilo, boy ölçümleri, kanser tipi, hangi kemoterapötik ilaçları aldıkları, kaç kür aldıkları, kümülatif dozları, en son kemoterapiden bu yana geçen süre, ek medikal tedavi alıp almadıkları, radyoterapi ve gray cinsinden kümülatif dozu, GnRH agonist veya antagonist tedavisi, oral kontraseptif tedavisi alıp almadıkları, menarş yaşı, güncel adet durumları, kemoterapi sonrası amenore varlığı, amenore süresi kayıt edildi. Adet görmekte olan hastalardan adet 2-3. günü erken foliküler fazda FSH, LH, E2, AMH, İnhibin B ölçümleri yapıldı ve düzeyleri kayıt edildi. Pelvik ultrasonografi ile mesane dolu iken over hacimleri ölçüldü ve AFS tespit edildi.

Kontrol grubu ise Kadın Hastalıkları ve Doğum ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliğine vajinit, sistit, üst solunum yolları enfeksiyonu, dermatit, ortopedik rahatsızlıklar gibi hormon düzeylerini etkilemediği varsayılan, ayaktan tedavi edilen ve 7 günden az tedavi süresi gerektirecek seviyede hastalıkları olan çocuk ve adolesanlar çalışmaya kabulleri sırasında adet düzenleri sorgulanmaksızın

rastgele başvuru sırasına ve çalışmayı kabul etmesine göre oluşturuldu. Bu hastaların geçmişlerinde kanser anamnezi olanlar, otoimmün hastalık anamnezi olanlar, endokrinopatisi olanlar, büyüme gelişme anormalisi olanlar, gonadotoksik kimyasal maruziyeti olanlar, akrabalarında erken menapoz ve infertilite anamnezi olanlar çalışmaya kabul edilmediler. Ayrıca vücut kitle indeksi 19 kg/m^2 dan küçük 26 kg/m^2 den büyük hastalar çalışmaya dahil edilmediler. Demografik verileri, fizik muayene bulguları, kilo, boy ölçümleri, sigara kullanımı, hastalık tipi, medikal tedavi alıp almadıkları, GnRH agonist veya antagonist tedavisi, oral kontraseptif tedavisi alıp almadıkları, menarş yaşı, güncel adet durumları, adet görmekte olan hastalardan adet 2-3. günü erken foliküler fazda FSH, LH, E2, AMH, İnhibin B ölçümleri yapıldı ve düzeyleri kayıt edildi. Pelvik ultrasonografi ile over hacimleri ölçüldü ve AFS tespit edildi. Adet görmeyen hastalarda kan hormon düzeyleri ve ultrasonografik ölçümleri başvuru sırasında yapıldı.

Bu kan hormon düzeylerinin ve ultrasonografik değerlendirmelerin nasıl yapıldığı aşağıdaki gibi tariflenmiştir ;

FSH: FSH, FSH için direk immüno enzimatik determinasyon testi olan diametra testi (Diametra SRL, İtalya) ile çalışıldı. Bu test, immüno enzimatik test için gerekli özreaktiflere yüksek afinite gösteren spesifik antikoları içerir. Bu prosedürde test süresince mikropate yüzeyinde immobilizasyon, sırasıyla streptavidin kaplı tabaka ile dışardan eklenmiş biotinlenmiş monoklonal anti-FSH antikoları arasındadır. Monoklonal biotinlenmiş antikolarla karışıktan sonra enzimle işaretlenmiş antikolar ve doğal antijen içeren serum reaksiyona girer. Sonuçta doğal antijen ve antikolar arasında yarışma sterik engel olmaksızın çözünebilir sandviç kompleksi şekillenir. Bu kompleks kendiliğinden streptavidin ve biotinlenmiş antikoların yüksek afiniteli reaksiyonuyla birikir. Dengelenme elde edildikten sonra antikor ve ona bağımlı fraksiyon bağı olmayan antijenden dekantasyon veya aspirasyon yolu ile ayrılır. Antikor ile ona bağı fraksiyonun enzim aktivitesi doğrudan doğal antijen konsantrasyonu ile orantılıdır. Bilinen antijen değerlerinin pek çok farklı serum referanslarının kullanılmasıyla bilinmeyen antijen konsantrasyonunun tespit edilmesinden elde edilmiş doz cevap eğrisi üretilmiş olur.

Bu test için, test içi değişkenliği \leq %5.1'dir. Testler arası değişkenliği ise \leq %7.6'dır. Bu testin sıfır standarttan ayırtedilebilen minimal tespit edebileceği FSH konsantrasyonu 0.22 mIU/ml'dir. Bu testin BhCG, hCG, hLH ve TSH için çapraz reaksiyonu ihmal edilebilir düzeydedir.

LH: Diametra (Diametra SRL, İtalya) LH kiti insan plazma veya serumunda LH konsantrasyonunun sayısal tespiti için solid faz enzim immün testidir. Bu metotta LH kalibretörleri hasta materyalleri ve/veya kontrolörler (doğal antijen içerirler) öncelikle straptavidin kaplı tabakaya eklenirler. Bundan sonra monoklonal biotinlenmiş ve enzim ile işaretlenmiş antikolar eklenir ve reaktanlar karıştırılırlar. Bu antikolar yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterirler ve LH'ın ayrı ve farklı epitoplarına karşı yönlendirmişlerdir. Reaksiyon değişik LH antikoları ve doğal LH arasındaki reaksiyon yarışma veya sterik engel olmaksızın çözünebilir sandviç kompleksi oluşturur. Bu kompleks kendiliğinden streptavidin ve biotinlenmiş antikoların yüksek afiniteli reaksiyonuyla birikir. Dengelenme elde edildikten sonra antikor ve ona bağımlı fraksiyon bağlı olmayan antijenden dekantasyon veya aspirasyon yolu ile ayrılır. Antikor ile ona bağlı fraksiyonun enzim aktivitesi doğrudan doğal antijen konsantrasyonu ile orantılıdır. Bilinen antijen değerlerinin pekçok farklı serum referanslarının kullanılmasıyla bilinmeyen antijen konsantrasyonunun tespit edilmesinden elde edilmiş doz cevap eğrisi üretilmiş olur.

Bu alışma için çalışma içi değişkenlik \leq %9.21'dir. Bu test için testler arası değişkenlik ise \leq %7.91'dir. Bu testin sıfır standarttan ayırt edilebilen minimal tespit edebileceği LH konsantrasyonu 0.22 mIU/ml'dir. Bu test için prolaktin, FSH, TSH için çapraz reaktivite ihmal edilebilir düzeydedir. Ancak hCG için çapraz reaktivite % 0.007 olarak tespit edilmiştir.

E2: DIASource E2 -EASIA (diasource immunoassays, Belçika) testi insan serum ve plazmasındaki estradiolün sayısal tespiti için yarışmacı bağlanma immün testidir. Bu test mikrotiter tabakta gerçekleştirilir. Horseradish peroksidaz (hrp) ile işaretlenmiş sabit miktarda estradiol, kalibratördeki veya örneklerdeki işaretlenmemiş estradiol spesifik antikordaki sınırlı sayıdaki bağlanma bölgesi için yarışmaya girer. E2-HRP-antikor kompleksi aşırı miktarda anti tavşan gama globülinleri ile kaplanmış mikrotiter plate deki tabaka ile kendiliğinden fikse olur.

Antikorların yüksek spesivitesi için ne ekstraksiyon ne de kromatografi gereklidir. Oda ısısındaki 2 saatlik inkübasyondan sonra mikrotiter plate bu yarışmacı reaksiyonu durdurmak için yıkanır. Bunun ardından substrat solüsyonu (tetra metil benzidin-hidrojen peroksit) eklenir ve 30 dakika inkübe edilir. Bu reaksiyon hidrojen sülfat ile durdurulur ve emilim uygun dalga boyuyla ölçülür. Substrat eksilme miktarı örnekteki estradiol konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Ve örnekteki estradiol konsantrasyonu kalibrasyon eğrisinden ara değerini bularak belirlenir. Bu testin tespit edebileceği minimum esrodiol konsantrasyonu 5 ± 2 pg/mL'dir. Bu testin estron ile çapraz reaksiyonu %2, estriol ile %1.9, progesteron ile %0.03, DEHAS, testosteron ve androstenedion ile çok çok düşük düzeydedir. Bu test için test içi tutarlılık %3.9-4.6 ve testler arası tutarlılığı (CV) %6-6.1 arasındadır.

AMH: AMH değerleri E90228Hu 96 testi ile (Uscn Life Sience inc., Çin) insan serumu, plazma, doku homojenatları, hüce kültür süpernatları ve diğer biyolojik sıvılarda AMH'nın sayısal ölçümü için kullanılan yarışmacı inhibisyon enzim immün test tekniğidir. Mikroplate insan AMH'ı için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmıştır. Biotin ile işaretlenmiş insan AMH'ı ile işaretlenmemiş insan AMH'ı (standartlar veya örnekler) arasında insan AMH'ına spesifik antikorlar ile yarışmacı inhibisyon reaksiyonu başlatılır. Enkübasyon sonrası bağlanmamış konjugatlar yıkanır. Ardından horseradish peroksidaz (hrp) ile konjuge edilmiş avidin her mikroplate tabakasına eklenir ve inkübe edilir. Bağlı hrp konjugatının miktarı örnekteki AMH konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Substrat solüsyonunun eklenmesi ardından gelişen rengin yoğunluğu yine örnekteki AMH konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Ve örnekteki AMH konsantrasyonu kalibrasyon eğrisinden ara değerini bularak belirlenir. Bu testin tespit menzili 37-3000 pg/mL dir. Ancak, biz çalışmamızda ml yerine birim olarak dl'yi kullandığımız için tespit aralığı olarak 0.37-30 pg/dl olarak kabul edilmiştir. Bu testin ölçebildiği minimum insan AMH tespit dozu 14.3 pg/mL den daha küçüktür. Bu test insan AMH'ı tespitinde yüksek duyarlılığa ve mükemmel özgüllüğe sahiptir ve insan AMH'ı ile analogları arasında çapraz reaksiyon veya etkileşim izlenmemiştir. Bu test için test içi tutarlılığı %10 dan küçüktür. Testler arası tutarlılığı ise %12 den küçüktür.

İnhibin B: İnhibin B E90760Hu 96 test kiti (Uscn Life Science inc., Çin) ile çalışılmıştır. Bu kit insan serumu, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda inhibin B nin sayısal ölçümü için geliştirilmiş sandviç enzim immün testidir. Mikroplate insan inhibin B için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmıştır. Biotin ile konjuge edilmiş inhibin B için spesifik antikor preparatı uygun mikrotiter plate tabakasına standartlar veya örnekler ile eklenir. Sonra avidin ile konjuge edilmiş horseradish peroksidaz herbir mikroplate tabakasına eklenir ve enkübe edilir. Bundan sonra TMB substrat solüsyonu eklenir. Biotin ile konjuge edilmiş antikorlar ve enzim ile konjuge edilmiş avidin renk değişikliğine neden olur. Enzim substrat reaksiyonu solüsyona sülfirik asit eklenmesiyle sonlandırılır ve renk değişimi spektrofotometrik olarak dalga boyu tespiti ile ölçülmüş olur. Örnekdeki inhibin B konsantrasyonu standart eğrideki optik dansite sonucu ile karşılaştırılarak belirlenmiş olur. Bu testin tespit menzili 15.6-1000 pg/mL'dir. Bu testin ölçebildiği minimum insan inhibin B tespit dozu 5.9 pg/mL'dir. Bu test insan inhibin B tespitinde yüksek sensitiviteye ve mükemmel özgüllüğe sahiptir ve insan inhibin B ile analogları arasında çapraz reaksiyon veya etkileşim izlenmemiştir. Bu test için test içi tutarlılığı %10 dan küçüktür. Testler arası tutarlılığı ise %12 den küçüktür.

Over hacmi ve AFS: Tüm ölçümler idrara sıkışmış hastada Sonoace-x8 ultrasonografi cihazı, 5 mH abdominal prob (Samsung-Medison Inc, Seul, Güney Kore) ile pelvik ultrasonografi yöntemiyle adet gören hastalarda adet 2-4 günü, görmeyen hastalarda rastgele hastaneye başvurduğu bir zamanda yapıldı. Over hacmi belirlenmesi için 3 ortagonal çap alındı ve yayvan elipsoid için formül kullanılarak hesaplandı ($\pi/6 \times D1 \times D2 \times D3$). Daha sonra her iki overe ait sonuçlar toplandıktan sonra veriler cm³ cinsinden kayıt edildi. AFS ölçümü için çapı 2-10 mm arasındaki olan foliküller her iki overde sayıldı ve toplandı.

Çalışma süresinde ÇÇK veya kemo/radyoterapi komplikasyonları nedeni de dahil olmak üzere çalışma grubunda hiçbir ölüm olmadı. Çalışmanın istatistikleri SPSS 16.0 programı (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) ile analiz edildi. Çalışmada ölçümle belirlenen devamlı değişkenler normal dağılıma uyuyorsa ortalama \pm standart sapma, normal dağılıma uymuyorsa median (minimum-maksimum) olarak verildi. Gruplar arasında devamlı değişkenlerin karşılaştırılması için Mann-Whitney U,

Student T-test kullanıldı. Sınıflandırılmış veriler araştırmamızda sayı (yüzde) olarak verildi. İki grup arasında sınıflanmış verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi veya Fisherin 'exact' testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için p değeri <0.05 olarak kabul edildi.



4. SONUÇLAR

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji ve Pediatrik Onkoloji servislerinde çeşitli çocukluk çağı maligniteleri nedeniyle tedavi ve takip programına alınan 43 hastada ve aynı yaş grubunda Pediatri polikliniğine malignite dışı, hormonal durum ve ovarian fizyolojiyi etkilemesi muhtemel olmayan yakınmalar ile başvurmuş 44 hastada gerçekleştirildi. Çalışma grubunu oluşturan hastaların sahip oldukları malignite tanılarına göre sayısı ve yüzde değerleri Tablo-2'de sunulmuştur.

Tablo-2. Çalışma grubunu oluşturan hastaların sahip oldukları malignite tanılarına göre dağılımı (n=43).

Malignite	Sayı (%)
ALL	16 (37.2)
Hodgkin Lenfoma	7 (16.2)
Non-Hodgkin Lenfoma	2 (4.6)
Burkitt Lenfoma	2 (4.6)
AML	3 (6.9)
KML	1 (2.3)
Langerhans Hücreli Histiositoz	1 (2.3)
Osteosarkom	3 (6.9)
Ewing Sarkom	3 (6.9)
Dev Hücreli Kemik Tümörü	1 (2.3)
Wilm's Tümörü	2 (4.6)
Ependimoma	1 (2.3)
Nazofarinks Ca	1 (2.3)

Çalışma grubunu oluşturan hastaların 32 tanesi hematolojik tümöre, 11 tanesi solid tümöre sahipti. Hastaların aldıkları kemoterapi ve radyoterapilerin malignite tipine göre dağılımı Tablo-3'de özetlenmiştir. Solid ve hematolojik tümörü olan olgular arasında alkileyici ajan tedavisi ve radyoterapi sıklığı istatistiksel olarak

farklı değildi ($p>0.05$). Antimetabolit, antibiyotik, mikrotübül inhibitörleri, steroid ve diğer kemoterapötik tedavi sıklıkları hematolojik maligniteli hastalarda, solid tümörlü hastalardan istatistiksel anlamlı olarak fazla idi ($p<0.05$).

Tablo-3. Çalışma grubundaki hastaların sahip olduğu malignitelere göre uygulanan kemoterapötikler, dozları ile radyoterapi tedavisinin dağılımları.

Tedavi ve Dozu	Solid Tümör n=11 (% 25.5)	Hematolojik Tümör n=32(%74.5)	P
Alkilleyici Ajan	9 (81,8)	24 (75)	0.64
Total Alkilleyici Ajan Dozu (mg/m ²)	30.880 ± 31.598	4431 ± 9768	0.02*
Antimetabolit Ajan	3 (27.3)	23 (71.9)	0.009*
Total Antimetabolit Dozu (mg/m ²)	17.545 ± 37.339	25.191 ± 20.409	0.39
Antibiyotik	7 (63,6)	30 (93.8)	0.029*
Antibiyotik Dozu (mg/m ²)	184 ± 184	219 ± 108	0.46
Mikrotübül inh.	6 (54.5)	27 (84.4)	0.043*
Mikrotübül İnhibitörü Dozu (mg/m ²)	51 ± 131	10.9 ± 10	0.35
Steroid	0	16 (50)	0.003*
Steroid Dozu (mg/m ²)	0	474 ± 544	0.007*
Diğerleri**	4 (36.4)	26 (81.3)	0.005*
Tümör Radyoterapi	4(36.4)***	19(59.4)****	0.18

* $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.

** Diğerleri başlığı altındaki ilaç grubunda ki solid tümörlü 4 hastada etoposid, hematolojik tümörlü 7 hastada etoposid, 1 hastada imatinip, 13 hastada asparajinaz kemoterapisi kullanıldı.

***1 hasta abdominal, 3 hasta ekstra abdominal radyoterapi aldı.

****19 hasta ekstra abdominal radyoterapi aldı.

Çalışma grubunun seçilmiş verileri ve menstrüel durumları Tablo-4'de sunulmuştur. Bu hastalardan bir kısmı geçmişte amenorede olup, şu anda düzenli adet gören veya oligomenore durumundaki olgulardan oluşmaktadır.

Tablo-4. Çalışma grubunun seçilmiş verilerinin ve menstrüel siklus düzeni bilgileri (Veriler ortalama \pm standart sapma ve minimum - maksimum ve sayı (%)) olarak verilmiştir).

	Çalışma Grubu (n=43)
Tanı Yaşı (yıl)	12.2 \pm 3.8 (3-17)
Takip Süresi (ay)	31.6 \pm 22.8 (3-84)
İlaçsız Geçen Süre (ay)	14.1 \pm 15.4 (0-60)
Prepubertal Olgular	10 (23.3)
Tedavi Sonrası Geçici Amenore	11 (25.6)
Tedavi Sonrası Halen Amenoresi Olan	2 (4.7)
Tedavi Sonrası Oligomenore	10 (23.3)
Tedavi Sonrası Düzenli Menstrüasyon	21 (48.8)

Solid ve hematolojik tümöre sahip hastalar arasında over hacmi, antral folikül sayımı, AMH, İnhibin B, FSH, LH ve estradiol ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). Bu sonuçlar tablo-5'de sunulmuştur.

Tablo-5. Kemoradyoterapi verildiği sırada pubertede olan solid ve hematolojik tümörlü olguların over rezervi ve hormon değerlerinin değerlendirilmesi (Bu tabloda prepubertal dönemde çalışmaya alınan 10 olgu analiz dışında bırakılmıştır).

	Solid Tümör (n=9)	Hematolojik Tümör (n=24)	P
Sağ over hacmi (cm³)	3.3±1.8	3.9±3.3	0.62
Sol over hacmi (cm³)	3.4±2.1	2.8±1.8	0.48
Total Antral Folikül Sayısı	3.5±3.3	4.3±3.3	0.53
FSH (mIU/mL)	8.4±3.9	12.6±11.8	0.13
LH (mIU/mL)	5.8±4.8	7.9±9	0.50
Estradiol (pg/mL)	57±43	43±31	0.31
İnhibin B (pg/mL)	19±16	13±4.6	0.27
AMH (pg/dl)	1.6±0.26	1.5±0.45	0.83

$p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.

Çalışma ve kontrol gruplarının demografik verileri istatistiksel olarak benzerdi ($p>0.05$). Veriler tablo-6'da sunulmuştur.

Tablo-6. Çalışma grubu pubertal hastalar ve kontrol gruplarının demografik verileri (Bu tabloda prepubertal dönemde çalışmaya alınan 10 olgu analiz dışında bırakılmıştır).

Parametre	Çalışma (n=33)	Kontrol (n=44)	P
Yaş (yıl)	15.8±1.9	16±1.6	0.60
Boy (cm)	158±7.4	158±4	0.99
Kilo (kg)	53.510	54.87	0.51
VKİ* (kg / m ²)	21.3±3.1	21.8±2.2	0.47
VYA**	1.5±0.18	1.5±0.10	0.16

p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

*VKİ: Vücut kitle indeksi.

**VYA: Vücut yüzey alanı.

Çalışma ve kontrol grubunun yaşları ve menarş yaşları benzer olmasına rağmen meme gelişimi ve aksiller kıllanma gibi Tanner evreleri anlamlı olarak geriden gelmekteydi (p<0.05). Bu sonuçlar Tablo-7'de sunulmuştur.

Tablo-7. Çalışma ve kontrol gruplarının Tanner evreleri ve menarş durumları (Prepubertal 10 olgu analiz dışı bırakıldı).

Parametre	Çalışma grubu (n=33) (%)	Kontrol grubu (n=44) (%)	P
Tanner meme			
1	2 (6.1)	0	0.002*
2	6 (18.2)	24 (54.5)	
3	25 (75.8)	20 (45.5)	
Tannerkılınma(aksilla)			
2	7 (21.2)	24 (54.5)	0.003*
3	26 (78.8)	20 (45.5)	
Menarş yaşı (yıl)	12.4±1.06	12.8±1.4	0.20
Dismenore yok	26 (78.8)	90 (20.9)	<0.001*
hafif	7 (21.2)	29 (67.4)	
şiddetli	0	5 (11.6)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

Çalışma ve kontrol grupları arasında hormon değerlerinden FSH çalışma grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.017). Ayrıca over hacimleri ve antral folikül sayıları da çalışma grubunda istatistiksel açıdan anlamlı oranda düşüktü (p<0.05). Veriler Tablo-8'de sunulmuştur.

Tablo-8. Pubertal hasta grubu ile kontrol grubunda mensturasyonun 2-4. günlerinde bakılan over hacimleri ve hormon değerleri.

	Çalışma Grubu (n=33)	Kontrol Grubu (n=44)	P
Sağ over hacmi (cm³)	3.77 ± 2.94	5.28 ± 2.71	0.02*
Sol over hacmi (cm³)	3.03 ± 1.93	4.18 ± 2.6	0.04*
Total antral folikül sayısı	4.1 ± 3.3	8.6 ± 3.5	<0.001*
FSH (mIU/mL)	13.5 ± 16.2	7.3 ± 2.7	0.017*
LH (mIU/mL)	8.03 ± 10.4	8.7 ± 7.5	0.72
Estradiol (pg/mL)	47.2 ± 35.0	48.2 ± 40.3	0.86
İnhibin B (pg/mL)	15.0 ± 9.5	21.0 ± 24.3	0.19
AMH (pg/dL)	1.57 ± 0.41	1.67 ± 0.33	0.24

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

Tablo-9. Prepubertal olguların over hacimleri ve rastgele hormon değerleri ortanca ± standart hata (minimum-maksimum değerler) olarak verilmiştir.

Parametre	Prepubertal olgular (n=10)
Sağ over hacmi (cm³)	2.04±0.8 (0.5-8.8)
Sol over hacmi (cm³)	1.8±0.5 (0.25-5.5)
FSH (mIU/mL)	20.4±8.71 (1.5-81)
LH (mIU/mL)	10.1±5.1 (0.5-52)
Estradiol (pg/mL)	24.3±7.5 (12.7-91.0)
İnhibin B (pg/mL)	24.2±8.5 (8.3-97)
AMH (pg/dL)	1.5±0.05 (1.31-1,89)

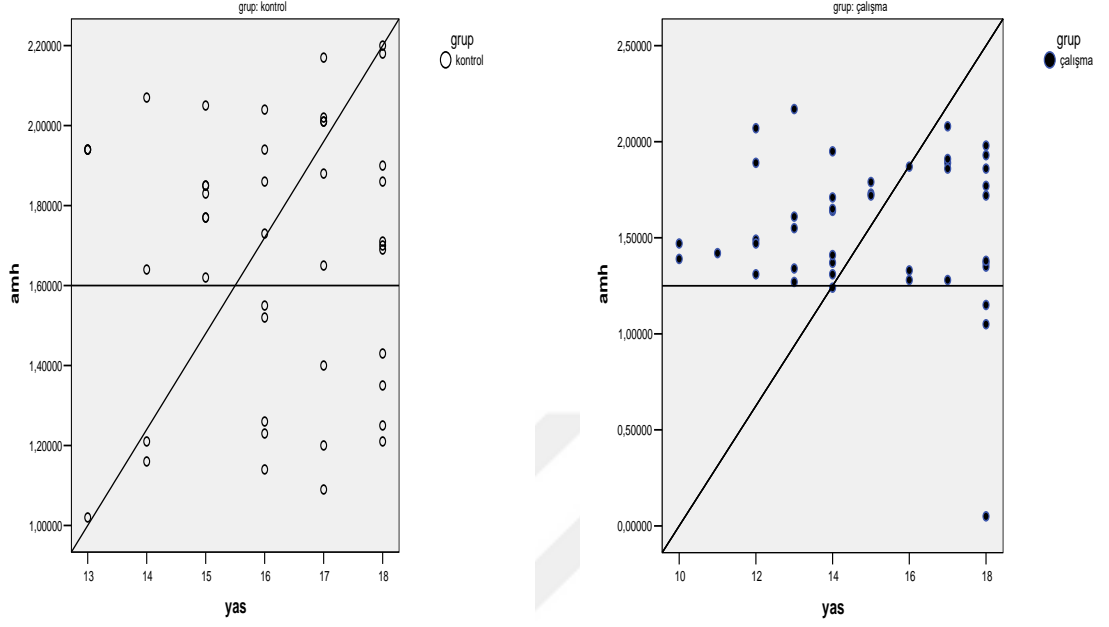
AMH ve yaş kontrol ve çalışma gruplarında korelasyon analizi ile araştırıldığında kontrol grubu ile ($r=0.01$, $p=0.94$) çalışma grubu ($r=0.05$, $p=0.75$) arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Prepubertal dönemde tanı konulup tedavi edilmiş hastalarla pubertal dönemde tedavi edilmiş hastaların over rezervini karşılaştırdığımızda AMH prepubertal olgularda istatistiksel açıdan daha yüksek olarak bulundu ($p=0.034$). Tablo-10'da bu sonuçlar verilmiştir.

Tablo-10. Tedavi sırasında prepubertal olan olgularla menstruasyon gören olguların FSH, LH, Estradiol, AMH, İnhibin B ve total antral folikül değerlerinin karşılaştırılması (Değerler ortanca \pm standart hata olarak verilmiştir).

Parametre	Prepubertal tedavi (n=7)	Menstruasyonlu tedavi (n=26)	P
Yaş (yıl)	14.4 \pm 0.8	16.2 \pm 0.3	0.02
İlk tanıdan sonra geçen ay	47.1 \pm 17.1	20.5 \pm 15.3	0.002*
İlaçsız geçen süre	21.8 \pm 21.7	9.8 \pm 12.4	0.19
Sağ over hacmi (cm ³)	3.7 \pm 1.1	3.7 \pm 0.5	0.95
Sol over hacmi (cm ³)	2.1 \pm 0.5	3.2 \pm 0.4	0.19
Total antral folikül sayısı	3 \pm 1.1	4.4 \pm 0.6	0.31
FSH (mIU/mL)	13 \pm 5.2	11.1 \pm 1.8	0.67
LH (mIU/mL)	6.7 \pm 1.4	7.5 \pm 1.7	0.80
Estradiol (pg/mL)	31.4 \pm 10.4	51.5 \pm 7	0.18
İnhibin B (pg/mL)	12.2 \pm 1.1	15.7 \pm 2.1	0.40
AMH (pg/dL)	1.8 \pm 0.1	1.5 \pm 0.08	0.034*

* $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı

Çalışma grubu pubertal hastalar ile kontrol grubuna ait AMH değerleri dağılımına ait grafikler Grafik 1'de sunulmuştur.



5. TARTIŞMA

Son yıllarda yeni kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapi uygulamaları sayesinde çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde önemli başarılar elde edilmiştir. Bu kanserlere sahip çocukların 5 yıllık sağ kalım oranları %70'in üzerine çıkmış, hatta bazı çocukluk çağı kanseri tümüyle tedavi edilebilir hastalıklar olarak değerlendirilmeye başlamıştır. Sağ kalım ile ilgili korkuların azalması ile beraber, tedavi sonrası yaşam kalitesi, genel sağlık durumunun korunması ve üreme fonksiyonlarının idamesi gibi konulara odaklanan endişeler giderek artmaktadır. Gerçekte yüksek dozda kullanılan kombinasyon kemoradyoterapi yöntemleri, uzun bir ömür beklentisi olan bu çocukların ilerideki yaşamlarında organ fonksiyonlarının bozulması, kronik hastalıklar, üreme yeteneğinin kaybı, genel hayat kalitesinin azalması gibi problemlerden acı çekmesine neden olur. Örneğin, ÇÇK'nde sıklıkla kullanılan alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antibiyotikler, vinka alkaloidleri akciğer, karaciğer, kalp veya böbrek hasarına neden olabilmekte, sinir sistemi ve endokrin fonksiyonları bozabilmekte ve genital organlar üzerine yarattıkları toksik etki ile overlerin hormon üretme kapasitesini ve sağ kalan kız çocuklarının reproduktif yaşamlarında üreme yeteneğini azaltabilmektedir. Araştırmalar ÇÇK'nin tedavisinde yaygın olarak kullanılan sitotoksik kemoterapinin süresi ve kümülatif dozu, aynı zamanda radyasyon terapisi verilip verilmemesi gibi faktörler ile ilişkili olarak, kurtulan çocukların ilerideki hayatlarında % 20 - 50 oranında genel endokrin rahatsızlıklar yaşadıklarını ortaya koymuştur (136).

Çocukluk çağı kanserinin tedavisi sırasında kız çocuklarında gözlenen akut gonadal hasarın boyutlarını ve uzun dönemli takip sürecinde üreme yeteneğini, hormon üretme kapasitesini inceleyen araştırmaların henüz tatmin edici sonuçlar vermekten uzak olsa da menopoza giriş sürecini ve kemoterapötik tedavi sürecinin erken menopoz ile ilişkisini değerlendiren çalışmalarda bu konuya ışık tutacak önemli bulgulara erişilmiştir. Avrupa'da kadın popülasyonunun ortalama menopoz yaşı 52 ve 40 yaşından önce menopoza girmek olarak tanımlanan erken menopoz olasılığı %1 olarak bilinmektedir (158, 159, 160). ÇÇK'nden sağ kalan kız çocuklarında ise ortalama menopoz yaşı 44, menopozun 40 yaşından erken başlama olasılığı %2.1 – 20 arasında bildirilmiştir (87, 158, 161, 162). Bu çalışmalar,

ÇÇK'nden sağ kalan kız çocuklarında tedavi yaşı, puberte durumu, kanserin solid tümör veya hematolojik malignite olması, seçilen tedavi yöntemi ve dozu, radyoterapi uygulanıp uygulanmaması gibi değişkenlere bağlı olarak cerrahi olmayan erken menopoza riskinin sağlıklı yaşlılarına oranla 13 kata kadar artabildiğini ortaya koymuştur (162). Byrne ve ark. çalışmalarında sadece alkilleyici ajan alan hastalarda erken menopoza için rölatif riskin 9.2 kat arttığını, alkilleyici ajanlar ile birlikte diafram altı radyoterapi alan hastalarda ise rölatif riskin 27 kat arttığını bildirdiler (163). Bu çalışmayı doğrular şekilde kanserden sağ kalan çocuklar ile ilgili geniş araştırmalardan biri olan çocukluk çağı kanserleri sağ kalım çalışmasında (Childhood Cancer Survey Study - CCSS) erken menopoza hastaların % 8'inde bildirildi ve erken menopoza için en önemli risk faktörleri, adölesan dönemde alkilleyici ajanlar ile maruziyet (RR:9) ve overlere uygulanan radyasyon dozu (RR:29) olarak tanımlandı. Beş merkez çalışmasında da (Five Center Study - FCS) erken menopoza için risk faktörleri kanser kemoterapisine puberteden sonra başlanmış olması, diafram altı radyoterapi ve alkilleyici ajan kullanımı olarak bulunmuştur. Diafram altı radyoterapi ve alkilleyici ajan kemoterapisine alanlarda ortalama menopoza yaşı 31 yıldır (163). Diğer çalışmalarda yukarıda sayılan risk faktörlerinin yanı sıra erken menopoza için öne sürülen diğer risk faktörleri Hodgkin lenfomalı olmak, unilateral salpingooforektomi, kemik iliği transplantasyonu için tüm vücut ışınlamasına maruz kalmak olarak ortaya konulmuştur (158, 162).

Kanser kemoterapisinin menopoza yaşını nasıl değiştirdiğinin anlaşılması kemoterapi sırasında ovarian hasarın boyutlarını değerlendirmek için faydalı veriler sağlarsa da bu tür uzun dönemli takiplere göre yapılan çalışmalar, hasta gruplarının oluşturulmasındaki eksiklikler, grupların kanserli çocukların genel popülasyonunu ve kanser türlerini yansıtmaması, yıllar öncesinden kalma veriler ve hatırlananlara odaklı anket çalışmaları olması, metodolojik farklılıklar, erken menopoza yol açabilecek genetik ve çevresel faktörler değerlendirilmemesi ve biyokimyasal ölçümler ile desteklenmemesi gibi nedenler ile eleştirilmektedir. Örneğin çalışmaların geneline baktığımızda kanser tedavileri için 50'li yıllardan günümüze değişen tedavi yöntemlerinin ayrıca değerlendirilememesi, hasta gruplarının üç aylık bebeklerden, 16 yaşına kadar pubertal hastaları kapsayacak şekilde geniş yaş aralıklarında alınması ve biyokimyasal değerlendirmelerin çocukluktan – 4. dekada

uzanan farklı yaş gruplarındaki hastaları ayırmadan yapılmış olması hasta gruplarını heterojen kılmaktaydı. Bu nedenler ile son yıllarda gonadotoksik hasarın gerçekleştiği dönemde over folikül havuzunda gerçekleşen yıkımı inceleyen çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Bununla beraber ÇÇK kemoterapisi ile ilişkili folikül rezervindeki değişimleri inceleyen araştırmalar, kemoterapi ile ilişkili folikül hasarının boyutları, bu hasarın kan biyokimyasal belirteçlerinde yarattığı değişim ve klinik anlamı konularında tatmin edici bilgiler vermekten uzaktır. Bizim çalışmamız adolesan döneme odaklanması ve prepubertal KT-RT alan hastaları ayrı analiz etmesi ile diğer çalışmalardan farklıdır.

Menopoz yaşını ve erken menopoz ile ilişkili risk faktörlerini değerlendiren çalışmaların aksine akut over yetmezliğini (AOY) inceleyen çalışmalar folikül rezervinin hasarlanma aşamaları hakkında biyokimyasal belirteçleri kullanarak objektif veriler sunar. Her ne kadar akut over yetmezliği için net bir tanım olmamak ile beraber adet gören hastalarda tedavi sırasında veya tedavi sonrası ilk 5 yılda amenore ortaya çıkması, puberte gecikmesi, over rezervini gösteren biyokimyasal belirteçlerdeki değişimler ve over antral folikül sayımında azalma ile tanınabilmektedir. Ancak prepubertal kızlarda bu belirteçleri kullanarak akut over yetmezliğini göstermek nispeten zordur. Çalışmalarda ÇÇK tedavisi sırasında ve ilk 5 yıllık takip sürecinde amenore ortaya çıkması AOY olarak kabul edilirse, hastaların %6.3'ünde, FSH, estradiol gibi biyokimyasal belirteçler bazında değerlendirilirse %22.6'sında AOY görüldüğü bildirilmiştir (164, 165, 166). Bununla beraber tedavinin tipi ile ilişkili olarak, kök hücre transplantasyonu için tüm vücut ışınlanmasında maruz kalan 10 yaşında küçük kızların %50'sinde ve 10 yaşından büyük olanların %100'ünde AOY ortaya çıkabilmektedir (164, 165, 166). Aslında hastalarda tedavi sonrasında hiçbir klinik bulgu saptanmasa bile histolojik olarak folikül sayısında akut azalma gösterilmiştir (167, 168). Akut ovarian yetmezlik için en önemli risk faktörleri, tanıdaki yaşın ileri olması, Hodgkin lenfomalı olmak, özellikle kök hücre transplantasyonu için tüm vücut ışınlanmasında maruz kalmak, overlerin 10 gy'den fazla radyasyona maruz kalması, alkilleyici ajan ve prokarbazin kullanımındadır (136, 165).

Kemoterapiye bağlı akut folikül hasarına ve akut over yetmezliği tablosuna kemoterapinin indüklediği apoptozis, mitokondrial DNA hasarı, kan damarlarının hasarı, neovaskularizasyon ve fokal fibrozisin neden olduğu düşünölmektedir (67). Kemoterapi ile indüklenmiş over hasarının ultraströktürel göstergesi yaygın follikül kaybı ve over fibrozisidir. Fare overlerinde siklofosfamidin etkilerini araştıran bir araştırmada bu kemoteröpatik ajanın primordial ve küçük primer foliküllerde oosit üzerine olumsuz etkili olduğu bununla beraber daha geniş primer foliküllerde apoptotik, granöloza hücreleri varken oositin sağlam kaldığı gösterilmiştir (169). Bununla birlikte kanser tedavilerinin endokrin fonksiyon gören overin stromal hücrelere etkisi de önemlidir. Stromal hücreler olasılıkla kemoterapi sonrası hasarın tamirinde de rol oynarlar (67). Hücre siklusuna spesifik olmayan alkilleyici ajanlar, hücreler bölünme aşamasında olmasalar da tek sarmal yada çift sarmal DNA kırıklarına neden olarak etki gösterirler. Foliküler hasar yanında, steroid sentezinin azalmasıyla karakterize yaygın granöloza hücre hasarına da neden olurlar (56,67,69,70).

Kanser kemoradyoterapisi nedeniyle folikül hasarı, AOY ve hastaların uzun dönemli takiplerinde erken menopoza giden süreci overlerdeki erken dönem foliküllerden üretilen anti-müllerian hormon, inhibin-B, estradiol ayrıca hipofiz kaynaklı FSH ve LH gibi biyokimyasal parametrelerin seviyelerini ölçerek değerlendirmek mümkün görünmektedir. Bu şekilde over folikül havuzunda ortaya çıkması muhtemel hasarlanma somut veriler ile ortaya konabilir. Anti-müllerian hormon primordial ve erken primer foliküllerden salgılanır ve over folikül rezervinin doğrudan bir göstergesidir. AMH, çocukluk çağında da tespit edilebilir düzeydedir ve tartışmalı olsa da adet gününden bağımsız siklusun herhangi bir zamanında değerlendirilebilir olması bu testi değerli kılar. Primer ve antral foliküllerden salgılanan inhibin B ölçümleri de ÇÇK'nden sağ kalanlarda çocuklarda over folikül rezervini ortaya koymak için kullanılmaktadır. Ancak, inhibin-B çocukluk çağında her zaman tespit edilebilir seviyelerde değildir ve puberte sonrası daha açıklayıcı bilgi verebilir. Benzer şekilde puberte sonrası FSH ölçümleri, ultrasonografi kullanarak over hacim ölçümü ve antral folikül sayımları ile de kemoradyoterapi uygulamaları sonrası over rezervi hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Çocukluk çağı kanser tedavisi sırasında ve sonrasında, 3-4 aylık periyodlar ile AMH,

inhibin B, FSH, LH, estradiol ölçümleri yaparak akut over yetmezliğini değerlendiren Mörse ve ark. tedaviden üç ay sonra tüm hastalarda tanıdaki AMH seviyesinden, yaş, menarş durumu veya alınan tedavi ve dozdan bağımsız olarak AMH ve inhibin B düzeylerinde keskin düşüş, FSH, LH düzeylerinde anlamlı artış olduğunu bildirdiler (170). Kemoterapiden 1-3 yıl sonra diafragma altına radyoterapi alan hastalar hariç diğer hastalarda AMH seviyeleri yükselmekte ama bu yükseliş eski seviyelerine ulaşamamaktaydı. Kemoterapinin over folikül rezervini akut şekilde etkilediğini ortaya koyan diğer bir çalışmada, Rosendahl ve ark. kemoterapi alan 19-35 yaş arası kadın hasta grubundaki çalışmalarında başlangıçta 2.7 ± 1 ng/mL olan AMH'nin 1. kür kemoterapinin ardından 1.1 ± 0.6 ng/mL a 2. kür kemoterapinin ardından 0.0 ± 0.4 ng/mL ye düştüğü belirlenmiştir. Bu çalışmada inhibin-B ve antral folikül sayımı 3. kür kemoterapinin ardından düşerken 4. kürden sonra FSH menopozal seviyelere ulaşmıştı. Benzer şekilde radyoterapi sonrası da over boyutlarının küçülmesi ve folikül kaybının akut olarak ortaya çıkabildiği ve kemik iliği transplantasyonundan ilk 24 saat içerisinde FSH'nin menopozal seviyelere çıkabildiği gösterildi (171). Kemoterapinin uygulamasının ilk haftası içerisinde AMH seviyelerindeki keskin düşüş kemoterapinin foliküler hedefinin granüloza hücrelerinin olabileceğini ve bu destekleyici hücrelerdeki hasarın folikül hasarına neden olduğunu işaret etmektedir. Bununla beraber tedaviden sonraki ilk aylarda FSH seviyesinin normale dönmeye başlarken, inhibin B'de daha önce, antral folikül sayısı ve AMH'da ise daha geç ortaya çıkan artış paterni olduğu gösterildi (170).

Kemoterapi sonrası ovaryan aktivitenin yeniden başlama paterni, büyümekte olan folikül popülasyonunun tekrarlayan kemoterapi ile neredeyse elimine olduğunu, ancak 2-3 ay önceden çağrılmış preantral foliküllerin antral evreye ulaşması ile dolaşımdaki FSH, inhibin B gibi belirteçlerin normale döndüğünü ortaya koymaktadır. AMH seviyeleri çok daha yavaş yükselmek ile birlikte çalışmaların bir kısmında eski seviyelerine dönmemiştir. Bu durum da her ne kadar tedavinin bitmesinden sonra over fonksiyonları ve adet siklusları normal hale dönse bile erken menopoza neden olacak şekilde erken evre foliküllerde geri dönüşümsüz olarak ortaya çıkan hasarı göstermektedir. Bath ve ark. kanserden sağ kalan kız çocuklarının uzun dönemli takiplerinde düzenli adet görüyor olsalar bile FSH seviyesinin yüksek, AMH seviyesinin düşük olarak bulduklarını bildirdi (172). Bu çalışmada kanserden

sağ kalanlar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında antral folikül sayımları gruplar arasında benzer olmak ile beraber, çalışma grubunda over hacim ölçümleri daha küçüktü. Herslag ve ark. ÇÇK den sağ kalan ve en az 18 yaşında olan hastalardan elde ettikleri serum analizinde hastaların %16'ında AMH seviyesinin < 0.1 ng/ml ve %24'ünde ise 0.1-1.0 ng/ml arasında buldular (173). Lie Fong ve ark. çalışmalarında ortalama 18.1 yıl takip edilen kanserden sağ kalmış hastalarda ortalama AMH konsantrasyonunu çalışma ve kontrol gruplarında benzer olduğunu (çalışma grubunda ortalama 1.7 µg/lt, kontrol grubunda 2.1 µg/lt) ancak üç veya daha fazla prokarbazin içeren kemoterapi siklusu ile tedavi edilenlerde ve abdominal yada total radyasyon alanlarda AMH seviyelerini kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulduklarını bildirdiler (Sırası ile ortalama 0.5µg/lt ve 0.1 µg/lt) (174). Krawzuk ve ark. ise kemoradyoterapi almış benzer yaş grubundaki genç kadınlarda sadece infradiafragmatik bölgeye radyoterapi uygulanmış hastalarda AMH seviyeleri anlamlı olarak düşük bulduklarını ve Hodgkin lenfoma nedeniyle kemoterapi uygulanmış hastalarda FSH seviyeleri anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirdiler (175).

Biz çalışmamızda ÇÇK tedavisi sırasında ve sonraki dönemde akut ovarian hasarın boyutunu ve ilişkili olduğu risk faktörlerini hem amenore, düzensiz adetler ve pubertal gelişim anormallikleri gibi klinik bulgular hem de Anti-müllerian hormon, İnhibin B, FSH, LH ve Estradiol düzeyi ölçümleri gibi biyokimyasal parametreler ile araştırdık. Prospektif yöntem ile planladığımız çalışmamızda hastalar ve ebeveynleri ile yüz yüze görüşerek çalışmamızı kayıt altına aldık. Biyokimyasal parametreleri gelişmiş yöntemler ile çalıştık ve ultrasonografik ölçümlerin aynı cihaz ve aynı ultrasonografist tarafından yapılmasını sağlayarak ölçümleri standardize etmeye çalıştık. Çalışmamızda ki olguları tedavisi üzerinden ortalama 14.1 ay (0-60 ay) geçmiş hastalardan oluşturduk. Bu durum akut over yetmezliği hakkında bilgi sağlarken, kemoradyoterapiye bağlı hasarın puberte ile ilişkisini değerlendirmemizi olanaklı kıldı. Çalışmamızda Lie Fong ve ark. ve Krawzuk ve ark. çalışmaları ile benzer şekilde kanserden sağ kalan kız çocuklarından puberte sonrası elde ettiğimiz AMH düzeylerini puberte sonrası kızlardan oluşan kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark tespit etmedik. LH, inhibin B, estradiol seviyelerinde de çalışma ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark yoktu.

Ancak çalışma grubumuzda kemik iliği transplantasyonu için tüm vücut ışınlaması almış hasta yoktu. Bu durum tüm vücut ışınlamasına maruz kalmamış hastalarda uygulanan standart kemoterapilerin erken dönem foliküller üzerinde AMH seviyeleri ile gösterilebilecek derecede hasar yapmadığını ortaya koymaktadır. Bununla beraber çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla ortalama FSH seviyesini anlamlı olarak yüksek ve ortalama over volümü ve antral folikül sayımı anlamlı olarak azdı (sırasıyla; $p=0.017$ ve $p\leq 0.001$). FSH seviyelerindeki artış, diğer çalışmalarda da gösterilmiştir ancak sıklıkla oligo-amenore gelişen bu hasta grubunda adet siklusuna bağımlı bu belirteç hatalı olarak yüksek tespit edilebilir ve kontrol kan örneklerinde doğrulanması yerinde olabilir. Aynı zamanda FSH overin akut hasarı sonrası en çabuk düzelen belirteçtir ve kemoterapi alan ve almış hastalarda foliküler hasarın boyutunu ortaya koymak için hangi aylarda ve ne sıklıkla bakılması gerektiği henüz belli değildir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular sonucunda antral folikül sayımları ve over hacim ölçümlerinin puberte sonrası dönemde ovarian rezervi değerlendirmek için kullanılabileceğini düşünüyoruz. Antral folikül sayımı ve over hacim ölçümlerinin over rezerv azalmasını ortaya koyan eşik değerlerinin belirlenmesi ve zaman içinde ortaya çıkması muhtemel sayım ve hacim azalmasının ortaya konulması bu hastaların değerlendirilmesinde yarar sağlayabilir. Bununla beraber gözlemci içi ve gözlemciler arası farklılıklardan etkilenen antral folikül sayımını genç adölesanlarda değerlendirmek her zaman mümkün olmayabileceği akılda tutulmalıdır. Çalışmamızda alkilleyici ajana maruziyet ve Hodgkin lenfoma tanılı olmayı da akut ovarian yetmezlik için risk faktörü olarak tespit etmedik. Araştırmamızda total alkilleyici ajan dozu, solid tümörleri olan hastalarda hematolojik tümörleri olan hastalara kıyasla anlamlı olarak fazlaydı ($p=0.02$). Bununla beraber solid veya hematolojik tümörü olan hastalar arasında antral folikül sayıları, over hacimleri ve diğer biyokimyasal belirteçleri arasında anlamlı farklılık tespit etmedik ($p=0.53$).

Çalışmamızda tanı ve tedavi sırasında prepubertal olup çalışmaya alındığı sırada pubertede olan hastalarla tanı, tedavi ve çalışmaya alındığı sırada pubertede olan hastalar karşılaştırıldığında, prepubertal dönemde kemoradyoterapi alan hastalarda AMH seviyesi 1.8 ± 0.1 pg/dL ve pubertal dönemde kemoradyoterapi alan hastalarda ise 1.5 ± 0.08 olarak tespit edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi

($p=0.034$). İnhibin B seviyeleri arasındaki fark ise anlamlı değildi. Çalışmamızda puberte durumu ile tedavinin akut over yetmezliğine yol açması arasındaki bu ilişki Chemaitilly ve ark. ve Lantigna ve ark. çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile benzerdir. Araştırmacılar da kanser tanısı konulduğu sırada ileri yaşta olan kızların tedaviye bağlı olarak AOY geliştirme olasılıklarının yüksek olduğunu, kanser tedavisini menarş sırasında ve hemen sonrasında alanlarda over yetmezliğini menarşdan önce alanlara oranla çok daha sık bulduklarını bildirdiler (sırasıyla, %45; %16.4). Chemaitilly ve ark. AOY’i sadece hasta ifadeleri ve anket sonuçlarından elde ettikleri klinik veriler ile Lantigna ve ark. ise FSH ve estradiol ölçümleri ile değerlendirdiler. Çalışmamızda AOY değerlendirmek için hastaların klinik bulgularının kayıt altına alınmasının yanı sıra AMH ve inhibin B ölçümü gibi güncel biyokimyasal belirteçleri de kullanmamız araştırmaların farklı dizaynını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda tedavi sırasında puberte durumu ile elde ettiğimiz bu bulgu, tedavinin menopoz yaşı ile ilişkisini değerlendiren gerek Beş Merkez Çalışması gerekse Teinturier ve ark.’nın çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile de doğrulanmaktadır. Bu çalışmalarda puberteden sonra kemoradyoterapi alan hastalarda menopozun erken yaşlara geldiği, ayrıca prepubertal kızların alkilleyici ajanlar ile yapılacak kemoterapinin toksik etkilerine daha dirençli oldukları öne sürüldü (158,163). Beş merkez çalışmasında 0-12 yaş arası tanı konulan ve puberteden önce tedavi edilen hastalarda yirmili yaşlarda menopoz olma oranı kontrollerle kıyaslandığında fazla değildi. Ancak tanı ve tedavi puberteden sonra olan hastalarda yirmili yaşlarda menopoza girme olasılığı kontrollerle karşılaştırıldığında 2.32 kat artmıştı. Puberteden sonra tanı konulup tedavi edilen ve aynı anda diafram altı radyoterapi alan hastalarda kontrol grubuna göre yirmili yaşlarda menopoz riski neredeyse 10 kat fazla (HL için RR:9.6 ve diğer tüm kanserler için RR:8.6) bulundu. Bu konudaki sonuçlarımız tedavisini menarş zamanında alanlarda daha sık fertilité defisitleri ortaya çıktığını bildiren Bynre ve ark.’nın çalışması ile de benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar ile kemoterapinin hedefinin büyümekte olan foliküller olduğu ve ilerleyen yaşla birlikte oosit sayısı azaldığı için overlerin gonadotoksik ajanlara karşı daha hassas hale geldiği öne sürülebilir. Anlaşılan o ki, foliküllerin tükenmesi sadece kemoterapinin dinlenmekte olan premordial foliküller üzerine direk etkisi ile ortaya çıkmaz aynı zaman ek olarak

çağrılmış folikülleri de indirekt olarak etkir ve hasarın artmasına sebep olur. GnRH pulsasyonunun başlaması ile preantral evreye ulaşan foliküller, primordial foliküllere oranla kemoterapi ve radyoterapi tedavisine daha hassas hale gelmektedir. AMH'ın büyümekte olan foliküller havuzundan primordial foliküllerin çağrılmasını engellediği bilinmektedir. AMH yokluğu olan farelerde çok sayıda primordial folikül çağrılmasına ve primordial folikül havuzunun erkenden tükenmesine yol açar (176, 177). AMH seviyesindeki tekrarlayan akut düşmeler primordial foliküllerin yeni kohortundan çağrılmasının ve matürasyonun başlamasını arttırır. Böylece foliküller kemoterapi etkilerine daha duyarlı bir hale gelir ve primordial havuzda daha hızlı bir tükenme meydana getirir. Bu durum puberteden sonra kemoradyoterapi verilmesi planlanan hastalarda folikül havuzunu daha az etkilenmesini sağlamak için ek önlemler alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Çoğu deneysel olmak ile beraber puberteye girmiş çocuklarda folikül havuzunu koruyucu yöntemler olan kriyopreservasyon, ooforopeksi ve GnRH analogları kanser tedavisinden önce başlanabilir. Prepubertal çocuklarda fertilitenin korunması seksüel immatürite nedeniyle genellikle ovarian kriyopreservasyon ile sınırlıdır. Pubertal çocuklarda GnRH analogu kullanımı ile ilgili veriler tatmin edici değildir. GnRH analogları farklılaşma evresine giren primordial folikül sayısını azaltır, hipoestrojenik durum yaratarak over kan akımını azaltır, GnRH reseptör aktivasyonu veya intragonadal antiapoptotik moleküllerin artırılması yolu over hücre apoptozisini azaltıcı etkisi ile over hasarını azaltması beklense de, iki prospektif randomize çalışmada GnRH analoglarının gonadal fonksiyonlarını korumada faydasız olduğu gösterilmiştir (178, 179).

Elde ettiğimiz sonuçlara karşın hem CCSS çalışmasında hem de Van Beek ve ark. çalışmasında puberte durumu ile ovarian hasarlanma arasındaki ilişkiyi ortaya koyacak benzer sonuçlar elde edilmediğini de vurgulamalıyız. Van Beek ve ark. kanser tedavisinin uzun dönemli etkilerini AMH düzeylerini ölçerek değerlendirdikleri çalışmalarında prepubertal ve puberte sırasında tedavi alan olgular arasında anlamlı fark bulmadıklarını bildirdiler.

Kız çocuklarında pubertal gelişimin gecikmesi ve düzenli menstrüel siklusların bozulması çocukluk çağında verilen kanser kemoterapisinin normal

fizyolojiyi bozan etkilerinin diğeri bir kanıttır. Puberte gecikmesini değerlendiren bir çalışmada puberte öncesi kanser tedavisi verilen olguların %5.8'inde ve puberte sırasında kanser tedavisi verilen hastaların %33.3'ünde puberte ilerlemesinin kötü etkilendiği gösterildi (180). Diğer bir çalışmada ise kanser tedavisi sırasında oluşan amenorenin üç aydan uzun sürdüğü hastalarda over fonksiyonlarının geri dönmesinin olası görünmediği bildirilmiştir (162). Çalışmamızda hastaların pubertal gelişimleri ve menstrüel sikluslarının düzenini sorguladık ve benzer sonuçlar elde ettik. Çalışma ve kontrol gruplarının yaşı ve menarş yaşı benzer olmasına rağmen pubertal gelişimleri farklıydı. Çalışma grubumuzda meme gelişimi ve aksiller kıllanma Tanner evreleri kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı oranda geri kalmıştı (sırasıyla $p=0.02$ ve $p=0.03$). Çalışmamızda 11 hastada (%25.6) kemoterapi sonrası 3-12 ay arasında amenoreik dönem tespit ettik. İki (%4.7) hastada ise amenore hali devam etmekteydi. Amenore dışında düzensiz menstrüel sikluslara sahip hasta oranı ise çalışma grubunun %23' idi. Bu sonuçlar, kanser tedavisine bağlı menstrüel siklus bozukluğu olan ve pubertal gelişimi geri kalan kızların süreç hakkında bilgilendirilmesi ve danışmanlık hizmeti verilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Pubertal gelişimi geri kalan kızlarda hormon replasman tedavisi ile sekonder seks karakterlerinin gelişiminin sağlanması, çocukluktan erişkinliğe geçişte psikososyal faydalar sağlayabilir (173). Ancak ocukluk ağı kanserlerinden sağ kalanlarda uzun süreli hormon replasman tedavisinin güvenilir olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Çocukluk ağı kanserini tedavi ile aşmış bireylerin karşılaştığı en önemli medikal ve sosyal problemlerden birisi de fertilitte sorunları ve artmış gebelik komplikasyonlarıdır. Biz alışmamızda hastaların fertilitte durumunu değerlendirmedik ancak Beş Merkez çalışmasında K'nden sağ kalan evli hastaların fertilitte durumları yakın akrabalarının fertilitte durumları ile karşılaştırıldığında erkeklerde fertilitenin %15, kadınlarda %7 düştüğü ortaya kondu, özellikle diafragma altını hedefleyen radyasyon tedavilerinde etki en belirgindi. Bu çalışmada kanserden sağ kalanlar ile onların akrabaları fertilitte açısından karşılaştırıldığında rölatif fertilitte oranı kadın sağ kalanlarda 0.93 (%95GA;0.83-1.04) olarak bulundu. Ayrıca diğer bir çalışmada hastaların %44'ünde AMH seviyesi fertilitenin azaldığını gösterecek kadar düştüğü tespit edildi (161). Fertilitte azalmasının yanı sıra gebe kalabilen hastalarda gebelik sonuçları da halen açıkça

bilinmemektedir. Özellikler uterin radyasyon düşük, erken doğum, ölü doğum, düşük doğum ağırlıklı gebelik komplikasyonları ile ilişkili gözükmemektedir. Kemoterapiye bağlı olarak AOY olan hastalarda düşük insidansı % 22.7 tekrarlayan düşük insidansı %7.3 olarak bildirildi (166). Sanders ve ark. prepubertal dönemde kanser tedavisi alan 82 kız çocuktan 23'ünün (%28) ileride normal over fonksiyonlarını geliştirdiği ve 9'unun gebe kaldığı ancak tüm vücut ışınlanması alan 5 hastanın spontan düşük yaptığı bildirildi. Green ve ark. ise çalışmalarında 1915 kanserden sağ kalan kadında 4029 gebelik değerlendirilmiş ve konjenital malformasyon riskinde artış tespit edilmemekle beraber 5 gy'den fazla uterin radyasyon alanlarda SGA bebek doğum olasılığının arttığı ortaya konmuştur (OR:4). Pelvik radyasyon alan kadınların çocuklarında doğum defektlerinin sayısında artış gözlenmediği bildirilmiştir (181).

Çalışmamızda foliküler hasarın derecesini ortaya koyabileceğini düşündüğümüz over rezerv testlerini kullanarak akut over yetmezliği tablosunun hangi yaş gruplarında yaygın olduğunu, menarş yaşı ile ilişkisini, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkışına olan etkilerini daha iyi anlamayı amaçladık. Bu sayede ortaya çıkan akut ovarian hasarı engellemek için kullanılacak over rezervini koruyucu tedavi yöntemlerini geliştirmek için yeni veriler sağlamaktır. Çalışmamız sonucunda ÇÇK'nden sağ kalan ve özellikle menarş sonrası kemoterapi tedavisi almış olan kadın hastaların düzenli menstrüel siklusa ve cinsiyet karakter özelliklerine sahip olsalar bile düzenli olarak AMH, jinekolojik ultrasonografi ve diğer over rezerv testlerine bakılarak değerlendirilmelerini öneriyoruz. ÇÇK'nden sağ kalan kız çocukları ve ailelerine fertilité koruma seçenekleri göz önünde bulundurularak gerekli danışmalık verilmedi. Özellikle puberte sonrası kemoradyoterapi almış kızların ileride prematür over yetmezliği riski altında oldukları unutulmamalı ve bu kadınlar çocuk doğurma fikrini ertelememesi, herhangi bir jinekolojik anormallik bulgusu olmasa bile fertilité uzmanlarınca değerlendirilmesi önerilmelidir. Gebe kalabilen hastalar ise gebelikleri süresince yüksek riskli gebelikleri takip eden perinatoloji kliniklerinde izlenmelidir. Fertil çağların sonuna yaklaştıklarında ise prematür menopoz sonucunda artan osteoporoz ve kardiovasküler hastalıklar gibi medikal problemler için multidisipliner bir yaklaşım takip edilmesi gerekliliği akılda tutulmalıdır.

6. ÖZET

AMAÇ

Çalışmamızda çocukluk çağı kanserlerinden dolayı kemoterapi ve radyoterapi almakta olan ve almış kız çocuklarında, anamnezden elde edilen güncel verileri, klinik bulguları, over rezervini belirlemek yaygın olarak kullanılan laboratuvar testleri ve ultrasonografik belirteçleri kullanarak, sitotoksik kemo/radyoterapi yöntemlerinin akut dönemde folikül havuzu üzerindeki etkisini ve akut over yetmezliği oluşturma potansiyellerini, prepubertal ve pubertal hasta gruplarını kontrol grupları ile karşılaştırmayı ve bu testlerin over hasarının boyutlarını değerlendirmede kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda malignite nedeniyle pediatrik hematoloji ve pediatrik onkoloji kliniklerinde takip ve tedavi edilen prepubertal dönemde olan 10 hasta, pubertal dönemde olan 33 hasta olmak üzere toplam 43 hasta çalışma grubunu, pediatri polikliniğine benign sebepler ile başvuran 44 pubertal hasta ise kontrol grubunu oluşturdu. Tüm hastaların demografik verileri, anamnez bulguları, fizik muayene bulguları, puberte evreleri, pelvik ultrasonografi ile over volümleri ve toplam antral folikül sayımları, antimüllerian hormon, inhibin B, folikül stimulan hormon, luteinizan hormon ve estradiol ölçümlerinin içeren laboratuvar verileri elde edildi. Elde edilen veriler, gruplar arasında devamlı değişkenlerin karşılaştırılması için Mann-Whitney U veya Student T-testi ve sınıflanmış verilerin karşılaştırılması için ise ki-kare testi veya Fisher'in exact testi kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

Çalışma grubundaki pubertal olguların kontrol grubundaki olgulara kıyasla over volümleri ve toplam antral folikül sayımları anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$) ve folikül stimulan hormon değerleri anlamlı olarak yüksekti ($p=0.017$). Diğer biyokimyasal belirteçler arasında çalışma ve kontrol grupları arasında fark yoktu. Prepubertal dönemde tanı alıp tedavi gören hastaların puberte sonrası bakılan

antimüllerian hormon değerleri, pubertal dönemde tanı ve tedavi alan hastaların değerlerinden anlamlı olarak yüksekti ($p=0.034$). Çalışma grubunda pubertal gelişim anlamlı olarak geri kalmıştı ($p<0.05$).

SONUÇLAR

Çocukluk çağı kanserleri için uygulanan kemo/radyoterapi yöntemlerinin erken dönemde over folikülleri üzerinde yarattığı hasarın değerlendirilmesinde folikül stimülan hormon, over hacmi ve toplam antral folikül sayımı kullanılabilir. Antimüllerian hormon değerleri puberte sonrası over foliküllerinin sitotoksik kemo/radyoterapinin tahrip edici etkilerine daha duyarlı olduklarını ortaya koymaktadır. Bu nedenle puberte sonrası kanser tedavisi alması planlanan hastalarda over folikül havuzunu koruyucu önlemler göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çocuklar pubertal gelişim yavaşlayabileceği konusunda uyarılmalı ve gerekli danışmanlık verilmelidir.

7. ABSTRACT

OBJECTIVE

The objective of the study was to assess the impact of chemotherapy/ radiotherapy treatment on ovarian reserve , ovarian damage, frequency of acute ovarian failure by evaluating medical history, symptoms, ovarian reserve markers and ultrasonographic markers in pre and postpubertal case- control groups.Our aim was to evaluate the markers that are used to indicate extent of damage to the ovaries.

MATERIAL and METHOD

Our study was a case -control study that involved 87 patients at Kocaeli University. Forty three females (10 prepubertal, 33 pubertal) were treated and followed up with the diagnosis of childhood cancer in pediatrics hematology and oncology clinics. Forty four control patients with diagnosis of benign conditions were enrolled from the pediatrics clinic. The demographic characteristics, medical histories, physical examination symptoms, volume of ovaries, total antral follicle counts, anti mullerian hormone levels, inhibin B levels, follicle stimulating- luteinizing hormones and estradiol levels were reviewed. Statistical analysis was performed using an analysis of Mann-Whitney U and Student T test for continuous variables and chi square and Fisher exact test for categorical variables.

RESULTS

Ovarian volumes and total antral follicle counts of pubertal patients in the study group were significantly lower than the control group ($p < 0.05$) whereas FSH levels (pg/ml) were significantly higher than the control group ($p = 0.017$). Other biochemistry parameters were not statistically different in between the two groups. Post treatment AMH levels for patients whom diagnosis was made at the prepubertal period were significantly higher than patients with diagnosis at pubertal period

($P=0.034$). Pubertal development was underdeveloped in case group significantly ($P<0.05$).

CONCLUSION

Follicle stimulating hormone levels, ovarian volumes and total antral follicle counts are clinically useful markers of damage to the ovarian follicles in patients receiving chemotherapy/ radiotherapy for childhood cancers. AMH level has indicated that ovarian follicles are more sensitive to cytotoxic treatment in postpubertal patients than prepubertal patients. Therefore ovarian reserve preservation should be considered in postpubertal girls planning treatment for cancer. These patients should be warned about decelerating pubertal development and genetic counselling should be informed.

8. KAYNAKLAR

1. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. *Lippincott Williams & Wilkins, 2001.*
2. Gleeson HK, Shalet SM. The impact of cancer therapy on the endocrine system in survivors of childhood brain tumours. *Endocr Relat Cancer 2004;11(4):589-02.*
3. Jemal A, Siegel R, Ward E ,et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J.*
4. Gershenson DM, Miller AM, Champion VL, Monahan PO, ZhaoQ, Cella D, Williams SD; Gynecologic Oncology Group. Reproductive and sexual function after platinum-based chemotherapy in longterm ovarian germ cell tumor survivors: *a GynecologicOncology Group Study. J Clin Oncol 2007; 25(19): 2792-7.*
5. Carpenter PJ, Sahler OJ, Davis MS (1990) Use of a camp setting to provide medical information to siblings of pediatric cancer patients. *J Cancer Educ, 5(1):21-26.*
6. Sadler TW. Ürogenital sistem in langman's medikal embriyoloji, altıncı baskı, *Williams & Wilkins.Baltimor. 1990;246-81.*
7. Çocukluk çağı lösemileri. (In) Temel Pediatri: Türk Milli Pediatri Derneği, (eds) P Hasanoglu E, Düsünsel R, Bideci A. 1. Baskı, *Güneş Tıp Kitabevi. 2010, Ankara.*
8. Gramatges MM, Rabin KR. The Adolescent and Young Adult with Cancer: State of the Art-- Acute Leukemias. *Curr Oncol Rep. 2013 Jun 12. [Epub ahead of print]*
9. Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer. 2013 May;60(5):728-33.*
10. Kelly KM, Hodgson D, Appel B, Chen L, Cole PD, Horton T, Keller FG; COG Hodgkin Lymphoma Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer. 2013 ;60(6):972-8.*
11. Cairo MS, Woessmann W, Pagel J. Advances in hematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescent lymphomas. *Biol Blood Marrow Transplant. 2013 ;19(1 Suppl):S38-43.*
12. Xavier AC, Armeson KE, Hill EG, Costa LJ. Risk and outcome of non-Hodgkin lymphoma among classical Hodgkin lymphoma survivors. *Cancer. 2013 Jun 24. [Epub ahead of print]*
13. Jacques G, Cormac O. Central nervous system tumors. *Handb Clin Neurol.2013;112:931-58.*
14. Nordfors K, Lohi O, Haapasalo H, Wigren T, Helén P, Vettenranta K, Arola M.[Childhood brain tumors]. *Duodecim. 2013;129(3):235-43.*

15. Bielack S, Kempf-Bielack B, Von Kalle T, Schwarz R, Wirth T, Kager L, Whelan J. Controversies in childhood osteosarcoma. *Minerva Pediatr.* 2013;65(2):125-48.
16. Shukla N, Schiffman J, Reed D, Davis IJ, Womer RB, Lessnick SL, Lawlor ER; COG Ewing Sarcoma Biology Committee. Biomarkers in Ewing Sarcoma: The Promise and Challenge of Personalized Medicine. *A Report from the Children's Oncology Group. Front Oncol.* 2013;3:141.
17. Chantada GL, Sampor C, Bosaleh A, Solernou V, Fandiño A, de Dávila MT. Comparison of Staging Systems for Extraocular Retinoblastoma: Analysis of 533 Patients. *JAMA Ophthalmol.* 2013; 20:1-8.
18. Mei H, Wang Y, Lin Z, Tong Q. The mTOR Signaling Pathway in Pediatric Neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol.* 2013 ; 22. [Epub ahead of print]
19. Sadak KT, Ritchey ML, Dome JS. Paediatric genitourinary cancers and late effects of treatment. *Nat Rev Urol.* 2013 ;10(1):15-25.
20. Parham DM, Alaggio R, Coffin CM. Myogenic tumors in children and adolescents. *Pediatr Dev Pathol.* 2012;15(1 Suppl):211-38.
21. Plowchalk DR, Mattison DR. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicol Appl Pharmacol .* 1991; 107:472-481.
22. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet* 1999; 21: 200-203.
23. Plowchalk DR, Mattison DR. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicol Appl Pharmacol .* 1991; 107:472-481.
24. Sadler TW. Ürogenital sistem in langman's medikal embriyoloji, altıncı baskı, *Williams & Wilkins.Baltimor.* 1990;246-281.
25. Drews U. Germ cell in color atlas of embryology, *Thieme medikal Publishers inc ,New york.* 1995; 1-15.
26. Kayalı H, atıroglu G ve Tasyürekli M. 1992 insan embriyolojisi , yedinci baskı , *alfa basım yayım dağıtım* 1992;54-65.
27. Baker TG, A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries, *Proc Roy Soc Lond.*1963;158:417-423.
28. Gondos B, Bhiraleus P, Hobel C, Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries, *Am J Obstet Gynecol* 110:644, 1971.

29. Speroff, Leon; Fritz, Marc A . *Clinical Gynecologic Endocrinology & Infertility*, 7th Edition Lippincott Williams & Wilkins 2005;102-105.
30. Gondos B, Westergaard L, Byskov A, Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study, *Am J Obstet Gynecol*.1986; 155:189-195.
31. Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U, Human female phenotypic development: role of fetal ovaries, *J Clin Endocrinol Metab*.1994;79:604-608.
32. Sadler TW .Ürogenital sistem in langman’s medikal embriyoloji, altıncı baskı, *Williams & Wilkins,Baltimor*.1990;246-281.
33. Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakane PK. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 1996; 137: 1938-1948.
34. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF: Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause, *Human Reproduction*. 1992;7:1342.
35. Parrot JA, Skinner MK: Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiate folliculogenesis, *Endocrinology*. 1990;140:4262.
36. Lee W, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S: The effect of bone morphogenetic protein- 7 on folliculogenesis and ovulation in the rat, *Biology of Reproduction*.2001;65:994.
37. Xiao CW, Asselin E, Tsang BK. Nuclear factor B-mediated induction of Flice-like inhibitory protein prevents tumor necrosis factor -induced apoptosis in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2002; 67: 436-41.
38. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF: Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- β superfamily, *Molecular and cellular Endocrinology*.2002;191:35.
39. Oktay K, Briggs D, Gosden RG: Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles, *Journal of Clinic Endocrinology and Metabolism*.1997;82:3748.
40. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S: the primordial to primary follicle transition, *Molecular and cellular Endocrinology*. 2000; 163:53.

41. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, et al.: Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome, *Journal of Clinical Endocrinology & metabolism*.2002;87:1337.
42. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJW, Hovatta O: Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.2002;87:316.
43. Erickson GF, Shimasaki S: the physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. *Fertility & sterility* 2001; 76:943.
44. Gougeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocrine Reviews*.1996;17:121.
45. Erickson GF: The graafian follicle: A functional definition. In: Adashi EY(ed) Ovulation: *Evolving Scientific and Clinical Concepts*. Springer-Verlaag, New York.
46. Erickson GF: Normal regulation of ovarian androgen production, *Seminars in Reproductive Endocrinology*. 1993;11:307.
47. Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakane PK. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 1996; 137: 1938-1948.
48. Cevrioglu S.A.Ovaryan Fizyoloji.In:Çiçek N, Akyürek C,Çelik Ç,Haberal A, eds.*Kadın Hastalıkları ve Do um Bilgisi*.Ankara: Güne Kitabevi,2004:1062-1074.
49. Sperof L, Glass R.H, Kase. Clinical. Endocrinology and Infertility.In: N.G,eds.Clinical Gynocologic Endocrinology and Infertility.6th edition. Baltimore:*Lippincott Williams & Wilkins*,1999:487-522 and 1013-1132.
50. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone- Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13612-13617.
51. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 162-177.
52. Matsuda F, noue N, Goto Y, Manabe N.The regulation of ovarian Granulosa Cell Death by pro- and anti-apoptotic Molecules. *Journal Reproduction and development*.2006;52:6.
53. Porter DA, Harman RM, Cowan RG, Quirk SM. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction* 2001; 121.

54. Kondo H, Maruo T, Peng X, Mochizuki M. Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2702-2710.
55. Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N, Yonehara S. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 11-18.
56. Inoue N, Maeda A, Matsuda-Minehata F, Fukuta K, Manabe N. Expression and localization of Fas ligand and Fas during atresia in porcine ovarian follicles. *J Reprod Dev (in submission)*.
57. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-B activation. *Cell* 1995; 81: 495-504.
58. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 1995; 270: 387-391.
59. Prange-Kiel J, Kreutzkamm C, Wehrenberg U, Rune GM. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine. *Biol Reprod* 2001; 65: 928-935.
60. Robles R, Tao XJ, Trbovich AM, Maravel DV, Nahum R, Perez GI, Tilly KI, Tilly JL. Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 2641-2644.
61. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994; 135: 1845-1853.
62. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 903-918.
63. Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1924-1933.
64. Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sci* 2004; 82: 1967-1975.

65. Ryungsa K. Recent Advances in Understanding the Cell Death Pathways Activated by Anticancer Therapy. *Cancer* 2005;103:1551–60.
66. Gleeson HK, Shalet SM. The impact of cancer therapy on the endocrine system in survivors of childhood brain tumours. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(4):589-602.
67. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995; 136: 3665-3668.
68. Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstetrics and Gynecology*. 2010;116(5):1171–1183.
69. Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology* 1996; 137: 4837-4843.
70. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999; 213: 1-17.
71. Brown RW, Hungerford JW, Greenwood PE, Bloor RJ, Evans DF, Tsonis CG, Forage RG. Immunization against recombinant bovine inhibin subunit causes increased ovulation rates in gilts. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 199-205.
72. King BF, Britt JH, Esbenshade KL, Flowers WL, Sesti LA, Martin TL, Ireland JJ. Ovulatory and endocrine responses after active immunization of gilts against a synthetic fragment of bovine inhibin. *J Anim Sci* 1993; 71: 975-982.
73. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1989;1(2):75-9.
74. Maneschi F, Fugardi MG, Corsello G, LoCurto M. Pubertal maturation in girls treated for childhood acute leukaemia. *European Journal of Pediatrics*. 1991;150(9):630–633.
75. Quigley C, Cowell C, Jimenez M, et al. Normal or early development of puberty despite gonadal damage in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 1989;321(3):143–151.
76. Noorda EM, Somers R, Van Leeuwen FE, Vulsma T, Behrendt H. Adult height and age at menarche in childhood cancer survivors. *European Journal of Cancer*. 2001;37(5):605–612.

77. Mills JL, Fears TR, Robison LL, Nicholson HS, Sklar CA, Byrne J. Menarche in a cohort of 188 long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatrics*. 1997;131(4):598–602.
78. Bath LE, Anderson RA, Critchley HOD, Kelnar CJH, Wallace WHB. Hypothalamic-pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. *Human Reproduction*. 2001;16(9):1838–1844.
79. Reulen RC, Zeegers MP, Wallace WHB, et al. Pregnancy outcomes among adult survivors of childhood cancer in the British childhood cancer survivor study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(8):2239–2247.
80. Green DM, Kawashima T, Stovall M, et al. Fertility of female survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(16):2677–2685.
81. Clayton PE, Shalet SM, Price DA, Jones PH. Ovarian function following chemotherapy for childhood brain tumours. *Med Pediatr Oncol* 1989;17(2):92-6.
82. Clayton PE, Shalet SM, Price DA, Campbell RH. Testicular damage after chemotherapy for childhood brain tumors. *J Pediatr* 1988;112(6):922-6.
83. Green DM, Sklar CA, Boice JD, et al. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(14):2374–2381.
84. Johnston RJ, Wallace WHB. Normal ovarian function and assessment of ovarian reserve in the survivor of childhood cancer. *Pediatric Blood and Cancer*. 2009;53(2):296–302.
85. Critchley HOD, Wallace WHB, Shalet SM, Mamtora H, Higginson J, Anderson DC. Abdominal irradiation in childhood; the potential for pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1992;99(5):392–394.
86. Critchley H. Factors of importance for implantation and problems after treatment for childhood cancer. *Medical and Pediatric Oncology*. 1999;33(1):9–14.
87. Larsen E, Schmiegelow K, Rechnitzer C, et al. Radiotherapy at a young age reduces uterine volume of childhood cancer survivors. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2004;83(1):96–102.
88. Broekmans F.J.Kwee J.Hendriks DJ. et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006. 12(6):685-718.
89. Soules MR, Battaglia DE, Klein NA. Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas* 1998;30:193–204.

90. Roberts VJ, Barth S, El-Roeiy A, Yen SSC. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1402–10.
91. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, et al. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol* 1994;40:717–23.
92. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1401–5.
93. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2742–5.
94. Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E. G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., Fisher, R.A., Bertonis, J.M., Torres, G., Wallner, B.P., Ramachandran, K.L., Ragin, R.C., Manganaro, T.F., MacLaughlin, D.T. & Donahoe, P.K. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. 1986;45, 685–698.
95. Rey. R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C. & Bedecarras, P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003;15, 21–31.
96. Teixeira, J., Maheswaran, S. & Donahoe, P.K. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews*, 2001; 22, 657–674.
97. Knebelmann, B., Boussin, L., Guerrier, D., Legeai, L., Kahn, A., Josso, N. & Picard, J.Y. Anti-Müllerian hormone Bruxelles: a nonsense mutation associated with the persistent Müllerian duct syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991; 88, 3767–3771.
98. Behringer, R.R., Finegold, M.J. & Cate, R.L. Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*. 1994; 79, 415–425.
99. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859–61.
100. Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Graem, N., Müller, J., Cate, R.L. & Skakkebaek, N.E. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and

granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999; 84, 3836–3844.

101. Rey, R., Sabourin, J.C., Venara, M., Long, W.Q., Jaubert, F., Zeller, W.P., Duvillard, P., Chemes, H. & Bidart, J.M. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Human Pathology*, 2000;31:1202–1208.

102. Salmon, N.A., Handyside, A.H. & Joyce, I.M. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology*, 2004; 266:201–208.

103. Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A. & Themmen, A.P. (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 2000;143: 1076–1084.

104. Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Rose, U.M., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A. & Themmen, A.P. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 2001;142:4891–4899.

105. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:3065–71.

106. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, et al. Antimüllerian hormone levels: A putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357-362.

107. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endoer Rev* 1996;17:121-155.

108. Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Human Reproduction*. 2003;18(4):700–706.

109. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998;69:505–10.

110. Chang MY, Chiang CH, Chiu TH, Hsieh TT, Soong YK. The antral follicle count predicts the outcome of pregnancy in a controlled ovarian hyperstimulation/ intrauterine insemination program. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:12–7.

111. Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW. Follicular vascularity—the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an invitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod* 1997;12:191–6.
112. Pavlik EJ, Depriest PD, Gallion HH, et al. Ovarian volume related to age. *Gynecologic Oncology*. 2000;77(3):410–412.
113. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 2003;79:190–7.
114. Syrop CH, Dawson JD, Husman KJ, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 1999;14:1752–6.
115. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* 1987;2(8560):645–7.
116. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting ‘poor responders’ in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994;9:1607–11.
117. Garcia JE. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues: applications in gynecology. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36:719–26.
118. Winslow KL, Toner JP, Brzyski RG. The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test-A sensitive predictor of performance in the flare up in vitro fertilization cycle. *Fertile steril* 1991;56:711-717.
119. Lass A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data. *Hum Reprod* 2004;19:467–9.
120. Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2004;19:1055–9.
121. Oehninger S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:222–231.
122. Blumenfeld Z, Haim N. Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Ann Med* 1997;29:199–206.
123. Maltaris T, Koelbl H, Fischl F, et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue pieces in gonadotropin-stimulated SCID mice: the effect of ovariectomy. *Anticancer Res* 2006;26:4171–4176. 124. Blumenfeld Z, Dann E, Avivi I, et al.

Fertility after treatment for Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002;13(suppl 1):138–147.

124. Meirow D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:123–131.

125. Waxman JH, Ahmed R, Smith D, et al. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19:159–162.

126. Georgescu S.E., Goldberg M.J., Stefan S., Ashok A. Present and future fertility preservation strategies for female cancer patients. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2008;63:725-732.

127. Behringer K, Breuer K, Reineke T, et al. 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: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2005; 23:7555–7564.

128. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999;213:1–17.

129. Morita Y, Perez GI, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000;6:1109–1114.

130. Paris F, Perez GI, Fuks Z, et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med* 2002;8:901–902.

131. Falcone T, Attaran M, Bedaiwy MA, et al. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril* 2004;81:243–257.

132. Bisharah M, Tulandi T. Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:367–370.

133. Morice P, Castaigne D, Haie-Meder C, et al. Laparoscopic ovarian transposition for pelvic malignancies: indications and functional outcomes. *Fertil Steril* 1998;70:956–960.

134. Horning SJ, Hoppe RT, Kaplan HS, Rosenberg SA. Female reproductive potential after treatment for Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1981;304(23):1377–82.

135. Sklar C. Maintenance of ovarian function and risk of premature menopause related to cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;(34):25-7.

136. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Kasper C, et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(13):890-6.
137. Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, et al. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod* 2003;18:137-139.
138. Abusief ME, Hornstein MD, Jain T. Assessment of United States fertility clinic websites according to the American Society for Reproductive Medicine (ASRM)/Society for Assisted Reproductive Technology (SART) guidelines. *Fertil Steril* 2007;87:88-92.
139. Gosden RG. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;60-63.
140. Oktay K, Sonmezer M. Fertility preservation in gynecologic cancers. *Curr Opin Oncol* 2007;19:506-511.
141. Li YB, Zhou CQ, Yang GF, et al. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:110-114.
142. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;342:1919.
143. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001;357:1172-1175.
144. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837-840.
145. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-1410.
146. Oktay K. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod* 2006;21:1345-1348.
147. Meirrow D, Levron J, Eldar-Geva T, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005; 353:318-321.
148. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod* 2006;21:2006-2009.

149. Shaw JM, Bowles J, Koopman P, et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 1996;11:1668–1673.
150. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10:251–266.
151. Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, et al. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 2002;79: 530–538.
152. Gandhi V, Plunkett W. Modulatory activity of 29,29-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Res* 1990; 50: 3675–3680.
153. Tsai MC, Takeuchi T, Bedford JM, et al. Alternative sources of gametes: reality or science fiction. *Hum Reprod* 2000;15: 988–998.
154. Nagy ZP, Chang CC. Artificial gametes. *Theriogenology* 2007; 67:99–104.
155. Takeuchi T, Neri QV, Palermo GD. Construction and fertilization of reconstituted human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:309–318.
156. Nagy ZP, Chang CC. Current advances in artificial gametes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:332–339.
157. Maltaris T, Seufert R, Fischl F, et al. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;130:148–155.
158. Thomas-Teinturier C, El Fayeche C, Oberlin O, Pacquement H, Haddy N, Labbé M, Veres C, Guibout C, Diallo I, De Vathaire F. Age at menopause and its influencing factors in a cohort of survivors of childhood cancer: earlier but rarely premature. *Hum Reprod*. 2013 Feb;28(2):488-95.
159. Dratva J, Gómez Real F, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Gerbase MW, Probst-Hensch NM, Svanes C, Omenaas ER, Neukirch F, Wjst M, Morabia A, Jarvis D, Leynaert B, Zemp E. Is age at menopause increasing across Europe? Results on age at menopause and determinants from two population-based studies. *Menopause*. 2009 Mar-Apr;16(2):385-94.
160. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod*. 2003 Jan;18(1):199-206.
161. Hamre H, Kiserud CE, Ruud E, Thorsby PM, Fosså SD. Gonadal function and parenthood 20 years after treatment for childhood lymphoma: a cross-sectional study. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Aug;59(2):271-7.

162. Green DM, Sklar CA, Boice JD Jr, Mulvihill JJ, Whitton JA, Stovall M, Yasui Y. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 2009 May 10;27(14):2374-81.
163. Byrne J. Infertility and premature menopause in childhood cancer survivors. *Med Pediatr Oncol.* 1999 Jul;33(1):24-8.
164. Green DM. Fertility and Pregnancy Outcome after Treatment for Cancer in Childhood or Adolescence. *Oncologist.* 1997;2(3):171-179.
165. Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1723-8. Epub 2006 Feb 21.
166. Lantinga GM, Simons AH, Kamps WA, Postma A. Imminent ovarian failure in childhood cancer survivors. *Eur J Cancer.* 2006 Jul;42(10):1415-20. Epub 2006 Mar 20.
167. Sklar C. Growth and endocrine disturbances after bone marrow transplantation in childhood. *Acta Paediatr* 1995;411(suppl):57-61.
168. Himelstein-Braw R, Peters H, Faber M. Influence of irradiation and chemotherapy on the ovaries of children with abdominal tumours. *Br J Cancer.* 1977 Aug;36(2):269-75.
169. Desmeules P, Devine PJ. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicol Sci.* 2006 Apr;90(2):500-9. Epub 2005 Dec 28.
170. Mörse H, Elfving M, Lindgren A, Wölner-Hanssen P, Andersen CY, Øra I. Acute onset of ovarian dysfunction in young females after start of cancer treatment. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Apr;60(4):676-81.
171. Broekmans F.J.Kwee J.Hendriks DJ. et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome *Hum Reprod Update* 2006. 12(6):685-718.
172. Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod.* 2003 Nov;18(11):2368-74.
173. Hershlag A, Rausch ME, Cohen M. Part 2: Ovarian failure in adolescent cancer survivors should be treated. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2011 Apr;24(2):101-3.
174. Lie Fong S, Laven JS, Hakvoort-Cammel FG, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, van den Heuvel-Eibrink MM. Assessment of ovarian reserve in adult childhood cancer survivors using anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod.* 2009 Apr;24(4):982-90.

175. Krawczuk-Rybak M, Leszczyńska E, Wysocka J, Zelazowska-Rutkowska B. [Anti-mullerian hormone in young women after chemotherapy and infradiaphragmatic radiotherapy for childhood cancer]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2008;14(2):99-103. Polish.
176. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999;140:5789–5796.
177. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2002;143:1076–1084.
178. Oktay K, Sonmezer M, Oktem O, et al. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. *Oncologist* 2007;12:1055-1066.
179. Ataya K, Ramahi-Ataya A. Reproductive performance of female rats treated with cyclophosphamide and/or LHRH agonist. *Reprod Toxicol* 1993;7:229-235.
180. Siris ES, Leventhal BG, Vaitukaitis JL. Effects of childhood leukemia and chemotherapy on puberty and reproductive function in girls. *N Engl J Med.* 1976 May 20;294(21):1143-6.
181. Chatterjee R, Goldstone AH. Gonadal damage and effects on fertility in adult patients with haematological malignancy undergoing stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996 Jan;17(1):5-11.