

T.C.

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

MEDİKAL ONKOLOJİ BİLİM DALI

111830

MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MCF-7 ÜZERİNDE ARSENİK

TRİOKSİT'İN SİTOTOKSİSİTESİ VE DİĞER  
KEMOTERAPÖTİK AJANLARLA ETKİLEŞİMİ

TEZ DANIŞMANI:

DOÇ. DR. ERDEM GÖKER

111830

DR. VELİDDİN CANFEZA SEZGİN

ONKOLOJİ UZMANLIK TEZİ

İzmir - 2001

YAYINLANMIŞTIR  
KİMLİK NO: 111830

## İÇİNDEKİLER:

Önsöz.....	3
Giriş ve Amaç.....	4
Genel Bilgiler.....	5 - 28
Arsenik Trioksit.....	29 - 30
Gereç ve Yöntem.....	31 - 32
Sonuçlar.....	33 - 35
Tartışma.....	36 - 39
Grafikler.....	40 - 48
Kaynaklar.....	49 - 53

## ÖNSÖZ

13.09.1999 tarihinde başladığım Medikal Onkoloji Bilim Dalı' ndaki eğitimim süresince hem klinik hem de prelinik çalışmalarında, her türlü desteği sağlayan Medikal Onkoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Erdem Göker, Yard. Doç. Dr. Ulus A. Şanlı, Yard. Doç. Dr. Rüşhan Uslu, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Filiz Büyükkeçeci, Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serdar Bedii Omay' a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı' nda uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini gördüğüm İç Hastalıkları A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Gürhun Atabay' a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve Medikal Onkoloji ihtisasım esnasında, günün yoğunluğunu beraber yaşadığımız, klinik ve prelinik çalışmaları beraber yürüttüğümüz Onkoloji Bilim Dalı uzmanlarından Uzm. Dr. Bülent Karabulut' a, Hematoloji Bilim Dalı uzmanlarından sayın Uzm. Dr. Güray Saydam' a, prelinik çalışmalarda yardımını gördüğüm Biyolog Nur Selvi' ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Yoğun çalışma tempomuzdan kalan kıt zamanımı anlayışla karşılayan, bana karşı her türlü destek ve sevgisini gösteren, sevgili eşim Esin Sezgin' e teşekkürlerimi sunarım.

Meme kanseri sık görülen kanserlerden olup, önemli bir sağlık sorununu oluşturmaktadır. Metastatik meme kanserinde kür elde edilememesi nedeniyle, tedavide temel amaç palyasyondur. Çalışmamızda; in vitro olarak arsenik trioksit' in MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksitesisi ve diğer kemoterapötik ajanlarla etkileşimi araştırıldı. Arsenik trioksit' in belirgin sitotoksitesite gösterdiği ve diğer kemoterapötik ajanlarla kombine edilmesinin aditif etki gösterdiği saptandı. Bu sonuçların değerlendirilmesi ve geliştirilmesi ile klinik uygulamada yararlı olmasını diliyoruz.

## I- GİRİŞ VE AMAÇ:

Meme kanseri kadınlarda major morbidite ve erken dönemde ölüm sebebidir. Metastatik meme kanseri olan olgularda salvaj kemoterapinin rolü bilinmemektedir. Ancak pek çok kemoterapötik ajanla objektif tümör yanıtının elde edildiği gösterilmiştir. Bu hasta grubunda kombine kemoterapinin tek ajan kemoterapiden daha iyi olduğunu gösterir veri yoktur. Yeni ve daha etkili ajanlara gereksinim duyulmaktadır.

Arsenik bileşiklerinin promiyelositik lösemi, over kanseri, özafagus kanseri, megakaryositik lösemi, lenfoma hücre dizilerinde sitotoksik olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu çalışmada, arsenik trioksit' in gerek tek ajan olarak, gerekse doksorubisin, paklitaksel ve dositaksel ile kombine edilerek meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkinliği araştırıldı. Arsenik trioksit' in 72 saatlik inkübasyonda kanser hücrelerinin %50' sini öldürdüğü konsantrasyon (IC<sub>50</sub> değeri)  $5 \times 10^{-6}$  M bulundu. Sitotoksosite zamana ve doza bağımlıydı. Arsenik trioksit' in, doksorubisin, paklitaksel ve dositaksel ile kombine kullanıldığında additif bir etkileşim olduğu gösterildi.

Arsenik trioksit ile *in vitro* olarak elde edilmiş bulgular bu ajanın meme kanseri tedavisinde alternatif bir ajan olabileceğini göstermektedir. Sitotoksosite mekanizmalarının anlaşılması ile ilgili çalışmalar, hayvanlarla yapılacak denemeler bu ajanın meme kanseri tedavisinde uygulanabilirliğini gösterecektir.

## II- GENEL BİLGİLER:

### MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malign tümördür ve bütün kadın kanserlerinin yaklaşık olarak % 32' sini oluşturmaktadır (1). Meme kanseri, kanser ölümlerinin % 18' ine neden olmakta ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada bulunmaktadır. 2001 yılında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' nde yaklaşık olarak 193.700 yeni tanı alan hasta olacağı ve 40.600 kadının da bu kansere bağlı olarak öleceği tahmin edilmektedir (1). 1940 ve 1987 yılları arasında hastalığın görülme sıklığında yıllık % 4 olmak üzere artış saptanmıştır (2). 1987 yılından itibaren ise herhangi bir artış göstermeden aynı düzeyde devam etmektedir. Meme kanserinin ölüm oranları 1950' lerden itibaren aynı düzeyde bulunmaktadır. Alt gruplara bakıldığında 55 yaşın üzerindeki kadınlarda ölüm oranında artış, 55 yaşın altındaki kadınlarda ise ölüm oranında azalma olduğu gözlenmiştir (3). Görülme sıklığında artış olurken ölüm oranının aynı düzeyde kalması; mammografinin daha yaygın kullanılması ile karsinoma in situ veya daha küçük invaziv kanserlerin saptanmasında artış ile açıklanabilir. Ayrıca, tedavi yaklaşımlarındaki yeni gelişmeler, meme kanserinin şifa oranının son 30 yılda artırılmasında önemli rol oynamıştır.

### RİSK VE EPİDEMİYOLOJİK FAKTÖRLER

ABD' nde yaşayan bir kadının hayat boyu meme kanseri gelişme riskinin % 13, meme kanserinden ölme riskinin % 3.3 olduğu hesaplanmıştır. Meme kanserinin görülmesi veya ölüm, hastanın kişisel özellikleri ve bulunduğu toplumun riskleri tarafından etkilenmektedir.

- Cinsiyet
- Yaş
- Irk
- Coğrafya
- Sosyoekonomik durum
- Hastalık bölgesi

Tablo I' de meme kanserinin gelişimi ile ilişkili risk faktörleri gösterilmektedir.

**Tablo I. Meme kanserinin gelişmesi ile ilişkili risk faktörleri**

Yaş
Hereditör faktörler Ailesel Genetik
Meme kanseri hikayesi İn situ İnvaziv
Benign meme hastalığı (atipik hiperplazi)
Endojen endokrin faktörler Menarş yaşı Menapoz yaşı İlk gebelik yaşı
Egzojen endokrin faktörler Postmenapozal östrojen replasmanı Oral kontraseptifler
Çevresel faktörler Doğum yeri Diyet Alkol

### MEME KANSERİNİN DOĞAL DAVRANIŞI

Meme kanserinin en önemli iki özelliği, farklı hastalarda davranışın değişken olması ve diğer bazı kanserlere göre çoğalmasının daha yavaş olmasıdır. Metastatik meme kanserli hastaların ortalama yaşam süreleri iki yıl kadardır (4). Metastatik kanserli bazı hastalar ise 10-20 yıl gibi uzun süre yaşabilmektedirler. Meme kanserinin ikilenme zamanı yaklaşık olarak 100 gündür. Palpabl tümörün minimum çapı; memenin yoğunluğu ve hacmi ile ilişkili olmakla birlikte genellikle 1 cm

civarındadır. Bu çaptaki bir tümör yaklaşık olarak 1-10 milyon hücre içermektedir ve bu da tek bir hücrenin 30-32 ikilenme zamanına denk gelmektedir.

### BULGU VE SEMPTOMLAR

Meme kanserinin en sık bulgusu, memede ağrısız kitle saptanmasıdır. Akıntı varsa değerlendirilmelidir. Laktasyonda olmayan memede spontan, tek taraflı meme başından seröz akıntı olması kronik sistik mastopati veya intraduktal papilloma, daha az olasılıkla da kansere bağlı olabilir. Meme başından kanlı akıntı gelmesi de bir diğer önemli bir yakınmadır. Fakat, bu hastaların çoğunda da altta benign bir hastalık yatmaktadır. Meme başındaki iyileşmeyen lezyonlar, eroziv lezyonlar iyice değerlendirilmeli ve gerekirse biyopsi alınarak Paget hastalığı dışlanmalıdır. Meme başında çekinti olması, memede asimetri olması, meme konturlarının düzensizleşmesi, meme derisinde kalınlaşma ve renk değişikliği, aksiller lenfadenopati saptanması diğer bulgulardır.

### TANI VE TARAMA

Meme kanserinin erken tanısında en iyi yaklaşım, kişinin kendisini aylık olarak muayene etmesi, düzenli olarak hekim muayenesi ve mammografi kontrolü yapılmasıdır. Böylelikle kür şansı daha yüksek olan küçük tümörlerin yakalanma şansı artmaktadır (5). Tablo II' de American Cancer Society' nin (ACS) meme kanseri tarama önerisi gösterilmektedir.

**Tablo II.** Meme kanseri taraması için ACS' nin önerisi

Yaş	Muayene	Sıklık
20-39	Kendi kendini muayene	Ayda bir
	Klinik muayene	3 yılda bir
≥40	Kendi kendini muayene	Ayda bir
	Klinik muayene	Yılda bir
	Mammografi	Yılda bir

Mammografinin daha yaygın kullanılması ile beraber, 2 cm' den küçük tümörlerin veya noninvaziv evredeki tümörlerin sayısında belirgin artış sağlanmıştır (6). Kendi kendini muayenenin avantajı ucuz olmasıdır. Bu yöntem, mammografinin yerini alamaz ve küçük tümörlerin saptanması zordur. Ultrasonografi, tarama yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Diğer yöntemlerle saptanan meme kitlelerinin kistik olup olmadığının ayırımında yararlıdır. Termografi, bazı tümörlerde kanlanma artışına bağlı ısı artışının gösterilmesi esasına dayanmaktadır. Mammografinin yerine kullanılmamaktadır. Bilgisayarlı tomografi (BT) yöntemi, mamografiden üstün değildir; daha pahalıdır ve daha çok radyasyona maruz kalınmaktadır. MRG yöntemi, mammografiden üstün değildir; radyasyondan sakınılmakta, fakat oldukça pahalı bir yöntemdir. MRG' nin, invaziv olmayan tümörlerin saptanmasında üstün olduğunu düşündüren bulgular vardır.

Mammografideki teknik gelişmelere rağmen, meme kanserlerinin yaklaşık olarak % 15' i görüntülenememektedir. Bu nedenle, hekimin muayenede saptadığı kitle şüpheliyse, mammografi negatif olsa dahi biyopsi düşünülmelidir. Muayene veya mammografi ile saptanamayan tümörlerin oranı yaklaşık olarak % 3.7' dir (7). Mammografi ile tarama yapılmasının meme kanserinden ölümleri % 30 civarında azalttığı ileri sürülmektedir (8, 9). Mammografinin en yararlı olduğu yaş grubunun 50-69 yaşlar arası olduğu gösterilmiştir (7, 8). Yeni yayınlanan bir meta analizde, 40-

49 yaş grubu kadınların da mammografiden yarar gördükleri gösterilmiştir. ACS, mammografinin 40 yaşından sonra tarama amacı ile kullanılmasını önermektedir (10).

**Fizik muayene:** Meme, servikal, supraklavikular, infraklavikular ve aksiller lenf bezlerinin muayenesini kapsamaktadır. Ayrıca, metastatik olduğu düşünülen hastalarda diğer organların muayenesi de dikkatli bir şekilde yapılmalıdır.

#### **Memede bulunan kistik kitlenin değerlendirilmesi:**

\*İnce iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB): Kistik lezyonlar, ince iğne ile aspire edilirler. Benign lezyonlar çoğunlukla tam olarak rezolüsyona uğrarlar. Benign lezyonların içeriği genellikle kanlı değildir.

\*\* Ultrasonografi: Memedeki kitlenin solid veya kistik olup olmadığının anlaşılması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca kistik kitlenin basit veya komplike olup olmadığı da değerlendirilmektedir.

\*\*\*Biyopsi: Kist içeriği kan içeriyorsa, aspirasyon sonrası tam olarak rezorbe olmuyorsa veya tekrarlayan aspirasyonlara rağmen nüks ediyorsa biyopsi yapılmalıdır. Kistik meme kanseri, tüm meme kanserlerinin % 1' inden az görülmesi nedeni ile, böyle lezyonlarda sitoloji yapılması rutin olarak önerilmemektedir. Fakat, intraluminal solid kitle içeren lezyonların biyopsi ile değerlendirilmesi gereklidir.

#### **Memede bulunan solid kitlenin değerlendirilmesi:**

Memede bulunan solid kitlenin değerlendirilmesi çok önemlidir. Çeşitli yöntemler kullanılmaktadır:

\*Mammografi: Kitlenin radyolojik özelliklerinin, ipsilateral ve kontrateral memenin yapısının değerlendirilmesinde çok yardımcıdır.

\*\*İİAB: Sitolojik değerlendirme için örnek alınmasının en kolay ve en ucuz yoludur. Yanlış pozitiflik oranı % 0 - 2.5, yanlış negatiflik oranı % 3 - 27' dir.

\*\*\*Biyopsi: Kor biyopsi, İİAB' nden daha fazla materyalin alınıp incelenmesini sağlamaktadır. Eksizyonel biyopsi, memedeki kitlenin tamamen çıkarılarak tanının daha kesin bir şekilde konulmasını sağlamaktadır. Eğer kitle çok büyük ise, insizyonel biyopsi olarak isimlendirilen ve kitlenin bir kısmının alınarak değerlendirilmesi yöntemi kullanılabilir.

### **Palpabl olmayan mammografik anormalliklerin değerlendirilmesi:**

\*Eksizyonel biyopsi: Daha önceden en sık uygulanan tanısal yöntemdir. Bu işlem, lezyonların cerrahi olarak çıkarılmasıdır. Günümüzde daha az kullanılmaktadır.

\*\*Ultrason eşliğinde ve stereotaktik kor biyopsi: Palpabl olmayan kitlelerin perkütanöz yolla uygulanan ve günümüzde en sık kullanılan yöntemdir.

### **Metastatik hastalık taraması:**

Memedeki tümörün ve bölgesel lenf nodlarının cerrahi olarak tedavisinden önce, sistemik yayılım olup olmadığı değerlendirilmelidir. Meme kanserinin en sık yayıldığı bölgeler; akciğer, plevra, kemik ve karaciğerdir. Erken evre meme kanserlerinde, kemik sintigrafisinin değeri azdır ve yanlış pozitiflik sık görülür (11). Klinik olarak evre III veya IV olanlar veya lenf nodu metastazı düşünölen evre II tümörlerde kemik sintigrafisi çekilmelidir.

Meme kanserli hastalardaki rutin tetkikler; akciğer grafisi, batin ultrasonografisi, hemogram ve karaciğer fonksiyon testleridir. Gereken hastalarda BT veya diğer ileri tetkikler yapılabilir.

### **EVRELEME**

Meme kanseri hastalarının tedavisinin ve prognozunun belirlenmesinde evrelemenin yapılması şarttır. Evrelemede en çok kullanılan sistem American Joint Committee on Cancer Staging (AJCC) TNM klasifikasyonudur. Tablo III' de TNM klasifikasyonu, tablo IV' de de meme kanserinin evrelemesi gösterilmektedir.

**Tablo III. Meme kanserinin TNM klasifikasyonu**

<b>Primer tümör T</b>	
Tx:	Primer tümör değerlendirilemeyebilir
T0:	Primer tümörün bulguları yok
Tis:	İn situ kanser: intraduktal karsinom, in situ lobuler karsinom veya Paget hastalığı
T1:	Tümör çapı 2 cm veya daha küçük çapta T1a: Tümör çapı $\leq 0.5$ cm T1b: $0.5$ cm < tümör çapı $\leq 1.0$ cm T1c: $1.0$ cm < tümör çapı $\leq 2.0$ cm
T2:	$2.0$ cm < tümör çapı $\leq 5.0$ cm
T3:	Tümör çapı $> 5$ cm
T4:	Tümörün çapı ne olursa olsun torax duvarına veya deriye doğrudan ulaşmış T4a: Torax duvarına ulaşmış T4b: Ödem, meme derisinde ülserasyon, aynı memede satellit deri nodülleri T4c: T4a ve T4b' nin herikisi T4d: İnflamatuvar meme kanseri
<b>Bölgesel lenf nodu tutulumu</b>	
Nx:	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemeyebilir (örn: önceden çıkarılmış )
N0:	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1:	Aynı taraftaki bir veya daha fazla aksiller mobil lenf bezinde metastaz
N2:	Aynı taraf aksiller bir veya daha fazla lenf nodunda metastaz; ama lenf nodları fikse veya çevre dokulara yapışık
N3:	Tümörle aynı taraftaki internal mammary lenf noduna metastaz
<b>Uzak metastaz</b>	
Mx:	Uzak metastaz değerlendirilemeyebilir
M0:	Uzak metastaz yok
M1:	Uzak metastaz var ( aynı taraf supraklavikular lenf nodu metastazı da bu gruba girmektedir )

**Tablo IV. Meme kanserinin evrelemesi**

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre II B	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Evre III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre III B	T4	Herhangi N	M0
	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

### PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Prognostik faktör; adjuvant sistemik tedavinin uygulanmadığı hastalardaki, hastalısız sağkalım veya tüm sağkalım ile ilişkili klinik veya biyolojik değerlendirmedir. Prognostik faktörler, hangi hastaların adjuvant tedavi uygulanması gerektiğini belirlemede çok yararlıdır. Ayrıca, standart tedavilere iyi yanıt alınamayacak hastaların belirlenerek daha agresif araştırma amaçlı tedaviler için değerlendirilmesinde de kullanılabilir.

Prognostik faktörler içinde en önemlisi ve en çok kullanılanı, tutulan aksiller lenf nodu sayısı ile bu lenf nodlarının histolojik değerlendirilmesidir. Aksiller lenf nodları, meme lenfatiklerinin boşaldığı en önemli bölgedir. Aksiller lenf nodunun tutulumu ile tümör çapı arasında ilişki vardır. Yapılan büyük bir çalışmada, bu ilişki kesin olarak gösterilmiş ve çok küçük kanserlerde bile aksiller lenf nodu tutulma oranının % 20 olduğu saptanmıştır (12). Aksiller diseksiyonun yeterli olarak değerlendirilebilmesi için en az on adet lenf nodu içermelidir (13). Yapılan klinik

çalışmalarda, hastalar genellikle nod negatif, 1 - 3 arası nod pozitif ve  $\geq 4$  nod pozitif olmak üzere sınıflandırılmıştır. Tutulan lenf nodu sayısı arttıkça, sağkalım oranı azalmakta ve nüks oranı artmaktadır (14). Meme kanserli hastalarda, aksiller diseksiyon yerine kullanılabilecek daha duyarlı bir gösterge bulunamamıştır.

Diğer önemli prognostik faktörlerden birisi de tümörün büyüklüğüdür. Bağımsız prognostik faktördür. Tümörün büyüklüğü, lenf nodu tutulumu sayısı ile doğru orantılıdır (12). Tümör çapı ile metastaz gelişmesi riski arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. Tümör çapı arttıkça, metastaz gelişme zamanının kısaltıldığı gözlenmiştir. Meme kanserinin çapı 1 - 2,5 cm olan hastalarda, metastazın ortalama görülme süresi küratif tedavi sonrası 42 ay iken, 8.5 cm veya daha büyük olanlarda ise 4 ay gibi oldukça kısa saptanmıştır (15). Lateral yerleşim gösteren tümörler, medyal yerleşimli tümörlere göre biraz daha iyi prognozludur. Medyan lezyonların, internal mammary lenf nodlarına yayılım yapma eğilimine bağlı olduğu düşünölmektedir. Bu lezyonlarda, aksiller lenf nodu negatif olabilir. Tümör çapı, özellikle nod negatif hastalarda prognozun saptanmasında önemlidir. İnvaziv duktal veya invaziv loböler karsinomlu nod negatif hastalar arasında 1 cm veya daha az çapta tümörü olanlarla diğer invaziv kanserlerin alt gruplarındaki ( müsinöz, papiller, tubuler, medüller veya adenokistik ) nod negatif hastalarda 3 cm veya daha küçük çapı olanlarda prognoz çok iyidir. 767 hastayı kapsayan bir çalışmada, hastaların % 29' unun bu kategoriye girdiği ve bunların da % 87' sinin 20 yıllık hastalısız sağkalım gösterdiği saptanmıştır (16). Nod negatif, ER negatif olan ve tedavi almamış hastalarda nüks oranının % 25 gibi yüksek oranlarda olduğu gösterilmiştir (17).

Tümörlerdeki östrojen ve progesteron reseptörlerinin durumu, prognozu etkileyen diğer önemli faktörlerdir. İlk olarak 1977 yılında Knight ve arkadaşları, östrojen reseptörünün (ER) erken nüks açısından bağımsız prognostik öneme sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan büyük çalışmalarda; ER pozitif hastalarda, ER negatif hastalara göre 5 yıllık hastalısız sağkalım avantajının % 10 olduğu gösterilmiştir (18). Progesteron reseptörünün (PR) östrojene bağımlı olarak oluşması nedeni ile, pozitif olan hastalarda hormonoterapiye yanıt alınabilir. PR pozitif olan, nüks meme kanserli hastalarda hormonoterapiye oldukça iyi yanıt alınabilmektedir. ER, adjuvant veya metastatik hastalık tedavisinde hormonal tedaviye yanıtın en önemli belirleyicisidir.

Kullanılan diğer patolojik prognostik faktörler; kötü farklılaşma (histolojik ve nükleer) ile lenfatik ve vasküler invazyondur. Tümör gradı, meme kanserinde prognostik öneme sahiptir. Fakat, kişisel yorum farklılıklarının olması bu yöntemin değerini azaltmaktadır.

Meme kanserli hastalarda, yaş ve menapozun prognoza etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte, bu konuda yapılan iki büyük çalışmada, 35 yaşın altındaki hastaların daha kötü prognoza sahip olduğu saptanmıştır (19, 20). Bu iki çalışmada da genç yaşın, ölüm ve nüks bakımından prognostik anlamı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar, gençlerde meme kanserinin davranışının daha farklı olduğu ve daha saldırgan seyrettiğini düşündürmektedir.

İlk olarak östrojen uyarımı sonrası insan meme kanseri hücre dizisinde bulunan pS2 geni, 6450 kd molekül ağırlığında bir proteindir. Geni 21q kromozomundadır. Çalışmalarda, ER ve PR ile pS2 arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır. Yüksek pS2 oranlarına sahip hastalarda, hastalısız sağkalım ve genel sağkalım oranları daha iyi bulunmuştur (21). pS2 değeri düşük olan hastalarda nüks ve ölüm oranlarında artış olduğu bildirilmiştir (22). Başka bir çalışmada da, pS2' nin hem hastalısız hem de genel sağkalım için prognostik faktör olduğu ileri sürülmüştür (23). Bazı araştırmacılar, pS2 ekspresyonunun meme kanserinin nüks veya metastaz yeteneği ile ilişkili olmadığını, ama bu özelliklerin agresifliği ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedirler. pS2' nin ER ve PR ile birlikte değerlendirilmesi, hormonal tedaviye yanıt açısından iyi bir belirleyici değeri olabilir.

DNA ploidi ölçümleri, hücredeki ortalama DNA içeriğini verir. Diploidi normal, aneuploidi anormal DNA miktarını göstermektedir. Aneuploidinin varlığı, kötü diferansiyasyon ve tedaviye kötü yanıtı göstermektedir. Fakat, yöntem standardize olmadığı için rutin olarak kullanımı önerilmemektedir.

Meme kanserinin proliferasyon yeteneği önemlidir. Bu yeteneğin gösterilmesinde, Mitotik İndeks (Mİ), Timidin İşaretleme İndeksi, S- fazı fraksiyonu, ki-67 ve Prolifere Hücre Nükleus Antijeni (PCNA) sık olarak kullanılmaktadır. Çalışmalarda yüksek Mİ oranına sahip hastalarda nüks ve ölüm risklerinde artış olduğu bildirilmiştir (24, 25). Mİ, tümör büyüklüğü ve lenf nodu durumunun birlikte değerlendirildiği Nottingham Prognostik İndeksinde, bu birlikteliğin prognostik değerinin tek başına olmalarından daha iyi olduğu gösterilmiştir. Timidin İşaretleme İndeksi (Tİİ)' nin temel alındığı çalışmalarda; hastalığın yaygınlığı, lenf nodu tutulumu ve tümör büyüklüğünden bağımsız, steroid reseptör düzeyleri ile ters

orantılı olarak bulunmuştur (26, 27). S fazı fraksiyonu (SPF) ile yapılan çalışmalarda; yüksek SPF oranlarının, kötü diferansiyasyonla ve tümör kitlesinde artış ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. SPF' nin, güvenilir bağımsız prognostik faktör olabileceği ileri sürülmüştür. 43 çalışmanın gözden geçirildiği bir toplantıda, yüksek SPF oranlarına sahip nod negatif veya pozitif hastalarda, nüks oranında ve ölüm oranında artış görüldüğü bildirilmiştir (28). Kemoterapiye yanıtın değerlendirildiği çalışmalarda, SPF ile yanıt arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ki-67 ile boyanma; tümör büyüklüğü, histolojik derece, vasküler invazyon ve aksiller lenf nodu tutulumu ile doğru, steroid reseptör durumu ile ters orantılı bulunmuştur (29, 30). Ki-67' nin prognostik önemi, bir çok çalışmada tek değişkenli analizlerde gösterilmiştir. Çalışmalarda genellikle hasta sayısı az, hasta grupları heterojendir. Ki-67' nin prognostik öneminin gösterilebilmesi için, çok değişkenli analizlere gereksinim vardır. Prolifere Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)' nin, diğer prognostik faktörlerle ilişkisi zayıftır ve özellikle nod negatif hastalarda klinik seyir hakkında bilgi vermemektedir.

Günümüzde ön plana çıkan diğer belirleyiciler; büyüme faktörleri ve onların reseptörleri ( özellikle epidermal büyüme faktörü ve HER2/neu ) ile RB, p53 gibi tümör süpresör genlerdir. Cathepsin-D ve stromolysin-3 moleküllerinin, kanser hücrelerinin stromayı invaze etme yeteneğini artırdığı bildirilmiştir. Fakat klinikte kullanılmamaktadır. Endotelyal hücreleri göstermek için Faktör VIII, CD-34, CD-3' e karşı antikorlar kullanılarak, mikrovasküler yapıların yoğunluğu ölçülebilmekte ve angiogenesis değerlendirilebilmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda, yüksek mikrovasküler yoğunluğun kötü histolojik derece ve metastazla birlikte olma riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Fakat, bu konuda daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

## MEME KANSERİNİN SİSTEMİK TEDAVİSİ

### **a) Metastatik olmayan meme kanserinin sistemik tedavisi**

Günümüzde erken evre meme kanserlerinin tedavisinde, geçmişe göre kemoterapinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Randomize klinik çalışmalarda, elli yaş altındaki kadınlarda adjuvant kemoterapi kullanılması ile nüks oranının % 35 ve mortalite oranının % 27 azaltıldığı gösterilmiştir (31). 50-69 yaş arasındaki kadınlarda da yararlı olduğu, nüksün % 20 ve ölüm oranının % 11 azaldığı gösterilmiştir. 70 yaş üzerindeki kadınlarda, kemoterapinin etkinliği geniş olarak

araştırılmamıştır. Bu nedenle bu hastaların tedavisi, hastanın performansına, ek hastalıklara göre kişiselleştirilmelidir.

Lenf nodu metastazı olan hastalarda; antrasiklin içeren şemalar, siklofosfamid, methotreksat ve 5-fluorourasil (CMF) kombinasyonundan daha üstün bulunmuştur. EBCTCG tarafından 1998' de yapılan değerlendirmede; antrasiklin içeren şemalarla CMF arasındaki nüks ve ölüm oranı farklılığın küçük olduğu saptanmıştır (5 yıllık takipte antrasiklin içeren şemalar nüksü % 3.2 ve ölüm oranını % 2.7 azalttığı saptanmıştır (31). Öte yandan, premenapozal nod pozitif hastalarda epirubisin içeren şemaların (CEF), CMF' den daha üstün olduğu gösterilmiştir (32).

Lenf nodu metastazı olan premenapozal kadınlarda, doksorubisin/siklofosfamid (AC) ± paklitaksel kolları ile yapılan çalışmanın ilk sonuçlarında, tedaviye paklitaksel eklenmesinin nüks oranını % 22, ölüm oranını % 26 azalttığı gösterilmiştir. Fakat bu çalışmada takip süresinin 18 ay gibi kısa olması en önemli dezavantajdır (33). Başka bir çalışmada ise, 5-fluorourasil, siklofosfamid, doksorubisin (FAC) kolunda 4 yıllık hastaliksız sağkalım % 81, FAC' ı takiben paklitaksel uygulanan kolda ise bu oran % 85 bulunmuştur (fark istatistiksel olarak anlamlı değil, p=0.2) (34). NSABP P-28 çalışmasında, lenf nodu metastazı olan hastalarda dört kür AC ± paklitaksel kolları karşılaştırılmaktadır ve sonuçları henüz açıklanmamıştır.

c-erbB2 durumunun, adjuvant kemoterapi sonuçlarına etkisi henüz netleşmemiştir. Retrospektif analizler, doksorubisin içeren şemaların c-erbB2 pozitif hastalarda daha etkili olduğunu düşündürmektedir (35). Taksanların c-erbB2 ile etkileşimi bilinmemektedir. Adjuvant trastuzumab (Herceptin)' in, kemoterapi ile kombine veya ardışık kullanılması ile ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir.

Evre III kadınlarda, cerrahi tedavi ve kemoterapinin zamanı tartışmalıdır. Bazı merkezler, neoadjuvant kemoterapiyi sadece inoperabl hastalara sınırlarken, bazı merkezler de bütün evre III hastalara neoadjuvant kemoterapi uygulamaktadır. Neoadjuvant şemalar genellikle antrasiklin içermektedir. Fakat, bazı neoadjuvant şemalarda taksanlar da kullanılmaktadır. Takip süresi nispeten kısa (ortalama 23 ay) olan tek merkezli bir çalışmada; neoadjuvant olarak kullanılan tek ajan paklitaksel' in, FAC rejimine eşit etkinlikte olduğu gösterilmiştir (36). Fakat bu konuda daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

EBCTCG tarafından yapılan analizlerde, estrogen reseptörü (ER) pozitif veya bilinmeyen erken evre meme kanserli hastalarda tamoksifen kullanılmasının hastalık

nüksünü % 47 ve ölüm oranını % 26 azalttığı gösterilmiştir (37). 10 yıl gibi uzun süreli yapılan takiplerde, elde edilen bu yararın; hastanın yaşı, menapoz durumu veya kemoterapi ile değişmediği gözlenmiştir. ER-pozitif ve ER-negatif kadınlardaki mortalite oranlarındaki azalma benzer olsa da; ER-pozitif kadınlarda bu yarar daha belirgindir. EBCTG çalışmasının bu sonuçları, ER-zayıf pozitif olan kadınlarda da, tamoksifen kullanılmasının yararlı olacağını düşündürmektedir.

NSABP-P1 çalışmasında; tamoksifen kullanan meme kanseri için yüksek risk taşıyan kadınlarda meme kanseri görülmesinin belirgin derecede azaltıldığı gösterilmiştir (38). İnvaziv meme kanseri insidansı % 49, invaziv olmayan meme kanseri insidansı % 50 azaltılmıştır. Tamoksifen kullanılmasının, ER-pozitif tümörlerde azalmaya neden olurken, ER-negatif tümörleri etkilemediği gözlenmiştir. Günümüzdeki en önemli sorunlardan birisi, önceden ER-negatif meme kanseri olan hastalarda tamoksifen kullanılmasının yararlı olup olmadığıdır. Selektif ER modülatörlerin, adjuvant ve korunmadaki rolleri ile ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir. LH-RH agonistlerinin tek başına veya kemoterapi ve/veya tamoksifen ile kombine kullanılmaları araştırılmaktadır. 50 yaşın altında overleri aktif, lenf nodu metastazı olan veya olmayan, ER-pozitif invaziv meme kanseri olan kadınlarda; cerrahi veya radyoterapi ile ovaryan ablasyon yapılması, hastalığın nüks ve ölüm riskini polikemoterapiye eş oranda azaltabilmektedir (39).

EBCTG analizleri ve NSABP-P1 çalışmasının sonuçlarına göre; ER-pozitif hastalığı olan lobular karsinoma in situ (LKİS) ve duktal karsinoma in situ (DKİS) hastalara, 5 yıl süreyle tamoksifen verilmelidir. NSABP-P24 çalışmasında; DKİS' lu hastalara, meme koruyucu cerrahi sonrası tamoksifen veya placebo verilmiştir. Tamoksifen kolunda, placebo koluna göre nüks oranlarında belirgin azalma (sırasıyla % 8.2 ve % 13.4) saptanmıştır (40). Fakat bu çalışmada, hasta seçilmesinde ER durumu göz önüne alınmamış ve bu konuda bilgi verilmemiştir.

Aşağıda tablo V' te lenf nodu metastazı olan hastaya, tablo VI' da lenf nodu metastazı olmayan hastaya yaklaşım özetlenmiştir.

**Tablo V. Aksiller lenf nodu metastazı olan hastalarda sistemik tedavi**

Menapoz ER	Tümör çapı	Tedavi	Toksisite	Genel
Premen. Negatif	Herhangi bir T	Kombinasyon KT (CMF, FAC, CEF, AC, AC → T)	Şemaya bağlı; çoğunlukla bulantı, kusma, amenore, alopesi, nöropati. Nötropeni ve mukozit < % 25 görülür. Doksorubisin, % 1-2 KKY ile ilişkili. Alkilleiyici ajan ve antrasiklinler lösemik sendrom ile ilişkili (< %2).	Tedavi 4-8 siklustur. AC' ye paclitakselin eklenmesi sağkalımı iyileştirebilir. > 10 lenf nodu metastazı olanlar yüksek doz şemalar için düşünülebilir.
Premen. Pozitif	Herhangi bir T	Kombinasyon KT (CMF, FAC, CEF, AC, AC → T) + Tx	Yukarıdaki yanetkilere ek olarak tamoksifene bağlı sıcak basması, vaginal akıntı, tromboflebit, katarakt, endometrium kanseri gelişimi	Tamoksifen eklenmesi sağkalımı iyileştirmektedir.
Postmen. Negatif	Herhangi bir T	Kombinasyon KT (CMF, FAC, CEF, AC, AC → T) ± Tx	Diğerlerinin aynı	EBCTCG, 50-69 yaş arası hastalarda, nükste % 20, ölümdede % 11 azalma olduğunu gösterdi. > 70 yaş olan hastalarda veriler yetersiz.
Postmen. Pozitif	Herhangi bir T	Tamoksifen 20 mg/gün ± kombinasyon KT (CMF, AC, FAC)	Postmenapozal kadınlarda tamoksifene bağlı uterus kanseri riski azdır.	KT + tamoksifen kombinasyonu, tek başına Tamoksifenden daha etkili.

**Tablo VI. Aksiller lenf nodu metastazı olmayan hastalarda sistemik tedavi**

Menapoz ER	Tümör çapı	Tedavi	Toksisite	Genel
Pre veya postmen. Pozitif veya negatif	< 10 mm	ER-pozitif ise tamoksifen	Tamoksifene bağlı tablo V' teki yan etkiler görülür.	Sadece lokal tedavi: 5 yıllık sağ kalım > % 90. Karşı memede kanser riski her yıl için % 1' dir. Tümör çapı: 6-10 mm ve nükleer grad, S fazı, vasküler/lenfatik invazyon, c-erbB2 pozitifliği gibi kötü prognostik faktörler varsa KT düşünülebilir.
Pre veya postmen. Negatif	≥ 10 mm, < 20 mm	Kombinasyon KT (CMF, FAC, AC)	Tablo 5' teki KT yan etkilerine benzer	Kötü prognostik faktörler varlığında KT düşünülmelidir. Tübüler, kolloid, medüller ve adenokistik tiplere KT uygulanması gerekli değildir.
Pre veya postmen. Negatif	≥ 20 mm	Kombinasyon KT (CMF, FAC, AC)	Tablo 5' teki KT yan etkilerine Benzer	Risk azalması, lenf nodu metastazı olan hastalara benzerdir.
Pre veya postmen. Pozitif	≥ 10 mm	Tamoksifen 20 mg/gün ± kombinasyon KT (CMF,FAC,AC)	Tamoksifen ve KT yan etkileri tablo V' e benzerdir.	Yüksek gradli veya T2 tümörü (>3 cm) olan premenapozal, ER-pozitif kadınlar kombinasyon KT ile tedavi edilmelidir (1998 St. Gallen konferansı ve 2000 NCCN önerisidir). Kötü prognostik faktörler, hastanın performansı, ER durumu KT ekleme kararını vermede etkilidir.

### **b) İleri evre meme kanserinin sistemik tedavisi**

Günümüzde meme kanserinin tedavisinde, geçmişe göre belirgin değişiklikler vardır. Son yıllarda popüler olan yüksek doz kemoterapi çalışmalarının sonuçlarının beklendiği gibi çıkmaması nedeni ile, ileri evre meme kanserinin tedavisinde yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmıştır (41). Anti-HER antikoru trastuzumab (Herceptin), bu yeni moleküler yaklaşımların en önemli örneğidir. Metastatik meme kanserli ilk hat hastaların tedavisinde, kemoterapi ± trastuzumab kullanılması ile yapılan randomize çalışmalarda, kemoterapiye trastuzumab eklenmesinin progresyona kadar geçen süreyi, yanıt oranlarını ve sağkalımı iyileştirdiği saptanmıştır (42). Günümüzde, kemoterapi ajanlarıyla beraber tümör hücre fonksiyonları üzerine etkili moleküler olarak hedeflenmiş yeni tedavi modalitelerinin kombine kullanılması ve böylece tedavinin başarısının artırılması amaçlanmaktadır.

İleri evre meme kanseri yaklaşık olarak 41.000 ölüme neden olmaktadır. İleri evre meme kanserli hastaların tedavisinin planlanmasındaki ilk basamak ER, progesteron reseptörü (PR) ve c-erbB2 özelliklerinin saptanmasıdır. Böylelikle tümörün biyolojik özellikleri hakkında genel bir fikir sahibi olunabilir.

### İleri evre meme kanserinin tedavisinde yüksek doz tedavi

1990' lı yılların ortasında, otolog kemik iliği transplantasyonunun en sık uygulandığı hastalıklardan biri de meme kanseridir. Tek merkezli çalışmalara umut verici sonuçlar alınsa da, henüz randomize çalışmalarda bu başarı gösterilememiştir. Çok merkezli, randomize PBT-1 çalışmasında, metastatik meme kanserlilere ilk hat olarak verilen CMF veya FAC rejimine yanıt alınan hastalar; CMF veya yüksek doz tedavi (Siklofosamid, tiotepa, carboplatin) koluna ayrılmıştır (41). 60 yaşın altında toplam 184 hastanın sonuçları tablo VII' de gösterilmektedir. Ölümcül toksisite, ortalama sağkalım, progresyonsuz sağkalım ve progresyona kadar geçen süre açısından her iki grup arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır. Yapılan çalışmaların derlendiği araştırmalarda, yüksek doz tedaviye iyi yanıt açısından kullanılabilecek herhangi bir klinik faktör veya tümör özelliği bulunamamıştır.

Çalışmalarda elde edilen bu sonuçlar, metastatik meme kanserinin tedavisinde çok önemli değişikliklere neden olmuştur. Önceleri yoğun olarak kullanılan yüksek doz ve OKİT şemaları giderek daha az uygulanır hale gelmiştir. Metastatik meme

kanserinin tedavisinde, hormonal olmayan sistemik tedavide genellikle konvansiyonel doz kemoterapi şemaları uygulanmaktadır.

**Tablo VII.** İleri evre meme kanserinde standart şemalarla yüksek doz şemaların etkinliği

Tedavi	Progresyon süresi (ay)	3 yıllık PFS (%)	3 yıllık OS (%)
Standart CMF	9.0	12	38
Yüksek doz KT	9.6	6	32

#### İlk hat kemoterapi seçilmesi

Hormonal tedavilere duyarsız veya hormonal tedavinin başarısız olduğu metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde kemoterapi kullanılması ile; hastalığın kontrolü, bazı semptomların kontrol altına alınması ve yaşam kalitesinin artırılması sağlanabilmektedir. İleri meme kanserli hastalarda kemoterapiye tam yanıt alınmasının en iyi prognostik faktör olduğu düşünülmektedir (43). Bir kemoterapi şemasının diğerinden daha üstün olduğu veya çoklu ajan içeren şemaların ardışık tek ajanlı tedavilerden daha üstün olduğunu gösteren önemli sayılabilecek bulgu yoktur. CALGB tarafından yapılan bir çalışmada araştırma amaçlı kullanılan faz II ajanlarla, FAC şeması karşılaştırılmış ve her iki kol arasında sağkalım farklılığı gözlenmemiştir (44). Araştırma amaçlı kullanılan bu ajanların hiçbirisi, meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmamıştır.

Antrasiklin dirençli metastatik meme kanserinin tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, taksanların önemli etkinlik gösterdiği saptanmıştır (45). Tablo VIII' de, ileri evre meme kanserinin ilk hat tedavisinde kullanılan çeşitli ajanların yanıt oranları gösterilmektedir. Günümüzde, ilk hat tedavide tercih edilen ajanların, uzun süreli sağkalıma etkisinin ılımlı olduğu veya etkilemediği kabul edilmektedir. İlk hat tedavide başarısız olduğu zaman, çapraz direnç göstermeyen başka bir ajan kullanılabilir. Çok ajan içeren kombinasyon şemalarının, tek ajanlı şemalardan daha üstün olduğunu gösteren herhangi bir veri yoktur. Bu sonuçlar ışığında, önceki tedavi şeması, tedavinin yan etkileri, tedavinin yanıt oranları, tedavi süresince hastanın yaşam kalitesi gibi parametreler gözönünde bulundurularak uygun tedavi seçilmelidir.

Günümüzde kabul gören iki eğilim vardır. Birincisi, hastaların adjuvant tedavilerinde antrasiklin ve taksanların kullanılmasıdır. İkincisi ise, c-erbB2 reseptörü pozitif olan metastatik meme kanserli hastaların % 30-40' ının tedavisinde trastuzumab kullanılması etkin olduğudur. c-erbB2 aşırı ekspresse eden metastatik meme kanserli hastaların ilk hat tedavisinde, kemoterapi ajanları ile trastuzumab kombinasyonunun kullanılması önerilmektedir.

**Tablo VIII.** Metastatik meme kanserli hastaların ilk hat tedavisinde taksanlarla diğer şemaların karşılaştırıldığı randomize çalışmaların sonuçları

Yazar	Hasta sayısı	Tedavi	Yanıt (%)	Genel
Sledge ve ark	739	Doksorubisin Paclitaksel Doksorubisin/paclitaksel	34 33 46	Kombinasyon ile yüksek yanıt oranı elde edilirken, progresyona kadar geçen süre ve tüm sağkalımda farklılık yok
Paridaens ve ark	331	Doksorubisin Paclitaksel	41 25	Doksorubisin ile progresyona kadar geçen süre ve yanıt oranı daha yüksek, fakat tüm sağkalımda farklılık yok
Bishop ve ark	209	CMFP Paclitaksel	35 29	İstatistik olarak yanıt oranları ve progresyona kadar geçen süre eşit, paclitaksel ile sağkalımda iyileşme gözleniyor
Chan ve ark	376	Doksorubisin Docetaksel	33 48	Docetaksel ile yanıt oranları yüksek, fakat progresyona kadar süre ve sağkalımda farklılık yok

#### Trastuzumab: Tümör Biyolojisinin Hedeflenmesi

cerbB-2' nin aşırı ekspresse edilmesi, kötü prognoz göstergesidir. Kanser hücrelerinde cerbB-2' nin selektif olarak ekspresse edilmesi nedeniyle, kanser tedavisinde önemli bir hedef haline gelmiştir. Trastuzumab, cerbB-2 proteinine karşı geliştirilmiş humanize edilmiş fare antikoruudur. Kemoterapi ile beraber antikorun kullanıldığı metastatik meme kanserli hastalarda, uzun süreli sonuçlarda düzelme olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, daha önceden adjuvant antrasiklin almış olan hastalara paklitaksel ± trastuzumab, antrasiklin almamış hastalara ise doksorubisin/ siklofosfamid ± trastuzumab kombinasyonu verilmiştir (42). Kemoterapiye trastuzumab eklenmesinin; yanıt oranlarını, progresyona kadar geçen süreyi ve ortalama sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, cerbB-2

pozitif metastatik meme kanserli hastaların ilk hat tedavisinde trastuzumab' ın önemli seçeneklerden birisi olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, metastatik meme kanserli bütün hastalarda cerbB-2 ekspresyonu araştırılmalıdır.

Trastuzumab ile tedavinin süresi tam olarak bilinmemektedir. Bu sorunun yanıtının bulunabilmesi için randomize klinik çalışmalar gereklidir.

#### Hormonal tedavi:

Tamoksifen son yirmi yıldır, hormona duyarlı meme kanserinin tedavisinde standart olarak kullanılan ajandır (46). Tamoksifen over ablasyonu, megestrol asetat, toremifen, dietilstilbestrol gibi ajanlarla karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda, ER pozitif meme kanserinin tedavisinde tamoksifen' den daha etkili bir ajan saptanmamıştır.

Aromataz inhibitörleri, tamoksifen dirençli ER-pozitif postmenapozal meme kanserli hastaların tedavisinde etkili ajanlardır (47). Bu hastaların ikinci hat tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bunlardan anastrozole ve letrozole ilk hat tedavide onay almışlardır. Postmenapozal ileri evre meme kanserli hastaların tedavisinde tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinin karşılaştırıldığı bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, aromataz inhibitörlerinin hormona duyarlı meme kanserinin tedavisinde, tamoksifen kadar etkili olduğu, bazılarında da yanıt oranı ve progresyona kadar geçen sürenin daha iyi olduğu gösterilmiştir. Fakat, sağkalımın artırılması için tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinin hangi sırayla kullanılması gerektiği bilinmemektedir. Daha önceden aromataz inhibitörü kullanmış olan hastalarda tamoksifen kullanılması ile yanıt alınabilmektedir. Bunun tersi de geçerlidir. Özellikle adjuvant olarak tamoksifen kullanılmamış, metastatik ER ve/veya PR- pozitif metastatik meme kanserli hastaların çoğu; tamoksifen ve aromataz inhibitörleri ile uzun süreli tedavi olabilmektedir.

Metastatik premenapozal meme kanserli hastaların tedavisinde, gonadotropin-releasing hormon analogları (GnRH) ile yapılan over ablasyonu ve tamoksifen kombinasyonun, tek başına GnRH kullanılmasından biraz daha üstün olduğu gösterilmiştir (48). EORTC tarafından yapılan bir çalışmada, GnRH analogu buserelin, tamoksifen ve buserelin + tamoksifen kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Kombinasyon kolunda istatistik olarak daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir.

Günümüzde pür östrojen antagonistleri ve selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERMs) ile çalışmalar yapılmaktadır. İki büyük randomize çalışmada;

tamoksifen dirençli metastatik meme kanserinin ikinci hat tedavisinde pür antiöstrojen fulvestrant ile aromataz inhibitörü anastrozol karşılaştırılmıştır (49, 50). Bu çalışmada, anastrozol ve fulvestrant kombinasyonunun önemli bir avantaj sağladığı gösterilememiştir. Günümüzdeki pratik kullanımda; hormon reseptörü pozitif metastatik meme kanserli hastaların ilk hat tedavisinde tek ajan hormonal tedavi başlanmaktadır. İlk hat hormonoterapiye yanıt vermeyen hastaların durumuna göre ikinci veya üçüncü hat hormonoterapi uygulanmaktadır. Tablo IX' da hormonal tedavi yöntemleri gösterilmektedir.

**Tablo IX. Meme kanserinin hormonal tedavisi**

Over ablasyonu Cerrahi (oofektomi) Radyasyon
LHRH agonistleri
Antiöstrojenler
Aromataz inhibitörleri (nonselektif ve selektif)
Progestinler
Androjenler
Diğerleri: Tam antiöstrojenler LHRH antagonistleri, glukokortikoidler

**c) Meme kanserinin tedavisinde temel ajanlar: Antrasiklinler ve taksanlar**

**Antrasiklinler:**

Antrasiklinler, amino şekerine bağlanmış dört halkalı antrakinon molekülünden oluşmaktadır. 1960' lı yıllardan itibaren en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardır. Daunorubisin ve doksorubisin ilk antrasiklinlerden olup streptomis türünden elde edilmiştir. İdarubisin ve epirubisin gibi ikinci kuşak antrasiklinler sentetiktir.

Antrasiklinlerin sitotoksik etkilerini kısaca;

- 1- Antrakinon halkası, DNA' nın baz çiftlerinin arasına girerek DNA replikasyonunun ve RNA transkripsiyonunun bozulmasına neden olurlar.

- 2- Antrasiklinler, tek sarmallı veya çift sarmallı DNA kırıklarına neden olarak DNA tamirini bozarlar. Bu etkinin mekanizması; antrasiklinlerin baz çiftlerinin arasına girmesi veya topizomeraz II enzimi ile etkileşimine bağlı olabilir. Antrasiklinlerin sitotoksik etkileri bir çok yolla olmakla birlikte topoizomeraz II ile etkileşimi, sitotoksik etkilerinin en önemlilerindedir.
- 3- Serbest radikalleri oluşturarak, DNA kırıkları ve hücre membran hasarı gibi diğer hasarların oluşmasına neden olurlar. Serbest radikaller, hipoksik ortamlarda DNA'ya kovalant olarak bağlanan metabolitlere dönüşmektedirler.

İdarubisin haricindeki antrasiklinler, oral yolla kullanılamamaktadır. İdarubisin, daunorubisin' in lipofilitesi arttırılmış sentetik analogudur. Oral emilimi iyi olmamakla birlikte, aktif metaboliti olan idarubisinol' ün kan konsantrasyonu yüksek düzeylere ulaşabilmektedir. Oral olarak alınan idarubisin' in aktif metabolitinin kan düzeyleri, karaciğerden ilk geçiş metabolizmasının daha fazla olması nedeni ile intravenöz kullanımdan daha yüksektir.

Antrasiklinlerin düşük lipofilik özellikleri olması ve beyin endotel hücrelerinde p-glikoprotein ekspresyonunun olması nedeni ile kan-beyin bariyerini geçemezler (51). Fakat, idarubisin' in intravenöz kullanılmasıyla metaboliti olan idarubisinol' ün beyin omurilik sıvısında (BOS), plazma konsantrasyonunun % 1-13' ü düzeyinde olduğu saptanmıştır ve bu düzeylerin sitotoksik olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir (51). İdarubisin hariç antrasiklinlerin etkisi, plazma protein düzeyiyle anlamlı değişim göstermemektedir. Fakat hipalbuminemide, idarubisin ve idarubisinol' ün plazma düzeyleri ve sistemik etkinlikleri artmaktadır.

Doksorubisin, intravenöz yolla verildikten sonra vücutta yaygın olarak dağılır. Doksorubisin' in doz sınırlayıcı yan etkisi kemik iliği supresyonudur. Total alopesi çoğunlukla görülmektedir. İlimli düzeyde görülen diğer yan etkiler; bulantı, kusma ve stomatittir. İlaç, damar dışına kaçtığına şiddetli nekroza neden olabilir. Hiperpigmentasyon görülebilir. İdrar renginde, ilacın uygulanmasından sonra, ilacın atılmasına bağlı olarak kırmızılık olabilir, önemli bir yan etki değildir. Daha önceden radyoterapi uygulanmış bölgelerde, eritem ve nadiren deri ülserasyonları görülebilir (recall reaksiyonu).

Doksorubisin' in dikkat edilmesi gereken en önemli toksisitesi, doza bağımlı olarak görülen kardiyotoksisitedir. Doksorubisin' in kümülatif dozu 550 mg/m<sup>2</sup>, ye kadar kalp yetmezliği görülme riski % 1-4' tür.

Faz II çalışmalarda epirubisin, esorubisin ve menogaril gibi doksorubisin analogları yoğun olarak kullanılmıştır. Bu ajanlardan hiç birisi, doksorubisinden üstün bulunmamıştır ve hepsinin de kardiyotoksik etkileri bulunmaktadır. Kardiyotoksiste, antrasiklinlere bağlı olarak gelişen serbest oksijen radikallerine bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (52).

Doksorubisin; akut lenfoblastik lösemi, akut myeloblastik lösemi, Wilm's tümörü, nöroblastoma, yumuşak doku ve kemik sarkomu, meme kanseri, over kanseri, değişici hücreli mesane kanseri, tiroid kanseri, mide kanseri, Hodgkin' s hastalığı, malign lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

Antrasiklinlere karşı direnç: Antrasiklinler direkt olarak hücre membranlarının yapısını bozarak (muhtemelen direkt kardiolipine bağlanarak), DNA yapısına girerek, DNA topoizomeraz II' yi inhibe ederek ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak sitotoksik etki göstermektedir. Bu nedenle, bu ajanlara karşı direncin bir çok mekanizması vardır. Pgp, MRP, LRP, topoII' de değişiklik, glutatyon metabolizmasında rol oynayan enzimlerin düzeylerinde değişiklik olması antrasiklin direncinde rol oynamaktadır (53).

#### Taksanlar: Paklitaksel ve Dositaksel

Paklitaksel; antitümör aktiviteye sahip doğal üründür. *Taxus baccata*' dan yarı sentetik olarak elde edilmektedir. İlk olarak porsukağacı kabuğundan 1971' de elde edilmiş ve antikanser ve antilösemik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Paklitaksel, taksan bileşiğine oksetane halkasının eklenmesiyle oluşan bir moleküldür. Bu molekülün sentezlenmesi için yoğun çabalar harcanması nedeni ile yeni bir molekül geliştirmeye çalışılmıştır. Bu çabaların sonucunda da avrupa porsukağacı özütünden Dositaksel elde edilmiştir. Molekül ağırlığı 861.9' dur. Bu iki ilaç da, sitotoksik olmayan öncü moleküllerden geliştirilmiştir.

Etki mekanizması: Paklitaksel, tübülün depolimerizasyonunu azaltarak ve mikrotübüllerin toplanmasını artırarak etki gösterir (54). Normalde, mikrotübüllerin dağılmasını sağlayan durumlarda (düşük ısı, ortamdaki kalsiyum yüksekliği) bile mikrotübüllerin stabilize halde kalmasını sağlarlar. Dositaksel' in, mikrotübül depolarizasyon yapıcı etkisi, paklitaksel' den iki kat fazladır. Her iki ilaç arasındaki diğer farklılıklar; spesifik mikrotübül ilişkili proteinler tarafından düzenlenmelerinde

ve her iki ilaç tarafından uyarılan tübülün polimer ürünlerinin yapılarındaki farklılıkları kapsamaktadır.

Taksanlar, mitozda özgü mikrotübül sürecini bozarak, hücrelerin G2-M fazında durmasını sağlar. Mikrotübüller, mitozda gerekli olduğu gibi ayrıca, hücre membranından nukleusa sinyal iletiminde de rol oynamaktadır. Böylelikle, tümör hücrelerinin yanı sıra diğer normal hücrelerde de bazı işlevlerde bozulma ortaya çıkmaktadır. Şekil değişiklikleri, nörit gelişimi, lokomotor sistemin etkilenmesi ve sekresyonun bozulması gibi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Mikrotübül ve paklitaksel'in etkileşimi, geriye dönüşümlüdür.

Yapılan çalışmalarda, antikanser özelliği sağlayan temel etkinin, mikrotübül üzerine olduğu bulunmakla birlikte başka etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Bu etkileri şöyle özetleyebiliriz;

- 1- p53 bağımlı veya p53 bağımsız olarak apoptozisi uyararak hücre ölümünü tetiklemektedir. p53 bağımlı inhibisyonda etkisi yavaş başlar (3-5 gün) iken p53 bağımsız inhibisyonda etkisi hızlı başlar (55).
- 2- Raf-1' i ve Bcl-2' yi fosforile ederek apoptozisi uyarmaktadır (46)
- 3-Matriks metalloproteinazların inhibisyonuna bağlı antimetastatik aktivite göstermektedir (57).
- 4- Angiogenezi inhibe etmektedir (58).
- 5-İmmunolojik yanıtın değiştirilmesini sağlayarak antikanser yanıtı uyardığı düşünülmektedir.

Paklitaksel direnci: Kültür çalışmalarında, direncin iki nedenle geliştiği saptanmıştır. Bunlardan birincisi;  $\alpha$  veya  $\beta$  tübülün yapısındaki değişiklikler veya mutasyonlar, ikincisi ise Pgp ekspresyonu veya MDR fenotipi ile ilişkilidir (59). Aynı anda ikisi de beraber bulunabilmektedir.

Farmakokinetik profili, üç kompartmanlı farmakokinetik modeline uymaktadır. Alfa, beta ve gamma olarak isimlendirilen yarılanma süreleri sırasıyla 4 dk, 36 dk ve 11.1 saattir. Başlangıçtaki hızlı faz, ilacın periferal kompartmanlara dağılımı ile, en son faz ise ilacın periferal kompartmandan yavaşça salınımı ile ilişkilidir. Eliminasyon yolu başlıca karaciğer ve safra yollarındandır. %10' undan azı idrarla değişmeden atılmaktadır. İlacın farmakokinetiği; yaş, cinsiyet ve deksametazon proflaksisi ile etkilenmemektedir. KCFT' lerinin bozuk olması, maruz kalınan ilaç konsantrasyonunu arttırmakta ve eliminasyonu azaltmaktadır.

Paklitaksel ve dositaksel' in toksik etkileri: Paklitaksel' in nötrojeni etkisi, ilacın uygulanış şekline bağımsız olarak görülmektedir. Nötrofil nadir' i 8-11. günlerde görülürken 21 günde düzeltilmektedir. Hipotansiyon, bronkospazm, ürtiker ve dispne ile karakterize şiddetli olan tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları % 2-4 görülmektedir. Anjiyoödem, terleme, kas ve eklem ağrıları, yaygın eritem ve kaşıntı görülebilmektedir. Polinöropati sık görülmektedir. Karaciğer enzim yüksekliği olan hastalarda, toksisitenin daha şiddetli görülmesi nedeniyle, orta veya şiddetli karaciğer bozukluğu olanlarda doz indirimi yapılmalıdır.

Dositaksel' in şiddetli yan etkileri özellikle KCFT' leri bozuk hastalarda veya daha önceden platinum içeren tedavi almış hastalarda 100 mg/m<sup>2</sup> dozunda uygulandığında görülmektedir. Dositaksel, total bilirubin > normalin üst sınırı olanlarda, ALP > 2.5 x normal ile beraber SGOT ve / veya SGPT > 1.5 x normalin üst sınırı olanlarda kullanılması önerilmemektedir.

Dositaksel' in en önemli yan etkisi, hastaların çoğunda ortaya çıkan grade 4 nötropenidir. Alopesi, halsizlik, bulantı, deri döküntüleri, stomatit ve diyare görülebilmektedir. Hastaların çoğunda, geçici döküntü veya kızarıklık görülebilmektedir. Şiddetli alerjik reaksiyonlar nadirdir. Dört kürden fazla uygulanan hastalarda sıvı retansiyonu görülmektedir. Periferik ödem geriye dönüşümlüdür, tedaviyle yavaş ilerleme gösterir ve diüretiklere iyi yanıt vermektedir.

**Paklitaksel klinik kullanımı:**

- Over Kanseri
- Meme kanseri
- Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)
- Diğer kanserler
  - Üreter kanserleri
  - Germ hücreli tümörler
  - Skvamöz hücreli baş-boyun kanserleri
  - Ösefagus kanseri
  - Küçük hücreli akciğer kanseri

Günümüzde diğer ajanlarla kombine edilerek etkinliğinin artırılmasına çalışılmaktadır. Meme kanserinin tedavisinde, cisplatin, siklofosfamid ve doksorubisin ile kombine olarak denenmektedir. Paklitaksel' in, doksorubisin' in klirensini azaltarak toksisitesini arttırabileceği unutulmamalıdır. Over kanserinin tedavisinde cisplatin, carboplatin ve ifosfamid ile kombine olarak kullanılmaktadır.

**Dositaksel klinik kullanımı:**

- Meme kanseri
- KHDAK
- Over kanseri

### III-ARSENİK TRİOKSİT ( $As_2O_3$ )

Arsenik binlerce yıldır geleneksel Çin tıbbında pek çok hastalıkta, özellikle kanser tedavisinde doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Doğada serbest olarak eser miktarda bulunur, genellikle sülfür bileşikleri şeklindedir. Arsenik trioksit ( $As_2O_3$ ), arseniğin oksitidir, molekül ağırlığı 197.84 gr/mol'dür. 1970 yılında arsenik tedavisindeki efektif komponentin  $As_2O_3$  olduğu keşfedilmiştir. Çin'deki Harbin Üniversitesi'nde çalışmalarını sürdüren Shen ve arkadaşları (60) promiyelositik lösemi tedavi edici etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Arsenik bileşiklerinin promiyelositik lösemi, özafagus kanseri, megakaryositik lösemi, lenfoma dizilerinde sitotoksik olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(61). Son yapılan çalışmalarda  $As_2O_3$  'in differansiyasyon ve programlı hücre ölümüne (apoptosis) neden olarak akut promiyelositik lösemili hastalarda klinik remisyonu indüklediği gösterilmiştir(62).

$As_2O_3$ 'in antineoplastik etkisinin hangi mekanizmalarla olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bir çalışmada,  $As_2O_3$  'in oksidatif bir ajan olarak DNA hasarına yol açtığı, bir diğer çalışmada da APL hücre dizisi olan NB4 hücrelerinde  $As_2O_3$ 'in bcl-2 ekspresyonunu down-regüle ettiği ve diferansiyasyon olmadan apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca  $As_2O_3$ 'in APL hücrelerinde retinoik asit füzyon proteinin nükleer reseptörünün degradasyonuna neden olduğu da bilinmektedir (63). Ek olarak sülfidriden zengin proteinler üzerinde de etkilidir. Özellikle protein tyrosine fosforilasyonunu etkileyen enzimler üzerinde etkili olması hücre içindeki çeşitli sinyal mekanizmalarının etkilenmesine neden olmaktadır (64).

Arsenik trioksit' in metabolizması, karaciğerde metilasyonla olmaktadır. Arsenik, başlıca karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, saç ve tırnaklarda depolanmaktadır. Metilasyona uğramış arsenik, insanlarda başlıca idrarla atılmaktadır.

Arsenik ile tedavi esnasında kardiyak yan etkilere dikkat edilmelidir ve EKG' de QT uzaması, tam AV blok gelişimi bildirilmiştir. Sistemik yan etkiler; gastrointestinal (bulantı, kusma, diyare ve karın ağrısı), yorgunluk, ödem, hiperglisemi, dispne, öksürük, döküntü veya deride kalınlaşma, başağrısı ve başdönmesidir.

$As_2O_3$  ' in çeşitli kanserlerin tedavisinde klinikte başarıyla kullanılması ve etki mekanizmaları ile terapötik emin dozlarının nispeten iyi bilinmesi nedeniyle, bu ajanın meme kanseri üzerindeki sitotoksik etkisi deneysel olarak araştırıldı. Meme kanserinin tedavisinde temel etkili olan doksorubisin, paclitaksel ve docetaksel ile

kombine kullanılarak sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Meme kanserinin sık görülen bir hastalık olması ve çok sayıda hastanın tedavisi için yeni ajanlara gereksinim duyulması çalışmalarımızı bu yöne kaydirmiştir.



#### **IV- GEREÇ VE YÖNTEM**

##### **Tümör hücre hatları**

Meme kanseri hücre hattı MCF-7, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center' dan temin edildi.

Hücre hatları, %1 nonesansiyel aminoasid, %1 L-glutamine, 10 000 unite / ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal calf serum eklenen RPMI-1640 besiyeri ortamında, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltılarak kullanıldı. Hücre kültürü için kullanılan besiyeri ve eklenen maddeler Sigma (Sigma Chemical Co.,St Louis, Missouri, USA) firmasından satın alınmıştır.

##### **Reaginler**

Dimethylsulfoxide (DMSO) ve trypan blue Sigma (Sigma Chemical Co.,St Louis, Missouri, USA) firmasından satın alınmıştır. Reaginlerin stok solüsyonları uygun şekilde DMSO ile hazırlandı.

RPMI 1640 besiyeri, değişik miktarlarda çeşitli esansiyel aminoasidler, B grubu vitaminler, ekstra metabolitler (nükleozid, pirüvat gibi) glukoz ve minerallerce zengindir. Bu ortama nonesansiyel aminoasidler ve enfeksiyonu önlemek için penisilin-streptomisin ile, enerji ve karbon kaynağı olarak L-glutamin eklendi. L-glutamin ışıktaki ve beklemekle degrade olduğu için kullanım süresince her onbeş günde bir mediuma eklendi.

##### **Hücrelerin çoğaltılması ve idamesi**

Hücre kültür işlemleri Juoan marka Hood ve inkübatörde gerçekleştirildi. Sıvı nitrojen (-180 °C) de saklanmış olan MCF-7 hücre örnekleri 37 °C' de eritildi ve 75 cm<sup>2</sup> flasklara steril şartlarda aktarıldı. Üzerine 10 ml besiyeri eklendi ve hücreler, nemlendirilmiş, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında çoğaltıldı. Her pasaj sırasında ortalama 2 milyon hücre, 10 ml besiyeri konmuş flasklara alındı ve hücreler trypan blue dye exclusion test ile boyanarak hem canlılık hem de enfeksiyon açısından değerlendirildi. İşleme devam etmek için %90'ın üzerinde canlı hücre varlığı gerekmektedir. Ayrıca flasklar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden değerlendirildi.

### **Sitotoksosite deneyi**

Birim volümdeki hücre Thoma camında sayılarak ayarlandı. Altı well içeren plate her well içine 2 ml hücre ( $5 \times 10^5$  hücre), 2ml farklı konsantrasyonlarda hesaplanan miktarda reagin eklendi. Negatif kontrol olarak reagent içermeyen 2 ml besiyeri ve 2 ml hücre karışımı kullanıldı. Nemlendirilmiş, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi. Sitotoksosite 72. saatte trypan blue dye exclusion test ile değerlendirildi. Sayım işlemi için her aşamada 100 µl hücre süspansiyonu ve aynı miktarda trypan blue karıştırıldı.

(%) sitotoksosite,  $100 - [100 \times (\text{denek well deki toplam hücre sayısı} / \text{kontrol well deki toplam hücre sayısı})]$  formülüne göre hesaplandı. Çalışmada deneyler, her aşamada en az üç kez tekrarlandı.

### **DNA fragmanlarının ELISA ile tespit edilmesi**

Apoptosis, üretici firmanın önerilerine uygun olarak ELISA kiti (Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>; Boehringer Mannheim, Germany) ile değerlendirildi. Mono ve oligonükleozomların hücre lizatlarında sitoplazmik fraksiyonlar içinde saptanması temeline dayanan bu yöntemde, biotinlenmiş antihiston ve peroksidazla çiftleştirilmiş anti DNA antikoru kullanılmaktadır. Sitoplazmadaki mono ve oligonükleozomlardaki artış, örnek hücrelerin absorbansı / kontrol hücrelerin absorbansı şeklinde hesaplanır. Artış faktörü (enrichment factor) apoptozisin bir parametresi olarak belirlendi ve y ekseninde 3 deneyin ortalaması olarak gösterildi.

## V- SONUÇLAR

### **MCF-7 hücrelerinin ikilenme zamanının belirlenmesi:**

Altı well içeren plate, her well içine  $5 \times 10^5$  hücre, çift kontrollü olarak eklendi ve toplam volüm 2 ml'ye besiyeri ile tamamlandı. Nemlendirilmiş, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi. Sırasıyla 24, 48 ve 72. saatte trypan blue dye exclusion test ile değerlendirildi. Sayım işlemi için her aşamada 100 µl hücre ve aynı miktarda trypan blue karıştırıldı.  $5 \times 10^5$  hücre temel alınarak MCF-7 hücre dizisinin ikilenme zamanı hesaplandı. Bu yöntem ile MCF-7 hücre dizisinin ikilenme zamanı 72 saat olarak bulundu (Grafik 1).

### **MCF-7 meme kanseri hücre hattında As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi:**

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in ile  $1 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonun molar (M) konsantrasyonunun belirlenmesi için daha önce APL hücre dizisi olan NB4 hücrelerinde kullanılan konsantrasyonlar baz alındı (63). Bundan sonra As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in 1/10 dilüsyonları yapılarak her bir konsantrasyon için 72 saatlik inkübasyon sonucunda Trypan blue dye exclusion testi kullanılarak sitotoksikite belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in 72 saatlik inkübasyonda IC<sub>50</sub> değeri  $5 \times 10^{-6}$  M bulundu. (Grafik 2).

### **Arsenik trioksit' in apoptotik etkisi**

AsO<sub>3</sub>' in MCF-7 hücre hattında apoptosisi indükleyici etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla AsO<sub>3</sub>' in farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücre süspansiyonlarında 24. ve 48. saatlerde ELISA kullanılarak apoptozis esnasında oluşan mono ve oligonükleozomlar ölçüldü. Mono ve oligonükleozomların apoptozisin tamamlanmasından saatler önce ortaya çıkması nedeni ile ELISA ile farklı zamanlarda değerlendirildi. ELISA ile AsO<sub>3</sub>' in artan konsantrasyonlarında mono ve oligonükleozomlardaki artış faktörünün (Enrichment Factor) aynı oranda arttığı gösterildi. (Grafik 3; a ve b).

**MCF-7 meme kanseri hücre hattında Doksorubisin' in sitotoksik etkisinin belirlenmesi:**

Doksorubisin ile 1 mg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Bundan sonra doksorubisin 1/10 dilüsyonları yapılarak her bir konsantrasyon için 72 saatlik inkübasyon sonucunda trypan blue dye exclusion testi kullanılarak sitotoksosite belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi. Doksorubisin' in 72 saatlik inkübasyonda IC<sub>50</sub> değeri 0.1 µg/ml bulundu. (Grafik 4).

**MCF-7 meme kanseri hücre hattında Dositaksel' in sitotoksik etkisinin belirlenmesi:**

Dositaksel ile 2 mg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Bundan sonra dositaksel' in 1/10 dilüsyonları yapılarak her bir konsantrasyon için 72 saatlik inkübasyon sonucunda Trypan blue dye exclusion testi kullanılarak sitotoksosite belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi. Dositaksel' in 72 saatlik inkübasyonda IC<sub>50</sub> değeri 5 ng/ml bulundu. (Grafik 5).

**MCF-7 meme kanseri hücre hattında Paklitaksel' in sitotoksik etkisinin belirlenmesi:**

Paklitaksel ile 2 mg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Bundan sonra paklitaksel' in 1/10 dilüsyonları yapılarak her bir konsantrasyon için 72 saatlik inkübasyon sonucunda trypan blue dye exclusion testi kullanılarak sitotoksosite belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi. Paklitaksel' in 72 saatlik inkübasyonda IC<sub>50</sub> değeri 10 ng/ml bulundu. (Grafik 6).

**MCF-7 hücre hattında, meme kanserinin tedavisinde kullanılan diğer ajanlarla  $As_2O_3$ ' in beraber kullanılması ile elde edilen sitotoksitenin değerlendirilmesi:**

Daha önceki basamakta,  $As_2O_3$ ' in meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerinde belirgin derecede sitotoksik etkili olduğunun gösterilmesi nedeni ile aynı hücre hattında, meme kanserinin temel etkili ajanları olan doksorubisin, dositaksel ve paklitaksel ile beraber kullanıldı. Bu çalışmada arsenik ile diğer her bir ajanın  $IC_{50}$  konsantrasyonu ve daha önceden belirlenmiş olan  $IC_{50}$  değerinin altındaki bir konsantrasyonu kombine kullanıldı. Doksorubisin +  $As_2O_3$ , dositaksel +  $As_2O_3$  ve paklitaksel +  $As_2O_3$  kombinasyonu well içinde 24 saat enkübe edilen hücre süspansiyonu üzerine eklendi. İlaç konduktan 72 saat sonra trypan blue dye exclusion testi ile sitotoksitenin değerlendirildi.  $As_2O_3$  ve diğer üç ajanın iki konsantrasyonlarının kombinasyonu sonucunda aditif bir etkinin olduğu saptandı (grafik 7, 8 ve 9).

## VI- TARTIŞMA

Meme kanseri, sık görülen kanserlerden olup önemli bir sağlık sorununu oluşturmaktadır. ABD' nde her yıl yaklaşık olarak 190.000 kadına meme kanseri tanısı almaktadır. Eğer görülme hızı aynı kalacak olursa, bugün doğan her 10 kadından biri ileride meme kanseri tanısı alacaktır. Meme kanserinin tedavisindeki yeni gelişmeler, günümüzde meme kanserli kadınların daha uzun yaşama süresi şansına sahip olmasını sağlamaktadır.

Lokalize meme kanserinin primer tedavisi konservatif cerrahi + radyoterapi ya da mastektomidir. Sistemik adjuvan tedaviler, primer meme kanserinden yayılabilecek ya da metastaz yapmış olabilecek mikroskopik kanser hücreleri de pozitiflerinin eradikasyonu için geliştirilmiştir. Bu tedaviler, hastaların uzun dönem yaşam sürelerine sahip olmalarını sağlamışlardır. Sistemik adjuvan tedaviler içinde kemoterapi ve hormonoterapi yer alır. Uygun hastalarda kullanılan adjuvant hormonoterapi ve/veya kemoterapi ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Metastatik meme kanserinde kemoterapi, hastalısız sağkalım avantajı sağlamasına karşın genel sağkalımda avantaj sağlamamakta, çoğu kez tedavi palyatif olmaktan öteye gidememektedir. İleri evre meme kanserli hastaların tedavisinin planlanmasındaki ilk basamak ER, PR ve c-erbB2 özelliklerinin saptanarak tümörün biyolojik özelliklerinin öğrenilmesi gereklidir. Böylece tedavinin planlanmasında daha sağlıklı kararlar alınabilir. Antrasiklin dirençli metastatik meme kanserinin tedavisinde kullanılan en etkili ajanlar taksanlardır.

Kemoterapötik ajanlara karşı intrensek ve edinilmiş rezistansın ortaya çıkması tedavideki başarısızlığın temel nedenidir. Direnç mekanizmalarının ortaya konarak gelişen bu direncin kırılması, etkinliği fazla ve toksisitesi az olan terapötik stratejilerin geliştirilmesi, yeni antineoplastik ajanların uygulamaya sokulması gerekmektedir.

İlk kez 1878 yılında,  $As_2O_3$  ile hazırlanmış olan Fowler solusyonu (65) klinik uygulamada kullanılmış, lökosit sayısında azalma yaptığı bildirilmiştir (66). Daha sonraki dönemlerde  $As_2O_3$ , çeşitli lösemilerin tedavisinde kullanılmıştır. Dr. Forkner ve Dr. Scott'un KML tedavisinde arseniği kullanması,  $As_2O_3$ 'i yeniden gündeme getirmiştir (67). Bu çalışmalar sonucunda modern kemoterapötik ajanların bulunduğu 1950'li yıllara kadar  $As_2O_3$  lösemilerin tedavisinde radyoterapiden sonra kullanılan en önemli ajan olarak kalmıştır.

Modern kemoterapötik ajanların tedaviye girmesiyle arseniğin rolü giderek azalmıştır. Ancak Asya'nın geleneksel tıbbında kullanılmaya devam etmiştir. Arsenik

özellikle Çin' de geleneksel bir tedavi yöntemi olarak kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. 1970 yılında arsenik tedavisindeki etkin bölümün  $As_2O_3$  olduğu bulunmuştur. Shen ve arkadaşları (60) arseniğin akut promyelositik lösemide tedavi edici etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra, yapılan klinik çalışmalarda APL hastalarında belirgin klinik remisyon elde edilmiştir (62, 68).

Klinik uygulamaya hemen sokulmasına rağmen  $As_2O_3$ 'in hangi mekanizmalarla sitotoksositeye yol açtığı tam olarak bilinmemektedir. Sitotoksik etki mekanizmalarını belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda,  $As_2O_3$ 'in sitotoksik etki mekanizması ilk kez APL hücre dizisi olan NB4 hücrelerinde tanımlanmıştır;  $As_2O_3$ 'in APL'in karakteristik özelliği olan t (15;17) translokasyon ürünü onkojenik protein olan PML/RAR- $\alpha$  proteininin degrade olmasını sağlayarak hücrelerin hızla diferansiyasyonuna ve apoptozisine yol açtığı gösterilmiştir (63). Wang ve arkadaşları tarafından  $As_2O_3$ ' in myeloid lösemi hücre dizilerinde bcl-2 ekspresyonunun down-regülasyonuna neden olduğu ve apoptozisi diferansiyasyon olmaksızın da indüklediği gösterilmiştir (69). Bazı çalışmalarda da  $As_2O_3$ ' in oksidatif bir ajan olarak DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir (63). Ayrıca  $As_2O_3$  sülfidriden zengin proteinlere afinite gösterir. Özellikle protein tyrosine fosforilasyonunu etkileyen sülfidril taşıyan enzimler üzerinde etkili olması hücre içindeki çeşitli sinyal mekanizmalarının etkilenmesine neden olur (70). Glutasyon,  $As_2O_3$ 'in sülfidriden zengin ikinci önemli hedef moleküldür. Glutasyon düzeyinin azalması hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin artmasına ve DNA hasarına, ardından apoptozise neden olur (70).  $As_2O_3$ 'in hem glutasyon seviyelerinde azalmaya neden olduğu hem de glutasyonu azaltılmış hücrelerde daha toksik etkide bulunduğu yine bu çalışmada gösterilmiştir.

$As_2O_3$ , daha çok hematolojik malignitelerde kullanılmıştır. Solid organ tümörlerindeki sitotoksitesi ile ilgili az sayıda in vitro çalışma vardır. Bu çalışmalardan birisinde, zaman ve doz bağımlı bir şekilde sitotoksite gösterdiği ve hücreleri apoptozise götürdüğü gösterilmiştir (71). Ayrıca etkisinin, hücre içi kalsiyum içeriği ile yakın ilişkide olduğu saptanarak,  $As_2O_3$  aracılı hücre ölümünde hücre içi kalsiyum sinyal ileti yolağının önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Başka bir çalışmada da,  $As_2O_3$ ' in over ve prostat kanseri hücre dizilerinde belirgin derecede sitotoksosite gösterdiği, apoptozisi uyardığı, cisplatin, etopozid ve doksorubisin ile aditif etki gösterdiği saptanmıştır (72).

Tüm veriler  $As_2O_3$ ' in tek bir mekanizma ile değil hücre için yaşamsal önem taşıyan birçok mekanizma üzerinden etkili olduğuna işaret etmektedir. Bu da  $As_2O_3$ ' in sitotoksik etkisinin sadece lösemik hücrelere özgü olmayıp, diğer pek çok kanser hücre türü üzerinde de olabileceğini, yine farklı sitotoksik mekanizmaların varlığının bu ajana karşı direncin ortaya çıkışını zorlaştıracağını göstermektedir. Bu teorik temele dayanan *in vitro* çalışmalarda  $As_2O_3$ 'in, APL dışında diğer malignitelerde de etkili olabileceği gösterilmiştir. Özafagus kanseri, megakaryositik lösemi ve malign lenfositik hücre dizilerinde sitotoksik etkisi bildirilmiştir (73). Çalışmamızda  $As_2O_3$ 'in meme kanserinde etkinliği, bir meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 kullanılarak *in vitro* koşullarda araştırıldı.

MCF-7, hormon reseptörleri pozitif, c-erbB2 eksprese eden bir meme kanseri hücre dizisidir.  $As_2O_3$ 'in bu hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi "Trypan blue dye exclusion" yöntemi kullanılarak değerlendirildi. 72 saatlik inkübasyonlar yapıldı. Üç ayrı deney düzeneğinde  $As_2O_3$ 'in  $IC_{50}$  değeri 72 saat için  $5 \times 10^{-6}$  M olarak bulundu (Grafik 2). Bu sonuçlar  $As_2O_3$ 'in MCF-7 hücre dizisinde belirgin sitotoksik etki gösterdiği, bu etkisinin zaman ve doza bağımlı olduğunu göstermektedir. Sitotoksik elde edilen konsantrasyonları biyolojik sistemlerde kullanılabilir konsantrasyonlar olarak değerlendirildi. Sitotoksikitenin hangi mekanizma ile olduğunun ortaya konması açısından, arsenik trioksit' in MCF-7 hücre hattında DNA fragmentasyonuna yol açıp açmadığı ELISA yöntemi ile araştırıldı. Bu yöntemle elde edilen sonuçlarla, arsenik trioksit' in MCF-7 hücre hattında apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Ancak, apoptozise götüren mekanizmalar bilinmemektedir. Bcl-2' nin down-regülasyonu, reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkması ve DNA hasarına yol açması olası mekanizmalar olarak düşünülebilir. Arsenik trioksit' in belirgin sitotoksik etkisinin olması ve apoptozisi indüklemesi, bu ajanın meme kanseri tedavisinde alternatif bir ajan olabileceğinin kuvvetli göstergeleridir. Bu veriler temel alınarak, meme kanseri tedavisinde en etkin ajanlar olan adriamisin (doksorubisin), paclitaksel ve docetaksel ile arsenik trioksit' in kombinasyonları da etkinlik açısından *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.

Doksorubisin ile  $As_2O_3$ 'in kombine edilerek uygulanmasındaki amaç; toksisiteyi farklı, etki mekanizmaları aynı olmayan ve tek başlarına belirgin sitotoksik etki gösteren iki ajanın daha düşük dozlarda birlikte kullanılarak sinerjik veya aditif etki elde etmektir. Böylece ilaçlara direnç azaltılacak, etkin sitotoksikite için ihtiyaç duyulan ilaç konsantrasyonlarının azaltılması sağlanacaktır. Çalışmanın

sonunda, grafik 7' de gösterildiği gibi iki ajan arasında aditif etki saptandı. Bu kombinasyonun daha ileri çalışmalarla geliştirilmesi ve klinik uygulamaya konması yararlı olabilir.

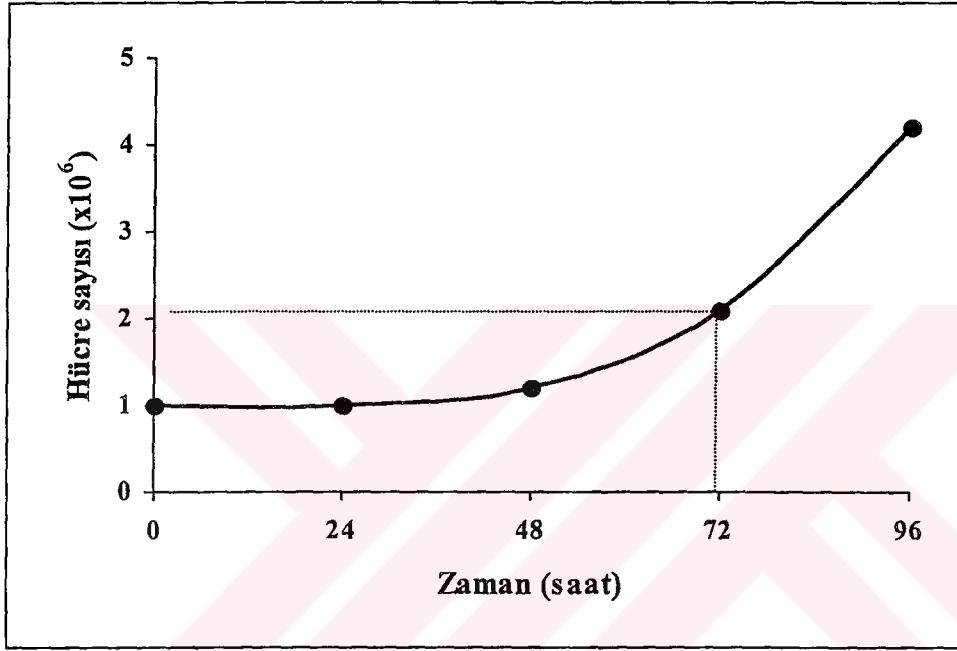
Meme kanserinin tedavisinde etkili diğer iki ajan dositaksel ve paklitaksel de  $As_2O_3$  ile kombine edilerek kullanıldı. Sonuç olarak doksorubisin' e benzer şekilde tablo 8 ve 9' da gösterildiği gibi aditif sitotoksikite gözlemlendi. Bu kombinasyonlar da geliştirilerek klinik uygulamaya sokulabilir.

$As_2O_3$ 'in meme kanseri hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin biyolojik sistemlerde de gösterilmesi, bu sitotoksitenin hangi mekanizmalarla olduğunu araştırılması gerekmektedir. Ayrıca bugün elimizde bulunan diğer antineoplastik ajanlarla kombine edilerek sitotoksik etkisinin *in vitro* koşullarda değerlendirilmesi meme kanseri tedavisine yeni bir perspektif getirecektir.

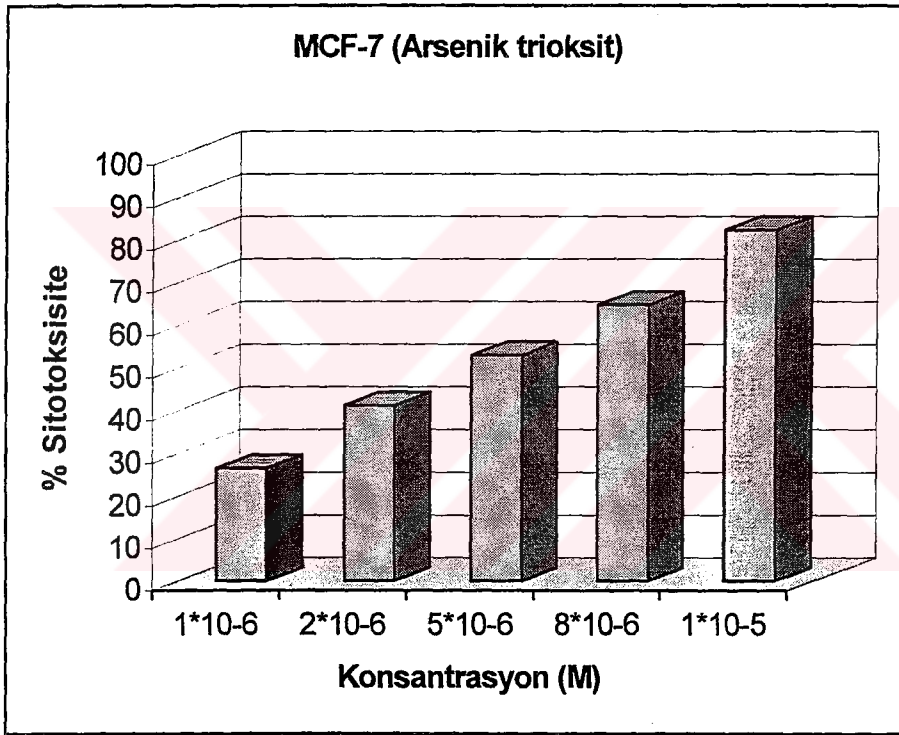


## VII. GRAFİKLER

Grafik 1. MCF-7 meme kanseri hücre dizisi ikilenme zamanı

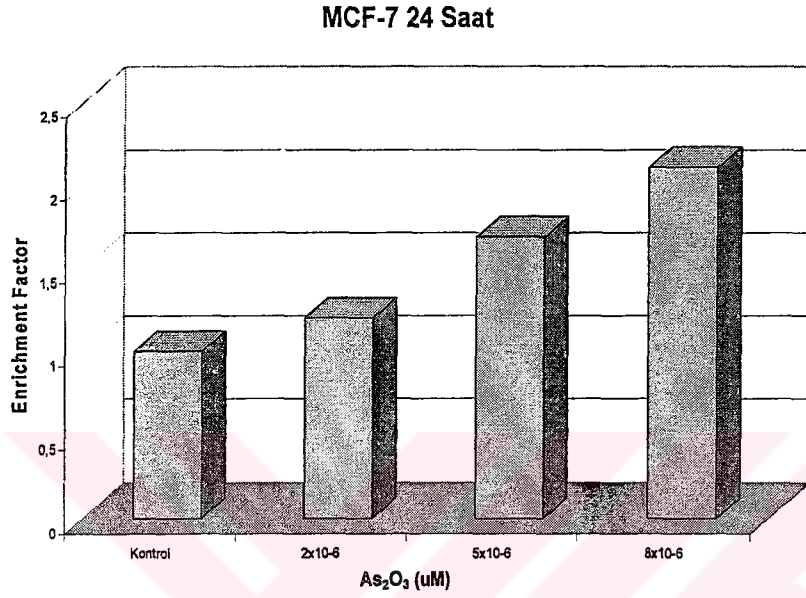


**Grafik 2.** Arsenik triksitin MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi (% sitotoksosite-  $IC_{50}=5 \times 10^{-6}$  M)

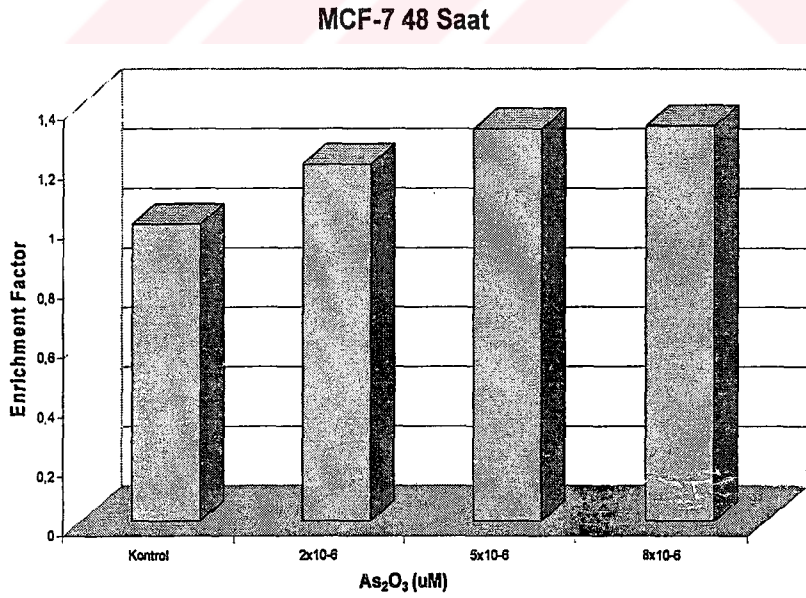


**Grafik III.** Arsenik trioksit etkisi ile MCF-7 hücre hattında DNA fragmantasyonunun ELISA ile değerlendirilmesi: a) MCF-7 24 saat, b) MCF-7 48 saat

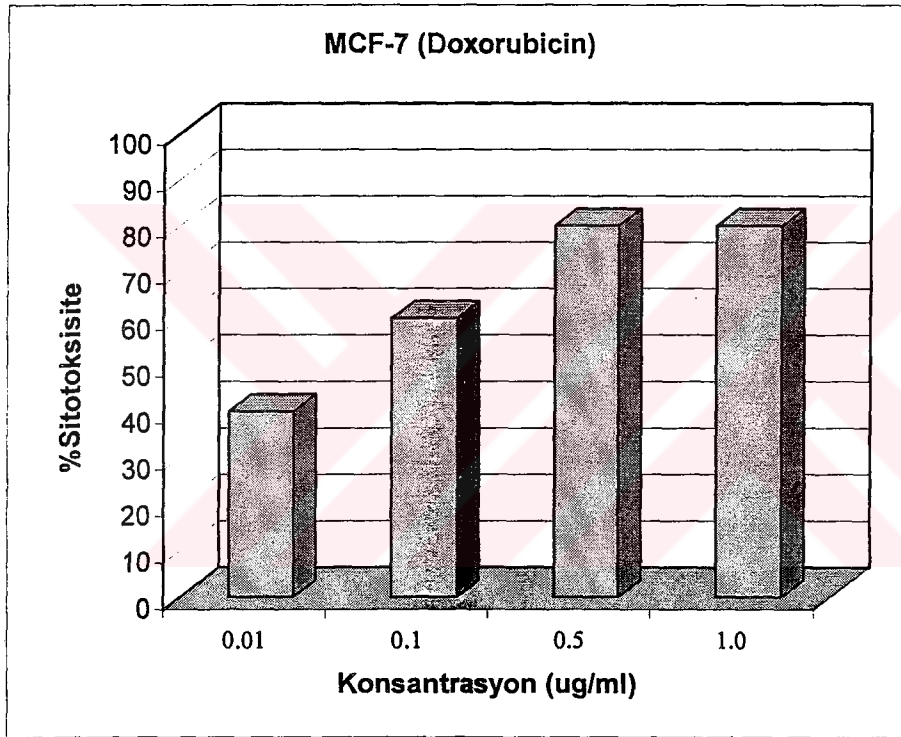
a)



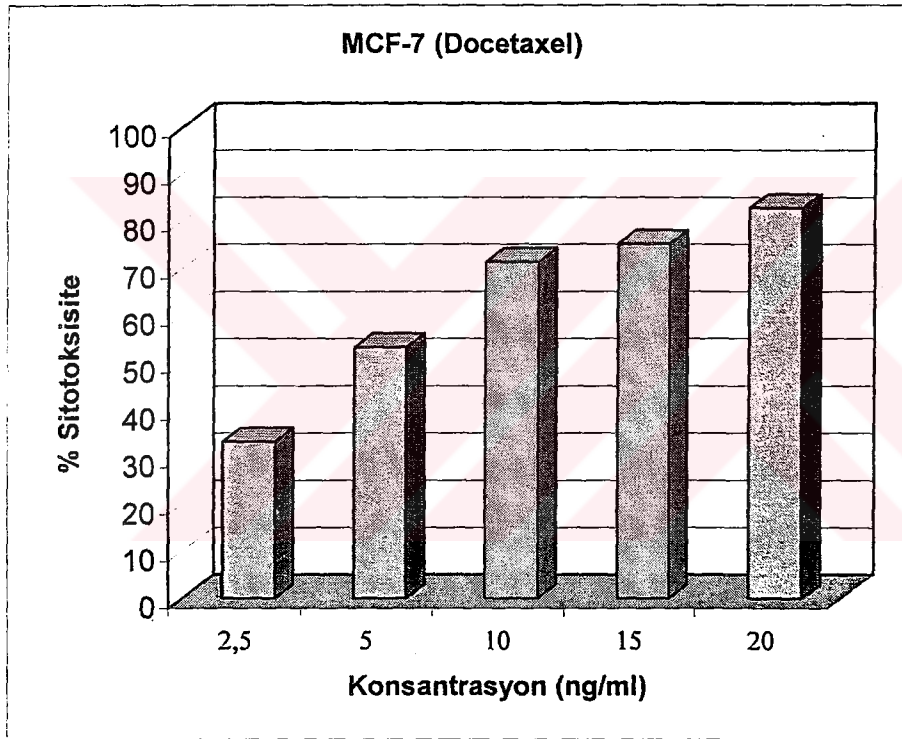
b)



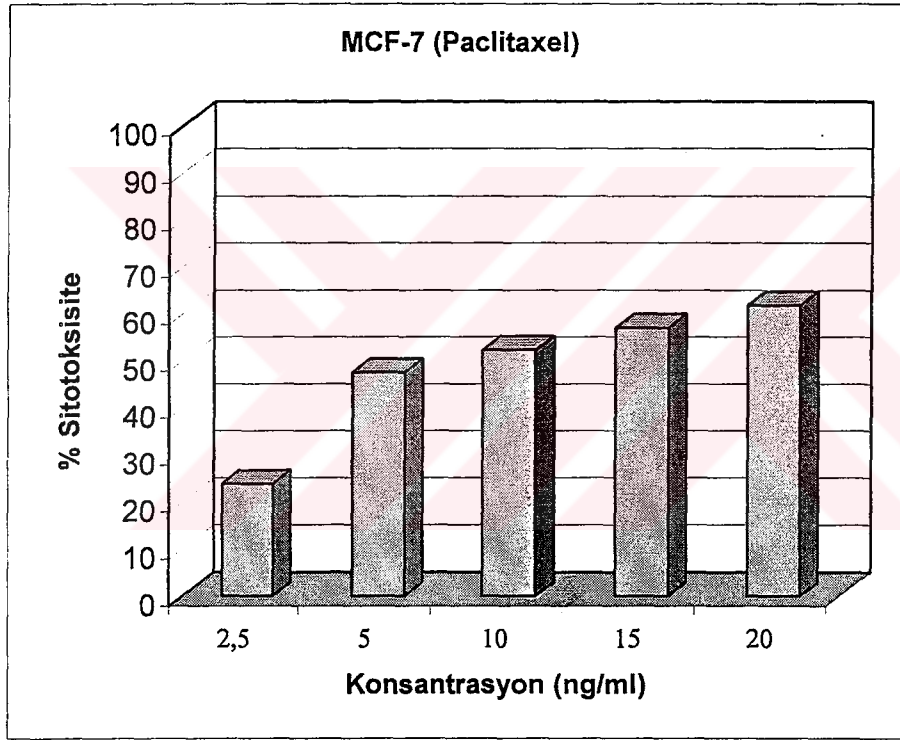
**Grafik 4.** Dokсорubisin' in MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi (% sitotoksisite-  $IC_{50}=0.1 \mu\text{g/ml}$ )



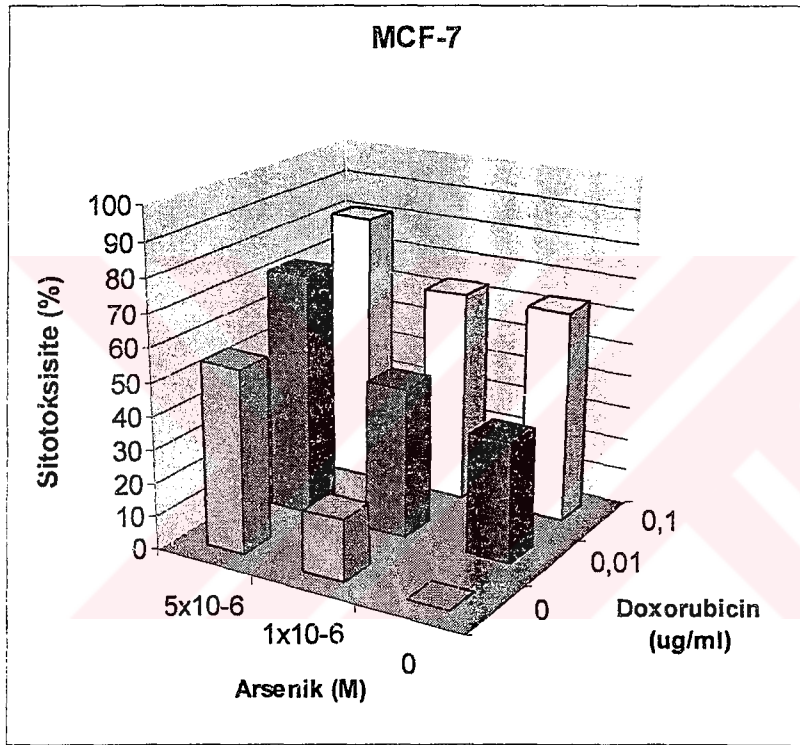
Grafik 5. Dositaksel' in MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi (% sitotosisite-  $IC_{50}=5$  ng/ml)



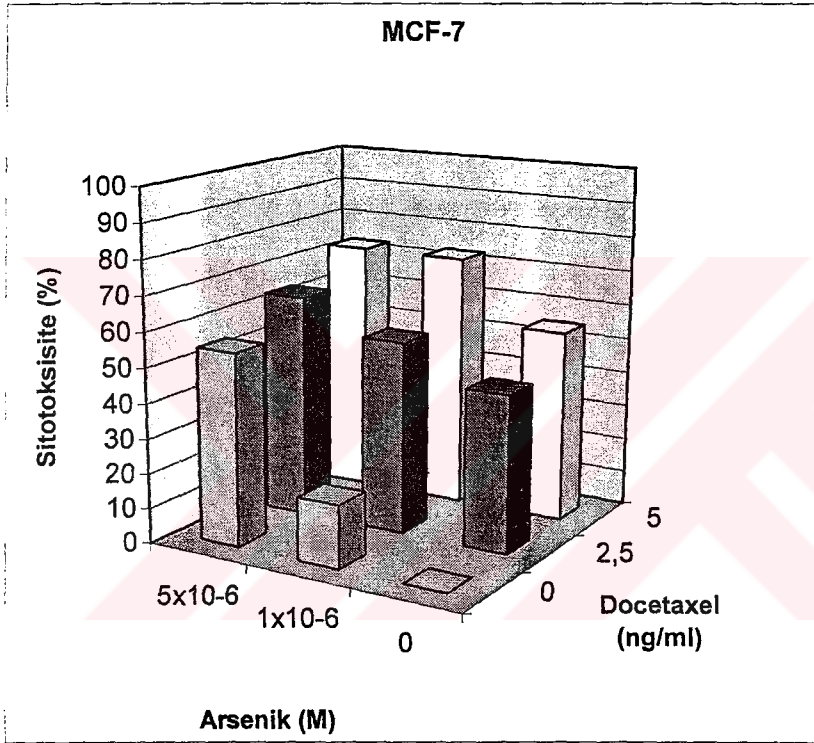
**Grafik 6.** Paklitaksel' in MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi (% sitotoksosite-  $IC_{50}=10$  ng/ml)



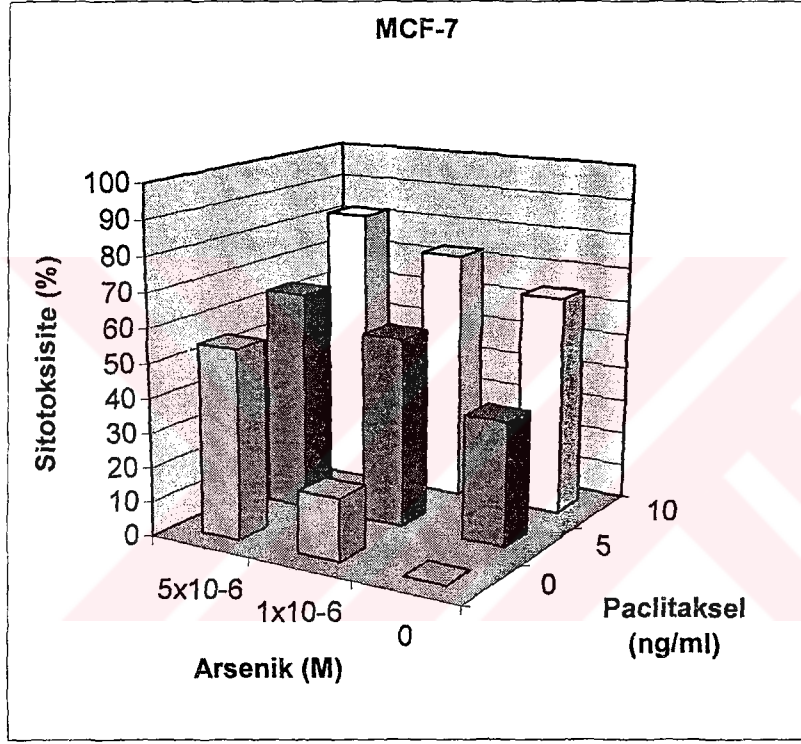
**Grafik 7.** Arsenik trioksit ve doksorubisin kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi



**Grafik 8.** Arsenik trioksit ve dositaksel kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi



**Grafik 9.** Arsenik trioksit ve paklitaksel kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi



## VII- KAYNAKLAR

1. Jardines L, Haffly BG, Doroshow JH, Fisher B, Weitzel J, Theriault RL. Breast cancer overview. Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD, eds. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. New York: PRR press, 2001.
2. Chu KC, Tarone RE, Kessler LG, et al. Recent trends in U. S. breast cancer incidence, survival, and mortality rates. *J Natl Cancer Inst* 88: 1571-1579, 1996.
3. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willet W. Breast cancer. *N Engl J Med* 327: 319-328, 473-480, 1992.
4. Clark GM, Sledge GW Jr, Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 5: 55-61, 1987.
5. Kerlikowske K, Grady D, Rubin SM, et al. Efficacy of screening mammography. A meta-analysis. *JAMA* 273: 149-154, 1995.
6. Osteen RT. Breast Cancer. In Steele GD, Osteen RT, Winchester DP, et al. (eds), *National Cancer Data Base: Annual Review of Patient Care*. Atlanta: American Cancer Society and the Commission on Cancer, 1994: 56-71.
7. Layfield LJ, Glasgow BJ, Cramer H. Fine needle aspiration in the management of breast masses. In Rosen PP, Fechner RE (eds), *Pathology Annual*, part 2 (vol 24). Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1989: 23-62.
8. Day NE. Screening for breast cancer. *Br Med Bull* 47: 400-415, 1991.
9. Tabar L, Duffy SW, Vitak B, et al. The natural history of breast carcinoma: What have we learned from screening? *Cancer* 86: 449-462, 1999.
10. Hendrick RE, Smith RA, Rutledge III JH, Smart CR. Benefit of screening mammography in women aged 40-49: a new meta-analysis of randomized controlled trials. *J Natl Cancer Inst Monogr* 22: 87-92, 1997.
11. Osteen RT, Cady B, Chmiel JS, et al. 1991 National survey of carcinoma of the breast by the commission on cancer. *Surg Gynecol Obstet* 178: 213-219, 1994.
12. Carter C, Allen C, Henson D. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181.
13. Harris J, Morrow M, Norton L. Malignant Tumors of the Breast In: *Cancer Principles and Practice Oncology*. Fifth edition. Devita Vt, Hellman S, and Rosenberg SA ( eds. ) 1997; 1557- 1606.
14. Fisher B, Bauer M, Wickerman DL, et al. Relation of number of positive axillary lymph nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer* 1983; 52: 1551.
15. Koscielny S, Tubiana M, Le M, et al. Breast cancer; relation between the size of the primary tumor and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; 49: 709.
16. Rosen P, Lesser M, et al. P53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiological risk factors, histologic features and prognosis. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2090.

17. Fisher B, Redmond C, et al. Systemic therapy in patients with node- negative breast cancer. *Ann Intern Med* 1989; 111: 703.
18. Clark GM, Mc Guire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 1988; 15: 20.
19. Nixon AJ, Neuberg D, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 888.
20. Albain KS, Allred KC, et al. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994; 16: 35.
21. Foekers JA, Rio MC, Sequin P, et al. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 1990; 50: 3832.
22. Predine J, Spyrtos F, et al. Enzyme- linked immunosorbent assay of pS2 in breast cancers, benign tumors and normal breast tissues. *Cancer* 1992; 69: 2116.
23. Gion M, Mione R, Pappagallo GL, et al. PS2 in breast cancer; alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br J Cancer* 1993; 68: 374.
24. Russo J, Frederick J, Ownby HE, et al. Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 123.
25. Clayton F: Pathologic correlates of survival in 378 lymph node- negative infiltrating ductal breast carcinomas: mitotic count is the best single predictor. *Cancer* 1991; 68: 1309.
26. Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P, et al. Cell kinetics as a prognostic indicator in node-negative breast cancer. *Eur J Clin Oncol* 1989; 25: 1165.
27. Courdi A, Hery M, et al. Factors affecting relapse in node- negative breast cancer: a multivariate analysis including the labeling index. *Eur J Clin Oncol* 1989; 25: 351.
28. Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry* 1993; 14: 482.
29. Walker RA, Campjohn RS. Comparison of monoclonal antibody Ki-67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinomas. *Br J Cancer* 57; 57: 281.
30. Brown RW, Allred DC, et al. Prognostic significance and clinical- pathological correlations of cell cycle kinetics measured by Ki-67 immunocytochemistry in axillary node- negative carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16: 191.
31. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998; 352: 930-942.
32. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, et al. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2651-2658.
33. Henderson IC, Berry D, Demetri G, et al. Improved disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) from the addition of sequential paclitaxel (T) but not from the escalation of doxorubicin (A) dose level in the adjuvant chemotherapy of patients (pts) with node-positive primary breast cancer (BC). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1998; 17: 101a.

34. Thomas E, Buzdar A, Theriault R, et al. Role of paclitaxel in adjuvant therapy of operable breast cancer: preliminary results of prospective randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2000; 19: 285.
35. Paik S, Bryant J, Park C, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 1361-1370.
36. Buzdar AU, Singletary SA, Theriault RI, et al. Prospective evaluation of paclitaxel versus combination chemotherapy with fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide (FAC) as neoadjuvant therapy in patients with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 3412-3417.
37. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998; 351: 1451-1467.
38. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for early breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 1371-1388.
39. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Ovarian ablation in early breast cancer: overview of the randomised trials. *Lancet*. 1996; 348: 1189-1196.
40. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomized controlled trial. *Lancet*. 1999; 353: 1993-2000.
41. Stadtmauer EA, O' Neill A, Goldstein LJ, et al. Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1069-1076.
42. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344: 783-792.
43. Greenberg PAC, Hortobagyi GN, Smith TL, et al. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 2197-2205.
44. Costanza ME, Weiss RB, Henderson IC, et al. Safety and efficacy of using a single agent or a phase II agent before instituting standard combination chemotherapy in previously untreated metastatic breast cancer patients: report a randomized study—Cancer and Leukemia Group B 8642. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 1397-1406.
45. D' Andrea GM, Seidman AD. Docetaxel and paclitaxel in breast cancer therapy: present status and future prospects. *Semin Oncol*. 1997; 24 (suppl 13): 27-44.
46. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1609-1618.
47. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1998; 339: 974-984.

48. Klijn JGM, Blamey F, Tominaga T, et al. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 343-353.
49. Howell A, Robertson JFR, Albano J, et al. Comparison of the efficacy and tolerability of fulvestrant (Faslodex) with anastrozole (Arimidex) in post-menopausal (PM) women with advanced breast cancer (ABC)- preliminary results. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 64: 27 (abstract 6).
50. Osborne CK. A double-blind randomized trial comparing the efficacy and tolerability of Faslodex (fulvestrant) with Arimidex (anastrozole) in post-menopausal (PM) women with advanced breast cancer (ABC). *Breast Cancer Res Treat* 2000; 64: 27 (abstract 7).
51. Cersosimo RJ. Idarubicin: an anthracycline antineoplastic agent. *Am J Hosp Pharm* 1992; 11: 152.
52. Basser RL, Green MD. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1993; 19: 57.
53. Pratt WB, Ruddon RW, Ensminger WE, Maybaum J. *The anticancer drugs*, ed 2. Oxford: Oxford University Press, 1994.
54. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *JNCI* 1990;82: 1247.
55. Woods CM, Zhu J et al. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med* 1995;1:506-526.
56. Haldar S, Jena N, et al. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4507-4511.
57. Stearns ME, Wang M. Immunoassays of the metalloproteinase (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP 1 and 2) levels in noninvasive and metastatic PC-3 clones: effects of taxol. *Oncol Res* 1994;6:195-201.
58. Klauber N, Parangi S, Flynn E, et al. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res* 1997;57:81-86.
59. Roy SN, Horwitz SB. A phosphoglycoprotein associated with Taxol resistance in J774.2 cells. *Cancer Res* 1985;45: 3856.
60. Shen ZX, Chen G, Ni JH et al. Use of arsenic trioxide in the treatment of APL. Clinical efficacy and pharmacokinetics. *Blood* 1997;89: 3354.
61. Kroemer G, de The H. Arsenic trioxide, a novel anticancer agent? *J Natl Cancer Inst* 1999;91(9):743-5.
62. Hu J, Shen ZX, Sun GL, et al. Long-term survival and prognostic study in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans-retinoic acid, chemotherapy, and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: an experience of 120 patients at a single institution. *Int J Hematol* 1999;70(4):248-60.
63. Chen G-Q, Zhu J, Shi XG, W et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of APL: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR $\alpha$ /PML protein. *Blood* 1996; 88: 105.

64. Gallagher RE. Arsenic-New life for an old potion. *N Engl J Med* 339: 1998;1389.
65. Duncan A: *The Edinburgh New Dispensatory* (ed4). Philadelphia, PA, T. Dobson, 1794.
66. Cutler EG, Bradford EH. Action of iron, cod-liver oil and arsenic on the globular richness of the blood. *Am J Med Sci* 1878;75: 74.
67. Forkner CE, Scott TFM. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia. *JAMA* 1931; 97:3.
68. Niu C, Yan H, Yu T, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1999;94(10):3315-24.
69. Wang ZG, Rivi R, Delva L, König A, et al. Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RAR $\alpha$  independent manner. *Blood* 1998;92: 1497.
70. Gallagher RE. Arsenic-New life for an old potion. *N Engl J Med* 339: 1389, 1998.
71. Zhang TC, Cao EH, Li JF, Ma W, Qin JF. Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC-803 cell growth by arsenic trioxide. *Eur J Cancer* 1999 Aug;35(8):1258-1263.
72. Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, Karabulut B, Terzioglu E, Omay SB, Goker E. Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2000 Dec;6(12):4957-4964.
73. Shen ZY, Tan LJ, Cai WJ, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of oesophageal carcinoma in vitro. *Int J Mol Med* 1999;4: 33.

www.ijerph.com