

157729

**T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI BAŐKANLIĐI**

**ADJUVAN YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİ VE OTOLOG
PERİFERİK KÖK HÜCRE NAKLİ UYGULANAN YÜKSEK
RİSKLİ MEME KANSERLİ HASTALARDA HER 2/neu
DURUMUNUN HASTALIKSIZ SAĞKALIMA VE TOPLAM
SAĞKALIMA ETKİSİ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

**Okan KUZHAN
Dz. Tbp. Bnb.**

Ankara–2004

ÖNSÖZ

Bu tezin konusu, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından, Haziran 2003’de verildi ve Ağustos 2004’de tamamlandı.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Yaşları 45–55 arasında olan kadınların ana ölüm nedenidir. Bu ürkütücü rakamlar, meme kanseriyle ilgili çalışmaları yüreklendirmektedir. Çünkü istatistiksel yöntemlerle başarısı çok farklı görülmeyen yeni tedavi yöntemleriyle bile, birçok yaşam kurtarılmış olmaktadır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük katkıları olan Prof. Dr. Ahmet ÖZET’e, Prof. Dr. Fikret ARPACI’ya, istatistiksel analizleri yapan Uzm. Dr. Selim KILIÇ’a, kliniğimizin konuk doktorlarına, intörn doktorlarına, hemşirelerine, sekreterlerine ve hasta bakıcılarına teşekkür ederim. Bu çalışmada birer rakam olarak görülen hastalarımıza ayrıca teşekkür eder, kaybettiklerimizin anısı önünde saygıyla eğilirim.

Dr. Okan KUZHAN
Ankara, 2004

İÇİNDEKİLER

GENEL BİLGİLER	1
C-erbB-2 ONKOGENİ	1
MEME KANSERİNDE YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİNİN YERİ	3
GEREÇ VE YÖNTEM	10
AMAÇ	10
HASTALAR	10
İNDÜKSİYON KEMOTERAPİSİ	11
PERİFERİK KÖK HÜCRELERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI	11
YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİ PROTOKOLLERİ	12
KÖK HÜCRELERİN GERİ İNFÜZYONU	12
NAKİL SONRASI DESTEK TEDAVİSİ	12
NAKİL SONRASI TEDAVİ VE İZLEM	13
DEĞERLENDİRME KRİTERLERİ	14
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ	14
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	15
BULGULAR	17
HASTALAR	17
KÖK HÜCRELERİN MOBİLİZASYONU VE TOPARLANMASI	18
YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİ VE NAKİLLE İLİŞKİLİ ÖLÜM	18
ENFRAFTMAN KİNETİKLERİ VE DESTEK TEDAVİ VERİLERİ	19
HASTALIKSIZ SAĞKALIM VE TOPLAM SAĞKALIM	20
TARTIŞMA VE SONUÇ	23
ÖZET	26
SUMMARY	27
KAYNAKLAR	28

GENEL BİLGİLER

Otuz yıl önce adriyamisinin kullanıma girmesinden beri, meme kanserli hastaların sağkalımını uzatma yolunda çok büyük ilerleme olmamıştır. Taksanlar, trastuzumab, yüksek doz kemoterapi (YDK), trastuzumabın ilk hatta kullanımı veya nakil sonrası minimal kalıntı hastalık için pekiştirme tedavisi olarak kullanımı, gen tedavileri, allojenik nakil ve immünoterapi günümüzde yoğun olarak çalışılan konulardır.

Çalışmalar yeni tedavi yöntemleri geliştirmenin yanı sıra yeni prediktif ve prognostik faktörleri bulmak üzerinde yoğunlaşmaktadır. Tümör belirteçleri (*marker*), meme kanserinin prognozunu tahmin etmeye, tedaviye yanıtın nasıl olacağını kestirmeye veya nüksü izlemeye yarar. ER/PgR, CA 15-3, katepsin D, p53, S faz fraksiyonu ve c-erbB-2 meme kanserinde klinik kullanımı olan doku ve serum belirteçlerindendir. Bu belirteçler prediktif ve/veya prognostik bilgi verirler. Prognostik faktörler, özgün bir tedaviden bağımsız olarak hastalığın nasıl sonuçlanacağını tahmin etmede işe yarar. Örneğin lenf düğümü metastazının varlığı, uygulanan tedavilerden bağımsız olarak hastalığın kötü sonuçlanma olasılığının yüksek olduğunu gösterir. Prediktif faktörler ise, özgün bir tedaviye direnç veya duyarlılık durumunu ortaya koyar. ER ve c-erbB-2 gibi bazı belirteçler, hem prognostik hem de prediktif bilgi verebilir. Son zamanlarda adjuvan hormon tedavisi ve kemoterapiyi planlarken, c-erbB-2 durumu da göz önüne alınmaya başlamıştır. Hatta yüksek doz kemoterapiden daha çok yarar görecektir olan hasta gruplarını belirlemede de kullanılacak gibi görünmektedir.

C-erbB-2 ONKOGENİ

C-erbB-2 onkogeni, 185 KD ağırlığında, hücre içi tirozin kinaz aktivitesi olan bir transmembran glikoproteini kodlamaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesinin bir üyesidir. Epitel hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden hücre içi sinyal iletim yollarının aktivasyonunda önemli rol oynar. C-erbB-2 onkogeninin amplifikasyonu ve protein

ürününün (HER 2/neu) aşırı ifadesi meme kanseri olgularının %20-40'ında görülmektedir (1, 2, 3).

C-erbB-2 aktivitesi şu yöntemlerle ölçülebilir:

- C-erbB-2 gen amplifikasyonu – fluorescence in situ hybridization (FISH)
- C-erbB-2 RNA aşırı ifadesi – Northern blotting veya reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
- Protein ürününün (HER 2/neu) aşırı ifadesi – Western blotting, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) veya immünohistokimya (IHK).

C-erbB-2 testlerinin bazı kısıtlılıkları vardır: Testlerin standardizasyonu zordur, sonuçlar laboratuvarlar arasında değişiklik gösterebilir. Kullanılan antikorlara, doku hazırlama tekniğine ve değerlendirme kriterlerine göre sonuçlar değişebilir. Pozitif ve negatif ayrımı için kullanılan kriterler üzerinde görüş birliği yoktur. Bu nedenle hem laboratuvar sonuçlarına güvenmek, hem de değişik çalışmaları birbiriyle karşılaştırmak çok güçtür.

FDA tarafından onaylanan c-erbB-2 testleri ve endikasyonları şunlardır:

- Adjuvan kullanımda doksorubisinden yarar görecektir hastaların seçimi (PathVysion HER-2 DNA probe kit®)
- Lenf düğümü tutulumu olmayan hastalarda prognoz belirlenmesi (INFORM HER-2/neu Test®)
- Trastuzumab kullanımından yarar görecektir metastatik hastaların seçimi (Herceptest®).

Kesin olmasa da HER 2/neu ile ilgili şu genellemeler yapılmaktadır:

- C-erbB-2'nin aşırı ifadesi, endokrin tedavisine yanıtın kötü olacağını gösterebilir. C-erbB-2 pozitifliğinin, ER negatifliği ile ilişkili olduğu bulunmuştur (4). Ancak çelişkili klinik veriler nedeniyle, c-erbB-2 durumu, ne adjuvan ne de metastatik kullanımda endokrin tedaviyle ilgili karar verirken tek başına yönlendirici olamaz.
- C-erbB-2 ifadesi yüksek olan kadınlar alkileyici ajanlara daha yüksek oranda direnç gösterirler. Ancak bu hastalar doksorubisinin yüksek dozlarından daha çok yararlanırlar. Bu nedenle c-erbB-2 ifadesi yüksek hastalarda, antrasiklin içeren rejimleri seçmek akıllıca bir tutum olur (5, 6). Yakın geçmişte yayınlanan bir *in vitro* çalışmada, c-erbB-2 ekspresyonunun topoizomera II ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Doksorubisin etkisini bu enzimi inhibe ederek yaptığına göre, c-erbB-2 pozitif

tümörlerde, direnci kırmak için doksorubisin dozunu artırmak gerektiği çıkarımı yapılabilir.

- C-erbB-2 pozitifliği, antrasiklin içermeyen rejimlere direnç varlığını göstermez. Bu nedenle c-erbB-2 pozitif hastalara, eğer antrasiklinler kontrendikeyse ve adjuvan kemoterapi endikasyonu varsa, antrasiklin içermeyen tedaviler başlanabilir (8).
- C-erbB-2 negatif tümörlerde, doksorubisin içermeyen CMF gibi protokoller tercih edilebilir (9).
- HER 2/neu pozitifliğinin, hormon tedavisi yanında, radyoterapiye; siklofosfamid, metotreksat ve fluorourasil içeren kemoterapilere yanıtın kötü olacağını kestirmede kullanılabilecek bir faktör olduğu bildirilmektedir.
- C-erbB-2 durumu, trastuzumab gibi bu proteini hedefleyen tedavilere yanıtın iyi olacağını gösterir.

MEME KANSERİNDE YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİNİN YERİ

Yaygın aksilla metastazı olan meme kanserli olgularda, geleneksel tedaviyle 5 yıllık sağkalım %25'in altındadır (10, 11). On adet ve üzerinde metastatik aksiller lenf düğümü olan grup, yüksek riskli meme kanseri olarak tanımlanmaktadır ve yeni sınıflandırmada n3a (evre IIIc) olarak tanımlanmıştır (12). Böyle yüksek bir ölüm oranı, yüksek riskli meme kanserli olgularda klinik çalışmalara dayanak oluşturmaktadır. Yüksek doz kemoterapinin kanser olgularında yarar sağlayacağı inancı, alkileyici ajanlara maruz bırakılan tümör hücre hatlarında doz yanıt eğrisinin doğrusal olması bulgusundan kaynaklanmaktadır (13, 14). Lokal ileri meme kanserinde yüksek doz kemoterapinin bazı avantajları vardır: Tüm makroskopik hastalık rezeksiyonla veya radyoterapiyle ortadan kaldırılabilir, henüz kemoterapiler ve radyoterapilerle yorulmamış kemik iliği kendini daha çabuk toparlar, tümör birçok kemoterapi ajanına henüz direnç geliştirmemiştir. Tablo I'de meme kanserinde kullanılan yüksek doz kemoterapi protokolleri görülmektedir.

Tablo I: Evre III meme kanserinde kullanılan yüksek doz kemoterapi protokolleri

Merkez	YDK	N	HS (%)	Ortanca izlem (ay)	Toksik ölüm	Araştırmacı
ABMTR	Farklı	863	51	36	3	Antman
Paris	C/TVI	9	33	37	0	Gisselbrecht
Groningen	CE	19	58	48	5	Mulder
City of Hope	CEA	74	54	46	0	Somlo
Toulouse	CEP	28	64	40	0	Roche
Marseille	CL	11	36	5-25	0	Maraninchi
French Autologous Group	CLM	33	36	>24	4	Gisselbrecht
Columbia	CTCb	38	69	24	0	Hesdorffer
Wake-Forest	CTCb	11	85	14	0	Perry
Dana Farber Cancer Inst	CTCb	50	64	30	0	Ayash
Milan	HDSC	7	86	26	0	Gianni
Tampa	Değişik	86	53	60	5	Fields
Solti Group	CTCb veya CEL	18	60	24	Veri yok	Liuch
San Antonio	Değişik	21	57	27	5	Adkins
Uni of Colorado	CBP	30	70	19	3	Cagnoni
Romagnolo Oncology Inst	CMT	13	85	20	Veri yok	Rosti
Uni of Heidelberg	ICE	33	36	48	0	Hohaus

A: doksorubisin, C: siklofosfamid, E: etoposid, Ep: epirübisin, F: fluorourasil, L: melfalan, M: mitoksantron, P: sisplatin, TBI: tüm beden ışınlaması

Yüksek riskli meme kanseri olgularında, adjuvan yüksek doz kemoterapinin sağkalım yararı sağlayıp sağlamadığı konusunda çelişkili veriler vardır. İlk karşılaştırmalı sonuçlar küçük bir faz II çalışmadan gelmiştir. Rodenhuis ve arkadaşları, üçüncü seviye aksiler tutulumu olan 81 hastayı, neoadjuvan kemoterapi, operasyon, operasyon sonrası bir kür kemoterapi uyguladıktan sonra yüksek doz kemoterapi veya gözlem kollarına randomize ettiler. Ortanca 7 yıllık gözlem sonunda, intent-to-treat analiziyle iki kol arasında toplam sağkalım (TS) ve hastalıksız sağkalım (HS) arasında bir fark olmadığı saptadılar. Bu çalışmada aksiller tutulumu değerlendirmek için, aksilla diseksiyonu yerine standart olmayan bir yöntem olan infraklavikuler lenf düğümü biyopsisi yapılmıştır (15). Hortobagyi ve arkadaşları, ilk basamakta operasyon uygulanan ve ≥ 10 lenf düğümü tutulumu olduğu saptanan ve operasyon öncesi kemoterapi alanlarda operasyon ile ≥ 4 lenf düğümü tutulumu olduğu saptanan toplam 78 hastayı, 8 kür adriyamisin tabanlı kemoterapiden sonra, 2 kür DICEP (siklofosfamid, etoposid, sisplatin) alan veya izlenen kollara randomize ettiler. Ortanca 53 aylık izlem sonunda, iki kol arasında TS ve HS açısından bir fark olmadığını saptadılar (16). Ancak birçok uzman, DICEP rejiminin miyeloablatif olmadığını

görüştüğüdür. Görüldüğü gibi, bu iki küçük çalışmaya dayanarak, yüksek riskli meme kanseri olgularının yüksek doz kemoterapiden yarar görüp görmediğine karar vermek mümkün değildir.

Daha büyük faz III çalışmaların ilk sonuçları yayınlanmaya başlamıştır. CALGB (*Cancer and Acute Leukemia Group B*) 9082 çalışmasında, Peters ve arkadaşları, en az 10 metastatik lenf düğümü olan ve 4 kür CAF uygulanmış olan 785 hastayı, siklofosfamid, sisplatin ve BCNU'dan oluşan bir yüksek doz protokolü alan veya bu ajanları standart üzeri ancak miyeloablatif olmayan dozlarda G-CSF desteğiyle alan kollara (*ılımlı doz grubu*) randomize ettiler (17). İlimli doz grubunda nüks saptanan 25 hastaya kurtarma amaçlı YDK uyguladılar. Ortanca 5 yıllık izlemde, intent-to-treat analiziyle HS oranları, yüksek doz kemoterapi kolunda %61, diğer kolda %60 olarak hesaplanmıştır ($p=0,5$). YDK kolunda nüks daha az görülmüştür (%32 [güvenilirlik aralığı %95, %27–38]). Bu bulgu, nüks sıklığında %31 oranında azalma olduğu anlamına gelmektedir. Ancak bu başarı, YDK kolundaki 32 (%8,1) toksik ölümle gölgelenmiştir. TS açısından bir fark gözlenmemiştir (%70 ve %72, $p=0,2$). Bu çalışmada verilen TS oranları, daha önceki CALGB deneyimlerinden ve bu popülasyonda yapılan diğer geleneksel kemoterapi çalışmalarının sonuçlarından daha yüksektir. Yüksek doz grubunda sonuçların böyle iyi çıkması beklenen bir sonuçtur. Ancak ılımlı doz grubundaki bu başarı şaşırtıcıdır. G-CSF desteğiyle uygulanan standart doz üzerindeki kemoterapi uygulaması, çalışmaya almadan önce yapılan evreleme çalışmalarının çok ayrıntılı olması veya kurtarma amaçlı YDK uygulaması, sonuçların bu kadar iyi olmasını açıklayabilir.

Bergh ve arkadaşları, en azından 8 metastatik lenf düğümü olan veya östrojen negatifliği, yüksek S-faz fraksiyonu ile birlikte en azından 5 metastatik lenf düğümü olan hastalarda çalıştılar (18). Toplam 525 hastayı bireyselleştirilmiş dozlarda dokuz kür FEC (FU, epirübisin, siklofosfamid) veya üç kür standart FEC ardından YDK kollarına randomize ettiler. Bireyselleştirilmiş FEC dozları, her kür başına epirübisin için 120 mg/m^2 , siklofosfamid için 1800 mg/m^2 miktarlarına ulaştı. Metastatik olguları saptamak için, diğer YDK çalışmalarında olduğu gibi ayrıntılı incelemeler yapılmadı. Ortanca 34 aylık izlemle, nakil ve bireyselleştirilmiş FEC grubunda HS oranları %65 ve %72 ($p=0,04$); TS oranları %77 ve %83 idi ($p=0,1$). İzlem süresi kısa olmasına karşın bireysel FEC grubunda sekiz MDS/AML (%3,2) görüldü. Nakil grubunda iki hasta toksik nedenlerle kaybedildi (%0,7). Bu çalışmayı yorumlamada en büyük güçlük, nakil grubuna verilen toplam kemoterapi dozunun kontrol grubundan daha az olmasıdır.

Konuyla ilgili en büyük randomize çalışma Hollanda ulusal çalışmasıdır. Rodenhuis ve arkadaşları, en azından dört metastatik lenf düğümü olan 885 hastayı (4–9 adet arasında metastatik düğümü olan 570 hasta ve 10 ve üzerinde metastatik lenf düğümü olan 315 hasta), operasyon sonrasında 4 kür FEC veya 4 kür FEC ardından YDK kollarına randomize ettiler (19). Bu çalışma, %24'lük nüks azalmasını %90 olasılıkla saptayabilecek istatistiksel güçte tasarlanmıştır. İlk sonuçların yazıldığı dönemde, beklenen 570 olaydan 200'ü gerçekleşti. Hollanda sigorta şirketlerinin isteğiyle, ortalama 4,5 yıllık izlem sonrasında, çalışmaya alınan ilk 284 hastanın ileriye dönük (prospektif) sonuçları yayınlandı. Nakil grubunda TS (%77 ve %62, $p=0,009$) ve HS oranları (%89 ve %79, $p=0,04$) hem 4–9 lenf düğümü grubunda hem de ≥ 10 lenf düğümü grubunda daha iyi bulundu. Bu çalışmada her iki grubun TS ve HS eğrilerinin ancak dördüncü yılda birbirinden ayrılmaya başladığını belirtmek gerekir. Aynı çalışmanın ortalama gözlem 3,5 yıldaki analizinde iki kol arasındaki HS farkı orta derece önemdeydi (%72 ve %65, $p=0,05$), TS açısından bir fark yoktu (%84 ve %80, $p=0,3$). 2002 yılında Rodenhuis çalışmasının kesin sonuçları bildirildi (20). Ortalama 7 yıllık izlem sonrasında nakil ve standart tedavi kolları arasında 5 yıllık HS oranları (%49 ve %47,5) ve TS (%61 ve %62,5) açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Anglosakson ve Alman çalışmalarında, Hollanda çalışmasına benzer sonuçlar çıktı. Crown ve arkadaşları, en az dört metastatik lenf düğümü olan 605 hastayı, dört kür adriyamisinden sonra YDK veya pekiştirme CMF kemoterapisi alan kollara randomize ettiler (21). Ortalama 4 yıl izlemle nakil ve kontrol grubu arasında TS (%63 ve %62, $p=0,8$) ve HS (%51 ve %54, $p=0,6$) açısından bir fark bulunmadı. Ancak Hollanda çalışmasının sonuçlarının bildirilmesi üzerine, planlama dışı yapılan ilk 100 hastanın incelemesinde nakil grubu lehine önemli fark (%59 ve %43) saptanmıştı (22).

On ve üzerinde metastatik lenf düğümü olan hastalarda yapılan Alman çalışmasında, Zander ve arkadaşları, en uzun süre izlenen hasta alt grubunda belirgin HS farkı (%50 ve %25) olduğunu sonucuna vardılar (23).

Fransız PEGASE 01 çalışmasında, Roche ve arkadaşları, 7 üzerinde metastatik lenf düğümü olan 314 hastayı standart adjuvan kemoterapiden sonra YDK veya izlem kollarına randomize ettiler (24). Nakle bağlı ölüm oranı %0,6 idi. Otuz üç ay gibi kısa bir izlem sonrasında

hastaliksız sağkalımda (%71 ve %55, $P=0,002$) anlamlı bir fark bulunurken, toplam sağkalımlar (%84 ve %85; $p=0,3$) arasında bir fark yoktu.

Gianni ve arkadaşları, Milano'da Ulusal Kanseri Enstitüsünde, dört veya daha fazla pozitif lenf düğümlü olan 382 hastada kendi yüksek doz ardışık tek ajan tedavilerini geleneksel kemoterapiyle karşılaştırdılar (25). Yüksek doz ardışık tedavi kolunda tedaviye bağlı ölüm oranı %0,5 idi. Ortanca 52 aylık izlem sonunda HS (%65 ve %62) ve TS (%76 ve %77) oranları arasında bir fark saptanmadı. Aynı CALGB çalışmasında olduğu gibi, genç yaş alt grubunda ve 4–9 arası lenf düğümlü olan grupta HS avantajı göze çarpıyordu.

Bezwođa, iki randomize çalışmada, yüksek doz kemoterapinin hem metastatik hem de adjuvan kullanımda belirgin sağkalım yararı sağladığını bildirmiştir. Ancak bu çalışmalarda verilerin çarpıtıldığı, göz önüne alınmaması gerektiği düşünölmektedir (26).

Bunca bilgi karmaşasından bazı sonuçlar çıkarılabilir:

- Yüksek riskli meme kanserinde yüksek dozun yararı konusunda son söz henüz söylenmemiştir.
- Çalışmaları karşılaştırırken hasta sayılarını ve istatistiksel güçlerini göze almak gerekir.
- İzlem sürelerinin yeterli olması gerekir. Özellikle MDS/AML gibi komplikasyonların altıncı yılda görölmeye başladığı düşünölrse, ortanca izlem süresi en az altı yıl olmalıdır.
- Çalışma sonuçlarının kabul edilen standartlarla uyumlu olması gerekir. %5 üzerinde nakle bağlı ölüm kabul edilemez.
- Naklin gecikmesi, sonuçların başarılı çıkmasını önleyebilir.

Yukarıda değinilen ve Tablo II'de özetlenen çalışmalardaki nakil lehine başarılı sonuçlar kesinlikle küçümsenmemelidir. İstatistiksel bir fark olmadan klinik yarar söz konusu olabilir. Bazen istatistiksel bir farkın klinik bir anlamı olmayabilir. Kısaca, yüksek riskli meme kanserinde yüksek doz kemoterapinin umut verdiği söylenebilir. Çalışmaların hedeflerinin gerçekçi olması gerekir. Hiçbir yeni tedavi yönteminin standart tedaviye göre %30'un üzerinde daha başarılı çıkmayacağı ortadadır. Bu kadar büyük bir fark, ancak opere edilen ve edilmeyen evre II meme kanseri olguları arasında görölebilir. Özetle, kabul edilebilir standartlarda nakil yapan merkezlerde araştırma kapsamında nakillerin devamında yarar vardır. Yukarıdaki çalışmalarda

dikkati çektiği gibi, yüksek riskli meme kanseri olgularının bazı alt gruplarında sonuçların daha iyi olması, yeni çalışmaların bu alt grupları tanımlamaya yönelik planlanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Tümörün hormon reseptör durumu, HER 2/neu durumu, yaş gibi. Bu alt grupların belirlenmesiyle bazı hastalar, yüksek doz kemoterapinin toksik etkilerinden korunmuş olacak ve para tasarrufu sağlanmış olacaktır.

Bu çalışmanın amacı, HER 2/neu durumunun yüksek doz tedavi alan hastalarda hastalıksız sağkalım ve toplam sağkalım oranlarına etkisini ortaya koymaktır.



Tablo II: Yüksek riskli meme kanserinde randomize çalışmalar

Çalışma	Düğüm sayısı	n	İzlem	HS (YDK)	HS (kontrol)	p	TS (YDK)	TS (kontrol)	p	Çalışmanın durumu
Rodenhuis (Hollanda)	≥4	885	İlk 285 hasta 4,5 yıl	3 yıl: %77	3 yıl: %62	0,009	3 yıl: %79	3 yıl: %79	0,03	İlk sonuçlar (5/2000)
			Tümü 3,5 yıl	3 yıl: %72	3 yıl: %65	0,05	3 yıl: %84	3 yıl: %80	0,3	
Peters (CALGB)	≥10	785	5,1 yıl	%61	%60	0,49	%70	%72	0,23	İlk sonuçlar (5/2001)
Leonard	≥4	605	İlk 100 hasta >6 yıl	%59	%43	Rapor edilmedi	Rapor edilmedi	Rapor edilmedi	Rapor edilmedi	İlk sonuçlar (5/2002)
			Tüm hastalar >4 yıl	%51	%54	0,6	%63	%62	0,8	
Bergh (İskandinav)	>5-8	525	34 ay	3 yıl: %63	3 yıl: %72	0,04	3 yıl: %77	3 yıl: %83	0,12	İlk sonuçlar (5/99)
Gianni (İtalya)	≥4	382	52 ay	5 yıl: %65	5 yıl: %62	Önem siz fark	5 yıl: %77	5 yıl: %76	Önem siz fark	İlk sonuçlar (5/01)
Roche (Fransa)	>7	314	33 ay	3 yıl: %71	3 yıl: %55	0,002	3 yıl: %84	3 yıl: %85	0,33	İlk sonuçlar (5/01)
Zander (Almanya)	≥10	302	3,7 yıl	6 yıl: %50	6 yıl: %25	0,09	Rapor edilmedi	Rapor edilmedi		İlk sonuçlar (5/02)
Takuda (Japonya)	≥10	95	4 yıl	%60	%48	0,4	%67	%66	0,9	İlk sonuçlar (5/01)
Rodenhuis (Hollanda)	≥4	81	6,9 yıl	%49	%47,5	0,37	%62,5	%61	0,85	Kesin sonuçlar
Hortobagyi (ABD)	≥10 veya KT sonrasında ≥4	78	6,5 yıl	%48	%62	0,35	%58	%77	0,23	Kesin sonuçlar
Bearman (ABD)	4-9	1000	-	-	-	-	-	-	-	Hasta alımı tamamlandı
Talman ²⁷ (ABD)	≥10	550	-	-	-	-	-	-	-	Hasta alımı tamamlandı
Basser (Avusturalya)	≥10	340	-	-	-	-	-	-	-	Hasta alımı tamamlandı

GEREÇ VE YÖNTEM

AMAÇ

Bu çalışma geriye dönük (retrospektif) bir olgu incelemesi olup amacı, otolog periferik kök hücre nakli (OPKHN) ve yüksek doz kemoterapi uygulanan yüksek riskli meme kanseri olgularında immünohistokimyasal olarak saptanan HER 2/neu durumunun hastalıksız sağkalıma ve toplam sağkalıma olan etkisini ortaya koymaktır.

HASTALAR

GATA Tıbbi Onkoloji Kliniği, Kemik İliği Transplantasyon Merkezinde 31 Mart 1997-18 Haziran 2004 tarihleri arasında en azından 10 adet metastatik aksiller lenf düğümü olan meme kanserli 54 hastaya yüksek doz kemoterapi ve otolog periferik kök hücre nakli uygulandı. Bu hastalar geriye dönük olarak cerrahi örneklerinin immünohistokimyasal olarak HER 2/neu reseptörünün negatif ve pozitif olmasına göre iki gruba ayrılarak bu iki grup arasında hastalıksız sağkalım ve toplam sağkalım açısından bir fark olup olmadığı araştırıldı.

OPKHN şu hastalara önerildi:

- Meme kanseri nedeniyle operasyon uygulanan, cerrahi örneğin (*spesimen*) patolojik incelemesiyle meme kanseri tanısı konan, yaşı 18- 65 arasında olan hastalar,
- Aksiler lenf düğümü diseksiyonunda en azından 10 adet metastatik lenf düğümü saptanan hastalar. (Metastatik lenf düğümü sayısı 8 olan üç hastaya ve 9 olan bir hastaya diseksiyonla çıkarılabilen toplam lenf düğümü sayısı 15 altında olduğu için, pozitif lenf düğümü sayısının gerçekte daha yüksek olabileceği düşünülerek nakil önerildi.)
- Uzak metastazı olmayan hastalar. Uzak metastaz taraması için akciğer grafisi, batin ultrasonografisi ve kemik sintigrafisi çektilirdi; kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi yapıldı.

- Hastaların performans durumları ve organ fonksiyonları göz önüne alındı. ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group-Zubrod*) performans statüsü 1 üzerinde olan hastalara nakil önerilmedi.
- Beyaz küre sayısı $4000/\text{mm}^3$ altında, platelet sayısı $100.000/\text{mm}^3$ altında, kreatinin klirensi 60ml/dk altında olan, rutin biyokimya sonucuna göre karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalara nakil önerilmedi.

Tüm hastalar çalışma hakkında sözlü ve yazılı olarak bilgilendirildi; çalışmaya alınmaları için yazılı onayları alındı. Çalışma kurum etik komitesince onaylandı.

Kök hücre nakli uygulanan hastalar geriye dönük olarak incelenerek HER 2/neu reseptör durumu saptanmış olan 36 hasta, pozitif ve negatif olmak üzere iki kola ayrıldı. HER 2/neu reseptör durumu bilinmeyen 18 hasta bu çalışmaya alınmadı.

İNDÜKSİYON KEMOTERAPİSİ

İndüksiyon kemoterapisi olarak 4 kür CAF (siklofosfamid 500 mg/m^2 1.gün, doksorubisin 50 mg/m^2 1.gün, 5-fluorourasil 500 mg/m^2 1.gün, üç haftada bir) uygulandı. Kemoterapiye operasyon sonrasında yara iyileşmesi gerçekleşmesinin ardından hemen başlandı.

PERİFERİK KÖK HÜCRELERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

Hastalara aldıkları son indüksiyon kemoterapisinin bitiminden 14 gün sonra G-CSF (Filgrastim, Neupogen®, Roche, Basel, Switzerland) $10\text{--}15\text{ }\mu\text{g/kg/gün}$ dozunda cilt altına uygulanarak kök hücreler mobilize edildi. Aferez işleminden bir gün önce hastalara juguler kateter takıldı. Bu kateter yüksek doz kemoterapi uygulaması için ve engraftman öncesi destek tedavisi için de kullanıldı. G-CSF uygulamasının 4ncü, 5nci ve 6ncı günlerinde G-CSF infüzyonundan 6–8 saat sonra Cobe Spectra hücre ayırıcısı (COBE Lakewood, CO, USA) kullanarak 4–6 saat süren aferezler yapıldı. Elde edilen mononükleer hücreler, immünfloresan analiz için örnek gönderildikten sonra, DMSO (*dimethylsulfoxide*) çözeltisinin son yoğunluğu %10 olacak şekilde dondurulup sıvı nitrojen içinde $-197\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Aferez yönteminin ayrıntıları kliniğimizde yapılan başka bir çalışmada açıklanmıştır (28).

YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİ PROTOKOLLERİ

- 33 hastaya CNV yüksek doz kemoterapi protokolü (siklofosfamid, mitoksantron, etoposid) uygulandı: Siklofosfamid $2,4 \text{ g/m}^2$ toplam doz bir kerede -8. gün; mitoksantron 35 mg/m^2 toplam doz bir kerede -3. gün, etoposid $1,5 \text{ g/m}^2$ toplam doz 6 güne bölünerek -8, -7, -6, -5, -4, -3ncü günler.
- 1 hastaya ICE protokolü (ifosfamid, karboplatin, etoposid) uygulandı: Ifosfamid $2,5 \text{ g/m}^2$ -8, -7, -6, -5, -4, -3. günler, karboplatin $1,5 \text{ g/m}^2$ -8, -7, -6, -5, -4, -3. günler, etoposid 250 mg/m^2 -8, -7, -6, -5, -4, -3ncü günler.
- 1 hastaya TCM (tiotepa, karboplatin, melfalan) yüksek doz kemoterapi protokolü uygulandı: Tiotepa 250 mg/m^2 -8 ve -7nci günler, melfalan 50 mg/m^2 -6 ve -5nci günler, karboplatin 450 mg/m^2 -4, -3 ve -2nci, günler.
- 1 hastaya CNP (siklofosfamid, mitoksantron, karboplatin) yüksek doz kemoterapi protokolü uygulandı: siklofosfamid 60 mg/kg -4 ve -3ncü günler, mitoksantron 35 mg/m^2 -8nci gün, karboplatin 200 mg/m^2 -8, -7, -6, -5, -4, -3ncü günler.

KÖK HÜCRELERİN GERİ İNFÜZYONU

Kemoterapinin son dozundan 48 saat sonra, mobilizasyon ürünü, hasta başında 37°C 'ye kadar ısıtılıp santral kateterden infüze edildi. İnfüzyondan 30 dakika önce 50 mg difenhidramin ve 1 mg/kg metilprednizolon damar içine uygulandı. Hastaların hiçbirinde DMSO'ye bağlı ciddi toksisite gözlenmedi.

NAKİL SONRASI DESTEK TEDAVİSİ

Kök hücre infüzyonunun ardından hastaların bir kısmı ultraviyole sterilizasyonu uygulanan konvansiyonel odalarda, Mart 2004'den sonra nakil uygulananlar ($n=8$), HEPA filtreli, ultraviyole sterilizasyonu uygulanan özel odalarda izole edildi. Hastalara nötropenik dönemde ağızdan siprofloksasin ve düşük kalorili yarı steril diyet verildi. Tüm hastalara aynı febril nötropeni

protokolü uygulandı. İki saatten uzun süren ateş ve klinik olarak enfeksiyon kuşkusu olduğunda, her iki koldan kan kültürü ve klinik duruma göre idrar, gaita, balgam kültürleri alındıktan sonra geniş spektrumlu antibiyotiklerle standart damar içinden tedaviye başlandı. Patojen ajan mikrobiyolojik olarak saptandığında, antibiyogram sonucuna göre tedavi yeniden düzenlendi. Ateş nedeni bulunamadığında, eğer hasta ampirik tedaviye yanıt vermişse, tedavi lökosit sayısı $0,5 \times 10^9/l$ üzerine çıkana kadar sürdürüldü. Hiçbir hastaya granülosit transfüzyonu yapılmadı. Platelet düzeyini $10 \times 10^9/l$ üzerinde tutacak biçimde tek bir vericiden platelet transfüzyonu, hemoglobin düzeyini 8 g/dl üzerinde tutacak biçimde eritrosit transfüzyonu yapıldı. Tüm kan ürünleri 2500 cGy ile ışınladı.

Hastalara naklin uygulandığı tarihte yürütülen randomize çalışmaların protokollerine göre, kök hücre infüzyonundan sonra 24 hastaya G-CSF (Filgrastim, Neupogen®, Roche, Basel, Switzerland) 5 µg/kg/gün dozunda, 7 hastaya GM-CSF (Molgramostim, Leucomax; Sandoz-Schering-Plough Laboratories, Paris, France) 5 µg/kg/gün dozunda uygulandı. 5 hastaya GF uygulanmadı.

Nakil sonrası dönemde herhangi bir komplikasyon gelişmediği takdirde, lökosit sayısı ardışık 3 günde $1 \times 10^9/l$ ve platelet sayısı transfüzyon gerektirmeden ardışık 3 günde $50 \times 10^9/l$ üzerine çıktığında hastalar taburcu edildi.

NAKİL SONRASI TEDAVİ VE İZLEM

Nakil sonrası taburcu olan hastalara en kısa süre içinde Radyasyon Onkolojisi Polikliniğinde ayaktan RT uygulandı. Hastalara 2 Gy fraksiyonlarla toplam 50 Gy'den az olmamak üzere foton kullanarak göğüs duvarı ve periferik lenfatik ışınlama uygulandı.

Hastalar ilk yıl 4 ayda bir, ikinci yıl 6 ayda bir, daha sonra yılda bir kontrol muayenesine çağrıldı. Her kontrolde akciğer filmi ve batin ultrasonografisi çektirildi. Hormon reseptör pozitif olan hastalara 5 yıl süreyle 40 mg/gün tamoksifen verildi. Hastaların menapozal durumlarını izlemek için son adet tarihleri göz önüne alındı ve en azından yılda bir serum FSH ve östradiol düzeyleri ölçüldü. Yılda bir pelvik muayene, yılda bir mamografi, görme sorunları olduğunda katarakt açısından göz muayenesi yaptırıldı. 3 hastada vajinal kanama gözlemlendi, bu hastalardan birinde tamoksifen tedavisi sonlandırıldı. Bir hastada serebral aspergillozis ve boş sella sendromu

gelişti. Bu hastada daha sonra aldığı steroid tedavisinin komplikasyonu olarak femur başı aseptik nekrozu gelişti.

DEĞERLENDİRME KRİTERLERİ

Lökosit sayısının $1 \times 10^9/l$ düzeyine ulaşp üç gün boyunca bu düzeyde kalması, lökosit engraftmanının işareti olarak kabul edildi ve nakil gününden bu değere ulaşılması için geçen süre, lökosit engraftman süresi olarak kabul edildi. Platelet sayısının, platelet transfüzyonu yapılmaksızın $50 \times 10^9/l$ üzerinde seyretmesi, platelet engraftmanı olarak değerlendirildi. Ateşli gün sayısını saptamada, eşik ateş değeri $38,1^\circ C$ olarak alındı. Nakil sonrası hastanede yatış süresi hesaplanırken kök hücre nakli ile taburcu olduğu zaman arasında geçen süre gün olarak belirlendi. Hastalara transfüzyonla verilen platelet ve eritrosit süspansiyonları ünite olarak sayılarak platelet ve eritrosit transfüzyon gereksinimi belirlendi.

Hastalıksız sağkalımı hesaplarken hastalık nüksünün ilk işareti veya herhangi bir nedenle ölüm sonlanım noktası olarak kabul edildi. Son kontrol muayenesinde hastalıksız olarak yaşadığı bilinen hastalar, bu muayene tarihi itibariyle tamamlanmamış izlem (censored observation) olarak kabul edildi. Toplam sağkalımı saptarken herhangi bir nedenle ölüm sonlanım noktası olarak kabul edildi. Son muayenede yaşadığı bilinen, herhangi bir tarihte hastanede bir tetkik yaptıran hastalar, o tarih itibariyle tamamlanmamış izlem olarak kabul edildi. Hastane takiplerini bırakan hastalara telefonla ulaşıldı; yaşayıp yaşamadıkları öğrenildi. Kendisine iki yıldan beri ulaşılamayan bir hasta, son muayene tarihi itibariyle kayıp izlem olarak kaydedildi.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Yüksek riskli meme kanseri nedeniyle hastanemizde OPKHN yapılan 54 hastanın meme dokusu bloklarına ulaşılmaya çalışıldı. Ulaşılabilen 31 adet parafin blok, GATA Patoloji AD'da iki patolog tarafından kontrollü olarak bir defada incelendi. Parafin bloklar, çalışma öncesinde mikrotomlar ile $2 \mu g$ kalınlığında kesitlere ayrıldı. Kesitler, $37^\circ C$ 'de 24 saat boyunca inkubasyonla parafinden arındırıldı. $50^\circ C$ 'de 30 dakika süren ikinci inkübasyondan sonra, kesitler xylene içinde immersiyona tabii tutuldu ve sırayla %100, %96, %70 yoğunluğunda alkol

içinde beşer dakika tutularak rehidrate edildi. İmmünohistokimyasal boyama öncesinde, kesitler 10 dakika boyunca mikrodalga fırında bekletildi. Kesitler, 50 cc saf su ve bir antijen sökücü tampon eklemesinden sonra 7 dakika daha mikrodalgada tutuldu. Lamlar oda sıcaklığında en az 20 dakika boyunca soğuduktan sonra, otomatik immünohistokimyasal bir teknikle boyandı. Boyamada östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, HER 2/neu gibi primer antikorlar kullanıldı. HER 2/neu immünreaksiyonu, hücre membranı boyanmasına göre pozitif ve negatif olarak değerlendirildi. ER ve PR boyanması, boyanan çekirdek sayısına ve boyanma yoğunluğuna göre zayıf pozitif, pozitif, güçlü pozitif olarak değerlendirildi.

Başka merkezlerden hastanemize sevk edilen hastaların güvenilir patoloji laboratuvarlarından, üniversite hastanelerinden aldıkları raporlardaki ER, PR, HER 2/neu sonuçları istatistiksel analizlerde kullanıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İki grup arasında östrojen reseptör pozitifliği, progesteron reseptör pozitifliği, ailede meme kanseri öyküsünün varlığı, kullanılan hazırlama rejimleri, nakil sonrasında kullanılan hemopoietik büyüme faktörleri, CD34 seleksiyon uygulaması, menapozal durum, patoloji örneğinde lenf düğümü invazyonunun varlığı değişkenlerinin yüzdeleri açısından fark olup olmadığı Ki-kare testi kullanılarak araştırıldı. Ki-kare testinde tablo gözlerinde beklenen frekansın 5'ten ya da toplam örneklemin 20'den az olduğu durumlarda Fischer's Exact Test kullanıldı.

İki grup arasında yaş, tanıyla nakil arasında geçen süre, nakil öncesinde kullanılan toplam kemoterapi kür sayısı, infüzyonla verilen toplam CD34 hücre sayısı, ateşli gün sayısı, lökosit ve platelet engraftman süreleri, eritrosit ve platelet transfüzyon sayısı, hastanede yatış süreleri değişkenlerinde iki grup ortalamalarının karşılaştırılmasında parametrik olmayan istatistik yöntemlerinden Mann-Whitney U testi kullanıldı.

İki grup birbiriyle toplam sağkalım ve hastalıksız sağkalım olasılıkları açısından karşılaştırıldı. Grupların hastalıksız sağkalım ve toplam sağkalım olasılıkları Kaplan-Meier yöntemiyle saptandı ve bunların karşılaştırmaları log-rank testiyle yapıldı.

İstatistiksel işlemler mikroişlemci yardımı ile hazır istatistik paket programı (*SPPS for Windows, ver.10.0, SPSS Inc., USA*) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlı farklılık kriteri olarak $p<0.05$ düzeyi kabul edildi. Metin içindeki tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.



BULGULAR

HASTALAR

31 Mart 1997- 18 Haziran 2004 tarihleri arasında toplam 54 meme kanseri olgusuna OPKHN uygulandı. Ancak 36 olgunun parafin bloklarından immünohistokimyasal yöntemle HER 2/neu analizi yapılabildi. HER 2/neu negatif 23 olgu ve HER 2/neu pozitif 13 olgu, hastalıksız sağkalım ve toplam sağkalım oranları arasındaki fark yönünden incelemeye alındı. Hastaların özellikleri Tablo III'de özetlenmiştir.

Tablo III: Hastaların ve tümörlerin özellikleri ve bunların karşılaştırılması

Özellikler	HER 2/neu negatif	HER 2/neu pozitif	P değeri
Hasta sayısı	23	13	
Yaş (yıl) Ortanca Aralık	44 27-66	43 29-55	0,500 ^a
Tümör çapı (cm) Ortanca Aralık	2,5 0,6-10	3,7 1,1-8	0,143 ^a
Pozitif düğüm sayısı (düğüm adedi) Ortalama Aralık	15 8-30	17 8-33	0,320 ^a
Pozitif düğüm oranı ortalaması (metastatik/total düğüm sayısı)	0,70	0,75	0,371 ^a
Lenfatik invazyonu olan hasta sayısı	5	2	1,0 ^b
Histolojik derece (hasta sayısı) 2 3	2 10	2 5	0,603 ^b
Tanı nakil süresi (gün) Ortanca Aralık	131,0 105-282	128,0 102-265	0,242 ^a
Toplam kemoterapi sayısı Ortalama Aralık	4 4-7	4 4-7	0,643 ^a
Ailede meme kanseri öyküsü olan hasta sayısı	3	3	0,645 ^b
Premenapozal hasta sayısı	12	9	0,363 ^b
Östrojen reseptör negatif hasta sayısı	6	5	0,680 ^b
Progesteron reseptör negatif hasta sayısı	7	5	1,0 ^b
CD34 seleksiyon uygulanan hasta sayısı	13	6	0,358 ^c

^a: Mann Whitney U testi; ^b Fisher Exact testi, ^c Pearson Chi-square testi ile saptanan P değerleri

KÖK HÜCRELERİN MOBİLİZASYONU VE TOPARLANMASI

Yalnızca 6 hastada 2 aferez seansı gerekti, diğerlerinde tek seansla yeterli sayıda kök hücre toplanabildi. $2 \times 10^6/\text{kg}$ üzerinde CD34+ hücre toplanması hedeflendi. Grupların aferez sayıları ve toplanan CD34 sayıları ile ilgili bilgiler Tablo IV’de görülmektedir. Tabloda CD34+ hücre sayılarının minimum değerlerine bakıldığında, $2 \times 10^6/\text{kg}$ altında değerlerin olduğu görülmektedir. CD34 seleksiyonu uygulanan 9 hastada toplanan CD34+ hücre sayısı, seleksiyon işlemi sırasındaki kayıplara bağlı olarak $2 \times 10^6/\text{kg}$ altında olmuştur. Ancak bu miktar, engraftmanı olumsuz etkilememiştir.

Aferez öncesinde G-CSF uygulaması sırasında, santral ven kateteri takılması ve aferez işlemi sırasında ciddi bir komplikasyon gözlenmedi. Tek aferez seansının yeterli olduğu hastalarda, G-CSF 5 gün, diğerlerinde 6 gün kullanıldı. 19 hastaya halen yürüten başka bir çalışmanın protokolü gereği CD34 seleksiyon işlemi uygulandı.

Tablo IV: Grupların aferez işlemiyle ilgili özellikleri

	<i>HER 2/neu negatif</i>	<i>HER 2/neu pozitif</i>	<i>p değeri</i>
CD34 sayısı ($\times 10^6/\text{kg}$)			
Ortalama	3,43	4,95	0,768 ^a
Aralık	1,25–7,14	1,53–20,45	
CD34 seleksiyonu (hasta sayısı)	13	6	0,358 ^b
Aferez sayısı (hasta sayısı)			
1 seans	18	11	0,121 ^c
2 seans	5	—	
Eksik veri	0	2	
^a : Mann Whitney U testi; ^b Pearson Chi-square testi; ^c Fisher Exact testi ile saptanan p değerleri			

YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİ VE NAKİLLE İLİŞKİLİ ÖLÜM

Tablo V’de hastaların aldığı yüksek doz kemoterapi protokolleri, kök hücre sonrasında uygulanan büyüme faktörleri ve ölüm sayıları görülmektedir. Nakil uygulanan 54 hastanın biri kafa içi

kanama, biri Escherichia coli sepsisi nedeniyle erken dönemde kaybedilmiştir. Nakil sonrası 23ncü günde, RT sırasında bir hasta miyokart enfarktüsü nedeniyle kaybedilmiştir.

Tablo V: Yüksek doz kemoterapiler ve nakille ilişkili ölüm

	<i>HER 2/neu negatif</i>	<i>HER 2/neu pozitif</i>
Yüksek doz kemoterapi (hasta sayısı)		
CNV	22	11
ICE	1	-
TCM	-	1
CNP	-	1
kille ilişkili ölüm	1	0
İlk 30 günde ölüm	0	1

ENFRAFTMAN KİNETİKLERİ VE DESTEK TEDAVİ VERİLERİ

OPKHN uygulanan 54 hastanın nakil sonrası alınan kan kültürlerinde 9 olguda koagülaz negatif Staphylococcus aureus, 2 olguda Escherichia coli, 3 olguda metisiline dirençli Staphylococcus aureus, 2 olguda Pseudomonas aeruginosa, 1 olguda Staphylococcus aureus ve Pseudomonas aeruginosa üretilmiştir.

54 olguda $10,9 \pm 2,3$ (ortanca 10,0) günde beyaz küre engraftmanı, $12,1 \pm 3,3$ (ortanca 12,0) günde platelet engraftmanı gerçekleştirildi. Ortalama 2 ünite eritrosit süspansiyonu, 1 ünite tek vericiden aferezle elde edilen platelet süspansiyonu kullanıldı. Yatış süresi $13,0 \pm 3,0$ gündü.

Tablo VI'da HER 2/neu negatif ve pozitif grubun engraftman kinetiklerine ve destek tedavisine ait veriler görülmektedir.

Tablo VI: Grupların destek tedavileri ve engraftman kinetikleri verileri

	HER 2/neu negatif	HER 2/neu pozitif
Büyüme faktörü (hasta sayısı)		
G-CSF	16	8
GM-CSF	5	2
GF kullanmayan	2	3
Beyaz küre engraftmanı (ortalama gün±s sapma)	10,6±1,94	11,7±2,86
Platelet engraftmanı (ortalama gün±s sapma)	11,9±3,6	12,1±2,6
Eritrosit desteği (ünite)	2,8±1,9	2,6±1,3
Platelet desteği (ünite)	0,86±0,89	0,69±0,75
Ateşli gün sayısı (ortalama±s sapma)	4,7±3,2	3,7±1,9
Yatış süresi (ortalama±s sapma)	12,6±3,0	14,0±3,2
Pozitif kan kültürü (hasta sayısı)	12	4

HASTALIKSIZ SAĞKALIM VE TOPLAM SAĞKALIM

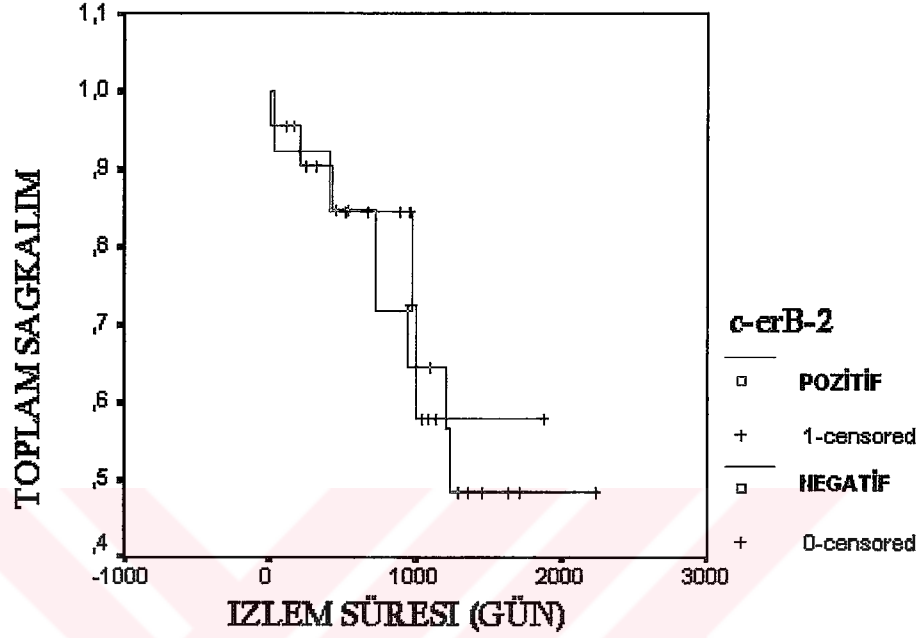
OPKHN uygulanan 54 adet evre IIIc olgusunun izleme süresi ortancası 925 gündür. Kaplan Meier ile hesaplanan 5nci yılda sağkalım olasılığı %58,5'dur. Bu olgulardan HER 2/neu durumu bilinen 36 hastanın yıllara göre sağkalım olasılıkları Tablo VII'de görülmektedir.

Tablo VII: HER 2/neu negatif ve pozitif grubun yıllara göre toplam sağkalım oranları

	HER 2/neu negatif	HER 2/neu pozitif
1nci yıl (%)	90,6	92,3
2nci yıl	71,8	84,6
3ncü yıl	64,7	58,2
4ncü yıl	48,5	58,2
5nci yıl	48,5	58,2

HER 2/neu negatif grupta ortanca 726 gün izlem süresinde 8 hasta, HER 2/neu pozitif grupta ise ortanca 967 gün izlem süresinde 4 hasta ölmüştür. 5nci yılda toplam sağkalım oranları arasında HER 2/neu negatif ve pozitif grup arasında fark saptanmamıştır. (%48,5 ve %58,2, p=0,86). Şekil 1'de grupların toplam sağkalım olasılığı eğrileri görülmektedir.

Şekil 1: HER 2/neu negatif ve pozitif grupların toplam sağkalım olasılıkları



Hastaların son durumları Tablo VIII’de özetlenmiştir. HER 2/neu negatif ve pozitif grupların beşinci yılda hastalıksız sağkalım olasılıkları arasında bir fark saptanmamıştır (%30,5 ve %43, $p=0,74$). Yıllara göre hastalıksız sağkalım oranları Tablo IX’da, hastalıksız sağkalım eğrileri Şekil 2’de görülmektedir.

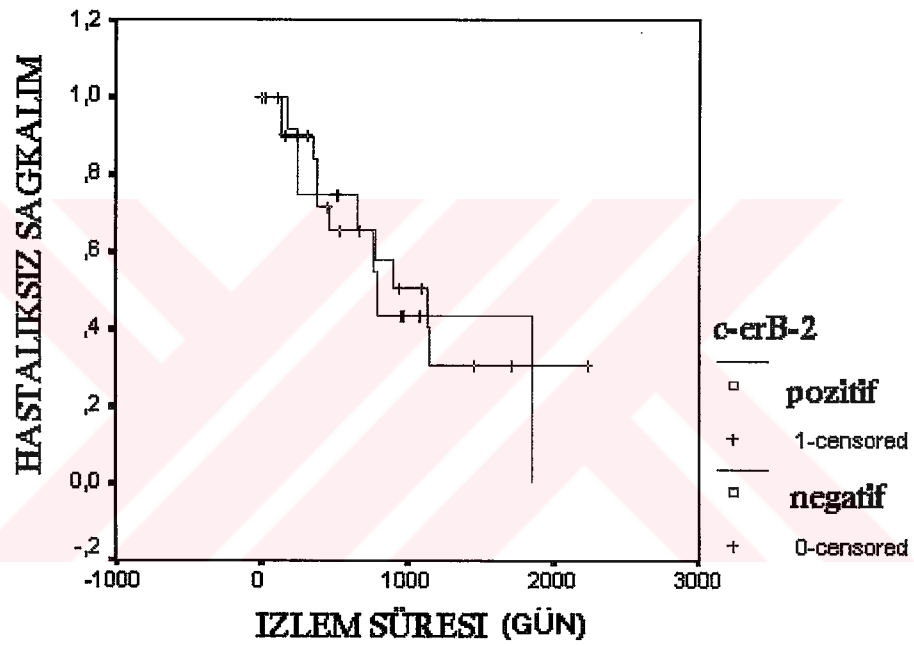
Tablo VIII: Hastaların son durumları (Ağustos 2004)

	HER 2/neu negatif (n=23)	HER 2/neu pozitif (n=13)
Ölü	8	4
Nükslü yaşam	3	5
Nüksüz yaşam	12	4

Tablo IX: HER 2/neu negatif ve pozitif grubun yıllara göre hastalıksız sağkalım olasılıkları

	<i>HER 2/neu negatif</i>	<i>HER 2/neu pozitif</i>
1nci yıl (%)	84,0	75,0
2nci yıl	65,4	54,6
3ncü yıl	50,9	43,0
4ncü yıl	50,9	43,0
5ci yıl	30,5	43,0

Şekil 2: HER 2/neu negatif ve pozitif grupların hastalıksız sağkalım eğrileri



HER 2/neu negatif ve pozitif grupların nüks yerleri Tablo X’da görülmektedir.

Tablo X: HER 2/neu negatif ve pozitif gruptaki nüks yerleri

	<i>HER 2/neu negatif</i>	<i>HER 2/neu pozitif</i>
Akciğer	2	2
Kemik	1	3
Karaciğer	1	-
Beyin	1	-
Perikart	-	1
Diğer meme	3	1
Nüksüz ölüm	1	2
Nüks yeri bilgisi eksik	2	-
<i>Toplam</i>	<i>11</i>	<i>9</i>

TARTIŞMA VE SONUÇ

GATA Kemik İliği Transplantasyon Merkezinde yüksek riskli meme kanserli 54 olgunun ortanca 925 günlük izlem sonrasında 5 yıllık sağkalım olasılığı, Kaplan Meier yöntemi ile %58,5 olarak saptanmıştır. Merkezimizin nakil sonuçları başarılıdır. Nakille ilişkili ölüm oranı %3,7'dir. İyi merkezlerin nakle bağlı ölüm oranının %5'in altında olması gerektiği vurgulanmaktadır (29).

Tanı ile nakil arasında geçen süre medyanı 131,0 gündür. 200 günden sonra nakil uygulanan 8 hasta vardır. Bunlar başka merkezlerden kliniğimize sevk edilen hastalardır. Hastalarımızın prospektif yürüyen çalışmalar çerçevesinde, kemoterapilerini, yüksek doz kemoterapilerini ve radyoterapilerini zamanında aldıkları görülmektedir.

Çalışmanın ana amacı, HER 2/neu durumunun yüksek doz kemoterapiden sonra hastalıksız sağkalıma ve toplam sağkalıma etkisini ortaya koymaktır. Çalışmamızda ortanca 30 aylık izlem sonrasında, HER 2/neu negatif ve pozitif gruplar arasında, 5 yıllık toplam sağkalım olasılığı açısından (%48,5 ve %58,2, log rank ile $p=0,86$) ve hastalıksız sağkalım oranları açısından bir fark bulunamamıştır (%30,5 ve %43,7, $p=0,74$). HS ve TS oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmasa da, HER 2/neu pozitif grupta sonuçlar daha iyi gibi görülmektedir. Bu sonuç, aşağıda özetlenecek olan literatür verilerine uymamaktadır.

Lenf düğümü negatif 118 hastanın tedavi verilmeden izlendiği bir çalışmada, ortanca 7 yıllık izlem sonrasında HER 2/neu pozitifliğinin tek değişkenli ve çok değişkenli analizde hastalıksız sağkalımla ilişkili olmadığı, ancak toplam sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (30). On yıl sonunda sağkalım olasılığı HER 2/neu pozitif grupta %93, negatif grupta %53 olarak bulunmuştur ($p=0,001$). Bu sonuç, dolaylı olarak HER 2/neu reseptör durumunun nüks saptandıktan sonra uygulanan tedavilere yanıt veya direnç durumunu yansıttığı biçiminde yorumlanabilir.

HER 2/neu durumunun yüksek doz kemoterapi sonrasında HS ve TS'a etkisi inceleyen çalışmalar şöyle özetlenebilir: Bitran ve arkadaşları, 10 ve üzerinde pozitif lenf düğümü olan 24 hastaya 6 kür standart CAF kemoterapisinden sonra, otolog kök hücre desteğinde yüksek doz kemoterapi ($2,5 \text{ g/m}^2$ siklofosamid 3 gün, 225 mg/m^2 tiotepa 3 gün) uyguladılar ve 3ncü yıl sonunda yalnızca HER 2/neu pozitif hastalarda 4 nüks saptadılar. Bu gözlemlerle HER 2/neu pozitif

hasta grubunun, yüksek doz kemoterapi aldıktan sonra da nüks açısından yüksek risk taşımaya devam ettiği sonucuna vardılar (31).

Nieto ve arkadaşları, başka prospektif bir çalışmaya katılmış olan on ve üzerinde pozitif lenf düğümü olan 66, dört ve üzerinde pozitif lenf düğümü olan 56 ve inflamatuvar meme kanseri olan 24 olguyu geriye dönük olarak incelediler (32). Bu hastalara yüksek doz kemoterapi protokolü olarak 5,625 mg/m² siklofosfamid, 165 mg/m² sisplatin, 450 veya 600 mg/m² BCNU uygulandı. İmmünohistokimyasal çalışma, monoklonal antikorlarla yapıldı. HER 2/neu pozitifliği birden üçe kadar derecelendirildi. HER 2/neu pozitifliği, nüks sıklığı ile ilişkili bulundu (p=0,0005) ve hastalıksız sağkalım (p=0,002) ve toplam sağkalım (p=0,02) için önemli negatif prediktif bir faktör olduğu saptandı. HER 2/neu pozitifliği, bir doğrusal değişken olarak (0→3+) ele alındığında, HS ile güçlü korelasyonu olduğu görüldü (p<0,05). 2+ ve 3+ tümörler arasındaki HS farkı anlamlı değildi (p<0,05). İmmünohistokimya skorlaması ile toplam sağkalım arasındaki korelasyon istatistiksel olarak önemli boyutta değildi (p=0,15). Sonuç olarak, immünohistokimyasal yöntemle saptanan HER 2/neu pozitifliğinin, HS ve TS için bağımsız negatif prediktif faktör olduğu bildirildi.

Yüksek riskli meme kanserinde, yüksek dozun etkinliğini ortaya koymada en önemli çalışmalardan biri Rodenhuis çalışmasıdır (20). Elli altı yaşın altında olan, meme operasyonu geçirmiş ve en azından 4 pozitif lenf düğümü olan 885 hasta, 443 kişilik standart doz ve 442 kişilik yüksek doz kollarına randomize edildi. Her iki grup 21 günde bir 4 kür FEC, radyoterapi ve hormon reseptör durumuna göre tamoksifen aldı. Yüksek doz kolu, dördüncü FEC ardından yüksek doz kemoterapi protokolü olarak 6 gr/m² siklofosfamid, 480 mg/m² tiotepa, 1600 mg/m² karboplatin aldı. Ortanca 57 ay izlem sonrasında, standart doz grubunda 5 yıllık sağkalım oranı %59, yüksek doz grubunda %65 (p=0,09) idi. On ve üzerinde pozitif lenf düğümü olan alt grupta standart doz grubunda hastalıksız sağkalım oranı %51, yüksek doz grubunda %61 (log rank ile saptanan p=0,05) idi. Ancak 4–9 arasında metastatik lenf düğümü olan alt grubun standart ve yüksek doz kolu arasında (%64 ve %66, p=0,54) ve 10 ve üzerinde metastatik lenf düğümü olan alt grubun standart ve yüksek doz kolu (%50 ve %60, p=0,05) arasında toplam sağkalım oranlarını arasında bir fark gözlenmedi. Tüm hastalar, HER 2/neu durumu açısından negatif (n=620) ve pozitif (n=181) alt gruplara ayrılarak birbiriyle karşılaştırıldı. HER 2/neu negatif alt grubun standart ve yüksek doz kolları arasında beş yıllık hastalıksız sağkalım açısından

istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu (%58 ve %74, $p=0,002$), beş yıllık toplam sağkalımın istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek doz kolunda daha uzun olduğu (%70 ve %78, $p=0,07$) saptandı.

Bitran ve Rodenhuis çalışmalarının sonuçlarının birbirine paralel olduğu görülmektedir. Bitran çalışmasında hasta sayısı yeterli değildir. Rodenhuis çalışmasının hasta sayısı ve izlem süresi yeterlidir. Ancak çalışmanın esas olarak HER 2/neu durumunun prognostik değerini ortaya koymaya yönelik planlanmadığını, alt grup analizlerinde böyle bir sonuç çıktığını unutmamak gerekir.

Tüm bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışmamızdaki ortalama 31 aylık izlem tatmin edici bir süredir. Toplam 36 hasta ile bu izlem süresi içinde güvenilir sonuçlara ulaşılması beklenir. Ancak izlem süremiz uzadıkça daha kesin sonuçlara ulaşılabilecektir.

Bazı çalışmalarda c-erbB-2 durumunu belirlemek için FISH kullanılmıştır. Ancak monoklonal antikorlarla yapılan immünohistokimya yöntemi güvenilir bir yöntemdir. HER 2/neu ifadesinin immünohistokimya ile ölçümünün c-erbB-2 gen amplifikasyonu ile çok iyi korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (33). Çalışmamızda arşivlenmiş parafin bloklar bir defada aynı patologlar tarafından çalışıldı. Böylece sonuçların daha güvenilir olacağı düşünülmüştü. Ancak parafin blokların immünohistokimya çalışması öncesinde $1394,7 \pm 707,3$ (ortalama 1394,0) gün beklediği dikkati çekmektedir. Bu kadar uzun bir bekleme süresinin immünohistokimya sonuçlarını olumsuz etkilemesi mümkündür (6).

Sonuç olarak, yüksek doz kemoterapiden daha çok yararlanan meme kanseri alt gruplarının tanımlanmasına gereksinim vardır. HER 2/neu durumunun meme kanserli hastaların yüksek doz kemoterapiden sonraki sağkalımlarıyla ilişkisi, ancak prospektif randomize çalışmalarla ortaya konabilir.

ÖZET

Meme kanserli hastalarda yüksek doz kemoterapinin sağkalıma etkisi tartışmalıdır. Prospektif randomize çalışmalar, belirli alt grupların daha çok yarar göreceğini göstermektedir.

GATA Tıbbi Onkoloji Kliniği Kemik İliği Transplantasyon Merkezinde 10 ve üzerinde metastatik aksiller lenf düğümü olan 54 meme kanserli olgunun ortalama 31 aylık izlem sonrasında 5 yıllık sağkalım olasılığı, Kaplan Meier yöntemi ile %58,5 olarak saptanmıştır. Nakille ilişkili ölüm oranı %3,7'dir.

Hastaların patoloji laboratuvarında arşivlenmiş olan parafin bloklarından immünohistokimyasal yöntemle HER 2/neu boyaması yapıldı. HER 2/neu negatif (n=23) ve pozitif grup (n=13) birbiriyle hastalıksız sağkalım ve toplam sağkalım açısından karşılaştırıldı.

Ortalama 30 aylık izlem sonrasında, HER 2/neu negatif ve pozitif gruplar arasında, 5 yıllık toplam sağkalım olasılığı açısından (%48,5 ve %58,2, log rank ile $p=0,86$) ve hastalıksız sağkalım oranları açısından bir fark bulunamamıştır (%30,5 ve %43,7, $p=0,74$). Hastalıksız sağkalım toplam sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmasa da, HER 2/neu pozitif grupta sonuçlar daha iyi gibi görünmektedir. Bu sonuç, literatür verilerine uymamaktadır. Bu uyumsuzluk, çalışmamızda, HER 2/neu için immünohistokimyasal çalışmanın, $1394,7 \pm 707,3$ (ortalama 1394,0) gün beklemiş olan parafin bloklarla yapılmış olmasından, izlem süresinin kısalığından ve hasta sayısının azlığından kaynaklanabilir.

HER 2/neu durumunun meme kanserli hastaların yüksek doz kemoterapiden sonraki sağkalımlarına etkisini ortaya koymak için prospektif randomize çalışmaların planlanması gereklidir.

SUMMARY

The role of high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in breast cancer is still controversial. If high-dose chemotherapy proves to benefit patients with breast cancer, it is quite likely that this benefit will be limited to a subgroup of patients.

Between March 1997 and June 2004, totally 54 breast cancer patients with at least 10 metastatic lymph nodes underwent to high-dose chemotherapy with HSCT. After a median follow-up of 31 months, the 5-year overall survival rate was %58.5. The transplantation related mortality was %3.7.

Depending on HER 2/neu status detected by immunohistochemistry of archival specimens, they were divided into HER 2/neu negative (n=23) and positive (n=13) groups. They were compared together regarding disease-free survival and overall survival. No statistically significant differences were detected between HER 2/neu negative and positive arms in 5-year disease-free survival (%30.5 and %43.7, $p=0.74$) and in overall survival (%48.5 and %58.2, $p=0.86$). Contrary to literature results, the survival rate in the HER 2/neu positive group seems to be superior. This may be caused by short follow-up period, small sample size and delayed immunohistochemistry staining of archival specimens.

To clarify the value of the HER 2/neu status in predicting outcome after high-dose chemotherapy, prospective randomized studies are needed.

KAYNAKLAR

1. King, CR, Kraus, MH, Aaronson, SA. Amplification of a novel c-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 229:974, 1985.
2. Slamon, DJ, Clark, GM, Wong, SG, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177, 1987.
3. Slamon, DJ, Godolphin, W, Jones, LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244:707, 1989.
4. Nieto Y., Cagnoni P.J., shapall J., Yerushalmi R., Cook B., Russell P., McDermit J., Murphy J., Bearmann S.I., Jones R.B.: Evaluation of the predictive value of HER 2/neu overexpression abd p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 18:2070-2080, 2000.
5. Muss H.B., Thor A.D., Berry D.A.: c-erbB-2 expression and response to adjuvant chemotherapy in women with node-positive early breast cancer. *N England journal of Medicine* 330:1260-1266, 1994.
6. Moliterni A., Menard S., Valagussa P., Biganzoli E., Boracchi P., Balsari A., Casalini P., Tomasic G., Marubini E., Pilottoi S., Bonadonna G.: Her2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21:458-462, 2003.
7. Smith K., Houlbrook S., Greenall M., Carmichael J., Haris A.L.: Topoisomerase IIalpha co-amplification with erB2 in human primary breast cancer and breast cancer lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity. *Oncogene*, 8:933-938, 1993.
8. Menard S., Valagussa P., Pilotti S., Gianni L., Biganzoli E., Boracchi P., Tomasic G., Casalini P., Marubini E., Bonadonna G.: Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *Journal of Clinical Oncology*, 19:329-335, 2001.

-
9. Goldhirsch A., Gelber R: Understanding adjuvant chemotherapy for breast cancer. Editorial. *New England Journal of Medicine*, 330: 1308-1309, 1994.
 10. Schakee-Koning C., Hamersma-van der Linden E., Hart G., Engelsman E.: Adjuvant chemo- and hormonal therapy in locally advanced breast cancer: a randomized clinical study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 11: 1759-63, 1985.
 11. Valagussa P., Bonadonna G., Veronesi U.: Patterns of relapse and survival following radical mastectomy: analysis of 716 consecutive patients. *Cancer* 41: 1170-1178, 2002.
 12. Singletary S., Alfred C., Ashley P., Basset L.W., Berry D, Bland K.I., Borgen P.: Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for breast cancer. *J Clin Oncol*, 20:3628-3636, 2002.
 13. Frei E., Antman K., Teicher B., Eder P., Schnipper L.: Bone marrow autotransplantation for solid tumors- prospects. *J Clin Oncol*, 7: 515-26, 1989.
 14. Frei E., Teicher BA., Holden SA., Cathart KNS, Wang Y.: Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose. *Cancer Res*, 48: 6417-23, 1988.
 15. Rodenhuis S, Bontenbal M, Beex LVAM et al. Randomized phase III study of high-dose chemotherapy with cyclophosphamide thiotepa and carboplatin in operable breast cancer with 4 or more axillary lymph nodes. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 19: 1a (Abstr 286), 2000.
 16. Rodenhuis S, Richel D, Van der Wall E., Schnornagel J.H., Baars J.W., Koning C.E.: Randomized trial of high-dose chemotherapy and haemopoietic progenitor-cell support in operable breast cancer with extensive axillary lymph node involvement. *Lancet*, 352: 515-521, 1988.
 17. Peters WP, Posner G, Vredenburg J et al. Updated results of a prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents (AA) as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes (LN): CALBG 9082. SWOG9114. NCIC MA-13. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: 21a (Abstr 81), 2001.
 18. Bergh J., Wiklund T., Erikstein B., Lidbrink E., Lindman H., Malmström P et al.: Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomized trial. Scandinavian Breast Cancer Group 9401 study. *Lancet*, 356: 1384-1391, 2000.

-
19. Rodenhuis S., Bontenbal M., Beex LVAM, van der Wall E., Richel D.J., Nooij M.A.: High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 349: 7-16, 2003.
 20. Rodenhuis S., Schrama J.G., Faneyte I.F., Schornagel J.H., Baars J.W., Peterse J.L., Vijver M.J.: Randomized trial of high-dose chemotherapy and hematopoietic progenitor-cell support in operable breast cancer with extensive lymph node involvement: final analysis with 7 years of follow-up. *Annals of Oncology*, 13:689-698, 2002.
 21. Crown J.P., Lind M., Gould A., Verrill M., Twelves C., Coleman R.: Conventional adjuvant chemotherapy versus single-cycle autograft supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients: a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 14:1076-1083, 2004.
 22. Crown J.P.: Poster presentation at the 2002 Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Orlando, Florida.
 23. Zander A.R., Krüger W., Kröger N., Schmoor C., Möbus V., Frickhofen N.: High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support vs. standard-dose chemotherapy in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes: first results of a randomized trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 21: 415a [abstract 1658], 2002.
 24. Roche H., Viens P., Biron P., Lotz J.P., Asselain B.: High-Dose Chemotherapy for breast cancer: The French PEGASE experience. *Cancer Control*, 10:43-47, 2003.
 25. Gianni A., Bonadonna G.: Five year results of the randomized clinical trial comparing standard versus high-dose myeloablative chemotherapy in the adjuvant treatment of breast cancer with >3 positive nodes. *Proc. Soc. Clin. Oncol.*, 20:21a [abstract 80], 2001.
 26. Raymond B.W., Rifkin R.M., Stewart F.M., Theriault R.L., Williams L.A., Herman A.A., Beveridge R.A.: High-dose chemotherapy for high-risk primary breast cancer: an on-site review of the Bezwoda study. *Lancet*, 355:999-1003, 2000.
 27. Tallman M.S., Gray R., Robert N.J., Lemaistre C.F., Osborne C.K.: Conventional adjuvant chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in high-risk breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 349:17-26, 2003.

-
28. Arpacı F., Kömürcü Ş., Öztürk B., Özet A., Kinalp C., Şengül A., Beyzadeoğlu M., Pak Y., Yalçın A.: A successful and simplified filgrastim primed single apheresis method without large volume apheresis for peripheral blood stem cell collection. *J. Clin. Oncol*, 30(3): 159-164, 2000.
29. Nieto Yago: The verdict is not in yet. Analysis of the randomized trials of high-dose chemotherapy for breast cancer. *Haematologica*, 88:201-211, 2003.
30. Zemzoum I., Ross J.S., Dettmar P., Dutta M., Henrichs C., Yurdseven S., Höfler H., Kiechle M., Schmitt M., Harbeck N.: Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21: 1022-28, 2003.
31. Bitran J.D., Samuels B., Trujillo Y., Klein L., Schroeder L., Martinec J.: Her2/neu overexpression is associated with treatment failure in women with high-risk stage II and stage IIIA breast cancer (>10 involved lymph nodes) treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support following standard-dose adjuvant chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 9:1509-1513, 1996.
32. Nieto Y., Cagnoni P.J., Shapall J., Yerushalmi R., Cook B., Russell P., McDermit J., Murphy J., Bearmann S.I., Jones R.B.: Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 18:2070-2080, 2000.
33. Liu E., Thor A., He M., Barcos M., Ljung B.M., Benz C.: The HER2 oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene*, 7:1027-1032, 1992.