

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Fehmi AKÇİÇEK



**İNSAN HER2/NEU POZİTİF, İNVAZİV MEME
KARSİNOMU HÜCRE HATTI OLAN MDA-MB453 DE
TRASTUZUMAB VE GOSSİPOL (AT-101)
KOMBİNASYONUNUN SİTOTOKSİSİTE VE
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülcan BULUT

TEZ DANIŞMANI:

Prof. Dr. F. Rüçhan USLU

İZMİR-2012

ÖNSÖZ

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman desteğini esirgemeyen İç Hastalıkları ABD başkanı Sn. Prof. Dr. Fehmi Akçiçek'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezin hazırlanmasındaki yol göstericiliğinden ve eğitimime sağladığı katkılardan dolayı Sn. Doç. Dr. Burçak Karaca'ya ve Sn. Prof. Dr. Rüçhan USLU' ya teşekkür ederim.

Tezin hazırlanmasından laboratuvar çalışmalarını özveriyle yürüten araştırma görevlisi Aslı Kısım'a teşekkür ederim.

İç Hastalıkları eğitimim boyunca servis ve poliklinik çalışmalarında verdikleri destek ve eğitimime sağladıkları katkılar nedeniyle bütün İç Hastalıkları öğretim üyelerine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteğini hissettiğim aileme ve özellikle biricik kızıma çok teşekkür ederim.

Meme kanseri tedavisiyle ilgili dünya çapında çalışmalar sürmektedir. Tedavide sağlanan ilerlemelere rağmen özellikle ileri evre hastalarda ölüm oranları yüksektir. Çalışmadan elde edilen verilerin meme kanserli hastaların tedavisine katkıda bulunmasını diliyoruz.

İÇİNDEKİLER:

Şekil, Tablo, Grafik Dizini.....	iv
Kısaltmalar Dizini	v
Özet	vi
Abstract	vii
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
Materyal ve Metod	33
Sonuçlar.....	42
Tartışma.....	55
Kaynaklar	63

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1	: Bitkisel kökenli kimyasal; Gossypol.....	24
Şekil 2	: Gossypol ün ve (-) Gossypol (AT-101)'un kimyasal yapıları.....	26
Şekil 3	: MDA-MB-453 hücrelerin floresan mikroskop altında boya olmaksızın görüntüsü. 35	
Şekil 4	: Otomatik sayım cihazındaki hücrelerin görünümü	36
Şekil 5	: XTT'in canlı hücrelerde suda çözünür.....	38

TABLO DİZİNİ

Tablo 1	: TNM evreleme	10
Tablo 2	: İki ilacın hücre kültürlerinde kombine kullanımının sinerjistik-aditif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri. 40	
Tablo 3	: AT-101'in MDA-MB-453 hücre hattında zamana ve doza bağlı sitotoksosite oranları.....	44
Tablo 4	: Trastuzumab 'in MDA-MB-453 hücre hattında zamana ve doza bağlı sitotoksosite oranları	47
Tablo 5	: AT-101 ve Trastuzumab(TB) kombinasyonunun sinerjistik etki saptanan konsantrasyonları ve CI değerleri.....	50
Tablo 6	: MDA-MB-453 hücre hattında 72. saatte değişik dozlardaki AT-101 ve trastuzumab in tekli ve sinerjistik kombinasyonlarında apoptotik etkileri (pozitif kontrol: % DNA fragmentasyonu: %11, Kaspaz 3/7 aktivitesi: %6)	54

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1A	: MDA-MB-453 hücre hatlarında 24. saatte AT-101'in değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları.....	43
Grafik 1B	: MDA-MB-453 hücre hatlarında 48. saatte AT-101'in değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları.....	43
Grafik 1C	: MDA-MB-453 hücre hatlarında 72. saatte AT-101'in değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları.....	44
Grafik 2A	: MDA-MB-453 hücre hatlarında 24. saatte Trastuzumab'ın değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları.....	46
Grafik 2B	: MDA-MB-453 hücre hatlarında 48. saatte Trastuzumab'ın değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları.....	46
Grafik 2C	: MDA-MB-453 hücre hatlarında 72. saatte Trastuzumab'ın değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları.....	47
Grafik 3	: MDA-MB-453 hücre hattında 72.saatte AT-101 ve Trastuzumab(TB) in değişik konsantrasyonlarda kombinasyonunda gözlenen sitotoksosite	49
Grafik 4	: AT-101 ve trastuzumab in tekli ve kuvvetli sinerjistik kombinasyonlarında gözlenen %DNA fragmentasyonu oranları	52
Grafik 5	: AT-101 ve trastuzumab in tekli ve kuvvetli sinerjistik kombinasyonlarında gözlenen % Kaspaz 3/7 enzim aktivite oranları	52

KISALTMALAR LİSTESİ

ADCC	:	Antikor bağımlı hücresele sitotoksisite
AT -101	:	R-(-)-gossypol acetic acid
Akt	:	Protein Kinase B (PKB)
Bad	:	Bcl-2-associated death protein
Bax	:	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	:	B-cell lymphoma protein
Bcl-xl	:	B-cell lymphoma-extra large
BH3	:	Bcl-2 homoloji 3
BRCA 1	:	Breast and ovarian cancer susceptibility protein 1
BRCA 2	:	Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2
EGF	:	Epidermal büyüme (çoğalma) faktörü (Epidermal growth factor)
ER	:	Östrojen reseptör
ERK1/ERK2	:	MAPK p42/p44
FasL	:	TNF süper ailesinin 6. üyesi
FGF	:	Fibroblast büyüme (çoğalma) faktörü (Fibroblast growth factor)
HER-2 (Cerb-B2)	:	Epidermal büyüme (çoğalma) faktörü reseptör-2
HIV	:	Human immunodeficiency virus
HT	:	Hormonoterapi
IC50	:	Hücrelerin yarısını öldüren doz (Inhibition concentration of %50)
IGF 1	:	İnsülin benzeri büyüme (çoğalma) faktörü 1 (Insulin like growth factor 1)
IGFBP	:	İnsülin benzeri büyüme (çoğalma) faktörü bağlanma proteini (Insulin like growth factor binding protein)
CI	:	Kombinasyon indeksi (Combination index)
KT	:	kemoterapi
MAPK	:	Mitogen activated protein kinases VI
Mcl-1	:	Myeloid cell leukemia sequence 1
MG	:	Mamografini
MUC-4	:	Membrane-associated glycoprotein
NFκB	:	Nuclear factor-kappa B
NK	:	Natural killer p21 : protein 21
p53	:	protein 53
PKC	:	Protein kinaz C
PR	:	Progesteron reseptör
PTEN	:	Phosphatase and tensin homolog
RT	:	Radyoterapi
SD	:	Standart sapma (Standart deviation)

ÖZET

Meme kanseri gelişmiş ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanserdir. Mortalite ile sonuçlanan kadın kanserlerinde ikinci en sık görülenidir. Meme kanserinde kemoterapi, hormonoterapi, monoklonal antikorla tedavi ya da radyoterapi tedavi seçeneklerindedir. Kemoterapötik ajanların en önemli etki mekanizması apoptosizdir.

AT -101(R-(-)-gossypol asetik asit) pamuk tohum yağından elde edilen BH3(bcl-2 domain 3) mimetik ajandır. Gossypol' un daha önce in vitro ve in vivo çalışmalarda hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozisi tetikleyerek anti-kanser etki gösterdiği bilinmektedir. Anti-kanser etkisini antiapoptotik olarak bilinen Bcl-2, Bcl-xL, ve Mcl-1 i inhibe ederek yapmaktadır.

Meme kanserinin %20-25 de HER2/neu reseptör aşırı ekspresyonu olmaktadır. Trastuzumab meme kanseri tedavisinde endikasyon almış HER2/ neu reseptörünü hedef alan bir monoklonal antikordur.

Bu çalışmada HER2/neu yüksek oranda exprese eden MDA-MB 453 meme karsinomu hücre hattında trastuzumab ve gossypol' un sinerjistik sitotoksik/apoptotik etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common in women at the advanced countries. It is the second most common cancer resulting death. Theratment options include chemotherapy, hormone therapy, radiotherapy and therapy with monoclonal antibodies. The most important mechanism of the chemotherapatic agents is on apoptosis.

AT -101(R-(-)-gossypol acetic acid) is a BH3 mimetic agent produced by cotton seed oil. It has been demonstrated that gossypol shows its anti-cancer effects through inhibition of the cell proliferation and triggering apoptosis by in vivo and in vitro studies. AT-101 to inhibit known as anti apoptotic moleculer such as bcl2, Bcl-xL, and Mcl-1

There is on over-expresion of HER2/neu receptor in %20-25 of the breast cancers. Trastuzumab is a monoclonal antibody licenced in treatment of breast cancer. It is a monoclonal antibody trageting HER2/neu receptor.

In this research we aim to study the synergystic cytotoxic/apoptotic effects of the transtumab/gossypol in HER2/neu receptor over expressing MDA-MB-453 breast cell line.

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, yine kadınlarda akciğer kanserinden sonra kanser ile ilişkili ölümlerin en sık sebebidir (1). Son 50 yılda meme kanserinin erken tanınması ve yeni tedavi modalitelerinin gelişmesi ile birlikte meme kanseri ile ilişkili ölüm oranları azalmıştır (2). Meme kanserinin %20-25 de bir Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2 veya HER2/neu) reseptör geninde aşırı ekspresyon olmaktadır. Bu gendeki overekspresyon ve/veya amplifikasyon sonucu meme kanseri hücreleri daha agresif bir şekil almaktadır (3,4). HER2/neu reseptör geninin meme kanseri etiyojisindeki rolünün saptanması sonrasında bu geni hedef alan ilaçlar klinik kullanıma girmiştir. (5) Trastuzumab bu tarz bir genetik değişiklik görülen meme kanseri hücrelerinde HER2' yi hedefleyen bir monoklonal antikordur (6). Transtuzumab dışında bir başka küçük molekül tirozin kinaz inhibitörü olan Lapatinib ise HER2' i ve EGFR- 1 'i inhibe ederek etki gösterir.

HER2/neu reseptörü pozitif meme kanserli hastalarda Trastuzumabın adjuvan, neoadjuvan ve metastatik hastalıkta tedaviye eklenmesi hastalarda belirgin iyileşme sağlamıştır (7-10).

AT -101(R(-)-gossypol asetik asit) ise pamuk tohumundan elde edilen doğal, sarı renkli bir polifenolik aldehittir. Yapılan çalışmalarda anti-tümöral, anti-viral, anti-paraziter ve anti-oksidan etkileri saptanmıştır. Gossypol' ün birçok enzimatik sistem, hücre siklusu düzenleyici proteinleri, hücre membranı ve mitokondri membranı ile etkileşime girdiği ve bu yolaklar ile etkilerini meydana getirdiği saptanmıştır. Gossypol' ün meme kanseri üzerindeki etkileri in vitro olarak hücre hatlarında ve Faz I/II klinik çalışmalarda araştırılmıştır. Ancak literatürde, meme kanseri hücre hatlarında trastuzumab ile gossypol 'ün kombinasyonlarına ait çalışma yer almamaktadır.

Çalışmamızın amacı; in vitro verilerde meme kanseri hücre hatlarında etkinliği gözlenen ve faz I/II klinik çalışmalarda ciddi sistemik yan etkileri saptanmamış olan gossypol' un HER2 pozitif MDA-MB-453 invaziv meme kanseri hücre hattındaki sitotoksitesini araştırmak ve trastuzumab ile kombine edildiğinde

olası aditif, sitotoksik ve apoptotik etkilerinin bulunup bulunmadığını gözlemlemektir.

Çalışmamız Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

‘İn vitro deneylere başlamadan önce E.Ü.T.F. Etik kurul (karar no: 11-1/45) onayı alınmıştır.’

‘Uzmanlık tezi; 2011-tıp-055 nolu projeyle E.Ü.T.F. Bilimsel Araştırma Proje fonu tarafından desteklenmiştir.’

GENEL BİLGİLER

1. Epidemioloji:

Meme kanseri dünyadaki her altı kadından birinde, invaziv meme kanseri ise her sekiz kadından birinde gelişebilmektedir. Deri kanserlerinden sonra kadınlarda en sık görülen kanserdir. Akciğer kanserinden sonra en sık kanser ile ilişkili ölüm nedenidir. Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 178.000 yeni meme kanseri vakası görülürken, her yıl ABD'de 41.000 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (1). Hastalık uzun seyirli olup heterojen bir yapıya sahiptir. Hastalığın tanıdan önceki periyodu klinik olarak belirgin hale gelmesi ve metastazların ortaya çıkma süreci 1 yıldan 10 yıla kadar değişebilmektedir. Hastalığın tanı öncesi periyodu ile klinik bulguların ve metastazların ortaya çıkma süreci 1 yıldan 10 yıla kadar değişebilmektedir (11). Erken tanı ve gelişen sistemik tedavi sayesinde meme kanserinin mortalitesi azalmaktadır. Meme kanseri tedavisinde son yıllarda olumlu gelişmeler olsa da, ileri evre hastalıkta kür şansı yoktur (1).

2.Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri gelişen kadınların yaklaşık sadece %25'inde belirgin bir risk faktörü vardır. Bu risk faktörlerinin çoğu östrojene maruziyet süresi ve miktarı ile ilişkilidir. Östrojene maruziyet süresi arttıkça meme kanseri görülme riski artmaktadır. Meme kanseri olan hastaların %20-30'unun ailesinde en azından bir kadında meme kanseri öyküsü mevcuttur. Ancak meme kanserinin %10'unda herediter predispozisyon görülür. Bu herediter predispozisyonun en önemlileri BReast CAncer (BRCA) 1 ve 2 gen mutasyonlarıdır. Meme kanseri ile ilişkili bu genler (BRCA 1 ve BRCA 2) % 5 ile %10 vakada görülmektedir. Bu geni taşıyan kadınların yaşamları boyunca meme kanseri gelişme riski %50 ile %80 arasındadır. Meme kanseri gelişimi açısından risk faktörleri yüksek, orta ve düşük olarak sınıflandırılabilir (11).

- Yüksek risk faktörleri; ileri yaş, hastanın kendisinde meme kanseri hikâyesi, premenopozomal bilateral ailesel meme kanseri hikâyesi, ailesel kanser sendromları ve meme biyopsisinde atipi içeren proliferatif hastalık gösterilmesidir (11).
- Orta risk faktörleri; birinci derece akrabalarında meme kanseri olması, hastanın kendisinde over veya endometrium kanseri hikâyesi, ilk gebeliğinin 30 yaşının üzerinde olması, hiç gebe kalmamış olma, postmenopozal kadında obezite ve yüksek sosyoekonomik seviye olarak tanımlanmaktadır (11).
- Düşük risk faktörleri ise 12 yaşından önce menarş, 55 yaşından sonra menopoz, alkol alımı, beyaz ırktan olmak, uzun süreli (15 yıl veya daha fazla süreli) östrojen replasman tedavisi almak olarak tanımlanmıştır (11).

Meme kanseri açısından yüksek riskli kadınlar düzenli takip edilmeli ve bu yüksek riskli hastaların bazılarında profilaktik mastektomi, oofektomi veya tamoksifen gibi seçenekler düşünülmelidir (1).

3.Tarama:

Meme kanserinin sık görülmesi ve erken evrede tedavisinin mümkün olması nedeniyle tarama önerilmektedir (1). 50 yaş ve üzerinde mamografinin (MG) tarama aracı olarak kullanılması; meme kanseri ile ilişkili mortaliteyi %20-30 oranında azaltmıştır (12). MG ve fizik muayene ile taramada 50 yaşından büyük 1000 kadının 10 unda, 50 yaşından küçük 1000 kadının 2 sinde meme kanseri saptanmaktadır. Tarama ile lenf nodu tutulumu olmadan meme kanserinin %80 tanınabilmektedir. Böylelikle 5 yıllık sağkalım %85' e yükselmektedir. Taramada fizik muayene ve MG birlikte kullanılmalıdır. Sadece MG ile erken meme kanserlerinin %35-50' si saptanırken sadece fizik muayene ile %40' ı saptanabilir. 40 yaşın üzerinde ise meme muayenesi yıllık yapılmalıdır (11).

MG kitle palpe edilmeden önce meme kanserini tanımlamada en güvenilir araçtır. Yavaş büyüyen tümörler mamografi ile palpe edilecek çapa ulaşmadan 2 yıl öncesinde MG ile saptanabilir. MG' de meme kanseri ile ilişkili en sık bulgular küme yapmış polimorfik mikro kalsifikasyonların bulunmasıdır. Dominant veya şüpheli kitlesi olan hastaya mamografik bulguya bakılmaksızın biyopsi yapılmalıdır.

Normal MG meme kanserini ne yazık ki ekarte ettirmez. Şüpheli bir lezyon olduğunda fizik muayene ve ultrasonografi (USG) ile de değerlendirilmelidir (1). Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) yüksek riskli meme kanserlerinde kullanılabilir ancak tüm popülasyona uygulanamaz. MRG' in duyarlılığı MG' den daha yüksektir ancak özgüllüğü daha düşüktür. Meme implantı olanlarda, önceden lumpektomi olan veya radyoterapi (RT) alan hastalarda MRG faydalıdır.

4. Klinik Bulgular:

Hastaların %80'inin şikâyeti ağrısız kitledir. Daha nadir semptomlar meme ağrısı, akıntı, erozyon, çekinti, kızarıklık, genel katılık ve meme başının itilmesidir. Nadiren aksiller kitle, kolda şişlik ilk belirti olabilir. Sırt-kemik ağrısı, sarılık, kilo kaybı gibi sistemik metastaz bulguları da nadiren başlangıç semptomu olarak görülebilir. En sık üst dış kadranda (%60) lezyon görülürken, %15'i üst iç kadranda, %15'i alt dış kadranda, %5'i alt iç kadranda %5'i ise areola etrafında görülür (1).

5. Tanı:

Tanı histopatolojik olarak koyulur. Fizik muayenede veya MG' de saptanan bütün şüpheli lezyonlara biyopsi yapılmalıdır. Kanser olduğu düşünülen lezyonların %60'ı benign, benign olduğu düşünülen lezyonların %30'u da maligndir. Bu nedenle bütün meme kitlelerine biyopsi ile tanı konmalıdır (1).

6. Patolojik Tipler:

Meme kanserlerinin yaklaşık %15-%25'ini in-situ karsinomlar kalan %75-85'ini de invaziv meme kanserleri oluşturmaktadır (1).

Meme kanseri memenin duktuslarından veya lobüllerinden köken almasına göre duktal ve lobüler olarak sınıflandırılmaktadır. Karsinoma in-sitular ise metastaz yapmayan ve bazal membranı invaze etmeyen lezyonlardır.

1-Karsinoma in-situ:

Duktal Karsinoma in-situ

Lobüler Karsinoma in-situ

2-İnvaziv Meme Kanseri:

İnvaziv duktal karsinom- %76

İnvaziv lobüler karsinom- %8

Duktal/lobüler karsinom- %7

Müsilöz (kolloid) karsinom- %2,4

Tübüler karsinom- %1,5

Medüller karsinom- %1,2

Papiller karsinom- %1

Metaplastik meme kanseri ve mikropapiller meme kanserini de içeren diğer alt tiplerin oranı %5'ten az bulunmuştur. (11)

7. Prognostik Faktörler:

Tek başına en iyi prognostik faktör tutulan aksiller lenf nodu sayısıdır. Tümör çapı lenf nodu durumundan sonra en önemli prognostik faktördür.

Meme kanseri her bir hastanın ayrı ayrı değerlendirilmesi gereken kompleks bir moleküler süreçtir. Geleneksel histolojik sınıflandırma geniş klinik spektrumu kapsamamaktadır. Histolojik olarak aynı tümörlerde moleküler farklılıklar olduğundan, farklı klinik davranışlar izlenmektedir. Son 10 yıldır geliştirilen gen tarama teknikleriyle, bir tümörde, tek seferde binlerce gen ve gen ürünü saptanmakta ve bunlar yeni prognostik markırlar belirleme, tedaviye yanıtı öngörme ve yeni hedefleyici tedaviler geliştirilmesinde kullanılmaktadır (13). Perou ve ark. 2000 yılında gen ekspresyon örnekleriyle invaziv meme kanserinin ilk alt tiplerini belirleyerek 'Orijinal Perou Sınıflaması' adı verilmiştir. (13). Bu çalışmada invaziv meme kanserlerinin gen profilleri çıkarılarak farklı moleküler fenotiplerin olduğu belirlenmiş, kanserli doku ve normal meme dokusu örneklerinden DNA testi ile elde edilen gen haritası içinde bir grup 'intrensek gen' saptanmıştır. (14). İntrensek genler farklı tümörler arasında çeşitli varyasyonlar oluşturmaktaydı. Bu varyasyonlarla moleküler sınıflandırmanın 6 alt tip belirlendi.

- Bazal- like hastalık; Triple negatif, CK 5/6 ve EGFR (+)
- Her-2 pozitif hastalık; ER, PR(-), Her-2(+), CK 5/6 ve EGFR (-)
- Normal meme benzeri; ER (-)/(+), Her-2 (-), CK 5/6 ve EGFR (+)
- Luminal A hastalık; ER(+), PR(+), Her-2 (-), CK 5/6 ve EGFR (-)
- Luminal B hastalık; ER (+)/(-),PR(+)/(-), Her-2 (+)/(-), CK 5/6 ve EGFR (-)
- Claudin- low hastalık; Triple negatif, CK 5/6 ve EGFR (+)/(-)

1. Basal-like: Bu tümörlerin %90'ı ER negatif, PR negatif ve HER-2 negatifti. % 95 oranında ER negatif olan bu grubun %91'i yüksek grade'li tümörlerden oluşmaktadır (15). Myoepitelyal hücre belirteçlerinin pek çoğu bu tümörde mevcuttur [CK 5/6, CK17, p-kadherin, caveolin 1-2, nestin, CD-44 ve EGFR (+)] ve P53 mutasyonu çok sıktır. Bu meme kanserinde BRCA-1 mutasyonu (germline ya da epigenetik susturma) da sık saptanmaktadır. EGFR; bazal-like kanserlerde yüksek oranda pozitiflik gözlenen bir yeni moleküler belirteçtir. Triple negatif tümörlerle klinik anlamda eşanlamda kullanılmasına rağmen moleküler anlamda çok fazla gen mutasyonu vardır.
2. HER-2 pozitif: Aşağıda ayrıntılı olarak anlatılacaktır.
3. Normal-like: Net olarak tanımlı moleküler bir alt yapısı yoktur.
4. Luminal-like -A: Luminal-A tümörlerde en yüksek ER ekspresyon düzeyi saptandı. GATA-binding protein 3, X-box binding protein 1, Trefoil factor 3, hepatocyte nuclear factör 3-alfa ve LIV-1'in yüksek düzeylerde ekspresyonu saptandı (12). Hormonoterapiye çok iyi yanıt verir. İyi prognozludur.
5. Luminal-B tümörlerde, luminal spesifik gen ekspresyon düzeylerinin daha az ve bazılarında HER-2 pozitifliği olduğu görüldü. P53 gen mutasyon oranının, Luminal-B'de Luminal-A tümörlerden daha fazla olduğu belirlendi. Lüminal B'i Luminal-A hastalıktan ayıran özelliği Ki-67 proliferasyon indeksinin yüksekliğidir. 2009 yılı St. Gallen Meme Konsensusu'nda da Ki-67'nin prognostik önemi kabul edilmiş ve IHC'sal olarak değerlendirilen Ki-67 için <%14 düşük risk, %15-30 orta risk ve > %30 yüksek risk grubu olarak kabul

edilmiştir. Lüminal B hastalık Lüminal A ya göre HER-2 pozitifliği nedeniyle daha kötü prognozludur. Bütün luminal grup meme kanserlerinde ER pozitifliği mevcuttu ve bunların üçte ikisi düşük veya orta histolojik grade'liydi.

6. Claudin-low tipi hastalık: İlk kez 2007'de tanımlanmıştır. İntersellüler adezyon molkeüllerinin düşük ekspresyonu ile karakterizedir. (claudin 3,4,7, cingulin, e –kadherin gibi). Bazal-like hastalığa benzer bir moleküler yapılanması vardır. (16)

Bu moleküler sınıflama, tedaviye yanıtı öngörmek için kullanılmaktadır. Örneğin; neoadjuvan tedaviye en iyi yanıtı verenler bazal-like ve HER2 (+) olan gruplardır (17). GEP metodu ile aynı zamanda BRCA (Breast Cancer Gene) mutasyonu ile ilişkili olan sporadik meme kanserleri saptanabilir. (18). Ayrıca bu yöntem ile lenf nodu negatif veya 'grade' II tümörlerin prognostik olarak kategorize edilmesi mümkün olabilmektedir.(19) Bu sınıflama ile yeni hedefleyici tedaviler belirlenmesi amaçlanmaktadır.

8. Evreleme:

Meme kanseri; tümör çapı, lenf nodu sayısı, metastaz varlığına göre yapılan TNM sınıflaması ile Evre 0' dan Evre 4' e kadar evrelendirilir. Tümörün evresi arttıkça 5 yıllık sağkalım azalmaktadır. Bütün dünyada meme kanserinin evrelemede TNM sistemi kullanılır. T primer tümörün çapını, N bölgesel lenf nodu metastazını, M uzak metastazı gösterir. Evre I, IIA ve IIB opere edilebilir hastalık; evre IIIA ve IIIB lokal ileri hastalık; evre IIIC ileri hastalık; evre IV ise metastatik hastalık olarak sınıflandırılır (11).

8.1. Primer tümör (T) :

Tümör kitlesi olan Paget hastalığı tümörün boyutuna göre sınıflandırılır. Meme başı çekintisi, derinin çukurlaşması ve diğer deri değişiklikleri sınıflandırmayı etkilemeksizin T1, T2 veya T3 tümörlerde de oluşabilir. Göğüs duvarına; kostalar, interkostal kaslar ve ön serratus kasları dahil, pektoral kas dahil değildir (1, 19).

-TX: Primer tümör değerlendirilemiyor.

-T0: Primer tümör bulgusu yok.

-Tis: Karsinoma in situ Tis (DCIS): Duktal karsinoma in situ Tis (LCIS): Lobüler karsinoma in situ Tis (Paget): Tümör kitlesi olmayan meme başının Paget hastalığı

-T1: En büyük çapı 2 cm veya daha az tümör

- T1mic: En büyük çapı 0,1 cm veya daha az olan mikroinvazyona sahip tm
- T1a: En büyük çapı 0,1 cm' den daha büyük olan ama 0,5 cm' yi geçmeyen tümör
- T1b: En büyük çapı 0,5 cm' den daha büyük olan ama 1 cm' yi geçmeyen tm
- T1c: En büyük çapı 1 cm' den daha büyük olan ama 2 cm' yi geçmeyen tm

-T2: En büyük çapı 2 cm' den büyük fakat 5 cm' den küçük tümör

-T3: En büyük çapı 5 cm' den büyük tümör

-T4: Boyutu ne olursa olsun, göğüs duvarı veya cilde direkt yayılım gösteren tümör

- T4a: Pektoral kas tutulumu olmadan göğüs duvarına yayılım
- T4b: Meme derisinin ödem (portakal kabuğu görünümü dâhil) veya ülserasyonu ya da aynı memede satellit deri nodülleri
- T4c: T4a ve T4b' deki bulguların birlikte olması
- T4d: İnflamatuvar karsinoma

8.2. Bölgesel Lenf Bezleri (N)

-NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

-N0: Bölgesel lenf bezi metastazı yok

-N1: Aynı tarafta mobil aksiller lenf bezi metastaz varlığı

-N2: Birbirlerine veya çevre yapılara fikse aynı taraftaki aksiller lenf bezleri veya aynı taraf internal mammaryal lenf bezlerine metastaz varlığı

- N2a: Birbirlerine veya çevre yapılara fikse aynı tarafta aksiller lenf nodu metastazı varlığı
- N2b: Klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın aynı taraftaki internal mammaryal lenf nodlarına metastaz varlığı,

-N3: Aynı taraftaki infraklaviküler lenf nodlarına metastaz veya hem aynı taraftaki internal mammaryal lenf nodlarına hem de aksiller lenf nodlarına metastaz ya da aynı taraftaki supraklaviküler lenf nodlarına metastaz varlığı

- N3a: Aynı taraflı infraklaviküler lenf nodlarına metastaz varlığı
- N3b: Hem aynı taraftaki internal mammaryal lenf nodlarına hem de aksiller lenf nodlarına metastaz varlığı
- N3c: Aynı taraftaki supraklaviküler lenf nodlarına metastaz varlığı

8.3. Uzak metastaz (M)

-MX: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

-M0: Uzak metastaz yok

-M1: Uzak metastaz var

Tablo 1: TNM evreleme:

Evre 0	Tis, N0, M0
Evre I	T1, N0, M0
Evre IIA	T0, N1, M0 T1, N1, M0 T2, N0, M0
Evre IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
Evre IIIA	T0, N2, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
Evre IIIB	T4, N0, M0 T4, N1, M0 T4, N2, M0
Evre IIIC	Herhangi bir T, N3, M0
Evre IV	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

9. Tedavi:

Meme kanserinde uygulanacak tedavi şekli birçok faktöre göre belirlenmektedir. En önemlileri aksiller lenf nodu metastazı, tümör boyutu, tümörün daha önce bahsedilen moleküler sınıflaması, hastanın yaşı, menapozal durumu ve performansı olarak sıralanabilir.

Evre I, II ve III meme kanserinin tedavisinde seçilecek kemoterapi tartışmalıdır. Şu anda evre I, II ve III hastalarda standart tedavi cerrahi tedaviyi takiben adjuvan radyoterapi veya sistemik tedavidir. Neoadjuvan tedavi cerrahi öncesi kemoterapi ile tümör çapını küçültmeye yönelik kullanılan bir tedavidir. Böylelikle mastektomi gereken hastalara lumpektomi yani meme koruyucu cerrahi (MKC) yapılabilir (1). Primer tedaviden sonra ek sistemik tedavinin (adjuvan) sistemik rekürrens riskini azalttığı ve genel sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Adjuvan tedavi kemoterapi (KT) ve hormonoterapi (HT)' den oluşmaktadır (11).

9.1. Primer veya Lokal - Bölgesel Tedavi

Primer lokal tedavi lumpektomi (meme koruyucu cerrahi- MKC) ve takiben RT veya mastektomidir. Randomize kontrollü çalışmalarda MKC ile mastektomi arasında genel sağkalımda farklılık gösterilememiştir. Ancak mastektomi daha az lokal rekürrens ile ilişkilidir (11).

Erken evre meme kanserli hastalarda tercih edilen tedavi formu MKC ve radyoterapidir. Meme koruyucu cerrahinin yapılıp yapılamayacağını belirleyen en önemli durum tümörün çapıdır. Klinik olarak tanımlanan multifokalite MKC için relatif bir kontredikasyondur. Göğüs duvarı, deri, meme başı ve etrafındaki deriye fiske olmuş tümörler de relatif kontredikasyondur. Aksiller diseksiyon aksiller rekürrensleri önlemede faydalıdır. Aynı zamanda tümörün önlenmesinde ve tedavinin planlanmasında da değerlidir (1). Radikal mastektomide ise pektoral kasta eksize edilir.

9.2. Adjuvan Hormonoterapi:

Başlangıç biyopsinin ER ve PR pozitifliği meme kanserinin yönetiminde kritik öneme sahiptir. Reseptör pozitif hastalar HT alabilmektedirler. Adjuvan hormonal tedavi; reseptör pozitif tümörlerde yaşa, menopozal duruma, diğer prognostik faktörlere, alınan kemoterapiye, HER2/neu durumuna bakılmaksızın sağ kalım oranlarını artırır (1). Başlıca iki tip antiöstrojen tedavi vardır. Postmenopozal hastalar östrojen biyosentezindeki son biyolojik basamağı inhibe ederek östrojen üretimini azaltan aromataz inhibitörleri (örn. letrozol, anastrozol ve ekzemestan) ile tedavi edilir. Aromataz inhibitörleri fonksiyon gören overi olan hastalarda overyan fonksiyonlar bloke edilmeden kullanılmamalıdır. Son menstürel siklustan bir yıldan daha az zaman geçmiş hastalar premenopozal kabul edilirler. Potent selektif östrojen modülatörü olan tamoksifen premenopozal hastalarda en sık kullanılan hormonal tedavidir (1).

9.3. Adjuvan Kemoterapi:

Lokal ileri meme kanserleri (T3, T4) ve inflamatuvar meme kanseri bile kür olabilir (1, 20). Adjuvan sistemik tedavi orta ve yüksek risk gruplarındaki kadınlara önerilmektedir. KT rekürrens riskini azaltır ve genel sağkalımı iyileştirir. Bu etkisini hem lenf nodu negatif hem de pozitif hastalarda gösterir. Ancak HT' den daha toksiktir (11). Adjuvan tedavi 10 yıllık relaps riski olan meme kanserli hastalara önerilir. Bu grup patolojik tümör çapı 1 cm ve üzerinde olan İnvaziv duktal ve lobüler karsinomları ve tümör çapı ile histolojik bulgularına bakılmaksızın aksiller lenf nodu pozitif olan tüm hastaları içerir (11). Negatif lenf nodu olan kadınlarda da %25 ihtimalle mikroskobik metastatik hastalık görülmektedir (1). Bu nedenle lenf nodu negatif yüksek riski hastalarda da adjuvan tedavi endikasyonu vardır (11).

Adjuvan tedavide çeşitli KT rejimleri verilmektedir. Bunlar arasında 6 kür TAC (taksotere/dosetaxel adriamisin, siklofosfamid), 4 kür AC (adriamisin, siklofosfamid) ile takiben 4 kür paklitaksel, 6 kür CEF (siklofosfamid, epirubisin, 5 florourasil); 4 kür CAF (siklofosfamid, adriamisin, 5 florourasil); 4 kür TC (taksotere, siklofosfamid) gibi çeşitli kemoterapi rejimleri bulunmaktadır. (21).

Kemoterapi kombinasyonları tek ajanlı tedavilerden daha üstündür ve genellikle antrasikline dayalı tedaviler tercih edilmektedir. Antrasiklinlerin diğer ajanlarla kombinasyonu antrasiklin içermeyen kombinasyonlara göre daha fazla sağkalım avantajı sağlamaktadır. Randomize çalışmalarda CAF ve CEF' in klasik CMF (siklofosfamid, metotreksat, fluorourosil) tedavisinden üstün olduğu gösterilmiştir. Ancak antrasiklinlerin kardiyak toksisite ve lösemi gibi komplikasyonları vardır. Antrasiklin ve taksanlar metastatik meme kanserli hastalarda en aktif ajanlar olduğundan antrasiklin ve taksan kombinasyonu erken evre meme kanserinde de kullanıma girmiştir (11). Yüksek riskli lenf nodu negatif hastalar da taksanlar ile tedavi edilmelidir (1). Adjuvan KT' nin tam süresi hala belli değildir. Şu andaki öneriler 3 ile 6 ay arasında değişmektedir. Taksanların eklenmesi ile KT süresi 6 aya kadar uzamaktadır. KT' nin frekansının artırılmasının (doz yoğun kemoterapi) standart tedaviye üstün olduğu gösterilmiştir. Fiziksel olarak tolere edilmesi zor bir rejim olması nedeniyle sıklıkla rekürrens riski yüksek olan hastalarda veya genç hastalarda kullanılır (1).

9.4. Metastatik Meme Kanseri Tedavisi

Tanı anında yaklaşık %10-15 meme kanserli olguda metastatik hastalık mevcuttur. Erken evre veya lokal ileri evre meme kanserlerinde tedavi sonrası oluşan nükslerin çoğu, izole lokal nüksten ziyade yaygın metastatik hastalık şeklinde olmaktadır. En sık uzak metastazlar kemik, karaciğer ve akciğere olmaktadır. Metastaz görülme olasılığı en sık tanı sonrası 2-3. yıllardadır (22).

Meme kanseri; kemiklerde, karaciğerde, akciğerlerde veya beyinde tekrar ortaya çıkabileceği gibi lokal olarak göğüs duvarında veya kalan meme dokusunda da görülebilir. Rekürren veya metastatik meme kanserlerinde küratif tedavi yoktur. Ortalama sağkalım rekürren hastalıkta 2,5 yıldır. Bu nedenle tedavi stratejileri uzun sağkalım, progresyonsuz sağkalım, stabil hastalık ve yaşam kalitesini artırmaya yönelik olmalıdır. Metastatik hastaların sadece %5-10'u 5 yıl veya daha fazla hayatta kalmaktadır (22).

Metastatik meme kanserli hastaların tedavi planı prognostik ve prediktif faktörlere göre yapılmalıdır.

- İzole tek metastastazı olan veya metastazın yerleşim bölgesi nedeniyle ciddi komplikasyon riski olan (fraktür, spinal kord kompresyonu, soliter beyin metastazı) hastalarda ilk seçenek lokal tedaviler olmalıdır. Sistemik tedavi endikasyonu varsa ve hormon reseptörleri pozitif ise, birinci basamak sistemik tedavi olarak hormonoterapi tercih edilmelidir.
- Hızlı progresyonu olan, visseral organ tutulumu bulunan ve hormonoterapiye yanıtızsız hastalarda kemoterapi ve trastuzumab (HER-2 pozitif tümörlerde) verilmelidir.
- Osteolitik ve özellikle osteoblastik kemik metastazı olan olgularda kemoterapi veya hormonoterapi yanında bifosfonatların (özellikle zoledronik asit) kullanılması, kemik metastazı ilişkili komplikasyon riskini azaltmaktadır (23).
- HER-2 pozitif tümörlerde trastuzumab ilk tercih edilecek ajan olmalıdır. Hafif seyirli hastalığı olanlarda başlangıçta trastuzumab + hormonoterapi denenebilir. Hızlı progrese viseral metastazı olan semptomatik hastalarda ise trastuzumab + kemoterapi kombinasyonu verilebilir.

Birçok seride hormonoterapi + kemoterapi kombinasyonunun tek tedaviye göre daha yüksek yanıt oranları sağladığı fakat genel sağkalımda anlamlı değişiklik yapmadığı gösterilmiştir.

Randomize çalışmalarda, metastatik meme kanseri tedavisinde tek ajan ve kombinasyon kemoterapileri karşılaştırıldığında, kombine kemoterapiyle daha yüksek yanıt oranları ve genel sağkalımda artış saptanmıştır. 2005 yılında 37 çalışmayı kapsayan bir meta-analizde, kombine kemoterapinin tek ajan kemoterapisine göre %12 daha fazla sağkalım sağladığı belirlenmiştir. Fakat kombine tedavi alan hastalarda kemoterapiye bağlı yan etkiler daha şiddetlidir (24). Dört büyük çalışmada, kombine kemoterapiyle, ardışık kemoterapi uygulaması karşılaştırılmıştır:

- 739 metastatik meme kanserli hastayı içeren ECOG çalışmasında hastalar üç gruba ayrılmıştır. Birinci gruba sadece doksorubisin, ikinci gruba sadece paklitaksel, üçüncü gruba ise doksorubisin+paklitaksel kombinasyonu verilmiştir. Tek ajanlı tedavi alan hasta grubunda progresyon saptananlara bir sonraki alternatif ajanlı kemoterapi uygulanmıştır. Kombine kemoterapi alan grupta diğerlerine göre daha yüksek yanıt oranları saptanmış (kombinasyon %47, doksorubisin %36, paklitaksel %34) fakat ortalama sağkalım üç grup arasında benzer bulunmuştur (kombinasyon 22 ay, doksorubisin 19 ay, paklitaksel 22 ay) (25)
- GEICAM 9903 çalışmasında bir gruba doksorubisin ve dosetaksel kombinasyonu, diğer gruba ise doksorubisin sonrası dosetaksel tedavisi verilmiş. Her iki grupta da benzer yanıt ve sağkalım oranları elde edilmiş fakat ardışık kemoterapi alan grupta daha az toksisite görülmüştür(26).
- İkiyüz metastatik meme kanserli olguyu içeren bir randomize çalışmada, bir gruba epirubisin ve paklitaksel kombinasyonu, diğer gruba ise her bir ilaç sırayla 4'er kür uygulanmıştır. Gruplar arasında yanıt oranları ve genel sağkalım açısından anlamlı fark bulunmamıştır (27).
- Antrasiklin tedavisi almış 368 metastatik meme kanserli hastayı kapsayan bir Faz III çalışmada ise, kombine kemoterapinin (kapesitabin+paklitaksel veya dosetaksel) ardışık kemoterapiye (kapesitabin ardından taksan) üstünlüğü gösterilememiştir (28). Yayınlanan ön raporda ardışık uygulanan kemoterapinin kombine kemoterapiye göre daha düşük objektif yanıt oranlarıyla ilişkili olduğu (kombine tedavinin %74 ve %65'ine karşı %46) fakat progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımın farklı olmadığı belirtilmiştir.

Bugün için klinik pratikte genel eğilim, hızlı seyirli, visseral organ tutuluşu olan ve semptomatik vakalarda kombinasyon kemoterapisinin ilk seçenek olarak tercih edilmesidir.

9.5. Anti-HER2 tedaviler:

-HER2 Reseptör tayini:

HER2 reseptörü insan kanserlerinde eksprese edilen EGFR ailesinin bir üyesidir. 17. kromozumun q kolunda kodlanır (29). 185 kd ağırlığında glikoprotein yapıda, sitoplazmik kısmı tirozin kinaz aktivasyonu gösteren transmembran büyüme faktörü reseptörüdür. Hücre proliferasyonu ve ölümsüzlüğünde rol oynar. Normal hücrelerde yaklaşık 24.000 HER2 proteini ve sadece iki kopya HER2 geni varken over eksprese dokularda 2.400.000 HER2 molekülü ve 50-100 HER2 gen kopyası görülebilir. Bu da HER2 kinazın ligandan bağımsız olarak aktive olmasına neden olur (29,30). HER2 proteini hücre proliferasyonunu, anjiogenez, invazyonu, metastazı ve hücrenin ölümsüzlüğünü regüle eder (31) Birçok çalışmada meme kanserlerinin %25' in de over eksprese edildiği bildirilmiştir.

Her2 reseptörünün 3 bölgesi bulunmaktadır: Ekstrasellüler kısım, sitoplazmik kısım (tirozin kinaz aktivitesi bulunur) ve transmembran kısmı

2001 den beri hem American Society of Clinical Oncology (ASCO)'de bildirilmiş hem de National Comprehensive Cancer Network (NCCN) klavuzlarında yeni tanı almış metastatik meme kanserli hastalarda HER2 ekspresyonunun rutin test olarak kullanılmasını önerilmektedir. (32)

HER2 ekspresyonu değerlendirmek için;

- HER2 gen amplifikasyonu; floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve kromojenik in situ hibridizasyon (CISH), silver in situ hibridizasyon (SISH), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
- HER2 proteini; ELİSA, immünohistokimya (İHC)
- HER2 geni RNA; revers transkriptaz PCR (rt-PCR) kullanılır.

Fakat HER2 durumunu test etmede rutinde kullanılan 2 yöntem; immünohistokimya (IHC), floresan in situ hibridizasyondur (FISH) (33). IHC her yerde bulunabilen, ucuz ve ışık mikroskobu gerektiren bir tekniktir. Formalinle fiske edilmiş dokuda membrana bağlı HER2 proteini varlığını değerlendirir. Farklı laboratuvarlarda uygulanabilen ve subjektif kriterler kullanılarak yapılan bir tekniktir.

FISH testi tümör hücrelerindeki gen kopya sayısını ölçer. HER2-neu geninin 50 ile 100 kopya artması pozitif olarak değerlendirilir. FISH testi zaman alıcı bir testtir, ancak çok az doku gerekir.

CISH ise yeni bir tetkiktir. Işık mikroskopuyla tanımlanabilir. FISH' in maliyetinin dörtte biridir. FISH' e göre pratik ve kost-efektif bir yöntemdir. FISH daha iyi bir prediktör olarak görülmektedir (20).

HER2/neu overekspresyonu IHC yönteminde numerik sistem kullanılarak skorlanır. 0 ve 1+ overekspresyon yok demektir. 2+ sınırdaki iken, 3+ overekspresyon var demektir. 2+ saptandığında FISH yöntemi ile HER2/neu gen amplifikasyonunun değerlendirilmesi önerilir (1). IHC 3+ veya FISH ile pozitif olan hastalarda Trastuzumabın tahmini faydası aynıdır. Mikroarray yöntemiyle HER2 protein pozitifliği saptanan tümörlerin sadece %70'inde IHC ile protein overekspresyonu gösterilebildiğinden IHC profili her zaman net bir sonuç vermeyebilir. FISH daha duyarlı, spesifik, güvenilir ve tekrarlanabilir bir testtir. IHC' nin subjektif bir test olması ve FISH ile konkordansının laboratuvarlar arasında farklı olması nedeniyle tecrübeli laboratuvarlarda uygulanması önerilmektedir (29).

-HER2 pozitif hastalık:

HER2 pozitif hastalık [ER(-), PR(-), HER2(+)] tüm meme kanserlerinin %15-20' ini oluşturur. HER2 proteini meme kanserlerinin %25' inde over eksprese edilirken, bunların yaklaşık yarısı HER2 pozitif hastalık olarak tanımlanır.(13) Diğer yarısı luminal subtipi içinde incelenmektedir. HER2 pozitif hastaların %75' i yüksek grade' lidir. %40' ında mutant p53 proteini vardır. HER-2 derived prognostic predictor (HDDP); temelde immün yanıt, invazyon ve metastazı ilgilendiren gen profilidir yeni oluşturuluyor. Bunun temelinde immün yanıtı down regüle eden genler rol oynamaktadır. Buna göre yüksek invazyon kapasitesi ve düşük immün yanıtı sahip HER2(+) hastalık çok daha kötü prognozludur. 10 yıllık sürviyi %12-24 dür (34) . Gen profili ile yapılan çalışmaların tamamlanması ile HER2 pozitif meme kanserinin prognozunu, anti-HER-2 tedavilere yanıtını öngörebilecek ve yeni tedaviler geliştirilebilecektir.

-Trastuzumab:

Trastuzumab (Herceptin® Basel, İsviçre; Molekül ağırlığı: 145531gr) DNA-rekombinant teknolojiyle oluşturulmuş humanize bir monoklonal antikordur. Meme kanserli hastaların yaklaşık %20-25'sinde yüksek oranda eksprese edilen p185Her-2/neu transmembran reseptörünün ekstra-sitoplazmik kısmına bağlanarak reseptör tirozin kinaz aktivasyonunu bloke eder.(1)

Trastuzumab gelişimi 2 dekat önce başlamıştır. 1987' de HER2 pozitifliğiyle agresif meme kanseri arasındaki ilişki bulunmuş, 1990' da HER2' ye karşı antikor geliştirilmiştir. 1993'de Trastuzumabın metastatik meme kanserlerinde faz 2 çalışmasına başlanmış, 1998'de HER2 overekspresyon tanısı geliştirilmiştir (33). Trastuzumab 1998 yılından beri FDA tarafından önerilen bir monoklonal antikordur (31). Günümüzde ise HER2 ekspresyonu gösteren metastatik meme kanserinde trastuzumab standart olarak birinci basamak tedavide kemoterapi ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Trastuzumab'ın başlıca anti-tümör etki mekanizmaları:

1. HER 2 reseptör down regülasyonu (HER2 endositozu ve yıkımı)
2. HER2 dimerizasyonu ve HER2/HER3 ve HER2/HER4 heterodimerizasyonun engellenmesi,
3. Antikor bağımlı hücresel sitotoksinite (ADCC)
4. HER2 ekstraselüler kısmının proteolitik yıkımının önlenmesi
5. Hücre siklusunu G1 fazında durdurur. (PI3K-AKT ve MAP kinaz yollarının inhibisyonu ve P27 protein ekspresyonunun indüksiyonu)
6. Tümör anjiogenezinin engellenmesi (VEGF, IGFa, Ang-1, PAI-1 ekspresyonunu engeller; anti anjiogenik olan TSP-1 i indükler)
7. Kemoterapi yada radyoterapi ile meydana gelen DNA onarımını engeller. (35)

Trastuzumab HER2 reseptörü; ligand bağlanmasını sağlayan ekstraselüler kısım, alfa helikal yapıya sahip transmembran kısmı, tirozin kinaz aktivitesine sahip intrasitoplazmik kısmından oluşur. Plazma membranında bulunan HER2 molekülü normal şartlarda inaktiftir. Ligant bağlandıktan sonra şekil değişikliğine uğrayan reseptör hetero- ya da homo- dimer oluşturarak intraselüler tirozin kinaz bölgesinin

fosforile olmasına neden olur. Bu bölge ilgili proteinler için bir kenetlenme bölgesi sağlayarak sinyal iletim sisteminin aktive olmasını sağlar. İntraselüler sinyal iletim yollarından fosfatidil inositol 3 fosfat-(PI3)-Akt ve mitojen aktive-protein kinaz (MAPK) yollarını aktive ederek hücrelerin çoğalmasına, motilitesine, apoptosise direnç oluşturmaya, invazyon özelliği kazanmasına ve anjiogeneze yol açar.

Diğer HER ailesi üyelerine nazaran HER2 yapısal olarak aktiftir ve liganttan bağımsız olarak dimer oluşturabilir. HER2 reseptörünün PI3K bağlanması sağlayan altı bağlanma bölgesi olması nedeniyle HER2-HER3 heterodimerizasyonu PI3K yolağının en güçlü aktivatörüdür. Trastuzumab ilk olarak HER2 reseptörünün ekstraselüler kısmına bağlanan bir humanize monoklonal antikordur. Trastuzumabın antitümör etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte bazı mekanizmalar öne sürülmektedir. Trastuzumab tümör hücresine bağlandıktan sonra doğal killer hücrelerin Fc reseptörü ile etkileşir. Böylece immün hücreler hedef hücreye doğru yönelerek antikor bağımlı hücrel sitotoksikite (ADCC) ile saldırılarını gerçekleştirir. HER2 reseptörünün hücre yüzeyinde bulunan bölümü metalloproteinazlar ile proteolitik yıkıma uğrayarak kan dolaşımına dökülebilir. Ekstraselüler kısımdan yoksun HER2 molekülü fosforile p95Her2 yapısını oluşturur. p95 trastuzumab için bağlanma bölgesine sahip değildir. Yapılan prelinik çalışmalarda trastuzumabın HER2 reseptörünün proteolitik yıkımını ve p95 oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.HER2reseptörünün aktivasyonu ile başlatılan PI3K-Akt ve MAPK yollarının aktivasyonu hücre siklusunun progresyonu için temeldir (35).

Trastuzumab ile bu aktivasyonun ve siklin D aracılı hücre siklusunun engellenmesi tümör hücresinin büyümesinin engellenmesi ile sonuçlanmaktadır. Vasküler yapılanma tümörün büyümesi ve yayılması için gereken önemli bir basamaktır.HER2aşırı eksprese eden tümörlerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunun ilişkili olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda trastuzumabın VEGF gibi anjiogenezi artıran faktörleri azaltarak tümöre ait damarsal yapılanmayı azalttığı gösterilmiştir.(35)

Trastuzumabın etki mekanizmalarından biri de kemoterapi ya da radyoterapiye bağlı oluşan DNA hasarlarının tamirini başlatmada etkili olan sinyal iletim yollarını engellenmek ve tamir sürecini bozmak olduğu düşünülmektedir.

Trastuzumab tedavisi meme kanserli hastalarda tedaviye cevap oranını %33'den %52'e çıkartmıştır.(33) Subgrup analizlerde Trastuzumab hastaliksız sağkalımı tümör çapına, tipine, pozitif lenf nodu sayısına hormon reseptör durumuna ve hastanın yaşına bağlı olmaksızın artırmaktadır.

Trastuzumab tedavisine genel olarak 8 mgr/kg iv yükleme dozunda başlanır ve 6 mg/kg iv idame dozunda üç haftalık olarak devam edilir (29).

1.Neoadjuvan tedavide Trastuzumab 'in yeri:

HER2 pozitif tümörü olan lokal ileri meme kanserinde kemoterapiye trastuzumab eklenmesi; tam yanıt oranlarında artış saptanması nedeniyle önerilmektedir.

2.Adjuvan tedavide Trastuzumab'ın yeri:

HER2 pozitif tümörü olan metastatik hastalarda Trastuzumab tek ajan aktivitesine sahiptir ve kemoterapiye dâhil edildiğinde sağkalımı iyileştirir. Metastatik hastalıkta elde edilen başarıdan sonra trastuzumabın adjuvan tedavide kullanımı için yapılan dört büyük faz III çalışmada (NSABP B-31, North Central Cancer Treatment Group N9831, HERA, BCIRG006) etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmalarda HER2 over ekspresyonu olan meme kanserli hastalarda çeşitli kemoterapi kombinasyonu ile birlikte adjuvan 12 aylık trastuzumab uygulanması sonrası hastaliksız sağkalımda %33-52, toplam sağkalımda %34-41 oranında artış sağlanmıştır. (36)

HER2 pozitif aksiller lenf nodu tutulumu olan hastalarda ve HER2 pozitif aksiller lenf nodu tutulumu olmayan 1 cm den büyük tümörü olan hastalarda adjuvan tedaviye trastuzumab eklenmesi ile progresyonsuz, hastaliksız sağkalım oranlarında artış gösterilmiştir. (33) HER2 pozitif, nod negatif, 0,5-1 cm arasında tümörü olan hastalarda; HER2 negatif benzer özellikteki hastalara göre rekürren hastalık riski artmış olduğu için trastuzumab tedavisi önerilmektedir. Fakat yeterli çalışma ile desteklenmemiştir.

Trastuzumab kemoterapi ile birlikte veya kemoterapiden sonra verilebilir. Birçok ülke tarafından yapılan standart uygulama kemoterapiden sonra verilmesidir. HER2 pozitif olan hastalar bazı KT ajanlarına daha iyi yanıt verir. Bunlar antrasiklin bazlı rejimler ve paklitakseldir. Antrasiklin bazlı rejimler daha iyi yanıt verir. Bunun topoizomeraz 2 ve HER2' nin koamplifikasyonu nedeniyle olabileceği bildirilmiştir. (9, 21). Ancak antrasiklinlerle Trastuzumabın birlikte verilmesi kardiyotoksosite oranlarını artırmaktadır.(3, 10, 30).

3. Metastatik hastalıkta Trastuzumab'ın yeri:

Trastuzumab öncelikle monoterapide kullanılmıştır. Fakat monoterapi etkinliğinin %10-15 olması ve trastuzumaba primer dirençli olması ve sekonder direnç gelişmesi nedeniyle trastuzumabın klinik pratikte mutlaka bir kemoterapi ajanı ile birlikte kullanılması tercih edilmelidir. Bu noktada trastuzumab ile kombine edilecek daha etkin, toleranslı yüksek sitotoksitesite olan ajanlara gereksinim vardır.

Trastuzumab tedavisi ile hastaların %40'ında tedavi yanıtı sağlanmış ve progresyona kadar geçen sürede 4 ay kadar uzama gösterilmiş. Trastuzumab ile kemoterapi kombine edildiğinde tedavi yanıt oranı %70'e, progresyona kadar geçen sürede 7 aya kadar uzama gösterilmiştir. (37)

Trastuzumabın bir taksanla (docetaksel veya paklitaksel) ve bir platinle (örneğin karboplatin) kombinasyonu meme kanseri hastalarında alternatif tedavi şeklidir. Cevap oranları bu kombinasyona trastuzumab eklenmesiyle %52' den %82' ye yükselmiştir (38). Docetaxel + Trastuzumab sadece docetaxel ile kıyaslandığında genel cevap oranını, ortalama genel sağkalımı ve hastalısız progresyon zamanını belirgin oranında iyileştirir. Diğer kemoterapötik ajanlarla (gemsitabin ve vinorelbin) da Trastuzumab kombine edildiğinde HER2 pozitif hastalarda cevap oranları % 40' tan %60' a yükselmiştir. Karboplatinin Trastuzumab ve paklitaksele eklenmesi Trastuzumab ve paklitaksel alan hastalara göre genel cevap oranlarını daha da artırmaktadır (33)

4.Güvenlik profili:

Trastuzumab genellikle iyi tolere edilir ve kemoterapi göre daha düşük yan etki insidansına sahiptir. İnfüzyonla ilişkili yan etkiler (ateş, terleme) rapor edilmiştir. Trastuzumab tedavisinin en önemli yan etkisi kardiyotoksisitedir. Kardiyotoksisite açısından en riskli grub metastatik hastalığı olan ve antrasiklin ile kombinasyon tedavisi almış olan hastalardır. Sol ventrikül disfonksiyonu, koroner arter hastalığı (KAH), kontrolsüz hipertansiyon, kalp kapak hastalığı, aritmi, ileri yaş, göğüs duvarına RT, diyabetes mellitus ve obezite trastuzumab ilişkili kardiyotoksisitede diğer risk faktörleridir. Adjuvan çalışmaların hiçbirinde Trastuzumab ile ilişkili kardiyak ölüm rapor edilmemiştir. Vakaların çoğunda Trastuzumab'la ilişkili kardiyak disfonksiyon kalp yetmezliği tedavisi ile kontrol altına alınabilir. Antrasiklin ilişkili kardiyak disfonksiyon kalıcı miyokardiyak hasar bırakır. Halbuki Trastuzumab ile ilişkili kardiyak disfonksiyon medikal olarak yönetilebilir ve myositlerde morfolojik değişikliğe neden olmaz ve birçok hastada geri dönüşümlüdür (33). Trastuzumab ile ilişkili kalp hasarı ise daha çok HER2 inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. (39).

Tedavi süresi boyunca kardiyak fonksiyonlar monitörize edilmelidir. Trastuzumab ilişkili kardiyak disfonksiyonun erken tanımlanması efektif medikal tedavinin verilmesini ve semptomların düzelmesini sağlamaktadır (40).

Meme kanserli hastalarda Trastuzumab kullanımı ile ilgili en önemli sorunlardan biri de artan beyin metastazı oranıdır. HER2 pozitif hastalık beyin metastazı gelişme riski HER2 negatif hastalığa göre 4 kat daha yüksek saptanmıştır. Trastuzumab ve sistemik tedaviyle sistemik hastalık kontrol altına alınabilmektedir. Böylece de hastaların yaşam süresi uzamakta ve beyin metastaz riski artmaktadır. Trastuzumab 145 kda ağırlığında bir antikordur ve diğer kemoterapötik ilaçlar gibi kan beyin bariyerini geçemez. Lapatinib daha küçük bir moleküldür. Kan beyin bariyerini geçer ve meme kanserinin beyin metastazlarında kullanılabilir (41,42).

5.Direnç gelişimi:

HER2 pozitif tüm meme kanserli hastalar; trastuzumaba cevap vermez. Metastatik HER2 over-eksprese meme kanserli hastaların %66-89' u trastuzumab

monoterapisine intrensek dirençlidir (43). Trastuzumab direncinde birçok mekanizmanın rol alabileceği düşünülmektedir (44). Bu mekanizmalar içinde:

- Reseptör antikor etkileşiminin bozulması (mutant reseptör, ekstrasellüler kısmının yıkımı, membrane-associated glycoprotein MUC-4); Trastuzumab'ın tümör hücresi HER2 reseptörüne bağlanabilmesi için ekstrasellüler kısmın sağlam olması gerekmektedir.(35) Ekstrasellüler kısmın metalloproteinazlar ile yıkımı ya da mutant reseptör varlığında trastuzumab bağlanmamaktadır. HER2 reseptörünün ekstrasellüler kısmının kesik olduğu daha düşük molekül ağırlıklı p95Her2 reseptöründe trastuzumabın bağlanmasını için uygun ekstrasellüler kısım yoktur, bu nedenle trastuzumabın tedavisine intrensek direnç oluşturur (45).

In vitro çalışmalarda membran bağımlı müsin olan MUC-4'ün aşırı ekspresyonu HER2 reseptörünün ekstrasellüler kısmının maskelenmesine neden olmakta ve antikor bağlanması engelleyerek direnç oluşturabileceği gösterilmiştir. (46)

- HER2 sinyal yolağının aktivasyonu (Akt aktivasyon artışı, PTEN kaybı, P27 kip-1 protein kaybı); Akt mutasyonu ve PTEN kaybı sonucunda HER2 sinyal yolağının anormal aktive olmasıdır. PI3K mutasyonu olması durumunda bu yolak trastuzumab ile inhibe edilememekte, PTEN down regülasyonu durumunda Akt sinyal artışı olmakta böylece trastuzumab ilişkili hücre büyümesindeki duraklama bloke olmaktadır. İnvitro çalışmalar göstermiştir ki; PTEN ekspresyonu olmayan hücreler PTEN eksprese eden hücrelere göre trastuzumaba daha az duyarlıdır.(47) P27 kip1 proteini cdk-cyc kompleksini inhibe ederek hücre siklusunu G1 fazında durdurur. P27 kip1 protein kaybı olduğunda ise hücre siklusu G1 fazında durdurulamaz ve apoptozdan kaçmış olur. (48)
- Kompanzatuvar diğer tirozin kinaz yollarının aktivasyonu; Trastuzumab direnci ile ilişkili olabileceği düşünülen diğer bir mekanizmada insülin-benzeri büyüme faktörü-1 reseptörünün (IGF-1 R) over ekspresyonudur. İGF1 de trastuzumab gibi tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. PI3K'ın majör tetikleyicisidir. Deneysel çalışmalarda trastuzumab ve IGF-1 R inhibitörünün

birlikte kullanılmasının sinerjistik etkili olduğu ve direnç oluşumunu engelleyebileceği öngörülmektedir. (49)

6. Yeni HER2 blokörleri: Küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri

Lapatinib bir oral tirozin kinaz inhibitörü olup Trastuzumab dirençli HER2 pozitif meme kanserinde kullanılmaktadır (50). Ayrıca bu hastalarda kullanılan ilaçlar arasında Pertuzumab, Trastuzumab-DM1 (tübülün polimerizasyonunun potent inhibitörü), HSP 90 (heat shock protein 90) inhibitörü olan tanespimisin, sirolimus, immünotoksinler, neratinib ve everolimus bulunmaktadır (51, 52, 53).

10. Gossypol:

Gossypol, Malvaceae ailesinden olan pamuk bitkisinden (*Gossypium species*) ve tropik bir ağaç olan *thespesia populnea*'dan elde edilen sarı renkli, hücre içine geçen ve birçok dehidrogenaz enziminin inhibitörü gibi davranan, bir polifenolik aldehiddir (54). İlk kez 1886'da pamuk yağının rafinerisi ile izole edilen gossypol'ün fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında 1938'e kadar bir bilgiye ulaşılamamıştır. 1958 yılında Edwards tarafından kimyasal yapısı belirlenmiştir (1,1',6,6',7,7'-hexahydroxy-5,5'-diisopropyl-3,3'-dimethyl-2,2'-binaphtalene-8,8'- dicarboxaldehyde) (Şekil 2) (55)



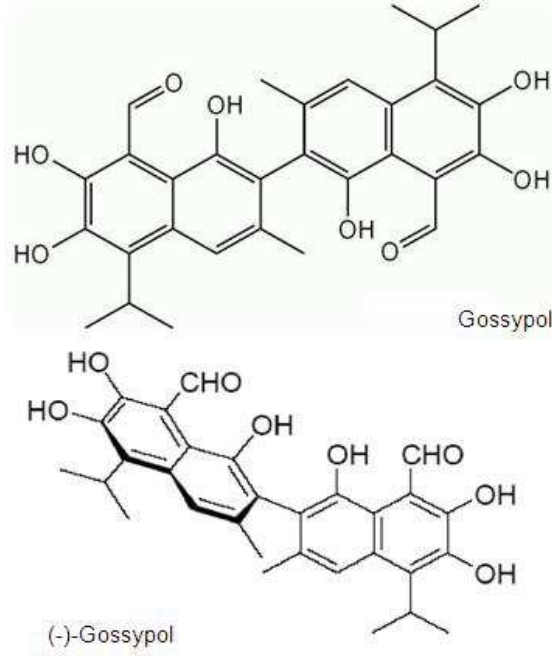
Şekil 1: Bitkisel kökenli kimyasal; Gossypol

1960'ların sonlarında kıtlık nedeniyle besin kaynağı olarak pamuk tohumu yağını kullanan Çinli çiftçilerde daha sonraları kontrasepsiyon geliştiği fark edilmiştir. 1978 yılında Çin hükümeti tarafından 10,000 sağlıklı erkeğe gossypol 20 mg/gün peroral olarak 75 gün süresince verilmiş ve ardından da 50 mg/gün dozunda devam edilmiştir. %10 olguda bir yıldan fazla kullanıldığında geriye dönüşümsüz aspermatogenezis ve ciddi hipokalemi olduğu saptanmıştır (National Coordinating Group on Male Infertility Agent, 1978). Bundan sonra yapılan uluslararası çok merkezli bir çalışmada, 151 erkeğe 12 hafta veya 14 hafta 15 mg/gün gossypol verildikten sonra 7,5-10 mg/gün ile 40 hafta daha devam edildiğinde hiçbir olguda geri dönüşümsüz aspermatogenez ve hipokalemi gözlenmemiştir. Sonuç olarak doza bağımlı sterilite gelişebileceği ve vazektomiye alternatif bir kontrasepsiyon yöntemi olabileceği ifade edilmiştir (56)

Gossypol ün erkeklerdeki infertilite yapıcı özelliği saptandıktan sonra biyolojik aktivitesini araştıran çalışmalara başlanmıştır.

10.1.Gossypol ün kimyası:

Gossypol, atropizomerizm denen bir çeşit enantiomerizm içerir. C2-C2' binaftalan bağında rotasyon ile (-)- (AT101) ve (+)- olmak üzere iki aktif optik forma döner (57). Gossypol aynı zamanda aldehit, laktol ve ketol olmak üzere simetrik veya asimetrik 3 tautomerik form içerir (58). Gossypol ün kimyasal yapı özelliğine göre farklı hücrelerde etkinliği ve etkinlik yolları değişmektedir. Fenolik hidroksil ve aldehit gruplarının varlığı nedeniyle gossypol, reaktif bir bileşiktir. Bu reaktivite ile biyolojik etkileri düzenlenir.



Şekil 2: Gossypol ün ve (-) Gossypol (AT-101)'un kimyasal yapıları

10.2.Gossypol ün Biyolojik Aktivitesi:

Yapılan çalışmalarda gossypolun birçok enzim sistemini, sinyal transdüksiyon mediatörlerini ve membranları etkilediği görülmüştür.

-Anti-tümör aktivitesi: Kanser hücre hatlarında in-vitro olarak, gossypol ün büyümeyi inhibe edici etkisi difenilterazoliumbromid (MTT) ve flow sitometri yöntemleri ile gösterilmiştir. Kanser hücre hatlarında (-)- izomeri (AT101)' in (+)- ve rasemik izomerinden daha fazla sitotoksik olduğu gözlenmiştir (59). Özellikle adriamisin, vinblastin ve sisplatine dirençli hücre hatlarında da (-)- izomeri (AT101)'in etkin olduğu saptanmıştır (60). Sisplatine dirençli baş-boyun kanseri hücre hatlarında da sitotoksik etkisi gösterilmiş (61). Diğer bir çalışmada ise gossypol ün L-fenil alanin metil ester analogunun malign melanom, serviks, küçük hücreli akciğer kanseri ve miyelositer lösemide potansiyel sitotoksik etkinliği olduğu gösterilmiştir (62). Gossypol ile yapılan klinik çalışmalarda ise kemoterapiye refrakter metastatik adrenal kanser (63), nüks malign glioma (64) ve metastatik meme kanseri olgularında (65), objektif yanıtlar gözlenmiş ve diğer kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanılabilir, ciddi yan etkileri olmayan yeni bir anti-neoplastik ajan olarak sunulmuştur.

-Antiviral, antiparaziter aktivitesi: HIV-I ve HSV-2 gibi virüslerde etkin olduğu gözlenmiştir. (-) gossypol (AT101), HIV-I 'de kullanılan zidovudinden daha az potent olmasına rağmen, kemik iliği süpresyonunu yapmamaktadır. (-) gossypol (AT101)'in keratinosit hücre hattında, HPV-16'nın keratin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş, bu özelliği nedeniyle anti-psöriatik olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (66). Gossypol ün Plasmodium falciparum (67), Entamoeba histolytica ve Trypanosoma cruzi (68) enfeksiyonlarında antiparaziter etkinliği olduğu gösterilmiştir.

-Antioksidan aktivitesi: Gossypol potent bir antioksidandır. Rat kardiyak lipozomlarının süperoksid ile ilişkili serbest radikallerle maruz kaldığında, düşük konsantrasyonda gossypol ile peroksidatif hasardan korunduğu gözlenmiştir (69). Karaciğerde mikrozomal peroksidasyonu da inhibe ettiği saptanmıştır. Bu nedenle psöriazis gibi lipid oksidatif hasar ile karakterize hastalıklarda antioksidan etkisinden faydalanabileceği ifade edilmiştir (66).

10.3. Gossypol ün Biyolojik Aktivite Mekanizmaları:

Gossypol ün her bir biyolojik aktivitesinin çalışma mekanizmaları halen sınırlı bilgilere dayanmaktadır. Açıklığa kavuşmuş mekanizmaları; enzimler, sinyal iletim mediatörleri ve membranlar gibi hedef biyomoleküllerle etkileşimidir.

-Enzimatik etkisi:

Gossypol, glikolitik yolak ve trikarboksilik asid döngüsü (Kreb's siklusu) gibi mitokondrial elektron transport sisteminde rol oynayan NAD(P) ilişkili enzim katalizli oksidasyonları veya redüksiyonları inhibe eder (70).

İnsan laklat dehidrogenaz (LDH) enzimi 5 izoenzim içerir ve bu enzim, anaerobik glikoz metabolizmasında önemli rol oynar. (-) gossypol (AT101) izomeri LDH'a bağlanan NADH'ın kompetitif inhibitörüdür. LDH-C4 (LDH-X) sadece testis ve spermde bulunur ve esansiyel enerji üretiminde yer alır. Gossypol ün bu enzimi inhibe ederek infertiliteye katkısı olduğu düşünülmektedir. (-) gossypol ün (AT101) albümin-gossypol kompleksi yaparak kan-testis bariyerini geçtiği de gösterilmiştir (71). Melanom ve kolon karsinomu hücre hatlarında gossypol ün LDH

I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Santral sinir sistemi tümör hücre hatlarında ise LDH-A4 enzimini inhibe ederek sitotoksik etki göstermektedir (72). Bu veriler ışığında tümör hücrelerinin enerji üretimi için anaerobik glikolize ihtiyacı olduğu ve bunun da gossypol tarafından inhibe edildiği söylenebilir.

Gossypol ün anti-fertilite etkisinin ortaya çıkması için inhibe ettiği diğer enzimler; malat dehidrogenaz (MDH), gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GA3PDH), protein kinaz C (PKC) ve sitoplazmik fosfolipaz A2 (cPLA2)'dir. cPLA2 özellikle sperm maturasyonunda rol oynayan bir enzimdir (73). Rat spermatogenez örneklerinde, gossypol uygulaması ile apoptotik DNA fragmanlarının PKC inhibisyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (74).

Sinir hücrelerinde ve karaciğerde bulunan COMT (katekol-o-metil transferaz) enzimi katekolamin metabolizmasından sorumlu tutulan bir enzimdir. Gossypol tarafından inhibe edildiği saptanmıştır. Bu enzimin melanom gelişmesinde sorumlu olabileceği belirtilmektedir, ancak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (75)

Aldehid dehidrogenaz (ALDH) enzimi aldehidlerin aside oksidasyonunu ve esterlerin hidrolizini katalize eder. Sınıf 3 ALDH (ALDH-3) enzimleri tümör hücrelerinin sitozolünde bulunur ve antineoplastik ilaçların oksidatif detoksifikasyonunu katalize eder, kemoterapötiklere direnç gelişmesinden sorumludur. Gossypol ise bu enzimi inhibe eder (76).

Metabolik enzim ailesinden olan Glutasyon-s transferaz (GST) hepatik, renal ve intestinal hücrelerin sitozolünde bulunur, elektrofillik substratların glutasyon ile konjugasyonunu katalize eder. Bu enzimin aşırı ekspresyonunun olduğu bazı kanser hücre hatlarında alkilleyici ajanlara karşı direnç gelişmesinde, bu enzimin detoksifikasyonu rol oynar. (-)- gossypol (AT101), hepatik GST'in inhibisyonunda daha etkilidir (77).

Protein kinaz C (PKC), hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunun indüklenmesinde, tümör supresör gen p53'ün down regülasyonunda rol oynar. Ayrıca aldosteron sentezi, glikoz transport regülasyon ve kemoterapötik ajanlara direnç gelişmesinde de görev alır. Gossypol ile PKC'de doza bağımlı inhibisyonu meydana gelir (78).

DNA polimeraz-alfa DNA sentezinden ve DNA polimeraz-beta ise DNA tamirinden sorumlu olan enzimdir. İn vitro ve in vivo koşullarda gossypol ün over kanseri hücrelerinde, bu enzimleri süre ve doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda gossypol ile telomeraz aktivitesinin de inhibe edildiği ileri sürülmektedir (79).

Steroid 5-alfa redüktaz enzimi, NADPH-bağımlı redüksiyon ile testosteronu daha potent olan dihidrotestosterona çevrilmesini katalize eder. Bu durum, erkeklerdeki seksüel diferansiyasyon için önemlidir. Bu aktivitenin artması ise prostat hipertrofisi, prostat kanseri, alopesi ve hirsutizme yol açmaktadır. Gossypol, bu enzimin selektif non-kompetitif inhibitörüdür. Bu sayede androjen ile ilişkili bozukluklarda kullanılabilir (80).

Erkek kontrasepsiyon klinik çalışmalarında gossypol uygulaması ile 11-β-hidroksisteroid dehidrogenaz enziminin inhibisyonunun hipokalemiden sorumlu olduğu saptanmıştır (81). Böbrekte mineralokortikoid reseptörlerinin yanında bulunan bu enzim, mineralokortikoid reseptörlerine zayıfça bağlanarak aktif kortizon ve kortikosteronu, inaktif keto-analoglarına okside eder. Bu enzim inhibe edilirse mineralokortikoid reseptörleri stimüle olur ve hipokalemi, hipernatremi ve hipertansiyon gelişebilir.

Gossypol sitokrom P450 sistemi ile etkileşime girer, yağ asidi metabolizması ve steroid hormon sentezinde bozukluklara neden olabilir. Gossypol ün renal ve hepatik toksisiteleri, bu etkileşim sonucu ortaya çıkabilir.

Aldoz redüktaz enzimi, glikozun sorbitole dönüşümünü azaltan bir enzimdir. Bu enzimin aktivasyonu ile hiperglisemi ve buna bağlı komplikasyonlar ortaya çıkar. Gossypol, aldoz redüktazı inhibe ettiği için hiperglisemi ve komplikasyonlarının tedavisinde ümit vericidir (82).

Kalsinörin (Calcineurin (CaN)), protein fosfataz 2B (PP2B) olarak da bilinen protein serin/treonin fosfatazlar içinde yer alan, binükleer Fe-Zn metallofosfatazdır. Kalsiyum, kalmodulin, mangan ve nikel ile aktive olur ve oksidatif süreç ile inaktive olur. Gossypol, kalsinörin bağımlı defosforilasyonun geri dönüşümlü yarışmasız inhibitörüdür. Bu inaktivasyon ile oksidatif süreç durur. Gossypol ile CaN

inhibisyonu sonucunda serebral iskemide serbest yağ asitlerinin akımı ve nöral hasarlanma ile ölüm oranı belirgin şekilde azalmıştır (83).

Gossypol ün sıçan ve sığır hücrelerinde adenil siklazı, enzimin ATP bağlayıcı bölgesinde direkt olarak hidrofobik etkileşim ile inhibe ettiği gösterilmiştir (84). Adenil siklaz enzimi; karaciğerden glikoz salınımını artırır, kalp ve iskelet kasında ATP üretimini ayarlar ve pankreatik enzimlerin gastrointestinal kanala sekresyonunda rol oynar. Bu enzimin gossypol ile inhibisyonu, ilacın baş dönmesi ve yorgunluk gibi yan etkilerini açıklayabilir.

-Hücre siklusu düzenleyici proteinlerine etkisi:

İnsan meme kanseri hücre hattında gossypol ün anti-proliferatif etkisi TGF β -1 (transforming growth factor β -1), protein tirozin fosfataz-gamma ekspresyonu stimüle edip ve siklin-D1 ekspresyonunun down-regülasyonu ederek yapar. Böylece Rb fosforillenmez. Non-fosforile Rb, transkripsiyon faktörü E2F (elongasyon faktör 2) bağlar ve DNA sentezini durur. TGF β -1, pek çok epitelyal hücre ve DNA sentezinde otokrin ve parakrin olarak negatif hücre büyüme düzenleyicisidir. Protein tirozin fosfataz-gamma ise sağlıklı hücrelerde eksprese olan bir tümör süpressör proteindir. Siklin D1 ile CDK4/6 (siklin bağımlı kinaz)'in oluşturduğu kompleks (cyc-cdk) Rb geninin fosforile eder ve hücre proliferasyonu G1 fazından S fazına ilerler. Meme kanser hücrelerinde Rb gen ekspresyonu bozulmuştur, nükleer protein olan siklin D1de aşırı eksprese olmaktadır. (-)- gossypol (AT101)'in, meme kanseri hücrelerinde TGF β -1 (transforming growth factor β -1) ve protein tirozin fosfataz-gamma ekspresyonu (+)- ve rasemik gossypol'e göre daha etkin stimüle ettiği gösterilmiştir (85).

AT-101, antiapoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinde korunmuş bir domain olan BH3 bölgesine ve Mcl-1 proteinine bağlanarak onların antiapoptotik etkilerini antagonize eder. Dolayısıyla hücrede iç apoptozis yolağını aktive eder. (86). Bcl-2 ve Bcl-xL'in tümör hücrelerinden aşırı ekspresyonu, onların kemoterapötik ajanlara direncinden sorumludur. Bu nedenle gossypol gibi BH-3 mimetik ajanların kanser tedavisinde ümit verici ajanlar olduğu söylenebilir. Sisplatine dirençli baş-boyun kanseri hücre hattında aşırı Bcl-xL ekspresyonu yapan tümör hücrelerinde gossypol ile apoptozun selektif olarak indüklendiği gösterilmiştir

(87). İnsan lenfoma hücrelerinde de tek başına veya standart kemoterapi rejimi ile beraber uygulanan gossypol, apoptozu indükleyerek kemoterapinin etkinliğini artırmıştır (88). Diğer bir çalışmada radyoterapi ile beraber prostat kanseri hücrelerinde tümör progresyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Gossypol Bcl-2 inhibisyonunun dışında, mitokondrial diferansiyasyon yolundaki apoptotik kaspaz 8'i aktive eder. Kaspaz 8 aktivasyonu ile Sitokrom C'nin mitokondriden sitozole salınımı gerçekleşir ve bundan sonrada kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptoz indüklenir (89). Bu çalışmaların dışında, insan alveoler akciğer kanseri hücrelerinde gossypol ile fas/fas L (fas ligand) apoptotik yolunun da aktive olduğu gösterilmiştir (90). AT-101 in Kronik lenfosit lösemide ritüksimab ile kombinasyonunun ve hormon refrakter prostat karsinomunda dosetaxel ile kombinasyonun faz 2 çalışmaları devam etmektedir. Prostat kanserli hastalarda yapılmış Faz 1-2 klinik çalışmalarda yan etki olarak yalnızca doza bağımlı olarak gastrointestinal toksisitesi saptanmıştır.

-Hücre membranı ile etkileşim:

Gossypol membran proteinleri ile etkileşerek ya da lipid matrikse bağlanıp özelliklerini modifiye ederek hücre membranındaki etkilerini meydana getirir. Tümör hücreleri lipid membran içerdiği için gossypol ün anti proliferatif etkilerine oldukça duyarlıdır (91). Tümör hücre membranına, normal hücrelere göre daha fazla olan kolesterol düzeyi, tümör büyümesini uyarıyor olabilir. Bu nedenle tümör hücreleri gossypol ün etkisine, normal hücrelerden 5-10 kat daha duyarlıdır. Ayrıca membran geçirgenliğinin değişmesi ile hücre morfolojisinin değiştiği, melanom ve meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir (59). Gossypol aynı zamanda, gap alanlarındaki proteinlere bağlanarak hücreler arası ilişkiyi keser.

-Mitokondri membranı ile etkileşim:

İnsan meme, kolon, over ve pankreas hücre hatlarında 10 µM gossypol ile 24 saat enkübe edilince, mitokondrial kristallerin kaybolduğu ve vakuolizasyonun meydana geldiği görülmüştür (77). Gossypol, fosfolipid ve kolesterol tabakalarını etkileyerek mitokondri membranına girer. Bu etki, membranın kolesterol içeriğine bağlıdır. Adrenal korteks mitokondri membranı düşük kolesterol içerir, gossypol

lipid komponentin akışkanlığını azaltır, sonuçta membran enzimleri lipid bariyeri açar ve optimal enzim aktivitesi bozular.

Gossypol hücrelerde ve mikroorganizmalarda geniş bir alanda araştırılmaktadır. Biyolojik aktivitesi; enzim inhibisyonu, sinyal iletim yolakları etkileşimi, protein ekspresyonunun regülasyonu, hücre ve mitokondri membranları ile etkileşimi ile ortaya çıkar. alışmalar devam ettikçe, etki yolları daha iyi anlaşılacak ve daha efektif kullanım alanları bulacaktır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda MDA-MB453 HER2 pozitif meme kanseri hücre hattında trastuzumab ve AT-101'in tek başlarına ve kombinasyon olarak uygulanması ile olası aditif, sitotoksik ve apoptotik etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

-Tümör hücre hattı:

MDA-MB-453 Meme kanseri hücre hattı 'Leibniz –Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' (Alman mikroorganizma ve hücre kültür koleksiyonu) ' dan temin edilmiştir.

İlaçlar:

Trastuzumab (Herceptin; Roche, Basel, İsviçre) firmasından temin edilmiştir.

(-)- Gossypol (AT -101), Ascenta (Ascenta Therapeutics, ABD) firmasının Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'na hediyesiydi.

1. MDA-MB453 hücre hattında kullanılan

besiyeri ve kültür işlemleri:

Hücre hatları; 37 °C'de ve %5 CO₂'li humidifiye edilmiş inkübatörde, stabil %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 ve DMEM Ham's F:12 besiyeri birebir karıştırıldı. İçine %1 nonesansiyel aminoasitler, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10,000 ünite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek çoğaltıldı.

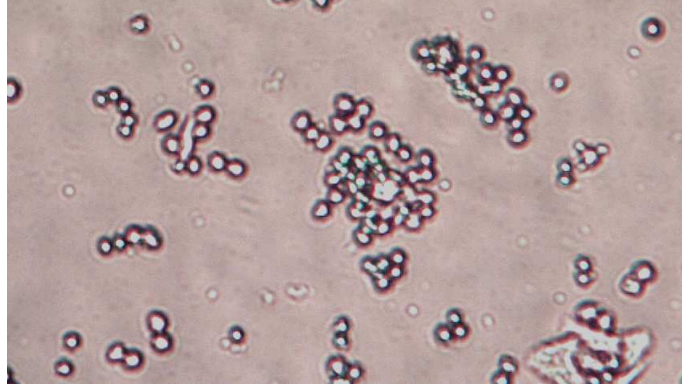
Hücre kültür işlemleri ultraviyole ile sterilize edilen Laminar Hood (NuAire, USA) içerisinde yapıldı.

Dondurulmuş hücre hattının çözülmesi:

-80 °C'deki kriyotüpler içinde %10 DMSO ile dondurulmuş olan MDA-MB453 hücre hattı, -80 °C'den çıkarılıp 37 °C'de çözüldü. İşlem öncesi Hood 30 dk boyunca ultraviyole ile sterilize edildi ve çalışmaya başlamadan önce içi alkol ile temizlendi. Çözülen hücrelerin üzerine 10-15 ml besiyeri eklendikten sonra 1000 devir/dk'da 10 dakika santrifüje edildi. 37 °C ısıda DMSO' un hücrelere olan toksik etkisi, hücre canlılığını azaltacağı için, en seri şekilde çalışılmıştır. Santirfügasyondan sonra üstteki kısım atılıp, kalan hücre çökeltisine taze besiyeri eklendi. Ardından homojenize edilip tekrar santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra tüpün dibindeki hücre çökeltisi tekrar 10-15 ml taze besiyeri ile homojenize edilip, 50 ml'lik flasklara steril şekilde aktarıldı.

Hücre hattının pasajlanması:

Flasklara aktarılan hücrelerin üzerine 10 ml besiyeri eklenip, inkübatöre yerleştirildi. Çoğalmaları beklenirken haftada iki kere besiyeri değiştirildi. Işık mikroskopunda flask tabanını monolayer olarak kaplayıp kaplamadıkları kontrol edildi. MDA-MB453 hücrelerinin ikilenme zamanları yaklaşık 10 gün olarak bulundu ve pasajları, ikilenme zamanına uygun olarak yapıldı. Pasajlama işlemi için öncelikle flaskların içindeki besiyeri dökülüp, hücrelerin üzerine 5 ml Tripsin-EDTA (Biological Industries, Indianapolis) eklendi. İnkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra mikroskopta flask tabanından kalkıp kalkmadıkları kontrol edildi. Tabandan ayrılan hücrelerin üzerine, yaklaşık 5-10 ml besiyeri eklenerek, Tripsin-EDTA nötralize edildi ve ardından bu karışım, tüplere alınıp santrifüje edildi. Üzerindeki süpernatant atılıp, tabandaki hücre çökeltisi üzerine yaklaşık 10 ml besiyeri eklenip homojenize edildi ve pasajlanmak üzere flasklara tekrar ekildi, üzerine besiyeri eklendi. Her pasaj sırasında yaklaşık 2 milyon hücre/10 ml besiyerinde olacak şekilde pasajlama yapıldı.



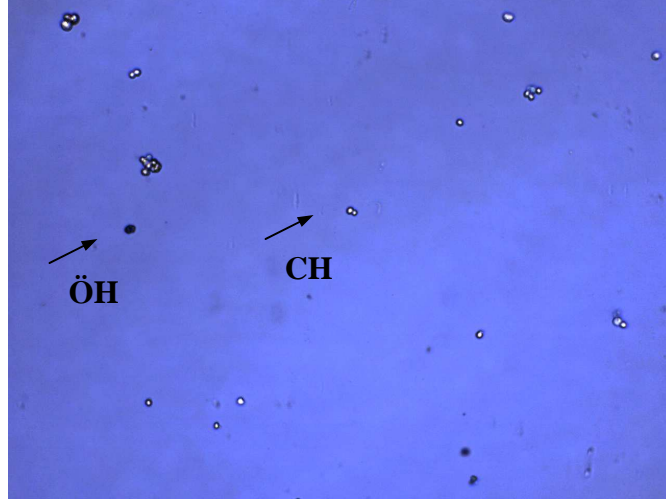
Şekil 3: MDA-MB-453 hücrelerin floresan mikroskop altında boya olmaksızın görüntüsü

MDA-MB453 hücrelerinin sayımı ve deney planına göre ekimi:

Hücre sayısı; besiyerinin mililitresi başına veya tutunulan yüzeyin santimetreküpü başına düşen hücre sayısı olarak belirtilebilir. (Şekil 3)

Flasklar içinde inkübe edilmiş olan MDA-MB453 hücreleri yapıştıkları yüzeyden kalkması için tripsin EDTA ile muamele edildi. Hücreler kalkınca besiyeri ile nötralize edilip, tüpte santrifüje edildi. Altta kalan hücre çökeltisi besiyeri ile dilüe edilip homojenize edildi.

Hücre sayımı için trypan blue dye exclusion test uygulandı. Hücre içeren süspansiyon ve trypan blue solüsyonu 1:1 oranında karıştırıldı ve otomatik sayım cihazının (Cellometer) lamına mikropipet yardımıyla aktarıldı. Hücre sayımı otomatik olarak yapıldı. Canlı hücreler, trypan blue boyasına geçirgen olmadıkları için parlak, ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine çektikleri için mavi renkte görünürler (Şekil 4).



Şekil 4: Otomatik sayım cihazındaki hücrelerin görüntüsü (ÖH = Ölü hücreler, CH = Canlı hücreler).

Canlı hücre sayımından sonra, deneyi yapacağımız 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarında her bir kuyucuk içine 10.000 hücre gelecek şekilde MDA-MB453 hücrelerinin ekimi yapıldı. Deneyde her bir ilaç konsantrasyonu ve kombinasyonları üçlü kontrolle çalışılacağı ve 24-48-72. saatlerde de tek ajan değerlendirmeleri yapılacağı için, aynı zamanda pozitif kontrol (sadece hücre içeren) ve negatif kontrol (sadece besiyeri içeren) kuyucuklar da hazırlanacağı için, deney planına göre uygun sayıda kuyucuk içine hücre ekim işlemleri tamamlandı.

Hücre ekilen 96 kuyucuklu hücre kültür plakları, hücrelerin tabana yapışması için 37°C ısı, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

İlaçların hazırlanması ve hücrelere eklenmesi:

Çalışmamızda MDA-MB453 meme kanseri hücre hattında trastuzumab ve AT-101 artan dozlarda tek başına ve kombine uygulanmasındaki sinerjistik, sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

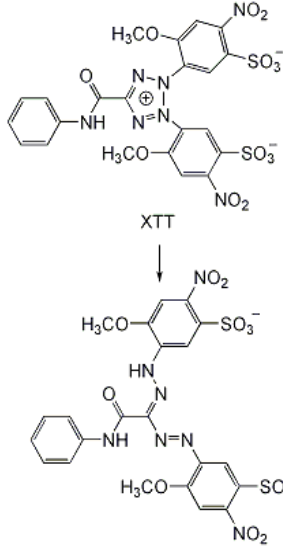
Trastuzumab (Herceptin; Roche, Basel, İsviçre) konsantre liyofilize (dondurulup-kurutulmuş) toz halindedir. Firma önerisine göre %1.1 benzil alkol içeren su ile sulandırıldı. Stok solüsyonu +4 derecede saklandı. Gossypol (Sigma

Aldrich, Germany), 1ml DMSO'da çözdürülerek 10^{-2} M'lık stok solüsyon oluşturuldu. Stok solüsyonu -20°C 'de saklandı.

Çalışmanın başında 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına, her bir kuyucuk içine toplam 100 μl volüm içinde 10.000 hücre olacak şekilde (sadece besiyeri koyularak negatif kontrol olarak kullanılacak kuyucuklara da 100 μl besiyeri koyularak) ve her bir konsantrasyon için üçlü kontrollü (triplicate) hücre ekimleri yapılmıştı. Trastuzumab için deneyimizde çalışılacak konsantrasyonları mililitrede 10 μgr , 20 μgr , 40 μgr , 80 μgr , 100 μgr , 120 μgr , 160 μgr ve 200 μgr olarak planlandı. AT-101 için ise planlanan konsantrasyonlar 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM ve 15 μM olarak saptandı. Hücre ekim işleminden sonra 24 saat boyunca inkübatörde bekletilen hücre kültür plaklarına planlanan konsantrasyonlardaki trastuzumab ve AT-101, toplam 100 μl volüm içinde olacak şekilde, tek başlarına veya kombine edilecekleri dozlarında 24-48-72 saatlik sitotoksosite analizleri için eklendi (her bir deney 3 kez tekrarlandı).

2. Sitotoksosite Analizi:

Hücre proliferasyonu ve sitotoksosite tayini için XTT Hücre Canlılık Kiti (Roche) kullanıldı. XTT metodu ilk kez 1988 yılında Scudiero tarafından tanımlanmıştır. Tetrazolium tuzuna dayanan kolorimertrik bir metoddur. Tetrazolium tuzunun, Metabolik aktif, çekirdekli hücre mitokondrilerinde suda çözünen ve turuncu renk veren formazana dönüşüm prensibi ile çalışan bir metoddur. (Şekil 5) Başlangıçta ortamdaki renk sarı iken, madde canlı hücrelerde metabolize edildikçe turuncuya döner. Canlı hücre sayısı ne kadar fazla ise renkte koyulaşma o kadar fazla gözlenir.



Sekil 5: XTT^{ox}'in canlı hücrelerde suda çözünür

Sitotoksosite analizlerinin yapılacağı saatlerde (24-48-72. saat) XTT solüsyonu sodyum 3'- [1-(fenil-aminokarbonil)- 3, 4-tetrazolyum]- bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat ile N-metil dibenzopirazin metil sülfat'ın 50:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100µl volümde olacak şekilde XTT solüsyonu eklendi. Üzerine XTT eklenen kuyucuklar inkübatörde 4 saat bekletildi. Bu süre sonunda, oluşan turuncu renk yoğunluğunun absorpsansı, 420-630 nm dalga boyu aralığında DTX 880 (Elisa Reader Multimod mikroparka okuyucu) cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her değerlendirme, aynı saatteki pozitif kontrol grubundaki hücre sayısı ile karşılaştırılıp, canlı ve ölü hücre yüzdeleri (% sitotoksosite) hesaplandı.

% Sitotoksosite = 1 - [(İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması / Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması) x100] formülü ile hesaplandı.

3. Kombinasyonlarındaki Sinerjistik Sitotoksitenin Apoptozla İlişkisinin Gösterilmesi:

A. DNA fragmantasyon analizi

AT-101 ve Trastuzumab'ın kombine halde sitotoksik etkili oldukları konsantrasyonlarda bu etkinin apoptoza bağlı olup olmadığını belirlemek üzere Cell

Death Detection ELISA Plus Kit (Roche Applied Science, Germany) üretici firmanın protokolüne uygun olarak kullanıldı. Bu kit hücrelerdeki DNA fragmantasyon miktarının ölçülmesi için tasarlanmıştır ve apoptotik hücrelerin sitoplazmasındaki histonlarla paketlenmiş olan DNA fragmanlarını ölçmektedir.

İlaçlarla tek ve kombine olarak muamele edilen hücrelerden ve ilaç eklenmeyen kontrol hücrelerinden elde edilen hücre lizatları kitin içeren streptavidin kaplı plakalara eklendi. Histon proteinleri ve DNA fragmanlarına karşı (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz) antikoları içeren reaktiften 80 µl eklenen plaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında anti-histon antikoru bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunkompleksler, streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasından sonra nükleozomların miktarının kalitatif olarak belirlenmesi immunokomplekslere tutunmuş olan peroksidazların ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile absorbansı spektrofotometrik olarak (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter) 490 nm referans dalga boyu ile 405 nm' de okundu. Kitin ihtiva ettiği ve %100 apoptotik hücre lizatlarında histon ve DNA fragmanlarındaki miktarındaki artış, apoptoz miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

B. Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi analizi:

Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi ise Caspase-Glo Assay (Promega, WI, USA) kullanılarak değerlendirildi. İlaçlarla muamele edilmiş ve edilmemiş hücreler toplam hacim 300 µl olacak şekilde 96 kuyucuk içeren hücre kültürü plakalarına eklendi. Kitin ihtiva ettiği 2,5 ml Caspase-Glo 3/7 Buffer, Caspase-Glo 3/7 substratı ile karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlandı. Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenerek hücre kültürü plakası oda sıcaklığında 1 saat enkübe edildi. 1 saatlik İnkübasyon sonunda oluşan lüminesans sinyalleri çok modüllü plaka okuyucu ile ölçüldü (Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Reader). Caspase-Glo 3/7 karışımı, kaspaz 3/7 substratı olan DEVD Asp-Glu-Val-Asp tetrapeptid dizisi ayrıca hücre lizisini sağlayan

buffer içermektedir. Bu karışımın hücelere eklenmesi hücrelerin lizisine, ardından da kaspaz substratının yıkımına bağlı olarak lüminesans sinyal oluşumuna neden olur. Oluşan lüminesans sinyal miktarı, hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesiyle doğru orantılı olarak değerlendirilir.

4.İstatistiksel Analiz:

Kombinasyonların sinerjistik etkilerini araştırmak üzere medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre iki veya daha fazla ilacın sinerjistik, antagonistik veya aditif etki gösterip göstermediğini otomatik olarak analiz eden CalcuSyn 2.0 (Biosoft, England) yazılımı kullanıldı. CalCusyn programı ortak mekanizma veya ortak hedefli ilaçlar ile farklı mekanizma veya farklı hedeflere yönelen ilaç kombinasyonlarının verilerini otomatik olarak analiz etmektedir. Bu programda da kullanılan kombinasyon indeksi (CI) analizi, bu amaçla geniş bir şekilde uygulanmaktadır ve mikrobilgisayar yazılımı kullanımıyla birlikte basitleştirilmiştir (92). CI metodu Chou tarafından ortaya konan ortalama etki (median-effect) prensibine dayanmaktadır (93,94). CI denklemi ilaç kombinasyonlarının aditif etkilerini belirlerken, beklenen aditif etkiden daha fazla etki, antagonizmi ise beklenen aditif etkiden daha az etki olarak tanımlamaktadır. Bu şekilde $CI=1$ olduğunda aditif etkiyi, $CI<1$ olduğunda sinerjistik etkiyi, $CI>1$ olduğunda ise antagonizmi ifade etmektedir.

Tablo 2: İki ilacın hücre kültürlerinde kombine kullanımının sinerjistik-aditif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri

CI (kombinasyon indeksi)	Kombine sitotoksik etki
$0.1<$	Çok kuvvetli sinerjizm
$0.1 - 0.3$	Kuvvetli sinerjizm
$0.3 - 0.7$	Sinerjizm
$0.7 - 0.9$	Hafif sinerjistik etki
$0.9 - 1.1$	Aditif etki
>1.1	Antagonist

Absorbans değerlerinden yukarıdaki formüle göre hesaplanan sitotoksisite yüzdeleri CalcuSyn programına girildi. Böylece her ilacın doz etki tablosu ve eğrisi çizilerek IC₅₀ değeri saptandı. IC₅₀ değerleri doğrultusunda Trastuzumab ve AT-101 değişik oranlarda kombine edilerek ilaç kombinasyonunun sinerjisi 72 saatlik hücre kültürü inkbasyonlarında araştırıldı. 72 saatlik inkübasyon sonucu sitotoksisite yüzdeleri Calcusyn programına girilerek sinerji bulunan kombinasyonlar belirlendi.

Deneylerdeki veriler GraphPad PRISM 5.0 (San Diego, CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Tüm deneyler “triplicate” olarak yapıldı ve sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edildi. En son değer,  deneydeki ekspresyon oranı (y eksenini) \pm SD'dan elde edilen veriler ile belirlendi. İki grubun sonuçlarının karşılaştırılmasında Student's t test kullanılarak veri analizi yapıldı (p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

SONUÇLAR:

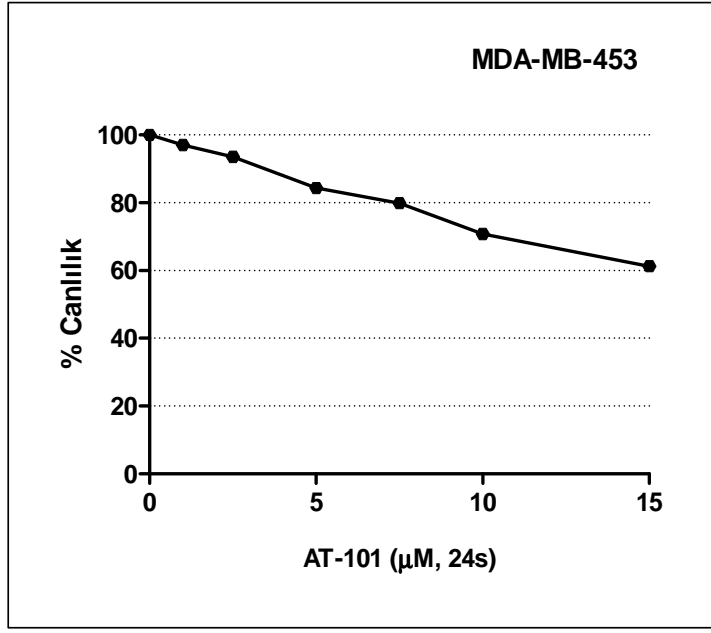
MDA-MB-453 hücre hatlarında AT-101 ve Trastuzumab 'in (TB) zamana ve doza bağımlı anti-tümöral etkilerinin gösterilmesi ve IC₅₀ (%50 inhibitör konsantrasyon) saptanması:

AT-101: MDA-MB-453 hücreleri 96 kuyucuktan oluşan (microtiter well plate) deney ortamına her kuyucukta 10.000 hücre bulunacak şekilde ekildi. AT-101 altı farklı konsantrasyonunun (1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM ve 15 µM) 24. saat, 48. saat ve 72. saatlerdeki sitotoksitesinin belirlenebilmesi için üç ayrı deney oluşturacak şekilde deney planlaması yapıldı. Her deney grubunda sadece besiyeri ve besiyeri ile birlikte hücre bulunacak şekilde iki adet pozitif kontrol sağlandı. Pozitif kontroller ve farklı ilaç konsantrasyonlarının bulunduğu her deney üç defa tekrarlandı. Belirlenen konsantrasyonlarda AT-101; MDA-MB-453 hücrelerinin bulunduğu deney ortamına eklendi. 24. Saat, 48. Saat ve 72. Saatlerde yukarıda bahsedildiği şekilde XTT metodu kullanılarak sitotoksite ölçümü spektrofotometrik yöntemle yapıldı.

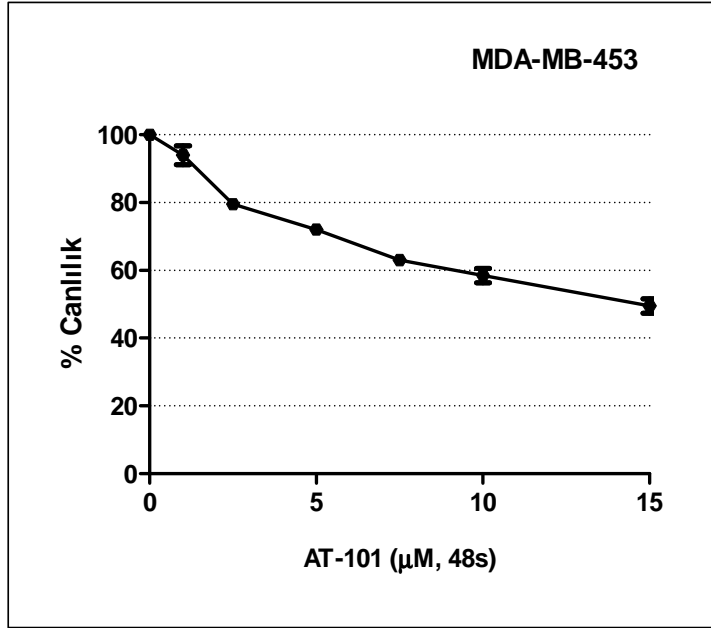
MDA-MB-453 hücre hattında 24. Saatte; 1 µM konsantrasyonda AT-101 ile % 96; 2,5 µM AT-101 ile % 92; 5 µM AT-101 ile % 83; 7,5 µM AT-101 ile % 78; 10 µM AT-101 ile % 69; 15 µM AT-101 ile % 60 oranında canlılık gözlemlendi. (Grafik 1A).

MDA-MB-453 hücre hattında 48. Saatte; 1 µM konsantrasyonda AT-101 ile % 92; 2,5 µM AT-101 ile % 80; 5 µM AT-101 ile % 71; 7,5 µM AT-101 ile % 62; 10 µM AT-101 ile % 57; 15 µM AT-101 ile % 48 oranında canlılık gözlemlendi (Grafik 1B).

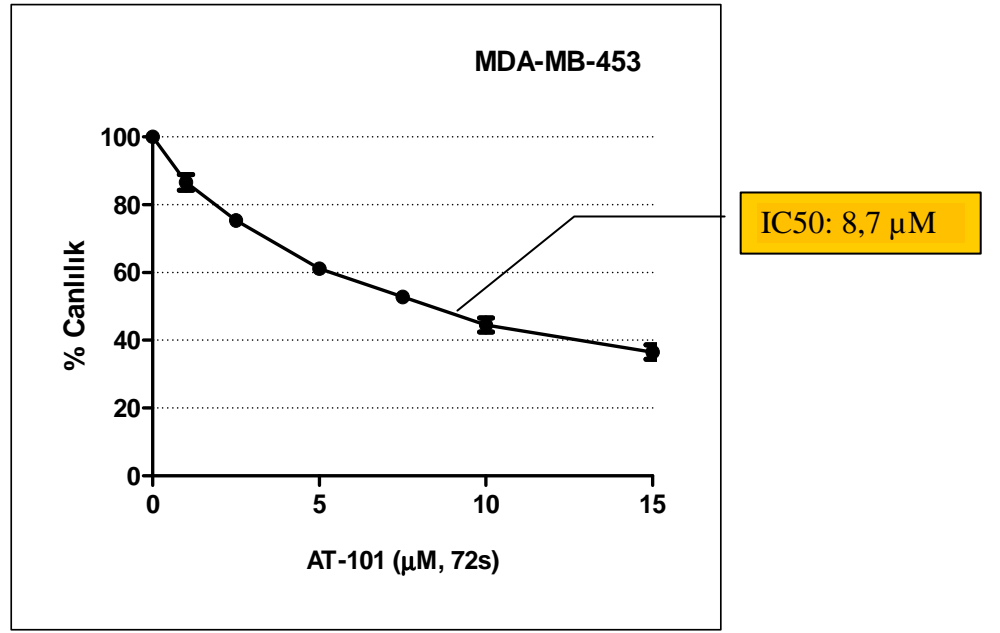
MDA-MB-453 hücre hattında 72. Saatte; 1 µM konsantrasyonda AT-101 ile % 89; 2,5 µM AT-101 ile %77; 5 µM AT-101 ile % 63; 7,5 µM AT-101 ile % 54; 10 µM AT-101 ile % 46; 15 µM AT-101 ile % 38 oranında canlılık gözlemlendi (Grafik 1C).



Grafik 1A: MDA-MB-453 hücre hatlarında 24. saatte AT-101'in değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları



Grafik 1B: MDA-MB-453 hücre hatlarında 48. saatte AT-101'in değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları



Grafik 1C: MDA-MB-453 hücre hatlarında 72. saatte AT-101'in değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları

Tablo 3: AT-101'in MDA-MB-453 hücre hattında zamana ve doza bağlı sitotoksosite oranları

%sitotoksosite	Pozitif	1µM	2.5µM	5µM	7.5µM	10µM	15µM
24. saat	0	4,0	8,0	17,0	22,0	31,2	40,0
48. saat	0	8,0	20,0	29,0	38,0	43,0	52,4
72. saat	0	11,7	23,3	37,8	46,0	54,0	62,0

Sonuç olarak, AT101'in MDA-MB-453 hücre hattında sitotoksik etkisinin olduğu; doza ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edildi.(Tablo 3)

72. saatte tespit edilen sitotoksosite yüzdeleri Calcsyn programına girilerek AT-101'in IC₅₀ değeri hesaplandı. Bu programa göre AT-101'in 72. saatte; MDA-MB-453 hücre hattındaki IC₅₀ değeri 8,7 µM olarak belirlendi.

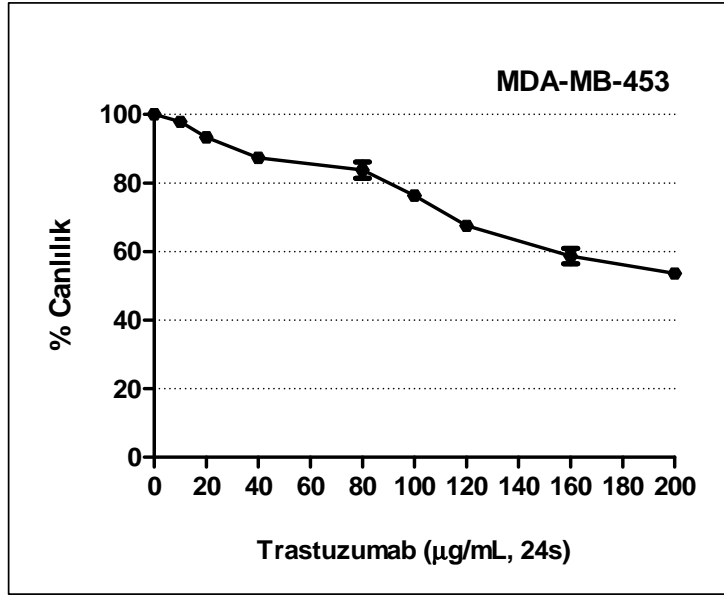
Trastuzumab: MDA-MB-453 hücreleri 96 kuyucuktan oluşan (microtiter well plate) deney ortamına her kuyucukta 10.000 hücre bulunacak şekilde ekildi. Trastuzumab dokuz farklı konsantrasyonunun (5 µgr, 10 µgr, 20 µgr, 40 µgr, 80 µgr ve 100 µgr, 120 µgr, 160 µgr ve 200 µgr) 24. saat, 48.saat, 72. saatlerdeki sitotoksitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenebilmesi için üç ayrı deney oluşturacak şekilde deney planlaması yapıldı. Her deney grubunda sadece besiyeri ve besiyeri ile birlikte hücre bulunacak şekilde iki adet pozitif kontrol sağlandı. Pozitif kontroller ve farklı ilaç konsantrasyonlarının bulunduğu her deney üç defa tekrarlandı.

5 µgr/ml, 10 µgr/ml, 20 µgr/ml, 40 µgr/ml, 80 µgr/ml ve 100 µgr/ml, 120 µgr/ml, 160 µgr/ml ve 200 µgr/ml konsantrasyonlarda Trastuzumab MDA-MB-453 hücrelerinin bulunduğu deney ortamına eklendi. 24. 48. ve 72. Saatlerde XTT metodu kullanılarak sitotoksite ölçümü yapıldı.

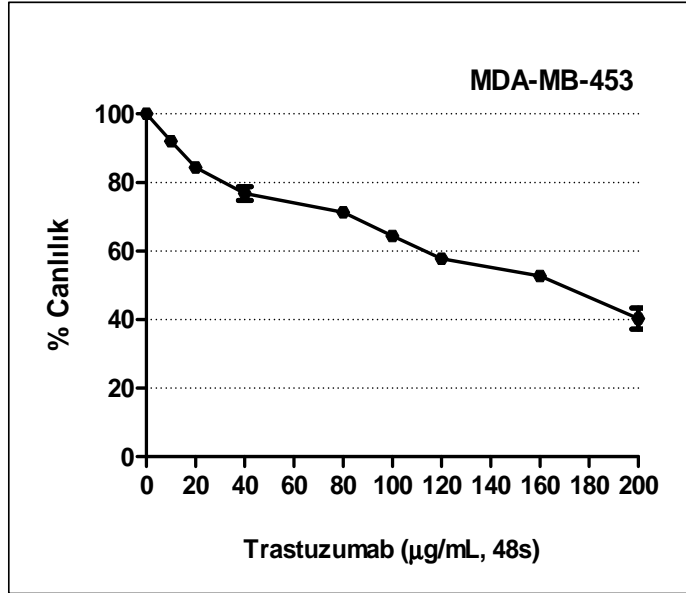
MDA-MB-453 hücre hattında 24. saatte; Trastuzumab'ın 5µgr/ml si ile %99; 10µgr/ml si ile %97; 20 µgr/ml si ile %94; 40 µgr/ml si ile %86; 80 µgr/ml si ile %82; 100 µgr/ml si ile %77; 120 µgr si ile %68; 160 µgr/ml si ile %57 ve 200 µgr/ml si ile %52 oranında canlılık gözlemlendi. (Grafik 2A).

MDA-MB-453 hücre hattında 48. Saatte; Trastuzumab'ın 5µgr/ml si ile %95; 10 µgr /ml si ile %91; 20 µgr/ml si ile %83; 40 µgr/ml si ile %75; 80 µgr/ml si ile %70; 100 µgr/ml si ile %63; 120 µgr/ml si ile %56; 160 µgr/ml si ile %51 ve 200 µgr/ml si ile %42 oranında canlılık gözlemlendi. (Grafik 2B).

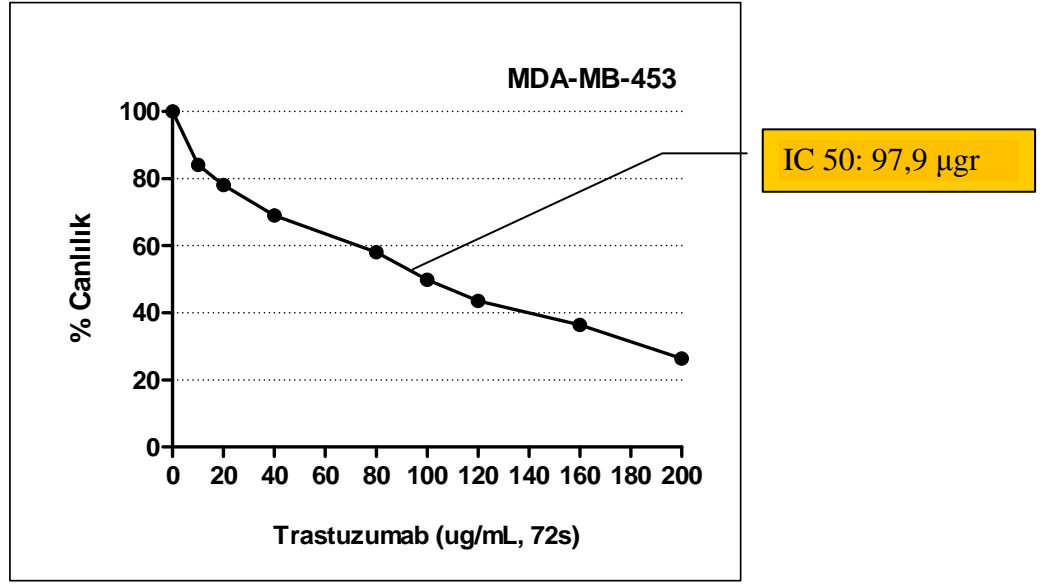
MDA-MB-453 hücre hattında 72. saatte; 5µgr/ml Trastuzumab ile %88; 10 µgr/ml trastuzumab ile %85; 20 µgr/ml trastuzumab ile %79; 40 µgr/ml trastuzumab ile %70; 80 µgr/ml trastuzumab ile %59; 100 µgr/ml trastuzumab ile %51; 120 µgr /ml trastuzumab ile %45; 160 µgr/ml trastuzumab ile %38 ve 200 µgr/ml trastuzumab konsantrasyonu ile %28 oranında canlılık gözlemlendi. (Grafik 2C).



Grafik 2A: MDA-MB-453 hücre hatlarında 24. saatte Trastuzumab'ın değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları



Grafik 2B: MDA-MB-453 hücre hatlarında 48. saatte Trastuzumab'ın değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları



Grafik 2C: MDA-MB-453 hücre hatlarında 72. saatte Trastuzumab'ın değişen konsantrasyonlarında gözlenen % canlılık oranları

Tablo 4: Trastuzumab 'in MDA-MB-453 hücre hattında zamana ve doza bağlı sitotoksisite oranları

%sitotoksisite	Pozitif Kontrol	5 µgr	10 µgr	20 µgr	40 µgr	80 µgr	100 µgr	120 µgr	160 µgr	200 µgr
24. saat	0	1,2	3,1	6,2	14,0	18,1	23,0	32,0	43,1	48,3
48. saat	0	5,1	9,2	17,0	25,3	30,0	37,3	44,2	49,0	58,1
72. saat	0	12,4	15,6	21,0	30,3	41,2	49,1	55,0	62,2	72,0

Sonuç olarak; Trastuzumab'ın MDA-MB-453 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin AT- 101 gibi doza ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edildi.(Tablo 4)

72. saatte tespit edilen sitotoksisite yüzdeleri Calcusyn programına girilerek Trastuzumab'ın IC₅₀ değeri hesaplandı. Bu programa göre Trastuzumab'ın 72. saatte, MDA-MB-453 hücre hattındaki IC₅₀ 97,9 µgr/ml olarak belirlendi.

Trastuzumab ve AT-101 kombinasyonunun MDA-MB-453 hücre hattındaki sitotoksik etkileri:

MDA-MB-453 hücre hattında trastuzumab ve AT-101'in değişen konsantrasyonlarda doza ve zamana bağlı olarak artan sitotoksikite verileri elde edildikten sonra, bu ilaçların klinik kullanıma uygun ve IC 50 değerleri ve altındaki konsantrasyonlar seçilerek kombinasyonlar oluşturuldu ve 72. saatteki sitotoksikite oranları saptandı. (Grafik 3)

MDA-MB-453 hücre hattında 72. saatte; 2.5 μ M konsantrasyonda AT-101'in sitotoksik etkisi %23 ve 5 μ gr/ml konsantrasyonda Trastuzumab'ın sitotoksik etkisi %12 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %33 oranında saptandı.

5 μ M konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %37 ve 5 μ gr/ml konsantrasyonda Trastuzumab'ın sitotoksik etkisi %12 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %46 oranında saptandı.

2,5 μ M konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %23 ve 20 μ gr/ml konsantrasyonda trastuzumab sitotoksik etkisi %21 olurken, bu dozların sitotoksik etkisi %52 oranında saptandı.

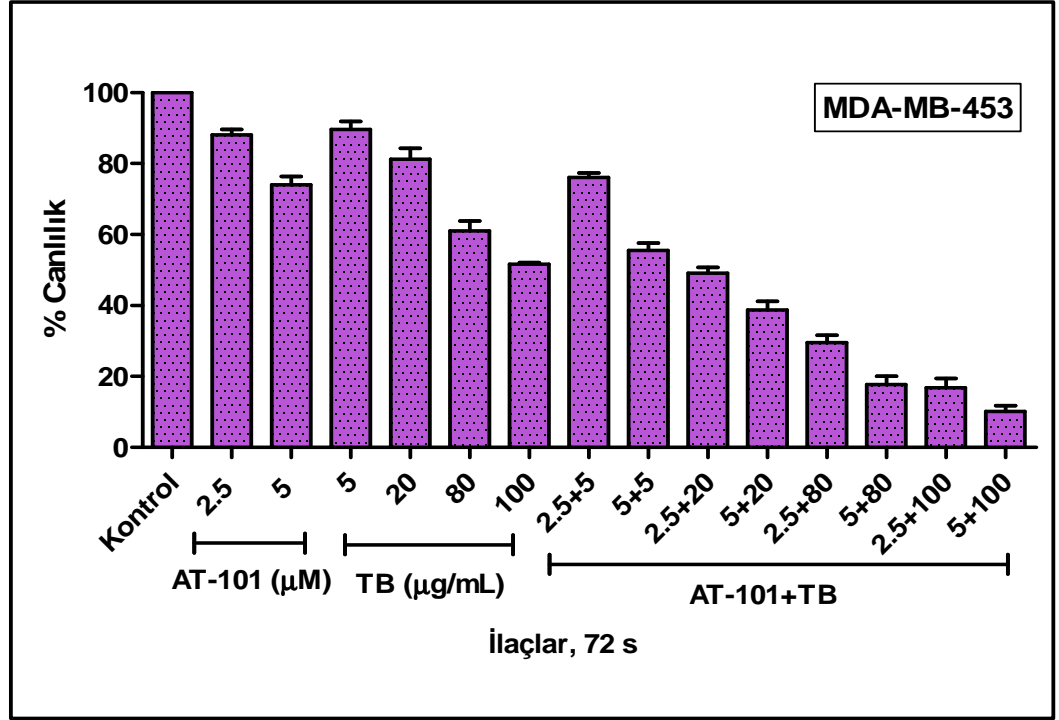
5 μ M konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %37 ve 20 μ gr/ml konsantrasyonda trastuzumabın sitotoksik etkisi %21 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %63 oranında saptandı.

2,5 μ M konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %23 ve 80 μ gr/ml konsantrasyonda trastuzumabın sitotoksik etkisi %41 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %72 oranında saptandı.

5 μ M konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %37 ve 80 μ gr/ml konsantrasyonda trastuzumabın sitotoksik etkisi %41 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %84 oranında saptandı.

2,5 μ M konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %23 ve 100 μ gr/ml konsantrasyonda trastuzumabın sitotoksik etkisi %48,9 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %85 oranında saptandı.

5 μM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %37 ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda trastuzumabın sitotoksik etkisi %48,9 olurken, bu dozların kombinasyonunun sitotoksik etkisi %91 oranında saptandı.



Grafik 3: MDA-MB-453 hücre hattında 72.saatte AT-101 ve Trastuzumab(TB) in değişik konsantrasyonlarda kombinasyonunda gözlenen sitotoksisite

Değişik oranlarda ilaç kombinasyonlarının MDA-MB-453 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CalcuSyn programına girilerek kombinasyonların CI (Kombinasyon İndeks) değerleri hesaplandı. Araştırılan 8 adet kombinasyondan 2 tanesinde sinerjistik etki, 3 tanesinde kuvvetli sinerjistik etki, 1 tanesinde çok kuvvetli sinerjistik etki gözlemlendi (Tablo 5).

Tablo 5: AT-101 ve Trastuzumab(TB) kombinasyonunun sinerjistik etki saptanan konsantrasyonları ve CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
TB (5µg/mL) + AT-101 (2.5µM)	0,766	Hafif sinerjizm
TB (5µg/mL) + AT-101 (5µM)	0,746	Hafif sinerjizm
TB (20µg/mL) + AT-101 (2.5µM)	0,443	Sinerjizm
TB (20µg/mL) + AT-101 (5µM)	0,413	Sinerjizm
TB (80µg/mL) + AT-101 (2.5µM)	0.290	Kuvvetli sinerjizm
TB (80µg/mL) + AT-101 (5µM)	0.158	Kuvvetli sinerjizm
TB (100µg/mL) + AT-101 (2.5µM)	0,112	Kuvvetli sinerjizm
TB (100µg/mL) + AT-101 (5µM)	0,075	Çok kuvvetli sinerjizm

2.5µM AT-101+5 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.766 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında hafif sinerjizm olduğu görüldü.

5µM AT-101+5 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.746 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında hafif sinerjizm olduğu görüldü.

2.5µM AT-101+20 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.443 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında da sinerjizm olduğu görüldü.

5µM AT-101+20 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.431 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında sinerjizm olduğu görüldü.

2.5µM AT-101+80 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.290 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında kuvvetli sinerjizm saptandı.

5µM AT-101+80 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.158 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında kuvvetli sinerjizm olduğu görüldü.

2.5µM AT-101+100 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.112 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında kuvvetli sinerjizm olduğu görüldü.

5µM AT-101+100 µgr/ml Trastuzumab kombinasyonunun CI değeri 0.075 olarak saptandı ve bu kombinasyon dozlarında çok kuvvetli sinerjizm olduğu görüldü.

İstatistiksel analiz:

MDA-MB-453 hücre kültürlerinde 24. ve 48. saatin sonunda AT-101'in çalışılan konsantrasyonlarında (1-15 μ M) anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmezken ($p \geq 0.05$) 72 saatin sonunda ise aynı konsantrasyonların etkileri sırasıyla %11.7, 23.3, 37.8, 46.6, 54.0, 62.0 olarak bulundu, istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p \leq 0.05$). AT101'in MDA-MB-453 hücre kültürlerinde 72. saat IC50 değeri 8.7 μ M olarak tespit edildi.

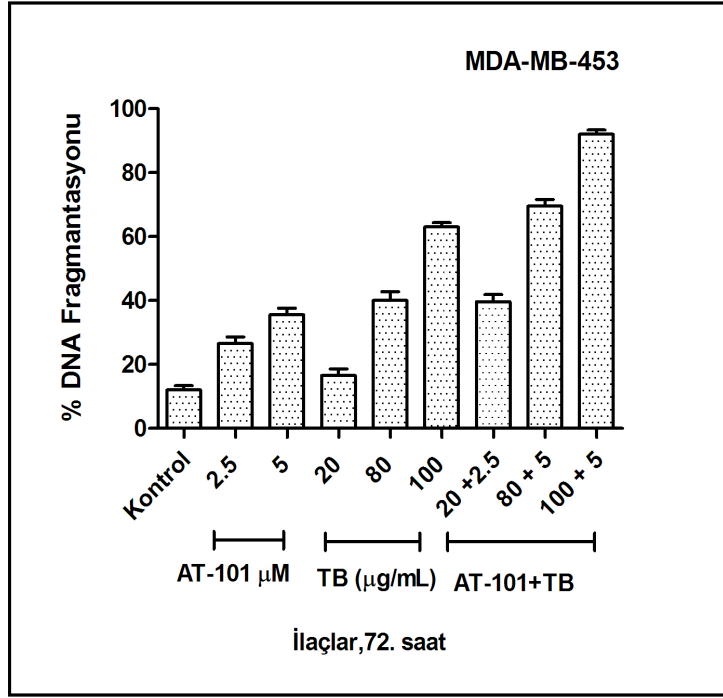
Trastuzumab 'in ise bu kanser hücre hattında 24 ve 48. saat sonunda çalışılan konsantrasyonlarında da (5-200 μ gr/ml) anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmezken ($p \geq 0.05$) 72 saatin sonunda ise belirlenen konsantrasyonların etkileri sırasıyla %12.4, 15.6, 21.0, 30.3, 41.2, 49.1, 55.0, 62.2, 72.0 olarak bulundu, istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p \leq 0.05$). Trastuzumab' in MDA-MB-453 hücre kültürlerinde 72. saat IC50 değeri 97.9 μ gr/ml olarak tespit edildi.

72. saatte hücre hattında Trastuzumab ve AT-101 in tekli kullanımıyla elde edilen sitotoksikite verileri, ilaçların kombinasyonlarından elde edilen verilerle Student's t testi kullanılarak karşılaştırıldığında tüm kombinasyonların sitotoksik etkileri istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0,05$ olarak hesaplandı.)

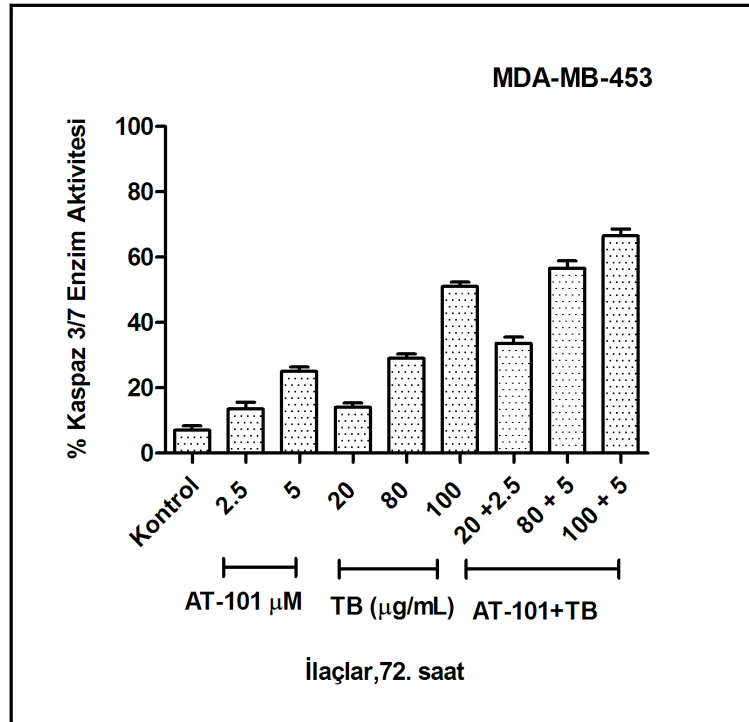
AT-101 ve Trastuzumab in MDA-MB-453 hücre hattında sinerjistik etki gösteren kombinasyonlarının apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi:

İlaçların değişik dozlarda tekli ve kombine uygulanmasıyla elde edilen IC50 ve CalcuSyn bilgisayar programıyla belirlenen sinerjistik dozlar; doz şemasına göre MDA-MB-453 hücre hattında ilaçların sitotoksik etkilerinin apoptoz aracılığı ile oluştuğunun gösterilmesi amaçlandı. Bunun için bu hücre hattında Cell Death Detection Kit (Roche) kullanılarak yapılarak DNA fragmentasyon yüzdesi kantitatif olarak ölçüldü ve efektör kaspazlardan olan Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi çalışıldı.

MDA-MB-453 hücre hattında Trastuzumab ve AT-101'in artan tekli ve kombine doz uygulamalarında elde edilen sonuçlar grafik 4 ve grafik 5 de gösterilmiştir.



Grafik 4: AT-101 ve trastuzumab in tekli ve kuvvetli sinerjistik kombinasyonlarında gözlenen %DNA fragmentasyonu oranları



Grafik 5: AT-101 ve trastuzumab in tekli ve kuvvetli sinerjistik kombinasyonlarında gözlenen % Kaspaz 3/7 enzim aktivite oranları

MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkinin apoptoz aracılı olduğunun belirlenmesi için 72. Saatte ölçülen DNA fragmantasyon yüzdeleri; kontrolde %11 oranında saptanırken; 2.5µM AT 101 ile %25, 5 µM AT-101 ile %34, 20 µgr/ml Trastuzumab ile %18, 80 µgr/ml Trastuzumab ile %42, 100 µgr/ml Trastuzumab ile %64 oranında saptandı. (Grafik 4, Tablo 6)

DNA fragmantasyonu dışında apoptozu değerlendirmek için 72. Saatte ölçülen Kaspaz 3/7enzim aktivitesi; kontrolde %6 oranında saptanırken; 2.5µM AT 101 ile %12, 5 µM AT-101 ile %24, 20 µgr/ml Trastuzumab ile %13, 80 µgr/ml Trastuzumab ile %30, 100 µgr/ml Trastuzumab ile %52 oranında saptandı. (Grafik 5, tablo 6)

MDA-MB-453 hücre hattında tedavisiz kontrole göre 20 µgr/ml Trastuzumab ile DNA fragmantasyonunun da 1,6 kat artış, 2,5 µM AT-101 ile 2,2 kat artış olurken 20 µgr/ml Trastuzumab+2,5 µM AT-101 ile 3,7 kat artış saptandı.

DNA fragmantasyonunun da pozitif kontrole göre; 80µgr/ml Trastuzumab ile 3,8 kat artış, 5 µM AT-101 ile 3 kat artış olurken 80 µgr/ml Trastuzumab+ 5 µM AT-101 ile 6,45 kat artış saptandı. 100 µgr/ml Trastuzumab ile DNA fragmantasyonunun da 5,8 kat artış olurken 100 µgr/ml Trastuzumab+ 5 µM AT-101 ile 8,45 kat artış saptandı.

MDA-MB-453 hücre hattında tedavisiz kontrole göre 20 µgr/ml Trastuzumab ile Kaspaz 3/7 enzim aktivitesinde 2 kat artış, 2,5 µM AT-101 ile 2 kat artış olurken 20 µgr/ml Trastuzumab+2,5 µM AT-101 ile 5,3 kat artış saptandı.

80µgr/ml Trastuzumab ile Kaspaz 3/7 enzim aktivitesinde 5 kat artış, 5 µM AT-101 ile 4 kat artış olurken 80 µgr/ml Trastuzumab+ 5 µM AT-101 ile 9,7 kat artış saptandı. 100 µgr/ml Trastuzumab ile DNA fragmantasyonunun da 9 kat artış olurken 100 µgr/ml Trastuzumab+ 5 µM AT-101 ile 11 kat artış saptandı.

Tablo 6: MDA-MB-453 hücre hattında 72. saatte değişik dozlardaki AT-101 ve trastuzumab in tekli ve sinerjistik kombinasyonlarında apoptotik etkileri (pozitif kontrol: % DNA fragmentasyonu: %11, Kaspaz 3/7 aktivitesi: %6)

Trastuzumab (µgr/ml)	AT-101(µM)	DNA fragmentasyonu (%)	Kaspaz 3/7 aktivitesi (%)
Kontrol		11	6
20	-	18	13
80	-	42	30
100	-	64	52
-	2,5	25	12
-	5	34	24
20	2,5	41,2	32,3
80	5	71	58,2
100	5	93	68

İstatistiksel analizde; Trastuzumab ve AT-101'in tekli dozları ile elde edilen DNA fragmentasyon yüzdeleri ve kaspaz 3/7 enzim aktivitesi oranları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıydı.(p:<0,05) İlacın tekli dozlarıyla, kombinasyonları karşılaştırıldığında tüm kombinasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı apoptozis saptandı (p:<0,05 olarak hesaplandı.)

TARTIŞMA

Etkili kanser tedavisi için kemoterapi ilaçlarının kombine şeklinde kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve standart hale gelmektedir. Kombinasyon tedavisinin birçok kanser türünde başarı öyküsü mevcuttur. Preklinik çalışmalarda denenen kombinasyonların farmakolojik olarak toleranslı, yan etkilerinin az, ilacın normal hücrelere minimum, kanser hücrelerini hedef alması oldukça önemlidir. Hangi ilaçların kombine edilebileceğini belirlerken; minimum dirence yol açması, her bir ilacın tek başına da oldukça etkin olması ve kombine edilen ilaçların çoğalmayı engelleyici etki mekanizmalarının farklı olması gibi hususlar oldukça önemlidir. Kombinasyon planlanırken, kombine edilecek ilaçların hedeflediği moleküller ve etkilediği yollar göz önünde bulundurulmalıdır.

Trastuzumab hem erken evre, hem de metastatik meme kanseri tedavisinde yer alan bir monoklonal antikordur. Ancak metastatik hastalıkta trastuzumab monoterapisine yanıt oranı %10-15 'dir (43). Trastuzumabın intrinsek (primer) dirençli olması ve sekonder direnç gelişmesi nedeniyle mutlaka sitotoksik diğer bir ajanla kombine edilmelidir. Bu nedenle daha etkili ve daha toleranslı yeni ajanlar ile kombinasyonlarının geliştirilmesine gereksinim vardır.

Yapılan çalışmalarda gossypol'ün meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde potent bir anti-kanser ajan olduğu gösterilmiştir (95). İn-vivo çalışmalarda ise çok düşük yan etki profili gözlenen gossypol'ün, meme kanserinde kullanılan kemoterapi ajanlarıyla kombinasyonu uygun olabilir.

MDA-MB-453 hücre hattının seçilmesinde; insan meme kanserinin metastatik lezyonundan elde edilmiş olması, yüksek malign potansiyele sahip olması ve HER2 reseptörü eksprese etmesi etkili olmuştur. Bu meme kanseri hücre hattı; 1976 ' da R. Cailleau ve arkadaşları tarafından 48 yaşında lenf nodu, beyin, plevral ve perikardial metastazı olan meme kanserli kadın hastadan elde edilmiştir. Perikardiyal effüzyon mayinden derive edilmiştir. Anormal bir karyotipe sahip olan bu kadın hasta anöploid yapıda iken hücrenin karyotip analizinde kromozom sayılarının hipoploidten tetraploide kadar geniş bir aralıkta olduğu gözlenmiştir (96). Konvansiyonel sitogenetik analizinin yapıldığı çalışmada hipertriploid klona sahip olduğu görülmüştür. 7, 11, 17, 19 ve 21. kromozomda kazanç varken; X, 3, 4, 9, 13,

14, 16 ve 18.kromozomda kayıp gösterilmiştir (97). 7 ve 17. kromozom polizomisi her hücre gösterilmiştir (CEP₁₇). Bu hücre hattında Rb gen ifadesinde inaktivasyon daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. 9 p21 lokusundaki (CDKN2 gen) kayıp hücre siklusunda negatif regülatör rol oynayan p^{16INK4A} protein ekspresyon kaybına neden olmaktadır(98). Bu protein ile aynı regülatör noktada rol oynayan pozitif regülâtör protein olan Siklin D1' de bu hücre hattında over eksprese edilmektedir (99). p^{16INK4A} proteini Siklin bağımlı kinaz (CDK) ve Siklin D1 (cyc) kompleksine bağlanır ve bu kompleksi (cdk-cyc) inhibe eder. CDK-cyc kompleksi tümör süpresör gen olan Retinoblastom (Rb)'un fosforillenmesini sağlar. Fosforillenen Rb; E2F transkripsiyon faktörünü serbestleştir. E2F transkripsiyon faktörünü salınması ile DNA çoğalır ve hücre siklusu duraksamadan S fazına girer. Ama p^{16INK4A} protein defekti ya da siklin D1 over ekspresyonu olduğunda retinoblastomun fosforilasyonu artar böylece Rb inaktive edilir. Bu gen defekti antiapoptotik etki ile sonuçlanmaktadır. (98)

Hormon reseptörlerinin negatif olması da bu hücre hattının seçilmesinde etkili olmuştur. Bu hücre hattı östrojen reseptörü, progesteron reseptörünü kaybetmiş ve androjen reseptörünü yüksek oranda eksprese eden pür apokrin meme kanseri özelliği göstermektedir. Hall RE ve ark bu hücre hattında invaziv karakter göstermesinde androjenlerin anahtar rol oynayabileceği bildirilmiştir. (99).

Hücre hattı seçiminde en etkili olan HER2 reseptörünün tirozin kinaz fosforilasyon aktivitesi göstermesidir. Bu hücre hattının Tirozin kinaz fosforilasyonunu; Tyr1248 aracılığıyla olmaktadır (100). Eğer PCR ile CEP17 bakıldığında HER2 amplifikasyonu negatif saptanabilir (97). L.Merlin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MDA-MB-453 hücre hattı; İHC 2+ iken FISH ile pozitif olduğu gösterilmiştir. Luisa Paris ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MDA-MB-453 hücre hattında 61% ± 6% HER 2 ekspresyonu saptanmıştır. Bu oran reseptör ekspresyonu için over eksprese olarak yorumlanmıştır (101). Semir Vranic ve ark 2011'de yaptığı çalışmada HER2 protein ekspresyonu ICC ile +3 saptanmıştır (97). Diğer bir çalışmada ise kontrol olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hattına göre MDA-MB-453 hücre hattı yaklaşık 7 kat daha fazla HER2 eksprese etmektedir (102).

Ayrıca MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı Fibroblast growth faktör reseptörünü (FGFR) over eksprese etmektedir. Bu da HER2 reseptörü gibi büyüme

sinyalleri aracılığı ile onkogenik rol oynamaktadır. A.Rodyn ve ark. yaptığı çalışmada MDA- MB-453 hücre hattında fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Y367C mutasyonu gösterilmiştir. FGFR4 mutant proteini, MAPK (mitogen-activated protein kinase) yolağı aktivasyonu ile Erk1/2 proteininin fosforilasyonu artmaktadır. Fosforillenen Erk proteini ise hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. (103)

Bu çalışmada, HER-2 pozitif metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-453'de gossypol ile trastuzumab'ın farklı dozlarda kombinasyonlarının olası sinerjistik sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada gossypol'ün en potent formu olan AT101 [(-)- gossypol] kullanılmıştır. Literatürde AT-101 ve Trastuzumab'ın kombinasyonu ile ilgili herhangi bir meme kanseri hücre hattında yapılmış çalışma olmadığından bu çalışma yüksek özgün niteliktedir.

MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında AT-101 ya da gossypol'ün sitotoksik etkisini ölçen bir çalışma olmadığı için karşılaştırma yapılamadı. Fakat diğer meme kanseri hücre hatları ile olan çalışmalara göre değerlendirildi. Yine meme kanseri hücre hatlarında AT-101 ile yapılan çalışmalar Gossypol ile yapılan çalışmalara göre daha kısıtlıdır. Literatürde Lui ve ark. meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) AT-101 ile yaptıkları çalışmada; AT-101 'in 2.5, 5 ve 7.5 µM dozların etkisini sırasıyla % 33, % 89 ve % 98 bulmuşlardır (85). Bizim kliniğimizde yapılan A.Kısım ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MCF -7 meme kanseri hücre hattı için 72 saatte AT-101 'in 2.5, 5 ve 7.5 µM dozların etkisini sırasıyla %32.3, %54.2, %58.6 bulunmuş ve IC 50 değeri 4.64 µM hesaplanmış ve MDA-MB-231 için yine aynı dozlarda AT-101 in etkisi sırasıyla %36.6, %57.8, %61.2 saptanmış ve IC50 değeri 3.99 µM olarak hesaplanmıştır.(104) Bizim çalışmamızda ise MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında 72. saatte AT-101'in 2.5 µM ile %23, 5 µM ile % 37, 7.5 µM ile % 46, 10 µM ile % 54 sitotoksik etki gözlemlendi ve IC50 değeri 8,7 µM olarak hesaplandı. AT-101 'in literatürdeki diğer iki çalışmaya göre bu hücre hattında sitotoksik etkisi daha az ve diğer meme kanseri hücre hatlarına göre IC50 değeri daha yüksek bulundu. Bir başka deyişle bizim çalışmamızda kullandığımız MDA-MB-453 hücre hattı literatürdeki diğer hücre hatlarına göre AT-101'e daha az duyarlıdır. Bu fark literatürde karşılaştırılacak çalışma olmadığı için başlıca hücre hattının farklılığı ile ilişkilendirilmiştir. Çünkü

bu meme kanseri hücre hattı oldukça dirençlidir. Hücre hattı farklılığı dışında laboratuvar koşullarına, kullanılan kimyasallara, test edilen hücre sayısına, deney sürelerine, hücre hatlarının zindelik (vitality) durumuna da bağlı olabilir. Ayrıca, hücre kültürü işlemlerinde ortam koşulları da deney sonuçlarını etkileyebilmektedir. Bu çalışmada Trastuzumab ile elde edilen veriler incelendiğinde; MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattının literatürle uyumlu olarak Trastuzumab tedavisine duyarlı olduğu gözlenmiştir (101,105)

Bizim çalışmamızda MDA-MB-453 hücre hattında 72.saate Trastuzumab'ın; 5µgr/ml ile %12, 10 µgr/ml ile %15, 20 µgr/ml ile %21, 40 µgr/ml ile %30, 80 µgr/ml ile %41, 100 µgr/ml ile %49, 120 µgr /ml ile %55, 160 µgr/ml ile %62 ve 200 µgr/ml konsantrasyonu ile %72 oranında sitotoksik etki gösterildi. Trastuzumab 'in IC50 değerleri ise 97,9 µgr/ml (yaklaşık 0,67 nM) olarak hesaplandı. Trastuzumab'ın MDA-MB-453 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi.

Literatürde ; Luisa Paris ve ark. yaptığı çalışmada MDA-MB-453 hücrelerinde 50µg/mL Trastuzumab ile %35 sitotoksik etki göstermiştir (101). Bizim çalışmamızda ise 40µgr/ml trastuzumab ile %30,3 sitotoksik etki gözlemlendi. Bu değer Luisa Paris ve ark nın verileri ile uyumluydu.

Ryungsa Kim. ve ark. nın yaptığı çalışmada MDA-MB-453 hücre hattında IC50: 0,8 µM bulunurken; Ana M Tari ve ark. yaptığı diğer çalışmada 1 µM Trastuzumab konsantrasyonu ile hücrelerde sitotoksik etki gösterilememiştir (106,107). Bizim çalışmamızda literatürdeki konsantrasyonlardan çok daha düşük değerlerde (0,6 nM) %50 sitotoksikite saptandı. Literatüre göre bu çalışmada trastuzumab hücre hattı üzerinde daha güçlü sitotoksik etki gösterdi.

Literatürde meme kanser hücre hatlarında AT-101 ile trastuzumab kombinasyonunu araştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmaya en yakın literatür verisi 2005'de Ryungsa Kim. ve ark. yaptığı tamoksifen dirençli meme kanser hücre hatlarında trastuzumab ve bcl-2 antikorunun etkisinin araştırıldığı çalışmadır. MDA-MB-453 hücre hattında IC50: 0,8 µM bulunurken, bcl-2 antikorunu IC50:0,65 µM bulunmuştur. Bu hücre hattında bcl-2 antikorunun trastuzumab'ın tekli kullanımından daha güçlü apoptotik etkili olduğu gösterilmiştir.(106)

Bizim çalışmamızda ise 100 µgr/ml trastuzumab ile 72. saatte % 49,1 sitotoksisite görülür iken 20 µgr/ml trastuzumab ile 2,5 µM AT-101'in kombine edildiğinde 72. saatte %52 oranında sitotoksisite görüldü. Yani bu kombinasyon beş katı dozda trastuzumab' dan daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür.

5 µgr/ml konsantrasyonda trastuzumab ile 5 µM konsantrasyonda AT-101 kombine edildiğinde 72. saatte %46 oranında sitotoksik etki gösterildi, bu da trastuzumabın 16 katı olan 80 µgr/ml konsantrasyonda trastuzumab' ın tek etkisinden daha güçlü ve 100 µgr/ml trastuzumab' a da yakın sitotoksik etkiliydi.

5 µgr/ml konsantrasyonda trastuzumab ile 2.5 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte MDA-MB-453 hücre hattında %33 oranında sitotoksik etki saptandı yine bu kombinasyonda trastuzumabın sekiz kat daha fazla olan 40 µgr/ml konsantrasyonundaki sitotoksik etkisinden daha güçlü idi.

Kombinasyon deneylerinde uygulanan kombinasyonların (2,5 µM AT-101+ 5 µgr/ml Trastuzumab' dan 5 µM AT-101+ 100 µgr/ml Trastuzumab' a kadar) hepsinde CI göre sinerjistik etki saptandı. MDA-MB-453 hücre hattında ilaçların sinerjistik kombinasyonları çalışmanın rasyonelini oluşturdu. İstenen sitotoksik etkinin oluşması için AT-101 ile Trastuzumab'ın kombinasyon konsantrasyonlarında Trastuzumab'ın tekli konsantrasyonun daha düşük olması çalışmanın en dikkat çekici noktasıydı.

Kombinasyon deneylerinde saptanan sinerjinin, ağırlıklı olarak ilaçların moleküler yapı ve konfigürasyonundan mı (potensiyasyon) yoksa doza bağlı olarak mı gerçekleştiği, sinerjistik kombinasyon oranlarının düşük dozlarında da sinerjinin korunup korunmadığı test edilerek araştırıldı. Yapılan deneylerde, sinerjistik etkilerin azalan konsantrasyonlarda koruduğu gözlemlendi. Artan dozlarda ise, sitotoksik etkinin arttığı gözlemlendi.

Apoptozisten kaçma kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden olduğu için kombinasyon deneylerinde apoptotik yolların işlevini göstermek oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullanılan meme kanseri hücre kültüründe apoptozisin tetiklenip tetiklenmediği histon-DNA kompleksi fragmentasyonunun ve kaspaz 3/7 enzim aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi.

Günümüzde bitkisel kökenli yüzlerce molekül, potansiyel anti kanser özellikleri noktasından araştırılmaktadır. Bu çalışmada sekonder metabolit olan Gossypol'un enantiomerik formunun (AT-101) tercih edilmesinin sebebi, rasemik formuna göre daha kuvvetli çoğalmayı engelleyici etkiye sahip olması ve son yıllarda potansiyel kemoterapatik ajan olarak kabul görmesidir. AT-101, ilaçlara direnç geliştiren kanser hücrelerinde, Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinin (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 gibi) BH3 domainine bağlanarak, bu proteinleri inhibe eder böylece apoptozisi indükler.

MDA-MB-453 hücre hattının 72 saat AT-101 ile muamelesi sonrası apoptoz varlığını göstermek için histon-DNA kompleksi fragmentasyonunun ve kaspaz 3/7 enzim aktivitesinin ölçüldü. Kontrole göre; 2,5 µM AT-101 ile 2,2 kat, 5 µM AT-101 ile 3 kat DNA fragmentasyon yüzdesinde artış gözlenmiştir ve yine kontrole göre 2,5 µM AT-101 ile 2 kat, 5 µM AT-101 ile 4 kat daha fazla Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi artışı saptandı. Bu sonuçlara göre MDA-MB-453 hücre hattında AT-101'in sitotoksik etkisinin apoptoz aracılığı olduğu ve doza bağlı olarak da apoptozda artış olduğu gösterildi. BH3 mimetik ajan olan AT-101 bcl-2 inhibisyonu aracılığıyla apoptozise neden olmaktadır. Anti apoptotik bcl-2 inhibe olunca mitokondriden sitokrom c salınışını artar, sitokrom c de kaspaz 9'u aktive eder böylece kaspaz kaskadını başlar. AT-101'in MDA-MB-453 hücre hattında da bu yolak aracılığı ile apoptozu tetiklediği literatür verilerine de dayanılarak düşünülmektedir.

Humanize kimerik monoklonal antikor olan trastuzumab ise HER2 reseptörüne bağlandıktan sonra çeşitli hücre içi sinyal yollarını indükler. Trastuzumab anti tümöral etkisi; ¹HER 2 reseptör down regülasyonu, ²HER2/HER3 ve HER2/HER4 heterodimerizasyonun engellenmesi, ³Antikor bağımlı hücresel sitotoksikite (ADCC) mekanizmaları dışında ⁴Hücre siklusunu G1 fazında durdurur. (AKT ve MAP kinaz yollarının inhibisyonu ve P27 protein ekspresyonunun indüksiyonu). Bilinen bu mekanizmalar dışında Trastuzumab'ın bcl-2' i down regülasyonuna neden olduğu ve bunun ilacın etki mekanizmasında anlamlı rol oynadığı düşünülmektedir. (106)

MDA-MB-453 hücre hattında artan dozlarda Trastuzumab uygulandıktan 72 saat sonra DNA fragmentasyon yüzdeleri incelendiğinde kontrole göre; 20 µgr/ml Trastuzumab ile 1,6 kat, 80 µgr/ml Trastuzumab ile 3,8 kat, 100 µgr/ml Trastuzumab

ile 9,6 kat artış gözlenmiş ve yine 72. saatte kontrole göre Kaspaz 3/7 enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde; 20 µgr/ml Trastuzumab ile 2 kat, 80 µgr/ml Trastuzumab ile 5 kat, 100 µgr/ml Trastuzumab ile 9 kat artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre MDA-MB-453 hücre hattında trastuzumab'ın sitotoksik etkisinin apoptoz aracılığıyla olduğu ve doza bağlı olarak apoptozda logaritmik artış olduğu gösterildi. Literatür verilerinde olduğu gibi bu hücre hattında trastuzumab'ın etkinliği bu çalışma da da gösterildi.

Hücreler 72. saat 80 µgr/ml trastuzumab ile muamele edildiğinde % 42 oranında DNA fragmentasyonu; %30 oranında kaspaz 3/7 enzim aktivitesi gösterildi. Buna karşılık dörtte bir dozu olan 20 µgr/ml trastuzumab ile 2,5 µM AT-101'in kombine edildiğinde benzer oranlarda DNA fragmentasyonu (%41,2), kaspaz 3/7 enzim aktivitesi (%32,3) görüldü.

Benzer şekilde; 80 µgr/ml trastuzumab ile 5 µM AT-101'in kombine edildiğinde %71 oranında DNA fragmentasyonu, %58,2 oranında kaspaz 3/7 enzim aktivitesi görüldü. Bu oranda 100 µgr/ml trastuzumab ile oluşan apoptotik etkiden güçlüydü. İstenen apoptotik etkinin oluşması için AT-101 ile Trastuzumab'ın kombinasyon dozlarında Trastuzumab'ın dozunun çok daha düşük olması dikkat çekicidir.

İlaçların hücreler üzerindeki bu sitotoksik etkisinin nekroz ya da apoptozis üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini saptamak için yapılan deneyler, ilaçların sitotoksik etkilerinin apoptozis üzerinden gerçekleştiğini gösterdi. Bunun dışında tüm kombinasyonlar, ilaçların tekli kullanımından çok daha güçlü apoptotik etkiliydi. Düşük dozlarda Trastuzumab ile kombinasyonlar, yüksek dozlardaki trastuzumab'ın apoptotik etkisini yakaladı. Bu çalışma verilerine dayanılarak; kombinasyon ile trastuzumab dozunun düşürülebileceği öngörüldü.

Bilindiği gibi; anti apoptotik sinyal yolları bcl-2 ve AKT aktivasyonunu içerir. Meme kanserinin %60-80 bcl-2 overexpresyonu bulunmuş ve yine AKT aktivasyonu da pek çok kanserde rapor edilmiştir (108,109). Kanser hücresinde Bcl-2 ve AKT proteini multipl sinyal yolağıyla apoptozu engellemektedir. ¹bax ve bcl-2 homodimerizasyonunu inhibe olur.(110) Böylece mitokondiriden sitokrom c salınımını inhibe olur. ²AKT aktivasyonuyla Bad fosforilasyonu aracılığı ile kaspaz 9

inhibe olur (111,112). ³AKT, bcl-2 ekspresyonunu da uyarır. (113) ⁴AKT nükleusdan NF-κ B salınımına da neden olur (114).

- bcl-2 overexprese eden meme kanserinde eksprese etmeyenlere göre genel sağkalım daha iyi olsada bcl-2 ekspresyonu anti-tümör ilaçlara direnç gelişimde rol oynamaktadır. (106)
- Akt pozitif meme kanseri bağımsız risk faktörüdür. Kötü prognostiktir. Uzak organ metastazıyla ve rekürrens ile ilişkilendirilmiştir.(115)

Başlıca apoptotik etkisi bcl-2 inhibisyonu olan AT-101 ve başlıca apoptoz yolağı AKT inhibisyonu olan trastuzumab'ın güçlü sinerjistik etkili kombinasyonu; konsantrik tipte kombinasyona örnektir. İki ilacın farklı apoptotik yollar aracılığıyla etki gösteriyor olmasının bizim hipotezimizi desteklemesi muhtemeldir.

Bu veriler, AT-101 in Trastuzumab ile kombinasyonunda artan dozlarda dozla doğru orantılı olarak apoptoz aracılıklı sitotoksositeye yol açtığını göstermektedir. Apoptoz sürecindeki bozukluğun karsinogenezde önemli rol oynadığı göz önüne alındığında, agresif yapıdaki bu hücre hatlarında AT-101'in apoptozu indüklemesi ve trastuzumab ile güçlü sinerjizm göstermesi gelecekte meme kanser tedavisinde yer alabileceği göstermiştir.

Trastuzumab direncinin gelişmesi nedeniyle, meme kanseri tedavisinde Trastuzumab'ın diğer ajanlarla birlikte kullanarak tümör hücrelerinin apoptozise duyarlı hale getirilmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca direnç oluşmasının bir diğer sebebi olan proapoptotik moleküllerin BH3 domainine antiapoptotik moleküllerin bağlanmasının engellenmesi, AT-101 gibi BH3 mimetik ajanlarla mümkündür. Bu sebeple, oluşan direncin birkaç farklı yoldan kırılması, farklı etki mekanizmaları olan ajanlarla mümkündür. Kemoterapi ile kıyaslanamayacak kadar az yan etkisi olan AT-101 in, Trastuzumab gibi hedefe yönelik tedavide önemli bir ajanla kombinasyonu, apoptozise direncin sıklıkla gözlemlendiği meme kanseri tedavisinde yeni bir kemoterapi seçeneği olmaya adaydır. Belirlenen sinerjistik kombinasyon oranlarında ümit verici sitotoksik ve apoptotik etkilerin diğer meme kanseri hücre hatlarında da doğrulanması; etki mekanizmalarının aydınlatılması ve bu verilerin hayvan deneyleriyle de doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Giuliano AE. Breast disorders. "Current Medical Diagnosis & Treatment" (Ed. McPhee SJ, Papadakis MA) ,da. 48th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. USA. 2009;17:630-54.
2. Wickerham DL, O'Connell MJ, Costantino JP ve ark. The half century of clinical trials of the National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Project. *Semin Oncol.* 2008;35:522-9.
3. Rayson D, Richel D, Chia S, Jackisch C, van der Vegt S, Suter T. Anthracycline-Trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Ann Oncol.* 2008;19:1530-9.
4. Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA, McCready D, Pritchard KI, Messersmith H. Adjuvant/neoadjuvant Trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2008;34:539-57.
5. Mariani G, Fasolo A, De Benedictis E, Gianni L. Trastuzumab as adjuvant systemic therapy for HER2-positive breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2009;6:93-104.
6. Hall PS, Cameron DA. Current perspective - Trastuzumab. *Eur J Cancer.* 2009;45:12-8.
7. Suzuki E, Toi M. Improving the efficacy of Trastuzumab in breast cancer. *Cancer Sci.* 2007;98:767-71.
8. Wesolowski R, Budd GT. Neoadjuvant therapy for breast cancer: assessing treatment progress and managing poor responders. *Curr Oncol Rep.* 2009;11:37-44.
9. Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM ve ark. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and Trastuzumab. *Ann Oncol.* 2008;19:2020-5.
10. Mackey J, McLeod D, Ragaz J ve ark. Adjuvant targeted therapy in early breast cancer. *Cancer.* 2009;115:1154-68.

11. Moynihan TJ. Meme Kanseri, “Mayo Clinic Internal Medicine: Concise Textbook Türkçesi” (Ed.: Habermann TM, Ghosh AK). (Çev. Ed.: Unal S, Demir AU) „nde. Öncü Yayınevi. Ankara. 2009;19:661-5
12. Berns, E. M. *et al.* Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumors: correlation with steroid receptors. *Eur. J. Cancer* 28, 697– 700 (1992).
13. Charles M. Perou, Therese Sørlie, Michael B. Eisen *at.al.* Molecular portraits of human breast tumours *Nature* 406, 747-752 (17 August 2000)
14. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354: 2463.
15. Heintz, N. H. , Leslie, K. O. , Rogers, L. A. & Howard, P. L. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114, 160– 163 (1990).
16. Aleix Prat , Joel S Parker , Olga Karginova *at.al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010; 5/12:R68
17. Pusztai L, Ayers M, *et al.* Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2406.
18. Ayers M, Symmans WF, *et al.* Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2284.
19. Glinsky GV, Higashiyama T, *et al.* Classification of human breast cancer using gene expression profiling as a component of the survival predictor algorithm. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2272.
20. Mehta RS, Schubbert T, Kong K. Trastuzumab in inflammatory breast cancer. *Ann Oncol.* 2008;19:1815-7.

21. Ozisik Y, Baltali E. Meme Kanseri. "Hacettepe İç hastalıkları Kitabı" (Ed. Yasavul Ü) ,nda. Prestij Basımevi. Ankara. 2003;11:1426-35.
22. Greenberg, PA, 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.
23. Theriault, RL, Lipton, A, Hortobagyi, GN, et al. Pamidronate reduces skeletal morbidity in women with advanced breast cancer and lytic bone lesions: a randomized, placebo-controlled trial. Protocol 18 Aredia Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:846.
24. Azad, NS, Posadas, EM, Kwitkowski, VE, et al. Increased efficacy and toxicity with combination anti-VEGF therapy using sorafenib and bevacizumab (abstract). *J Clin Oncol* 2006; 24:121s.
25. Sledge, GW, Neuberg, D, Bernardo, P, et al. Phase III Trial of Doxorubicin, Paclitaxel, and the Combination of Doxorubicin and Paclitaxel as Front-Line Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer: An Intergroup Trial (E1193). *J Clin Oncol* 2003; 21:588.
26. Bontenbal, M, Creemers, GJ, Braun, HJ, et al. Phase II to III Study Comparing Doxorubicin and Docetaxel With Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide As First-Line Chemotherapy in Patients With Metastatic Breast Cancer: Results of a Dutch Community Setting Trial for the Clinical Trial Group of the Comprehensive Cancer Centre. *J Clin Oncol* 2005; 23:7081.
27. Pegram, M, Chan, D, Dichmann, RA, et al. Phase II combined biological therapy targeting the HER2 proto-oncogene and the vascular endothelial growth factor using trastuzumab and bevacizumab as first-line treatment of HER2-amplified breast cancer. Data reseted at the 29th annual San Antonio Breast Cancer Symposium, December 15, 2006.
28. Lord, CJ, Ashworth, A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 363.

29. Perez EA, Baweja M. HER2-positive breast cancer: current treatment strategies. *Cancer Invest.* 2008;26: 545-52
30. Metcalfe S, Burgess C, Laking G, Evans J, Wells S, Crausaz S. Trastuzumab: possible publication bias. *Lancet.* 2008;371:1646-8.
31. Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009;14: 55-66.
32. National Comprehensive Cancer Network (NCCN), clinical Practice Guidelines in Oncology are available online at. (Accessed on July 28, 2010). http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines
33. Brufsky A. Trastuzumab-based therapy for patients with HER2-positive breast cancer: from early scientific development to foundation of care. *Am J Clin Oncol.* 2010; 33: 186-95.
34. Jeff C. Liu, Veronique Voisin, Gary D. Bader et al. Seventeen-gene signature from enriched Her2/Neu mammary tumor-initiating cells predicts clinical outcome for human HER2⁺:ERα⁻ breast cancer. *PNAS.* April 2012; 15;5832-5837
35. Rita Nahta, Francisco J. Esteva Herceptin: mechanisms of action and resistance *Cancer Letters* 2006; 232:123-38
36. Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008;5: 531-42.
37. Vogel CL, Franco SX, Clinical experience with trastuzumab. *The Breast journal* 2003; 9 ;452-62
38. Joensuu H, Bono P, Kataja V et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without Trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol.* 2009;27: 5685-92.
39. Popat S, Smith IE. Therapy Insight: anthracyclines and Trastuzumab the optimal management of cardiotoxic side effects. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008;5: 324-35.

40. Martín M, Esteva FJ, Alba E et al. Minimizing cardiotoxicity while optimizing treatment efficacy with Trastuzumab: review and expert recommendations. *Oncologist*. 2009;14:1-11.
41. Park IH, Ro J, Lee KS, Nam BH, Kwon Y, Shin KH. Trastuzumab treatment beyond brain progression in HER2-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2009;20:56-62
42. Gomez HL, Doval DC, Chavez MA et al. Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for HER2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26: 2999-3005
43. C.L. Vogel, M.A. Cobleigh, D. Tripathy et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2002; 20(3):719-826
44. Rita Nahta, Francisco J. Estev. Herceptin: mechanisms of action and resistance, *Cancer Letter* 2006; 232(2):123-138
45. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J et al. Expression of p95HER2, a truncated form of theHER2receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(8):628.
46. Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola, J, Jovin TM: Decreased accessibility and lack of activation of HER2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005, 65: 473-482.
47. Nagata Y et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6: 117–127
48. R. Nahta, T. Takahashi, N.T. Ueno, M.C. Hung, F.J. Esteva. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2004; 64(11):3981-6.
49. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(24):1852.

50. Cameron DA, Stein S. Drug Insight: intracellular inhibitors of HER2 clinical development of lapatinib in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008;5: 512-20.
51. Seruga B, Tannock IF. Mathematics in the realm of lapatinib: $500 + 500 = 1,500$ *J Clin Oncol.* 2008;26: 2940-2.
52. Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 9-14.
53. Portera CC, Walshe JM, Rosing DR et al. Cardiac toxicity and efficacy of Trastuzumab combined with pertuzumab in patients with Trastuzumab-insensitive human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14: 2710-6.
54. Jaroszewski JW, Storm-Hansen T, Hansen SH, Thastrup O, Kofod H. On the botanical distribution of chiral forms of gossypol. *Planta Med* 1992; 58: 454-58
55. Edwards JD. Total synthesis of gossypol. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 3798-99
56. Coutinho EM. Gossypol. *Drug* 1989; 65: 259-63
57. Freedman TB, Cao X, Oliviera RV, Cass QB, Nafie L. Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichroism. *Chirality* 2003; 15: 196-200
58. Brzezinski B, Jerszy O, Paszyc S, Aripov TF. ¹H NMR studies of gossypol and its complexes with some organic compounds. *J Mol Struct* 1990; 220: 261-68
59. Shelley MD, Hartley L, Fish RG, Groundwater P, Morgan JJ, Mort D, Mason M, Evans A. Stereospecific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. *Cancer Lett* 1999;135:171-80
60. Jaroszewski JW, Kaplan O, Cohen JS. Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells. ³¹P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Res* 1990; 50: 6936-43
61. Oliver CL, Bauer JA, Wolwr KG. In vitro effect of BH3 mimetic (-)- gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10(22): 7757-63

62. Shelley MD, Harley L., Groundwater PW. Structureactivity studies on gossypol in tumour cell lines. *Anticancer Drug* 2000; 11(3): 209-216
63. Flack MR, Pyle RG, Mullen NM, Lorenzo BJ, Wu YW, Knazek RA, Nisula BC, Reidenberg MM. Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer. *J Clin Endocr Metab* 1993;76: 1019–24
64. Bushnow P, Reidenberg MM, Wasenko J, Winfield J, Lorenzo B, Lemke S, Himpler B, Corona R, Coyle T. Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas. *J Neuro-Oncol* 1999;43:79–86
65. Van Poznak C, Sedman AD, reidenberg MM. Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I-II clinical trial. *Breast Cancer Res treatment* 2001; 66: 239-48
66. Dodou K, Anderson RJ, Lough WJ. Synthesis of gossypol atopisomers and derivatives and antioxidant and their antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem* 2005; 13 (13): 4228-37
67. Razakantoanina RJ, Deck LM, Phung NKP, Jaureguiberry G. Antimalarial activity of new gossypol derivates. *Parasit. Res* 2000; 86: 665-68
68. Gonzales-Garza MT, Matlin SA, Mata-Cardenas B, Said-Fernandez S. Differential effects of the (+) and (-) enantiomers upon *Entamoeba histolytica* axenic cultures. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 144-45
69. Janero DR, Burghardt B. Protection of rat myocardial phospholipid against peroxidative injury through superoxide-dependent, iron-promoted Fenton chemistry by the male contraceptive gossypol. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3335-42
70. Burgos C, Gerez De Burgos NM, Rovai LE, Blanco A. In vitro inhibition by gossypol of oxidoreuctases from human tissues. *Biochem Pharmacol* 1986; 35(5): 801-4
71. Yu Y, Deck A, Hunsaker LA. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 81-89

72. Coyle T, Levante S, Shetler Mi Winfield J. In vitro and in vivo cytotoxicity of gossypol against central nervous system tumour cell lines. *J Neuroonc* 1994; 19:25-35
73. Vainio P, Thuren T, Wichman K. Hydrolysis of phospholipids monolayers by human spermatozoa. Inhibition by male contraceptive gossypol. *Biochim Biophys Acta* 1985; 814(2):405-8
74. Teng CS. Gossypol-induced apoptotic DNA fragmentation correlates with inhibited protein kinase C activity. *Contraception* 1995; 52: 389-95
75. Smit NPM, Pavel S, Kammeyer A. Determination of catechol-o-methyl transferase activity in relation to melanin metabolism using high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal Biochem* 1990; 190:286-91
76. Rekha GK, Sladek NE. Inhibition of human class3 aldehyde dehydrogenase and sensitisation of tumour cells that Express significant amounts of this enzyme to oxazoposphorines by the naturally occurring compound gossypol. *Enzymology and molecular biology of Carbonyl metabolism* 1996; 6: 133-46
77. Benz CC, Keniry MA, Ford JM. Biochemical correlates of the antitumour and antimitochondrial properties of gossypol enantiomers. *Mol Pharmacol* 1990; 37:840-47
78. Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 1994; 54(7): 1707-14
79. Mego M. Telomerase inhibitors in anticancer therapy: gossypol as a potential telomerase inhibitor. *Bratis Lek Listy* 2002; 103(10): 378-81
80. Hiipakka RA, Zhang HZ, Daiw W. Structure-activity relationship for inhibition human 5-alpha -reductases by polyphenols. *Biocem Pharmacol* 2002;63: 1165-76
81. Reidenberg MM. environmental inhibition of 11 β - hydroxysteroid dhydrogenase. *Toxicology* 2000;144: 107-11

82. Kawanishi K, Ueda H, Moriyasu M. Aldose reductase inhibitors from the nature. *Med Chem* 2003; 10(15): 1353-74
83. Baumgrass R, Weiwad M, Erdmann F. Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. *J Biol Chem* 2001; 276(51):47914-21
84. Olgiati KL, Toscano DG, Atkins WM, Toscano WA. Gossypol inhibition of adenylate cyclase. *Arch Biochem Biophys* 1984; 231(2):411-15
85. Liu S, Kulp SK, Sugimoto Y et al. The (-)- enantiomer of gossypol possesses higher anticancer potency than racemic gossypol in human breast cancer. *Anti-Cancer Res* 2002; 22:33-38
86. Kitada S, Leone M, Sareth S. Discovery, characterisation and structure activity relationship studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem* 2003; 46(20): 4259-4264
87. Bauer JA, Trask DK, Kumar B. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic (-)- gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild type p53 and Bcl-xL. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(7): 1094-1104
88. Mohammad RM, Wang S, Aboukameel A et al. Preclinical studies of a non-peptidic small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X(L) ((-)- gossypol) against diffuse large cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2005 ; 4(1): 13-21
89. Hou DX, Uto T, Tong X et al. Involvement of reactive oxygen species independent mitochondrial pathway in gossypol -induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2004; 428: 179-187
90. Chang JS, Hsu YL, Kuo PL. Upregulation of fas/fas ligand mediated apoptosis by gossypol in an immortalised human alveolar lung cancer cell line. *Clin Exp. Pharmacol Physiol* 2004; 31(10): 716-722
91. Zhuang L, Kim J, Adam RM. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 2005; 115(4): 959-968
92. Chou, T.C. and Hayball, M.P. CalCusyn Windows Software for Dose Effect Analysis, Biosoft, Cambridge, MA 2000. 41(6):294-302

93. Chou, T.C., Rideout , D., Chou,J., and Bertino, J.R., 1974. Relationships between inhibition constants and fractional inhibitions in enzyme catalysed reactions with different number of reactants , different reaction mechanisms ,and different types of mechanisms of inhibition. *Mol. Pharmacol.* 10, 235- 247.
94. Chou, T.C,and Talalay P, Quantitative analysis of dose effect relationships : the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 1984; 22, 27–55
95. Tuszynski GP, Cossu G. Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma and other tissue culture cell lines. *Cancer Res* 1984; 44: 768–771.
96. Siciliano MJ, et al. Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker. *Cancer Res.* 1979;39: 919-922.
97. Semir Vranic, Zoran Gatalica, and Zhao-Yi Wang Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies *Oncol Lett.* 2011; 2(6): 1131–1137.
98. Perez-Tenorio G, Stal O, Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer.* 2002;86:540–545.
99. Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer.* 1994;30A:484–490.
100. Taniyama K, Ishida K, Toda T at. al. Tyrosine1248-phosphorylated HER2 expression and HER2 gene amplification in female invasive ductal carcinomas. *Breast Cancer.* 2008;15(3):231-40.
101. Luisa Paris, Serena Cecchetti at. al. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C downregulates HER2 overexpression on plasma membrane of breast cancer cells *Breast Cancer Research* 2010, 12:R27

102. Govindarajan S, Sivakumar J, Garimidi P. Targeting human epidermal growth factor receptor 2 by a cell-penetrating peptide-affibody bioconjugate. *Biomaterials*. 2012 Mar;33(8):2570-82.
103. A Roidl, P Foo, W Wong, C Mann et al. The FGFR4 Y367C mutant is a dominant oncogene in MDA-MB453 breast cancer cells. FGFR4 Y367C mutation *Oncogene* 2010; 29:1543-52
104. Kisim A, Atmaca H, Cakar B, Karabulut B, Sezgin C, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Pretreatment with AT-101 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of breast cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(7):1155-63
105. Ali Naderi, Kee Ming Chia and Ji Liu. Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research* 2011, 13:R36
106. Kim R, Tanabe K, Emi M et al. Modulation of tamoxifen sensitivity by antisense Bcl-2 and trastuzumab in breast carcinoma cells. *Cancer*. 2005 May 5;103(10):2199-207.
107. Ana M Tari, Soo-Jeong Lim et al. Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells 8 August 2002, Volume 21, Number 34, Pages 5224-.
108. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 2002; 21:8786–8803.
109. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis—the contribution of molecular level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;50:343–352.
110. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, et al. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem*. 1999;274:21528–21532.

111. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322–1326.
112. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231–241.
113. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998; 282:1318–1321
114. Meng F, Liu L, Chin PC, D’Mello SR. Akt is a downstream target of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 2002;277:29674–29680.
115. Perez-Tenorio G, Stal O, Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*. 2002;86:540–545.