

TC
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
PROF. DR. FEHMİ AKÇİÇEK

**PAKLİTAKSEL / (-)- GOSSYPOL (AT-101)
KOMBİNASYONUNUN
MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
SİNERJİSTİK SİTOTOKSİK VE
APOPİTOTİK ETKİLERİ**

**TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. ULUS ALİ ŞANLI**

**DR. KANİ MASAROĞULLARI
İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ
İZMİR-2010**

İÇİNDEKİLER:

Önsöz.....	2
Giriş ve Amaç.....	3
Genel Bilgiler.....	4
Materyel ve Metod.....	38
Sonuçlar.....	47
Tartışma.....	58
Kaynaklar.....	64

ÖNSÖZ:

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman ve her konuda destek olan İç Hastalıkları ABD Başkanı Sn. Prof. Dr. Fehmi Akçiçek'e ve İç Hastalıkları Öğretim Üyeleri'ne en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İç Hastalıkları ihtisasım süresince klinik çalışmalarda ve laboratuvar araştırmalarında hem teknik hem teorik bilgi yönünden eğitimime sağladığı büyük katkılar, verdiği destek ve bu tezin hazırlanmasındaki yol göstericiliğinden dolayı tez hocam Sn. Prof. Dr. Ulus Ali Şanlı'ya teşekkürü bir borç bilirim.

İç Hastalıkları eğitimim boyunca özellikle onkoloji servis ve poliklinik çalışmalarında verdiği destek, eğitimime sağladığı katkılar nedeniyle Onkoloji BD Başkanı Sn. Prof. Dr. Erdem Göker'e teşekkür ederim.

Ayrıca Onkoloji BD Öğretim Üyeleri Sn. Doç. Dr. Rüçhan Uslu, Sn. Doç. Dr. Canfeza Sezgin, Sn. Doç. Dr. Bülent Karabulut, Sn. Prof. Dr. Erhan Gökmen ve Sn. Prof. Dr. Banu Çiçek Bilkay'a eğitimime sağladıkları katkılar nedeniyle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren Sn. Uzm. Dr. Burçak Karaca'ya 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.

GİRİŞ ve AMAC:

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup, kansere bağılı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde son yıllarda baş döndürücü gelişmeler olsa da, ileri evre hastalıkta kür şansı yoktur (1). Taksanlar hem erken evre, hem de metastatik hastalıkta standart tedavide yer alan ajanlardır. Ancak metastatik olgularda bir süre sonra taksanlara da direnç geliştiği için, özellikle metastatik hastalığın tedavisi bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle yeni ajanların ve tedavi kombinasyonlarının geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır.

Gossypol, pamuk tohumundan elde edilen doğal, sarı reklı bir polifenolik aldehittir. Pek çok tümör hücre hattı ile yapılan çalışmalarda anti-tümöral, anti-viral, anti-paraziter ve anti-oksidan etkileri saptanmıştır. Gossypol'un birçok enzimatik sistem, hücre siklusu düzenleyici proteinleri, hücre ve mitokondri membranı ile etkileşime girdiği ve bu yolaklarla etkilerini meydana getirdiği saptanmıştır. Gossypol'un meme kanseri üzerindeki etkileri hem in vitro olarak hücre hatlarında hem de Faz I/II klinik çalışmalarda araştırılmıştır. Ancak literatürde, meme kanseri hücre hatlarında paklitaksel ile kombinasyonlarına ait çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada amaç, in vitro verilerde meme kanseri hücre hatlarında etkinliği gözlenen ve Faz I/II çalışmalarda ciddi sistemik yan etki göstermeden etkinlik sağlamış olan gossypol'un paklitaksel ile kombinasyonunun meme kanseri hücrelerindeki olası additif/sinerjistik sitotoksitesini ve apoptotik etkisini araştırmaktır.

Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Tüm dünyada her yıl bir milyondan fazla yeni meme kanseri vakası saptanmaktadır. Yaşam boyunca her yedi kadından biri meme kanseri tanısı almaktadır. Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır ve kadınlarda akciğer kanserinden sonra en sık kansere bağlı ölüm nedenidir (1).

Erkeklerdeki meme kanseri tüm yeni vakaların %1'ini oluşturmaktadır. Meme kanseri insidansı giderek artmaktadır fakat mortalite oranları 1990'ların başından itibaren azalma göstermiştir. Bu azalma mamografik görüntülemenin daha yaygın kullanımı, daha iyi cerrahi, adjuvan kemoterapi ve radyoterapi kullanımı gibi faktörlere bağlanmaktadır. Meme kanseri risk faktörleri (erken menarş, geç menapoz, alkol kullanımı, sedanter hayat tarzı, ileri yaş, postmenapozal obezite, proliferatif meme hastalıkları, pozitif aile öyküsü v.s) olguların yarısından fazlasında bulunmaktadır. Meme kanserli kadınların yaklaşık %20'sinde aile öyküsü mevcutken, % 5-10'unda ise genetik geçiş söz konusudur. Vakaların % 80'inden fazlası ise sporadiktir.

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

1- İn-situ karsinom: Tümör hücreleri duktus veya lobüllerde proliferasyon olmaktadır fakat çevre stromal dokuya invaze olmamaktadır. İn-situ karsinomlar ikiye ayrılır:

a. Ductal karsinoma in-situ: En sık görülen noninvaziv meme kanseri türüdür. Tümör hücreleri duktuslarda proliferasyon olmakta ve çevre dokulara invazyon göstermemektedir. Yeni tanı koyulan meme kanseri olgularının %20'sini oluşturmaktadır (2). Mamografi ile saptanan tüm meme tümörlerinin %30'unu oluşturmaktadır (3). Doğal davranışı, tümörün derecesine ve histolojik tipine göre değişmekte olup, tedavisiz bırakıldığında düşük dereceli olanların üçte

biri 30 yıl kadar sonra invaziv kansere dönüşmekte, yüksek dereceli olanlarda ise bu süre 5 yıla kadar inmektedir (4).

b. Lobüler karsinoma in-situ: Sadece kadınlarda görülür. Hastaların %90'ı premenapozal dönemdedir. Terminal duktus epitelinden ve asinulardan gelişir. Asinularda proliferen olmuş tümör hücreleri bulunur (5).

2- İnvaziv Meme Kanseri: Duktal veya lobüler kaynaklı tümör hücreleri, memede stromal dokuya invaze olmuştur ve uzak metatstaz yapma potansiyelleri bulunmaktadır.

İnvaziv meme kanserinin birçok histolojik alt tipi bulunmaktadır. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün 1992-2001 yılları arasında yüzbinden fazla meme kanserli kadın hastayı kapsayan epidemiyolojik çalışmada:

İnvaziv duktal karsinom- %76

İnvaziv lobüler karsinom- %8

Duktal/lobüler karsinom- %7

Müsinöz (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.

İNVAZİV MEME KANSERİNDE HİSTOLOJİK ALT TİPLER:

A) İnvaziv Duktal Karsinom (İDK): İDK en sık görülen invaziv meme kanseridir. İnvaziv lezyonların %70-80'ini oluşturmaktadır. Çoğu vakada değişen oranlarda duktal karsinoma in-situ odakları bulunmaktadır (6).

B) İnvaziv Lobüler Karsinom (İLK): İnvaziv meme kanserinin ikinci en sık tipidir. İnvaziv lezyonların %5-10'unu oluşturmaktadır. İDK'lardan daha sık bilateral ve multisentrik olma özellikleri vardır (7). Uluslararası Meme Kanseri Çalışma Grubu'nun yaptığı 12,000 hastayı içeren 15 çalışmanın analizinde İLK'un İDK'a göre daha ileri yaştaki kadınlarda, daha iyi diferansiye ve daha büyük boyutta olma eğiliminde olduğunu ortaya koyulmuştur (8). İDK'lara oranla daha geç metastaz yaparlar ve genellikle periton, meninks, gastrointestinal sistem gibi bölgelere metastaz yapma eğilimleri bulunmaktadır (9).

C) Tübüler Karsinom: İyi oluşmuş tübüler veya glandüler yapıların stromaya infiltrasyonu ile karakterizedir. İnvaziv meme kanserlerinin %2'sinden azını oluşturmaktadır. Vakaların üçte biri düşük grade'lidir. İDK'a göre daha iyi prognozludur; indolan seyirlidir ve nadir metastaz yapar (10).

D) Müsinöz (Kolloid) Karsinom: İnvaziv meme kanserlerinin %1-2'sini oluşturmaktadır ve daha çok yaşlı hastalarda görülmektedir. Tübüler karsinom gibi iyi prognozludur (11).

E) Medüller Karsinom: İnvaziv meme kanserlerinin %1-10'unu oluşturmaktadır. Medüller karsinom diğer invaziv kanserlere kıyasla daha genç yaştaki hastalarda görülmektedir. BRCA-1 mutasyonu taşıyan hastaların %10'unda medüller karsinom saptanmaktadır (12). Pür medüller karsinomların prognozu, İDK'dan daha iyidir (13).

F) Diğer Histolojik ve Klinik Tipler:

- **Mikropapiller Karsinom:** Küçük boyutta bile lenf nodu metastazı yapma eğilimi olan agresif bir invaziv karsinom türüdür (14).

- **Metaplastik Karsinom:** Kötü diferansiye duktal adenokarsinom, mezenkimal (sarkomatöz) ve diğer epitelyal (örn: skuamöz hücreli) komponentlerin değişik kombinasyonundan oluşan bir tümördür (15). Daha kötü prognozlu olduğu düşünülse de diğer invaziv meme kanserleri gibi tedavi edilirler (16).
- **Adenoid Kistik Karsinom:** Nadir görülen meme kanseri türüdür. Tükürük bezlerindeki adenoid kistik karsinomla aynı morfolojiye sahiptir. Tümör çapı büyük de olsa, prognozu iyidir, aksiler metastaz insidansı %5'in altındadır (17).
- **Paget hastalığı:** Meme başı ve areolanın hastalığıdır. Klinik olarak egzema benzeri belirtileri mevcuttur. Hemen daima altta yatan in-situ ya da invaziv bir meme kanseri ile ilişkilidir. Son çalışmalarda, radyoterapi ile meme koruyucu yaklaşımın uygun bir alternatif olduğu ifade edilmektedir (18).
- **İnflamatuvar Karsinom:** Lokal ileri meme kanserinin özel bir formudur. Klinik olarak eritem, ödem ve meme cildinde ısı artışı ile karakterizedir. Histolojik olarak dermal lenfatiklerde tümör invazyonu saptanır. Kötü prognozludur (19).

Meme kanseri heterojen bir hastalıktır ve mevcut histolojik sınıflandırma geniş klinik spektrumu kapsayamamaktadır. Histolojik olarak aynı tümörlerde, moleküler farklılıklar olduğundan, farklı klinik davranışlar gözlemlenebilir. Son 10 yıldır geliştirilen gen tarama teknikleriyle, bir tümörde, tek seferde binlerce gen ve gen ürünü saptanmakta ve bunlar yeni prognostik belirteçler saptama, tedaviye yanıtı öngörme ve yeni hedefleyici tedaviler geliştirilmesinde kullanılmaktadır (20).

Perou ve ark. 2000 yılında gen ekspresyon örnekleriyle invaziv meme kanserinin ilk alt tiplerini belirledi. Buna 'Orijinal Perou Sınıflaması' adı verildi. Bu çalışmada invaziv meme kanserlerinin mikrorray yöntemiyle gen profilleri çıkarıldı ve farklı moleküler genotiplerinin olduğu belirlendi. Kanserli doku ve normal meme dokusu örneklerinden DNA testi ile elde

edilen gen haritası içinde bir grup ‘intrensek gen’ saptandı. İntrensek genler farklı tümörler arasında çeşitli varyasyonlar oluşturmaktaydı. Bu varyasyonlarla, moleküler sınıflandırma metoduyla dört alt tip belirlendi:

1. Luminal-like (Luminal-A ve Luminal-B): Luminal-A tümörlerde en yüksek östrojen reseptörü (ER) ekspresyon düzeyi saptandı. Bunun yanı sıra, GATA-binding protein 3, X-box binding protein 1, Trefoil factor 3, hepatocyte nuclear faktör 3-alfa ve LIV-1’in yüksek düzeylerde ekspresyonu saptandı (21). Ancak, human epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER-2) ekspresyonunun olmadığı görüldü.

Luminal-B tümörlerde ise luminal spesifik gen (ER, PR v.b) 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.

Bütün luminal grup meme kanserlerinde ER pozitifliği mevcuttu ve bunların üçte ikisi düşük veya orta histolojik grade’liydi.

2. Basal-like: Bu tümörlerin %90’ı ER, PR ve HER-2 negatiftir. Bu grubun %90’ı yüksek grade’li tümörlerden oluşmaktadır. CK 5, 6, 15 ve 17 gibi bazal sitokeratinleri yüksek oranda eksprese etmektedirler. Fakat basal-like genotipi içeren tümörlerde heterojenitenin yoğun olması nedeniyle iki ek alt gruba ayrılması önerilmiştir (22). Bu alt gruplardan biri olan ‘triple negatif hastalık’ grubunda bazal sitokeratinler de dahil olmak üzere ER, PR ve HER-2 negatiftir. Hastalık oldukça agresif bir seyir göstermektedir.

3. HER-2 pozitif: HER-2 aşırı ekspresyonu bulunmaktadır. ER negatiftir.

4. Normal-like: Normal meme hücrelerine benzer fenotip ve genotipik özellikler taşıyan düşük grade’li tümörlerdir.

Bu moleküler sınıflandırmada, prognoz ve kemoterapiye yanıtın moleküler alt gruplar arasında farklı olduğu saptanmıştır. Böylece yeni hedefleyici tedaviler belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Klinik çalışmalarda basal-like, triple negatif ve HER-2 pozitif/ER negatif meme kanserlerinin, luminal meme kanserlerine göre antrasiklin içeren neoadjuvan kemoterapiye daha sensitif oldukları fakat buna rağmen daha kötü prognozlu oldukları gösterilmiştir (23).

Meme Kanserinin TNM Evreleme Sistemi

Meme kanserinde, tümör evreleme sistemi American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından 2002 yılında modifiye edildi (24).

TNM Evreleme Sistemi

Primer tümör (T)

TX- Primer tümör saptanmamış

TO- Primer tümör kanıtı yok

Tis- Karsinoma in-situ

- **Tis (DKİS)-** Duktal karsinoma in-situ
- **Tis (LCİS)-** Lobüler karsinoma in-situ
- **Tis (Paget)-** Tümör olmaksızın meme başının paget hastalığı; tümör ilişkili paget hastalığı primer tümör çapına göre sınıflandırılır.

T1- Tümör çapı 2 cm veya daha küçük

- **T1mic-** 0.1 cm veya daha küçük mikroinvazyon
- **T1a-** Tümör çapı 0.1-0.5 cm arasında
- **T1b-** Tümör çapı 0.5-1 cm arasında
- **T1c-** Tümör çapı 1-2 cm arasında

T2- Tümör çapı 2-5 cm arasında

T3- Tümör çapı 5 cm'den büyük

T4- Aşağıda tanımlandığı gibi göğüs duvarına (a) veya deriye (b) yayılmış herhangi bir çapta tümör:

- **T4a-** Göğüs duvarına yayılmış
- **T4b-** Aynı memede ödem (peau d'orange dahil) veya meme cildinde ülserasyon veya satellit deri nodülleri
- **T4c-** T4a ve T4b'nin her ikisi de
- **T4d-** İnflamatuar karsinom

Not: T4b ve T4d'de tariflenen deride çukurlaşma, meme ucu çekilmesi veya herhangi bir deri değişikliği T1-3 tümörlerde görülebilir ve bu sınıflandırmayı değiştirmez.

Bölgesel lenf nodları (N): Klinik sınıflandırma

Nx- Bölgesel lenf nodu saptanmamış

N0- Bölgesel lenf nodu yok

N1- Aynı taraf aksillada hareketli lenf nodu metastazı

- **N1mic-** 0.2 mm-2mm arasında mikrometastaz
- **N1a-** 1-3 lenf nodu metastazı
- **N1b-** Klinik olarak görünür olmayan internal meme lenf nodunda mikroskopik metastaz
- **N1c-** Klinik olarak görünür olmayan 1-3 aynı taraf aksiller ve internal meme lenf nodlarında mikroskopik metastaz

N2- Aynı taraf aksillada fikse lenf nodu metastazı veya aksiller lenf nodu metastazı

olmadan klinik olarak görünür aynı taraf internal meme lenf nodu metastazı

- **N2a-** Birbirine veya diğer dokulara fikse aynı taraf aksiller lenf nodu metastazı

- **N2b-** Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın klinik olarak görünür (görüntüleme yöntemleriyle saptanmış veya muayene ile saptanmış) aynı taraf internal meme lenf nodu metastazı

N3- Klinik olarak saptanmış aksiller lenf nodu metastazı olsun olmasın aynı taraf

infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik olarak saptanmış aksiller lenf nodu metastazı ve aynı taraf internal meme lenf nodu metastazı veya aksiller ya da internal meme lenf nodu metastazı olsun olmasın aynı taraf supraklaviküler lenf nodu metastazı

- **N3a-** Aynı taraf infraklaviküler lenf nodu metastazı
- **N3b-** Klinik olarak görünür aksiller lenf nodu metastazı ve aynı taraf internal meme lenf nodu metastazı
- **N3c-** Aksiller veya internal meme lenf nodu metastazı olsun olmasın aynı taraf supraklaviküler lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)

MX- Uzak metastaz saptanmamış

M0- Uzak metastaz yok

M1- Uzak metastaz var

EVRE GRUPLAMALARI

Evre 0- Tis N0 M0

Evre I- T1 N0 M0 (T1mic dahil)

Evre IIA- T0 N1 M0; T1 N1 M0 (T1mic dahil); T2 N0 M0

Evre IIB- T2 N1 M0; T3 N0 M0

Evre IIIA- T0 N2 M0; T1 N2 M0 (T1mic dahil); T2 N2 M0; T3 N1 M0; T3 N2 M0

Evre IIIB- T4 herhangi bir N M0

Evre IIIc- Herhangi bir T N3 M0

Evre IV- Herhangi bir T herhangi bir N M1

MEME KANSERİ TEDAVİSİ

Meme kanserinde uygulanacak tedavi şekli prognostik ve prediktif pek çok faktöre göre belirlenmektedir. Bu faktörler içinde en önemlileri aksiller lenf nodu metastazı, tümör boyutu, tümörün eksprese ettiği hormon reseptörleri (ER, PR) ve HER-2 durumu, tümör grade'i, hastanın yaşı, menapozal durumu ve performansı olarak sıralanabilir.

Meme dokusunun lenf drenajı aksilladaki lenf nodlarına olmaktadır. Tanı anındaki aksiller lenf nodu durumu kanserin uzak metastaz yapma olasılığını yansıtmaktadır. Tümör eğer aksiller lenf nodlarına metastaz yaptıysa diğer organlara yayılma ve rekürrens oranı artar. Bütün lenf nodu pozitif olgular, lokal tedavi sonrasında, tümör cerrahi olarak tamamen rezektive edilse bile, adjuvan sistemik tedavi (kemoterapi, hormonoterapi, trastuzumab veya kombinasyonları) almalıdır. Sistemik tedavinin türü de kanserin hormon reseptör durumu ve HER-2 ekspresyon düzeyi ile belirlenmektedir.

Lenf nodu durumuna ek olarak, tümörün prognozu boyutuna da bağlıdır. Büyük tümörler daha sık nüks ederler. Bazen büyük tümörlerde ve göğüs duvarına uzanan tümörlerde cerrahi öncesinde, tümör çapını küçültmek amaçlı operasyon öncesi dönemde kemoterapi (neoadjuvan tedavi) verilir. İnflamatuvar meme kanserlerinde de aynı yaklaşım uygulanmaktadır.

Meme kanserinin pek çok histolojik tipi bulunmaktadır. Tedavi seçimi yapılırken en önemli ayırım noktası tümörün invaziv veya noninvaziv (in-situ) olmasıdır. İn-situ kanserlerdeki cerrahi tedavi (lumpektomi) invaziv kanserlerle benzerdir fakat genellikle aksiller diseksiyon gerekmemektedir. İn-situ kanserlerin yayılma oranı %1'in altında olduğundan adjuvan kemoterapi önerilmez fakat hormonoterapi konusu tartışmalıdır.

İnflamatuar meme kanserinde cerrahi tedavi sonrası sistemik tedavi uygulanmasının sonuçları kötü olduğu için, genellikle sistemik tedavi sonrası cerrahi tedavi uygulanması önerilmektedir. Hormon reseptörü pozitif olan tümörler cerrahi sonrası ilave hormonoterapiden fayda görürler. Premenopozal olgularda tamoksifen ± ovaryan ablasyon veya supresyon, postmenopozal olgularda ise tamoksifen veya aromataz inhibitörleri (anastrozole, letrozole, exemestane) önerilir. Hormon reseptör negatif tümörlerde hormonoterapi etkili değildir. Hormon reseptör durumu tedaviye yanıtta önemli bir göstergedir. Son 20 yılda adjuvan kemoterapideki gelişmelerin ER pozitif olan tümörlerde sağkalıma katkısı, ER negatif tümörlere göre belirgin şekilde daha azdır (25). National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (26) ve International Consensus Group for the Treatment of Early Stage Breast Cancer (27) gibi grupların konvansiyonel rehberlerinde ER pozitif ve nod pozitif erken evre meme kanseri olgularında adjuvan hormonal tedaviye, adjuvan kemoterapinin eklenmesi öneriliyorsa da, bu olgularda kemoterapinin yararları tartışmalıdır.

Bütün primer meme tümörleri HER-2 ekspresyonu açısından test edilmelidir. Yaklaşık %20-25 oranındaki meme tümöründe yüksek düzeylerde HER-2 ekspresyonu saptanmaktadır. Yüksek düzeylerde HER-2 ekspresyonu, hem adjuvan hem de metastatik hastalık tedavisinde trastuzumab gibi HER-2 hedefleyici tedavilerin seçilmesini sağlamaktadır. Ek olarak HER-2'yi yüksek oranda eksprese eden tümörlerde, antrasiklin bazlı kemoterapi, CMF (siklofosfamid, metotreksat ve fluorourasil)'yi içeren adjuvan kemoterapiden daha etkili bulunmuştur (28).

Premenopozal veya 50 yaşın altındaki olgularda, ER/PR pozitif tümörlere daha az rastlanır ve bu nedenle adjuvan sistemik kemoterapiden daha fazla fayda görürler. Daha yaşlı veya postmenopozal kadınlarda ise hormonoterapiye yanıtı tümörler daha fazla görüldüğü

için kemoterapinin faydası, genç ve premenopozal olgulardan daha azdır. Buna rağmen postmenopozal kadınlar halen adjuvan kemoterapiden fayda görmektedirler.

Meme kanserinde tedavi seçiminde hastalık evresi her zaman göz önüne alınır. Olguların tedavisi aşağıdaki evrelere göre planlanır:

- Karsinoma in-situ tedavisi
- Erken evre meme kanseri tedavisi (Evre I-II)
- Lokal ileri ve inflamatuvar meme kanseri tedavisi (Evre III)
- Metastatik meme kanseri tedavisi (Evre IV)

Karsinoma in-situ Tedavisi

Lobüler Karsinoma in-situ: LKİS saptanan hastalarda hayat boyu invaziv karsinom gelişme riski her yıl %1 oranındadır. Cerrahi tedavi sonrası RT veya konvansiyonel kemoterapi yapılmamaktadır.

Duktal Karsinoma in-situ: LKİS'ya kıyasla DKİS preinvaziv bir lezyondur ve tedavi edilmediğinde invaziv kanser gelişme riski yüksektir. İnvaziv karsinom gelişme sıklığı bilinmemektedir. Vakaların %90'ı mamografide mikrokalsifikasyon görülmesi ile, %10'u da palpabl kitle ile tanı almaktadır. Geçmişte DKİS saptanan hastalarda %98 oranında küratif bir tedavi olan mastektomi uygulanmaktaydı. Fakat günümüzde bu agresif tedaviden uzaklaşıp meme koruyucu yaklaşımlar yapılmaktadır. Üç cm'den küçük kitle, eksizyon sonrası histolojik olarak temiz sınırlar ve düşük nükleer grade'li olan tümörler meme koruyucu tedaviye uygun kabul edilmektedir. Yüksek riskli hormon reseptör pozitif vakalara invaziv tümör gelişimini önlemek amacıyla tamoksifen verilmesi uygundur.

Erken Evre Meme Kanseri Tedavisi

Adjuvan sistemik tedavi, meme kanserinde cerrahi tedavi sonrası hormonoterapi, kemoterapi ve/veya trastuzumab uygulanmasıdır. Adjuvan sistemik tedavinin en büyük avantajı erken evre meme kanserini kontrol altına alarak, hem rekürrens oranını hem de kanserden ölüm riskini anlamlı oranda azaltmasıdır.

Erken evre meme kanserinde adjuvan polikemoterapinin (2 veya daha fazla antineoplastik ajanın kombine uygulanması) yarar sağladığı gösterilmiştir (29) :

- 50 yaş altı kadın hastaların randomizasyonunda, polikemoterapinin hastalık relapsını %37, ölüm oranını ise %30 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç 15 yıllık sağkalımda %10'luk bir artış sağlamıştır.
- 50-69 yaş arası kadın hastalarda relaps riski %19, ölüm oranı ise %12 oranında azalmıştır. Bu da 15 yıllık sağkalımda %3'lük bir artış sağlamıştır.
- 70 yaş ve üzeri kadın hastaları içeren çalışmaların azlığı nedeniyle kemoterapinin faydaları bu grup için belirsizdir.

ER negatif tümörü olup adjuvan sistemik tedaviye ihtiyacı olan (1 cm üzerinde tümör, lenf nodu pozitifliği veya diğer kötü risk faktörlerini taşıyan) olgularda adjuvan sistemik kemoterapi uygulaması standarttır (30,31).

Özellikle lenf nodu negatif, ER pozitif hastaların tedavisinde hormonoterapiye kemoterapi eklenmesinin faydaları tartışmalıdır. Hormon reseptör pozitif hastalar sistemik kemoterapiden daha az yarar görmektedirler (25,32). Randomize çalışmalarda bazı hormon reseptör pozitif hastaların kemoterapiden fayda gördüğü açıkça gösterilmiştir (33). Fayda görecekt olguları saptamak için tümör genotipini göstermek amacıyla Oncotype DX testi uygulanabilir.

Büyük miktarda veride, yüksek düzeyde HER-2 eksprese eden tümörlerde antrasiklin içeren tedavilerin antrasiklin ve taksan içermeyen (CMF) tedavilere üstün olduğu görülmektedir (34).

Son çalışmalarda ise, antrasiklin bazlı rejimlerin (en az 4 kür AC), 4 kür antrasiklin içermeyen taksan içeren rejimlerle (dosetaksel+siklofosfamid) karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir.

Birçok çalışmada lenf nodu pozitif ve lenf nodu negatif yüksek riskli tümörü olan hem premenapozal hem de postmenapozal hastalarda taksan (paklitaksel ve dosetaksel) ve antrasiklin içeren adjuvan kemoterapinin sağkalım avantajı sağladığı saptanmıştır.

HER-2 aşırı ekspresyonu ise kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu olgularda, HER-2 proteinine karşı geliştirilmiş monoklonal humanize antikor olan trastuzumabın adjuvan tedavide kullanımı gündeme gelmiştir.

Adjuvan Sistemik Kemoterapide Paklitakselin Yeri:

Taksanlar ve antrasiklinler meme kanseri tedavisinde tek ajan olarak en etkin kullanılan ilaçlardır ve aralarında çapraz direnç gelişmemektedir. Birçok çalışmada antrasiklin bazlı adjuvan kemoterapiye taksan eklenmesinin sağkalım avantajı sağladığı gösterilmiştir (35).

Üç büyük randomize çalışmada antrasiklin bazlı kemoterapiye paklitaksel eklenmesiyle hastalüksız sağkalımın arttığı, bir tanesinde de genel sağkalımın uzadığı gösterilmiştir (36).

1- CALGB 9344 çalışması: Bu çalışmaların en büyüğü olan CALGB 9344 çalışmasında 3121 lenf nodu pozitif, erken evre meme kanserli olgu AC (doksorubisin+siklofosfamid) tedavisi verilerek randomize edilmiştir. Randomizasyonda 3 farklı doz doksorubisin (60, 75, 90 mg/m²) artı 4 kür standart doz (600 mg/m²) siklofosfamid uygulanmıştır. Ardından hastalar tekrar randomize edilerek, bir gruba paklitaksel (175 mg/m² 3 haftada bir 4 kür) uygulanmış, diğer grup ise izlenmiştir (36).

AC tedavisine paklitaksel eklenen kolda hastalık nüks riskinde (5 yıllık hastalüksız sağkalım %65'e karşılık %70) ve ölüm oranında (genel sağkalım %77'ye karşılık %80) istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Paklitaksel toksisitesi tolere edilebilir

düzeyde görülmüştür. Standardın üstünde (>60 mg/m²) doksorubisin dozlarının ek yarar sağlamadığı anlaşılmıştır.

Çalışmanın alt grup analizinde 1322 kadında HER-2 ve ER durumu ile taksan etkisi değerlendirilmiştir. ER durumuna bakılmaksızın HER-2 pozitif hastalara, aynı zamanda HER-2 durumuna bakılmaksızın ER negatif hastalara AC sonrası paklitaksel eklenmesinin, ek fayda sağladığı anlaşılmıştır. ER pozitif ve HER-2 negatif tümörler ise bu tedaviden etkilenmemiştir.

Bu verilere rağmen taksan tedavi seçiminde tümörün HER-2 ekspresyon durumunun göz önüne alınması tartışmalıdır. ASCO (American Society of Clinical Oncology), adjuvan kemoterapide taksanların kullanımı için tümörün HER-2 ekspresyon düzeyine bakılmasını önermektedir (37).

2- NSABP B-28 çalışması: Bu çalışmada lenf nodu pozitif erken evre meme kanserli 3060 kadın 2 kola ayrılmıştır. Bir kola 4 kür AC (60 mg/m² doksorubisin+600 mg/m² siklofosfamid 3 haftada bir) ardından 4 kür paklitaksel (225 mg/m² 3 haftada bir), diğerine ise sadece 4 kür AC (60 mg/m² doksorubisin+600 mg/m² siklofosfamid 3 haftada bir) verilmiş. Paklitaksel alan grupta 5 yıllık hastaliksız sağkalımda (%72'ye karşılık %76) artış saptanırken, genel sağ kalımda iki grup arasında fark görülmemiştir.

3- GEICAM 9906 çalışması: Bu çok merkezli Avrupa çalışmasında ise 1246 lenf nodu pozitif meme kanserli kadın hasta 2 gruba randomize edilmiştir (38). Birinci gruba FEC protokolü (siklofosfamid 600 mg/m², epirubisin 90 mg/m², 5-Fluorourasil 600 mg/m²), 2. gruba ise FEC ardından haftalık paklitaksel (100 mg/m²) 8 hafta uygulanmış. Paklitaksel alan grupta 5 yıllık hastaliksız sağ kalımda (%72'ye karşılık %79) ve genel sağkalımda (%87'ye karşılık %90) anlamlı oranda artış saptanmıştır. Bu çalışmada paklitaksel etkisi ile ER ve HER-2 düzeyleri arasındaki ilişki gösterilmemiştir.

Sonuçta, meme kanserinin adjuvan tedavisinde paklitakselin etkinliği pek çok klinik çalışma ile gösterilmiştir.

Lokal İleri ve İnflamatuvar Meme Kanseri Tedavisi

İnflamatuvar meme kanseri dahil, lokal ileri evre meme kanserlerinde indüksiyon kemoterapisi (neoadjuvan kemoterapi) ardından lokal tedavi (cerrahi, radyoterapi veya her ikisi de) önerilmektedir. Neoadjuvan tedavi ile hastaların yaklaşık %75'inde major klinik yanıt alınmakta ve bunların yarısında da tam klinik yanıt elde edilmektedir. Klinik tam yanıtlı olguların yarısında veya üçte ikisinde patolojik tam yanıt gözlenmektedir (cerrahi örneğinde tümör yok).

Birçok çalışmada neoadjuvan kemoterapi ile hastalısız sağkalım ve genel sağkalımda anlamlı artışlar sağlandığı gösterilmiştir. Neoadjuvan kemoterapi sonrası lenf nodu negatif hastalarda, pozitif olanlara göre rekürrens ve ölüm oranları daha az görülmüştür.

Neoadjuvan kemoterapinin kaç kür uygulanması gerektiği hastaya göre değişmektedir. Bazı hastalarda bir veya iki kür kemoterapi sonrası maksimum tümör yanıtı elde edilirken, bazılarında ise maksimum yanıt ancak sekiz kür sonrası olabilmektedir.

Neoadjuvan kemoterapide tedaviye taksanların (paklitaksel, dosetaksel) eklenmesinin etkinliği arttırdığı TAX-301 çalışmasında gösterilmiştir. Çalışmada 162 lokal ileri evre meme kanserli hasta iki gruba randomize edilmiştir. Bir gruba sekiz kür CAVP (siklofosamid, doksorubisin, vincristine, prednisolone), diğer gruba ise 4 kür CAVP sonrası 4 kür de docetaxel uygulanmış. Dosetaksel alan grupta iki kat daha fazla (%15'e karşılık %31) patolojik tam yanıt sağlanmıştır (39).

2003 Neoadjuvan tedavi konsensus konferansında ;

- 4 siklus antrasiklin veya taksan içeren neoadjuvan kemoterapi sonrası yanıt değerlendirilmesi,

- Tam veya tama yakın klinik cevap var ise cerrahi tedavinin uygulanması,
- Yetersiz yanıt varsa çapraz rezistans yapmayan yeni tedavi seçeneğinden 4 siklus verilmesi ,
- Adjuvan tedavi olarak 8 siklus verilmesinin uygun olduğu, bu tedavinin hepsinin preop verilebileceği gibi, preop ve postop dönemlerde ayrılarak tamamlanabileceği, önerileri yapılmıştır (40).

Hormon reseptörü pozitif lokal ileri evre hastalarda tamoksifen ve aromataz inhibitörleri etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Sınırlı sayıda mevcut veride neoadjuvan hormonoterapinin kemoterapiye oranla daha az patolojik tam yanıt sağladığı görülmektedir. Neoadjuvan hormonoterapi ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır. Neoadjuvan hormonoterapi, organ yetmezliği olan ileri yaştaki hastalarda, kemoterapiye bağlı ciddi toksisite riski bulunan hastalarda, performansı kötü olan hastalarda ve artmış cerrahi riski olan hastalarda tercih edilebilir.

Cerrahi, tümör makroskopik olarak tamamen rezeke edilebilecekse uygulanmalıdır. Neoadjuvan kemoterapi sonrası inoperabl olan hastalara lokal radyoterapi uygulanmalı, bu tedavi sonrası uygun hastalar cerrahiye verilmelidir.

HER-2 pozitif erken evre meme kanserli olgulara tedavide trastuzumab verilmesi hastalıksız sağ kalım ve genel sağ kalımda anlamlı oranda artış sağlamaktadır. HER-2 pozitif lokal ileri evre olgularda trastuzumabın neoadjuvan kemoterapide yer alan en iyi ajan olduğu tartışmalıdır.

Lokal ileri meme kanserinde, multimodalite tedavi yaklaşımları ile 5 yıllık sağkalım %50 civarındadır. Neoadjuvan tedaviye cevabı belirlemede en önemli prognostik belirteçler; aksiller lenf nodu metastazı, yaş, menopozal durum, hormon reseptör durumu, evre, histolojik grade ve tedaviye klinik yanıtıdır.

İnflamatuvar meme kanseri hızlı ilerleyen agresif bir tümördür ve erken metastaz riski yüksektir. Lokal ileri evre meme kanserinin en letal formudur. Neoadjuvan kemoterapi sonrası cerrahi ve radyoterapi yapılan inflamatuvar meme kanserli olgularda, 5 yıllık hastaliksız sağkalım %22-48 arasında, genel sağkalım ise %30-70 arasında değişmektedir (41). İnflamatuvar meme kanserli olgularda meme koruyucu tedavi sonrası yüksek oranda lokal nüks gelişmektedir. Bu yüzden bu hastalarda, neoadjuvan kemoterapi sonrası total mastektomi ve ardından radyoterapi önerilmektedir.

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.

Metastatik meme kanserinin kemoterapi sonrası tam remisyona girmesi alışılmış bir durum değildir ve çok az bir kısmı uzun süre progresyonsuz seyretmektedir. Metastatik meme kanserli hastaların sadece %5-10'u 5 yıl veya daha fazla hayatta kalmaktadır (42). Uzun süre yaşayan olgular, genellikle genç yaşta, mükemmel performansı olan ve sınırlı metastatik hastalığı (kemik, yumuşak doku, cilt v.b) olanlardır. Geçmişteki agresif uygulamalar da (yüksek doz kemoterapi+otolog kemik iliği transplantasyonu), bu grup hastaların sağkalım oranlarını etkilememiştir (43).

Metastatik hastalıkta çoğu hastada küratif tedaviler olmadığından, tedavi stratejileri uzun sağkalım, progresyonsuz sağkalım, stabil hastalık ve yaşam kalitesini artırmaya yönelik olmalıdır.

Metastatik meme kanserli hastaların tedavi planı prognostik ve prediktif faktörlere göre yapılmalıdır. Bu amaçla bazı genel görüşler benimsenmiştir:

- İzole tek metastastazı olan veya metastazın yerleşim bölgesi nedeniyle ciddi komplikasyon riski olan (fraktür veya spinal kord kompresyonu) hastalarda ilk seçenek lokal tedaviler olmalıdır. Sistemik tedavi endikasyonu varsa ve hormon reseptörleri pozitif ise, birinci basamak sistemik tedavi olarak hormonoterapi tercih edilmelidir.
- Hızlı progrese hastalığı, visseral organ tutulumu bulunan, ciddi semptomu olan ve hormonoterapiye yanıtız 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 (44).
- HER-2 pozitif tümörlerde trastuzumab ilk tercih edilecek ajan olmalıdır. Hafif seyirli hastalığı olanlarda birkaç ay boyunca tek başına trastuzumab veya trastuzumab+hormonoterapi denenebilir. Hızlı progrese viseral metastazı olan semptomatik hastalarda ise trastuzumab ve taksan kombinasyonu verilebilir.
- Trastuzumabla tedavi edilen HER-2 pozitif meme kanserli hastalarda ilk relaps olarak beyin metastazı saptananların oranı giderek artmaktadır (46). Bu hastaların yaklaşık üçte birinde beyin metastazı gelişmektedir (47). Bu sonuç tedavi şekli ve intrinsek biyolojik faktörlere bağlı gibi görünmektedir. Beyin metastazları kemoterapiye yanıt vermektedir. HER-2 pozitif hastalarda bir tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib de yararlı olabilir.

Özellikle semptomatik hastalarda lokal tedavi rejimleri tercih edilmektedir. Soliter beyin metastazı olan hastalarda cerrahi rezeksiyon, kranial radyoterapiye göre daha hızlı ve daha iyi palyasyon sağlamaktadır.

Birçok seride hormonoterapi ve kemoterapi kombinasyonunun tek tedaviye göre daha yüksek yanıt oranları sağladığı fakat genel sağkalımda pek değişiklik yaratmadığı 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 sağkalım avantajı sağladığı belirlenmiştir. Fakat kombine tedavi alan hastalarda daha şiddetli kemoterapiye bağlı yan etkiler gelişmiştir (48). 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) (49).
- 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 (50).

- İkiyüz tane 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 bulunamamıştır (51).
- 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 (52). 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 pek farklı olmadığı belirtilmiştir.

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

Metastatik Meme Kanseri Tedavisinde Paklitakselin Yeri

Tek ajan paklitaksel kullanımı hem antrasiklin sonrası (yanıt oranı %35'e karşılık %55) hem de antrasikline refrakter metastatik meme kanserinde etkilidir (yanıt oranı %20) (49). Optimal tedavi dozu 3 saatlik infüzyonla 175 mg/m², 21 günde bir şeklindedir. Haftalık 80-100 mg/m² paklitaksel uygulamasında kemik iliği baskılanması belirgin şekilde azalmaktadır (53). Haftalık paklitaksel uygulaması üç haftada bir uygulanana kıyasla daha etkilidir.

CALBG 9840 çalışmasında 585 metastatik meme kanserli olguda haftalık paklitakselle (80 mg/m²), 21 günde bir verilen paklitaksel (175 mg/m²) tedavisi karşılaştırılmıştır. Haftalık paklitaksel alan grupta daha yüksek yanıt oranı (%29'a karşı %42), daha geç dönemde tümör

progresyonu (5 aya karşı 9 ay) ve daha uzun sağkalım (ortalama sağ kalım 12 aya karşı 24 ay) saptanmış. Fakat bu grupta daha fazla nörotoksisite gözlenmiştir (54).

569 metastatik meme kanserli olguyu içeren Anglo-Celtic IV çalışmasında haftalık (90 mg/m²) ve üç haftada bir (175 mg/m²) paklitaksel uygulaması arasında sağkalım açısından fark bulunamamıştır. İlk raporlarda objektif yanıt oranı haftalık paklitaksel alan grupta daha yüksek saptanmış (%27'ye karşı %43). Fakat progresyona kadar geçen süre, genel sağkalım ve toksisite profili her iki grupta da benzer bulunmuştur (55).

Taksanlı kombinasyonlar, metastatik meme kanseri tedavisinde etkin rejimlerdir. Paklitaksel+doksorubisin kombinasyonunu inceleyen bir FazII çalışmanın erken sonuçlarında yanıt oranlarının %58-94 olduğu, ancak hematolojik toksisitenin fazla olduğu saptanmıştır. Bunun yanında kümülatif antrasiklin dozlarında gelişen kalp yetmezliğinin beklenenden çok daha az olduğu saptanmıştır (56). Paklitakselin, mitoksantron ve epirubisinle kombinasyonlarında kardiyotoksisite oranları beklenenden daha az olmuştur.

Sekiz büyük çalışmada antrasiklin/taksan kombinasyonu ile taksan içermeyen kombinasyonlar karşılaştırılmıştır (57):

- Birinci basamak tedavide, antrasiklinlere taksan tedavisinin eklenmesi objektif yanıt oranlarını artırmıştır (%46'ya karşı %57). İki grup arasındaki yanıt oranları %6'ya karşılık %10 olarak bulunmuştur.
- Taksan bazlı rejimlerde progresyonsuz sağkalım daha iyi bulunmuş olup, bu durum genel sağkalım oranlarına istatistiksel olarak yansımamıştır.

Taksan içeren gruplarda içermeyenlere oranla daha fazla ciddi nötropeni ve febril nötropeni gelişmiştir. Taksan/antrasiklin tedavisinde kombinasyonun mu yoksa sıralı uygulamanın mı daha etkin olduğu ise tartışmalıdır.

529 antrasiklin tedavisi almış metastatik meme kanserli olguyu içeren bir başka çalışmada da gemsitabin+paklitaksel kombinasyonu ile yalnız paklitaksel tedavisi

karşılaştırılmış. İlk raporlarda kombine tedavi alan grupta daha yüksek yanıt oranları (%22'ye karşı %41), daha geç dönemde tümör progresyonu (2.9 aya karşı 5.2 ay) ve genel sağ kalımda artış (15.8 aya karşı 18.5 ay) saptanmıştır. Bunun yanında kombine tedavide hematolojik toksisite daha yüksek oranda görülmüştür (58).

Antrasiklin alamayan hastalar için paklitaksel, lökovorin ve 5-FU kombinasyonu iyi tolere edilen, etkin bir tedavi rejimidir. İkiyüzelli metastatik meme kanserli olguda (ileri yaşlı ve hepatic invazyonu olan hastalar dahil) bu rejimle %48 yanıt oranı saptanmıştır (59).

Paklitaksel tedavisine bevasizumab (anti-VEGF) eklenmesinin faydaları da, ECOG 2100 çalışmasında gösterilmiştir. Bu çalışmada 722 metastatik meme kanserli olgu iki gruba ayrılmış. Bir gruba paklitaksel (90 mg/m²) diğer gruba ise paklitaksel+bevasizumab (10 mg/kg) kombinasyonu uygulanmış (60). Kombinasyon alan grupta daha yüksek yanıt oranı (%21'e karşı %37) ve progresyonsuz sağkalım oranı görülmüş fakat genel sağkalımda anlamlı bir artış saptanmamıştır. Bevasizumab alan grupta daha yüksek oranda hipertansiyon, proteinüri, baş ağrısı, serebrovasküler iskemi saptanmış fakat daha düşük oranda febril nötropeni görülmüştür.

Trastuzumab ve taksan kombinasyonları HER-2 pozitif olan metastatik meme kanseri olgularında popülerite kazanmaya başlamıştır. Doksorubisine dirençli HER-2 pozitif metastatik meme kanseri olgularında bir kola paklitaksel, diğer kola paklitaksel ve trastuzumab verilerek yapılan bir çalışmada, kombinasyon kolunda yanıt oranları ve progresyona kadar geçen süre daha uzun olarak bulunmuştur (61).

Yukarıda söz edildiği gibi, yapılan pek çok klinik çalışmada meme kanserinde erken evre adjuvan tedavide, lokal ileri hastalık (neoadjuvan tedavi) ya da metastatik hastalık tedavisinde tek ajan veya kombinasyon rejimlerinde paklitakselin etkinliği kanıtlanmıştır.

3 ila 52,7 saat arasındadır ve ortalama vücut klirensi 11,6 ila 24,0 L/sa/m² aralığındadır; toplam vücut klirensinin, daha yüksek paklitaksel plazma konsantrasyonları ile azaldığı görülmektedir.

Ortalama kararlı-durum dağılım hacmi, 198 ila 688 L/m² aralığındadır, bu da ekstrasvasküler dağılımın ve/veya dokulara bağlanmanın yüksek olduğunu göstermektedir. Üç saatlik infüzyon ile artan dozlarda doğrusal olmayan bir farmakokinetik gösterir. 135 mg/m²'den 175 mg/m²'ye %30'luk doz artışı ile en yüksek serum konsantrasyonu (C_{max}) ve plazma eğri altı alan (EAA_{0-∞}) değerlerinde sırası ile %75 ve % 81 artma görülmektedir.

Sistemik paklitaksel uygulaması ile aynı hastaya ait değişkenlik çok az olmuştur. Paklitakselin birden fazla tedavi kürleri ile birikim gösterdiğine dair bir bulgu olmamıştır. İn vitro çalışmalar plazma proteinlerine %89-98 oranında bağlandığını göstermiştir. Paklitakselin uzaklaştırılması insanlarda tamamıyla aydınlatılmamıştır. İdrarda bulunan kümülatif değişmemiş ilaç ortalama değerleri, verilen dozun %1,3 ila 12,6'sı arasındadır, bu da böbrek dışı bir klirensi göstermektedir. Karaciğer metabolizasyonu ve safra klirensi, paklitakselin uzaklaştırılmasında başlıca mekanizma olabilir. En önemli metabolitleri hidroksilli metabolitleridir. Paklitaksel başlıca sitokrom P450 (CYP450) enzimleriyle, 6-alfa-hidroksipaklitaksel, 3-p-hidroksipaklitaksel ve 6α-3p-dihidroksipaklitaksel'e metabolize olmaktadır. Bu hidroksilli metabolitlerinin oluşumu sırasıyla CYP2C8, CYP3A4 tarafından katalizlenmektedir. Üç saatlik infüzyonu takiben paklitakselin atılımı üzerine böbrek veya karaciğer fonksiyon bozukluğunun etkisi detaylı olarak incelenmemiştir. Üç saatlik 135 mg/m² paklitaksel infüzyonu almış olan bir hemodiyaliz hastasından elde edilen farmakokinetik parametreler, diyaliz uygulanmayan hastalarda tanımlanan parametrelerle aynı aralıkta bulunmuştur.

Paklitaksel en geniş spektrumlu antineoplastik ajanlardan biridir. Meme kanseri dışında over, prostat, küçük hücreli dışı akciğer, baş-boyun, safra kesesi, mide ve özefagus

kanserlerinde ve yumuşak doku sarkomlarında da kullanılmaktadır. İlk kez 1993 yılında insan lenfositik lösemi hücrelerinde apoptozisin, paklitaksel sitotoksitesinin mekanizmalarından biri olduğu gösterilmiştir (62). Bu gözlem daha sonra birçok çalışmayla da desteklenmiştir (diğer lösemi hücreleri, over karsinom hücreleri, gastrik karsinom hücreleri, baş boyun tümörleri, prostat tümörleri, adrenokortikal karsinom hücreleri ve insan glioma hücre hatlarında). Paklitakselin indüklediği sitotoksite ve apoptozis arasındaki pozitif korelasyon in-vivo olarak da gösterilmiştir (63).

Paklitaksel anti-mikrotübül bir ajandır. Bu nedenle M fazına spesifiktir. Hücrede tubülin depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübülleri stabilize eder; DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olur. Hücre siklusunu G2/M fazında durdurup apoptozisi tetikler ve sitotoksiteye neden olur. Paklitakselin mikrotübüllere bağlanarak apoptozisi başlattığı biyokimyasal yolak tam olarak anlaşılamamıştır. Son yapılan çalışmalarda paklitakselin bazı sinyal molekülleri ve gen ürünleri aracılığıyla apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir:

p53 mutasyonu olan tümörlerin paklitaksele daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (64). Kanserlerin %60'ından fazlasında p53 mutasyonu olduğu düşünülürse kemoterapötik ajan olarak paklitakselin avantajı anlaşılmaktadır. p53 tarafından aktive edilen p21(WAF1/CIP1) hücreyi mitotik arrestten çıkarır. p21 yokluğunda paklitakselle tedavi edilen tümör hücreleri mitotik arrest fazında kalır ve apoptozise gider.

Paklitakselin indüklediği apoptozis Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından da regüle olmaktadır. Paklitaksel anti-apoptotik Bcl-x1 ekspresyonunu azaltıp, apoptotik Bak ve Bax ekspresyonunu artırmaktadır. Paklitakselin Bcl-2 fosforilasyonunu artırarak apoptozisi indüklediği düşünülmektedir (65). Son raporlarda, Bcl-2 fosforilasyonunun paklitakselin indüklediği apoptozisle ilişkisinin hala netleşmediği ifade edilmektedir.

Paklitaksele bağılı apopitozis, p34(CDC2), CDC2-like kinaz ve diğler siklin bağımlı kinazların (CDC) aktivasyonuyla da ilişkilidir. Son çalışmalarda siklin bağımlı kinazların apopitoziste temel rol oynadıkları ve paklitakselin indüklediğı apopitozisle p34(CDC2) aktivasyonu arasında yakın bir ilişki olduğı gösterilmiştir (66). Fakat p34(CDC2) aktivasyonunun mitotik arrestin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğı hala netlik kazanmamıştır.

JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stres-activated protein kinase), MAPK (mitogen-activated protein kinase) ailesinin bir alt grubudur ve sıklıkla apopitozisle ilişkilidir (67). Paklitaksel, Ras ve ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) bağımlı sinyal iletim yolları aracılığıyla JNK/SAPK'yı aktive edip apopitozise yol açmaktadır (68).

Kobay hücre hattında yapılan bir çalışmada yüksek dozda (30 mM) paklitaksel uygulanması makrofajlardan TNF-alfa (apopitozisle ilişkili sitokin) salınmasına neden olmuştur (68). Bu doz klinik kullanım için uygun olmasa da, bu gözlem paklitakselin hücre üzerinde multipl etkilerinin olduğunu göstermiştir.

Paklitaksel erken evre, lokal ileri ve metastatik meme kanseri olgularında yapılan pek çok Faz II ve Faz III çalışmalarda tek ajan veya kombinasyon rejimlerinde, tedavideki etkinliğı kanıtlanmış bir ajandır.

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 (Şekil 3A ve 3B) (69). 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

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 da doza bağımlı sterilite gelişebileceği ve vazektomiye alternatif bir kontrasepsiyon yöntemi olabileceği ifade edilmiştir (71).

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

Gossypol'un Kimyası:

Gossypol, atropizomerizm denen bir çeşit enantiomerizm içerir. C2-C2' binaftalan bağında rotasyon ile (-)- (AT-101) ve (+)- (rasemik) olmak üzere iki aktif optik forma döner (72). Gossypol aynı zamanda aldehit, laktol ve ketol olmak üzere simetrik veya asimetrik 3 tautomerik form içerir (73). Gossypol'un 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.

Gossypol'un Biyolojik Aktivitesi:

Yapılan çalışmalarda gossypol'un birçok enzim sistemini, sinyal transdüksiyon mediatörlerini ve membranları etkilediği görülmüştür.

1- Anti-tümör aktivitesi: Kanser hücre hatlarında in-vitro olarak, gossypol'un büyümei inhibe edici etkisi difenilterazoliumbromid (MTT) ve flow sitometri yöntemleri ile gösterilmiştir. Kanser hücre hatlarında (-)- izomeri (AT-101)'in, (+)- (rasemik) izomerinden

daha fazla sitotoksik olduğu gözlenmiştir (74). Özellikle adriamisin, vinblastin ve sisplatin dirençli hücre hatlarında da (-)- izomeri (AT-101)'in etkin olduğu saptanmıştır (75). Sisplatin dirençli baş-boyun kanseri hücre hatlarında da sitotoksik etkisi gösterilmiştir (76). 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 (77). Gossypol ile yapılan klinik çalışmalarda ise kemoterapiye refrakter metastatik adrenal kanser (78), nüks malign glioma (79) ve metastatik meme kanseri olgularında (80) objektif yanıtlar gözlenmiş ve diğer kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanılabilir, ciddi yan etkileri olmayan yeni bir anti-neoplastik ajan olarak sunulmuştur.

2- 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, onun yaptığı kemik iliği supresyonunu yapmamaktadır. (-)- gossypol (AT101)'in keratinosit hücre hattında, HPV-16'nın keratin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir, bu özelliği nedeniyle anti-psoriatik olarak kullanılabilir öne sürülmüştür (81). Gossypol'ün Plasmodium falciparum (82), Entamoeba histolytica ve Trypanosoma cruzi (83) enfeksiyonlarında antiparaziter etkinliği olduğu gösterilmiştir.

3- Antioksidan aktivitesi: Gossypol, potent bir antioksidandır. Rat kardiyak lipozomlarının süperoksid ile ilişkili serbest radikallere maruz kaldığında, düşük konsantrasyonda gossypol ile peroksidatif hasardan korunduğu gözlenmiştir (84). Karaciğerde mikrozomal peroksidasyonu da inhibe ettiği saptanmıştır. Bu nedenle psoriasis gibi lipid oksidatif hasar ile karakterize hastalıklarda antioksidan etkisinden faydalanabileceği ifade edilmiştir (81).

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 memebranlar gibi hedef biyomoleküllerle etkileşimidir.

1- 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 (85).

İnsan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi 5 izoenzim içerir ve bu enzim, anaerobik glukoz metabolizmasında önemli rol oynar. (-)- gossypol (AT-101) 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 (AT-101) albumin-gossypol kompleksi yaparak kan-testis bariyerini geçtiği de gösterilmiştir (86). 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 (87). 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 (88). Rat spermatogenez örneklerinde, gossypol uygulaması ile apoptotik DNA fragmanlarının PKC inhibisyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (89).

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 (90).

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 (91).

Metabolik enzim ailesinden olan Glutasyon-s transferaz (GST) hepatik, renal ve intestinal hücrelerin sitozolünde bulunur, elektrofilik 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 (AT-101), hepatik GST'ın inhibisyonunda daha etkilidir (92).

Protein kinaz C (PKC), hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunun indüklenmesinde, tümör supresör gen p53'ün down regülasyonunda rol oynar. Ayrıca aldosteron sentezi, glukoz transport regülasyonu ve kemoterapötik ajanlara direnç gelişmesinde de görev alır. Gossypol ile PKC'de doza bağımlı inhibisyon meydana gelir (93).

DNA polimeraz-alfa DNA sentezinden, DNA polimeraz-beta ise DNA tamirinden sorumlu olan enzimlerdir. 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'ün telomeraz aktivitesini de inhibe edebildiği ileri sürülmektedir (94).

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 (95).

Erkek kontrasepsiyon klinik çalışmalarında gossypol uygulaması ile 11- β -hidroksisteroid dehidrogenaz enziminin inhibisyonunun hipokalemiden sorumlu olduğu saptanmıştır (96). 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, glukozu sorbitole dönüştüren enzimdir. Bu enzimin aktivasyonu ile hiperglisemiye bağlı komplikasyonlar ortaya çıkar. Gossypol, aldoz redüktazı inhibe ettiği için hiperglisemi komplikasyonlarının tedavisinde ümit vericidir (97).

Kalsinörin (Calcineurin (CaN)), protein fosfataz 2B (PP2B) olarak da bilinen protein serin/treonin fosfatazlar içinde yer alan, binükleer Fe-Zn metallofosfatazıdır. 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 asidlerinin akımı ve nöral hasarlanma ile ölüm oranı belirgin şekilde azalmıştır (98).

Gossypol'ün sıçan ve sığır hücrelerinde adenil siklazı, enzimin ATP bağlayıcı bölgesinde direkt olarak hidrofobik etkileşim ile inhibe ettiği gösterilmiştir (99). Adenil siklaz enzimi; karaciğerden glukoz 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.

2- Hücre siklusu düzenleyici proteinlere etkisi: İnsan meme kanseri hücre hattında (MCF-7) gossypol'ün antiproliferatif etkisi TGF β -1 (transforming growth factor β -1) ve protein tirozin fosfataz–gamma ekspresyonu ve ayrıca retinoblastoma geni (Rb) ve siklin-D1 ekspresyonunun down-regülasyonu ve Rb defosforilasyonu ile gerçekleşmektedir. 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 süpresör proteindir. Ancak tümör hücrelerinde, östrojenik bileşikler ile 'down-regüle' olur. Non-fosforile Rb, transkripsiyon faktörü E2F (elongasyon faktör 2)'ye bağlanıp inaktive ederek DNA sentezini baskılar. Siklin D1 ile CDK4/6 (siklin bağımlı kinaz)'nın oluşturduğu kompleks ile Rb geninin fosforilasyonu sonucunda, hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Meme kanseri hücrelerinde Rb geni bozulmuştur ve nükleer protein siklin D1 aşırı eksprese olmaktadır. (-)- gossypol (AT-101)'in, meme kanseri hücrelerinde TGF β -1 ve protein tirozin fosfataz–gamma ekspresyonunu, (+)- (rasemik) gossypol'e göre daha etkin stimüle ettiği gösterilmiştir (100).

Gossypol'ün temel apopitotik etkilerinin, anti-apopitotik olan Bcl-2 ailesinin inhibisyonu ve mitokondrial kaspaz yolları ile etkileşmesi ile ortaya çıktığı gözlenmiştir. Gossypol, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin BH-3 kısmına bağlanarak, bu proteinlerin etkilerini antagonize etmektedir (101). Bcl-2 ve Bcl-xL'in tümör hücrelerinden aşırı ekspresyonu pek çok kemoterapötik ajana karşı geliştirilmiş dirençten sorumludur. Bu nedenle gossypol gibi BH-3 mimetik ajanların kanser tedavisinde ümit verici ajanlar olduğu söylenebilir. Sisplatin dirençli baş-boyun kanseri hücre hattında aşırı Bcl-xL ekspresyonu yapan tümör hücrelerinde gossypol ile apopitozisin selektif olarak indüklendiği gösterilmiştir (102). İnsan lenfoma hücrelerinde de tek başına veya standart kemoterapi rejimi ile beraber uygulanan gossypol, apopitozisi indükleyerek kemoterapinin etkinliğini artırmıştır (103). Diğer bir çalışmada radyoterapi ile beraber prostat kanseri hücrelerinde tümör progresyonunu baskıladığı

gözenmiştir. 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 buradan apoptotik efektörler olan kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozis indüklenir (104). Bu çalışmaların dışında, insan alveoler akciğer kanseri hücrelerinde gossypol ile Fas/Fas L (Fas ligand) apoptotik yolunun aktive olduğu da gösterilmiştir (105).

3- 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'un antiproliferatif etkilerine oldukça duyarlıdır (106). Tümör hücre membranında, normal hücrelere göre daha fazla olan kolesterol düzeyi, tümör büyümesini uyarıyor olabilir. Bu nedenle tümör hücreleri gossypol'un etkisine, normal hücrelerden 5-10 kat daha duyarlıdır. Ayrıca membran geçirgenliğinin değişmesi ile hücre morfolojinin değiştiği, melanom ve meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir (74). Gossypol aynı zamanda, gap alanlarındaki proteinlere bağlanarak hücreler arası ilişkiyi keser.

4- 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 (92). Bu durum apoptozis indüklenmesini demonstre eder. 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 akışkalığını azaltır, sonuçta membran enzimleri lipid bariyeri aşar ve optimal enzim aktivitesi bozulur.

Gossypol hücrelerde ve mikroorganizmalarda geniş bir alanda araştırılmaktadır. Biyolojik aktivitesi; enzim inhibisyonu, sinyal iletim yolları ile etkileşimi, protein

ekspresyonunun regülasyonu, hücre ve mitokondri membranları ile etkileşimi ile ortaya çıkar. Çalışmalar devam ettikçe, etki yolları daha iyi anlaşılacak ve daha efektif kullanım alanları bulacaktır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattında paklitaksel ve AT-101'in tek başlarına ve kombinasyon olarak uygulanması ile olası sinerjistik sitotoksik ve apoptotik etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Tümör hücre hattının özellikleri:

MCF-7 hücreleri, Haziran 1970 tarihinde, 64 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomalı bir kadın olgunun plevral efüzyonundan elde edilmiştir (107). Ciddi immun yetmezliği olan farelerde bu hücreler ile tümör geliştirilip, metastatik olmayan evrede ksenograftlanmışlardır (108).

Östrojen reseptör pozitif (ER+) MCF-7 hücre hatları birçok çalışmada kullanılmıştır ve meme kanseri çalışmaları için ideal bir model durumundadır. Birçok çalışmada MCF-7 hücre hatlarında pro ve antiapoptotik sinyal iletim yolları ve regülatörleri ortaya konmuştur.

MCF-7 hücrelerinin genom stabilite özelliklerine bakıldığında; yüksek kromozomal instabilitesi olan anöploid yapıda oldukları, eşleşmeyen onarım (mismatch repair) defektlerinin (109) ve yüksek oranda tek kolda kırık tamir defektlerinin bulunduğu görülmektedir (110).

MCF-7 hücrelerinin hücre siklusunu kontrol noktalarındaki özellikleri; G1 ve mitotik uzantı kontrol noktalarının defektif, S ve G2 kontrol noktalarının ise iyi olmasıdır (111).

MCF-7 hücreleri apoptozis için uygundur. Ancak bu hücre hattında casp-3 gen delesyonu olduğundan kaspaz-3'ü eksprese etmemektedir. Bu yüzden apoptozisteki kaspaz

yolağının önemli bir komponenti olan kaspaz-3 aracılıklı yolak ile çalışmamaktadır. Kaspaz-6, 7 ve 9 ekspresyonu yanında, belirgin artmış Bcl-2 ekspresyonu vardır. P53 ve p21 ekspresyonu ve regülasyonu normaldir (112).

MCF-7 hücrelerinin proliferasyon mekanizmalarında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı büyüme, EGF (epidermal growth factor)'den bağımsız büyüme, artmış Her-2/Neu/c-ErbB-2 ekspresyonu (113), artmış N-ras (114) ve Rb gen ürününün hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır (115).

Çalıştığımız MCF-7 meme kanseri hücre hatları Interlab Cell Line Collection (Banca Cellule e Colture, Genova, Italy)'dan temin edilmiştir.

MCF-7 hücre hattında kullanılan besi yeri ve kültür işlemleri:

Hücre hatları, 37 °C'de ve %5 CO₂'li humidifiye edilmiş inkübatörde, stabil %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerine %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 dimetilsülfoksit (DMSO) ile dondurulmuş olan MCF-7 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 santirfüje edildi. 37 °C ısıda DMSO'nun hücrelere olan toksik etkisi, hücre canlılığını azaltacağı için, en seri şekilde çalışılmıştır. Santirfüjasyondan sonra üstteki kısım atılıp, kalan hücre çökeltisine taze besiyeri eklendi. Ardından homojenize edilip tekrar santirfüj 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. MCF-7 hücrelerinin ikilenme zamanları yaklaşık 72 saat 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 ile 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.

MCF-7 hücrelerinin sayımı ve deney planına göre ekimi:

Hücre sayısı; besiyerinin mililitresi başına veya tutunulmuş yüzeyin santimetreküpü başına düşen hücre sayısı olarak belirtilebilir.

Flasklar içinde inkübe edilmiş olan MCF-7 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 5).



Şekil 5: Otomatik sayım cihazındaki hücrelerin görünümü (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 MCF-7 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:

Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında paklitaksel ve AT-101'in farklı dozlarının tek başına ve kombine uygulanmasındaki olası sinerjistik sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Paklitaksel (Mayne Pharma) $7 \times 10^{-3} \text{M}$ (molar) stok solüsyonundan çalışma solüsyonları hazırlandı. Gossypol (Sigma Aldrich, Germany), 1ml DMSO'da çözdürülerek 10^{-2}M 'lık stok solüsyon oluşturuldu.

Stok solüsyonlar -20°C 'de saklandı. Çalışmanın başında 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına, her bir kuyucuk içine toplam 100µl volüm içinde 10.000 hücre olacak şekilde (sadece besiyeri koyularak negatif kontrol olarak kullanılacak kuyucuklara da 100µl besiyeri koyularak) ve her bir konsantrasyon için üçlü kontrollü (triplicate) hücre ekimleri yapılmıştı. Paklitakselin deneyimizde çalışılacak konsantrasyonları 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 7.5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM olarak planlandı. AT-101 için ise planlanan konsantrasyonlar 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM, 5 µM, 7.5 µM ve 10 µM olarak saptandı. Hücre ekim işleminden sonra 24 saat boyunca inkübatörde bekletilen hücre kültür plaklarına planlanan konsantrasyonlardaki paklitaksel ve gossypol, toplam 100 µl volüm içinde olacak şekilde, tek başlarına veya kombine edilecekleri dozlarında 24-48-72 saatlik sitotoksisite analizleri için eklendi ve her bir deney 3 kez tekrarlandı.

Sitotoksisite Analizi:

Hücre proliferasyonu ve sitotoksisite 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. 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.

Sitotoksisite analizlerinin yapılacağı saatlerde (24-48-72. saat) XTT solüsyonu sodyum 3'- [1-(fenil-aminokarbonil)- 3, 4-tetrazolyum]- bis (4-methoksi-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 absorbansı, 450-650 nm dalga boyu aralığında DTX 880 (Elisa Reader) cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her değerlendirme, aynı saatteki pozitif kontrol grubundaki hücre sayısı ile karşılaştırılıp, canlı ve ölü hücre yüzdeleri (% sitotoksisite) hesaplandı.

% Sitotoksisite = $1 - [(\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması} / \text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}) \times 100]$ formülü ile hesaplandı.

İstatistiksel Analiz:

Her bir ilacın ayrı ayrı ve kombine konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerini test eden deneyler üç kere tekrar edildi. Elde edilen absorbans değerleri cihaz tarafından otomatik olarak ortalama absorbans ve \pm SD değerleri olarak hesaplandı.

Kombinasyonların sinerjistik etkilerini araştırmak üzere medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre iki veya daha fazla ilacın sinerjistik, antagonistik veya additif 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 (116). CI metodu Chou tarafından ortaya konan ortalama etki (median-effect) prensibine dayanmaktadır (117,118). CI denklemi ilaç kombinasyonlarının additif etkilerini belirlerken sinerjizmi, beklenen additif etkiden daha fazla etki, antagonizmi ise beklenen additif etkiden daha az etki olarak tanımlamaktadır. Bu şekilde $CI=1$ olduğunda additif etkiyi, $CI<1$ olduğunda sinerjistik etkiyi, $CI>1$ olduğunda ise antagonizmayı ifade etmektedir.

CI (Kombinasyon İndeksi)	Kombine sitotoksik etki
0.1<	Çok kuvvetli sinerjizm
0.1 – 0.3	Kuvvetli sinerjizm
0.3 - 0.7	Sinerjizm
0.7 – 0.9	Hafif sinerjizm
0.9 – 1.1	Additif
1.1 – 1.45	Hafif antagonizm

Tablo1: İki ilacın hücre kültürlerinde kombine kullanımının sinerjistik-additif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri

Absorbans değerlerinden yukardaki formüle göre hesaplanan sitotoksosite yüzdeleri CalcuSyn programına girildi. Böylece her ilacın doz etki tablosu ve eğrisi çizilerek IC_{50} değeri saptandı. IC_{50} değerleri doğrultusunda paklitaksel ve AT-101 değişik oranlarda kombine edilerek ilaç kombinasyonunun sinerjisi 72 saatlik hücre kültürü inkübasyonlarında araştırıldı. 72 saatlik inkübasyon sonucu sitotoksosite yüzdeleri CalcuSyn programına girilerek sinerji bulunan kombinasyon oranları seçildi.

CalcuSyn'de hesaplanan doz etki değerleri Graphpad Prism 5.0 istatistik yazılımında istatistiksel analize tabi tutuldu. Grafikler Graphpad Prism 5.0 kullanılarak çizildi. Konsantrasyonlar arasındaki sitotoksik etkilerin anlamlı olup olmadığı student's t testi ile araştırıldı.

Kombinasyonlardaki Sinerjistik Sitotoksitenin Apoptozisle İlişkisinin Gösterilmesi:

a. DNA fragmentasyon analizi

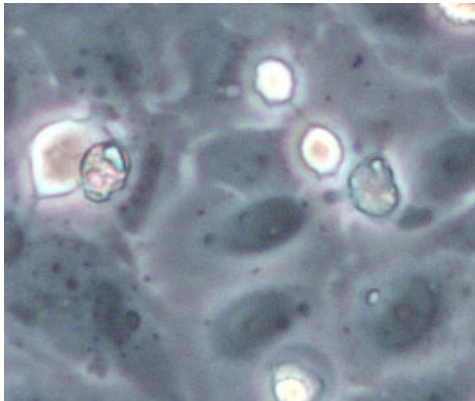
AT-101'in ve paklitakselin kombine halde sitotoksik etkili oldukları konsantrasyonlarda bu etkinin apoptozise bağlı olup olmadığını belirlemek üzere Cell Death Detection ELISA Plus Kit (Roche Applied Science, Germany) üretici firmanın protokolüne uygun olarak kullanıldı (119). Bu kit hücrelerdeki DNA fragmentasyon miktarının ölçülmesi için tasarlanmıştır ve apoptotik hücrelerin sitoplazmasındaki histonlarla paketlenmiş olan DNA fragmanlarını ölçmektedir.

İlaçlarla tek tek ve kombine olarak muamele edilen hücrelerden ve ilaç eklenmeyen kontrol hücrelerinden elde edilen hücre lizatları kitin içeren streptavidin kaplı plaklara 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. Bu işlemde, inkübasyon sırasında anti-histon antikoru bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunkompleks, 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 immunkomplekslere tutunmuş olan peroksidazların ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Apoptotik hücre lizatlarında histon ve DNA fragmanları miktarındaki artış, apoptozis miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

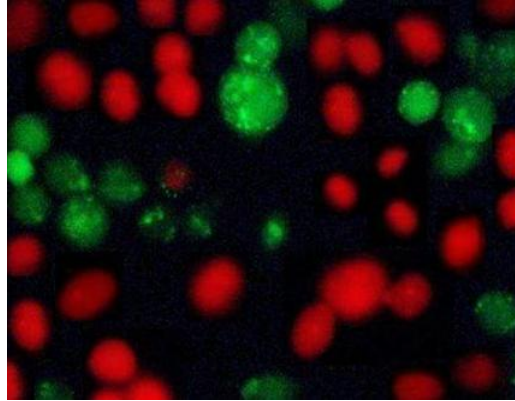
b. Akridin Oranj Testi

Paklitaksel ve AT-101 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattındaki apoptotik etkilerinin ikinci kez gösterilmesi için bir de Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit (Molecular Probe Inc., OR) kullanılarak test yapıldı. Her kuyucuktaki hücreler alınarak D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (besiyeri sıvısı) ile yıkandı. Besiyeri tampon sıvısı olan D-PBS boyaları dilüe etmek için kullanıldı. 10 M/ml Ethidium homodimer-1 (ölu hücre boyası) ve 12 M/ml Calcein AM (canlı hücre-esteraz substratı) 10 ml D-PBS besiyeri tampon sıvısı ile karıştırıldı. 96 kuyucuğun her birine bu karışımdan 150 µl eklendi. Plaklar oda ısısında en az 1 saat bekletildi. Floresan mikroskop kullanılarak dijital fotoğraflar çekildi. Bu yöntemde, canlı normal hücre çekirdekleri normal yapıda ve parlak yeşil renkte; canlı apoptotik hücrelerin çekirdekleri yoğunlaşmış veya fragmante yapıda ve parlak yeşil renkte; ölu normal hücrelerin çekirdekleri organize yapıda ve kromatinleri parlak turuncu renkte; ölu apoptotik hücrelerin çekirdekleri ise yoğunlaşmış veya fragmante yapıda ve kromatinleri parlak turuncu renkte görünmektedir (Şekil 6A ve 6B).

Şekil 6A



Şekil 6B



Şekil 6A: Normal MCF-7 hücre kültürlerinin floresan mikroskop görüntüsü

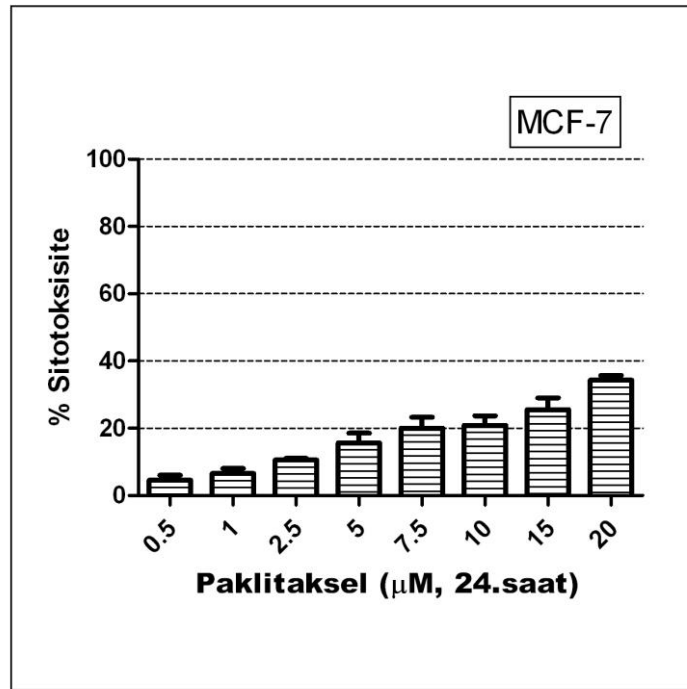
Şekil 6B: MCF-7 hücre kültürlerinde AT-101/Paklitaksel kombinasyonunun etkisinin Calcein/Etidium homodimer boyalarla gösterimi

SONUÇLAR

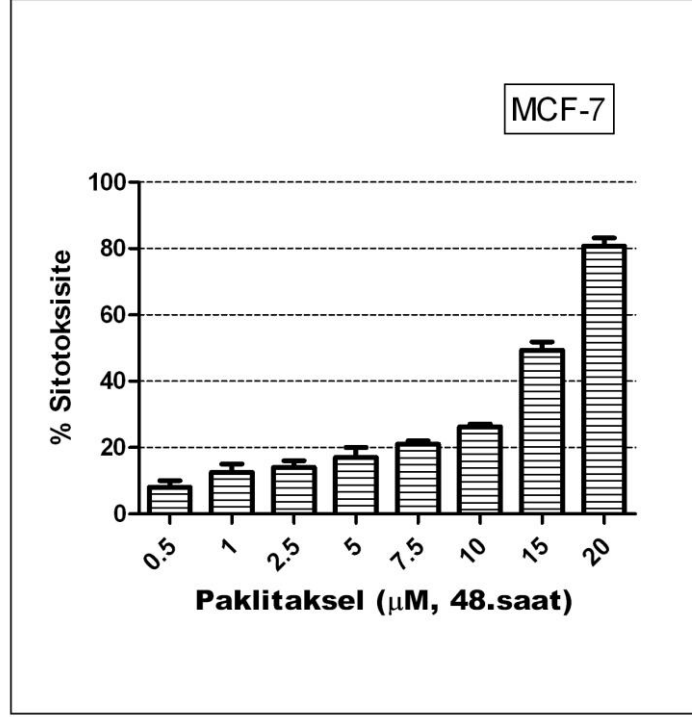
MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve AT-101'in zamana ve doza bağlı olarak sitotoksisitesinin değerlendirilmesi ve IC₅₀ (%50 inhibitör konsantrasyon) değerlerinin saptanması:

Paklitaksel: Paklitakselin 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 7.5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM'lık konsantrasyonları 24, 48 ve 72.saat deney ortamlarına eklendi. 24., 48. ve 72. saatlerde XTT metodu kullanılarak sitotoksosite ölçümü yapıldı.

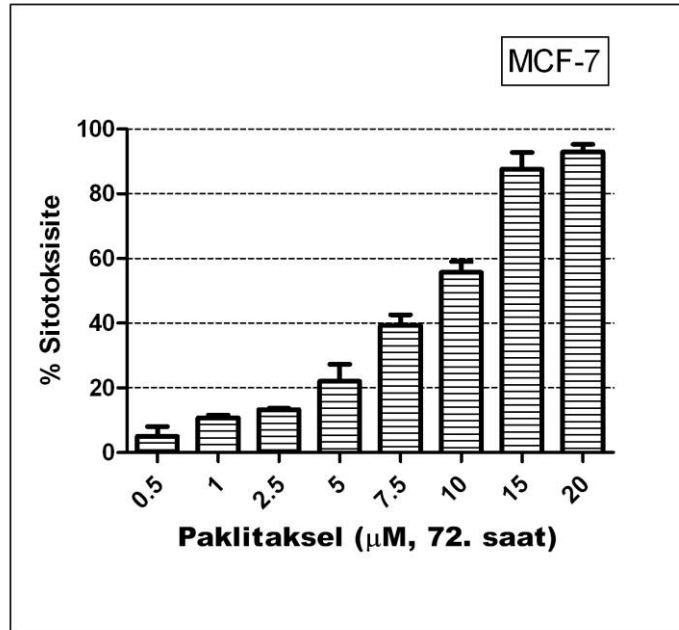
Grafik 1a,1b,1c'de ve Tablo 2'de paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi hem artan dozlarda hem de inkübasyon süresine göre gösterilmiştir:



Grafik 1a: Paklitakselin MCF-7 hücre hattında 24. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi



Grafik 1b: Paclitaxelin MCF-7 hücre hattında 48. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi



Grafik 1c: Paclitaxelin MCF-7 hücre hattında 72. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi

%sitotoksosite	Pozitif kontrol	0.5µM	1µM	2.5µM	5µM	7.5µM	10µM	15µM	20µM
24. saat	0	3,0	8,0	11,0	12,8	16,7	18,0	22,0	32,8
48.saat	0	6,0	9,0	12,0	14,0	20,0	25,4	46,8	78,4
72. saat	0	8,0	10,0	13	27,3	42,6	59,0	82,4	90,6

Tablo 2: Paklitakselin MCF-7 hücre hattında zamana ve doza bağlı sitotoksosite oranları

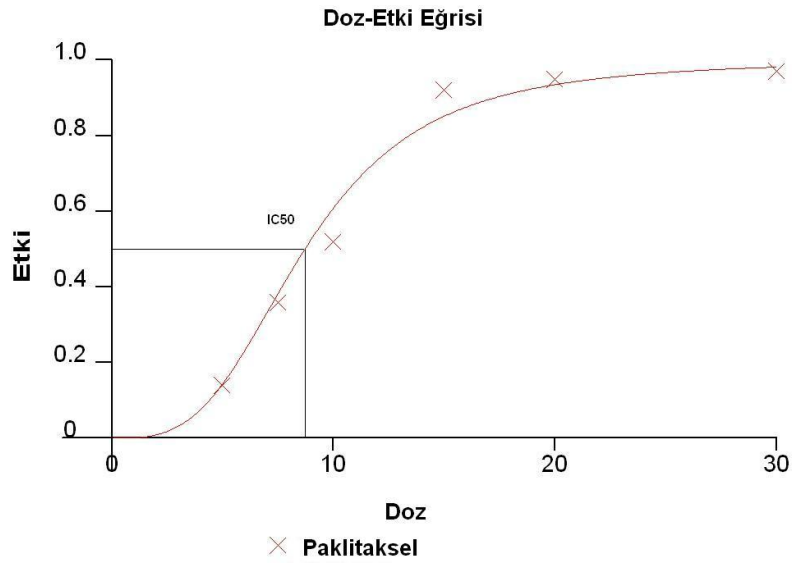
Paklitaksel 24. saatte 15 µM ve 20 µM’lık konsantrasyonlar dışında hep %20’nin altında sitotoksik etki gösterdi. 15 µM konsantrasyonda %22 ve 20 µM’lık konsantrasyonda %32.8 oranında sitotoksik etki görüldü.

48.saatte paklitakselin sitotoksik etkisinde belirgin bir artış gözlenmedi. Fakat 15 µM konsantrasyonda %46.8 ve 20 µM’lık konsantrasyonda %78.4 gibi 24. saatteki sitotoksosite oranlarını iki kat aşan oranlarda sistotoksik etki görüldü.

Ancak 72. saatte 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM ve 5 µM’lık konsantrasyonlarda sırasıyla %8, %10.0, % 13, %27.3 gibi düşük oranlarda sitotoksik etki saptanırken; 7.5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM’lık konsantrasyonlarda ise sırasıyla %42.6, %59, %82.4 ve %90.6 oranlarında sitotoksik etki saptandı. En yüksek sitotoksosite oranı 20 µM’lık konsantrasyonla 72. saatte gözlemlendi.

Sonuç olarak, paklitakselin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edildi.

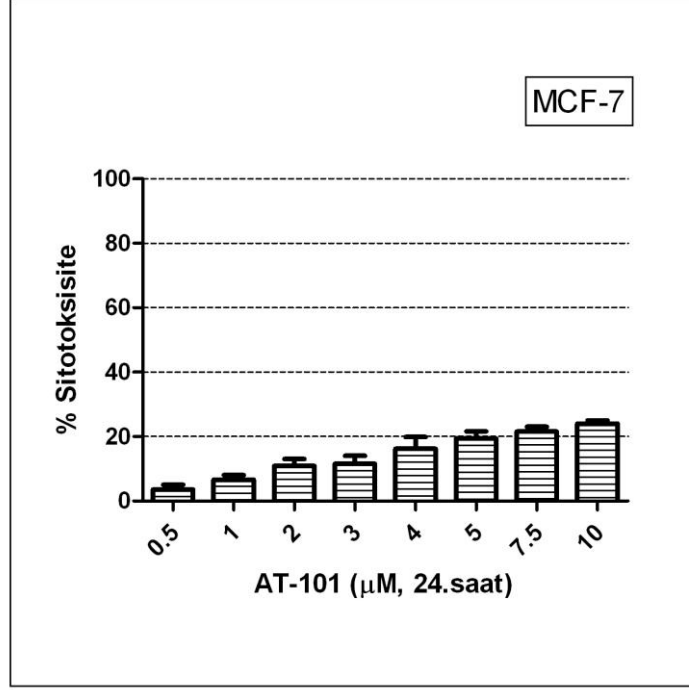
En yüksek sitotoksitenin elde edildiği 72. saatte tespit edilen sitotoksosite yüzdeleri CalcuSyn programına girilerek paklitakselin IC₅₀ değeri hesaplandı. Bu programa göre paklitakselin 72. saatte, MCF-7 hücre hattındaki IC₅₀ değeri 8.70 µM olarak belirlendi (Grafik 2).



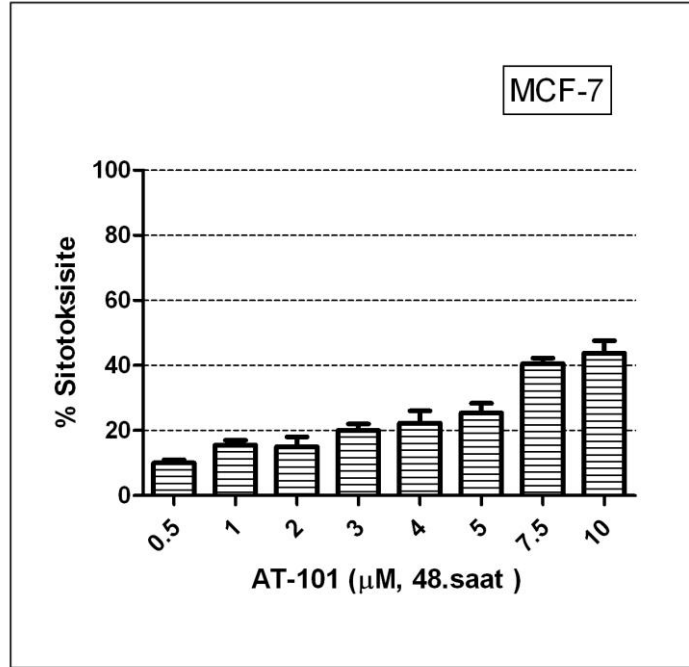
Grafik 2: Paklitakselin doza bağılı sitotoksik etki eğrisi.

AT-101: AT-101'in 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M ve 10 μ M'lık konsantrasyonları 24, 48 ve 72.saat deney ortamlarına eklendi. 24., 48. ve 72. saatlerde XTT metodu kullanılarak sitotoksosite ölçümü yapıldı.

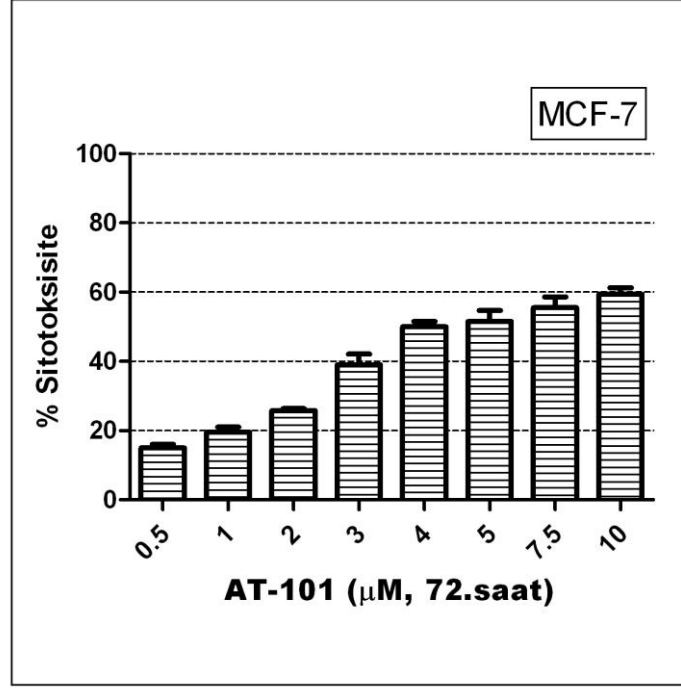
Grafik 3a, 3b, 3c'de ve Tablo 3'de paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi hem artan dozlarda hem de inkübasyon süresine göre gösterilmiştir:



Grafik 3a: AT-101'in MCF-7 hücre hattında 24. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi



Grafik 3b: AT-101'in MCF-7 hücre hattında 48. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi



Grafik 3c: AT-101'in MCF-7 hücre hattında 72. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi

%sitotoksosite	Pozitif kontrol	0.5µM	1µM	2µM	3µM	4µM	5µM	7.5µM	10µM
24. saat	0	2.0	5.3	8.8	9.0	12.5	17.2	20.0	23.0
48.saat	0	11	17	18	22	26	28.4	42.3	47.6
72. saat	0	16	21	25.2	42.1	51.5	54.7	58.6	61.3

Tablo 3: AT-101'in MCF-7 hücre hattında zamana ve doza doza bağlı sitotoksosite oranları

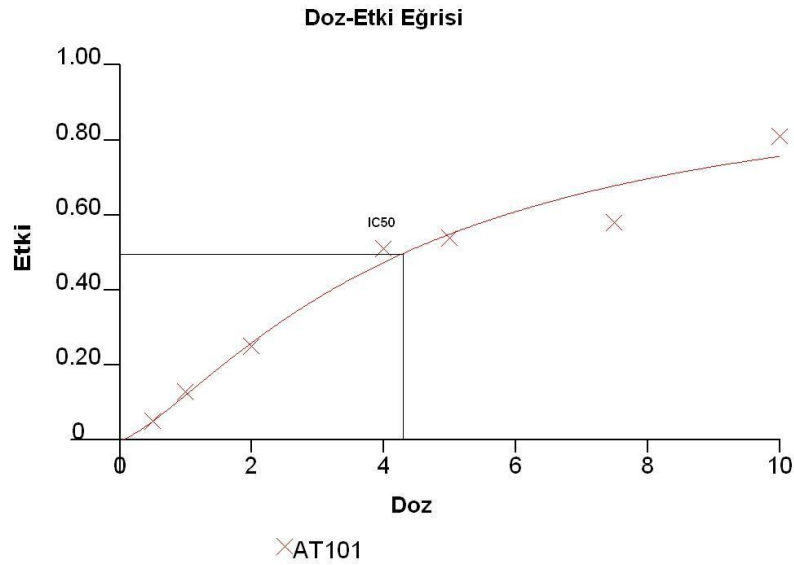
AT-101 24. saatte belirgin bir sitotoksik etki göstermedi. 24. saatte en yüksek sitotoksosite %23 ile 10 µM'lık konsantrasyonda görüldü.

48. saatte AT-101'in sitotoksik etkisinde artış saptandı. 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 3µM, 4µM, 7.5 µM ve 10 µM'lık konsantrasyonlarda, 24. saate göre iki katı aşan oranlarda; sırasıyla %11, %17, %18, %22, %26, %42.3 ve %47.6 oranında sitotoksik etki gözlemlendi.

72. saatte 0.5 μM , 1 μM ve 2 μM 'lık konsantrasyonlarda sırasıyla %16, %21, %25.2 gibi düşük oranlarda sitotoksik etki saptanırken; 3 μM , 4 μM , 5 μM , 7.5 μM ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarda ise sırasıyla %42.1, %51.5, %54.7, %58.6 ve %61.3 oranlarında sitotoksik etki saptandı. En yüksek sitotoksosite oranı 10 μM 'lık konsantrasyonla 72. saatte gözlemlendi.

Sonuç olarak, AT-101'in MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edildi.

72. saatte tespit edilen sitotoksosite yüzdeleri CalcuSyn programına girilerek AT101'in IC_{50} değeri hesaplandı. Bu programa göre AT-101'in 72. saatte, MCF-7 hücre hattındaki IC_{50} değeri 4.85 μM olarak belirlendi (Grafik 4).

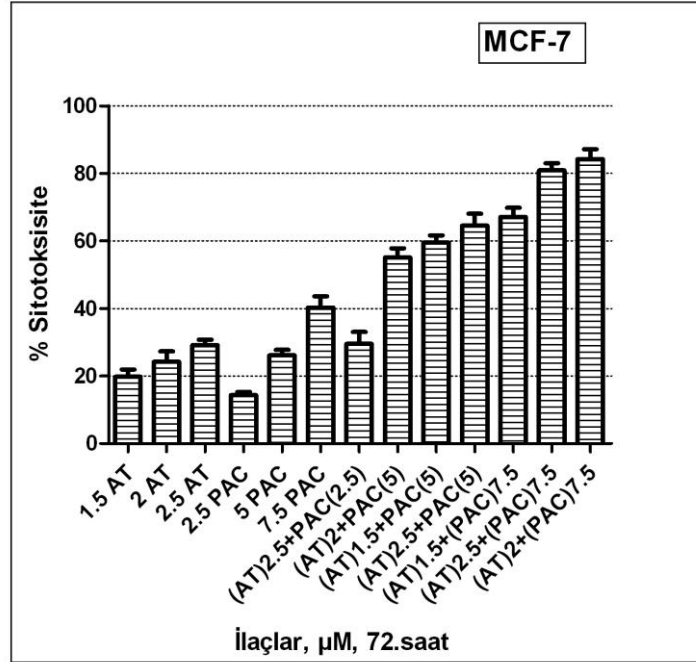


Grafik 4: AT-101'in doza bağlı sitotoksik etki eğrisi

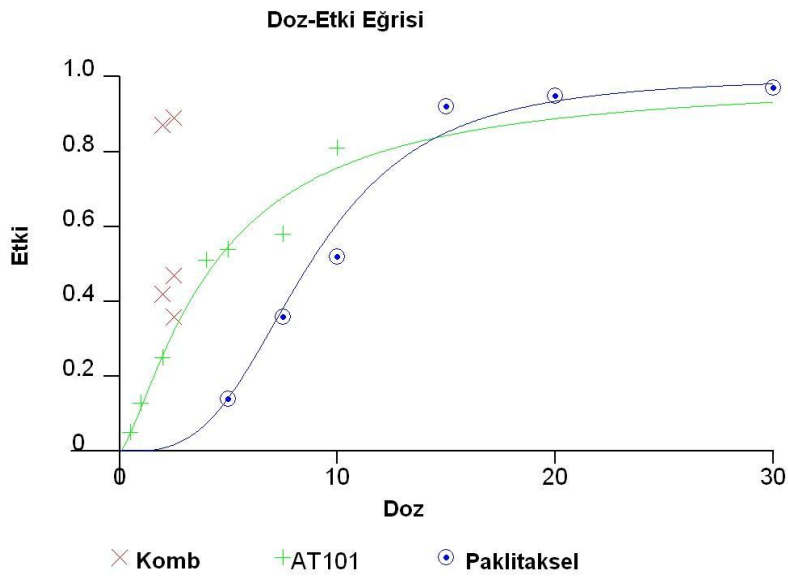
Paklitaksel ve AT-101 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri:

MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve AT-101'in değişen konsantrasyonlarda doza ve zamana bağlı olarak artan sitotoksosite verileri elde edildikten sonra, bu ilaçların klinik

kullanıma uygun ve IC₅₀ değerlerinin altındaki konsantrasyonlar seçilerek kombinasyonlar oluşturuldu ve 72. saatteki sitotoksikite oranları saptandı (Grafik 5 ve Grafik 6).



Grafik 5: AT-101 ve paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattında 72. saatte doza bağlı sitotoksik etkisi



Grafik 6: AT-101 ve paklitaksel kombinasyonunun doza bağlı sitotoksik etki eğrisi

2.5 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkisi %28 ve 2.5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %13.7 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %32 oranında saptandı.

2 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %25.2 ve 5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %16.7 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %57 oranında saptandı.

1.5 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %21.3 ve 5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %16.7 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %61 oranında saptandı.

2.5 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %28 ve 5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %16.7 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %67 oranında saptandı.

1.5 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %21.3 ve 7.5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %36 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %69 oranında saptandı.

2.5 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %28 ve 7.5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %36 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %82.4 oranında saptandı.

2 µM konsantrasyonda AT-101'in 72. saatte sitotoksik etkisi %25.2 ve 7.5 µM konsantrasyonda paklitakselin sitotoksik etkisi %36 olurken, bu dozların kombinasyonunun 72. saatteki sitotoksik etkisi %86.3 oranında saptandı.

Değişik oranlarda kombinasyonların MCF-7 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksikite yüzdeleri, CalcuSyn programına girilerek kombinasyonların CI (Kombinasyon İndeks) değerleri hesaplandı. Elde edilen değerler iki ilacın potansiyellerinden

gelen sinerjistik etki olarak yorumlandı. Araştırılan 7 adet kombinasyondan 6 tanesinde sinerjizm, bunların ikisinde kuvvetli sinerjizm ve bir tanesinde de additif etki gözlemlendi.

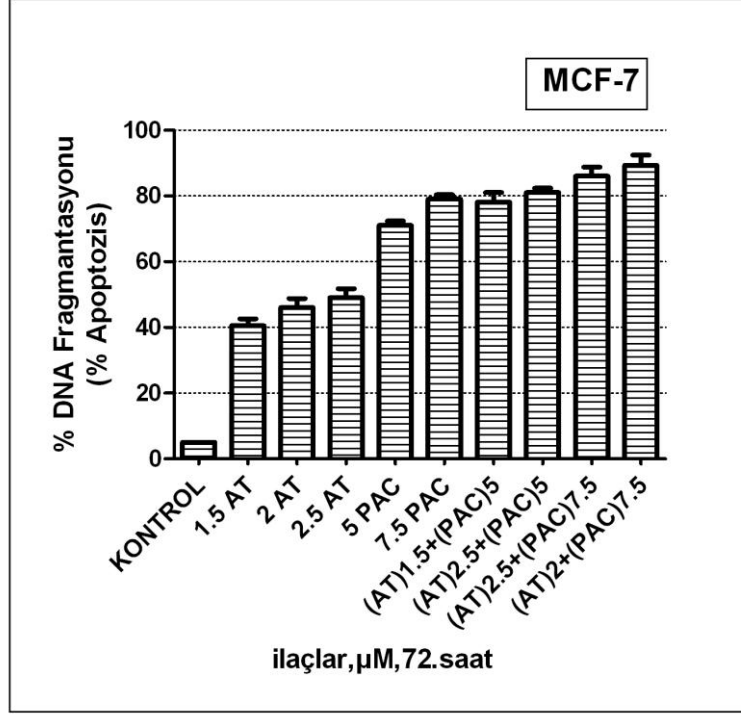
AT-101 ve paklitakselin sinerjik ve additif etkili olan doz kombinasyonları Tablo 4'te gösterildi.

Dozlar	CI Değeri	Yorum
1.5µM AT-101+ 5 µM Paklitaksel	0.566	Sinerjizm
1.5µM AT-101+ 7.5 µM Paklitaksel	0.602	Sinerjizm
2µM AT-101+ 5 µM Paklitaksel	0.768	Hafif Sinerjizm
2µM AT-101+ 7.5 µM Paklitaksel	0.224	Kuvvetli Sinerjizm
2.5µM AT-101+ 2.5 µM Paklitaksel	1.1	Additif
2.5µM AT-101+ 5 µM Paklitaksel	0.513	Sinerjizm
2.5µM AT-101+ 7.5 µM Paklitaksel	0.302	Kuvvetli Sinerjizm

Tablo 4: AT-101 ve paklitaksel kombinasyonunun sinerjistik ve additif etki saptanan konsantrasyonları ve CI değerleri

AT-101 ve paklitakselin MCF-7 hücre hattında sinerjizm gösteren kombinasyonlarının apopitotik etkileri:

CalcuSyn bilgisayar programıyla belirlenen en yüksek sinerjizm gösteren ilk 4 kombinasyonun, sinerjistik etkilerinin apopitozise bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere Cell Death Detection Kit (Roche) kullanılarak kantitatif ölçüm yapıldı. Sonuçlar Grafik 7'te gösterildi.



Grafik 7: AT-101 ve paklitakselin tekli ve sinerjistik kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattında 72. saatteki apopitotik etkileri

AT-101 ve paklitaksel ayrı ayrı uygulandığında, her iki ilaçla da doza bağlı olarak apopitotik etkide bir artış gözlemlendi.

1.5 µM AT-101 uygulanması sonucu %39 oranında bir apopitotik etki saptanırken, 2 µM ve 2.5 µM AT-101 uygulanmasıyla sırasıyla %44 ve %47 oranında apopitotik etki elde edildi.

5 µM ve 7.5 µM paklitaksel uygulanmasıyla sırasıyla %70 ve %80 gibi yüksek oranlarda apopitotik etki elde edildi.

Elde edilen sinerjistik kombinasyonların her birinde, ilaçların tek başlarına sebep oldukları apopitozisten daha fazla miktarda apopitozis saptandı.

1.5 µM AT-101 ve 5 µM paklitakselin kombine uygulanmasıyla %76 oranında apopitotik etki elde edilirken, 2.5 µM AT-101 ve 5 µM paklitakselin kombine uygulanmasıyla % 82 oranında apopitotik etki gözlemlendi.

2.5 μM AT-101 ve 7.5 μM paklitakselin kombine uygulanmasıyla % 87'lik apopitotik etki sağlanırken, 2 μM AT-101 ve 7.5 μM paklitakselin kombine uygulanmasıyla ise %88 oranında apopitotik etki elde edildi.

AT-101 ve paklitaksel kombinasyonunun sinerjistik dozlarındaki apopitotik etkinliği, tekli kullanıma göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdi. ($p < 0.05$)

TARTIŞMA

Taksanlar hem erken evre, hem de metastatik meme kanseri tedavisinde standart tedavide yer alan ajanlardır. Ancak metastatik olgularda bir süre sonra taksanlara gelişen direnç özellikle metastatik hastalığın tedavisinde bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle yeni ajanların ve ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır.

Yapılan çalışmalarda gossypol'ün meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde potent bir anti-kanser ajan olduğu gösterilmiştir (120). İn-vivo çalışmalarda ise çok düşük yan etki profili gözlenen gossypol'ün, meme kanserinde kullanılan kemoterapi ajanlarıyla kombinasyonu uygun olabilir.

Bu çalışmada, meme kanseri hücre hatlarında gossypol ile paklitakselin farklı dozlarda kombinasyonlarının olası sinerjistik sitotoksik ve apopitotik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada gossypol'ün en potent formu olan AT101 [(-)- gossypol] kullanılmıştır.

Çalışmada, paklitaksel ve AT-101'in giderek artan konsantrasyonlarının 24., 48. ve 72. saatteki sitotoksik etkilerine bakılmış ve en yüksek sitotoksikite sırasıyla 20 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarda, 72. saatte gözlenmiştir. Böylece, hem paklitakselin hem de AT-101'in MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin doz ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamalarla, paklitakselin IC_{50} değeri 8.70 μM olarak belirlenirken, AT-101'in IC_{50} değeri 4.85 μM olarak saptanmıştır (Grafik 2 ve 4).

MCF-7 hücre hatlarında paklitaksel ve AT-101'in değişen konsantrasyonlarda doza ve zamana bağlı olarak artan sitotoksisite verileri elde edildikten sonra, bu ilaçların klinik kullanıma uygun ve IC₅₀ değerlerinin altındaki konsantrasyonlar seçilerek kombinasyonlar oluşturulmuş ve 72. saatteki kombinasyonunun sitotoksisite oranına bakılmıştır (Grafik 5). Değişik oranlarda kombinasyonların MCF-7 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CalcuSyn programına girilerek kombinasyonların CI (Kombinasyon İndeks) değerleri hesaplandı. Araştırılan yedi adet kombinasyondan 6 tanesinde sinerjizm, bunların ikisinde kuvvetli sinerjizm ve 1 tanesinde de additif etki gözlenmiştir (Tablo 4). En yüksek sinerjizm gösteren ilk dört kombinasyonun, sinerjistik etkilerinin apoptozise bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere Cell Death Detection Kit (Roche) kullanılarak kantitatif ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sinerjistik kombinasyonların her birinde, ilaçların tek başlarına sebep oldukları apoptozisten daha fazla miktarda apoptozis saptandı. AT-101 ve paklitaksel kombinasyonun sinerjistik dozlarındaki apoptotik etkinliği, tekli kullanıma göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (p<0.05).

Paklitaksel ve AT-101 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattındaki apoptotik etkilerinin ikinci kez gösterilmesi için Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit (Molecular Probe Inc., OR) kullanılarak test yapıldı ve floresan mikroskop kullanılarak dijital fotoğraflar çekildi. Bu yöntemde, canlı normal hücre çekirdekleri normal yapıda ve parlak yeşil renkte; canlı apoptotik hücrelerin çekirdekleri yoğunlaşmış veya fragmante yapıda ve parlak yeşil renkte; ölü normal hücrelerin çekirdekleri organize yapıda ve kromatinleri parlak turuncu renkte; ölü apoptotik hücrelerin çekirdekleri ise yoğunlaşmış veya fragmante yapıda ve kromatinleri parlak turuncu renkte görünmektedir (şekil 6A ve 6B).

Literatürde, gossypol ile çeşitli kemoterapötik ajanlar kombine edilmiş ve aralarında sinerjistik etki saptanmıştır. Örneğin, Li et al. tarafından non-Hodgkin's lenfoma (NHL) hücre

hattında yapılan bir çalışmada gossypol'ün kemoterapötiklerle sinerjistik etkinliği gösterilmiş ve ajan umut vaad edici bir tedavi olarak ortaya konmuştur. Pek çok farklı kemoterapötik ajanla kombine kullanılan gossypol'ün etoposid, doksorubisin, vinkristin ve paklitakselle kombinasyonunda apoptoziste belirgin artış görülmüşken gossypol-sisplatin kombinasyonunda antagonistik etki saptanmıştır (121). Bu çalışmada ise gossypol-paklitaksel kombinasyonunun insan meme kanseri hücre hattında sinerjistik etkiyle belirgin sitotoksiste yaptığı gözlenmiştir.

Her hücre hattının kendine özgü moleküler özelliklere sahip olmasına ve deney koşullarının farklı olmasına rağmen, çalışmamızda kullanılan paklitaksel/AT-101 kombinasyonu da meme kanseri hücre hattında, NHL hücre hattında olduğu gibi sinerjistik sitotoksiste ve apoptozise yol açmıştır.

AT-101 ve paklitaksel kombinasyonu, çoklu ilaç direncinin sıklıkla gözleendiği meme kanseri tedavisinde yeni ve alternatif bir seçenek olabilir. Bu nedenle sinerjistik kombinasyon oranlarına bağlı olarak ortaya çıkan sitotoksik ve apoptotik etkilerin diğer meme kanseri hücre hatlarında doğrulanması; etki mekanizmalarının aydınlatılması ve bu verilerin gerek hayvan deneylerinde gerekse faz çalışmalarıyla doğrulanması gerekmektedir.

Paklitakselin sitotoksiste mekanizmalarından birinin apoptozis olduğu ilk kez 1993 yılında insan lenfositler lösemi hücrelerinde gösterilmiştir (62). Paklitakselin indüklediği sitotoksiste ve apoptozis arasındaki pozitif korelasyon in vivo olarak da gösterilmiştir (63).

Paklitaksel anti-mikrotübül bir ajandır. Hücrede tubülün depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübülleri stabilize eder; DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olur. Hücre siklusunu G2/M fazında durdurup apoptozisi tetikler ve sitotoksisteye neden olur. Paklitakselin mikrotübüllere bağlanarak apoptozisi başlattığı biyokimyasal yolak tam olarak anlaşılamamıştır. Son yapılan çalışmalarda paklitakselin bazı sinyal molekülleri ve gen ürünleri aracılığıyla apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir:

P53 mutasyonu olan tümörlerin paklitaksele daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (64). Kanserlerin %60'ından fazlasında p53 mutasyonu olduğu düşünülürse kemoterapide paklitakselin avantajı anlaşılmaktadır. P53 tarafından aktive edilen p21(WAF1/CIP1) hücreyi mitotik arrestten çıkarır. P21 yokluğunda paklitakselle tedavi edilen tümör hücreleri mitotik arrest fazında kalır ve apoptozise gider.

Paklitakselin indüklediği apoptozis Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından da regüle olmaktadır. Paklitaksel anti-apoptotik Bcl-xl ekspresyonunu azaltıp, apoptotik Bak ve Bax ekspresyonunu artırmaktadır. Paklitakselin Bcl-2 fosforilasyonunu artırarak apoptozisi indüklediği düşünülmektedir (65).

Paklitaksele bağlı apoptozis, p34(CDC2), CDC2-like kinaz ve diğer siklin bağımlı kinazların (CDC) aktivasyonu ile da ilişkilidir. Son çalışmalarda siklin bağımlı kinazların apoptoziste temel rol oynadıkları ve paklitakselin indüklediği apoptozis ile p34(CDC2) aktivasyonu arasında yakın bir ilişki olduğu gösterilmiştir (66). Fakat p34(CDC2) aktivasyonunun mitotik arrestin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu hala netlik kazanmamıştır.

JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stres-activated protein kinase), MAPK (mitogen-activated protein kinase) ailesinin bir alt grubudur ve sıklıkla apoptozis ile ilişkilidir (67). Paklitaksel Ras ve ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) bağımlı sinyal iletim yolları aracılığıyla JNK/SAPK'yı aktive edip apoptozise yol açmaktadır (68).

Kobay hücre hattında yapılan bir çalışmada yüksek dozda (30 mM) paklitaksel uygulanması makrofajlardan TNF-alfa (apoptozis ile ilişkili sitokin) salınmasına neden olmuştur (68). Bu doz klinik kullanım için uygun olmasa da, bu gözlem paklitakselin hücre üzerinde multipl etkilerinin olduğunu göstermiştir.

İnsan meme kanseri hücre hattında (MCF-7) gossypol'ün antiproliferatif etkisi TGFβ-1 (transforming growth factor β -1) ve protein tirozin fosfataz-gamma ekspresyonu ve ayrıca

retinoblastoma geni (Rb) ve siklin-D1 ekspresyonunun down-regülasyonu ve Rb defosforilasyonu ile gerçekleşmektedir. 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 süpresör proteindir. Ancak tümör hücrelerinde, östrojenik bileşikler ile ‘down-regüle’ olur. Non-fosforile Rb, transkripsiyon faktörü E2F (elongasyon faktör 2)’ye bağlanıp inaktive ederek DNA sentezini baskılar. Siklin D1 ile CDK4/6 (siklin bağımlı kinaz)’nın oluşturduğu kompleks ile Rb geninin fosforilasyonu sonucunda, hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Meme kanseri hücrelerinde Rb geni bozulmuştur ve nükleer protein siklin D1 aşırı eksprese olmaktadır. (-)- gossypol (AT101)’in, meme kanseri hücrelerinde TGF β -1 (transforming growth factor β -1) ve protein tirozin fosfataz–gamma ekspresyonunu, (+)- (rasemik) gossypol’e göre daha etkin stimüle ettiği gösterilmiştir (100).

Gossypol’ün apopitotik etkilerinin, anti-apopitotik olan Bcl-2 ailesinin inhibisyonu ve mitokondrial kaspaz yolları ile etkileşmesi ile ortaya çıktığı gözlenmiştir. Gossypol, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin BH-3 kısmına bağlanarak, bu proteinlerin etkilerini antagonize etmektedir (101). 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 apopitozisin selektif olarak indüklendiği gösterilmiştir (102). İnsan lenfoma hücrelerinde de tek başına veya standart kemoterapi rejimi ile beraber uygulanan gossypol, apopitozisi indükleyerek kemoterapinin etkinliğini artırmıştır (103). Diğer bir çalışmada radyoterapi ile beraber prostat kanseri hücrelerinde tümör progresyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Gossypol Bcl-2 inhibisyonunun dışında, mitokondrial diferansiyasyon yolundaki apopitotik kaspaz 8’i aktive eder. Kaspaz 8 aktivasyonu ile Sitokrom C’nin mitokondriden sitozole salınımı

gerçekleşir ve buradan apoptotik efektörler olan kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozis indüklenir (104). Bu çalışmaların dışında, insan alveoler akciğer kanseri hücrelerinde gossypol ile fas/fas L (fas ligand) apoptotik yolunun da aktive olduğu gösterilmiştir (105).

Sonuç olarak, yapılan tüm çalışmalara rağmen gossypol ve paklitaksel kombinasyonu sonucu oluşan sinerjistik etkinin mekanizmaları hala tam anlamıyla açıklık kazanamamıştır. Çalışmamızda, AT-101 ve paklitaksel kombinasyonun güçlü sitotoksik ve apoptotik etkileri olduğu gösterilmiş olup, bu sonuçlar daha önce yapılan benzer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler ve kullanılan ilaçların apoptozis mekanizmaları göz önüne alındığında, her iki ilacın da MCF-7 hücre hattında, anti-apoptotik Bcl-2 aktivasyonunu baskılayarak apoptozisi indükledikleri düşünülebilir. Bu iki ajanın düşük dozlarda sinerjistik etki göstermeleri, klinik kullanımda hem etkinliği artırabilecek hem de yan etki profilini azaltabilecektir. Paklitaksel ve AT-101 kombinasyonu özellikle tedaviye refrakter, ilaç direnci gelişmiş olan metastatik meme kanserli olgularda potansiyel bir kombinasyon olabilir. AT-101'in klinik kullanıma girebilmesi için ileri araştırmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Haris J et al (eds): Diseases of the breast.2d ed.philadelphia, Lippincott-Raven 1999
2. Ernster VL, Ballard-Barbash R, Barlow WE, *et al.* (October 2002). "Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography". Journal of the National Cancer Institute 94 (20): 1546–54.
3. Sakorafas GH, Farley DR, Peros G. Recent advances and current controversies in the management of DKİS of the breast. Cancer Treat Rev 2008; doi: 10.1016/j. ctrv. 2008.03.001 (PMID:18490111)
4. Collins LC, Tamimi RM, Baer HJ, Connolly JL, Colditz GA, Schnitt SJ. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy. Cancer 2005;103: 1778–1784. (PMID: 15770688)
5. Foote FW Jr, Stewart FW. Lobular carcinoma in situ: a rare form of mamary cancer.Am J Pathol 1941;17:491-496
6. Abner, AL, Connolly, JL, Recht, A, et al. The relation between the presence and extent of lobular carcinoma in situ and the risk of local recurrence for patients with infiltrating carcinoma of the breast treated with conservative surgery and radiation therapy. Cancer 2000; 88: 1072.
7. Yeatman, TJ, Cantor, AB, Smith, TJ, et al. Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. İmplications for management. Ann Surg 1995; 222:549
8. Pestalozzi, BC, Zahrieh, D, Mallon, E, et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. J Clin Oncol 2008; 26:3006.
9. Ferlicot, S, Vincent-Salomon, A, Medioni, J, et al. Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. Eur J Cancer 2004; 40:336.

10. Holland, DW, Boucher, LD, Mortimer, JE. Tubular breast cancer experience at Washington University: a review of the literature. *Clin Breast Cancer* 2001; 2:210.
11. Li, CI, Uribe, DJ, Daling, JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:1046.
12. Armes, JE, Venter, DJ. The pathology of inherited breast cancer. *Pathology* 2002; 34:309.
13. Vu-Nishino, H, Tavassoli, FA, Ahrens, WA, Haffty, BG. Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breast-conserving therapy (BCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62:1040.
14. Walsh, MM, Bleiweiss, IJ. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an underrecognized entity. *Hum Pathol* 2001; 32:583.
15. Tavassoli, FA. Classification of metaplastic carcinomas of the breast. *Pathol Annu* 1992; 27 Pt 2:89.
16. Pezzi, CM, Patel-Parekh, L, Cole, K, et al. Characteristics and treatment of metaplastic breast cancer: analysis of 892 cases from the national cancer data base. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:166.
17. Arpino, G, Clark, GM, Mohsin, S, et al. Adenoid cystic carcinoma of the breast: molecular markers, treatment, and clinical outcome. *Cancer* 2002; 94:2119.
18. Bijker, N, Rutgers, EJ, Duchateau, L, et al. Breast-conserving therapy for Paget disease of the nipple: a prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer study of 61 patients. *Cancer* 2001; 91:472.
19. Anderson, WF, Chu, KC, Chang, S. Inflammatory breast carcinoma and noninflammatory locally advanced breast carcinoma: distinct clinicopathologic entities?. *J Clin Oncol* 2003; 21:2254.
20. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747–752.

21. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869 –10874.
22. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-5374.
23. Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2329 –2334.
24. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 6th ed, Grene, FL, Page, DL, Fleming, ID, et al (Eds), Springer-Verlag, New York, 2002. Pp.223-240
25. Berry, DA, Cirincione, C, Henderson, IC, et al. Estrogen receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA* 2006; 295:1658.
26. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines available online at www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.asp).
27. Goldhirsch, A, Wood, WC, Gelber, RD, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18:1133.
28. Harris, L, Fritsche, H, Mennel, R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287.
29. Schwartz, GF, Solin, LJ, Olivotto, IA, et al. Consensus Conference on the Treatment of In Situ Ductal Carcinoma of the Breast, April 22-25, 1999. *Cancer* 2000; 88:946.
30. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines available online at www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.asp).

31. Goldhirsch, A, Wood, WC, Gelber, RD, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18:1133
32. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687.
33. Albain, K, Green, S, Ravdin, P, et al. Overall survival after cyclophosphamide, adriamycin, 5FU and tamoxifen is superior to tamoxifen alone in postmenopausal, receptor (+), node (+) breast cancer: New findings from phase III Southwest Oncology Group Intergroup trial S8814 (INT-0100) (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20:24a.
34. Harris, L, Fritsche, H, Menzel, R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287.
35. Seidman, AD, Reichman, BS, Crown, JP, et al. Paclitaxel as second and subsequent therapy for metastatic breast cancer: activity independent of prior anthracycline response. *J Clin Oncol* 1995; 13:1152.
36. Schwartz, GF, Hortobagyi, GN. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26-28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer* 2004; 100:2512.
37. Harris, L, Fritsche, H, Menzel, R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287.
38. Martin, M, Rodriguez-Lescure, A, Ruiz, A, et al. Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by paclitaxel for early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:805.

39. Heys, SD, Sarkar, T, Hutcheon, AW. Primary docetaxel chemotherapy in patients with breast cancer: impact on response and survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90:169.
40. Schwartz, GF, Hortobagyi, GN. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26-28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer* 2004; 100:2512.
41. Brito, RA, Valero, V, Buzdar, AU, et al. Long-term results of combined-modality therapy for locally advanced breast cancer with ipsilateral supraclavicular metastases: The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol* 2001; 19:628.
42. 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.
43. Stadtmauer, EA, O'Neill, A, Goldstein, LJ, et al. Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem-cell transplantation for metastatic breast cancer. Philadelphia Bone Marrow Transplant Group. *N Engl J Med* 2000; 342:1069.
44. 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.
45. Hillner, BE, Ingle, JN, Berenson, JR, et al. American Society of Clinical Oncology Guideline on the Role of Bisphosphonates in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:1378.
46. Lin, NU, Winer, EP. Brain metastases: The HER2 paradigm. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1648.

47. Bendell, JC, Domchek, SM, Burstein, HJ, et al. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97:2972.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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 (abstract). Data presented at the 29th annual San Antonio Breast Cancer Symposium, December 15, 2006.
52. Lord, CJ, Ashworth, A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8:363.
53. Perez, EA, Vogel, CL, Irwin, DH, Kirshner, JJ. Multicenter Phase II Trial of Weekly Paclitaxel in Women With Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:4216.
54. Seidman, AD, Berry, D, Cirincione, C, et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2

- nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. *J Clin Oncol* 2008; 26:1642.
55. Verrill, MW, Lee, J, Cameron, DA, et al. Anglo-Ceptic IV: First results of a UK National Cancer research Network randomized phase III pharmacogenetic trial of weekly compared to 3 weekly paclitaxel in patients with locally advanced or metastatic breast cancer (abstract). *J Clin Oncol* 2007; 25:33s.
56. Loffler, TM. Is there a place for "dose-dense" weekly schedules of the taxoids?. *Semin Oncol* 1998; 25:32.
57. Alba, E, Martin, M, Ramos, M, et al. Multicenter Randomized Trial Comparing Sequential With Concomitant Administration of Doxorubicin and Docetaxel As First-Line Treatment of Metastatic Breast Cancer: A Spanish Breast Cancer Research Group (GEICAM-9903) Phase III Study. *J Clin Oncol* 2004; 22:2587.
58. Albain, KS, Nag, SM, Calderillo-Ruiz, G, et al. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *J Clin Oncol* 2008; 26:3950.
59. Chan, S, Romieu, G, Huober, J, et al. Gemcitabine plus docetaxel (GD) versus capecitabine plus docetaxel (CD) for anthracycline-pretreated metastatic breast cancer patients: results of a European phase III study (abstract). *J Clin Oncol* 2005; 23:24s.
60. Miller, K, Wang, M, Gralow, J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 357:2666.
61. Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783.

62. Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahohey ME, Huang Y. Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1993;7:563-8.
63. Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L. Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1308-14.
64. Vikhanskaya F, Vignati S, Beccaglia P, Ottoboni C, Russo P, D'Incalci M, et al. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp Cell Res* 1998;241:96-101.
65. Blagosklonny MV, Giannakakou P, el-Deiry WS, Kingston DG, Higgs PI, Neckers L, et al. Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 1997;57:130-5.
66. Harvey KJ, Blomquist JF, Ucker DS. Commitment and effector phases of the physiological cell death pathway elucidated with respect to Bcl-2 caspase, and cyclin-dependent kinase activities. *Mol Cell Biol* 1998;18:2912-22.
67. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.
68. Lanni JS, Lowe SW, Licitra EJ, Liu JO, Jacks T. p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9679-83.
69. Jaroszewski JW, Storm-Hansen T, Hansen SH, Thastrup O, Kofod H. On the botanical distribution of chiral forms of gossypol. *Planta Med* 1992; 58:454-458
70. Enwards JD. Total synthesis of gossypol. *J Am Chem Soc* 1958; 80:3798-3799
71. Coutinho EM. Gossypol. *Drug* 1989; 65:259-263

72. Freedman TB, Cao X, Oliviera RV, Cass QB, Nafie L. Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichorism. *Chirality* 2003; 15: 196-200
73. Brzezinski B, jerszy O, Paszyc S, Aripov TF. H NMR studies of gossypol and its complexes with some organic compounds. *J Mol Struct* 1990;220: 261-268
74. 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;135:171–180
75. 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;50:6936-6943
76. 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): 7757-7763
77. Shelley MD, Harley L., Groundwater PW. Structureactivity studies on gossypol in tumour cell lines. *Anticancer Drug* 2000; 11(3): 209-216
78. 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 ;76:1019–1024
79. 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
80. 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: 239-248

81. Dodou K, Anderson RJ, Lough WJ. Synthesis of gossypol atropisomers and derivatives and antioxidant and their antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem* 2005; 13 (13): 4228-4237
82. Razakantoanina RJ, Deck LM, Phung NKP, Jaureguiberry G. Antimalarial activity of new gossypol derivatives. *Parasit. Res* 2000;86:665-668
83. 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 : 144-145
84. 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: 3335-3342
85. Burgos C, Gerez De Burgos NM, Rovai LE, Blanco A. In vitro inhibition by gossypol of oxidoreductases from human tissues. *Biochem Pharmacol* 1986; 35(5): 801-804
86. Yu Y, Deck A, Hunsaker LA. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 81-89
87. 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
88. Vainio P, Thuren T, Wichman K. Hydrolysis of phospholipids monolayers by human spermatozoa. Inhibition by male contraceptive gossypol. *Biochim Biophys Acta* 1985; 814(2): 405-408
89. Teng CS. Gossypol-induced apoptotic DNA fragmentation correlates with inhibited protein kinase C activity. *Contraception* 1995; 52: 389-395
90. 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: 286-291

91. 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 compaound gossypol. *Enzymology and molecular biology of Carbonyl metabolism* 1996; 6: 133-146
92. Benz CC, Keniry MA, Ford JM. Biochemical correlates of the antitumour and antimitochondrial properties of gossypol enantiomers. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 840-847
93. Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelositic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 1994; 54(7): 1707-1714
94. Mego M. Telomerase inhibitors in anticancer therapy: gossypol as a potential telomerase inhibitor. *Bratis Lek Listy* 2002; 103(10): 378-381
95. Hiipakka RA, Zhang HZ, Daiw W. Structure-activity relationship for inhibition human 5-alpha -reductases by polyphenols. *Biocem Pharmacol* 2002; 63: 1165-1176
96. Reidenberg MM. environmental inhibition of 11 β - hydroxysteroid dhydrogenase. *Toxicology* 2000; 144: 107-111
97. Kawanishi K, Ueda H, Moriyasu M. Aldose reductase inhibitors from the nature. *Med Chem* 2003; 10(15): 1353-1374
98. Baumgrass R, Weiwad M, Erdmann F. Reversible inhibition if calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. *J Biol Chem* 2001; 276(51): 47914-47921
99. Olgiati KL, Toscano DG, Atkins WM, Toscano WA. Gossypol inihbition of adenylate cyclase. *Arch Biochem Biophys* 1884; 231(2): 411-415
100. 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

101. Kitada S, Leone M, Sareth S. Discovery, characterisation and structure activity relationship studies of proapoptotik polyphenols targetting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem* 2003; 46(20): 4259-4264
102. 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
103. 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
104. 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
105. 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
106. 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
107. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1409–1416.
108. Kurebayashi J, McLeskey SW, Johnson MD, Lippman ME, Dickson RB, Kern FG. Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and LacZ. *Cancer Res* 1993;53:2178–2187
109. Watanabe N, Okochi E, Mochizuki M, Sugimura T, Ushijima T. The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2001;61:7739–7742.

110. Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer* 1999;82:396–404
111. Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu YJ, Little JB. Absence of a radiation-induced first-cycle G(1)-S arrest in p53(+) human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Res* 1998;58:2036–2041.
112. Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer* 1999;82:396–404.
113. Rait AS, Pirollo KF, Rait V, Krygier JE, Xiang LM, Chang EH. Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer. *Cancer Gene Ther* 2001;8:728–739
114. Sutherhland RL, Watts CKW, Lee CSL, Musgrove EA. Breast cancer. In: Masters JRW, Palsson B, editors. *Human cell culture. Vol. II. Cancer cell lines. Part 2.* Boston: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 79–106.
115. Botos J, Barhoumi R, Burghardt R, Kochevar DT. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002;38:235–241
116. Chou, T.C. and Hayball, M.P. 1996. *CalCusyn Windows Software for Dose Effect Analysis*, Biosoft, Cambridge, MA
117. 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.
118. Chou, T.C.,and Talalay P, 1984. Quantitative analysis of dose effect relationships : the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55
119. Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T.A., Schwarz, T. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J.Cell.Biol.*, 140:171-182, 1998.
120. 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.
121. Li ZM, Jiang WQ, Zhu ZY et al. Synergistic cytotoxicity of Bcl-xL inhibitor gossypol and chemotherapeutic agents in non- Hodgkin’s lymphoma cells. *Cancer Biol Ther* 2008; 7:51-60.