

**T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ HÜCRE SERİLERİNDE TAMOKSİFEN VE
ZOLEDRONİK ASİD KOMBİNASYONLARININ
ANTİNEOPLASTİK ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Ali GENÇASLAN**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Emin Tamer ELKIRAN**

**ELAZIĞ
2008**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

Dekan

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ayhan DOĞUKAN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden

Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emin Tamer ELKIRAN

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Emir DÖNDER

Doç. Dr. Ayhan DOĞUKAN

Doç. Dr. Yusuf ÖZKAN

Doç. Dr. Emin Tamer ELKIRAN

Yrd. Doç. Dr. Bilge AYGİN

Bu tez Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim birimi başkanlığı tarafından 1657 numaralı proje ile desteklenmiştir

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda değerli bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Ayhan Doğukan ve bütün hocalarıma, tezimin tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran, her konuda destek olarak yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Emin Tamer Elkıran' a, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet Ayar, Sayın Dr. Süleyman Sandal ve Sayın Dr. Mete Özcan' a, tezimin hazırlanması ve istatistiksel analizinin yapılmasında yardımlarının esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Saim Yoloğlu ve Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yunus Karakoç' a, dostluk ve yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma, beni yetiştiren anne ve babama, eşim Gülay ve oğlum Ege Berk' e içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bifosfonatlar, meme kanserine bağılı kemik metastazlarının tedavisinde kullanılan ajanlardır. Son çalışmalarda bu bileşiklerin kemik meteastazı gelişimini önlemede de etkili olduğunu gösterilmiştir. Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre serilerinden 24, 48, 72. saatlerde incelenmek üzere ajan verilmeyen kontrol grubu, zoledronik asid 1, 10, 100 $\mu\text{M/L}$, tamoksifen 10, 100 nM/L konsantrasyonları ile zoledronik asid ve tamoksifen kombinasyonlarının verildiğı gruplar oluşturuldu. Zoledronik asid ve tamoksifen ile kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre serileri üzerine olabilecek etkileri *inverted* mikroskop yardımıyla hücrelerin sayısı tespit edilerek belirlendi.

Zoledronik aside maruziyet MCF-7 hücre sayıları üzerinde ilk 24 saatte yeterli ve anlamlı bir azalmaya neden olmadı. Fakat MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde 10 μM zoledronik asid konsantrasyonu ile 48 ve 72. saatlerde sırasıyla hücrelerin % 13 ve % 25' i ölürken, 100 μM konsantrasyonda bu oranlar % 16 ve % 52 idi. Zoledronik asid doz ve zaman bağımlı olarak hücre sayılarında azalmaya neden oldu. MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde zoledronik asidin 100 $\mu\text{M/L}$ ve tamoksifenin 100 nM/L konsantrasyonlardaki kombinasyonu 48 ve 72. saatlerde hücre sayılarında sırasıyla % 28 ve % 63 azalmaya neden oldu ($p=0.0000007$).

Bu çalışma zoledronik asidin *invitro* olarak MCF-7 meme kanseri hücre serileri üzerine antitümör etkinliğı olduğunu ve yaygın kullanılmakta olan antineoplastik ajanlardan tamoksifenin antitümör etkinliğini arttırdığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, zoledronik asid, tamoksifen.

ABSTRACT

Bisphosphonates are well established in the management of breast-cancer induced bone disease. Recent studies have suggested that these compounds are effective in preventing the development of bone metastases. In this study using substance 1, 10, 100 $\mu\text{M/L}$ concentration of zoledronic acid, 10, 100 nM/L concentration of tamoxifen and zoledronic tamoxifen combinations groups were established out of MCF-7 cell line to be examined at 24th, 48th and 72nd hours. The effects of zoledronic acid, tamoxifen and combinations were determined by assessing cell number using a inverted microscopy.

Zoledronic acid was not sufficient to cause a significant reduction in cell number in 24 hours. At 10 $\mu\text{M/L}$ concentration of zoledronic acid decrease in cell number 13 % and 25 % of cells after 48 and 72 hours of incubation respectively whereas these rates were 16 % and 52 % at 100 $\mu\text{M/L}$ concentration of zoledronic acid respectively. The cytotoxic effect of zoledronic acid increases with dose and incubation time. Combination with 100 $\mu\text{M/L}$ concentration of zoledronic acid and 100 nM/L concentrations of tamoxifen decrease in cell number 28 % and 63 % after 48 and 72 hours of incubation respectively ($p=0.0000007$).

These data suggest that zoledronic acid has a direct anti-tumour activity on breast cancer cells in vitro and potentiates the anti-tumour effects of commonly used antineoplastic agent tamoxifen.

Keywords: breast cancer; zoledronic acid; tamoxifen.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Epidemiyoloji	3
1.1.2. Etyoloji	3
1.1.2.1. Genetik Faktörler	3
1.1.2.2. Edinsel Faktörler	4
1.1.2.3. Diğer Risk Faktörleri	4
1.1.3. Meme Kanserinde Evreleme	5
1.1.4. Meme Kanserinin Doğal Seyri	8
1.1.5. Meme Kanseri Yayılım Yolları	9
1.1.5.1. Lenfatik Yayılım	9
1.1.5.2. Hematojen Yayılım	9
1.1.6. Klinik	9
1.1.7. Meme Kanserinin Tanısı	10
1.1.7.1. Radyolojik Tanı ve Değerlendirme	10
1.1.7.2. Tanıya Yönelik İnvaziv Girişimler	12
1.1.7.3. Tanıda Yardımcı Diğer Yöntemler	12
1.1.8. Meme Kanseri Alt Tipleri	12
1.1.8.1. İnvaziv Duktal Karsinom	12
1.1.8.2. İnvaziv Lobuler Karsinom	13
1.1.9. Meme Karsinomunda Prognostik Faktörler	13
1.1.9.1. Lenf Nodu Metastazı	13
1.1.9.2. Tümör Boyutu	13
1.1.10.3. Histolojik Grade	14

1.1.9.4.	Tümörün Histolojik Tipi	14
1.1.9.5.	Lenfovasküler İnvazyon	14
1.1.9.6.	Nottingham Prognostik İndeksi	14
1.1.9.7.	Östrojen ve Progesteron Reseptörleri	15
1.1.9.8.	HER2/neu (cErbB-2, p185)	15
1.1.9.9.	Bcl-2	15
1.1.9.10.	Yaş	15
1.1.10.	Meme Kanseri Tedavisi	16
1.1.10.1.	Evre I, IIA, IIB, T3N1M0 İnvazif Meme Kanseri Lokal Tedavi	16
1.1.10.2.	Evre IIA, IIB, T3N1M0 Tümörlerde Preoperatif Kemoterapi	18
1.1.10.3.	Evre III İnvazif Meme Kanseri	19
1.1.10.4.	Başlangıç Tedavisi Olarak İnoperable Olgular (T3N1M0 hariç Klinik IIIA, IIIB veya İnflamatuvar)	19
1.1.10.5.	Metastatik Meme Kanseri ve Tedavisi	20
1.1.10.6.	Zoledronik Asid	21
1.1.10.7.	Tamoksifen	23
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1.	Gereç	24
2.1.1.	MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serileri	24
2.1.2.	Kimyasal Maddeler	24
2.1.3.	Malzemeler	24
2.1.4.	Aygıtlar	25
2.2.	Yöntem	25
2.2.1.	Sterilizasyon	25
2.2.2.	Hücre Kültürü	25
2.2.3.	Medyum ve Diğer Çözeltilerin Hazırlanması	26
2.2.3.1.	Kültür Medyumunun Hazırlanması	26
2.2.3.2.	Tripsin Hazırlanması	26
2.2.3.3.	Fosfat Buffer Solüsyonu Hazırlanması	26
2.2.4.	MCF-7 Hücre Serilerinin Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi	26

2.2.5.	Hücrelerin Test Edilecek Ajanlar İçin Hazırlanması	27
2.2.6.	Deney Düzenekinin Oluşturulması	27
2.2.7.	İstatistiksel Değerlendirme	28
3.	BULGULAR	29
3.1.	Zoledronik Asidin MCF-7 Meme Kanseri Hüce Serisi Üzerine Etkisi	31
3.2.	Zoledronik asid ve Tamoksifen Kombinasyonunun MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Etkisi	32
4.	TARTIŞMA	35
5.	KAYNAKLAR	40
6.	ÖZGEÇMİŞ	52

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Meme Kanserinde Cerrahi TNM Evreleme Sistemi	5
Tablo 2.	Meme Kanseri Klinik TNM Evreleme Sistemi	8
Tablo 3.	Meme Kanseri Histopatolojik Sınıflaması (WHO)	12
Tablo 4.	Histolojik Tiplere Göre Görülme Sıklığı	13
Tablo 5.	Modifiye Bloom-Richardson Sistemi	14
Tablo 6.	Nottingham Prognostik İndeksine Göre Prognostik Gruplar	15
Tablo 7.	Tamoksifen ve Zoledronik Asidin Farklı Doz ve Kombinasyonları ile Çözücülerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Zaman Bağımlı Etkileri	30
Tablo: 8.	Zoledronik Asid ve Tamoksifenin Farklı Konsantrasyonlarının ve Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Serileri Üzerine Olan Etkilerinin Pearson Ki Kare Analizi ile Değerlendirilmesi	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serilerinin Görünümü	29
Şekil 2.	Zoledronik Asidin 100 µM/L Konsantrasyonun 72. saatte MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Etkisi	29
Şekil 3.	Tamoksifen ve Zoledronik Asidin Farklı Doz ve Kombinasyonları ile Çözücülerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Zaman Bağımlı Etkileri	30
Şekil 4.	Zoledronik Asidin Farklı Konsantrasyonlarının Zaman Bağımlı MCF-7 Hücre Sayıları Üzerine Etkileri	31
Şekil 5.	Tamoksifen ve Zoledronik Asidin Farklı Dozlardaki Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Serileri Üzerine Olan Etkileri	32

KISALTMALAR

- AC:** Doksorubisin, Siklofosfamid
- ATAC:** Arimidex and Tamoxifen Alone or Combination
- BCL-2:** Apoptozu Engelleyen Protein
- BRCA1:** Meme Kanseri Erken Başlangıç 1
- BRCA2:** Meme Kanseri Erken Başlangıç 2
- CAF:** Siklofosfamid, Doksorubisin, Fluorourasil
- CEF:** Siklofosfamid, Epirubisin, Fluorourasil
- CMF:** Siklofosfamid, Metotreksat, Fluorourasil
- DMEM:** Dulbeco's Modified Eagle Medium
- DMF:** Dimethylformamide
- DNA:** Deoksiribonükleik asid
- EC:** Epirubisin, Siklofosfamid
- EGF:** Epidermal Büyüme Faktör
- EGFR:** Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
- FAC:** Fluorourasil, Doksorubisin, Siklofosfamid
- FDA:** Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
- FEC:** Fluorourasil, Epirubisin, Siklofosfamid
- FSH:** Follikül Stimulan Hormon
- HER-2/neu:** İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Resptörü 2
- MCF 7:** Meme Kanseri Hücre Dizisi
- MDA-MB-231:** Meme Kanseri Hücre Dizisi
- NPI:** Nottingham Prognostik İndeksi
- NSABP:** Ulusal Adjuvan Meme & Barsak Cerrahisi Projesi
- PBS:** Fosfat Buffer Solüsyonu
- WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanserdir (1, 2). Meme kanseri kadınlarda görülen tüm kanserlerin dörtte birinden sorumludur. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerde akciğer kanseri ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı alır (2, 3). Normal meme dokusunun büyüme ve çoğalması genel olarak östrojen ve prolaktin hormonları tarafından düzenlenmektedir. Meme kanserinin ortaya çıkmasından ve ilerlemesinden öncelikle östrojenler sorumludur (4). Östrojen hücre içine girdikten sonra çekirdekteki östrojen reseptörüne bağlanır. Bunun sonucunda çeşitli büyüme faktörleri yapılır (5). Epidermal büyüme faktör (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü α (TGF α), epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile etkileşip tirozin kinazı aktive ederek meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna neden olur. Meme kanserinde önemli olan iki büyüme faktörü; TGF α ve β ' dir. TGF β meme kanseri serilerinde inhibitör etkiye sahiptir. Östrojen, östrojen reseptörü (+) hücrelerde büyümeyi uyaran faktörlerin yapımını artırırken TGF β gibi büyümeyi baskılayan faktörlerin yapımını azaltır. Antiöstrojenler ise uyarıcı büyüme faktörlerini azaltıp TGF β ' yı artırırlar (5).

Tamoksifen, nonsteroidal antiöstrojen grubu bir ilaç olup östrojen reseptörüne bağlanır ve östrojenin bağlanmasını yarışma yolu ile engeller. Tamoksifen-reseptör bileşiği nükleusa taşınarak nükleik asid fonksiyonlarını etkiler. Tümör DNA sentezi yavaşlar ve tümör tarafından sekrete edilen çeşitli büyüme faktörleri azalır, hücre proliferasyonu inhibe olur (6, 7). Meme kanserinde endokrin tedavinin temel prensibi tümör hücresinin östrojenlerin büyümeyi uyaran etkisinden yoksun bırakılmasıdır (3). Meme kanserinde endokrin tedaviye cevap alınabileceğinin en önemli göstergesi tümörde östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığıdır. İleri evre hastalıkta endokrin tedaviye cevap oranı, bir hormon reseptörü pozitif olan olgularda %33, her iki reseptörde pozitif olan olgularda ise % 50-70' tir (8). Endokrin tedaviye cevabı belirleyen diğer faktörler endokrin tedaviye önceden alınan cevap durumu, yumuşak doku ve kemik metastazı varlığı, uzun hastalıksız sağ kalım süresi, ileri yaş, iyi diferansiye tümör ve HER-2/neu negatifliğidir (9). Çok sayıdaki çalışma ile tamoksifenin meme kanser tekrarını, diğer memede karsinomu ve ölüm riskini azalttığı, küçük primer nod negatif hastalıktan metastatik hastalığa kadar meme

kanserinin çeşitli evrelerindeki olgularda hastalıksız sağkalım süresini arttırdığı gösterilmiştir (10).

İleri evre meme kanserli olguların % 80' den fazlasında kemik metastazları gelişmektedir (11). Osteoklast aracılı osteolizisin kuvvetli inhibitörleri olan bifosfonatlar kemik metastazlarının tedavisinde kullanılmaktadır (12-14). Bifosfonatların apopitotik ve antiproliferatif etkileri bazı tümör hücrelerinde gösterilmiştir (15). Klinik uygulamalarda bifosfonatlar metastatik kemik hastalığının tedavisinde endokrin ajanlarla sıklıkla kombine olarak kullanılmaktadır (16). İn vitro isobologram çalışmalarıyla zoledronik asidin gemesitabin ve fluvastatinin sitotoksik etkilerini arttırdığı kanıtlanmıştır (17). Potent bir antiresorbtif ilaç olan zoledronik asidin in vitro olarak kemik metastazı olmayan meme kanserli fare modellerinde kemoterapi ajanlarından doksorubisinin antitümör etkinliğini arttırdığı (18), kemik metastazlı meme kanseri olan fare modellerinde ise bifosfonatların kemikte tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (19). MCF 7 meme kanseri hücre serilerinde zoledronik asid ve paklitaksel kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde apoptozisi 4-5 kat arttırdığı ve isobologram analizi ile zoledronik asid ve paklitakselin sinerjistik etki oluşturduğu gösterilmiştir (20).

MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde in vitro olarak tamoksifenin, hücrelerin G0-G1 fazında akümülyasyonuna, G2-S ve M fazında ise azalmaya yol açarak etki ettiği gösterilmiştir (21-24). Tamoksifenin bu etkisi östrojen reseptörü pozitif MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde daha belirgindir (23).

Literatürde tamoksifen ve zoledronik asidin meme kanser hücrelerine in vitro olarak nasıl bir etkisinin olduğunu değerlendiren bir çalışma yapılmamıştır. Tamoksifen ve zoledronik asidin östrojen reseptörü pozitif MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde antineoplastik etkinliğinin sinerjistik ve/veya additif bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda tamoksifen ve zoledronik asidin östrojen reseptörü pozitif MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde antineoplastik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerinin % 14.1' inden sorumludur. Tüm dünyada tahmini yeni olgu sayısı 2007' de 1.3 milyondur. Olguların yarıdan fazlası endüstrileşmiş ülkelerdedir. 2007' de tüm dünyada yaklaşık 465.000 kansere bağlı ölüm ortaya çıkmıştır. 2010 yılında tüm dünyada 1.35 milyon yeni olgu beklenmektedir. 99/100.000 oranı ile en yüksek insidans Kuzey Amerika' dadır. Meme kanseri Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa' da Asya ve Afrika' ya göre 4-5 kat daha fazladır (2).

Amerika Birleşik Devletleri' nde kadınlarda 2008 yılında 182.460 meme kanseri olgusu bildirilmiş ve tüm kanserler içerisinde %26 oranı ile kadınlarda en sık görülen kanser olmuştur. 2008 yılında 40.480 ölüm ve % 15 oranıyla akciğer kanserlerinden sonra ikinci en sık, 20-59 yaş arası kadınlarda ise en sık ölüme neden olan kanser olmuştur (25).

Ülkemizde mevcut kayıt sisteminin yeterli olmaması nedeniyle kanser insidansı hakkında yeterli bilgi olmamakla birlikte, T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde de % 24.1 oranı ile kadınlarda görülen kanserler arasında ilk sırada yer almaktadır (26).

1.1.2. Etyoloji

Meme kanseri olan kadınların % 66' sında bilinen hiçbir risk faktörü yoktur (27). Çoğu olguda meme kanserinin etyolojisi bilinmez ancak pek çok predispozan faktör ileri sürülmüştür.

1.1.2.1. Genetik Faktörler

Tüm meme kanserlerinin % 5-10' u kalıtsaldır. Kalıtsal meme kanserlerinin tümü otozomal dominant ve çoğu bilateralidir (28). Meme kanserli olguların ailesinde sık olarak başka kanser olgularına rastlanır. Meme kanserli bir kadının kız kardeşi yada kızı hastalık açısından üç kat fazla risk taşımaktadır. Hem annesi hem kızkardeşi meme kanseri olan bir kadında ise risk 10 kat artmıştır. Annesinde menapoz öncesi bilateral meme kanseri görülen kadınların ortalama %50' sinde meme kanseri gelişme riski vardır (29). Meme kanseri kadınlarda erkeklere kıyasla 135 kat fazla görülmektedir (30).

Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers, Cowden, Muir Torre, Ataksi Telenjektazi sendromlarında meme kanseri riski artmaktadır (31-33). Tüm meme kanserli olguların yaklaşık yarısında EGFR' nin aşırı üretimi saptanır (34). EGFR ekspresyonunu özellikle invazif lobular karsinomlu olgularda belirgindir ve bu tip için prognostik belirteç olabileceği vurgulanmıştır (35).

HER2/Neu (cErb2, p185) onkogeninin kopya sayısının yüksek bulunuşu tümör şiddeti ile doğru orantılıdır (36, 37). Meme kanserlerinin üçte biri c-myc onkojeni taşır (38). H-ras gen mutasyonları nadir olmakla birlikte meme kanserinde %70' lik bir risk nedenidir (39, 40).

Apoptoz genleri olan Bcl-2 aşırı ekspresyonunun duktal meme karsinomlarında hastalığın ilerlemesi ile yakın ilişkisi saptanmıştır (41). BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer genom koruyucu rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (42, 43).

1.1.2.2. Edinsel Faktörler

Nulliparite (30), uzun süre kesintisiz menstural siklus, erken menarş, geç menapoz, ilk menstrüel dönemin 1. yılında düzenli menstrüel siklusların ortaya çıkması (44), menstural siklus düzensizliği (45), hormon replasman tedavisi (46, 47) gibi hormonal faktörler meme kanseri riskini artırır.

Özellikle erken yaşlarda iyonizan radyasyona maruziyet meme kanseri riskini arttırırken 40 yaşın üzerindeki maruziyetlerde risk artışı görülmez (48). Yüksek alkol bağımlılığı da meme kanseri riskini artırır (49, 50). Özellikle aile öyküsü olanlarda daha belirgin bir artış sözkonusudur (51).

1.1.2.3. Diğer Risk Faktörleri

Normal popülasyonla karşılaştırıldığında yüksek mammografik dansite oranına sahip kadınlarda meme kanseri riski 4 kat artmıştır (52). Atipik hiperplazi, özellikle 1. derece akraba aile öyküsü olanlarda riski dört kat arttırır. Eğer 1. derece akrabada meme kanseri öyküsünde varsa riski 8-12 kat arttırmaktadır (53). Endometriyal ya da over karsinomu öyküsü olan kadınlarda öyküsü olmayan kadınlara göre meme kanseri riski 2 kat artmıştır.

Daha önce meme kanseri öyküsü olanlar normal popülasyonla karşılaştırıldığında meme kanseri riski 5 kat artmıştır. Genç yaşta primer lezyon

tanısı ailede bilateral meme kanseri ve kalıtsal meme kanseri öyküsü olanlarda diğer memede kanser gelişme riski artmıştır (53).

1.1.3. Meme Kanserinde Evreleme

Meme Kanserinde TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tablo 1) (54).

TNM evreleme sisteminde tümörleri sınıflamak için kullanılan kriterler

T: Tümör boyutu

N: Aksiller lenf nodlarına yayılım

M: Uzak bölgelere yayılımı ifade etmektedir.

Daha önceden tanımlanan kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek TNM evresi hesaplanır. Tümör evresi meme kanserli olgularda tedaviye yön veren önemli bir faktördür. American Joint Committee on Cancer (AJCC) periyodik olarak evreleme standartlarını güncellemektedir.

Tablo 1. Meme Kanserinde Cerrahi TNM Evreleme Sistemi

T: Primer tümör boyutu (en büyük çap)

TX: Primer tümör saptanamamaktadır

T0: Primer tümör bulgusu yok

Tis: Karsinoma in situ

Tis(DCIS): Duktal

Tis(LCIS): Lobuler

Tis (Paget): Meme başının kitlesiz Paget hastalığı

T1: Tümörün en büyük boyutu ≤ 2 cm

T1mic: mikroinvazyon ≤ 0.1 cm

T1a: 0.1-0.5 cm tümör

T1b: 0.5-1 cm tümör

T1c: 1-2 cm tümör

T2: 2-5 cm tümör

T3: Tümör > 5 cm

T4: Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım

T4a: Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı

T4b: Meme cildinde ödem (peau d'orange da dahil) ülserasyon veya aynı memede satellit deri nodülleri

T4c: T4a ve T4b birlikte

T4d: Enflamatuvar karsinom

Tablo 1. Meme Kanserinde Cerrahi TNM Evreleme Sistemi (devamı)

N: Bölgesel Lenf Nodülleri (klinik)

NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel LN metastazı yok

N1: İpsilateral fikse olmayan LN metastazı

N2: Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller LN metastazı veya klinik olarak belirgin aksiller LN metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammarian LN metastazı

N2a: Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller LN metastazı

N2b: Klinik olarak aksiller LN metastazı yokluğunda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammarian LN metastazı

N3: Aksiller LN tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular LN metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammarian ve aksiller LN metastazı veya aksiller ya da internal mammarian LN metastazı olsun yada olmasın ipsilateral supraklavikular LN metastazı

N3a: İpsilateral infraklavikular LN metastazı

N3b: İpsilateral internal mammarian veya aksiller LN metastazı

N3c: İpsilateral supraklaviküler LN metastazı

pN: Bölgesel Lenf Nodülleri (patolojik)

pNX: Bölgesel lenf nodları saptanamamakta

pN0: Histolojik olarak bölgesel LN metastazı yok, İTH için ek inceleme yok

pN0(i -): Histolojik bölgesel LN metastazı yok, negatif İHK

pN0(i +): Histolojik bölgesel LN metastazı yok, pozitif İHK, 0.2 mm den geniş İHK kümesi yok

pN0(mol -): Histolojik bölgesel LN metastazı yok, negatif moleküler bulgular RT-PCR ile negatif

pN0(mol +): Histolojik bölgesel LN metastazı yok, pozitif moleküler bulgular RT-PCR ile pozitif

pN1: Klinik olarak belirgin olmayıp sentinel LN diseksiyonunun mikroskopik incelemesi ile tespit edilen 1-3 aksiller ve/veya internal mammarian LN metastazı

pN1mi: Mikrometastaz (0.2 mm.den geniş, 2.0 mm den geniş değil)

pN1a: 1-3 adet aksiller lenf LN metastazı

pN1b: Klinik olarak belirgin olmayan sentinel LN diseksiyonunun mikroskopik incelemesinde saptanan internal mammarian LN metastazı

Tablo 1. Meme Kanserinde Cerrahi TNM Evreleme Sistemi (devamı)

pN1c: Klinik olarak belirgin olmayıp sentinel LN diseksiyonunun mikroskopik incelemesinde 1-3 adet aksiller LN ve internal mammarian LN metastazı
pN2: 4-9 aksiller LN metastazı veya aksiller LN metastazı yokluğunda internal mammarian lenf nodunda klinik olarak belirgin metastaz
pN2a: 4-9 aksiller LN metastazı (tümör boyutu > 2 mm)
pN2b: Aksiller LN metastazı yokluğunda klinik olarak belirgin internal mammarian LN metastazı
pN3: 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya infraklaviküler lenf nodlarında veya 1 yada daha fazla aksiller LN pozitif olduğunda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammarian LN metastazı veya internal mammarian lenf nodlarında klinik olarak negatif mikroskopik metastazla birlikte 3' ten daha fazla aksiller LN metastazı veya ipsilateral supraklaviküler LN metastazı
pN3a: 10 veya daha fazla aksiller LN metastazı (tümör boyutu > 2mm) veya infraklaviküler LN metastazı
pN3b: 1 veya daha fazla pozitif aksiller LN varlığında klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammarian LN metastazı veya klinik olarak belirgin olmayan ancak sentinel LN diseksiyonuyla saptanan mikroskopik düzeyde 3 veya daha fazla aksiller LN veya internal mammarian LN metastazı
pN3c: İpsilateral supraklaviküler LN metastazı
Uzak Metastaz (M)
MX: Uzak metastaz bulunamıyor
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var (Tümörün olduğu tarafta supraklaviküler lenf nodları ve karşı memenin bölgesel lenf nodlarına metastazlar dahil)

LN: Lenf nodu

İTH: İzole tümör hücreleri

İHK: İmmünohistokimyasal

RT-PCR: Ters transkriptaz/ polimeraz zincir reaksiyonu

Klinik olarak belirgin: Lenfosintigrafi hariç görüntüleme metodları veya muayene ile saptanan metastazlar

Klinik olarak belirgin olmayan: Lenfosintigrafi hariç görüntüleme metodları veya muayene ile saptanamayan metastazlar

Tablo 2. Meme Kanseri Klinik TNM Evreleme Sistemi

Tümörün Evresi	Kapsadığı gruplar	Özellikleri
Evre 0:	Tis N0 M0	İnsitu Duktal Karsinom
Evre 1:	T1 N0 M0	Tümör < 2 cm LN (-)
Evre IIA:	T0 N1 M0	Tümör 2-5 cm
	T1 N1 M0	Aksiller LN (+)
	T2 N0 M0	
Evre IIB:	T2 N1 M0	
	T3 N0 M0	
Evre III		Lokal ileri evre hastalık
		Fikse tüm tümörler
		Tümör 5 cm, internal mammarian LN (+)
		Cild metastazı
Evre IIIA:	T0 N2 M0	Teknik olarak opere edilebilir
	T1 N2 M0	Tümör > 5 cm ve palpable aksiller LN
	T2 N2 M0	Herhangi boyutta tümör ve fikse aksiller LN
	T3 N1 M0	
	T3 N2 M0	
Evre IIIB:	T4 N0 M0	İnoperabl
	T4 N1 M0	Göğüs duvarı yada cild invazyonu
	T4 N2 M0	İnternal mammarian LN metastazı
Evre IIIC:	Herhangi T, N3, M0	
Evre IV:	Herhangi T/N, M1	Uzak metastaz
		Göğüs duvarı invazyonu

LN: Lenf Nodu

1.1.4. Meme Kanserinin Doğal Seyri

Meme kanseri %39.5 oranında olmak üzere en sık üst-dış kadrandan kaynaklanır. Meme kanserinin palpe edilebilir bir büyüklüğe ulaşması için (yaklaşık 10 mm) ya da mammografik olarak saptanabilmesi için (yaklaşık 3-5 mm) geçen sürede tümör ekspansiyonel bölünmektedir. Tümör 1mm³’ lük hacme ulaştığında tümör hücrelerinin hematojen yolla yayılmaya başlar (55). Meme kanserinde tümör boyutunun iki kat artması için geçen süre 50 günden kısa veya 500 günden uzun olabilmektedir. Erken olarak saptandığı düşünülen tümörlerin bile ortalama 6-10 yıllık bir geçmişe sahip olduğu bilinmektedir (56).

1.1.5. Meme Kanseri Yayılım Yolları

1.1.5.1. Lenfatik Yayılım

Çoğu tümör duktuslardan kaynaklanır, duktuslar ve fasya boyunca yayılarak meme yağ dokusuna ulaşır. Lenfatik kanallar yoluyla da periferik lenfatiklere yayılır. Dermisin derin lenfatiklerinin içine yayılabilir ve böylece deri ödemi meydana gelebilir. Üst-dış kadrant tümörleri aksiller nodları daha çok invaze eder. Tümör ne kadar büyükse aksiller tutulum insidansı o kadar yüksektir. Aksiller tutulum oranı ne kadar yüksek ise prognozda o kadar kötüdür. Palpabl aksiller lenf nodu varlığında alt-iç kadrant tümörlerinin internal mammarian lenf nodunu tutma ihtimali oldukça yüksektir.

1.1.5.2. Hematojen Yayılım

Sık görülen bir yayılım şekli olup sıklıkla iskelet sistemi, akciğer, karaciğer, beyin, overler, böbreküstü ve hipofiz bezlerine metastaz yapar. Pek çok olguda tanı anında subklinik lokal ve sistemik yayılım mevcuttur. Primer tümör büyüklüğü, tutulan aksiller lenf nodu sayısı ve diğer biyolojik özellikler göz önüne alınarak mikroskopik uzak metastaz riski büyük oranda hesaplanabilir (29).

Uzak organ tutulumu sıklık sırasına göre iskelet sistemi, akciğer ve karaciğerde olmaktadır (57). Lobüler tipler serozal yüzeylere yayılır (58). HER-2/neu pozitif tümörler iç organlara ve santral sinir sistemine yayılma eğilimindedir (59). Hormon reseptörleri pozitif olanlar ise daha sıklıkla iskelet sistemine yayılım göstermektedir (60). Uzak metastazın erken tanısı genel sağkalımı arttırmaz ancak morbiditeyi azaltacağı için olgulara herhangi bir yakınması olduğunda başvurmaları söylenmelidir (61-64).

1.1.6. Klinik

Meme kanseri en yavaş büyüyen tümörlerdendir. Olgular arasında belirgin farklılıklar gözlenir. Teşhis öncesi preklinik dönem, başlangıç tedavisinden sonraki klinik dönem ve hatta metastazın gelişmesi bazı olgularda yıllar içerisinde olurken bazı olgularda bu dönem oldukça kısadır. T1 -T2 olguların çoğu ağrısız meme kitlesi ile ya da tarama mammografisindeki anormallikle bazende memede hassasiyet, cild değişiklikleri, kanlı meme başı akıntısı memenin konveksitesi veya büyüklüğünde değişme ile hekime müracat ederler (25).

1.1.7. Meme Kanserinin Tanısı

Olgular genellikle kendi kendilerine tespit ettikleri veya hekimin yaptığı rutin sistemik muayene sırasında tesbit edilen kitle ile başvururlar. Olgu kliniğe geldiğinde oturur ve yatar pozisyonda inspeksiyonla birlikte tüm kadranların palpasyonu ile meme muayenesi yapılmalıdır. Her iki meme arasındaki büyüklük farkı, asimetri, pigmentasyon, meme başı akıntısı yada pullanma ve hamile olmayan bir kadında venöz dilatasyon veya ödem olup olmadığı dikkatle incelenmelidir. Meme muayenesi ile aynı zamanda aksilla ve supraklaviküler bölgede muayene edilmeli ve tespit edilen lenf bezi sayısı, yapısı, mobilitesi ve büyüklüğü not edilmelidir.

1.1.7.1. Radyolojik Tanı ve Değerlendirme

Meme kanserinin erken teşhisinde olgunun kendi kendini muayenesi, doktor tarafından muayenesi ve mammografi ile tarama önemli yer tutar (25). Buna karşın meme kanseri olgularının %70' i palpe edilebilir olmakla birlikte 0.6-2.0 cm boyutlarındaki tümörlerin ancak % 50' si klinik muayene ile tespit edilebilmektedir.

Mammografi

Mammografi asemptomatik kadınları taramada kullanılan ve erken evrede meme kanserini saptayabilen yöntemdir (65). Yoğun meme dokusuna sahip olgular, önceden cerrahi yada radyoterapi uygulanmış olgular ve mammooplasti uygulanmış olgularda benign lezyonların malign lezyonlardan ayırt etmede mammografinin duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür (66). Palpe edilebilir lezyonların %10' u mammografide tespit edilememektedir (67).

Amerikan Radyoloji Birliği, Ulusal Kansere Enstitüsü gibi organizasyonların resmi önerilerine göre 40 yaş üzeri kadınlarda fizik muayene ile birlikte her yıl mammografi önerilmektedir. BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyon taşıyıcıları gibi yüksek riskli gruplarda tarama 25 yaşında veya ailede meme kanseri görüldüğü en erken yaştan 5-10 yıl erken başlanmalıdır (68). Son yıllarda meme kanseri insidansı devamlı olarak artış göstermekle birlikte tarama programları ile tüm dünyada mortalitede % 25-30 düşüş sağlanmıştır (69).

Ultrasonografi

Palpabl kitlesi olan 30 yaş üzerindeki kişilerde ilk tercih edilecek görüntüleme yöntemi mammografi iken 30 yaş altındakilerde ultrasonografidir (70).

Ultrasonografi ile lezyonların iç yapısı değerlendirilerek %96-100 oranında doğrulukla kistik/solid ayırımı yapılabilir (71).

Renkli Doppler Ultrasonografi

Genel olarak malign tümörler benign tümörlerden daha fazla damar içermektedir. Malign tümörlerin iki önemli özelliği kontrol dışı büyüme ve invazyona eğilimleridir. Renkli doppler ultrasonografi benign solid kitleleri malign kitlelerden ayırmada ultrasonografiye yardımcı bir inceleme yöntemidir (72).

Manyetik Rezonans Görüntüleme

Morfolojik bulgularla fonksiyonel bilgileri birleştirir ve invazif meme kanseri için en duyarlı görüntüleme tekniğidir. Mammografik olarak parankim dansitesi yüksek olan ve meme koruyucu cerrahi düşünülen olgularda, non palpable lezyonların tespitinde, diğer memedeki tümör varlığını göstermede, konvansiyonel yöntemlere oranla daha üstün bir yöntemdir (73, 74).

Dijital Mammografi

Görüntüyü depolama, düzeltme ve işleme avantajları bulunmaktadır. Bilgisayar tarafından farkedilen anormal alanları işaretleyerek radyoloğun bu alanlara tekrar bakmasını sağlayarak tarama mammografilerindeki yanlış negatif oranı düşürmeyi amaçlamaktadır (75). Yüksek maliyeti dezavantajdır.

Sintigrafi

Genel olarak yalnızca fizik muayene veya mammografi ile saptanmış 1 cm' den büyük meme lezyonu olan kadınlarda istenmelidir. Malign-benign ayrımı yapılamayan meme lezyonu, radyoterapi sonrası saptanan şüpheli mammografi bulgusu olanlarda, meme implantlarında, neoadjuvan kemoterapi yanıt değerlendirilmesinde kullanılabilir. Duyarlılığı % 85 ve özgüllüğü % 89' dur (76).

Pozitron Emisyon Tomografisi

Yalnızca primer tümörü tanımlamakla kalmayıp aynı zamanda bölgesel lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz varlığını da gösterebilmektedir. Diğer görüntüleme metodları ile karşılaştırıldığında bölgesel lenf nodu tutulumunun tespitinde en yüksek tanısal duyarlılığı gösteren yöntemdir. Meme kanserlerinin kemoterapiye yanıtının değerlendirilmesinde de kullanılabilir (77).

1.1.7.2. Tanıya Yönelik İnvaziv Girişimler

Meme kanserinin tedavi öncesi histolojik tanısı şarttır. Genellikle ince iğne aspirasyon biyopsisi, sınırlı insizyonel biyopsi yada geniş lokal eksizyon tekniklerinden bir veya birkaçı kullanılır.

1.1.7.3. Tanıda Yardımcı Diğer Yöntemler

Tam kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, 5 nükleotidaz, karsino embriyonik antijen özellikle ilerlemiş vakalarda rekürrens ve metastazların erken tespitinde önemlidir. Kanser antijen 15-3, karsino embriyonik antijenden daha spesifik ama daha az sensitif bir monoklonal antikor yöntemi olup rekürrens, metastaz, regresyonu yada progresyonu değerlendirmede yararlanılan bir tümör belirleyicisidir.

1.1.8. Meme Kanseri Alt Tipleri

Meme tümörlerinin histolojik sınıflaması 1982 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılmıştır. WHO 2003 yılında yeni bir sınıflama yayınlamıştır (Tablo 3) (78).

Tablo 3. Meme Kanseri Histopatolojik Sınıflaması (WHO)
Sık Görülen Histolojik Tipler

Lobüler karsinoma in situ	Müsinöz karsinom
Duktal karsinoma in situ	Medüller karsinom
Mikroinvaziv karsinom	İnvaziv papiller karsinom
İnvaziv duktal karsinom	İnvaziv kribriform karsinom
İnvaziv lobüler karsinom	Taşlı yüzük hücreli karsinom
Tubuler karsinom	

Seyrek Görülen Histolojik Tipler

Nöroendokrin tümörler	Sekretuar karsinom
Apokrin karsinom	Onkositik karsinom
Metaplastik karsinom	Adenoid kistik karsinom
Lipidden zengin karsinom	

1.1.8.1. İnvaziv duktal karsinom

İnvaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (79). Diğer alt tiplerden herhangi birine ait spesifik özellikleri taşımayan geniş bir grubu oluşturmaktadır.

Makroskopik olarak olguların çoğu sert kıvamlı ve düzensiz sınırlıdır. Mikroskopik olarak sıklıkla tübül oluşumunun eşlik ettiği değişen kalınlıkta şerit yapıları, genelde grade II-III nükleus, bazen solid nodülleri, santral nekroz, sıklıkla da nekroz içeren duktal karsinoma insitu ile karakterizedir. Lezyonun % 90' ında duktal patern olmalıdır. Palpasyonda taş sertliğindedir. Kesitte iri kumlu bir görünüm mevcuttur bu nedenle daha önceleri 'skiroz' olarak isimlendirilmiştir. Özellikle yıldız şeklinde olup fokal nekroz içeren tümörler kötü prognozludur (80).

1.1.8.2. İnvaziv lobuler karsinom

Hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülmektedir. Diğer tip invaziv meme karsinomlarına göre daha yüksek oranda bilateral ve multifokal olma eğilimindedir. Lokal rekürrens oranı yüksektir (81). Duktal lobuler varyant % 7, invaziv lobuler tip % 8 oranında görülür (Tablo 4) (79). Pleomorfik tip hücreler iri pleomorfik ve agresif seyirli varyantıdır (82).

Tablo 4. Histolojik Tiplere Göre Görülme Sıklığı

Histolojik Tip	Sıklığı %
İnfiltratif Duktal Tip	76
İnvaziv Lobüler Tip	8
Duktal/Lobüler Tip	7
Musinöz (kolloid) tip	2.4
Tubuler Tip	1.5
Meduller Tip	1.2
Papiller Tip	1
Diğer Tipler	<5

1.1.9. Meme Karsinomunda Prognostik Faktörler

1.1.9.1. Lenf Nodu Metastazı

Lenf nodu metastazı en önemli prognostik faktördür. Meme kanser tanılı 202 olgu üzerinde yapılan prospektif bir çalışmada lenf nodu tutulumu olan olguların 112 aylık izleminde mortalite oranı %42 olarak saptanırken lenf nodu tutulumu olmayan olgularda bu oran 168 aylık izlem döneminde sadece % 11 olarak belirlenmiştir (83).

1.1.9.2. Tümör Boyutu

Bağımsız bir prognostik faktördür. Tümör boyutu arttıkça aksiller lenf nodu metastazı artmakta ve sağkalım oranı düşmektedir (84).

1.1.9.3. Histolojik Grade

Günümüzde morfolojik tipine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün gradelenmesi önerilmektedir ve en çok kullanılan gradeleme sistemi modifiye Bloom-Richardson sistemidir. 10 yıllık sağkalım oranı grade I tümörler için %85, grade II tümörlerde %60, grade III tümörlerde ise %15'dir (Tablo 5) (85).

Tablo 5. Modifiye Bloom-Richardson Sistemi

Tümörün Özellikleri	Skor (puan)
Tubulus yapımı	
Tümörün büyük kısmında (>75)	1
Orta derecede (%10-75)	2
Minimal veya hiç yok (<10)	3
Nükleus özellikleri	
Küçük, uniform hücreler	1
Orta derecede boyut ve şekil farkı, nükleol varlığı	2
Belirgin boyut ve şekil farkı, sıklıkla çok sayıda nükleol	3
Mitoz sayısı (x25, alan çapı 0.59 mm-10 alan)	
0-9	1
10-19	2
> 20	3
Toplam skor; 3-5: Grade I,	6-7: Grade II,
	8-9: Grade III

1.1.9.4. Tümörün Histolojik Tipi

Tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, sekretuar karsinom ve invaziv lobuler karsinomun tubulolobuler varyantının prognozu iyidir. Buna karşın metaplastik karsinom, invaziv lobuler karsinomun pleomorfik ve solid tiplerinin, invaziv mikropapiller karsinomun ve inflamatuvar karsinomun prognozu kötüdür (86).

1.1.9.5 Lenfovasküler İnvazyon

Tümör çevresi lenfatik ve kan damarları lümeninde tümör hücrelerinin görülmesi durumunda lenf nodu metastazı olasılığı yüksektir. Lenf nodu metastazı görülmese de lenfovasküler invazyon varlığı kötü bir prognostik faktördür (87).

1.1.9.6. Nottingham Prognostik İndeksi

Tümör boyutu, lenf nodu durumu ve histolojik grade gibi önemli prognostik parametreler değerlendirilerek prognostik bir indeks oluşturulmuştur (88, 89).

Nottingham Prognostik İndeksi = {tümör çapı (cm)x0.2}+{lenf nodu stage (1-3)}+{grade (1-3)}

Tablo 6. Nottingham Prognostik İndeksine Göre Prognostik Gruplar

Prognostik grup	Skor
İyi	< 3.4
Orta	3.4-5.4
Kötü	> 5.4

1.1.9.7. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri

Meme kanserinde östrojen reseptörü erken nüks açısından bağımsız prognostik faktördür. Daha uzun takipli büyük çalışmalarda östrojen reseptörü pozitif olgularda sağkalımın daha uzun olduğu gösterilmiş olup San Antonio ve “National Surgical Adjuvant Breast Cancer Project” (NSABP) verilerine göre sağkalım avantajı 5 yılda %10’dur (90).

1.1.9.8. HER2/neu (cErbB2, p185)

HER-2/neu aşırı ekspresyonu kötü prognostik faktördür ve tedaviye cevabı belirlemede önemlidir. HER-2/neu aşırı ekspresyonu genellikle histolojik grade yüksek, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir (91, 92).

1.1.9.9. Bcl-2

Mitokondriyum, endoplazmik retikulum ve nükleus membranına yerleşik bir proteindir ve apoptotik hücre ölümü ile ilişkilidir. Duktal meme karsinomlarında apoptoz kaybı ile ilişkili Bcl-2 aşırı ekspresyonunun p53 negatif tümörler arasında hastalığın ilerlemesi ile yakın ilişkisinin olduğu bildirilmiştir (93). Bcl-2 lenf nodu ve tümör büyüklüğünden bağımsız bir prognostik faktördür (94).

1.1.9.10. Yaş

Genç yaş, konservatif cerrahi ve radyoterapi uygulanan olgular için bir risk faktörüdür. Lokoregional rekürrens açısından genç olguların riski daha yüksektir (95). 35 yaşından 65 yaşına ilerlerken meme kanserinde 6 kat artış olmaktadır. 60 yaşında her 1000 kadından yaklaşık 17’ sinde 5 yıl içerisinde meme kanseri gelişmesi beklenmektedir (32).

1.1.10. Meme Kanseri Tedavisi

Tümör histolojisi, primer tümörün klinik ve patolojik özellikleri, aksiller lenf nodu durumu, tümörün hormon reseptörü içeriği, HER2/neu düzeyi, saptanabilir metastatik hastalık durumu olgunun komorbid hastalıkları, yaşı ve menopoz durumu tedavi seçiminde önemli parametreleri oluşturmaktadır. Meme kanserli erkek olgular postmenopozal kadınlara benzer şekilde tedavi edilmelidir. Ancak testiküler steroidogenezin eşzamanlı baskılanmaması durumunda aromataz inhibitörlerinin kullanımı etkisiz kalmaktadır (96).

1.1.10.1. Evre I, IIA, IIB, T3N1M0 İnvazif Meme Kanseri Lokal Tedavi

Erken evre meme kanserinde genellikle ilk tedavi cerrahidir. Cerrahi girişim meme koruyucu veya modifiye radikal mastektomi şeklinde yapılabilir. Evre I ve evre II meme kanserli olgularda mastektomi veya meme koruyucu tedavi ile birlikte uygulanan aksiller lenf nodu diseksiyonu, tüm meme radyoterapisiyle birlikte meme koruyucu tedavi ve aksiler lenf nodu diseksiyonu tıbbi olarak eşdeğer primer tedavi seçenekleridir (97-100). Aksiller lenf nodu diseksiyonu veya aksiller lenf nodu radyoterapisi uygulanmayan kadınlarda ipsilateral lenf nodu rekürens artmaktadır (101).

Modifiye Radikal Mastektomi Sonrası Radyoterapi

Dört ya da daha fazla sayıda pozitif aksiller lenf nodu tutulumu olan kadınlarda mastektomi ve kemoterapi sonrası toraks duvarı ve bölgesel lenf nodu radyoterapisi önerilmektedir. Toraks duvarına radyoterapi uygulaması lokal rekürens riskini önemli ölçüde azaltmaktadır (98).

Sistemik Tedavi

İlk tetkikler sırasında nod-negatif meme kanseri olgularında prognoz hakkında bilgi edinmek için HER2/neu ekspresyonunun belirlenmesi önerilmektedir (102). Yapılan çalışmalar tümörün HER2/ neu ekspresyonunun aşırı olduğu olgularda doksorubisin bazlı adjuvan tedavinin, doksorubisin içermeyen adjuvan kemoterapiye üstün olabileceğini göstermektedir (103, 104). HER2/neu ekspresyonunun trastuzumab tedavisinin kullanılıp kullanılmayacağına karar verirken göz önüne alınması gereken başlangıç bilgisini sağlamaktadır (105).

Adjuvan Endokrin Tedavi

Östrojen ve/veya progesteron reseptörü pozitif olan invazif meme kanserli olgularda olgunun yaşından, lenf nodu durumundan veya adjuvan kemoterapi uygulanacak olup olmamasından bağımsız olarak adjuvan endokrin tedavi düşünülmelidir (10).

Prospektif, randomize çalışmalara göre tamoksifenin optimum kullanım süresi 5 yıl olarak gözükmemektedir (106). Tek başına veya birlikte arimidex, tamoksifen çalışması (ATAC: Arimidex and tamoxifen alone or in combination) anastrozolün, hormon reseptörü pozitif meme kanserli postmenopozal kadınların adjuvan endokrin tedavisinde, tamoksifene veya tamoksifen ve anastrozol kombinasyonuna üstün olduğunu göstermiştir (107, 108). Sağkalım yönünden bir fark gözlenmemiştir. ATAC çalışması alt protokolleri tamoksifene kıyasla anastrozolün yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkisi bulunmadığını ve önemi anlaşılamamış, küçük çapta bir farmakokinetik etkileşmeye yol açtığını (109) endometriyal dokuda daha az etkisi olduğunu (107) göstermektedir. Aromataz inhibitörleri overleri işlevsel olan kadınlarda etkin değildir, bu nedenle adjuvan tedavide menopoz öncesi dönemde kullanımı önerilmez.

Adjuvan Sitotoksik Kemoterapi Rejimleri

Fluorourasil, doksorubisin ve siklofosfamid (FAC/CAF)

Siklofosfamid, epirubisin ve fluorourasil (CEF)

Siklofosfamid, metotreksat ve fluorourasil (CMF)

Doksorubisin veya epirubisin ve siklofosfamid (AC/EC)

Ardışık paklitaksel ile birlikte AC

Doksorubisin, paklitaksel, siklofosfamid

Fluorourasil, epirubisin, siklofosfamid (FEC) sonrasında dosetaksel

Erken evre meme kanseri araştırmacılarının polikemoterapi değerlendirmesinde antrasiklin içeren rejimlerin CMF ile karşılaştırılması, antrasiklin içeren rejimlerde yıllık rekürens olasılığında ek %12 ve yıllık ölüm olasılığında ek %11'lik bir azalma sağlandığını göstermiştir (110). Bu verileri temel alarak nod pozitif olgularda antrasiklin içeren rejimlerin tercih edilmesi uygundur.

Dört siklus doksorubisin ve siklofosfamid kemoterapisi randomize çalışmalarda araştırılmış relapssız ve genel sağkalımda CMF kemoterapisine eşdeğer bulunmuştur (111, 112).

TAC ile FAC kemoterapilerinin karşılaştırıldığı randomize bir çalışmada, aksiller lenf nodu pozitif meme kanseri olgularında TAC'ın FAC' tan üstün olduğunu göstermektedir (113).

CEF ve CMF kemoterapisinin karşılaştırıldığı aksiller lenf nodu pozitif meme kanserli kadınlarda, hem 10 yıllık relapssız sağkalım hem de genel sağkalım hızları CEF kolu lehinedir (114).

Aksiller lenf nodu pozitif olan meme kanserli kadınlarda ardışık paklitaksel içeren veya paklitakselsiz AC kemoterapilerini karşılaştıran iki randomize çalışmanın sonuçları, paklitaksel eklenmesiyle hastalıksız sağkalım hızlarında iyileşme ve bunlardan birinin sonuçlarına göre genel sağkalımda iyileşme olduğunu göstermiştir (115, 116).

Adjuvan Trastuzumab Tedavisi

Trastuzumab aşırı HER2 ekspresyonunda etkili olan bir antikordur. HERA çalışmasında, lokal terapiden ve çeşitli standart kemoterapi rejimlerinden sonra bir yada iki yıl süreyle verilen trastuzumab, trastuzumab verilmemesiyle karşılaştırılmıştır. Medyan bir yıl süren izlemiden sonra, 1 yıl süreyle trastuzumab verilen grupla trastuzumab verilmeyen grup karşılaştırıldığında, trastuzumabla rekürrens riskinde % 46 azalma olduğu görülürken genel sağkalımda bir fark saptanmamış ve kardiyak toksisite kabul edilebilir düzeyde bulunmuştur (117).

1.1.10.2. Evre IIA, IIB, T3N1M0 Tümörlerde Preoperatif Kemoterapi

Tümörü büyük olan olgularda meme koruyucu tedavi kriterlerine uyan kadınlar için preoperatif kemoterapi düşünülmelidir. NSABP B-18 çalışması preoperatif kemoterapi sonrasında meme koruyucu cerrahi yapılma oranlarının daha yüksek olduğunu göstermiştir (118). Bununla birlikte preoperatif kemoterapi evre II tümörü olan olgularda sağkalım avantajı sağlamamıştır. NSABP B-27, 4 siklus AC sonrasında 4 siklus dosetaksel ile tedavi edilenlerde cerrahi sırasında tam patolojik yanıt oranının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımın daha iyi olduğu gösterilememiştir. Preoperatif ve postoperatif dosetaksel karşılaştırıldığında klinik sonuç yönünden herhangi bir fark bildirilmemiştir (119).

1.1.10.3. Evre III İnvazif Meme Kanseri

Evre IIIA olgularda primer tedavi olarak sistemik ilaç tedavisi önerilir. Başlangıç tedavisi olarak öncelikle cerrahi önerilebilecek hasta grupları çok açık değildir. Neoadjuvan tedavi uygulanamıyacak bazı olgularda cerrahi primer tedavi olabilir. Başlangıç tedavisi olarak cerrahi yapılmış Evre IIIA meme kanserinin sistemik adjuvan tedavisi Evre II hastalığına benzer şekilde uygulanır.

Premenapozal Evre IIIA

Bu olgularda cerrahi tedavi sonrası en az 6 siklus kemoterapi uygulanmalıdır. Kemoterapilerin bitiminde radyoterapi uygulanır. Hormon reseptör pozitif olgulara tamoksifen kemoterapi bitiminde hemen sonra başlanır.

Postmenapozal Evre IIIA

Bu olgularda cerrahi tedavi sonrası en az 6 siklus kemoterapi uygulanır. Kemoterapilerin bitiminde radyoterapi uygulanır. Hormon reseptörü pozitif olgulara tamoksifen kemoterapi bitiminde hemen sonra başlanır. Aromataz inhibitörleri tamoksifene alternatif diğer bir tedavi seçeneğidir.

1.1.10.4. Başlangıç Tedavisi Olarak İnoperable Olgular (T3N1M0 hariç Klinik IIIA, IIIB veya İnflamatuvar)

Lokal olarak ilerlemiş inoperable kanser ile gelen olgularda preoperatif kemoterapi kullanımı standart tedavidir. Preoperatif tedavi sonrası modifiye radikal mastektomi veya lumpektomi ve aksiller diseksiyon uygulanır (120). Preoperatif kemoterapiden sonra meme ve bölgesel lenf noduna yüksek dozda radyoterapi seçilmiş olgularda uygulanabilir (121). Hormon reseptör pozitif olan premenopozal olgularda kemoterapi bitiminde tamoksifen başlanır. Postmenopozal olgularda aromataz inhibitörleri tamoksifene alternatif tedavi seçeneğidir. Premenopozal hormon reseptörü pozitif tümörlü olgularda over ablasyonu/supresyonu tedaviye eklenir.

Neoadjuvan Endokrin Tedavi

Performans durumu uygun olmayan veya kemoterapi almak istemeyen postmenopozal olgularda hormon reseptörü pozitif ise aromataz inhibitörleri başlanabilir. Progrese olan veya yanıt alınamayan olgular lokal tedavi için değerlendirilmelidir. Yanıt alınan ve yanıtı devam eden olgular ise 3-4 ay sonra

opere edilebilir. Opere edilemeyecek olgulara 3-4 ay sonunda radyoterapi uygulanmalıdır. Yanıt alınan olgularda endokrin tedavi lokal tedavi sırasında ve sonrasında devam etmelidir. Hormon tedavisi ve kemoterapi birlikte verilecek olgularda bu tedaviler birlikte değil ardışık verilmelidir. Adjuvan kemoterapi endikasyonu varsa kemoterapi tamamlandıktan sonra radyoterapi uygulanmalıdır (122).

1.1.10.5. Metastatik Meme Kanseri Tedavisi

Hormon reseptörü (123), Bcl-2 ekspresyonu (124), hastalıksız sağkalım aralığı (125), tutulum bölgesi (126) ve performans durumu (127) gibi faktörler sağkalımı etkilemektedir. Metastatik meme kanserinin daha önceki yıllarda tedavi yaklaşımlarında temel amaç palyasyon sağlanması iken günümüzde sağkalımın uzatılması hedeflenmiştir. Özellikle trastuzumab, aromataz inhibitörleri ve taksanlar gibi yeni sistemik ajanların kullanıma girmesi ile bu hedef bir ölçüde gerçekleştirilmiştir. Metastatik meme kanserinde temel tedavi sistemik ilaç uygulamasıdır. Bu tedavi endokrin tedavi, kemoterapi veya biyolojik ilaç tedavilerini içerir (128).

Endokrin Tedavi

Östrojen ve/veya progesteron reseptörü pozitif olgularda verilmelidir. Premenapozal olgularda luteinizing hormone-releasing hormon agonisti ile tamoksifen birlikte verilmelidir. Postmenapozal olgularda yapılan çalışmalarda daha önce antiöstrojen tedavi almamış veya önceki endokrin tedavi üzerinden 1 yıldan uzun süre geçmiş olgularda aromataz inhibitörlerinin üstünlüğü gösterilmiş olmakla birlikte (129, 130) aromataz inhibitörleri veya tamoksifen uygun seçenek olarak gözükmemektedir. Özellikle trombotik öyküsü olanlarda aromataz inhibitörleri tercih edilmelidir. Daha önce antiöstrojen tedavi almış ve tekrarlayan hastalıkta aromataz inhibitörleri uygun seçenektir (131, 132).

Sistemik Kemoterapi

Hayati organ metastazı olup hormon reseptörü negatif olgularda sistemik kemoterapi uygulanmalıdır. Kemoterapi, tek ajan veya kombine kemoterapi şeklinde uygulanabilir. Tek ajan olarak doksorubusin, epirubisin, dosetaksel, vinorelbin ve gemitabin veya FAC/ CAF, FEC, AC/ EC, CMF kombinasyonları verilebilir.

Aşırı HER2/ neu ekspresyonu olan metastatik veya tekrarlayan meme kanseri olanlarda trastuzumab tek başına veya kemoterapi ajanlarıyla kombine verilmelidir (133). Vasküler endotel büyüme faktör reseptörüne karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olan bevasizumab, yineleyen meme kanserli kadınlarda ilk sıra kemoterapi olarak paklitakselle kombine olarak düşünülebilir (134).

Palyatif Radyoterapi

Metastatik meme kanserli olgularda semptomların giderilmesinde radyoterapi önemli bir tedavi seçeneğidir. Kemik metastazlı olgularda ağrı palyasyonu sağladığı gibi vertebral kolon ya da femur boynu gibi yük taşıyan kemiklerdeki metastazlarda patolojik fraktür riskini azaltır. Tek fraksiyon ışınlama ile daha uzun süreli fraksiyone ışınlama arasından ağrı cevabı açısından fark bulunamamıştır ancak tek fraksiyon uygulanan olgularda tekrar radyoterapi ihtiyacı gelişebilir (135, 136).

Cerrahi tedavi uygulanabilen soliter beyin metastazlı olgularda anlamlı bir sağkalım artışı gösterilmiştir ve bu olgularda medyan sağkalım 10-12 ay olup, %12 olguda 5 yıldan daha uzun yaşam bildirilmiştir. Birden fazla nodülü olan olgularda en büyük lezyonun çıkarılması semptomatik rahatlama sağlasa da standart bir uygulama değildir. Cerrahi sonrası tüm beyin ışınlaması önerilmektedir (137). Cerrahi tedaviye uygun olmayan tek lezyonlarda ve birden fazla beyin metastazının palyatif tedavisi standart olarak radyoterapidir.

Kemik Metastazında Bifosfonatlar

İleri evre meme kanserli olguların % 80' den fazlasında kemik metastazları gelişmektedir (16). Özellikle litik lezyonu olan kemik metastazlı olgularda kreatinin düzeyi 3 mg/dL' nin altında ve beklenen yaşam süresi 3 ay veya daha uzun ise bifosfonatlar kalsiyum sitrat ve D vitamini ile birlikte verilmelidir (138). Bifosfonatlar kemoterapi veya endokrin tedaviyle birlikte sistemik tedavi devam ettiği sürece verilebilir.

1.1.10.6. Zoledronik Asid

Bifosfonatlar kemik rezorpsiyonunu inhibe etmekte ve tüm dünyada primer ve sekonder osteoporoz tedavisinde kullanılmaktadır (139).

Bifosfonatlar genel olarak üç gruba ayrılmaktadır

1. kuşak bifosfonatlar; etidronate, clodronate, tilutronate
2. kuşak bifosfonatlar; alendronate, ibandronate, pamidronate

3. kuşak bifosfonatlar; risedronate, zoledronik asid

Bifosfonatlar 2 fosfanat grubunun tek karbon atomuna bağlanmasıyla P-C-P yapısını oluştururlar. 3.kuşak bifosfonat zoledronik asid 1.kuşak etidronata göre 10.000 kez daha aktiftir (139).

Zoledronik asid imidazol halkalı yan zinciri olan heterosiklik azot içeren bir bifosfonattır. Zoledronik asid kimyasal olarak bifosfonik asid monohidrat (1 hidroksi 2 imidazol-1-yl-fosfono etil) olarak adlandırılır. Diğer bifosfonatlardan farkı halka yapısında ikinci azot atomunun bulunmasıdır. Osteoklast aracılı osteolizisin kuvvetli inhibitörleri olan bisfosfonatlar kemik metastazlarının tedavisinde kullanılmaktadır (12-14). Klinik uygulamalarda bifosfonatlar metastatik kemik hastalığının tedavisinde endokrin ajanlarla sıklıkla kombine olarak kullanılmaktadır (16).

Zoledronik Asidin Etki Mekanizması

Zoledronik asid mevolanat sentez yolundaki anahtar enzim olan farnezil pirofosfatı inhibe eder. Sonuç olarak Ras, Rap1, Rho ve Rab gibi G proteinlerinin prenilasyonunu önleyerek osteoklastik aktiviteyi inhibe eder (140, 141). Zoledronik asid gibi nitrogen içerikli bifosfonatlar ile bu etkinin sadece osteoklastlarla sınırlı olmadığı invitro olarak insan multiple myelom hücre serilerinde gösterilmiştir (142, 143). Bifosfonatlar meme kanser hücrelerinin kemik matriksine invazyonunu inhibe eder ve antineoplastik ajanların kanser hücrelerinin invazyonunu inhibe etme özelliğini invitro olarak arttır (144-146).

Zoledronik asid kanser hücrelerine karşı önemli rol oynayan doğuştan immuniteye sahip gama delta T hücrelerinin salınımını stimüle eder. Aynı zamanda kuvvetli bir angiogenez inhibitörü olan zoledronik asid bu etkisini muhtemelen endotel hücrelerdeki anjiogenik özellikleri düzenleyerek yapar (147). Osteoklastlar tarafından oluşturulan kemik rezorpsiyonunu pamidronata göre 850 kat daha fazla inhibe eder (148).

İnvitro isobologram çalışmalarıyla zoledronik asidin gemitabin ve fluvastatinin sitotoksik etkilerini arttırdığı kanıtlanmıştır (17). Potent bir antiyazotik ilaç olan zoledronik asidin invitro olarak kemik metastazı olmayan meme kanserli fare modellerinde doksorubisinin antitümör etkinliğini arttırdığı (18), kemik metastazlı meme kanseri olan fare modellerinde ise bifosfonatların kemikte tümör gelişimini inhibe ettikleri gösterilmiştir (19). MCF 7 meme kanseri hücre serilerinde

zoledronik asid ve paklitaksel kombinasyonunun apoptozisi 4-5 kat arttırdığı ve isobologram analizi ile zoledronik asid ve paklitakselin sinerjistik etki oluşturduğu gösterilmiştir (20).

1.1.10.7. Tamoksifen

Tamoksifen nonsteroidal antiöstrojenler grubundan bir ilaçtır. Östrojen reseptörlerine bağlanır ve östrojenin bağlanmasını yarışma yönü ile engeller. Tamoksifen-reseptör bileşiği nükleusa taşınarak nükleik asid fonksiyonlarını etkiler. Tümör DNA sentezi yavaşlar ve tümör tarafından sekrete edilen çeşitli büyüme faktörleri azalır. Hücre proliferasyonu inhibe olur (6, 7). Tamoksifenin cis ve trans izomerleri mevcuttur. Trans izomeri antiöstrojenik, cis izomeri östrojenik aktiviteye sahiptir. Tamoksifen zayıf östrojenik etkiye sahip bir bileşiktir. Tamoksifenin östrojen agonistik ve antagonistik etkileri hormonal ortama bağlıdır. Premenapozal kadınlarda östrojenik etkilerini hipofiz bezinde göstererek plazma östrojen düzeylerini artırıp gonodotropin düzeylerini etkilemezken postmenapozal kadınlarda ise gonodotropin düzeylerini düşürür (149, 150). İleri evre hastalıkta endokrin tedaviye cevap oranı, bir hormon reseptörü pozitif olan olgularda %33, her iki reseptörde pozitif olan olgularda % 50-70' tir (8).

Tamoksifenin östrojenler, androjenler, progestinler, aminoglutetimid ile karşılaştırıldığı ramdomize çalışmalarda cevap oranlarının aynı veya daha iyi olması ve yan etkilerinin çok az olması nedeniyle metastatik meme kanseri tedavisinde birinci seçenek tedavi olarak son yıllara kadar kabul görmüştür. Günümüzde ise aromataz inhibitörleri ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Tamoksifen ve kemoterapi kombinasyonunun lokal, ipsilateral, bölgesel ve uzak rekürrens riskini olduğu kadar kontralateral meme kanseri insidansını da azalttığı gösterilmiştir (151).

Tamoksifenin plazma lipidleri üzerine östrojenik etkisi vardır. Tamoksifenin bu etkileri kliniğe koroner kalp hastalığı riskinde belirgin bir azalma olarak yansır. Kemik üzerine östrojenik etki gösterir ve 5 yıllık kullanım sonucunda kemik mineral dansitesinde anlamlı artışa neden olur (152).

NSABP B-14 çalışmasının sonuçları tamoksifen kullanan kadınlarda endometrium kanseri riskinde anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Tamoksifen alan meme kanserli olgularda yılda bir kez pelvik muayene ve PAP smear testi yapılmalıdır (153).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serileri

Çalışmamızda kullanılan MCF-7 meme kanseri hücre serileri DMSZ (Almanya Hücre Havuzu, Braunschweig, Almanya) firmasından temin edildi.

2.1.2. Kimyasal Maddeler

Zoledronik asid (Mustafa Nevzat A.Ş.)

Tamoksifen (Sigma)

DMF (Dimethylformamide) (Sigma)

Amfoterisin-B (Biochrom)

Trypsin from bovine pancreas (Sigma)

Newborn Calf serum, heat inactivated, cell culture tested (Sigma)

Trypan blue solüsyon (Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco)

Bovine İnsülin (Sigma)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Ambresco)

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Biochrom)

Non-Essential Amino Acid (Sigma)

L-glutamine (Biological Industries)

Etanol %100 (Riedel-de Haen)

2.1.3. Malzemeler

Filtre (150x0,22 µm milipor) (Orange Scientific)

İnkubatör dezenfektanı (Biological Industries)

Mikropipet ucu (10µl- 100 µl) (96x10) (Corning)

Mikropipet ucu (silikonlu 1, 200, 1000 ml) (Neptune)

Sıkı kapaklı besiyeri tüpü

Steril kültür tüpü

Vidalı Kapaklı Kültür Flaskı

Sıkı kapaklı besiyeri tüpü

Steril kültür tüpü

Steril plastik pipet (5ml-10ml)

24 well plate

2.1.4. Aygıtlar

Class II Laminair Flow (Biolaf, Ankara)

%5 CO₂ - %95 O₂ inkübatörü (Nuair, Plymouth, MN, ABD)

Inverted mikroskop (Soif Optical Inc., Çin)

Otoklav (Nüve, Ankara, Türkiye)

Floresan Ataşmanlı Inverted mikroskop, (Nikon TE2000 S)

CCD kamera (Orca 285, Hamamatsu, Japonya)

sPCI (Yazılım programı)

LB-2 Filtre sürücüsü (Sutter Instruments)

Hassas terazi

Çeşitli çapta otomatik pipetler,

Pipet uçları

Buzdolabı (Beko)

Derin dondurucu (-20° C) (Bosch)

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Elektrofizyoloji Laboratuvarında yapıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Sterilizasyon

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan tüm malzeme ve ajanlar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde bulunan Nüve marka (Ankara, Türkiye) bir otoklavda 121 °C'de steril edilerek kullanıldı. Sıvı ajanlar por büyüklüğü 0.22 µm olan mikrobiyolojik filtreden geçilerek sterilize edildi. Pipet ve uçlar kromat çözeltisinde bekletilerek sterilize edildi. Zefiran, %75 alkol ve özel dezenfektanlarla çalışma ortamı ve steril kabinin temizliği yapıldı. Steril kabine alınacak malzemeler %70 alkolle silindi. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.

2.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre serisi kullanıldı. Donmuş halde temin edilen hücre süspansiyonu 37 °C' deki su banyosunda yaklaşık 2 dakika bekletilerek sıvı hale gelmesi sağlandı.

2.2.3. Medyum ve Diğer Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.3.1. Kültür Medyumunun (DC₅) Hazırlanması

50 ml	Bovine Calf Serum
10 ml	Penicillin/Streptomycin
10 ml	Non-Essential Amino Acid
10 ml	L-glutamine
1 ml	İnsulin

1000 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine ilave edildi ve filtre edilerek steril hale getirildi. Hücrelerin beslenme işlemleri bu medyum kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2.3.2. Tripsin Hazırlanması (% 0.05)

0.5 g	Trypsin
0.25 g	EDTA

1000 ml Ca⁺²/Mg-free Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) içerisinde çözdürüldü ve filtrasyonla steril edildi. Bu çözelti hücreleri yapıştıkları yerden (flaskların tabanından) sökmek için kullanıldı.

2.2.3.3. Fosfat Buffer Solüsyonu Hazırlanması:

7.20 g NaCl, 1.48 g Na₂HPO₄, 0.43 g NaH₂PO₄ tartıldıktan sonra 0.5 ml tween 20 eklenerek distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2.2.4. MCF-7 Hücre Serilerinin Çözdürülmesi, Flasklara Ekimi, Beslenmesi ve Bölünmesi

Donmuş haldeki MCF-7 meme kanseri hücre serileri oda sıcaklığında çözdürülerek 75 ml flask içerisine aktarıldı. Flaskın içerisine daha önceden hazırlanmış olan DC₅ (25 ml) ilave edildi ve flasklar Nuaire marka %5 CO₂ -%95 O₂ inkübatörüne (Playmouth, MN, ABD) 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin kontamine olup olmadığı Soif marka (Soif Optical Inc., Çin) inverted mikroskopta incelendi. 48 saat sonra da hücre yoğunluğu aynı mikroskopta kontrol edildi. Üçüncü günün sonunda flasklarda bulunan DC₅ çekilerek taze siyle değiştirildi. Bu işlem üç gün aralıklarla sürekli tekrar edildi.

Sayıları artmaya devam eden hücreler flaskın tabanını tamamen kaplayarak üst üste tabakalar oluşturmaya başladılar. 15. günün sonunda flasklardaki medyum

tek kullanımlık steril pipet yardımıyla çekildi ve yerine 3 ml tripsin ilave edilerek inkübatöre yerleştirildi. 2-3 dakikada bir flasklar hafifçe sallanarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Tüm hücreler flaskın yüzeyinden ayrıldıktan sonra flaskların içerisine 12 ml DC₅ ilave edildi ve dikkatli şekilde tritürasyon (süspansiyonun pipet içerisine çekilip boşaltılarak yapılan ayrıştırma işlemi) yapılarak hücrelerin homojen olarak solüsyona dağılması sağlandı.

Hücreler hemositometre kullanılarak sayıldı. Her flaska 5×10^6 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu konulup üzerlerine toplam hacim 25 ml olacak şekilde DC₅ ilave edildi. Tüm flasklar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin ekimleri, beslenmeleri ve deneyler steril olacak şekilde Class II Laminair Flow (Biolaf, Ankara) içerisinde gerçekleştirildi.

2.2.5. Hücrelerin Test Edilecek Ajanlar İçin Hazırlanması

MCF-7 meme kanseri hücre serileri flasklara tripsin ilave edilerek yerlerinden söküldü ve hücre süspansiyonu 2000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edildi. Tüplerdeki tripsin-medyum karışımı alınarak yerine DC₅ ilave edildi ve tritürasyon ile hücrelerin *single cell suspension* haline gelmeleri sağlandı. Hemositometre kullanılarak hücreler sayıldı ve hücre sayısı deney için gerekli olan 4×10^3 / ml hücreye ayarlandı. Hücre sayımı sırasında hücre canlılığını saptamak için %0.4' lük tripan blue solüsyonu kullanıldı. Tripan blue boyama yöntemi hücre sayımı için önerilen canlı hücrelerin boyanmadığı ölü hücrelerin boyandığı bir yöntemdir.

2.2.6. Deney Düzeneginin Oluşturulması

Test edeceğimiz ajanlardan tamoksifen % 100 etanol içerisinde zoledronik asid ise DMF içerisinde çözündürüldü ve elde edilen karışım kullanımdan hemen önce DC₅ kültür medyumunu kullanılarak dilüe edildi. Her iki test ajanının çözücü maddelerinin final konsantrasyonları % 0.1' in altındaydı. Test ajanlarını çözmek için kullandığımız etanol ve DMF' nin MCF-7 hücre serileri üzerine olan olası etkilerini kontrol etmek için çözeltideki final konsantrasyonu olan etanol için 2 µL, DMF için 10 µL olacak şekilde MCF-7 hücre serileri üzerine uygulandığı ve hiçbir test ajanının uygulanmadığı kontrol grupları oluşturuldu.

Hücre süspansiyonları 24 *well plateler*' e yoğunluğu 4×10^3 /ml olacak şekilde birer mL ekildi. Zoledronik asidin ve tamoksifenin MCF-7 meme kanseri hücre serileri üzerine toksik etkilerini belirlemek için 1, 10 ve 100 µM/L

konsantrasyonlarında zoledronik asid ile 10 ve 100 nM/L konsantrasyonlarında tamoksifen ve aynı dozların kombinasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca hücre serileri ile 24 kuyucuklu plate içerisinde inkübasyona bırakıldı. 24 *well plate*' ler aracılığı ile kontrol, DMF, etanol, test edilen ajanlar ve kombinasyonlarından gruplar oluşturuldu.

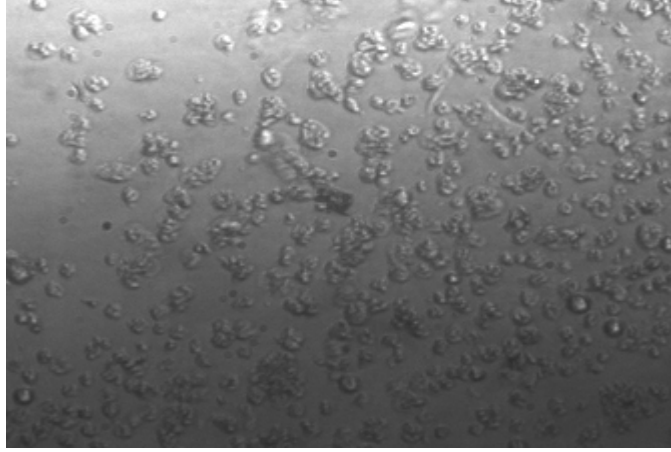
Aynı düzenek oluşabilecek olası bir kontaminasyonu engellemek için test ajanlarının etkisinin gözlemleneceği her saat için ayrı ayrı hazırlandı. Deney için hazırlanmış olan 24 *well plateler* inkübatöre yerleştirildi. 24 saat sonra değerlendirilecek plate inkübatörden çıkarıldı. Kültür esnasında ve deney gerçekleştirilirken hücre morfolojilerinin görüntülenmesi ters mikroskop (Nikon TE 2000 S) ve imaj sistemi (Hamamatsu Orca soğutmalı CCD kamera (Japonya) ve sPCI yazılım programı, Compix, ABD) yardımı ile gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72. saatlerde test ajanlarının çözücüleri, test edeceğimiz ajanlar ve kombinasyonlarından oluşan gruplardan elde edilen görüntülerdeki hücre sayıları tespit edilerek kontrol gruplarındaki hücre sayıları ile karşılaştırılarak test ajanlarının ve kullanılan çözücülerin hücre sayıları üzerine olan etkileri gözlemlendi.

2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

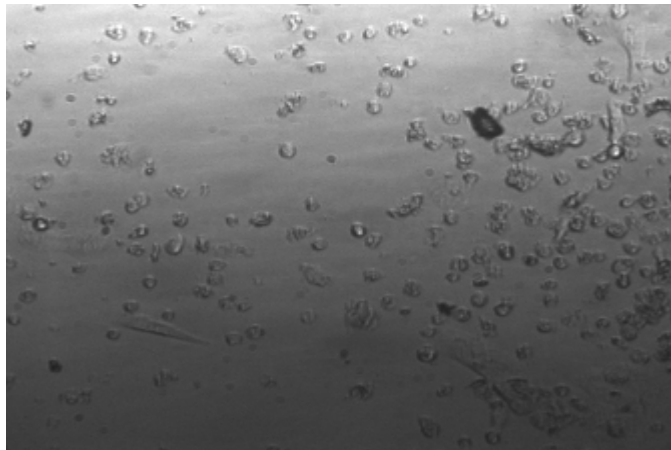
Bütün hücre kültürü verileri ortalama $\pm$ SEM olarak hesaplandı. Test ajanların 24, 48 ve 72. saatlerdeki etkileri Pearson Ki Kare Analizi yardımıyla yorumlandı.

3. BULGULAR

Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre serisinden oluşturulan gruplarda etken maddeleri çözmek için kullandığımız etanol, DMF, test edeceğimiz ajanlardan zoledronik asidin 1, 10, 100 $\mu\text{M/L}$ dozları ile tamoksifenin 10, 100 nM/L dozu ve iki etken maddenin aynı dozlardaki kombinasyonlarının 24, 48 ve 72. saatlerde MCF-7 meme kanseri hücre serileri üzerine olan etkileri ters mikroskop (Nikon TE 2000 S) ve imaj sistemi (Hamamatsu Orca soğutmalı CCD kamera ve sPCI yazılım programı) yardımı ile görüntülendi (Şekil 1 ve 2) ve kontrol grubu ile kıyaslandı. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular sırasıyla Tablo 7 ve Şekil 3' de gösterildi.



Şekil 1. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serilerinin Görünümü

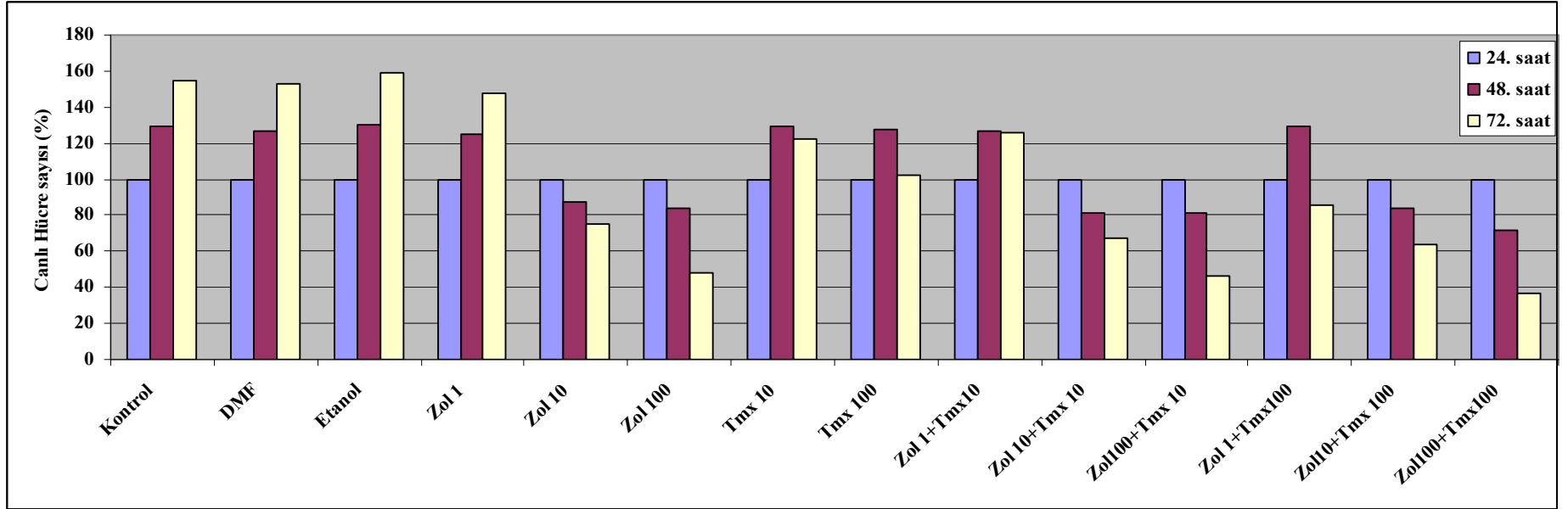


Şekil 2. Zoledronik Asidin 100 $\mu\text{M/L}$ Konsantrasyonun 72. saatte MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Etkisi

Tablo 7. Tamoksifen ve Zoledronik Asidin Farklı Doz ve Kombinasyonları ile Çözücülerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Zaman Bağımlı Etkileri

Canlı Hücre Sayıları														
Zaman	Kontrol	Zol 1	Zol 10	Zol 100	Tmx 10	Tmx 100	Zol1+ Tmx10	Zol 10+ Tmx 10	Zol100+ Tmx 10	Zol 1+ Tmx100	Zol 10+ Tmx 100	Zol100+ Tmx100	Etanol	DMF
24. saat	404	408	394	396	402	400	400	410	396	398	388	336	402	408
48. saat	522	508	344	294	516	510	508	332	296	502	320	242	522	520
72. saat	628	604	294	170	492	408	502	272	168	406	242	122	638	624

Zol 1= Zoledronik asid 1 µM/L, Zol 10= Zoledronik asid 10 µM/L, Zol 100= Zoledronik asid 100 µM/L, Tmx 10= Tamoksifen 10 nM/L, Tmx 100= Tamoksifen 100 nM/L



Şekil 3. Tamoksifen ve Zoledronik Asidin Farklı Doz ve Kombinasyonları ile Çözücülerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Zaman Bağımlı Etkileri

Zol 1= Zoledronik asid 1 µM/L, Zol 10= Zoledronik asid 10 µM/L, Zol 100= Zoledronik asid 100 µM/L, Tmx 10= Tamoksifen 10 nM/L, Tmx 100= Tamoksifen 100 nM/L

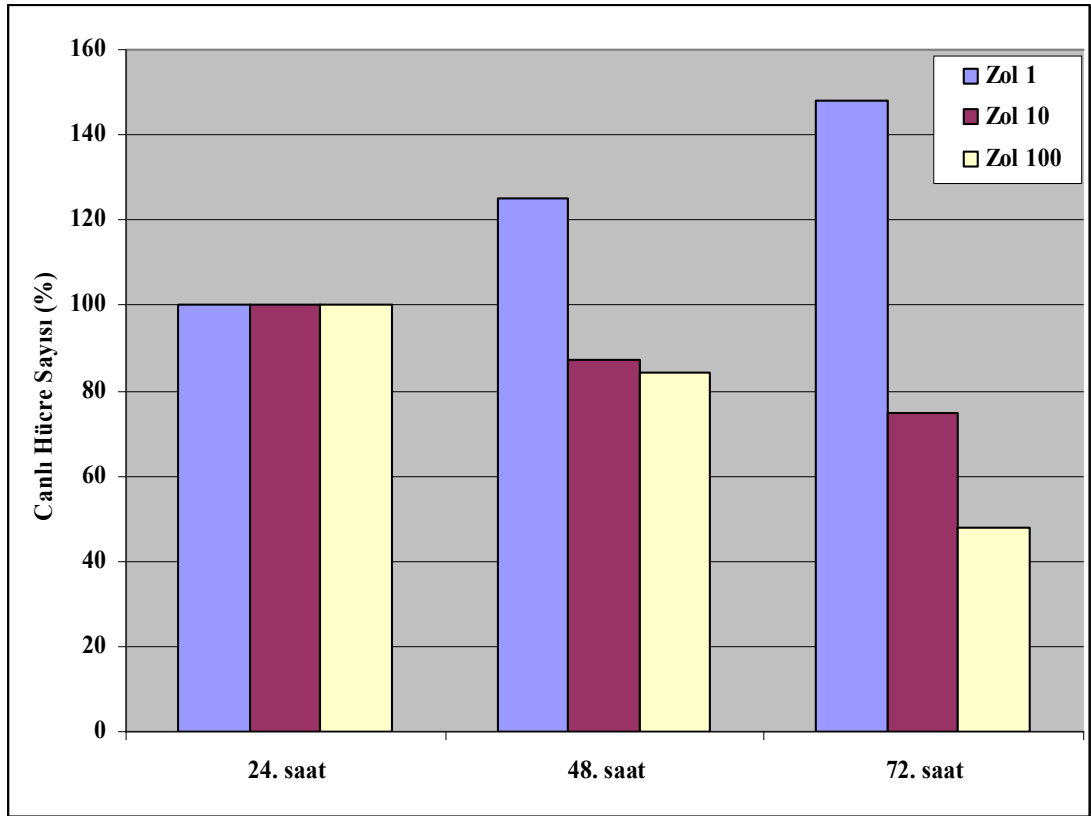
3.1 Zoledronik Asidin MCF-7 Meme Kanseri Hüce Serisi Üzerine Etkisi

Tek başına zoledronik asid uygulanan hüce gruplarında 10 µM/L konsantrasyonundaki zoledronik asid kontrol grubu ile kıyaslandığında MCF-7 hüce sayısını 48. saatte % 13, 72. saatte % 25 oranında azalttığı, 100 µM/L konsantrasyonundaki zoledronik asidin ise MCF-7 hüce sayısını 48. saatte % 16, 72. saatte ise % 52 oranında azalttığı gözlemlendi.

İlk 24 saatte hiçbir test ajanı ve kombinasyonunun etkin olmadığı gözlemlendi.

Zoledronik asidin 1 µM/L konsantrasyonunun 24, 48 ve 72. saatlerde hüce sayısı üzerine etkisi gözlemlenmedi.

Zoledronik asidin değişik konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatlerde MCF-7 meme kanseri hücrelerine olan etkileri Şekil 4’ de grafik olarak gösterilmektedir.



Şekil 4. Zoledronik Asidin Farklı Konsantrasyonlarının Zaman Bağımlı MCF-7 Hüce Sayıları Üzerine Etkileri
(canlı hüce/toplam hüce x 100)

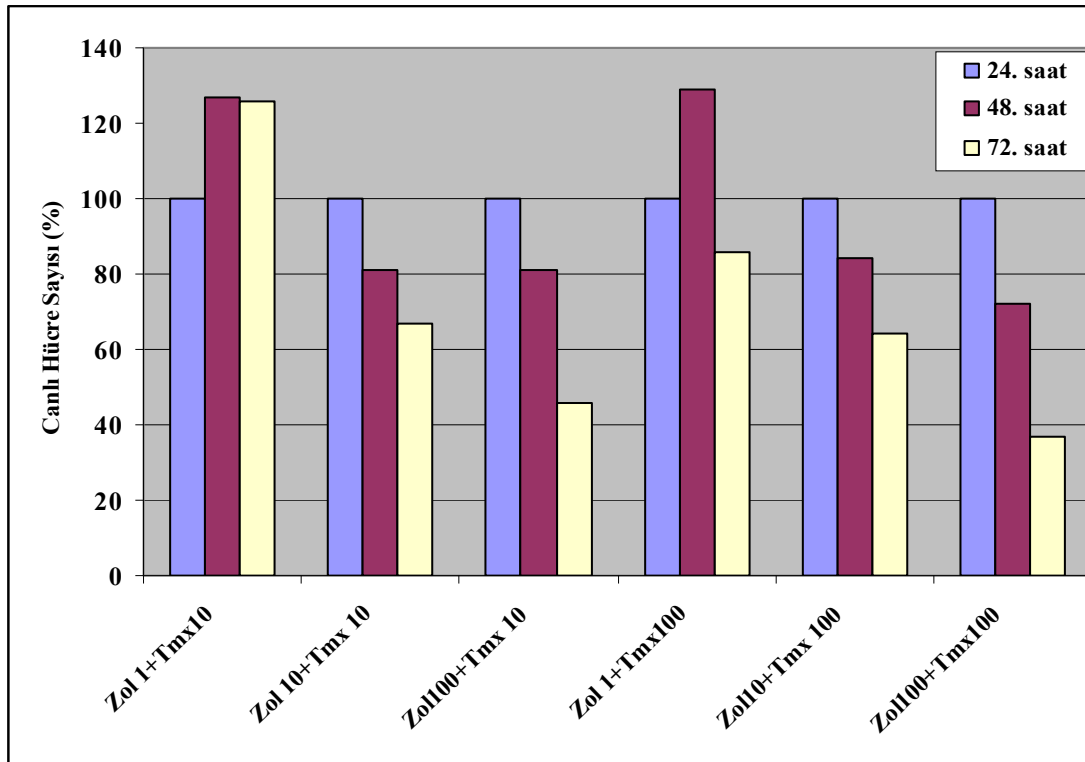
Zol 1= Zoledronik asid 1 µM/L
Zol 10= Zoledronik asid 10 µM/L
Zol 100= Zoledronik asid 100 µM/L

3.2. Zoledronik asid ve Tamoksifen Kombinasyonunun MCF-7 Meme Kanseri Hücre Serisi Üzerine Etkisi

Zoledronik asidin 10 $\mu\text{M/L}$ ile Tamoksifenin 10 nM/L konsantrasyonunun kombine verildiği hücre grubunda hücre sayısında 48. saatte % 19, 72. saatte % 33 azalma gözlemlendi. Zoledronik asidin 10 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonu ile tamoksifenin 100 nM/L konsantrasyonunun kombine verildiği hücre grubunda hücre sayısında 48. saatte % 16, 72. saatte ise % 30 oranında azalma gözlemlendi.

Zoledronik asidin 100 $\mu\text{M/L}$ ile tamoksifenin 10 nM/L konsantrasyonunun kombine verildiği hücre grubunda hücre sayısında 48. saatte % 19, 72. saatte % 54 azalma gözlemlendi. Zoledronik asidin 100 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonu ile tamoksifenin 100 nM/L konsantrasyonunun kombine verildiği hücre grubunda hücre sayısında 48. saatte % 28, 72. saatte ise % 63 oranında azalma gözlemlendi.

Tamoksifen ve zoledronik asidin farklı kombinasyonlarının MCF-7 hücre serileri üzerine olan etkileri Şekil 5’ de grafik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5. Tamoksifen ve Zoledronik Asidin Farklı Dozlardaki Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Serileri Üzerine Olan Etkileri (canlı hücre/toplam hücre x 100)

Zol 1=Zoledronik asid 1 $\mu\text{M/L}$
Tmx 10=Tamoksifen 10 nM/L

Zol 10=Zoledronik asid 10 $\mu\text{M/L}$
Tmx 100=Tamoksifen 10 nM/L

Zol 100=Zoledronik asid 100 $\mu\text{M/L}$

Tamoksifenin tek başına uygulandığı hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında ilk 72 saatte hücre sayılarındaki artışı engellerken hücre sayısı üzerine azaltıcı yönde bir etkisi gözlenmedi. Ancak tamoksifenle zoledronik asidin kombine verildiği hücre gruplarında zoledronik asidin tek başına kullanıldığı hücre gruplarına kıyasla daha fazla etki saptandı. Bu etki özellikle 72. saatte 100 nM/L tamoksifen ve 100 µM/L zoledronik asid kombinasyonunda % 63 oranı ile en belirgindi ($\chi^2=27.4$, $p=0.0000007$).

Zoledronik asidin 1 µM/L ile tamoksifenin 10 ve 100 nM/L konsantrasyonlarının kombine edildiği gruplarda MCF-7 hücre serilerine azaltıcı yönde bir etki gözlenmedi.

Zoledronik asid ve tamoksifen ajanlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının MCF-7 hücre serileri üzerine olan etkinlikleri 48. ve 72. saatlerde yüzde olarak hesaplandı. Bulunan değerler Pearson Ki Kare analizi ile değerlendirilerek zoledronik asid ve tamoksifen kombinasyonlarının en etkin doz ve zamanı hesaplandı. Elde edilen Person Ki Kare (χ^2) ve p değerleri Tablo 8 de gösterildi.

Tablo: 8. Zoledronik Asid ve Tamoksifenin Farklı Konsantrasyonlarının ve Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Serileri Üzerine Olan Etkilerinin Pearson Ki Kare Analizi ile Değerlendirilmesi

	Hücre Sayısını Azaltma Oranı %			
	48. saat	72. saat	χ^2	p
Zol 10	13	25	4.68	0.03
Zol 100	16	52	28.88	0.0000001
Zol10 + Tmx 10	19	33	5.9	0.02
Zol 100 + Tmx 10	19	54	26.43	0.0000003
Zol 10 + Tmx 100	16	36	10.40	0.0012
Zol 100 + Tmx 100	28	63	27.4	0.0000007

Zol 1=Zoledronik asid 1 µM/L
Tmx 10=Tamoksifen 10 nM/L

Zol 10=Zoledronik asid 10 µM/L
Tmx 100=Tamoksifen 10 nM/L

Zol 100=Zoledronik asid 100 µM/L

Pearson Ki Kare Analizi uygulanılarak yapılan istatistiksel analize göre zoledronik asidin 10 ve 100 µM/L konsantrasyonlarının tek başına ve tamoksifenin 10 ile 100 nM/L konsantrasyonlarının kombine edildiği gruplardaki hücre sayıları üzerine olan azaltıcı etkinlikleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Zoledronik asid 10 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonun 48. ve 72. saatlerdeki etkinlikleri kıyaslandığında 72. saatteki etkisi istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu ($\chi^2=4.68$, $p=0.03$).

Zoledronik asid 100 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonun 48. ve 72. saatlerdeki etkinlikleri kıyaslandığında 72. saatteki etkisi istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu ($\chi^2=28.88$, $p=0.0000001$).

Zoledronik asid 10 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonun ile tamoksifenin 10 nM/L dozunun kombine edildiği grubun 48. ve 72. saatleri kıyaslandığında 72. saatteki etkisi istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu ($\chi^2=5.9$, $p=0.02$).

Zoledronik asid 100 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonun ile tamoksifenin 10 nM/L dozunun kombine edildiği grubun 48. ve 72. saatleri kıyaslandığında 72. saatteki etkisi istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu ($\chi^2=26.43$, $p=0.0000003$).

Zoledronik asid 10 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonun ile tamoksifenin 100 nM/L dozunun kombine edildiği grubun 48. ve 72. saatleri kıyaslandığında 72. saatteki etkisi istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu ($\chi^2=10.40$, $p=0.0012$).

Zoledronik asid 100 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonun ile tamoksifenin 100 nM/L dozunun kombine edildiği grubun 48. ve 72. saatleri kıyaslandığında 72. saatteki etkisi istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu ($\chi^2=27.4$, $p=0.0000007$).

Zoledronik asidin DMF ile çözölürölmesinde kullandığımız DMF ile tamoksifenin DMF ile çözölürölmesinde kullandığımız etanol ile oluşturulan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DMF ve etanolün MCF-7 hücre serilerinde hücre sayıları üzerine bir etkisi gözlenmedi.

6. TARTIŞMA

Zoledronik asidin doz ve zaman bağımlı olarak meme kanser hücre serilerinde invitro olarak hücre sayılarını azalttığı ispatlanmıştır. Hughes ve arkadaşları (140) zoledronik asidin osteoklastik aktiviteyi inhibe ederek osteoklast sayısında anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Zoledronik asid ve incadronate gibi nitrogen içerikli bifosfonatlar ile bu etkinin sadece osteoklastlarla sınırlı olmadığı invitro olarak insan multiple myeloma hücre serilerinde gösterildi (142, 143).

Pamidronat, incadronat ve zoledronik asid gibi bifosfonatlarla yapılmış çalışmalarla bifosfonatların makrofaj (154), osteoklast (140, 155) ve myeloma hücrelerinde (142, 143) apoptozise neden olduğu gösterildi.

Thomas ve arkadaşları (24) MCF 7 hücre serilerinde antiprogesterin bir ajan olan RU-486 ve tamoksifen kombinasyonunun ilk 3 günde sinerjistik etkili olduğunu gösterdi.

Zoledronik asidin antitümör etkinliğini nasıl gösterdiği tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte mevalonat sentez yolundaki anahtar enzim olan, farnezil pirofosfatı inhibe edip Ras, Rap1, Rho ve Rab gibi G proteinlerin prenilasyonunu önleyerek bu etkiyi sağladığı düşünülmektedir (140, 141).

Jagdev ve arkadaşlarının (20) MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde, zoledronik asid ve paklitaksel kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde sinerjistik etki yaptığını gösterdikleri çalışmada deney ortamına 100 µM mevalonat yada 50 µM farnesol ilavesi ile zoledronik asidin apoptotik etkisinin önlenmesi bu düşüncüyü desteklemektedir.

Zoledronik asid ve paklitaksel kombinasyonunun doz ve zaman bağımlı olarak MCF-7 hücre serilerinde hücre sayısını azalttığı gösterildi. 0.1-1 µM/L zoledronik asidin uygulamasının MCF 7 hücre sayıları üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı 10 ve 100 µM/L zoledronik asid konsantrasyonlarının MCF 7 hücre sayısında belirgin bir azalmaya neden olduğu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında 100 µM/L zoledronik asidin meme kanseri hücrelerini 72. saatte % 63.5, 96. saatte % 87.1 azaltmakta olduğu gösterildi (20).

Çalışmamızda da Jagdev ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde 1 µM/L zoledronik asid konsantrasyonu uygulanan hücre serisinde 24, 48 ve 72. saatte

hücre sayısı üzerine etkisini gözlemlemedik. 100 µM/L zoledronik asid uygulanan hücre serisinde kontrol grubuna göre hücre sayısında 48. saatte % 16, 72. saatte % 52 azalma gözlemledik.

Fluorescence insitu nick translation metodu kullanarak zoledronik asidin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serilerinde apopitozisi uyardığı gösterilmiştir. 0.1-1 µM zoledronik asidin MCF 7 hücrelerinde apopitozise etkisi az iken 10 µM zoledronik asid 4 kat, 100 µM zoledronik asid 10 kat daha fazla apopitozise neden olmaktadır (20). MDA-MB-231 meme kanseri hücre serilerinde ise 0.1-10 µM konsantrasyondaki zoledronik asidin apopitozis üzerine etkisinin az olduğu 100 µM konsantrasyondaki zoledronik asidin ise 15 kat daha fazla apopitozise neden olduğu gösterilmiştir (20).

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serilerinde *Fluorescence insitu nick translation* metodu kullanılarak yaptıkları analize göre zoledronik asid ve paklitaksel kombinasyonu tek başına kullanılmalarına kıyasla 2 kat daha fazla apopitozise neden olmuştur. 2 µM/L paklitaksel ve 10 µM/L zoledronik asid kombinasyonu zoledronik asidin tek başına kullanımı ile kıyaslandığında 5 kat, paklitakselin tek başına kullanımı ile kıyaslandığında 4 kat daha fazla apopitozise neden olmuştur. Jagdev ve arkadaşlarına göre bu etki zoledronik asid ile paklitaksel arasındaki sinergistik etki sonucu ortaya çıkmaktadır (20).

Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde zoledronik asid ve tamoksifen kombinasyonunun nasıl bir etkisinin olacağı çalışıldı. İlk 72 saatte tamoksifen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde çoğalmayı engellerken tek başına tamoksifen verilen hücre serileri kontrol grupları ile kıyaslandığında hücre sayılarını azaltıcı yönde anlamlı bir etki gözlenmedi. Ancak 10 µM/L zoledronik asid 10 nM/L tamoksifenle kombine edildiğinde zoledronik asidin aynı konsantrasyonunun tek başına kullanımı ile kıyaslandığında hücre sayısını 48. saatte % 6, 72. saatte % 8 oranında daha fazla azalttığı, 10 µM/L zoledronik asid 100 nM/L tamoksifenle kombine edildiğinde zoledronik asidin aynı konsantrasyonunun tek başına kullanımı ile kıyaslandığında hücre sayısını 48. saatte % 6, 72. saatte % 29 oranında daha fazla azalttığı gözlemlendi. 100 µM/L zoledronik asid 100 nM/L tamoksifenle kombine edildiğinde zoledronik asidin aynı konsantrasyonunun tek başına kullanımı ile kıyaslandığında hücre sayısını 48. saatte % 12, 72. saatte % 11 oranında daha fazla

azalttığı gözlemlendi. Bu sinerjistik etki özellikle 100 µM/L zoledronik asidin, 100 nM/L tamoksifenle konsantrasyonu ile kombine edilerek uygulanan hücre grubunda ve 72. saatte hücre sayısı üzerine olan % 63 azaltıcı etki ile en belirgin olarak saptandı ($\chi^2=27.4$, $p=0.0000007$).

Thomas ve arkadaşları (24) MCF-7 hücre serilerinde antiprogesterin bir ajan olan RU-486 ve tamoksifen kombinasyonunun ilk 3 günde sinerjistik etkili olduğunu, 3. günden sonra ise tamoksifenin tek başına kullanılmasına kıyasla tamoksifen, RU-486 kombinasyonun bir üstünlüğü olmadığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda da aynı şekilde ilk 3 gün içerisinde 10 ve 100 µM/L zoledronik asid ile 10, 100 nM/L tamoksifen kombinasyonunun tek başına zoledronik asid ve tek başına tamoksifen uygulaması ile karşılaştırıldığında MCF-7 hücre sayılarını azaltıcı etki bakımından kombine edilen gruplarda hücre sayıları üzerine olan azaltıcı etki daha fazla idi.

Yaptığımız çalışmada 10 ve 100 µM/L zoledronik asid konsantrasyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerini en fazla 72. saatte azalttığı tespit edildi. Bununla birlikte bifosfonatlar mineralize kemiğe daha yüksek bir affinite göstermekte ve hızla kemiğe lokalize olmakta böylelikle klinik uygulamada primer meme kanseri hücreleri veya onun visseral metastazlarındaki kanser hücreleri çok kısa bir periyotta bu bileşiklere maruz kalmaktadırlar. Zoledronik asidin serum tepe konsantrasyonu birkaç saat boyunca 1-3 µM seviyelerinde bulunmuştur (156). Sato ve arkadaşlarının (157) alendronate ile kemik metastazı olan ratlar üzerinde yaptıkları çalışmaya göre bifosfonatlar kemiğe daha yüksek affinite göstermekte ve akut etkileri osteoklastlar üzerinde gözlenmektedir. Bununla birlikte *invivo* olarak 2-6 ve 12 saat süre bifosfonat tedavisi osteoklast haricindeki hücrelerde de bifosfonatların etkisini daha doğru yansıtabilir. Çalışmamıza göre 100 µM zoledronik asid ile MCF-7 hücrelerinin tedavisi bu 12 saatlik periyotta hücre sayıları üzerine anlamlı bir azaltıcı etkiye sahip değildi. Jagdev ve arkadaşları (20) MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serilerinde *Fluorescence insitu nick translation* metodu kullanarak zoledronik asidin erken dönemde meme kanseri hücreleri üzerine olan etkilerini saptamaya çalışmışlar ve ilk 12 saatte çok az apoptozise neden olduğunu göstermişlerdir. Caxon ve arkadaşlarının (158) nitrojen içerikli bifosfonatların makrofajlarda zaman bağımlı

olarak apoptozise neden olduğunu gösterdikleri çalışmada da erken dönemde zoledronik asidin hücre morfolojisi üzerine etkisi çok az bulunmuştur.

Klinik olarak bifosfonatlar endokrin yada kemoterapötik ajanlarla kombine olarak kullanılmaktadır (159). Yoneda T ve arkadaşları (160) meme kanserli fare modellerinde bifosfonatların kemoterapötik ajanların antitümör etkinliğini arttırdıklarını gösterdiler. Çalışmamızda zoledronik asid MCF-7 hücre sayılarını doz ve zaman bağımlı olarak azaltmakta, 100 µM/L zoledronik asid ile 100 nM/L tamoksifen konsantrasyonları kombine edildiğinde 72. saatte hücre sayılarını % 63 oranında azaltmaktadır (p=0.0000007).

Zoledronik asidin meme kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisi açıktır. Bu etkinin kalsiyumla şelat oluşturmasının sonucu olmadığı Jagdev ve arkadaşlarının (20) yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Jagdev ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ilginç olarak MCF-7 ve MDA MB-231 hücre serileri üzerinde farklı seviyelerde zoledronik asid duyarlılığı saptanmıştır. Bunun kesin nedeni belli değildir. MCF-7 hücre serileri agresif tip p53 ekspresyonu yaparken MDA MB-231 hücre serileri ılımlı bir p53 ekspresyonu yapmaktadır (161). Bu farklılık apoptozise olan direnci açıklayabilir. Alternatif olarak MDA MB-231 hücre serileri bazı sitokinler veya lokal *growth* faktörler salgılayarak zoledronik asid tarafından oluşturulan apoptozise karşı direnç geliştirebilirler (162).

Jagdev ve arkadaşları (20) zoledronik asidin MCF-7 hücre serilerinde apoptozise yol açmalarına ilave olarak mevolanat sentez yolunda inhibe ettiklerini göstermişlerdir. Bu inhibisyon Lukman ve arkadaşları (140, 141) tarafından osteoklast hücrelerinde, Shipman ve arkadaşları (142, 143, 155) tarafından insan myeloma hücrelerinde, Rogers ve arkadaşları (154) tarafından makrofaj hücrelerindedir gösterilmiştir. Zoledronik asid ile tedavi edilen meme kanser hücrelerine geranilgeraniol ilavesi ile apoptozisin önlendiği farnesol ilavesi ile hücre ölümünün kısmen önlendiği gösterilmiştir (20). Bifosfonatlar bu yolla osteoklastların yapısını bozabilir ve apoptozise neden olabilir (155). Ters olarak Roger ve arkadaşları (154) makrofajlarda bifosfonatların neden olduğu apoptozisin farnesol ve geranilgeraniol ilavesi ile düzelmediğini göstermişlerdir. Bu çalışmalar arasındaki farklı sonuçların nedeni bilinmemektedir.

Sonuç olarak, zoledronik asid ve tamoksifenin farklı doz ve kombinasyonlarının MCF-7 hücre serileri üzerine olan etkinliklerini mevcut laboratuvar imkanlarımız ölçüsünde direkt MCF-7 hücre sayıları üzerindeki azaltıcı etkiyi saptayarak gösterdik. Bu yöntem *invitro* ilaç etkinliğini saptamada en geçerli yöntemlerden birisidir. Ancak direkt sitotoksik etkinliklerinin yanı sıra hücreyi ölüme götüren apoptozis gibi hücre morfolojileri üzerine olan etkilerinde saptandığı (20, 158) benzer çalışmalardaki gibi kullandığımız ajanların MCF-7 meme kanseri hücre morfolojileri üzerine olan etkilerininide saptayabilmiş olsaydık muhtemelen elde ettiğimiz etkinlik daha yüksek bulunacaktı. Bununla birlikte kullanmış olduğumuz mevcut teknikle zoledronik asidin MCF-7 meme kanseri hücre serilerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre sayısını azalttığını ve tamoksifen ile kombine edildiğinde bu etkinin doz ve zaman bağımlı olarak arttığını gözlemledik.

7. KAYNAKLAR

1. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327-336.
2. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society 2007:2-12
3. 3. Baring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics, 1993. *CA Cancer J Clin* 1993;43:7-26.
4. Murphy B, Muss H. Hormonal therapy of breast cancer: state of the art. *Oncology* 1997;11:7-13.
5. Chang M, Liu H, Jordan VC. Hormone and Growth Factor Receptors. In: Donegan WL, Priatt J.S. (eds). *Cancer of the Breast*, 5th ed. Philadelphia: PA Saunders 2002:417-441.
6. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol* 1995;13:513-529.
7. Tonetti DA, Jordan VC. Possible mechanisms in the emergence of tamoxifen-resistant breast cancer. *Anticancer Drugs* 1995;6:498-507.
8. Sedlacek SM, Horowitz KB. The role of progestins and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Steroids* 1984;44:467-484.
9. Goldhirsch A, Gelber RD. Endocrine therapies of breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23:494-505.
10. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-1467.
11. Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997;80:1588-1594.
12. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
13. Hatoum HT, Lin SJ, Smith MR, Barghout V, Lipton A. Zoledronic acid and skeletal complications in patients with solid tumors and bone metastases: analysis of a national medical claims database. *Cancer* 2008;113:1438-1445.
14. Li EC, Davis LE. Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. *Clin Ther* 2003;25:2669-2708.
15. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Graham R, Russell G, Croucher PI. Anti-tumour activity of bisphosphonates in human myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 1998;32:129-138.
16. Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Current status of endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 2003;10:105-111.
17. Budman DR, Calabro A. Zoledronic acid (Zometa) enhances the cytotoxic effect of gemcitabine and fluvastatin: in vitro isobologram studies with conventional and nonconventional cytotoxic agents. *Oncology* 2006;70:147-153.

18. Ottewell PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1167-1178.
19. Daubiné F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Clézardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:322-330.
20. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-H A, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 2001;84:1126-1134.
21. Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19:615-621.
22. Sutherland RL, Hall RE, Taylor IW. Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Res* 1983;43:3998-4006.
23. Reddel RR, Murphy LC, Hall RE, Sutherland RL. Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Res* 1985;45:1525-1531.
24. Thomas M, Monet JD. Combined effects of RU486 and tamoxifen on the growth and cell cycle phases of the MCF-7 cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:865-870.
25. Jemal A, Siegel R., Ward E. Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer Statistics 2008 *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
26. Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı Bakanlık Yayınları Ankara 2002;618:145.
27. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. *N Engl J Med*. 1992;327:319-328.
28. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 2005;23:276-292.
29. Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin* 1995;45:263-278.
30. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 2005;23:276-292.
31. Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1126-1135.
32. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J, Morreau H, Klijn JG, Hoogerbrugge N, et al. The CHEK2*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer Res* 2003;63:8153-8157.

33. Fung YK, T'Ang A. The role of the retinoblastoma gene in breast cancer development. *Cancer Treat Res* 1992;61:59-68.
34. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992;13:3-17.
35. Sainsbury JR, Nicholson S, Angus B, Farndon JR, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status of histological sub-types of breast cancer. *Br J Cancer* 1988;58:458-460.
36. Perren TJ. c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991;63:328-332.
37. Kurebayashi J. Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2001;8:45-51.
38. Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:143-164.
39. von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000;62:51-62.
40. Walker RA, Wilkinson N. p21 ras protein expression in benign and malignant human breast. *J Pathol* 1988;15:147-153.
41. Sierra A, Castellsagué X, Escobedo A, Lloveras B, García-Ramírez M, Moreno A, et al. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:142-147.
42. Polyak K. Breast cancer gene discovery. *Expert Rev Mol Med* 2002;4:1-18.
43. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088-2090.
44. Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Krailo MD, Pike MC. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* 1985;56:1206-1208.
45. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Tozzi L. Lifelong menstrual pattern and risk of breast cancer. *Oncology* 1993;50:222-225.
46. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;15:17-35.
47. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997;350:1047-1059.
48. Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, Meadows AT. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1996;334:745-751.

49. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Speizer FE. Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1987;316:1174-1180.
50. Gapstur SM, Potter JD, Sellers TA, Folsom AR. Increased risk of breast cancer with alcohol consumption in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1992;136:1221-1231.
51. Vachon CM, Cerhan JR, Vierkant RA, Sellers TA. Investigation of an interaction of alcohol intake and family history on breast cancer risk in the Minnesota Breast Cancer Family Study. *Cancer* 2001;92:240-248.
52. Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, Trichler DL, Yaffe MJ. Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:1133-1144.
53. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 1993;71:1258-1265.
54. Escobar PF, Patrick RJ, Rybicki LA, Weng DE, Crowe JP. The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups. *Ann Surg Oncol* 2007;14:143-147.
55. Spratt JS, Spratt SW. Medical and legal implications of screening and follow-up procedures for breast cancer. *Cancer* 1990;66:1351-1362.
56. Skrabanek P. False premises and false promises of breast cancer screening. *Lancet* 1985;2:316-320.
57. Kamby C, Vejborg I, Kristensen B, Olsen LO, Mouridsen HT. Metastatic pattern in recurrent breast cancer. Special reference to intrathoracic recurrences. *Cancer* 1988;62:2226-2233.
58. Clavien PA, Laffer U, Torhost J, Harder F. Gastro-intestinal metastases as first clinical manifestation of the dissemination of a breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1990;16:121-126.
59. Bendell JC, Domchek SM, Burstein HJ, Harris L, Younger J, Kuter I, et al. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2003;97:2972-2977.
60. James JJ, Evans AJ, Pinder SE, Gutteridge E, Cheung KL, Chan S, et al. Bone metastases from breast carcinoma: histopathological - radiological correlations and prognostic features. *Br J Cancer* 2003;89:660-665.
61. Schapira DV, Urban N. A minimalist policy for breast cancer surveillance. *JAMA* 1991;265:380-382.
62. te Boekhorst DS, Peer NG, van der Sluis RF, Wobbes T, Ruers TJ. Periodic follow-up after breast cancer and the effect on survival. *Eur J Surg* 2001;167:490-496.
63. The GIVIO Investigators. Impact of follow-up testing on survival and health-related quality of life in breast cancer patients. A multicenter randomized controlled trial. *JAMA* 1994;271:1587-1592.

64. Rosselli Del Turco M, Palli D, Cariddi A, Ciatto S, Pacini P, Distante V. Intensive diagnostic follow-up after treatment of primary breast cancer. A randomized trial. National Research Council Project on Breast Cancer follow-up. JAMA 1994;271:1593-1597.
65. Bancej C, Decker K, Chiarelli A, Harrison M, Turner D, Brisson J. Contribution of clinical breast examination to mammography screening in the early detection of breast cancer. J Med Screen 2003;10:16-21.
66. Kopans DB. The positive predictive value of mammography. AJR Am J Roentgenol 1992;158:521-526.
67. Bird RE, Wallace TW, Yankaskas BC. Analysis of cancers missed at screening mammography. Radiology 1992;184:613-617.
68. Leitch AM, Dodd GD, Costanza M, Linver M, Pressman P, McGinnis L, Smith RA. American Cancer Society guidelines for the early detection of breast cancer: update 1997. CA Cancer J Clin 1997;47:150-153.
69. Fletcher SW, Elmore JG. Clinical practice. Mammographic screening for breast cancer. N Engl J Med 2003;348:1672-1680.
70. Bassett LW. Imaging of breast masses. Radiol Clin North Am 2000;38:669-691.
71. Hilton SV, Leopold GR, Olson LK, Willson SA. Real-time breast sonography: application in 300 consecutive patients. AJR Am J Roentgenol 1986;147:479-486.
72. Bergonzi M, Calliada F, Passamonti C, Campani R, Bottinelli O, Genovese E, et al. Color Doppler in the echographic evaluation of breast nodules. Radiol Med (Torino) 1990;79:178-181.
73. Lee SG, Orel SG, Woo IJ, Cruz-Jove E, Putt ME, Solin LJ, et al. MR imaging screening of the contralateral breast in patients with newly diagnosed breast cancer: preliminary results. Radiology 2003;226:773-778.
74. Lee JM, Orel SG, Czerniecki BJ, Solin LJ, Schnall MD. MRI before reexcision surgery in patients with breast cancer. AJR Am J Roentgenol 2004;182:473-480.
75. Roehrig J, Castellino RA. The promise of computer aided detection in digital mammography. Eur J Radiol 1999;31:35-39.
76. Bombardieri E, Crippa F, Baio SM, Peeters BA, Greco M, Pauwels EK. Nuclear medicine advances in breast cancer imaging. Tumori 2001;87:277-287.
77. Dose Schwarz J, Bader M, Jenicke L, Hemminger G, Jänicke F, Avril N. Early prediction of response to chemotherapy in metastatic breast cancer using sequential 18F-FDG PET. J Nucl Med 2005;46:1144-1150.
78. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press Lyon 2003; 32-34.

79. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:1046-1052.
80. Haris GC, Pinder SE, O'Malley FP. Invasive carcinoma: special types. In: *Breast Pathology*. O'Malley FP, Pinder SE (eds). Philadelphia: Churchill Livingstone 2006:201-223.
81. du Toit RS, Locker AP, Ellis IO, Elston CW, Nicholson RI, Robertson JF, et al. An evaluation of differences in prognosis, recurrence patterns and receptor status between invasive lobular and other invasive carcinomas of the breast. *Eur J Surg Oncol* 1991;17:251-257.
82. Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, Krebs P, Otis CN, Merino MJ. Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1650-1656.
83. Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:1259-1263.
84. Mersin H, Yildirim E, Bulut H, Berberoğlu U. The prognostic significance of total lymph node number in patients with axillary lymph node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:132-138.
85. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989;64:1914-1921.
86. Veronesi U, Costa A, Zurrida S, Goldhirsch A, Colleoni M, Ciniéri S, et al. European Institute of Oncology; European School of Oncology. Breast cancer at the end of a successful century: meeting highlights from the First Milan Breast Cancer Conference and discussion paper for the Second Conference (Milan, 14-16 June, 2000). *Breast* 2000;9:161-170.
87. Kuru B, Camlibel M, Gulcelik MA, Alagol H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. *J Surg Oncol* 2003;83:167-172.
88. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 2002;41:154-161.
89. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008 Jul 1;26:3153-3158.
90. Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 1988;15:20-25.
91. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1260-1266.

92. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *Natl Cancer Inst* 2000;92:1991-1998.
93. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, et al. *cerbB-2*, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1346-1360.
94. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:153.
95. Recht A, Connolly JL, Schnitt SJ, Silver B, Rose MA, Love S, Harris JR. The effect of young age on tumor recurrence in the treated breast after conservative surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;14:3-10.
96. Giordano SH, Valero V, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Efficacy of anastrozole in male breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2002;25:235-237.
97. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1233-1241.
98. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *N Engl J Med* 1995;333:1444-1455.
99. Arriagada R, Lê MG, Rochard F, Contesso G. Conservative treatment versus mastectomy in early breast cancer: patterns of failure with 15 years of follow-up data. Institut Gustave-Roussy Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996;14:1558-1564.
100. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1227-1232.
101. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, et al. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med* 1985;312:674-681.
102. Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol* 2001;12:23-28.
103. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, et al. *erbB-2* and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1361-1370.
104. Piccart MJ, Di Leo A, Hamilton A. HER2. a 'predictive factor' ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer* 2000;36:1755-1761.
105. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-2648.

106. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-1717.
107. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002;359:2131-2139.
108. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005;365:60-62.
109. Dowsett M, Cuzick J, Howell A, Jackson I; ATAC Trialists' Group. Pharmacokinetics of anastrozole and tamoxifen alone, and in combination, during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer in postmenopausal women: a sub-protocol of the 'Arimidex and tamoxifen alone or in combination' (ATAC) trial. *Br J Cancer* 2001;85:317-324.
110. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;352:930-942.
111. Bang SM, Heo DS, Lee KH, Byun JH, Chang HM, Noh DY, et al. Adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide versus cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil chemotherapy in premenopausal women with axillary lymph node positive breast carcinoma. *Cancer* 2000;89:2521-2526.
112. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol* 1990;8:1483-1496.
113. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005 ;352:2346-2348.
114. Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VH, Shepherd LE, Tu D, Paul N. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5. *J Clin Oncol* 2005;23:5166-5170.
115. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, Martino S, et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:976-983.
116. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28 2005;23:3686-3696.

117. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1652-1654.
118. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2672-2685.
119. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE Jr, Mamounas EP, Fisher B, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2006;24:2019-2027.
120. Shenkier T, Weir L, Levine M, Olivetto I, Whelan T, Reyno L. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 15. Treatment for women with stage III or locally advanced breast cancer. *CMAJ* 2004;171:219-220.
121. Favret AM, Carlson RW, Goffinet DR, Jeffrey SS, Dirbas FM, Stockdale FE. Locally advanced breast cancer: is surgery necessary? *Breast J* 2001;7:131-137.
122. Recht A, Come SE, Henderson IC, Gelman RS, Silver B, Hayes DF, et al. The sequencing of chemotherapy and radiation therapy after conservative surgery for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 1996;334:1356-1361.
123. Clark GM, Sledge GW Jr, Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1987;5:55-61.
124. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 2003;97:545-553.
125. Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, Martinez-Agullo A, Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999;56:67-78.
126. Parnes HL, Cirincione C, Aisner J, Berry DA, Allen SL, Abrams J, et al. Phase III study of cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil (CAF) plus leucovorin versus CAF for metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B 9140. *J Clin Oncol* 2003;21:1819-1824.
127. Efficace F, Biganzoli L, Piccart M, Coens C, Van Steen K, Cufer T, et al. Baseline health-related quality-of-life data as prognostic factors in a phase III multicentre study of women with metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:1021-1030.
128. Waddell JA. Treatment-experienced breast cancer: new pathways for improving survival. Introduction. *Am J Health Syst Pharm* 2008;65:2-3.
129. Nabholz JM, Bonnetterre J, Buzdar A, Robertson JF, Thürlimann B. Anastrozole (Arimidex) versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: survival analysis and updated safety results. *Eur J Cancer* 2003;39:1684-1689.

130. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Pérez-Carrión R, Boni C, Monnier A, et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2001;19:2596-2606.
131. Buzdar A, Douma J, Davidson N, Elledge R, Morgan M, Smith R, et al. Phase III, multicenter, double-blind, randomized study of letrozole, an aromatase inhibitor, for advanced breast cancer versus megestrol acetate. *J Clin Oncol* 2001;19:3357-3366.
132. Buzdar AU, Jonat W, Howell A, Jones SE, Blomqvist CP, Vogel CL, et al. Anastrozole versus megestrol acetate in the treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma: results of a survival update based on a combined analysis of data from two mature phase III trials. Arimidex Study Group. *Cancer* 1998;83:1142-1152.
133. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-726.
134. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, et al. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol* 2008;26:4672-4678.
135. Gaze MN, Kelly CG, Kerr GR, Cull A, Cowie VJ, Gregor A, et al. Pain relief and quality of life following radiotherapy for bone metastases: a randomised trial of two fractionation schedules. *Radiother Oncol* 1997;45:109-116.
136. Steenland E, Leer JW, van Houwelingen H, Post WJ, van den Hout WB, et al. The effect of a single fraction compared to multiple fractions on painful bone metastases: a global analysis of the Dutch Bone Metastasis Study. *Radiother Oncol* 1999;52:101-109.
137. Lang FF, Sawaya R. Surgical treatment of metastatic brain tumors. *Semin Surg Oncol* 1998;14:53-63.
138. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee GC, Janjan NA, et al. American Society of Clinical Oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:4042-4057.
139. Fleisch HA. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med* 1997;29:55-62.
140. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478-1487.
141. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998;13:581-589.

142. Shipman CM, Croucher PI, Russell RG, Helfrich MH, Rogers MJ. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 1998;58:5294-5297.
143. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997;98:665-672.
144. van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Löwik C, Papapoulos S. Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:698-705.
145. Boissier S, Magnetto S, Frappart L, Cuzin B, Ebetino FH, Delmas PD, Clezardin P. Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res* 1997;57:3890-3894.
146. Magnetto S, Boissier S, Delmas PD, Clezardin P. Additive antitumor activities of taxoids in combination with the bisphosphonate ibandronate against invasion and adhesion of human breast carcinoma cells to bone. *Int J Cancer* 1999;83:263-269.
147. Yuasa T, Kimura S, Ashihara E, Habuchi T, Maekawa T. Zoledronic acid a multiplicity of anti-cancer action. *Curr Med Chem* 2007;14:2126-2135.
148. Green JR, Müller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994;9:745-751.
149. Jordan VC, Fritz NF, Langan-Fahey S, Thompson M, Tormey DC. Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1488-1491.
150. Lonning PE, Johannessen DC, Lien EA, Ekse D, Fotsis T, Adlercreutz H. Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52:491-496.
151. Nahari C, Tepper R, Beyth Y, Flex D, Figer A, Cohen I. Long-term trans 1 ultrasonographic endometrial follow-up in postmenopausal breast cancer patients with tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol* 1999;74:222-226.
152. Love RR, Barden HS, Mazess RB, Epstein S, Chappell RJ. Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Arch Intern Med* 1994;154:2585-2588.
153. Polin SA, Ascher SM. The effect of tamoxifen on the genital tract. *Cancer Imaging*. 2008 Jun 30;8:135-145.
154. Rogers MJ, Chilton KM, Coxon FP, Lawry J, Smith MO, Suri S, Russell RG. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 1996;11:1482-1491.
155. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate

- pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;9:133-138.
156. Berenson JR, Ravera C, Ma P, Deckert F, Sasaki Y, Saeki T, et al. Population Pharmacokinetics (PK) of Zometa. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19: 2000 (abstr 814)
 157. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095-2105.
 158. Coxon FP, Benford HL, Russell RG, Rogers MJ. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 1998;54:631-638.
 159. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 1998;339:357-363.
 160. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 2000;88:2979-2988.
 161. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997;57:4285-4300.
 162. Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res* 2000;15:2211-2221.

ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Yozgat' ın Yenifakılı ilçesinde doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise tahsilimi Kayseri' de tamamladıktan sonra 1993 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi' nden mezun oldum. Yozgat Sağlık Müdürlüğü' ne bağlı olarak çeşitli birimlerde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda ihtisasa başladım ve halen bu göreve devam etmekteyim. Evli ve bir erkek çocuk babasıyım. Yabancı dilim İngilizce'dir.