

CDDO-Me'nin Meme Kanseri Hücrelerindeki Etkilerinin Tamoxifen ve Docetaxel ile Karşılaştırılması

Comparison of the Effects of CDDO-Me with Tamoxifen and Docetaxel on Breast Cancer Cells

Gülsüm ABUŞOĞLU ^{1*}, Cengiz KOÇAK ², Fatma Emel KOÇAK ³, Bahadır ÖZTÜRK ⁴,
Hüsamettin VATANSEV ⁴

¹ Selçuk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Konya, Türkiye

² Kütahya Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, Kütahya, Türkiye

³ Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Kütahya, Türkiye

⁴ Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Konya, Türkiye

Ö Z E T

Amaç: Oleanolik asitten türetilen sentetik triterpenoidlerin, güçlü antiproliferatif ve antitümörojenik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Bu çalışmada, bir triterpenoid olan CDDO-Me'nin insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini, meme kanserinin rutin tedavisinde kullanılan Tamoxifen ve Docetaxel ile karşılaştırarak araştırmaktır.

Materyal Metod: CDDO-Me, Docetaxel ve Tamoxifen'in sitotoksik etkilerini incelemek için meme kanseri hücreleri olarak MCF-7 ve MDA MB-231 hücre hatları tercih edildi. Her bir ilacın çeşitli dozları hücrelere uygulanarak sitotoksik etkileri xCELLigence cihazı ile belirlendi ve ilaçların IC₅₀ değerleri belirlendi. IC₅₀ dozlarıyla muamele edilen hücrelerden hücre blokları hazırlanarak, histolojik ve immünohistokimyasal boyama ile proliferasyon indeksi Ki-67 ve Cyclin D1, antiapoptotik Bcl-2 ve proapoptotik Bax protein ekspresyonları skorlandı.

Bulgular: CDDO-Me, Docetaxel ve Tamoxifen her iki hücre hattında hücre canlılığını istatistiksel olarak önemli bir şekilde inhibe etti. CDDO-Me'nin Tamoxifen ve Docetaxel ile etkileri moleküler düzeyde karşılaştırıldığında, her iki hücre hattında da apoptoz yolağı açısından CDDO-Me'nin, Tamoxifen ve Docetaxel'e göre istatistiksel olarak daha etkili olduğu (p<0.001) sonucuna varıldı. Hücre döngüsü açısından ise MCF-7 hücrelerinde CDDO-Me'nin Tamoxifen ile istatistiksel olarak benzer etkiler gösterdiği ve Docetaxel'in bu hücre hattında istatistiksel olarak daha etkin olduğu (p<0.001) ve MDA MB-231 hücrelerinde ise CDDO-Me'nin Docetaxel ile istatistiksel olarak benzer etkiler gösterdiği ve Tamoxifenin bu hücre hattında istatistiksel olarak daha etkin olduğu gözlemlendi (p<0.001).

Sonuç: CDDO-Me'nin antiproliferatif ve apoptoz indükleyici etkileri, rutin meme kanseri tedavisinde kullanılan Tamoxifen ve Docetaxel'in etkilerine göre her iki meme kanseri tipinde farklılık gösterse de, CDDO-Me, meme kanseri tedavisinde alternatif bir kemoterapötik ajan olabilir. Ayrıca bu çalışmanın sonuçları gelecekte yapılacak *in vivo* çalışmalara yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, CDDO-Me, Docetaxel, meme kanseri, Tamoxifen

Alınış / Received: 29.12.2021 Kabul / Accepted: 14.04.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 31.08.2022



ABSTRACT

Objectives: Synthetic triterpenoids derived from oleanolic acid are known to have strong antiproliferative and antitumorigenic activity. The aim of this study is to investigate the the cytotoxic effects of CDDO-Me, a triterpenoid, on human breast cancer cell lines by comparing it with Tamoxifen and Docetaxel, which are used in the routine treatment of breast cancer.

Material- Method: MCF-7 and MDA MB-231 were preferred as breast cancer cells to study the cytotoxic impressions of CDDO-Me, Docetaxel and Tamoxife. By applying various doses of each drug to both cells, its cytotoxic effects were determined by xCELLigence. Cell blocks were equipped and scoring the expressions of Ki-67 and Cyclin-D1 (proliferation index), antiapoptotic Bcl-2, proapoptotic Bax by histological and immunohistochemical staining in the blocks.

Results: CDDO-Me, Docetaxel and Tamoxifen inhibited the cell viability of both cells. When the effects of CDDO-Me with Tamoxifen and Docetaxel were compared at the molecular level, it was concluded that CDDO-Me was statistically more effective than Tamoxifen and Docetaxel in terms of apoptosis pathway in both cell lines ($p<0.001$). In terms of cell cycle, CDDO-Me showed statistically similar effects with Tamoxifen in MCF-7 cells and Docetaxel was statistically more effective in this cell line ($p<0.001$) and CDDO-Me showed statistically similar effects with Docetaxel in MDA MB-231 cells and Tamoxifen was statistically more effective in this cell line ($p<0.001$).

Conclusion: Although the antiproliferative and apoptosis-inducing effects of CDDO-Me differ in both types of breast cancer according to the effects of Tamoxifen and Docetaxel used in routine breast cancer treatment, CDDO-Me may be an alternative chemotherapeutic agent in the treatment of breast cancer and results of this study may guide *in vivo* studies in future.

Keywords: Apoptosis, breast cancer, CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen



1. Giriş

Meme kanseri, kadınlarda kanserden ölümlerin en alışılmış nedeni olmakla beraber, özellikle BRCA genlerindeki mutasyon sebebiyle "üçlü negatif" meme kanserlerinin tedavisinin genellikle başarısız olmasından dolayı meme kanseri insidansındaki artışın önüne geçilememektedir [1,2]. Bununla birlikte östrojen reseptörü pozitif (ER +) meme kanseri, tedaviye daha duyarlı olması nedeniyle, östrojen reseptörü negatif (ER -) meme kanserine kıyasla daha az görülme sıklığına sahiptir [3,4]. ER (+) meme kanserinin tedavisi için Tamoxifen, Raloxifene, Doxorubicin ve Docetaxel gibi birçok ilaç geliştirilmiş [5] olmasına rağmen, ER (-) meme kanserinde hem yan etkilerinden hem de tedaviye olumsuz yanıtlardan dolayı bu tür ilaçların sınırlı kullanımı, meme kanserinin prognozunda sorunlara neden olmuştur [6]. Bu nedenle istenmeyen yan etkilerden arındırılmış ve tedavide etkileyici yeni ajanların geliştirilmesi için yeni yaklaşımlar önem kazanmıştır.

Triterpenoidler, şifalı bitkiler başta olmak üzere biberiye ile kekikte ve elma gibi bazı meyvelerde bulunan doğal bileşiklerdir [7,8]. Bu bileşiklerin biyolojik önemi tam olarak aydınlatılamasa da, özellikle Asya tıbbında da kullanılan oleanolik asit, antioksidan ve antiproliferatif özelliklere sahip doğal bir triterpenoiddir [7-10]. Oleanolik asit türevi CDDO ve onun C28 modifiye analogları olan metil esterleri (CDDO-Me; NSC713200, Bardoxolone Methyl, 2-siyano-3,12-diokso-oleana-1,9(11)-dien-28-oik asit metil ester), prelinik ve klinik çalışmalarda tümör hücrelerinde antiproliferatif etkileri ve apoptozu

indüklenme yetenekleri ile ön plana çıkmıştır [7-14]. CDDO-Me'nin antioksidan ve antiproliferatif yeteneğinin, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1/nükleer faktör 2-ilişkili faktör 2 yolunun efektif bir şekilde yeniden etkinleştirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [14-16]. Yapılan çalışmalarda CDDO-Me'nin nanomolar konsantrasyonlarının, inflamasyonu ve oksidatif stresi baskılayarak iyileştirici etkiler gösterdiği gösterilmiştir [11, 15, 17, 18]. Antikanser etki mekanizması tam olarak net olmasa da çalışmalardan elde edilen veriler, CDDO-Me'nin MAPK yolunu (Erk1/2) kullanarak hücre proliferasyonu inhibisyonunu gerçekleştirebildiğini açıklamaktadır [19-21].

Kanser gibi giderek yaygınlaşan ve tedavi şansı erken teşhise bağlı olan hastalık türlerinde tedavi için, yan etkileri en aza indirecek yeni etkin bir ilaç veya kemopreventiflerin bulunması gerekmektedir. Bu çalışmada incelediğimiz CDDO-Me'nin daha önceki yapılan çalışmalarda *in vitro* olarak meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe etmede etkin olduğu gösterilmiştir, [9, 13, 21-26].

Ball ve ark. meme dokusundaki hücreleri CDDO-Me (10-1000 nM) ile muamele etmiş ve sonuç olarak CDDO-Me'nin hücre canlılığını inhibe ettiğini, tümör ilişkili makrofajların immünosupresif aktivasyonunu azalttığını ve immün uyarıcıların (TNF- α , IFN- γ ve IL-6) hem mRNA hem de protein ekspresyonunu artırdığı ve aynı şekilde tümör uyarıcıların (IL-10 ve VEGF) ekspresyonlarını da azalttığını gözlemişlerdir [9]. Lapillone ve ark. farklı meme kanseri hücre hatlarına CDDO-Me (50-1000 nM) uygulamasının ardından, CDDO-Me'nin hücrelerin büyümeyi inhibe ettiğini, apoptozu ve hücre döngüsü tutuklamasını indüklediğini göstermişlerdir [13]. CDDO-Me'nin etkinliğini hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gösteren Tran ve ark., CDDO-Me'nin (50 mg/kg diyet; 100-600 nM) ER (-) tümör hücrelerinde matris metalloproteinaz-9 salgılanması ile siklin D1 ekspresyonunu inhibe ederek ve epidermal büyüme faktörü reseptörü ile STAT3'ün fosforilasyonunu azaltarak bu hücrelerin proliferasyonunu azalttığı sonucuna varmışlardır [21]. Yine CDDO-Me'nin (100-300 nM) etkinliğini hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak çalışan Liby ve ark. çalışmasında, CDDO-Me'nin *in vivo* kısımda tümör hacminin yaklaşık % 85'inde azalmaya neden olduğunu, bunun yanı sıra *in vitro* kısımda özellikle ER (-) hücre proliferasyonunu azalttığı yönünde sonuçlar almışlardır [22]. Hyer ve ark.'nın *in vivo* ve *in vitro* olarak tasarladığı çalışmalarında CDDO-Me'nin (250-1000 nM) yine tümör büyümesini ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve apoptozu tetiklediği sonucuna varmışlardır [23]. Ling ve ark. CDDO-Me'nin (500 nM) etkinliğini özellikle meme kanserinde aşırı eksprese edilen STAT-3 protein inaktivasyonu yoluyla metastatik meme kanseri tümör büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır [24]. Kim ve ark.'nın çalışmasında CDDO-Me (100-300 nM) maruziyeti sonucu BRCA1-mutasyonlu meme kanseri hücrelerinde, hücre döngüsündeki G2/M fazının inhibisyonuyla apoptozu indüklediği yönünde sonuca varılmıştır [25]. Jeong ve ark. ise CDDO-Me'nin (500-2000 nM) çeşitli meme kanseri hücrelerine uygulaması sonucu meme kanseri hücrelerinde ER kaynaklı vakuolasyona ve hücre ölümüne katkı sağlayan intrasellüler Ca²⁺ düzeylerinde artışa neden olduğunun yanı sıra c-FLIPL aşağı regülasyonu yoluyla kaspaz aktivasyonuyla hücrelerde apoptozu tetiklediği sonucuna varmışlardır [26].

Tüm bu çalışmalar, CDDO-Me'nin özellikle meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabileceği yönünde çıktılar vermektedir. Ancak CDDO-Me'nin moleküler etkileri, meme kanseri tedavisinde rutin olarak kullanılan Tamoxifen ve Docetaxel'in moleküler etkileri ile karşılaştırılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı, CDDO-Me'nin hormon sensitif ve hormon non-sensitif meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitolojik, morfolojik ve sitotoksik etkilerini, Tamoxifen ve Docetaxel ile kıyaslamaktır.

2. Materyal ve Metot

Hücre Kültürü Çalışmaları

Meme kanseri hücreleri olarak MCF-7 (ER+, PR+, HER+) ve MDA MB-231 (ER-, PR-, HER-) hücre hatları bu çalışmada kullanılmak üzere, American Type Culture Collection'dan (ATCC, Manassas, VA, ABD) satın alınmıştır. Analizlere başlamadan önce, her iki hücre hattı da %10 Fetal Bovine Serum ve %1 penisilin/streptomisin L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium'da çoğaltılmıştır. Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için %5 CO₂ içeren, 37°C sıcaklıkta olan nemli bir inkübatör kullanılmıştır. Hücreler yaklaşık %80-85 oranında büyüdükten sonra tripsinize edilip, pasajlanarak analizlere kadar -80 °C'de stoklanmıştır.

Hücre Canlılığı ve Sitotoksiste

Antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini gözlemlemek için her iki hücre hattında CDDO-Me ve Docetaxel nanomolar (nM), Tamoxifen ise mikromolar (μM) düzeylerde hazırlanıp kullanılmıştır. Bunun için, hücreler her bir kuyucuk başına 1×10^5 olacak şekilde 16 kuyucuklu e-plakalarda kültüre edilmiş ve 24 saat boyunca hücreler inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücrelere çeşitli dozlarda CDDO-Me (1-100 nM), Tamoxifen (1-100 μM) ve Docetaxel (1-100 nM) uygulanmış ve uygulanan tüm ilaçların hücre canlılığı analizi ile IC_{50} hesaplamaları xCELLigence sistemi (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Almanya) ile belirlenmiştir. Tüm sistemde normalizasyon yapabilmek adına IC_{50} değerleri her ilaç ve her hücre için yaklaşık 48. saatlerde hesaplanmıştır.

Hücre Bloklarının Hazırlanması: Sitolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

Her iki hücre hattı da daha önce ilaçların sitotoksiste analizlerinde belirlenen IC_{50} dozlarıyla 48 saat muamele edilmiş ve hücre blokları bu hücrelerden hazırlanmıştır. Hücreler, tripsinizasyon olmadan steril bir kazıyıcı ile kaldırılarak, %90 etil alkol ve %10 nötral tamponlanmış formalin ile sabitlenmiştir. Bu işlemden sonra hücreler steril eppendorflara aktarılarak 2000 x r.p.m.'de santrifüjlenmiş ve tüplerin dibine çöken pellet, sitoblok kiti (Shandon Cytoblock Cell Block Preparation System, Thermo Fisher Scientific Inc., Cheshire, UK) ile kasetlere bloklanmıştır. Kasetler, oda sıcaklığında %10'luk nötral formalin içinde bekletilerek sabitlenmiş ve ardından hücre blokları parafine gömülmüştür.

Histolojik ve İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürleri

Hücre blokları bir mikrotom (Leica RM2245, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, ABD) yardımıyla (4 μm kalınlığında) hazırlanarak, Hematoxylin-Eosin (H&E) ile boyanmıştır. Boyanan kesitler daha sonra mikroskopla (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) incelenmiş ve immünohistokimyasal analizler için Ki-67 (rabbit monoclonal primary antibody, clone 30-9, Roche), Bcl-2 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP66, Roche), Cyclin-D1 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP4-R, Roche) ve Bax (rabbit polyclonal primary antibody, Dako) immün boyamaları yapılmıştır. Herhangi bir ilaçla tedavi edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. H&E ile boyanan kesitler mikroskopta incelenmiş ve rastgele seçilen 10 alandan H&E ile boyanmış hücreler sayılarak ortalamaları alınmıştır. Ki-67, Bcl-2, Bax ve Cyclin-D1 boyamaları ışık mikroskopunda (Olympus BX51) değerlendirilmiş ve yine rastgele seçilen alanlardan 100 hücrede pozitif boyanan hücreler sayılarak pozitif boyanan hücrelerin yüzdeleri hesaplanmıştır.

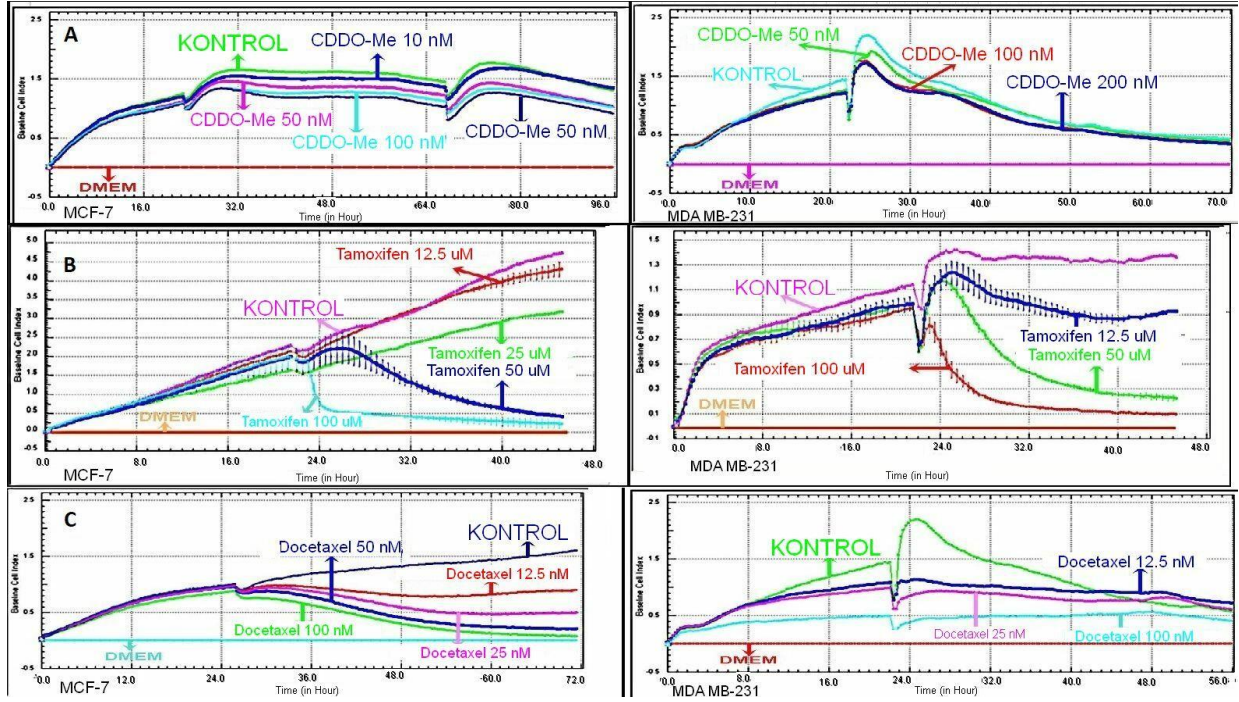
İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism [27] programı ile yapılmıştır. Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlama değerlerinin karşılaştırılması Ki-kare testi ile yapılmıştır. 0.05'den küçük olan P değerleri, anlamlı olarak kabul edilmiştir. Tüm deneyler istatistik açısından değerlendirme ve standartlaştırma için üç kere tekrar edilmiştir.

3. Bulgular

Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me'nin Antiproliferatif Etkileri

Çeşitli dozlarda uygulanan CDDO-Me, Tamoxifen ve Docetaxel'in her iki hücre hattının proliferasyonu üzerindeki doza ve zamana bağlı etkileri, gerçek zamanlı bir hücre elektronik tespit sistemi ile analiz edilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi CDDO-Me, Tamoxifen ve Docetaxel'in, MCF-7 ($p < 0,001$) ve MDA MB-231 ($p < 0,001$) hücre proliferasyonuna olan etkileri kontrol ile karşılaştırıldığında doz ve zaman bağımlı olarak anlamlı bulunmuş ve her iki hücredeki uygulanan tüm ilaçların IC_{50} değerleri Tablo 1'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır.



Şekil 1. CDDO-Me, Tamoxifen ve Docetaxel'in MCF-7 ve MDA MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonlarındaki uygulamalarının doz ve zaman bağımlı etkileri xCELLigence sistemi ile analiz edilmiştir. İlk ilaç uygulamaları hücre ekimlerinden sonra yaklaşık 24. saatlerde yapılmış olup, ilaçların IC₅₀ dozları uygulamalardan sonraki 48. saatlerde hesaplanmıştır. Kontrol olarak belirtilen gruptaki hücreler hiçbir ilaçla muamele edilmemiş olup, bu süre boyunca hücrelere sadece besiyeri yani DMEM uygulaması yapılmıştır. (A) CDDO-Me'nin MCF-7 ve MDA MB-231 hücre proliferasyonuna etkisi (p<0,001). (B) Tamoxifen'in MCF-7 ve MDA MB-231 hücre proliferasyonuna etkisi (p<0,001). (C) Docetaxel'in MCF-7 ve MDA MB-231 hücre proliferasyonuna etkisi (p<0,001). Proliferasyon deneyleri her bir hücre ve ilaç için istatistik analizler açısından üç kere tekrar edilmiştir. Veriler Ort±SS olarak gösterilmiş olup, 0.05'den küçük olan P değerleri, anlamlı olarak kabul edilmiştir.

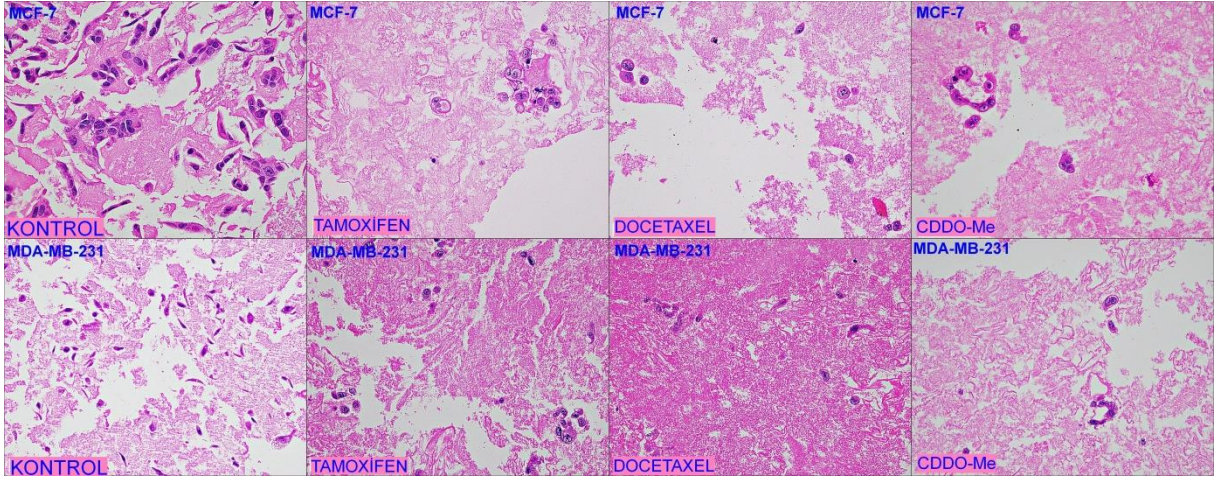
Tablo 1. CDDO-Me, Docetaxel ve Tamoxifen'in MCF-7 ve MDA MB-231 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri

	MCF-7	MDA MB-231
CDDO-Me (IC₅₀)(nM)	82	27
Tamoxifen (IC₅₀)(µM)	40	50
Docetaxel (IC₅₀)(nM)	43	32

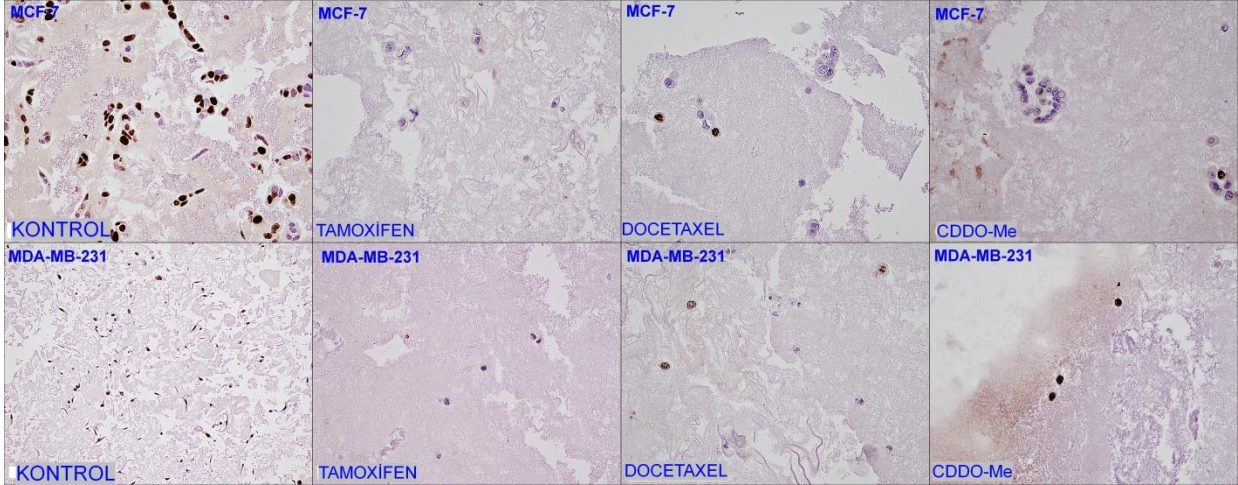
IC₅₀: hücrelerin %50'sini inhibe eden inhibitör (ilaç) konsantrasyonu, nM: nanomolar, µM: mikromolar.

Histokimyasal ve immünohistokimyasal skorum değerleri

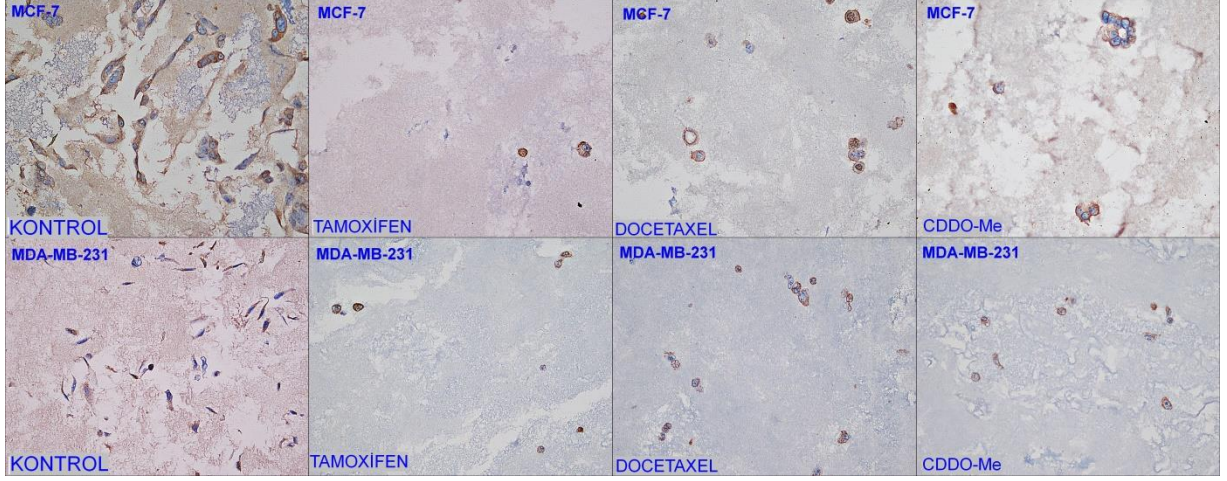
CDDO-Me, Docetaxel ve Tamoxifen ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin histopatolojik ve immünohistokimyasal skorları Tablo 2'de verilmiştir. H&E, Bcl-2, Bax, Bax/Bcl-2 Ki-67 ve Cyclin-D1 skorum değerlerinden elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak ilaçla muamele edilmemiş hücreler ile CDDO-Me, Docetaxel ve Tamoxifen ile muamele edilmiş hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (p<0.001). Buna göre H&E Ki-67 ve Cyclin D1 ile boyanmış hücre sayılarında MCF-7 için kontrol grubu ile kıyaslandığında, ilaçlarla muamele edilmiş olanlarda (CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen) sırasıyla, 3.4, 2.2, ve 4.8 kat azalma; 4.2, 1.68, ve 3.65 kat azalma; 2.3, 1.5 ve 3.8 kat azalma vardır. Aynı şekilde H&E, Ki-67 ve Cyclin D1 ile boyanmış MDA MB-231 hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında, ilaçlarla muamele edilmiş olanlarda (CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen) sırasıyla, 6.5, 3.5 ve 2 kat azalma; 5.5, 5 ve 2 kat azalma; 4.5, 3 ve 1.6 kat azalma vardır. Ayrıca sadece CDDO-Me, Docetaxel ve Tamoxifen ile muamele edilmiş hücreler histopatolojik ve immünohistokimyasal skorum değerleri açısından karşılaştırılmış olup (Tablo 2), H&E (Şekil 2), Ki-67 (Şekil 3), Bcl-2 (Şekil 4), Bax (Şekil 5), Cyclin-D1 (Şekil 6) ve Bax/Bcl-2 skorları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir (p<0,001)



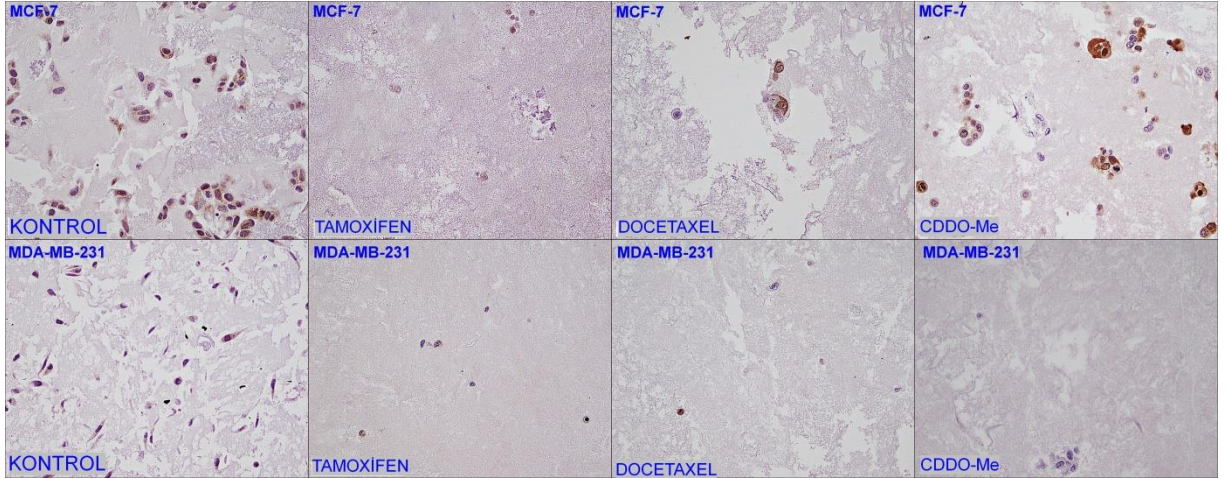
Şekil 2. Kontrol, Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me için H&E ile boyanmış hücre bloklarının mikroskobik görünümü (H&E x 400). Hücre blokları bir mikrotom yardımıyla (4 µm kalınlığında) hazırlanarak, Hematoxylin-Eosin (H&E) ile boyanmıştır. Tüm deneyler her bir hücre ve ilaç için istatistik analizler açısından üç kere tekrar edilmiştir. Kontrol olarak belirtilen gruptaki hücreler hiçbir ilaçla muamele edilmemiş olup, bu süre boyunca hücrelere sadece besiyeri yani DMEM uygulaması yapılmıştır.



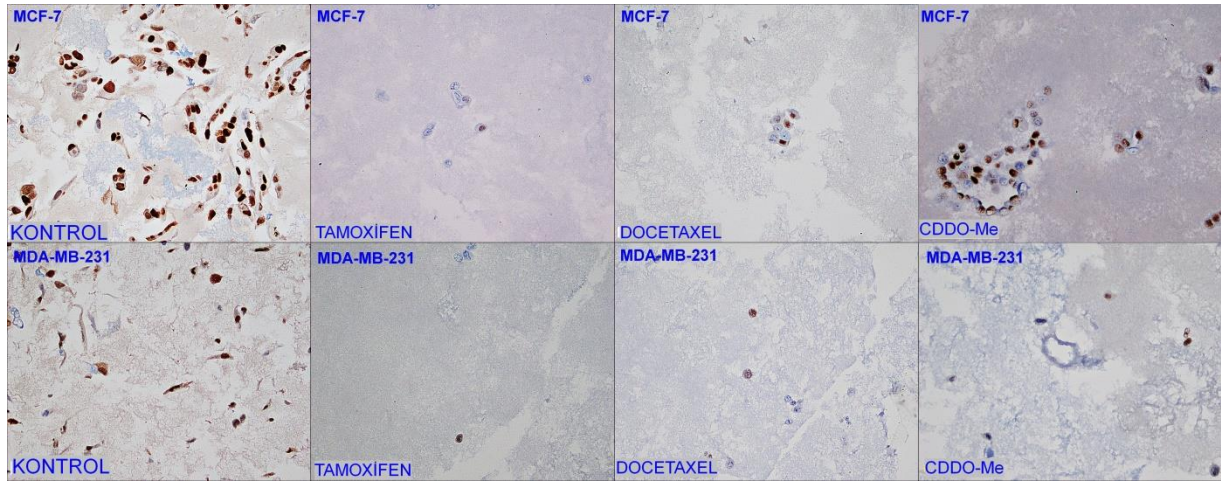
Şekil 3. Kontrol, Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me için Ki-67 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskobik görünümü (Ki-67 x 400). Hücre blokları bir mikrotom yardımıyla (4 µm kalınlığında) hazırlanarak, immünohistokimyasal analizler için Ki-67 (rabbit monoclonal primary antibody, clone 30-9, Roche) ile immün boyaması yapılmıştır. Tüm deneyler her bir hücre ve ilaç için istatistik analizler açısından üç kere tekrar edilmiştir. Kontrol olarak belirtilen gruptaki hücreler hiçbir ilaçla muamele edilmemiş olup, bu süre boyunca hücrelere sadece besiyeri yani DMEM uygulaması yapılmıştır.



Şekil 4. Kontrol, Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me için Bcl-2 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Bcl-2 x 400). Hücre blokları bir mikrotom yardımıyla (4 µm kalınlığında) hazırlanarak, immünohistokimyasal analizler için Bcl-2 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP66, Roche), ile immün boyaması yapılmıştır. Tüm deneyler her bir hücre ve ilaç için istatistik analizler açısından üç kere tekrar edilmiştir. Kontrol olarak belirtilen gruptaki hücreler hiçbir ilaçla muamele edilmemiş olup, bu süre boyunca hücrelere sadece besiyeri yani DMEM uygulaması yapılmıştır.



Şekil 5. Kontrol, Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me için Bax ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Bax x 400). Hücre blokları bir mikrotom yardımıyla (4 µm kalınlığında) hazırlanarak, immünohistokimyasal analizler için Bax (rabbit polyclonal primary antibody, Dako) ile immün boyaması yapılmıştır. Tüm deneyler her bir hücre ve ilaç için istatistik analizler açısından üç kere tekrar edilmiştir. Kontrol olarak belirtilen gruptaki hücreler hiçbir ilaçla muamele edilmemiş olup, bu süre boyunca hücrelere sadece besiyeri yani DMEM uygulaması yapılmıştır.



Şekil 6. Kontrol, Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me için Cyclin D1 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik (Cyclin D1 x 400). Hücre blokları bir mikrotom yardımıyla (4 µm kalınlığında) hazırlanarak, immünohistokimyasal analizler için Cyclin-D1 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP4-R, Roche) ile immün boyaması yapılmıştır. Tüm deneyler her bir hücre ve ilaç için istatistik analizler açısından üç kere tekrar edilmiştir. Kontrol olarak belirtilen gruptaki hücreler hiçbir ilaçla muamele edilmemiş olup, bu süre boyunca hücrelere sadece besiyeri yani DMEM uygulaması yapılmıştır.

Tamoxifen, Docetaxel ve CDDO-Me'nin Meme Kanseri Hücre Apoptozuna Etkileri

CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen'in her iki hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri için antiapoptotik Bcl-2, proapoptotik Bax ekspresyon analizleri yapılmış olup (Şekil 3 ve Şekil 4), Bax/Bcl-2 oranları hesaplanmıştır (Tablo 2). CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen ile muamele edilen hücreler kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında Bcl-2, Bax, Bax/Bcl-2, skorlama değerlerinde önemli farklılıklar görülmüştür ($p < 0.001$) (Tablo 2). Buna göre Bcl-2 ve Bax ile boyanmış hücre sayılarında MCF-7 için kontrol grubu ile kıyaslandığında, ilaçlarla muamele edilmiş olanlarda (CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen) sırasıyla; Bcl-2 ekspresyonlarında 2, 1.4 ve 2.5 kat azalma ile Bax ekspresyonlarında 2.3, 2 ve 2.7 kat artma söz konusudur. Aynı şekilde Bcl-2 ve Bax ile boyanmış MDA MB-231 hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında, ilaçlarla muamele edilmiş olanlarda (CDDO-Me, Docetaxel, Tamoxifen) sırasıyla; Bcl-2 ekspresyonlarında 2.8, 2.4 ve 1.4 kat azalma ve Bax ekspresyonlarında 8.5, 6.8 ve 3.4 kat artma mevcuttur.

Tablo 2. Kontrol hücre blokları ile CDDO-Me, Tamoxifen ve Docetaxel uygulanan hücre bloklarında H&E, Ki-67, Bcl-2, Bax, Cyclin-D1 ve Bax/Bcl-2 oranı patolojik skorlama değerlerinin karşılaştırılması

MCF-7	Untreated	CDDO-Me	Docetaxel	Tamoxifen	χ^2	p
H&E (n)	77	23	35	16	73.24	< 0.001
Ki-67 (%)	84	20	50	23	69.37	< 0.001
Bcl-2 (%)	79	40	55	32	30.99	< 0.001
Bax (%)	30	70	59	80	24.61	< 0.001
Bax/Bcl-2	0.38	1.75	1.07	2.50	152.34	< 0.001
Cyclin-D1 (%)	80	35	55	21	55.55	< 0.001
MDA-MB-231	Untreated	CDDO-Me	Docetaxel	Tamoxifen	χ^2	p
H&E (n)	85	13	24	43	96.50	< 0.001
Ki-67 (%)	98	18	20	47	99.80	< 0.001
Bcl-2 (%)	85	30	35	59	46.85	< 0.001
Bax (%)	10	85	68	34	79.57	< 0.001
Bax/Bcl-2	0.12	2.83	1.94	0.58	456.76	< 0.001
Cyclin-D1 (%)	90	20	30	58	81.24	< 0.001

Bax: Bcl-2-associated X protein. Bcl-2: B-cell lymphoma 2, H&E: Hematoksilen-eozin, Patolojik skorlama değerleri Ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. 0.05'den küçük olan P değerleri ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Proliferasyon her kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de prognoz ve tedavi yanıtı açısından kullanılan önemli bir göstergedir. Apoptoz yolundaki anormallikler rutin kanser tedavilerine dirençle ilişkili olduğundan, apoptozun indüklenmesi hastalığın prognozunun iyileşmesine destek olabilmektedir [20]. Bir onkogen olan Cyclin D1, hücre siklusunda G1'den S fazına geçiş kontrol noktasını düzenlemekle beraber, aşırı eksprese olması halinde G1 fazını hızlandırarak hücre çoğalmasına neden olan bir proteindir ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir [27]. Ayrıca proliferasyon indeksi olan Ki-67'nin saptandığı vakalarda özellikle invazyon, daha kötü proliferasyon ve daha sık metastazlar görülmüştür [28]. Dolayısıyla Ki-67 de meme kanseri için kötü prognoz göstergesi olarak gösterilebilmektedir.

Bir triterpenoid olan CDDO-Me *in vitro* olarak, meme, pankreas, oral skuamöz hücreli karsinom, yumurtalık ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde apoptozu indükleyerek güçlü antiproliferatif ve antitümörjenik etkinlik göstermiştir [15, 17-20, 22]. Çalışmalar, CDDO'ların MAPK ve ERK 1/2 yoluyla apoptozu indüklediğini, NF-κB ve PPARγ sinyalinin inhibe ettiğini ve ayrıca Bax ekspresyonunu artırdığı ve Bcl-2 ile Flice benzeri inhibitör protein [15, 20, 22] ekspresyonlarını azalttığını göstermiştir. CDDO-Me'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisini araştıran çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Lapillonne ve ark. CDDO'nun hücre döngüsü inhibisyonuna neden olduğunu, MCF-7 ve MDA MB-435 hücre hatlarında peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama, Cyclin-D1 ve Bcl-2 inaktivasyonunun reaktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediğini göstermiştir [13]. Başka bir çalışmada CDDO'nun HER-2 tirozin kinaz aktivitesini inhibe ettiği ve HER-2 pozitif meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [29]. Aynı çalışmada CDDO'nun Cyclin-D1 mRNA ve protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bir *in vivo* çalışmada, CDDO-Me, ER(-) meme tümörlerinin oluşumunu önleyerek koruyucu bir etki sergilemiş olup, tümör büyümesini inhibe ederek antitümör bir etki göstermiştir [27]. T47D ve MDA-MB-468 meme kanser hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada [23], CDDO ve CDDO-im'in, apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Ling ve ark. 'nın yaptığı, kemoterapiye dirençli olan murine 4T1 meme tümör modeli üzerinde yapılan bir çalışmada [24], CDDO-Me'nin STAT3 inaktivasyonu yoluyla tümör büyümesini ve metastazı inhibe ettiği bulunmuştur. Diğer bir sentetik triterpenoid bileşik olan CDDO-im'in, BRCA1 mutasyonu içeren meme kanseri hücre soylarında, hücre siklusunun G2/M fazını inhibe ettiği, DNA hasarı ve apoptozise neden olduğu, diğer yandan nonmalign MCF-10A meme epitel hücreleri ve normal fare 3T3 fibroblast hücrelerine karşı selektif olarak sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir [25]. Jeong ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [26], MDA-MB 435, MDA-MB 231, MDA-MB 468, BT-549, T47D ve MCF-7 meme kanser hücre soylarında CDDO-Me doz, zaman ve hücre tipine bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Bizim çalışmamızla benzer olarak, CDDO-Me'nin, triple negatif olarak sınıflandırılan MDA-MB 435, MDA-MB 231, MDA-MB 468 ve BT-549 hücre soyları üzerinde daha fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda Nrf-2 aktivatörü CDDO-Me'nin hormona duyarlı (ER ve PR +) MCF-7 ve hormona duyarlı olmayan (ER ve PR -) iki farklı insan kaynaklı meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri, meme kanseri tedavisinde halen yaygın olarak kullanılan Tamoxifen ve Docetaxel'in etkileri ile kıyaslanarak gözlemlenmiştir. Araştırılan bileşiğin etkilerini ortaya çıkarmak için sitotoksikite analizi ile histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Çalışmamızın sonucunda CDDO-Me uygulanmış ve Hematoksilin & Eozin ile immün boyanmış hücre preparatları analizlerine göre, her iki hücre tipinde de hücre sayılarının kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak azaldığı (p<0.001) gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra tüm ilaçlarla muamele edilmiş ve H&E ile boyanmış MCF-7 hücre sayılarında ilaçlar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmazken, MDA MB-231 hücrelerinde hücre sayısı açısından CDDO-Me, Tamoxifen'e göre istatistiksel olarak daha etkin olarak bulunmuştur. CDDO-Me'nin her iki meme kanseri hücre tipinde de doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, Ki-67, Cyclin-D1, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı, Bax ekspresyonunu artırdığı görülmüştür. Böylece CDDO-Me'nin, hücre siklusunda G1 fazını hızlandırarak hücre proliferasyonunu artıran Cyclin-D1 ve proliferasyon indeksi Ki-67'deki azalmaya sebep olmasıyla, hücre döngüsünü G1/S fazında durdurduğunu ve Bax/Bcl-2 oranını artırmamasıyla da apoptozu tetikleyerek hücre proliferasyonunu engellediğini söyleyebiliriz. Dolayısıyla bu çalışmada CDDO-Me'nin her iki meme kanseri hücre hattındaki moleküler etkileri hem sitotoksik hem apoptotik hem de hücre döngüsü açısından, yukarıda adı geçen çalışmaların sonuçlarıyla benzer şekildedir.

Bunun yanı sıra CDDO-Me'nin moleküler etkilerini Tamoxifen ve Docetaxel ile karşılaştırdığımızda; MDA MB-231 hücrelerinde immün boyanmış olan Bax ve Bcl-2 skor ve oranlarına göre apoptoz yolağı

açısından CDDO-Me'nin, Tamoxifen ve Docetaxel'e göre istatistiksel olarak daha etkili olduğunu ($p<0.001$); yine immün boyanmış Ki-67 ve Cyclin-D1 skorlarına göre hücre döngüsü açısından CDDO-Me'nin Docetaxel ile istatistiksel olarak benzer etkiler gösterdiği ve Tamoxifenin bu hücre hattında istatistiksel olarak daha etkin olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.001$). MCF-7 hücrelerinde de immün boyanmış olan Bax ve Bcl-2 skor ve oranlarına göre apoptoz yolağı açısından CDDO-Me'nin, Tamoxifen ve Docetaxel'e göre istatistiksel olarak daha etkili olduğunu ($p<0.001$); yine immün boyanmış Ki-67 ve Cyclin-D1 skorlarına göre hücre döngüsü açısından CDDO-Me'nin Tamoxifen ile istatistiksel olarak benzer etkiler gösterdiği ve Docetaxel'in bu hücre hattında istatistiksel olarak daha etkin olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Sonuçlara bakıldığında genel olarak CDDO-Me her iki hücre hattında da Tamoxifen ve Docetaxel'e göre apoptoz açısından daha etkindir.

Hormon sensitif olan meme kanseri tedavisi için klinikte rutin olarak kullanılan ilaçların özellikle bu türdeki kanserde daha az yan etkiye sahip olup, daha etkili olması yönüyle tedaviye daha çabuk yanıt alınabilmektedir. Bunun tam tersi hormon non-sensitif meme kanserinde hem yan etkilerinden hem de tedaviye olumsuz yanıtlarından dolayı ilaçların sınırlı kullanılması, bu türdeki kanserde sağkalım oranını düşürmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda özellikle hormon non sensitif kanser tedavisi için yeni ve daha etkili alternatiflerin olması gerektiğinin önemi ortaya çıkmaktadır. CDDO-Me'nin hormon sensitif ve hormon non-sensitif meme kanseri hücre hatları ile çalışılmasının asıl sebebi bu olmakla beraber, yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında özellikle reseptör negatif meme kanseri hücrelerinde CDDO-Me'nin daha etkili olduğu vurgulanmıştır. Bunu en iyi açıklayan çalışmalardan birisinde, CDDO-Me uygulaması sonrası yaklaşık 48. saatlerde MDA MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre hücre büyümesi inhibisyonunun fazla olması, hücre döngüsünde G1 fazında daha az hücre yoğunluğunun olması, Cyclin D1 protein ekspresyonunun aşağı regüle edilmesi, apoptotik hücre yoğunluğunun daha fazla olması sonuçlarıyla; gerek büyüme inhibisyonu gerekse apoptoz açısından hormon non sensitif hücrelerde CDDO-Me'nin daha etkili olduğu gözlenmiş olup, kendi çalışmamız dahil pek çok çalışma için, bu bileşiğın hem her iki kanser hücre tipiyle hem de rutinde kullanılan ilaçlarla kıyaslama açısından yol gösterici olmuştur.

CDDO-Me'nin hormon sensitif ve hormon non-sensitif meme kanseri hücrelerinde, özellikle hücre döngüsü ve apoptoz yolağı açısından farklı olan etkileri hakkında henüz net bir bilgi elde edilememiştir. Buna rağmen iki farklı hücre tipinde de farklı sonuçlar vermesinin arkasında belki de CDDO-Me'nin etkilediği özellikle genomik düzeyde farklı ve olası sinyal yolakları olabilir. Dolayısıyla ileride yapılacak olan çalışmalarla meme kanserinin farklı türlerinde daha detaylı bir genomik analiz yapılarak CDDO-Me'nin her iki farklı hücre tipindeki etkilerinin farklı olmasının arkasında yatan sebepler bulunabilir. Sonuç olarak, meme kanseri hücrelerinde CDDO-Me'nin antitümöral etkinliğini gösterdiğimiz bu *in vitro* çalışma, gelecekteki klinik faz çalışmalarına destek olup rehberlik edebilir.

Teşekkür

Bu çalışma Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2014-69). Tüm yazarlar bu makalenin tüm içeriğinin sorumluluğunu kabul etmiş ve gönderimini onaylamıştır. Çalışmanın tüm aşamalarında yazarların her biri katkıda bulunmuştur.

Kaynakça

- [1] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. N Engl J Med 2010;363(20):1938-48.
- [2] Uray IP, Brown PH. Chemoprevention of hormone receptor-negative breast cancer: new approaches needed. Recent Results Cancer Res 2011;188:147-62.
- [3] DeSantis C, Howlader N, Cronin KA, Jemal A. Breast cancer incidence rates in U.S. women are no longer declining. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2011;20 (5):733-9.
- [4] Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feurer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 2007; 356:1670-4.
- [5] Cuzick J, DeCensi A, Arun B, Brown PH, Castiglione M, Dunn B, et al. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. Lancet Oncol 2011;12:496-503.

- [6] Brown PH, Subbaramaiah K, Salmon AP, Baker R, Newman RA, Yang P, et al. Combination chemoprevention of HER2/neu-induced breast cancer using a cyclooxygenase-2 inhibitor and a retinoid X receptor-selective retinoid. *Cancer Prev Res [Phila]* 2008;1 (3):208-14.
- [7] Borella R, Forti L, Gibellini L, De Gaetano A, De Biasi, Nasi M, et al. Synthesis and anticancer activity of CDDO and CDDO-Me, two derivatives of natural triterpenoids. *Molecules* 2019; 24:4097-117.
- [8] Zhao Y, Huo M, Xu Z, Wang Y, Huang L. Nanoparticle delivery of CDDO-Me remodels the tumor microenvironment and enhances vaccine therapy for melanoma. *Biomaterials* 2015;68:54-66.
- [9] Ball MS, Shipman EP, Kim H, Liby KT, Pioli PA. CDDO-Me redirects activation of breast tumor associated macrophages. *PLoS One* 2016;11:e0149600.
- [10] Wang XY, Zhang XH, Peng L, Liu Z, Yang YX, He ZX, et al. Bardoxolone methyl [CDDO-Me or RTA402] induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Erk1/2 signaling pathways in K562 cells. *Am J Transl Res* 2017; 9 (10):4652-72.
- [11] Khurana N, Chandra PK, Kim H, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Sikka SC. Bardoxolone-Methyl [CDDO-Me] suppresses androgen receptor and its splice-variant ar-v7 and enhances efficacy of enzalutamide in prostate cancer cells. *Antioxidants [Basel]* 2020; 9:68-86.
- [12] Konopleva M, Contractor R, Kurinna SM, Chen W, Andreeff M, Ruvolo P. The novel triterpenoid CDDO-Me suppresses MAPK pathways and promotes p38 activation in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2005; 19:1350-4.
- [13] Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, Gold D, McQueen T, Sutherland RL, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63:5926-39.
- [14] Lewis JH, Jadoul M, Block GA, Chin MP, Ferguson DA, Goldsberry A, et al. Effects of bardoxolone methyl on hepatic enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 CKD. *Clin Transl Sci* 2021; 14:299-309.
- [15] Ball MS, Bhandari R, Torres GM, Martyanov V, ElTanbouly MA, Archambaut K, et al. CDDO-Me alters the tumor microenvironment in estrogen receptor negative breast cancer. *Sci Rep* 2020;10:6560-70.
- [16] Kanda H, Yamawaki K. Bardoxolone methyl: drug development for diabetic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2020; 24:857-64.
- [17] Duan Z, Ames RY, Ryan M, Hornicek FJ, Mankin H, Seiden MV, et al. CDDO-Me, a synthetic triterpenoid, inhibits expression of IL-6 and Stat3 phosphorylation in multi-drug resistant ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63 (4):681-9.
- [18] Hermann C, Lang S, Popp T, Hafner S, Steinritz D, Rump A, et al. Bardoxolone-Methyl [CDDO-Me] impairs tumor growth and induces radiosensitization of oral squamous cell carcinoma cells. *Front Pharmacol* 2020; 11:607580.
- [19] Deeb D, Gao X, Liu YB, Gautam S. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by CDDO-Me in pancreatic cancer cells is ROS-dependent. *J Exp Ther Oncol* 2012; 10 (1):51-64.
- [20] Gao X, Deeb D, Liu P, Liu Y, Arbab-Ali S, Dulchavsky SA, et al. Role of reactive oxygen species [ROS] in CDDO-Me-mediated growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 2011; 9 (2):119-27.
- [21] Tran K, Risingsong R, Royce D, Williams CR, Sporn MB, Liby K. The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester delays estrogen receptor-negative mammary carcinogenesis in polyoma middle T mice. *Cancer Prev Res [Phila]* 2012; 5 (5):726-34.
- [22] Liby K, Risingsong R, Royce DB, Williams CR, Yore MM, Honda T, et al. Prevention and treatment of experimental estrogen receptor-negative mammary carcinogenesis by the synthetic triterpenoid CDDO-methyl Ester and the rexinoid LG100268. *Clin Cancer Res* 2008;14:4556-63.

- [23] Hyer ML, Croxton R, Krajewska M, Krajewski S, Kress CL, Lu M, et al. Synthetic triterpenoids cooperate with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to induce apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:4799-808.
- [24] Ling X, Konopleva M, Zeng Z, Ruvolo V, Stephens LC, Schober W, et al. The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3, 12-dioxolen-1, 9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling. *Cancer Res* 2007;67:4210-8.
- [25] Kim EH, Deng CX, Sporn MB, Liby KT. CDDO-imidazolide induces DNA damage, G2/M arrest and apoptosis in BRCA1-mutated breast cancer cells. *Cancer Prev Res [Phila]* 2011;4:425-34.
- [26] Jeong SA, Kim IY, Lee AR, Yoon MJ, Cho H, Lee JS, et al. Ca²⁺ influx-mediated dilation of the endoplasmic reticulum and c-FLIPL downregulation trigger CDDO-Me-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:21173-92.
- [27] Radushev D. GraphPad Prism Software v5.02. San Diego, CA, USA. 2008.
- [28] Lee SH, Lee JK, Jin SM, Lee KC, Sohn JH, Chae SW, et al. Expression of cell-cycle regulators [cyclin D1, cyclin E, p27kip1, p57kip2] in papillary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 142, 332-337.
- [29] Sessa F, Bonato M, Bisoni D, Ranzani GN, Capella C. Ki-ras and p53 gene mutations in pancreatic ductal carcinoma: a relationship with tumor phenotype and survival. *Eur J Histochem* 1998;42:67-76.
- [30] Konopleva M, Zhang W, Shi YX, McQueen T, Tsao T, Abdelrahim M, et al. Synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:317-28.