

**T.C**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**  
**TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI**

**MEME KANSERİNDE CARBONİC ANHYDRASE IX VE HİPOXIA**  
**INDUCIBLE FACTOR- 1 ALPHA EKSPRESYONLARININ**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**  
**UZ. DR. ALİ OSMAN KAYA**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. NAZAN GÜNEL**

**ANKARA**

**2008**

# TEŐEKKÜR

Eğitim sürecim ve çalıőmam boyunca desteklerini esirgemeyen baőta değerli hocam Prof. Dr. Nazan Günel olmak üzere beraberinde diğer tüm öğretim üyesi hocalarıma ve Patoloji Ana Bilim Dalı'nda tez hastalarımı değerlendirerek çalıőmam süresince desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Nalan Akyürek, Dr. Hayriye Tatlı'ya ;

Bir kardeş olarak gördüğüm asistan ve uzman arkadaşlarıma;

İhtisas sürecim boyunca desteğini esirgemeyen sevgili eşim Uz. Dr. Aysun Kaya'ya;

Teőekkür ederim.

# **İÇİNDEKİLER**

## **Sayfa**

<b>KISALTMALAR</b>	<b>I-II</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	
<b>2.1. MEME KANSERİNE GENEL BAKIŞ</b>	
2.1.1 Meme kanseri epidemiyolojisi	4
2.1.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	4
2.1.3. Meme Kanseri Patolojik Sınıflandırması	9
2.1.4. Meme Kanseri Evrelemesi	12
2.1.5. Meme Kanseri Tedavi Sonrası Takip	13
<b>2.2. MEME KANSERİNDE PROGNOTİK DEĞERLENDİRME</b>	
2.2.1. Prognotik Faktörlerin Rekürrens Riski Açısından Önemi	14
2.2.2. Prognotik ve Prediktif Faktörler	
2.2.2.a. Aksiler Nodal Durum	16
2.2.2.b. Tümör Büyüklüğü	17
2.2.2.c. Tümör Tipi ve Greydi	17
2.2.2.d. Lenfatik ve Vasküler İnvazyon	18
2.2.2.e. Proliferasyon Markırları	19
2.2.2.f. Yaş ve Etnik Yapı	20
2.2.2.g. Östrojen ve Progesteron Reseptör Durumu	20
2.2.2.h. HER-2/neu Durumu	21
2.2.2.I. Plazminojen Aktivatör Sistemi	22
2.2.2.j. Genetik Profil	22
<b>2.3. TÜMÖR HİPOKSİSİ</b>	<b>23</b>
<b>2.4. HIPOXY-INDUCIBLE FACTOR -1 ALPHA</b>	<b>25</b>
<b>2.5. KARBONİK ANHİDRAZ IX</b>	<b>26</b>

<b>MATERYAL-METOD</b>	
<b>3.1. Hasta Grubu Seçimi</b>	<b>28</b>
<b>3.2. İmmunhistokimyasal İnceleme Metodu</b>	<b>29</b>
<b>3.3. İstatistiksel Yöntemler</b>	<b>30</b>
<b>BULGULAR</b>	<b>31</b>
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>39</b>
<b>ÖZET</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>46</b>

## **KISALTMALAR**

TNM: Tümör, lenf nodu, metastaz  
uPA: Ürokinaz-tip plazminojen aktivatör  
PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitör tip 1  
CMF: Siklofosfamid, Metotreksat, Fluorourasil  
AC: Adriamisin, Siklofosfamid  
HIF-1 alpha. Hipoxia Inducible Factor 1  
CA IX: Carbonic anhydrase IX  
BRCA 1: Breast Cancer 1  
BRCA 2: Breast Cancer 2  
DCIS: Ductal carcinoma in situ  
LCIS. Lobular carcinoma in situ  
AJCC: American Joint Committee on Cancer  
NCCN: National Comprehensive Cancer Network  
DFS: Disease-free survival  
OS: Overall Survival  
NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project  
İHK: İmmünohistokimya  
SBR: Scarff-Bloom-Richardson  
PCR: Polimerase chain reaction  
VEGF: Vascular endothelial growth factor  
Nox: NADPH Oxidase  
ROS: Reactive Oxygen Species  
VEGFR 2: Vascular endothelial growth factor receptor 2  
PTPs: Protein tyrosine phosphatases  
PTEN: Phosphatase and tensin homolog  
cSrc: Cytoplasmic tyrosine kinases  
eNOS: Nitric Oxid synthase  
ERK: Extracellular signal-regulated kinase.  
Ref-1: Redox effecror factor 1  
Ets: Endothelins

MMP: Matrix metalloproteinases

MEK: Mitogen-activated protein kinase kinases

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

VHL: von Hippel-Lindau

EGFR: Epidermal growth factor receptor

PDGF-BB: Platelet derived growth factor-B chain

bFGF: Basic fibroblast growth factor

HER-2/neu: Human epidermal growth factor receptor-2

ECs: Endothelial cells

Akt: Protein kinase B

# 1. GİRİŞ

Meme kanseri, Amerikan kadınları arasında her yıl 200.000'den fazla yeni teşhis edilen vakalar ile en sık gözlenen malign hastalıktır (92). ABD'lerinde son yıllarda meme kanserinden ölüm, erken meme kanserinde adjuvan tedavideki ilerlemeler kadar, çok yaygın tarama sonuçlarının da olası etkisi ile azalmıştır (104). Meme kanseri evrelemesinde, TNM sistemi kullanılır. İnvaziv meme kanserinin en sık gözlenen histolojik tiplerini, infiltratif duktal karsinoma (yaklaşık % 70-80) ve infiltratif lobuler karsinoma (yaklaşık %10) oluşturur (3).

Lenf nodu durumu ve tümör büyüklüğü meme kanseri rekürrensi ve toplam sağkalım açısından en önemli prognostik faktörlerdir (123,137). Diğer prognostik faktörleri, tümör greydi, lenfatik ve vasküler invazyon, Ki-67 proliferasyon markırı, teşhis anında hastanın yaşı, östrojen ve progesteron reseptör durumu, HER-2/neu durumu, uPA, PAI-1, genetik profil oluşturur (30).

Tedavi önerileri, hastanın risk kategorisi, hastanın ve doktorun tercihlerine göre değişir (1,40,56). Sistemik adjuvan kemoterapi, tüm nod pozitif hastalar ve yüksek riskli nod negatif hastalara verilir. Antrasiklin bazlı kemoterapilerin, klasik CMF kemoterapisine göre toplam sağkalımı artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, AC kemoterapisi sonrası paklitaksel verilmesi ile rekürrens ve ölüm riski daha fazla azalır (96). Meme kanserinde rutin olarak kullanılan üç önemli moleküler markır, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve c erbB2 (HER-2/neu)'den oluşur. Östrojen ve/veya progesteron reseptör ekspresyon varlığı, tamoksifen ve diğer anti-östrojen tedavi için belirleyicidir. ER ve PR reseptörü pozitif tümörlerde yaklaşık %70 tamoksifene cevap gözlenirken, ER pozitif ve PR negatif tümörlerde %34, ER negatif ve PR pozitif tümörlerde %45 cevap oranları gözlenir (33,45). Meme kanserinde %20-30 oranında görülen ve bir trozin kinaz reseptörü olan c erbB2 (HER-2/neu), yüksek relaps ve ölüm riski ile ilişkilidir (136). HER-2/neu protein

ekspresyonu, onun ekstrasellüler domainine spesifik bir humanize monoklonal antikor olan trastuzumaba cevabı belirleyen bir markırdır (14).

Tümör hipoksisi, kemoterapi ve radyoterapiye kötü cevap, genetik instabilite, apoptozise direnç, artmış invazyon ve metastazis ile ilişkili mikroçevresel bir faktördür (59). Hipoksi, ayrıca, meme kanseri, baş-boyun kanseri, ve yumuşak doku kanserlerinde prognostik bir etki olarak gösterilmiştir (143). Tümör içi hipoksisi, çoğalan tümör dokusunda fonksiyonel kan damarlarının kaybına yol açar. Eğer hipoksi şiddetli veya uzun süreli olursa hücre ölümü görülür. Malign hücreler, oksijen azalmasına bağlı ölümden kaçmalarına izin veren genetik ve adaptif değişiklikler geçirebilirler. Bu değişiklikler, daha agresif malign tümör fenotipi oluşmasına, radyoterapi ve kemoterapiye direnç gelişmesine ve daha kötü prognoz ile sonuçlanmaya yol açar (67,73).

HIF-1 alfa (Hipoxia Inducible Factor- 1) 'nın stabilizasyonu, hipoksiye primer bir cevaptır (78). HIF-1, 1995 yılında ilk olarak eritropoezis regülatörü olarak tanımlanmasına rağmen, HIF-1 alfanın, metastazis, angiogenesis, apoptozis rezistansı, metabolik adaptasyon dahil tümör progresyonun birçok biçimleri ile ilişkili olan genleri regüle ettiği bilinmektedir (130). Trastour ve ark., 132 invaziv meme kanserli hastada HIF-1 alfa ve CA IX ekspresyonunun prognoz ve tedavi sonuçları üzerine olan etkilerini araştırmışlar. Hem sağ kalım hem de tedaviye cevap üzerine, CA IX 'un HIF 1-alfa' dan daha zayıf prognostik ve prediktif faktör olduğunu göstermişlerdir (146).

Karbonik anhidraz IX, karbondioksidi karbonik aside katalize eden bir transmembran glikoprotein olup, tümör mikroçevresinin asidifikasyonu aracılığı ile tümör büyümesi ve invazyonuna katkıda bulunur. 4 transmembran izo-enzimden biri olan bu enzimin, hücrelerin transformasyonu ve hücre proliferasyonunun kontrolünde ilişkisi olduğu gösterilmiştir (81,114). Normal dokular ile karşılaştırıldığında, geniş bir tümör spektrumunda CA IX artmış ekspresyonu gösterilmiştir (157). Solid tümörlerde, hipoksi

alanları ile CA IX ekspresyonu arasında önemli ilişki olup, bu enzimin, hipoksik durumlara tümör hücrelerinin adaptasyonunda ve tümör hücre progresyonunda rol aldığı düşünülmektedir (82,157). Bir çok klinik çalışma, tümör hücrelerinde yüksek CA IX ekspresyonu ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi açık olarak göstermiştir (29,55). Bunlara rağmen, CA IX ekspresyonunun hipoksinin basit bir markırı veya bir adaptasyon mekanizmasının olup olmadığı tespit edilememiştir. Ve CAIX ' un hücrel fonksiyonu tam aydınlatılamamıştır (122).

Bu çalışmada amacımız, tümör hücrelerinde CA IX ve HIF 1-alfa ekspresyonlarının, (c-erb B2 pozitif + ER(-) + PR(-) ) ile ( c-erb B2 negatif + ER(+) + PR(+)) gruplar arasında, evre, grade, lenf nod metastazı, tümör büyüklüğü, anjiolenfatik invazyon, ve sağ-kalım üzerine etkisini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MEME KANSERİNE GENEL BAKIŞ

#### 2.1.1 Epidemiyoloji

Meme kanseri dünyada akciğer ve mide kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülmekte ve kadınlarda en sık gözlenen maligniteyi oluşturmaktadır. Dünyada, kadınlarda toplam kansere bağlı ölümlerin %14. 1'inden meme kanseri sorumludur. Tüm dünyada 2002 yılında tahmini meme kanser yeni olgu sayısı 1.5 milyon olarak bildirilmiştir. Bunların da yarısından fazlasını Kuzey Amerika ve Avrupa gibi endüstrileşmiş ülkeler oluşturmaktadır (84,113). Meme kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde de kadınlarda en sık gözlenen malignitedir. Kadınlardaki tüm kanserlerin yaklaşık %32'sini ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %16'sını meme kanseri oluşturur. ABD'lerinde 1940'lı yıllardan sonra meme kanseri sıklığı artmaya başlamış ve bu artış hızı 1980-1987 yılları arasında %4'e ulaşmıştır. 1990'dan sonra mamografik tarama yönteminin yaygın kullanımı ile meme kanserinden ölüm oranlarında azalma olmuştur. Tüm meme kanserlerinin %1'den azını erkek meme kanseri oluşturur. Erkek meme kanseri sıklığı 100 binde 2.5 oranında görülmektedir. (84). Ülkemizde kanser istatistik verileri yeterli değildir. Sağlık bakanlığının 1994 yılındaki kanser istatistik verilerine baktığımızda, meme kanseri sıklığı 9.6/100000 olarak bildirilmiştir (43).

#### 2.1.2. Risk Faktörleri

Meme kanseri gelişimi ile ilişkili olan risk faktörleri tablo 1'de gösterilmiştir (75). Bu faktörler içerisinde çok önemli üç faktör, herediter meme kanseri öyküsü, cins ve yaş'dır.

#### Cins

Kadınlarda yaşla uyumlu olarak erkeklerden 100 kat daha fazla meme kanseri gelişme riski vardır. Kadın meme kanserinin daha sık olması , kadın meme kanseri risk faktörlerinin

daha iyi tanımlanmasını sağlamıştır. Erkek meme kanserinin daha az görülmesi nedeni ile erkek meme kanseri risk faktörleri çok daha az tanımlanmıştır (75).

### Yaş

Meme kanseri sıklığı yaşla dramatik olarak artar. Meme kanseri sıklığı, 20 ile 30 yaşları arasında 100 binde 10 olgudan daha az iken, bu oran 60 yaşın üzerindeki kadınlarda 100 binde 200 olgudan daha fazladır (120). Bununla birlikte, sıklıkdaki artma ve yaş arasında doğrusal bir ilişki yoktur. Daha genç kadınlarda, yaş ve sıklıkdaki artış arasında daha hızlı artan bir ilişki varken, menapoz esnasında ve sonrasında kısa bir sürede, dramatik olarak bu artış azalır. Menapozdan birkaç yıl sonra tekrar yaş ile sıklık arasındaki ilişkide artış gözlenir (120).

### Aile hikayesi ve kalıtsal risk faktörleri

Meme kanserli kadınların yaklaşık % 4-9'unda yüksek risk duyarlılık oluşturan BRCA1 veya BRCA2 genlerinin germ line mutasyonu olan aile hikayesi vardır (7) Birinci derece akrabalarında meme kanseri hikayesi olan bireylerde, meme kanseri aile hikayesi olmayanlara göre daha fazla meme kanseri oluşma riski vardır. BCRA1 (kromozom 17q21 bölgesinde lokalize)ve BCRA2 (kromozom 13q12 bölgesinde lokalize) tümör süpressör genleri, ailesel meme ve over kanseri ile ilişkili olarak gösterilen iki önemli gendir. 35 yaşından önce meme kanseri teşhis edilen kadınların %6.2'sinde BRCA1 mutasyonları saptanmıştır. BRCA1 mutasyonların büyük çoğunluğu, orta ve yüksek riskli aile bireylerinde gösterilmiştir. BRCA1 veya BRCA2 gen mutasyonlu bu bireyler, yaşamları boyunca %40 ile %85 arasında , meme kanseri gelişme riskine sahiptirler (15,36,100,140). BRCA1 gen mutasyonu ilişkili meme kanseri, daha erken yaşda başlangıç, daha düşük diploid oranı, daha yüksek proliferasyon oranı, daha yüksek mitotik sayı, daha fazla oranda östrojen ve progesteron reseptör negatifliği gibi özelliklere sahiptir. BRCA2 mutasyonları, erken başlangıçlı meme ve over kanseri, erkek meme kanseri ile ilişkilidir. BRCA2 ilişkili

kanserler, daha düşük mitotik sayı, tübül formasyonunda daha yüksek skor gibi özelliklere sahiptir (91). BRCA1 ve BRCA2 spesifik mutasyonları, Askenazi Yahudilerinde daha sıklıkla oluşur (40). Meme kanseri, p53 tümör supressör gen mutasyonu ile oluşan Li-Fraumeni sendromunun bir parçası olarak da kolon, over yada uterus gibi diğer kanserlerle birlikte gözlenebilir. Ayrıca, hücre siklüsünde DNA tamirinde görevli olan CHEK-2 genindeki mutasyon da ailesel ve sporadik meme kanseri olgularında gösterilmiştir. Bu gen mutasyonu erkeklerde 10 kat , kadınlarda ise 2 kat daha fazla meme kanseri riski oluşturur (75).

### Diyet

Birçok çalışma, meme kanseri riski ile diyetdeki hayvansal proteinler, hayvansal yağ, fiber, toplam kalori miktarı arasında bir ilişkiyi ortaya koymaya çalıştılar. DiyetSEL yağ alımı, artmış plazma östrojen düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (26). Diyetdeki doymuş yağ alımının azaltılması, birkaç hafta içerisinde serum östradiol seviyesinde belirgin azalmaya neden olmaktadır. Bir meta-analizde yağ alımı ve postmenapozal meme kanseri arasında pozitif bir ilişki gösterilmesine karşın, Kohort çalışmalarının toplu analizlerinde yağ alımı ile meme kanseri arasında kesin bir ilişki gösterilememiştir (50,77).

### Radyasyona maruziyet

Radyasyonun, meme kanserine neden olduğu açıkça gösterilmiştir. Hiroşima ve Nagasaki'de atom bombası sonrası sağ kalan Japon kadınlarda radyasyona bağlı meme kanserinde artış gösterilmiştir. Maruz kalınan radyasyon dozu ile meme kanseri riskinde artış olmaktadır. Adolesan dönemde radyasyona maruz kalanlarda bu risk daha da artmaktadır. Radyasyona maruziyetden yaklaşık 15 yıl veya daha uzun bir sürede meme kanseri ortaya çıkmaktadır(117,145).

### Menstrüel ve Reprodüktif Faktörler

Erken menarş ve geç menapoz, meme kanseri riskinde % 4 ile % 5 kadar artışa yol açar. Diğer iyi bilinen hormonal risk faktörleri ise ilk doğum yaşı ve doğurganlıktır. İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapanlara göre, 20 yaşından önce ilk doğumunu yapanlarda %50 oranında daha az risk vardır. Ayrıca, 3 veya daha çok çocuk doğuranlarda, hiç doğurmayanlara göre daha düşük risk gözlenmiştir (90,93).

#### HRT ve Oral Kontraseptifler

Oral kontraseptif kullanımı, kullanmayanlara göre meme kanseri riskinde çok hafif bir riske neden olmaktadır. Bununla birlikte bu risk, oral kontraseptif kullanımının bırakılmasıyla birlikte kaybolmaktadır(20). Hormon replasman tedavisi alan ve 53.863 postmenapozal kadını içeren büyük bir meta-analizde, 1.14'lük rölatif risk oranı ile meme kanseri riskinin arttığı bildirildi. Bu risk 5 yıldan fazla HRT alalarda daha da artmaktadır. Fakat HRT bırakılması ile meme kanseri riski de azalmaktadır (21).

#### Alkol kullanımı

Alkol tüketimi, iki büyük prospektif kohort çalışmayı da içeren bir çok çalışmada 1.2 ile 1.6 risk oranında artışa neden olduğu bildirildi. Güncel bir çalışmada, alkol kullanmayan premenapozal kadınlarda, alkol kullanımının seks steroid hormon düzeylerinde artışa neden olduğu gösterildi. Fakat bunun mekanizması açıklanamadı (68,119).

#### Atipik proliferatif değişiklikler

Memedeki proliferatif değişiklikler, öncelikle duktal ve lobuler hiperplazide 1.5 ile 2 kat rölatif risk varken, atipik hiperplazide 3 ile 5 kat artmış rölatif risk vardır. Meme kanseri ailesel hikayesi olan kadınlarda, atipik proliferatif değişiklikler varsa, meme kanseri rölatif riski 11 kat daha fazla ilişkili bulunmuştur (38,39).

Tablo 1. Meme kanseri risk faktörleri.

<u>Majör risk faktörleri</u>	<u>Tartışmalı (şüpheli) risk faktörleri</u>
BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları	Psikosomatik faktörler
Li-Fraumeni sendromu	Yüksek yağ diyeti
İleri yaş	Kompleks fibroadenoma
Batı kültüründe yaşam biçimi	Düşük sıklıkta elektromanyetik alanlara maruziyet
Birinci derece akrabalarda meme ya da over kanseri öyküsü	<u>Meme kanseri riskini azaltan faktörler</u>
Atipik hiperplazi	20 yaş öncesi ful-term gebelik
İyonize radyasyona maruziyet	Artmış gebelik sayısı
Önceki meme kanseri teşhisi	45 yaş öncesi overiektomi öyküsü
<u>Orta derecede risk faktörleri</u>	Düzenli egzersiz (özellikle adolesan ve erken yetişkin döneminde)
Erken menarş	Emzirme
Geç menapoz	<u>Etkisi olmayanlar</u>
Nulliparite	Meme büyüklüğü
Yüksek sosyoekonomik düzey	Proliferatif değişiklik olmaksızın fibrokistik hastalık
Alkol alımı	Sigara içimi
Obezite (yalnızca postmenapozal kadında)	Organoklorin maruziyeti
Sakıncalı mammografik parankimal görünüm	
Önceden uterus, over ve kolon kanseri teşhisi	
Atipi olmaksızın hiperplazili benign meme hastalığı	
Oral kontraseptif	

kullanımı ( 10 yıldan daha  
fazla kullananlar için)

Postmenapozal östrojen  
replasman tedavisi

### **2.1.3. Meme kanseri patolojik sınıflandırması**

Meme kanserinin patolojik sınıflandırmasında en yaygın olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması kullanılır (72,125)(Tablo 2).

#### 2.1.3.a.Karsinoma İn Situ

Karsinoma in situ, duktus ve lobuler asinüsü tutan ve proliferen olan , ancak bazal membranı geçmeyerek invazyon yapmamış malign epitelyal hücrelerin varlığı olarak tanımlanır. Karsinoma in situ, ductal karsinoma insitu (DCIS) ve lobuler karsinoma in situ (LCIS) olarak iki gruba ayrılır. DCIS, fiziksel muayene bulguları olmayan hastalarda tarama mamografide tipik mikrokalsifikasyon kümeleri şeklinde sıklıkla saptanır. Oysa, LCIS' da mamografik bulgular çok nadirdir ve çoğunlukla yapılan biopsiler sonrasında rastlantısal olarak saptanır (156).

#### 2.1.3.b.İnvaziv Karsinoma

##### İnvaziv duktal karsinoma

Tüm invaziv meme malignitelerinin yaklaşık % 65-80'ini oluşturur. Prognoz için önemli patolojik özelliklerini, tümör büyüklüğü, aksiler lenf nodu tutulumu, greydi, lenfovasküler invazyon varlığı oluşturur(51). Tümör greyd'lemesi, Bloom-Richardson sistemi kullanılarak, iyi diferansiye (greyd 1), orta diferansiye (greyd 2) ve kötü diferansiye (greyd 3) olarak yapılır (42).

##### İnvaziv lobuler karsinoma

Tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Memede sınırları belirsiz kalınlaşma ya da sertlikle karakterizedir. Mikroskopik olarak duktus ve lobullerin etrafında tek sıra kordonlar(Indian file patern) halinde büyüme eğilimi gösteren küçük hücrelerden oluşur (4).

### İnflamatuvar karsinoma

İnvaziv duktal karsinomun spesifik alt grubunda bulunur. Meme kanserinin en agresif gidişli olanıdır. Yeni tanı konan meme kanserinin %1-3 kadarını oluşturur. Meme derisinde ödemin eşlik ettiği diffüz eritem ve kahverengi endürasyonun oluşturduğu portakal kabuğu görünümü (peau d'orange) vardır. Primer olarak evre IIIB kanserdir (134).

### İnvaziv duktal karsinomun spesifik alt tipleri

Müsinöz karsinoma, medüller karsinoma, papiller karsinoma, tübüler karsinoma ve inflamatuvar karsinoma yer alır. Müsinöz karsinoma, olguların %2'den azını oluşturur ve ileri yaş kadınlarda görülür. Aksiler lenf nod metastazı daha az olup prognozu daha iyidir. Medüller karsinoma, tüm invaziv duktal karsinomların yaklaşık %5 'ini oluşturur ve daha genç yaşlarda gözlenir. Klasik infiltratif duktal kansere göre prognozu daha iyidir. Papiller karsinom, tüm invaziv meme kanserlerinin %1-2'sini oluşturur. Yaşlılarda görülme eğiliminde olup, klasik invaziv duktal karsinomadan daha iyi prognoza sahiptir. Tubuler karsinoma, tüm invaziv meme kanserlerinin %1-2'sini oluşturur. İnvaziv duktal karsinomanın en iyi differansiye şeklini oluşturur (156).

### Paget hastalığı

Meme başının Paget hastalığı, meme başı epidermisinde Paget hücrelerinin varlığı ile karakterizedir. Bu hücreler, iri, yuvarlak ya da oval intraepidermal hücreler olup, iri nükleusları, geniş, berrak stoplazmaları vardır. Meme başı çevresinde ekzematöz değişiklikler ile karakterizedir. Bir çok görüş, Paget hastalığını, duktal karsinoma in situ'nun bir varyantı olarak kabul etmektedir. Prognozu, invaziv komponentin varlığına göre değişir (156).

Tablo 2. Meme kanserinin WHO (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflaması.

NONİNVAZİV KARSİNOMA

Duktal karsinoma in situ

Lobuler karsinoma in situ

İNVAZİV KARSİNOMA

İnvaziv duktal karsinom

İnvaziv lobuler karsinom

Müsinöz karsinoma

Medüller karsinoma

Papiller karsinoma

Tubuler karsinoma

Adenoid kistik karsinoma

Jüvenil karsinoma

Apokrin karsinoma

Metaplastik karsinoma

İnflamatuar karsinoma

PAGET HASTALIĞI

#### **2.1.4. Evreleme:**

Evreleme, meme kanserinin görünümdeki yaygınlığına göre hastaların gruplandırılması olanağını sunar. Evreleme, klinik yada patolojik bulgulara göre yapılabilir. Amerikan Birleşik Kanser Komitesi, tümör büyüklüğü, lenf nodu ve uzak organ metastazını temel alan hem klinik hem de patolojik TNM evrelemesini yeniden düzenleyerek 2002 yılında yayınladılar. Bu yeni AJCC TNM evreleme sisteminde 1997 yılındaki evreleme sistemine göre bazı değişiklikler yapıldı. Bu değişiklikler şunlardır:

- Mikrometastazların izole tümör hücrelerinden ayrımı, boyut faktörü ve malignite aktivitesinin histolojik bulgularına göre yapılmıştır.
- Sentinel lenf nodu diseksiyonu ve immunhistokimyasal veya moleküler teknikler için yeni tanıtıcılar eklenmiştir.
- Majör lenf nodu sınıflandırması, rutin hematoksilen-eozin ya da immunohistokimyasal yöntem ile tespit edilen lenf nodu sayısına göre yapılmış olup, ektranodal yayılım sistemden çıkartılmıştır.
- Supraklavikular yada infraklavikular lenf nodu metastazı, N3 olarak evrelemeye eklenmiştir.
- Lenfosintigrafi hariç, görüntüleme yöntemleri veya klinik muayene ile tespit edilen makroskopik olarak tutulum gösteren internal mammarian lenf nodları, beraberinde aksiler lenf nodu metastazı yoksa N2, aksiler lenf nodu metastazı varsa N3 olarak sınıflandırılmıştır. Görüntüleme yöntemleri ve klinik inceleme ile tespit edilemeyen ancak lenfosintigrafi kullanılarak yapılan sentinel lenf nodu diseksiyonu ile tespit edilen internal mammarian lenf nodlarının mikroskopik tutulumu N1 olarak sınıflandırılmıştır (4,134).

### **2.1.6. Tedavi sonrası takip**

Meme kanserli hastaların adjuvan tedavi sonrası takibinde ASCO ve NCCN klavuzlarının önerileri sıklıkla kullanılmaktadır. NCCN klavuzu, adjuvan tedavisi tamamlanmış olan meme kanserli hastalarda, fizik muayene ve hikaye almayı, ilk 5 yıl için her 4-6 ayda bir, mammografiyi her 12 ayda bir ( meme koruyucu cerrahi yapılmış ise radyoterapi sonrası her 6-12 ayda bir) yapılmasını önermektedir. Ayrıca tamoksifen alan kadınlarda eğer uterus duruyorsa yıllık jinekolojik muayene, aromataz inhibitörü alan veya tedaviye sekonder ovaryel yetmezlik gözlenen hastalar için kemik yoğunluğunun takibini önermektedir (158). ASCO klavuzu, adjuvan tedavisi tamamlanmış olan meme kanserli hastalarda, fizik muayene ve hikaye almayı, tedavi sonrası ilk 3 yıl için her 3 ile 6 ayda bir, 4 ve 5. yıllarda her 6 ile 12 ayda bir, daha sonra yıllık olarak yapılmayı önermektedir. Tedavi sonrası ilk mammografiyi, teşhisteki mamografiden 1 yıl sonra yapılması önermekte, ancak adjuvan radyoterapi sonrası 6 aydan daha erken önerilmemektedir. Sonraki mamografiler, takipteki anormalliklerin gösterilmesine göre yapılmalıdır. Ayrıca, düzenli jinekolojik muayene, tamoksifen tedavisi almakta olan tüm hastalara önerilmektedir. ASCO klavuzu, adjuvan tedaviler sonrası, rutin kan testleri, PA akciğer grafisi, kemik sintigrafisi, karaciğer USG, PET BT, meme MRI, tümör markırları (CA 15-3, CA 27.29, CEA) tetkiklerini takip için önermemektedir (87)

## **2.2. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK DEĞERLENDİRME**

### **2.2.1 Prognostik faktörlerin rekürrens riski açısından önemi:**

Meme kanseri prognozu tümör büyüklüğü, lenf nodu tutulumu, tümör greydi, östrojen ve progesteron reseptör durumunu da içeren bir çok faktör tarafından saptanır. Prognostik faktörler, adjuvan tedavi gereken meme kanserli hastaları saptamaya yardımcı olurken, prediktif faktörler hangi adjuvan tedavinin en uygun olduğunu gösterir. Lenf nodu tutulumu hastalısız sağkalım (DFS) ve toplam sağkalım (OS) için en önemli prognostik faktördür (13). Erken veriler, pozitif lenf nodlu hastalarda tedavi başarısızlığındaki sıklığın daha yüksek olduğunu ve sağkalımın pozitif lenf nodu sayısı ile orantısız olduğunu gösterdi (17,107). Ayrıca, Carter ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, primer tümör büyüklüğünün lenf nodu metastazında artış ile ilişkili olduğunu ve hem tümör büyüklüğü hem de lenf nodu tutulumundaki artışın sağkalımda azalma ile ilişkili olduğu gösterildi (27). Erken evre meme kanserli bir çok hasta teşhis anında uzak mikrometastatik hastalığa sahiptir. Bu durum, daha sonra aşikar metastatik hastalık gelişmesi için risk oluşturur (46). Adjuvan sistemik tedavi, bu uzak mikrometastatik depozitleri yok eder. Bilinen prognostik faktörleri kullanarak, klinik olarak sessiz olan mikrometastatik hastalığın bireysel hasta riski tahmin edilmeye çalışılır. Bireylerin bilinen prediktif faktörleri temel alınarak optimal adjuvan tedavinin seçilmesi sağlanır. Güncel standart yaklaşım, lenf nodu pozitif tüm hastalara adjuvan tedavi verilmesi şeklindedir. Ayrıca, bir çok nod negatif hasta da prognostik ve prediktif faktörlerin durumuna göre adjuvan tedaviden fayda görmektedir (30). Meme kanseri risk sınıflandırmasında önemli yeri olan St Gallen tedavi klavuzu, 2005 yılında, HER-2/neu overekspresyonu veya amplifikasyonu ve peritümöral vasküler invazyon eklenerek operabl meme kanserli hastalar için risk kategorileri güncellendi.

Düşük, orta ve yüksek risk kategorisini oluşturan bu sınıflama tablo 3' de gösterilmiştir. Prognostik ve prediktif faktörlerin eklenmesine göre oluşturulan risk kategorilerine göre tedaviler planlanmaktadır. (57).

Tablo 3. Operabl meme kanserli hastalarda risk kategorileri (57)

Risk	kategorisi
Hasta/hastalık özellikleri	
Düşük	Nod
negatif ve aşağıdakilerin hepsi	
Pat. tümör büyüklüğü 2 cm veya daha az	
Tümör greydi: 1	
Peritümöral vasküler invazyon yok	
HER-2/neu gen ekspresyonu yok	
Hasta yaşı 35 veya daha yukarıda	
Orta	Nod
negatif ve aşağıdakilerden en az birinin varlığı	
Pat. tümör boyutu 2 cm'den büyük	
Tümör greydi 2-3	

Peritümöral vasküler invazyon varlığı

HER-2/neu gen ekspresyon pozitifliği

Hasta yaşı 35'den küçük

veya

Nod

pozitif (1-3) ile birlikte HER-2/neu negatifliği

Yüksek

Nod

pozitif (1-3) ile birlikte HER-2/neu gen pozitifliği

4

veya daha fazla nod pozitifliği

## **2.2.2. Prognostik ve prediktif faktörler**

### **2.2.2.a. Aksiller nodal durum**

Erken evre meme kanserli hastalarda en önemli prognostik gösterge aksiler lenf nodu tutulumunun varlığı veya yokluğudur. Ayrıca, tutulan aksiler lenf nodu sayısı ve uzak rekürrens riski arasında da direkt bir ilişki vardır (106, 120). Aksiler lenf nodu sayısına göre dört nodal grup oluşturulan NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) çalışmasında, 5-yıllık sağkalım oranları, nod negatif hastalarda %82.8, nod sayısı 1-3 olanlarda %73, nod sayısı 4-12 olanlarda %45.7 ve nod sayısı 13 ve üzeri olanlarda %28.4 olarak bildirilmiştir. Bu veriler, rekürrens riskinin adjuvan sistemik tedaviye ihtiyaç duyan lenf nodu pozitif hastalıkta önemli olduğunu gösterir. Özellikle lenf nodu negatif düşük riskli hastalarda, lenf nodu dışındaki prognostik faktörler değerlendirilmelidir (44). Deneyimli bir cerrahın sentinel lenf nodu biopsisi ile aksiller evrelemeyi yapması daha doğru olmasına rağmen, sentinel lenf nodunun optimal patolojik değerlendirmesinde hala sorunlar vardır. Sentinel lenf nodunun çok sayıda ince kesitlerinin alınması, histolojik olarak negatif lenf nodları için immünohistokimyasal (İHK) yöntemin duyarlılığını artırır. Tek başına İHK'sal yöntem ile okkült mikrometastazların saptanması hala tartışılmaktadır (61,80,103). 1275 nod negatif kadın hastayı içeren International Breast Cancer Study Group Trial V çalışmasında CMF kemoterapisi alan ve almayan hastalardan 736 hastanın aksiler lenf nodları, İHK'sal ve seri ince kesit alma ile daha sonradan tekrar değerlendirildiğinde %27 oranında okkült metastaz bulunmuştur. Saptanan bu metastazlar daha yüksek rekürrens riski ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (35). Hansen ve ark.'nın 696 sentinel lenf nodunu hematoksilen-eosin ve İHK'sal yöntemler ile değerlendirilen prospektif bir çalışmada, sentinel lenf nodu metastaz büyüklüğünün de hastaliksız sağkalım için önemli bir gösterge olduğunu bildirdiler. Aynı çalışmada, sentinel lenf nodu negatif ve İHK'sal pozitif gruplar arasında hastaliksız sağkalım veya toplam sağkalımda

farklılık bulunamamıştır. Hematoksilen-eosin boyama ile pozitif lenf nodu olan hastalara adjuvan tedavi standart bir yaklaşım olup, yalnızca İHK'sal yöntem ile sentinel lenf nodu pozitif olan hastalarda tedavi kararı, tümör büyüklüğü, greydi, hormon reseptör durumu ve yaş gibi diğer faktörler ile birlikte değerlendirilmelidir (30,63). Ayrıca geniş hasta popülasyonlu bir çalışmada, primer tümör büyüklüğünün nodal tutulumda artışa yol açtığı bildirilmekte ve hem primer tümör büyüklüğü hem de tutulan nod sayısındaki artışın sağkalımda azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (27).

### **2.2.2.b. Tümör büyüklüğü**

Tümör büyüklüğü, tutulan aksiler lenf nodu varlığı ve sayısı ile ilişkilidir. Ayrıca, tümör büyüklüğü ile uzak rekürrens oranlarında artış gözlenmesi, tümör büyüklüğünü bağımsız bir prognostik faktör olarak ortaya koymaktadır. 13464 nod negatif meme kanserli kadın hastayı içeren bir çalışmada, 1 cm'den küçük tümörlü hastalarda 5-yıllık sağkalım oranı %99 iken, tümör çapı 1-3 cm ve 3-5 cm arasındaki hastalarda bu oran %89 ve %86 kadardır (27). Rosen ve ark.'nın yaptığı daha uzun süreli bir çalışmada, tümör çapı 1 cm ve daha küçük olan hastalarda 20-yıllık sağkalım oranını %88, 1.1 cm ile 3 cm arasındakilerde %72 ve 3.1 cm-5 cm arasında olanlarda %72 olarak bildirdiler. Ayrıca metastatik hastalık gelişmesine kadar geçen zaman, tümör büyüklüğü artış gösterenlerde daha kısa olarak bildirilmiştir (124). Nod negatif hastalar için tümör büyüklüğü, çok güçlü bir prognostik gösterge olup rutin olarak adjuvan tedavi kararını vermede kullanılır. Genellikle, tümör büyüklüğü 1-2 cm'den büyük olanlar %20'nin üzerinde uzak rekürrens riskine sahip oldukları için adjuvan tedavi düşünülür (30).

### **2.2.2.c. Tümör tipi ve greydi:**

İnvaziv meme kanserinden daha az gözlenen saf tübüler, müsinöz, medüller, papiller kanser tipleri daha iyi prognoza sahiptir. Bu nedenle tümörlerin patolojik karakteristikleri prognostik öneme sahiptir (28,32,121). Çoklu greydleme sistemi olan Scarff-Bloom-

Richardson (SBR) sistemi meme kanseri greydelemesinde en sıklıkla kullanılır. Burada, mitotik indeks, differansiasyon ve pleomorfizm, 1'den 3'e kadar skorlanır ve her bir kategoriden skorlar toplanır. Skoru 3- 5 olanlar iyi diferansiye (greyd 1), 6-7 olanlar orta diferansiye (greyd 2) ve 8-9 arası olanlar kötü diferansiye (greyd 3) olarak tanımlanır (16). SBR ile saptanan histolojik greyd ve 5-yıllık hastalısız sağkalım arasındaki bağlantı, 1262 kadın hastayı içeren bir çalışmada gösterildi. SBR greyd 3 hastalarda, SBR greyd 1 olan hastalar ile karşılaştırıldığında rölaf rekürrens riski 4.4 kat daha fazla olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak, tümör greydi prognostik bir göstergedir ve tümör büyüklüğü sınırda veya belirsiz olan nod negatif hastalarda primer olarak kullanılır (30,94). 1 cm ve altındaki tümörlü hastaları içeren iki önemli çalışmada yüksek tümör greydi, adjuvan sistemik tedavi alan hastaların %17-%26'sında kötü sonuçla ilişkili olarak bulunmuştur (95,101).

#### **2.2.2.d. Lenfatik ve vasküler invazyon:**

Peritümöral lenfatik damar ve vasküler invazyon lokal ve uzak rekürrens riski açısından prognostik öneme sahiptir. 20-yıllık takipte Rosen ve ark. 'rı lenfovasküler invazyon ile rekürrens ve ölüm riski arasındaki bağlantıyı bildirdiler. Lenfovasküler invazyonu olan evre I kadın hastalarda rekürrens oranı %38 iken, lenfovasküler invazyonu olmayanlarda rekürrens oranı %22 olarak bulunmuştur (123). Sistemik tedavi almamış ve sistemik tedavi aldığı kaydedilmeyen iki önemli çalışmada, toplam sağkalım ve/veya hastalısız sağkalım için vasküler invazyon önemli bir prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir (24,123). Ayrıca, perioperatif tek siklüs kemoterapi alan veya sistemik adjuvan tedavi almayan nod negatif meme kanserli 1275 kadın hastayı içeren International Breast Cancer Study Group çalışmasında, lenfovasküler invazyonu olanlarda 5-yıllık rekürrens riskinde %15'lik bir artış bulunmuştur (109).

**2.2.2.e. Proliferasyon markırları:** Tümör proliferasyon oranını ölçen çeşitli metodlar, onların prognoz ile olan ilişkilerini ölçmede değerlendirilmiştir. Varsayılan bu markırları,

S-faz fraksiyonu, timidin labeling indeks, mitotik indeks, Ki-67 ve proliferating-cell nuclear antigeni kapsar (6,24,144).

**S-faz fraksiyonu:** S-faz fraksiyonu, hücrenin S veya DNA sentez fazında proliferasyon yapan bir tümördeki hücrelerin oranı olarak bilinir. Bir çok çalışmada, nod negatif meme kanseri hastalarında azalmış sağkalım açısından artmış S-faz fraksiyonunun prognostik değeri araştırılmıştır (25,139,155). San Antonio Breast Cancer Data Base Analizinde, yüksek S-faz fraksiyonu olanlarda 1.29 daha fazla rölatif ölüm riski bildirilmiştir. Östrojen reseptörü pozitif ve nod negatif tümörlü hastaları içeren NSABP B-14 çalışmasında da yüksek S-faz fraksiyonlu hastalarda düşük S-faz fraksiyonlulara göre daha fazla rekürrens ve ölüm riski bildirilmiştir (25,154). Yüksek S-faz fraksiyonu, primer olarak sınırdaki tümörlü veya belirsiz büyüklükteki nod negatif hastalarda adjuvan tedavi verme kararında kullanılır. Düşük S-faz fraksiyonu adjuvan tedavi gerekmeyen nod negatif hastaları belirlemede kullanılır (30).

**Ki-67:** Bu markır, hücre siklusunun G0 fazı haricindeki tüm evrelerde ekspresyon yapan hücre proliferasyonu ile ilişkili antijendir. Ki-67 markır, üç önemli çalışmanın tek yönlü analizinde toplam sağkalım ve/veya hastalısız sağkalım açısından önemli prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir (60,118,126). Ayrıca dört önemli çalışmanın çok yönlü analizinde, Ki-67 markır hastalısız sağkalım ve/veya toplam sağkalım açısından prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir (60,118,126,132).

**Mitotik indeks:** Bu markır, on veya daha fazla 40 büyütme mikroskopik alanda genellikle ölçülen tümörün bir alanındaki mitotik figürlerin sayısı olarak tanımlanır. Bu markır, nod negatif meme kanserli hastalarda mitotik indeks'in prognostik değerini araştıran çalışmalarda toplam sağkalım veya hastalısız sağkalım açısından önemli bir faktör olarak bildirilmiştir (10,118,139).

**Diğerleri:** Prolifere hücre nükleer antijeni ve timidin labeling index proliferasyon markırları ile ilgili az sayıda çalışma olup, nod negatif meme kanserinde prognostik öneme sahiptirler.

#### **2.2.2.f. Yaş ve etnik yapı**

Afrikan Amerikalı ve hispanik kadınlar, beyazlar ile karşılaştırıldığında meme kanserinde azalmış sağkalıma sahiptirler (37,41). Meme kanserinde sonuçlar üzerine yaşın etkinliğini değerlendiren bir çok çalışma, ihtilafli sonuçlar ortaya koymuştur (49,62,71). Fakat iki önemli büyük çalışma 35 yaşından daha genç kadın hastalar için kötü prognoz bildirdiler (5,111). Teşhis anında etnik yapı ve yaş, daha yüksek rekürrens riskine sahip bir grup hastayı belirlemek için kullanılabilir. Bu faktörler, tümör büyüklüğü gibi daha iyi bilinen diğer prognostik faktörlere eklenerek kullanılabilir.

#### **2.2.2.g: Östrojen ve Progesteron reseptör durumu**

İnvaziv meme kanserinde östrojen ve progesteron reseptörleri, hem prognostik hem de prediktif faktörlerdir. NSABP B-06 çalışması, erken evre meme kanserli hadınlarda mastektomi, yalnızca lumpektomi veya lumpektomi sonrası radyoterapi tedavisi uygulanan randomize bir çalışma olup, bu çalışmada adjuvan sistemik tedavi verilmemiştir. Östrojen reseptörü pozitif kadın hastalarda 5-yıllık hastaliksız sağkalım ve toplam sağkalım oranları %74 ve %92 iken, östrojen reseptörü negatif olanlarda 5-yıllık hastaliksız sağkalım %66 ve toplam sağkalım oranı %82 olarak bildirilmiştir(47). Östrojen reseptör pozitif hastalar çok yavaş seyirli olup, öncelikle metastazını kemik ve yumuşak dokuya yaparlar. Östrojen reseptör negatif tümörler ise daha erken relaps ederler ve karaciğer, akciğer ve santral sinir sistemine çoğunlukla metastaz yaparlar. Östrojen reseptör pozitif tümörler sıklıkla daha iyi differansiasyon gösterir ve diğer olumlu prognostik faktörler ile ilişkilidir. Ayrıca östrojen reseptör pozitif hastalar , östrojen reseptörü negatif olanlardan daha iyi hataliksız sağkalım ve toplam sağkalıma sahiptirler (70)). Progesteron reseptörü, bir çok çalışmada östrojen

reseptöründen çok daha değerli prognostik gösterge olarak bildirilmiştir. Steroid hormonal reseptörlerin en iyi kullanımı, prognoz saptamada değil sistemik endokrin tedaviye cevabı saptamada ve optimal adjuvan sistemik tedavilerin belirlenmesi olmaktadır. Bir çok güncel çalışma, özellikle neoadjuvan durumda kemoterapiye cevap için östrojen reseptör negatifliğinin güçlü prediktif değerini vurgulamaktadır (74).

### **2.2.2.h: HER-2/neu durumu**

HER-2/neu proto-onkogeni kromozom 17q21 üzerinde lokalize olup intrinsek trozin kinaz aktiviteli 185-kDa transmembran bir glikoproteini kodlar. HER-2/neu epidermal büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir. İnsan meme tumoründe yaklaşık %25-30 kadar HER-2/neu aşırı ekspresyon veya amplifikasyonu gözlenir (129,135). HER-2/neu aşırı ekspresyonu, nod negatif hastalarda çok değişken etkisi gözlenirken, nod pozitif hastalarda artmış mortalite ve artmış rekürrens oranları, artmış tümör agresifliği ile ilişkilidir. Nod pozitif ve HER-2 aşırı ekspresyonu gözlenen hastalarda daha kısa hastaliksız ve toplam sağ kalım vardır (18,31,115). HER-2/neu aşırı ekspresyonu, östrojen reseptörü ile tersine bir bağlantılı olup kötü diferansiye tümörler ile ilişkilidir. Aşırı HER-2/neu ekspresyon gösteren tümörlerde, normal ekspresyonlulara göre daha kısa sağkalım vardır. Bir çok güncel çalışma, HER-2/neu aşırı eksprese eden meme kanserli hastaların, antrasiklin içeren adjuvan kemoterapilerden diğer rejimlere göre daha fazla kazanç elde edildiğini göstermiştir (48). Ayrıca, bir çok çalışma, her-2 aşırı ekspresyonunun tamoksifen direncinin bir markerı olduğunu bildirdi. Östrojen reseptörü ve HER-2 pozitif postmenapozal hastalarda aromataz inhibitörleri, tamoksifenden daha etkilidir. HER-2 testinin en önemli klinik kullanım alanı, HER-2'ya yönelik trastuzumab tedavisine aday hastaları belirlemektir (12,151).

### **2.2.2.I: Plazminojen aktivatör sistemi**

Bu sistemi oluşturan, ürokinaz-tip plazminojen aktivatör (uPA) ve plazminojen aktivatör inhibitör tip-1 (PAI-1) her ikisi de tümör invazyonu ve metastazla ilişkili olup prognostik ve prediktif öneme sahiptir. Düşük uPA/PAI-1'li nod negatif hastalar, sistemik adjuvan tedavi almaksızın daha iyi prognoza sahiptirler ve 5-yıllık hastaliksız sağkalım %90'nın üzerindedir. Oysa, yüksek uPA/PAI-1'li nod negatif hastalar relaps açısından daha fazla riske sahiptir (64,66,83). 3424 primer meme kanserli hastayı içeren çok yönlü bir analizde, uPA ve PAI-1 düzeylerinin prediktif değere sahip olduğu ve relapssız sağkalımın en önemli prognostik belirteci olduğu gösterilmiştir (65). Yüksek uPA ve PAI-1 konsantrasyonlu hastalar, düşük düzeyli, hastalar ile karşılaştırıldığında adjuvan kemoterapiden daha fazla yarar görürler (30).

### **2.2.2.j: Genetik profil**

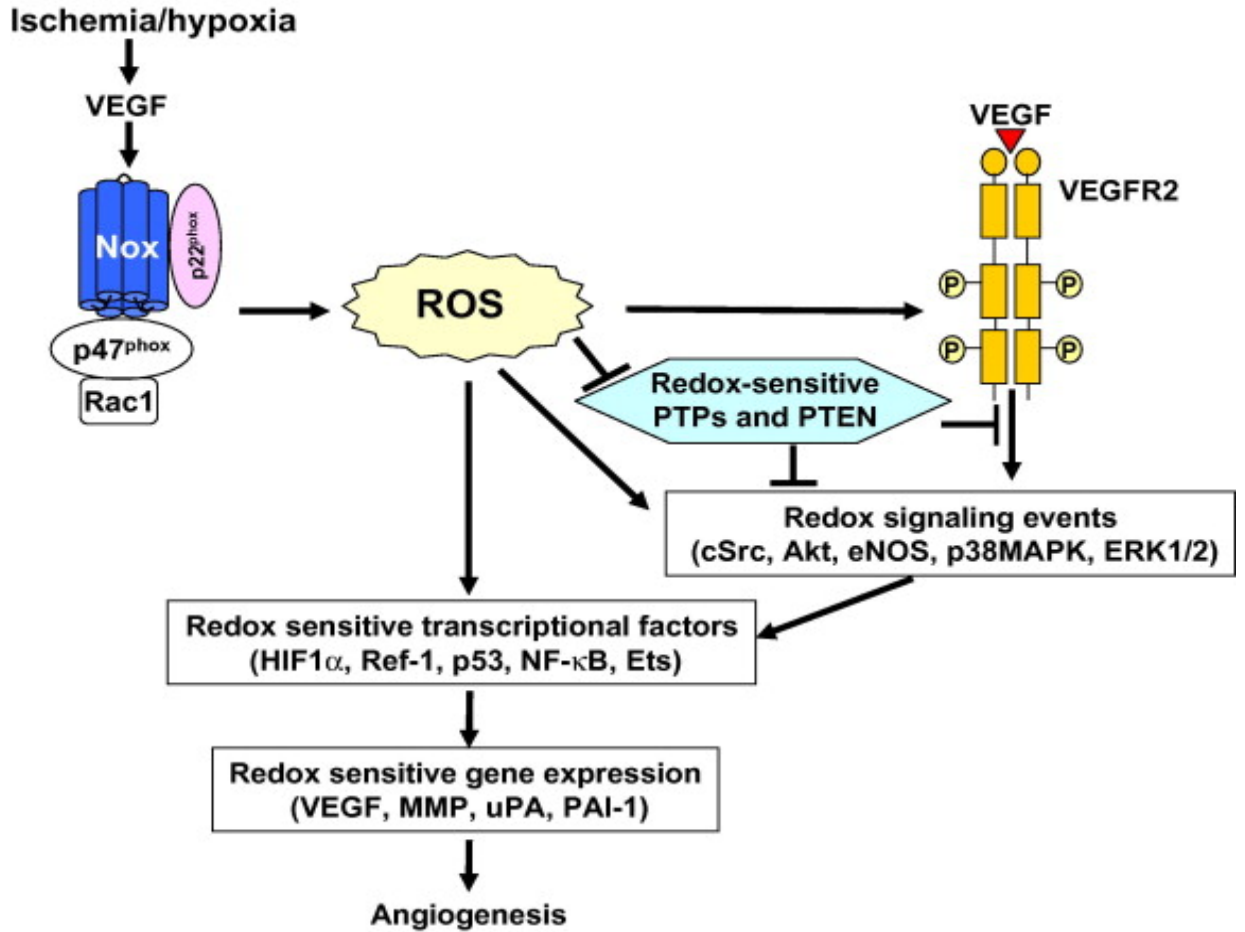
Mikroarrey analizleri, prognostik ve prediktif bilgi veren gen ekspresyon profilini belirlemede kullanılabilir. 21-gen PCR assay kullanımı (Oncotype Dx), nod negatif ve hormon reseptörü pozitif olan meme kanserli hastalarda FDA tarafından 2004 yılında onaylanmıştır. Bu yöntem, parafin emdirilmiş dokularda gen ekspresyon çalışmalarını temel alır. Aday genlerin detaylı seçilmesi sonrası, 16 kanser geni ve 5 referans geninden oluşan bir panel seçilerek bu analiz yapılır. Gen ekspresyon düzeyleri her bir tümör için rekürrens skoru (RS)'nin ölçülmesine izin veren bir algoritma halinde şekillendirilir. Rekürrens risk skoru 18'den az olan hastalar, düşük riskli kabul edilir ve hormonal tedavilere sitotoksik tedavinin eklenmesinden muhtemelen fayda görmezler. Rekürrens risk skoru 30'dan fazla olan hastalar yüksek sistemik hastalık riskine sahiptirler ve kemoterapiden maksimum fayda görürler. Orta risk skorlu (18-30) hastalar, karar vermede ikilem oluştururlar. Ve bu hasta popülasyonunda tedaviye yaklaşımı daha iyi belirlemede çalışmalar yapılmalıdır (105).

### **2.3. TÜMÖR HİPOKSİSİ:**

Difüzyon sınırlı hipoksi de denen kronik hipoksi, hipoksiye adapte olabilen kapillerlerden uzak tümör hücreleri ile ilgilidir. Hipoksi ile oluşturulan karmaşık yapılı mikroçevre, tümör hücrelerinde genetik kararsızlık oluşturur ve bu durum, hipoksinin malignitede ilerlemeye yol açtığı hipotezini destekler (67,88). Hipoksi, ayrıca, meme kanseri, baş-boyun kanseri, ve yumuşak doku kanserlerinde prognostik bir etki olarak gösterilmiştir (143). Tümör içi hipoksisi, çoğalan tümör dokusunda fonksiyonel kan damarlarının kaybına yol açar. Eğer hipoksi şiddetli veya uzun süreli olursa hücre ölümü görülür. Kronik hipoksik ortamda malign hücreler, oksijen azalmasına bağlı ölümden kaçmalarına izin veren genetik ve adaptif değişiklikler geçirebilirler. Bu değişiklikler, daha agresif malign tümör fenotipi oluşmasına, radyoterapi ve kemoterapiye direnç gelişmesine ve daha kötü prognoz ile sonuçlanmaya yol açar (67,73). Bölgesel tümör hipoksisi, tümör metastazlarından önce karsinogenezis'in erken evrelerinde gelişir ve sıklıkla non-invaziv tümörlerde gözlenir (67). Hipoksinin agresif bir tümör tipini mi oluşturduğu veya agresif bir tümörün devamlı tartışılan hipoksiyi mi oluşturduğu henüz tam olarak ortaya konamadı. Tümör hücreleri tümör hipoksisine bağlı olarak, HIF-1 alfa, Karbonik anhidraz IX gibi birçok hipoksik markır eksprese ederler. Hipoksik markırları eksprese eden tümörler, bu markırları eksprese etmeyen tümör tiplerine göre çok daha agresif özellikler gösterirler. Diğer taraftan, agresif tümörlerin, hızlı tümör hücre büyümesi ve damarlanmadaki düzensiz artışın bir sonucu olarak hipoksik markırları eksprese ettiği de gösterilmiştir (8). Hipoksi, glikolizis, apoptozis ve proliferasyon gibi işlemlerin sürecini etkilediği gerçeğine dayanılarak, güncel veriler hipoksi ile hücre diferansiasyonunda kayıp arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Örneğin, nroblastomadaki bir çok çalışma, hipoksinin nöronal ekspresyon kayıplı diferansiasyon kaybı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (86,110,128). Eğer hipoksi, tümör hücrelerini kötü diferansiasyon durumuna zorlar ise, bu durum

hipoksik tümörlerde gözlenen çok agresif özelliklerin bir çoğunu kısmi olarak açıklayabilir. Helczynska ve ark.'rı tarafından duktal carsinoma in situ modelinde santral nekrotik alanın çevresindeki hipoksik alanda HIF-1 alfa ve sitokeratin 19 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Benzer bulgular, hipoksik ortamda meme kanseri hücre dizilerinde büyümenin olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (69,99).

Hipoksinin, tümör hücrelerinde üzerinde oluşturduğu değişiklikler aşağıda şekil 1'de gösterilmektedir (149).



Hipoksik ortamda, NADPH Oksidaz'dan türeyen reaktif oksijen türleri (ROS), VEGF ve VEGFR2 yolağı, redoks sinyalizasyon ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri aracılığı ile tümör anjiogenezisinde önemli rol oynar. Tümör anjiogenezis'indeki transkripsiyon

faktörleri ve genleri, reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından regüle edilir. Bu redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ve genleri, HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), Ref-1, p53, NF-kappa B ve ETS transkripsiyon faktör'ü oluştururlar. Bu faktörler de hipoksik tümör hücrelerinde redoks duyarlı gen ekspresyon markırları (VEGF,MMP,uPA,PAI-1) aracılığıyla tümör anjiogenezis'ini artırırlar (149).

Tümör hipoksisine cevapda, VEGF ve eritropoetini de içeren bir çok anjiogenezis ile ilişkili genler, alfa ve beta subünitlerden oluşan bir heterodimerik transkripsiyon faktör olan HIF-1 tarafından artırılır. HIF-1, anjiogenezis, hücre sağkalımı ve invazyon dahil tümör büyümesinin bir çok biçimlerinde bir çok transkripsiyon genini aktive eder. HIF-1 ekspresyonunun yüksek düzeyleri bir çok kanserde gözlemlendi ve tümöröjenesis ile ilişkili bulundu (85,97). Gorrach ve ark.'ri hipoksi durumunda, Rac 1 aşırı ekspresyonunun reaktif oksijen türleri aracılığı ile HIF-1 ekspresyonunu artırdığını gösterdiler (58). Böylece, Rac 1/NADPH oksidaz/Reaktif oksijen türleri ileti yolları, hipoksi ve VEGF'e cevapda HIF-1 ve VEGF ekspresyonunun artırılmasında önemli rol oynadığı gösterildi. Hipoksi durumunda, NADPH Oksidaz'dan türeyen reaktif oksijen türleri (ROS), kanser hücrelerinde MEK/ERK veya PI3K/Akt/p706K ileti yollarının aktivasyonu aracılığı ile HIF1-alfa ve VEGF protein ekspresyonunda artışa yol açar. HIF 1-alfa ve VEGF ekspresyonundaki bu artış, tümör hücrelerinin hipoksik şartlarda anjiogenezisinin artmasına yol açar (52,53,133,147).

#### **2.4. HIPOXY-INDUCIBLE FACTOR 1-ALPHA**

HIF-1 proteini, alfa ve beta iki proteinden oluşan heterodimerik bir kompleksdir. HIF-1 alfa, normal oksijen konsantrasyonlu hücrelerde saptanmaz iken, hipoksik koşullar tarafından hızlıca aktive edilir. HIF-1 alfa, HIF-1'in oksijen duyarlı uyarılabilen alt ünitesini oluştururken, HIF-1 beta, HIF-1'i esaslı olarak eksprese eden alt ünitesini oluşturur (123,137). HIF-1, hipoksi tarafından oluşturulan en önemli faktörlerden biridir.

Hipoksik koşullarda, HIF-1 alfa, hücre sağkalımı ile ilgili bir çok genin transkripsiyonunu aktive eder (131).

HIF-1-alfa proteinin sentezi, mitogen-activated protein kinase (MAPK) ve phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ileti yollarının aktivasyonu gibi oksijen bağımsız yollar ile düzenlenir (51). Bu yollar, G-protein çift reseptörler veya trozin kinaz reseptörleri aracılığı ile oluşan sinyal iletileri tarafından aktive edilebilir.

HIF-1 alfa proteinin yıkılması, E3 ubiquitin-protein ligazlar yoluyla ubiquitilasyonda proteinleri hedef alan oksijen bağımlı prolil hidroksilasyon tarafından kontrol edilir. Bu ligazlar, hidroksile HIF-1 alfa'ya spesifik bağlanan von Hippel-Lindau (VHL) tümör süpressör proteini içerirler. Ubiquitilasyonlu HIF-1 alfa hızlıca proteozomlar tarafından yıkılır. Hipoksik ortamda, bu E3 ubiquitin-protein ligazlar yolu ile ubiquitilasyon gerçekleşmez ve von Hippel-Lindau aracılı ubiquitilasyon oluşmaz. Bu durumda hipoksik ortamda HIF-1 alfa ekspresyonu artarak, anjiogenezis yollarını uyarılır (34,102,112).

HIF-1 alfa aşırı ekspresyonu, insanlarda bir çok kanser tipinde saptanır. Bununla birlikte, beyin, meme, servikal, orofarinks, over ve endometrium kanserleri gibi belli kanser türlerinde HIF-1 alfa aşırı ekspresyonu ile hasta mortalitesi arasında önemli bağlantılar gösterilmiştir. Ayrıca bir çok güncel çalışmalar, HIF-1 alfa'nın kemoterapi ve radyoterapiye direnç gözlenmesinde de rol aldığını bildirdiler (2,9,150). Bu bulgular, HIF-1 alfa'nın kanser progresyonunda kritik role sahip olduğunu düşündürmektedir.

## **2.5. KARBONİK ANHİDRAZ IX**

Karbonik anhidraz enzimleri, karbondioksit'i karbonik aside reversb olarak dönüştüren çinko taşıyan metalloenzimlerdir. Bu enzimler, karbondioksit ve bikarbonat transferi, su ve elektrolit dengesinde, pH regülasyonunda rol alırlar (141).

Karbonik anhidraz IX, ekstrasellüler bölgede N-terminal proteoglikan domainli ve katalitik domainli bir transmembran glikoprotein için kodlanan ve HIF-1 alfa tarafından regüle edilen

tümör hipoksisi ile ilişkili genlerden birisidir (157). Karbonik anhidraz IX ekspresyonu, hipoksi ile bir HIF-1 alfa bağımlı yolak tarzında tümör hücre dizilerinde artar. Bu enzim doku pH'ını regüle eder (140,157). Bir çok çalışmada, CA IX, intrinsek hipoksik markır olarak gösterilmiştir. Karbonik anhidraz IX, hipoksik ortamlarda tümör mikroçevresinde asidifikasyon aracılığı ile tümör büyümesi ve invazyonuna katkıda bulunur (30). CA IX, hücre membranının her iki yönünde pH farklılığının devamlılığını sağlar. Bir çalışmada, CA IX'un hipoksik şartlarda, tümör hücrelerinin pH'ını asidifiye ederek, meme tümör hücrelerinin sağkalımındaki down regülasyonu azalttığı gösterilmiştir (116). Loncaster ve ark.'rı, servikal kanser hücrelerinde, Eppendorf mikroeletrod yöntemi ile tümör hipoksisini ölçtüler ve hipoksik durum ile CA IX ekspresyonu arasındaki direkt ilişkinin varlığını gösterdiler. Bu nedenle, CA IX, tümör dokularının immünhistokimyasal incelemesinde hipoksiyi saptamada bir markırdır (98).

Meme kanserli hastalarda yapılan üç çalışmada, CA IX ekspresyonu, tümör büyüklüğü, nod durumu, tümör greydi, östrojen reseptörü ve HER-2/neu ekspresyonu gibi prognostik parametrelerden bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (11,29,136).

## **MATERYAL-METOD**

### **3.1. Hasta grubu seçimi**

Haziran 1996 ile Şubat 2008 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda takip edilen toplam 111 kadın meme kanseri hastası çalışmaya alındı. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri Haziran 2008 tarihine kadar gözden geçirilerek değerlendirildi. İnvaziv meme kanseri tanısı almış, immünohistokimyasal yöntemle östrojen, progesteron reseptörleri değerlendirilen ve immünohistokimyasal yöntemle veya FISH yöntemi ile Her-2/neu ekspresyonu değerlendirilmiş olan hastalar çalışmaya alındı.

Çalışmada, 56 hastadan oluşan östrojen ve progesteron reseptörü pozitif Her-2/neu negatif ile 55 hastadan oluşan östrojen ve progesteron reseptörü negatif Her-2/neu pozitif iki ayrı grup oluşturuldu. Her iki grupta, HIF 1 alfa ve CA IX ekspresyonlarına bakılarak, sonuçlar karşılaştırıldı. Ayrıca, gruplardaki HIF 1 alfa ve CA IX ekspresyonlarının, evre, grade, lenf nodu metastazı, tümör büyüklüğü, menapoz durumu ile ilişkisini araştırdık.

Çalışma ile ilgili olarak Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

### **3.2. İmmünohistokimyasal inceleme metodu**

İmmünohistokimyasal Yöntem:

4 mikron kalınlığındaki kesitler 56 °C'lik etüvde deparafinize edildi. Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dk süre ile bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra 10mMol pH 8 EDTA çözeltisi ile antijen retrieval işlemi; mikrodalga fırında 15 dakika süre ile uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama streptavidin-biyotin peroksidaz metodu kullanılarak yapıldı. Kesitler Mouse monoklonal HIF-1alfa antikoru (klon ESEE122, 1:50 dilüsyon; Santa Cruz, CA, USA) ve rabbit monoklonal Karbonik Anhidraz IX antikoru (klon H-120, 1:100 dilüsyon, Santa Cruz, CA, USA) ile oda sıcaklığında 2 saat

süre ile bekletildi. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla 3,3' diaminobenzidine (DAB) (LabVision, NeoMarkers, CA, USA) ile 10 dakika süre ile inkübe edildi. Kesitler Mayers hematoxilen ile zemin boyaması yapılarak kapatıldı. Ayrıca primer antikoru uygulanmadığı negatif kontrol boyama yapıldı. Pozitif doku kontrolü olarak HIF-1alfa antikoru için akciğer karsinomu ve Karbonik Anhidraz IX antikoru için normal ince barsak mukozası kesitleri kullanıldı.

İmmünohistokimyasal olarak HIF-1alfa ve Karbonik Anhidraz IX ekspresyonu meme kanseri hücrelerinde yarı-kantitatif yöntemle değerlendirildi. HIF-1alfa ekspresyonu nükleer pozitif boyanan hücrelerin oranlarına göre değerlendirildi. Karbonik Anhidraz IX ekspresyonu için tümör hücrelerinin çevresindeki membranöz boyanan hücrelerin oranlarına göre değerlendirildi. HIF 1 alfa ekspresyonu, %2 ve üzeri değerler (nükleer boyanma oranı) pozitif, %2'nin altı değerler negatif olarak kabul edildi. CA IX ekspresyonu için, herhangi bir membranöz boyanma pozitif, hiç boyanma olmaması negatif olarak kabul edildi (89).

### **3.3. İstatistiksel yöntemler**

İstatistiksel işlemlerde SPSS for Windows 11,0 paket programı kullanıldı. Çalışmadaki değişkenler One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılım açısından değerlendirildi. Normal dağılıma uygun veriler, aritmetik ortalama ve standart sapmaları ile, normal dağılıma uygun olmayan veriler ortanca (minimum-maksimum) değerleri ile verildi. Gruplarda, HIF 1-alfa, CA IX ekspresyonları ve diğer klinikopatolojik parametreleri (aksiller nodal durum, greyd, tümör büyüklüğü, menapoz, evre) değerlendirmede  $\chi^2$  testi veya Fisher's Exact testi kullanıldı. Ayrıca gruplardaki hastalısız sağkalım ve toplam sağkalım analizleri için Kaplan-Meier Analizi ve log-rank test kullanıldı.  $P<0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya, invaziv meme kanseri tanısı alan 111 kadın hasta alındı. Endokrin duyarlı Her-2/neu negatif (Grup 1) grupta 56 hasta, endokrin duyarsız Her-2 pozitif (Grup 2) grupta 55 hasta vardı. Grup 1'deki hastaların ortalama yaşı 52 (aralık:34-77), grup 2'deki hastaların ortalama yaşı 47 (aralık: 27-83) idi. Grup 1'deki hastaların 23'ü (% 41.1) premenapozal, 33'ü (%58.9) postmenapozal idi. Grup 2'deki hastaların 33'ü (%60) premenapozal, 22'si (%40) postmenapozal idi. Her iki grubun klinik ve patolojik özellikleri tablo 4'de gösterildi.

Her iki gruptaki hastaların son değerlendirmesinde grup 1 ve grup 2'de 7'şer hastanın öldüğü tespit edildi.

Grup 1'deki 56 hastanın tamamını invaziv ductal karsinoma oluştururken, grup 2'deki 55 hastanın 53'ünü (% 96.4) invaziv ductal karsinoma, 2'sini (% 3.6) invaziv lobüler karsinoma oluşturuyordu. İki grup arasında tümör patoloji tipleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel fark yoktu ( $p=0.150$ ). Grup 1'de greyd 1, bir hasta (% 1.8), greyd 2, 43 hasta (% 76.8), greyd 3, 12 hasta (% 21.4) bulunurken, grup 2'de greyd 1 hasta yoktu, greyd 2, 24 hasta (% 43.6) ve greyd 3, 31 hasta (% 56.4) bulunuyordu. İki gruptaki tümör greydleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0.001$ ). İki grup tümör büyüklüğü ve lenf nodu durumu açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p=0.383$ ,  $p=0.703$ ).

Tablo 4. Grup 1 ve 2'deki hastaların klinik ve patolojik özellikleri.

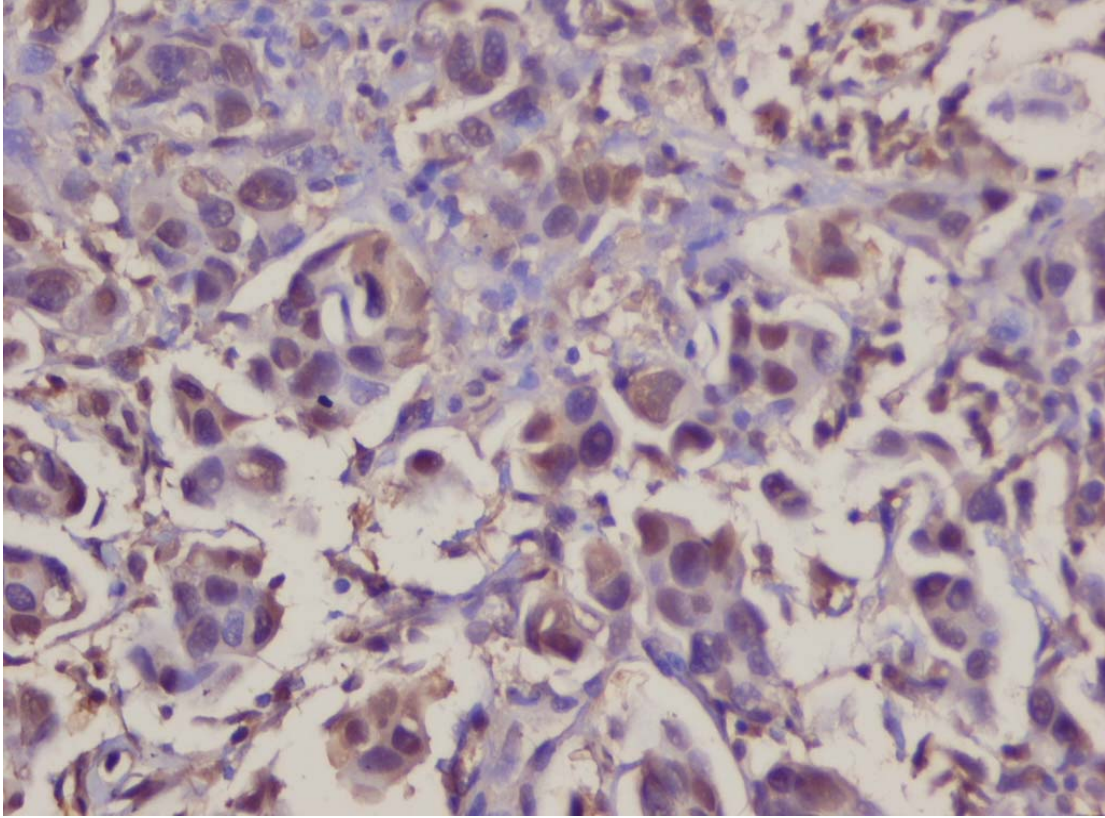
	Grup 1 (Endokrin duyarlı c erbB2 negatif)	Grup 2 (Endokrin duyarsız c erb B2 pozitif)	P değeri
	n %	n %	
Ortanca yaş (aralık), yıl	52 (34-77)	47 (27-83)	0.449
Menapoz durumu			
Premenapozal	23 41.1	33 60	0.035
Postmenapozal	33 58.9	22 40	0.150
Patoloji			
İnvaziv ductal	56 100	53 96.4	0.001
İnvaziv lobuler	0	2 3.6	
Tümör greydi	1		
Greyd 1	1.8	0	0.383
Greyd 2	43	24	
Greyd 3	76.8	43.6	
Tümör büyüklüğü	12 21.4	31 56.4	
T1			0.703
T2	12	8	
T3	21.4	14.5	
T4	35	39	
Lenf nodu durumu	62.5 5	70.9 8	
N0	8.9	14.5	< 0.0001
N1	4	0	
N2	7.1		
N3		21	0.013
HIF 1-alfa ekspresyonu	23 41.1	38.2 18	
Pozitif	22 39.3	32.7 10	
Negatif	7 12.5	18.2 6	
CAIX ekspresyonu	4 7.1	10.9	

Pozitif		46
	26	83.6
Negatif	46.4	9
	30	16.4
	53.6	
		37
	25	67.3
	44.6	18
	31	32.7
	55.4	

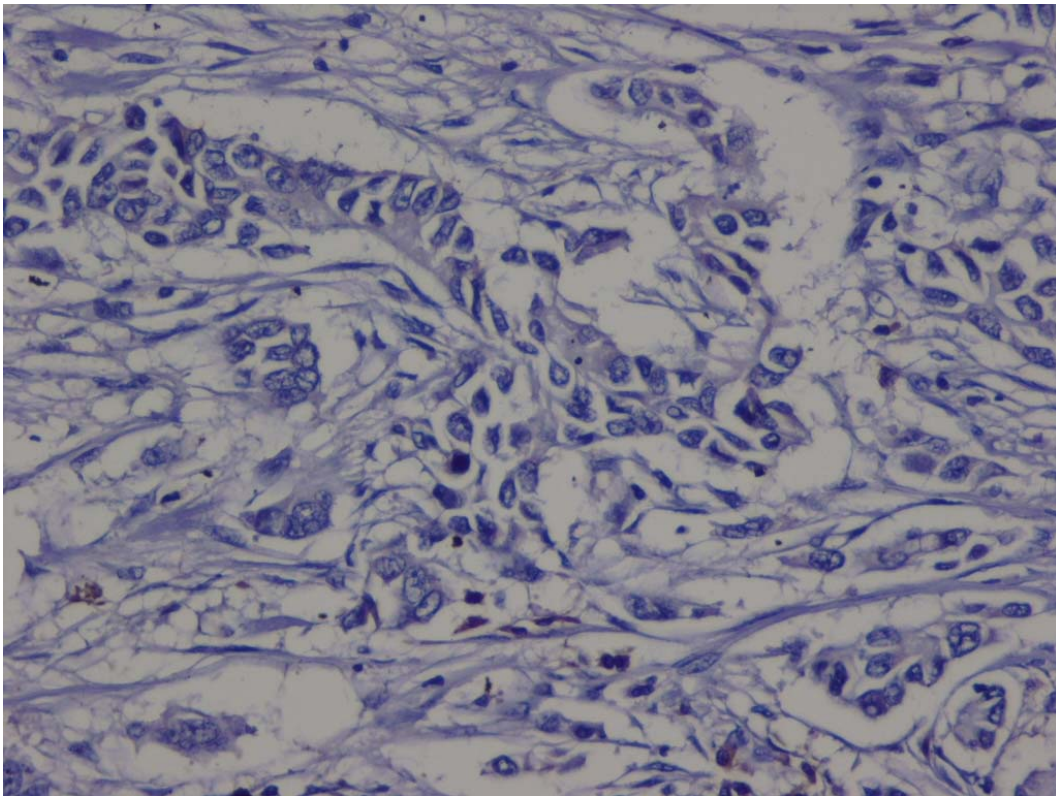
### HIF 1-alfa ekspresyon sonuçları

Grup 1 ve 2'deki tüm hastaların hazır parafin blokları, HIF 1-alfa ve CAIX antikör kitleri ile boyandı. Her iki grupta boyanan parafin bloklar, deneyimli Tıbbi Patoloji Uzmanı tarafından HIF 1-alfa ve CAIX ekspresyonu açısından değerlendirildi.

Östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, Her-2/neu negatif (grup 1) grupta 56 hastanın 26 (% 46.4)'sında HIF 1-alfa ekspresyonu nükleer pozitif bulunurken, 30'unda (% 53.6) HIF 1-alfa ekspresyonu gözlenmedi. Östrojen ve progesteron reseptörü negatif, Her-2/neu pozitif (grup 2) grupta 55 hastanın 46 (% 83.6)'sında HIF 1-alfa ekspresyonu nükleer pozitif bulunurken, 9'unda (%16.4) nükleer boyanma negatif idi. Grup 2'de HIF-1 alfa ekspresyon pozitifliği grup 1'den daha fazla idi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0001$ ).



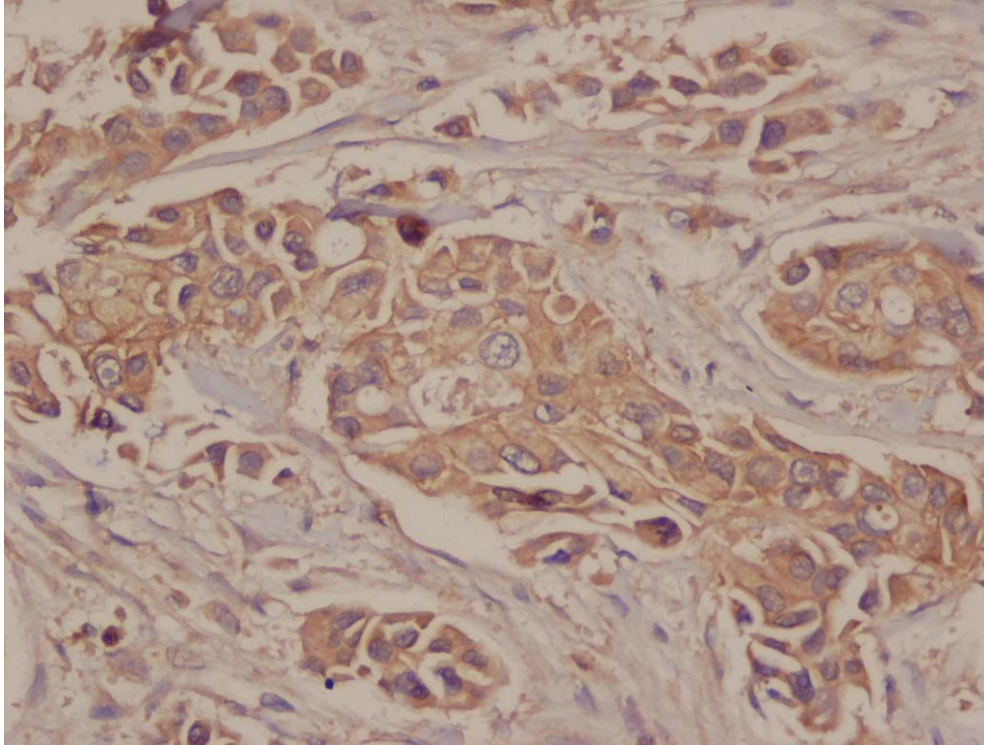
Şekil 1. İmmünohistokimyasal olarak nükleer HIF-1alfa pozitifliği gösteren meme kanseri hücreleri (HIF-1alfa, x400)



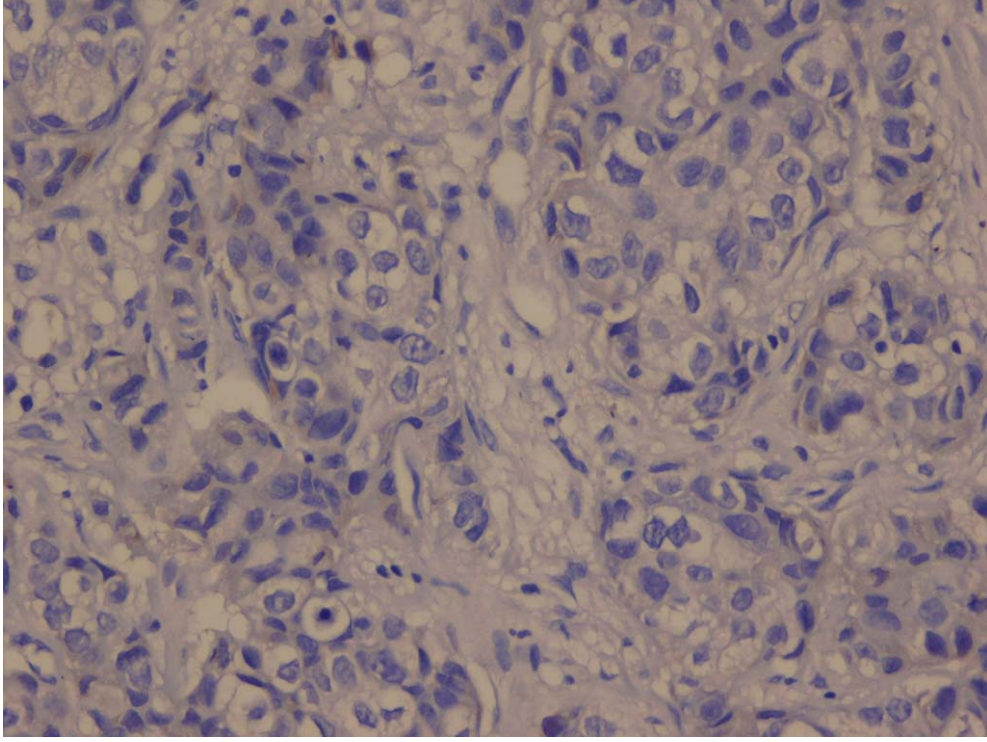
Şekil 2. İmmünohistokimyasal olarak HIF-1alfa negatif meme kanseri hücreleri (HIF-1alfa, x400)

### CA IX ekspresyon sonuçları

Östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, Her-2/neu negatif (grup 1) grupta 56 hastanın 25 (% 46.4)'inde CA IX ekspresyonu membranöz pozitif bulunurken, 31'inde (% 55.4) CA IX ekspresyonu gözlenmedi. Östrojen ve progesteron reseptörü negatif, Her-2/neu pozitif (grup 2) grupta 55 hastanın 37 (% 67.3)'sında CA IX ekspresyonu membranöz pozitif bulunurken, 18'inde (%32.7) membranöz boyanma negatif idi. Grup 2'de CA IX ekspresyon membranöz pozitifliği grup 1'den daha fazla idi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.013$ ).



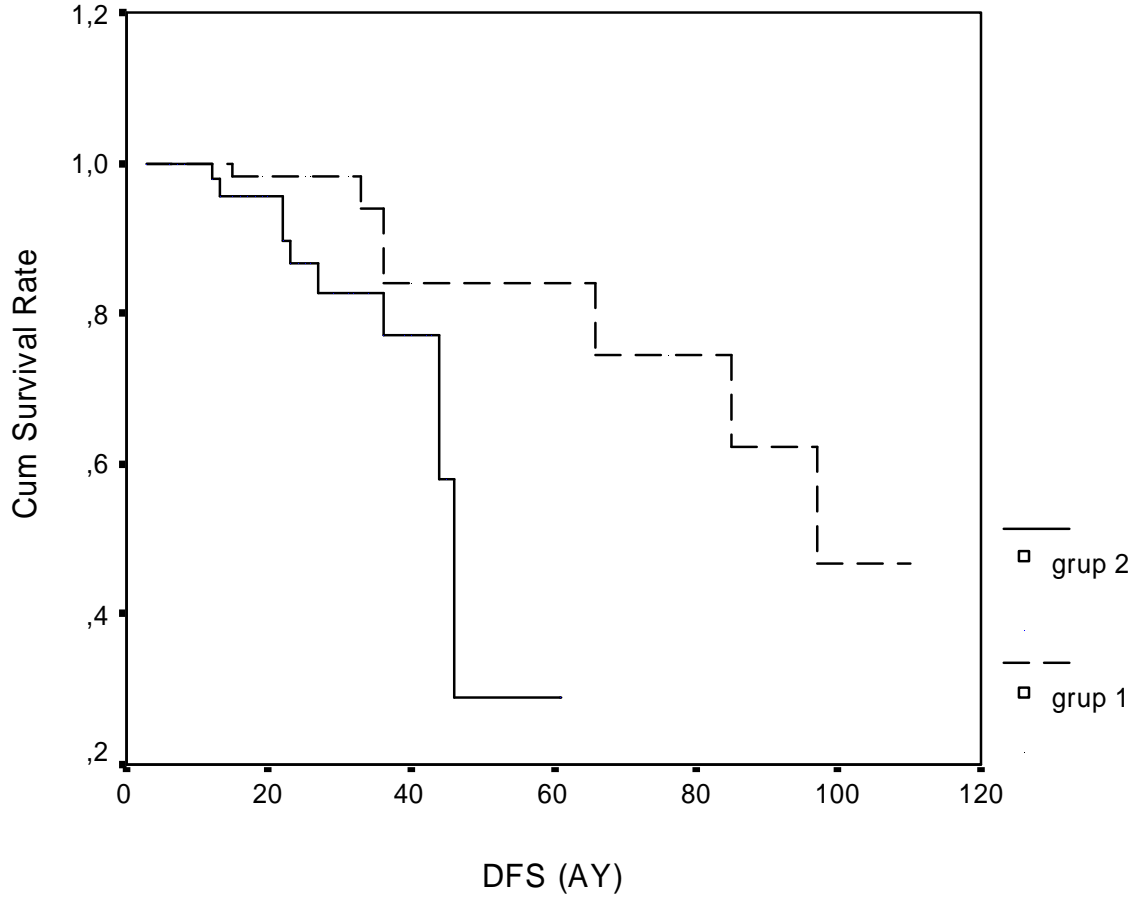
Şekil 3. İmmünohistokimyasal olarak membranöz CA IX pozitif boyanan meme kanseri hücreleri (CA IX, x400)



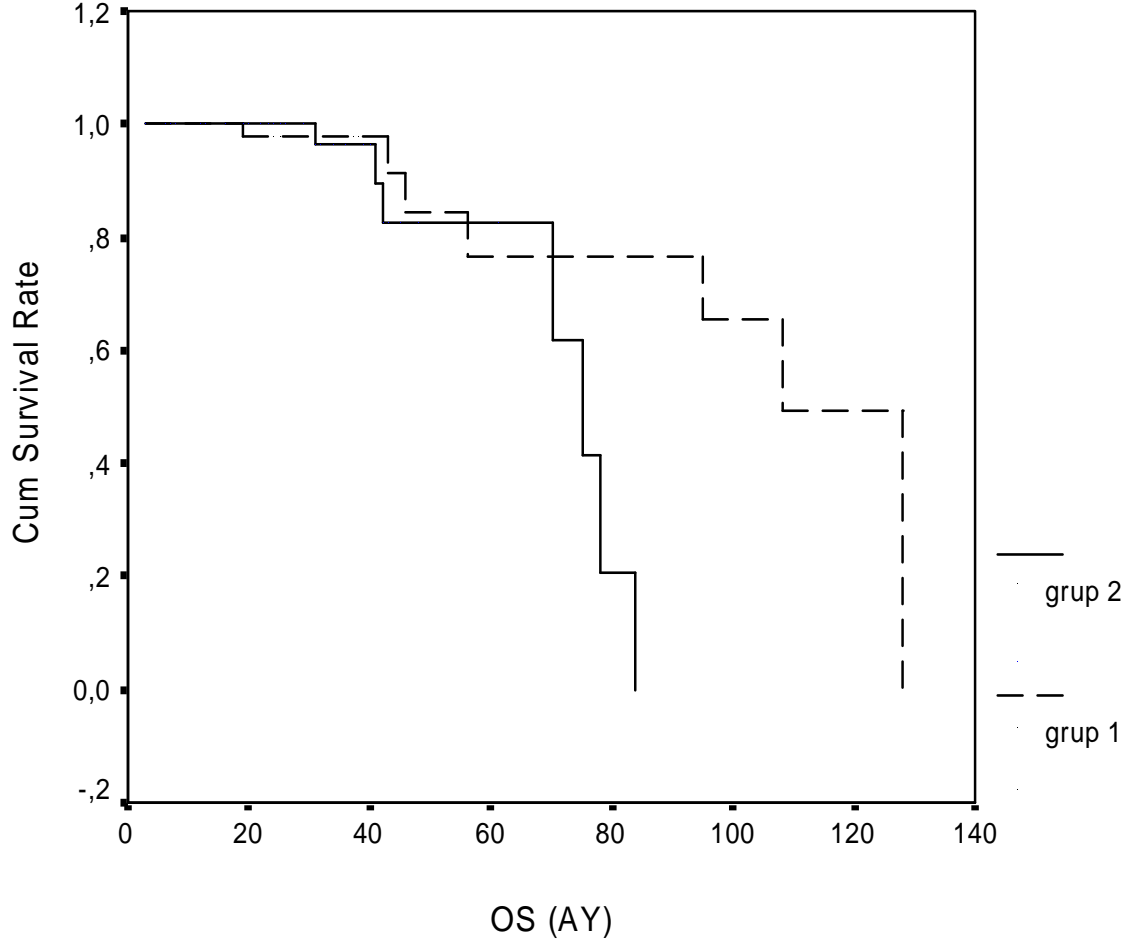
Şekil 4. İmmünohistokimyasal olarak CA IX negatif meme kanseri hücreleri (CA IX, x400)

*Hastaliksız sağ kalım ve toplam sağ kalım sonuçları*

Grup 1’de median hastaliksız sağ kalıma ulaşılamadı. Ortalama sağ kalım süresi, 88.35 ±6.73 ay idi. Grup 2’ de median hastaliksız sağ kalım, 46 ay (%95 CI: 42.98-49.02) idi. Endokrin duyarsız Her-2/neu pozitif (grup 2) grupta median hastaliksız sağkalım süresi daha kısa olarak bulundu. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi (log-rank p= 0.0308) (grafik 1).



Grafik 1. Grup 1’de median hastaliksız sağkalıma ulaşılamadı. Grup 2’de median hastaliksız sağkalım süresi, 46 ay (%95 CI: 42.98-49.02) ay idi. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (log-rank p= 0.0308).



Grafik 2. Grup 1’de median toplam sağkalım süresi, 108 ay (%95 CI: 90.65-125.35) iken grup 2’de toplam sağkalım süresi, 75 ay (%95 CI: 64.94-85.06) olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (log-rank  $p=0.0339$ ).

#### HIF 1-alfa ve CA IX ekspresyon sonuçlarına göre alt grup analizleri

Her iki grupta HIF 1- alfa ekspresyonu pozitif ve negatif alt gruplar, menapoz durumu, yaş, tümör patoloji tipi, tümör greydi, tümör büyüklüğü ve aksiler lenf nodu durumuna göre karşılaştırıldı. Grup 2’de HIF 1-alfa ekspresyonu pozitif hastaların 31’i (% 67.4) premenapozal, 15 (% 32.6)’i postmenapozal idi. HIF 1-alfa ekspresyonu negatif hastaların 2 (%22.2)’si premenapozal ve 7 (% 77.8)’si postmenapozal idi. Bu alt grup analizindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.016$ ). Her iki grupta, HIF 1-alfa

ekspresyonu pozitif ve negatif alt gruplar, yaş, tümör patoloji tipi, tümör greydi, tümör büyüklüğü ve aksiler lenf nodu durumuna göre karşılaştırıldığında alt gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunamadı ( $p=0.686$ ,  $p= 0.082$ ,  $0.303$ ,  $p= 0.335$ ,  $p= 0.917$ ,  $p=0.759$ ),  $p= 0.697$ ,  $p=0.291$ ).

Her iki grupda CA IX ekspresyonu pozitif ve negatif alt gruplar, menapoz durumu, yaş, tümör patoloji tipi, tümör greydi, tümör büyüklüğü ve aksiler lenf nodu durumuna göre karşılaştırıldı. Her iki grupta da CA IX ekspresyonu pozitif ve negatif alt gruplar, yaş, tümör patoloji tipi, tümör greydi, tümör büyüklüğü ve aksiler lenf nodu durumuna göre karşılaştırıldığında alt gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunamadı ( $p= 0.250$ ,  $p= 0.089$ ,  $p= 0.702$ ,  $p=0.420$ ,  $p=0.448$ ,  $p= 0.353$ ,  $p= 0.054$ ,  $p=0.291$ ,  $p= 0.640$ ,  $p=0.848$ ).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, Amerikan kadınları arasında her yıl 200.000'den fazla yeni teşhis edilen vakalar ile en sık gözlenen malign hastalıktır (92). Lenf nodu durumu ve tümör büyüklüğü meme kanseri rekürrensi ve toplam sağkalım açısından en önemli prognostik faktörlerdir (123,137). Diğer prognostik faktörleri, tümör greydi, lenfatik ve vasküler invazyon, Ki-67 proliferasyon markırı, teşhis anında hastanın yaşı, östrojen ve progesteron reseptör durumu, HER-2/neu durumu, uPA, PAI-1, genetik profil oluşturur (30).

Meme kanseri agresifliğini saptamaya yardımcı olan erken dönem markırları saptamada bir çok çalışma yapılmıştır. Tümör içindeki hipoksik alanların varlığı, kötü sağkalım ile ilişkili olarak bildirilmiştir (23). Tümör hücreleri tümör hipoksisine bağlı olarak, HIF-1 alfa, Karbonik anhidraz IX gibi birçok hipoksik markır eksprese ederler. Hipoksik markırları eksprese eden tümörler, bu markırları eksprese etmeyen tümör tiplerine göre çok daha agresif özellikler gösterirler. Diğer taraftan, agresif tümörlerin, hızlı tümör hücre büyümesi ve damarlanmadaki düzensiz artışın bir sonucu olarak hipoksik markırları eksprese ettiği de gösterilmiştir (8). Kronik hipoksik ortamda malign hücreler, oksijen azalmasına bağlı ölümden kaçmalarına izin veren genetik ve adaptif değişiklikler geçirebilirler. Bu değişiklikler, daha agresif malign tümör fenotipi oluşmasına, radyoterapi ve kemoterapiye direnç gelişmesine ve daha kötü prognoz ile sonuçlanmaya yol açar (67,73).

Eğer hipoksi, tümör hücrelerini kötü diferansiyasyon durumuna zorlar ise, bu durum hipoksik tümörlerde gözlenen çok agresif özelliklerin bir çoğunu kısmi olarak açıklayabilir. Helczynska ve ark.'rı tarafından duktal carsinoma in situ modelinde santral nekrotik alanın çevresindeki hipoksik alanda HIF-1 alfa ve sitokeratin 19 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Benzer bulgular, hipoksik ortamda meme kanseri hücre dizilerinde büyümenin olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (69,99).

Reseptör durumu ve Her-2/neu durumuna göre iki ayrı prognostik grup oluşturularak, bu gruplarda hipoksik tümör markırları olan HIF-1 alfa ve CA IX ekspresyonu değerlendirilen çalışma literatür taramamızda bulunamadı.

Çalışmamızda, östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, Her-2/neu negatif (grup 1) iyi prognostik faktörlere sahip grup ile östrojen ve progesteron reseptörü negatif, Her-2/neu pozitif (grup 2) kötü prognostik faktörlere sahip gruplar arasında, hipoksik tümör markırları olan HIF 1-alfa ve CA IX markır ekspresyonlarına baktık. Grup 2’de HIF-1 alfa ekspresyon pozitifliği grup 1’den daha fazla idi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0001$ ). Ayrıca, grup 2’de CA IX ekspresyon membranöz pozitifliği grup 1’den daha fazla idi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.013$ ). Çalışmamızda, iki önemli hipoksik markır olan HIF 1 alfa ve CA IX ekspresyonunun, reseptör negatif ve Her-2/neu pozitif özelliklere sahip meme kanseri tümör hücrelerinde daha fazla olduğu sonucuna vardık. Ayrıca, bu markırların daha fazla oranda eksprese edildiği reseptör negatif ve Her-2/neu pozitif (grup 2) grupta hastalısız sağ kalım ve toplam sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğunu gözlemledik.

Güncel bir çalışmada, 1 ile 3 aksiller lenf nodu metastazı olan premenapozal meme kanserli hastalarda CA IX ekspresyonunun, östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü negatif olan hastalarda, greyd 3 tümörlü hastalarda ve HIF 1-alfa ekspresyonu pozitif olan hastalarda istatistiksel olarak daha fazla olduğu bildirilirken, Her-2/neu pozitif hastalarda CA IX ekspresyonu anlamlı olarak bulunmamıştır. Aynı çalışmada, CA IX ekspresyonu pozitif hastalarda, relapsız sağkalım, toplam sağkalım ve meme kanserine spesifik sağkalım oranları daha düşük olarak bulunmuştur ( $p=0.032$ ,  $p= 0.022$ ,  $p= 0.005$ ) (22). Trastour ve ark.’rı, güncel bir çalışmada, HIF 1-alfa ve CA IX ekspresyonu ile nodal durum, tümör büyüklüğü ve hastaların yaşı arasında istatistiksel bir ilişki bulamaz iken tümör greydi yüksek olan hastalarda HIF 1-alfa ve CA IX ekspresyonunun daha fazla

olduğunu bildirdiler ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0004$ ) (44). Çalışmamızda, grup 1’ de greyd 1, bir hasta (% 1.8), greyd 2, 43 hasta (% 76.8), greyd 3, 12 hasta (% 21.4) bulunurken, grup 2’de greyd 1 hasta yoktu, greyd 2, 24 hasta (% 43.6) ve greyd 3, 31 hasta (% 56.4) bulunuyordu. HIF 1-alfa ve CA IX ekspresyonunun daha fazla olduğu grup 2’de greyd 3 tümör daha fazla idi. İki gruptaki tümör greydleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p = 0.001$ ). İki grup, tümör büyüklüğü ve lenf nodu durumu açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p = 0.383$ ,  $p = 0.703$ ). Ayrıca, HIF 1-alfa ve CA IX ekspresyonunun daha fazla olduğu grup 2’de premenapozal hasta oranının daha fazla olduğunu gözlemledik ( $p = 0.035$ ).

Generali ve ark.’rı, 183 meme kanseri hastayı içeren güncel bir çalışmada, CA IX ekspresyonu pozitif tümörlü hastalarda c erbB2, p53 ve Ki67 ekspresyonlarının fazla olduğunu ve CA IX ekspresyonunun tümör boyutu, lenf nodu durumu ile ilişkili olmadığını bildirdiler (54).

HIF 1-alfa, tümör hipoksisi ve anjiogenezis arasındaki ilişkide önemli rol oynayan bir markır olup, tümör hipoksisi ve anjiogenezis araştırmalarında sıkça kullanılan bir markır olmuştur.

Tümör hipoksisine cevapda, VEGF ve eritropoetini de içeren bir çok anjiogenezis ile ilişkili genler, alfa ve beta subünitlerden oluşan bir heterodimerik transkripsiyon faktör olan HIF-1 tarafından artırılır. HIF-1-alfa proteinin sentezi, mitogen-activated protein kinase (MAPK) ve fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) ileti yollarının aktivasyonu gibi oksijen bağımsız yollar ile düzenlenir (51,85). Hipoksi durumunda, NADPH Oksidaz’dan türeyen reaktif oksijen türleri (ROS), kanser hücrelerinde MEK/ERK veya PI3K/Akt/p706K ileti yollarının aktivasyonu aracılığı ile HIF1-alfa ve VEGF protein ekspresyonu artırılmasında rol oynar. HIF 1-alfa ve VEGF ekspresyonundaki bu artış, tümör hücrelerinin hipoksik şartlarda anjiogenezisinin artmasına yol açar (52,53,133,147).

van Diest ve ark.'rı 45 invaziv meme kanseri hastaların operasyon sonrası elde edilen taze meme tümörü örneklerinde HIF 1-alfa ekspresyonuna baktılar. Hastaların %25'inde HIF 1-alfa aşırı ekspresyonu bildirdiler. Aynı çalışmada, yüksek HIF 1-alfa ekspresyonu tümörlü dokularda, EGFR (p=0.011), PDGF-BB (p< 0.001) ve bFGF (p=0.045) aşırı ekspresyonu olduğunu bildirdiler (19).

Kronblad ve ark.'rı, 377 premenapozal meme kanserli hastada prognostik faktörlerin ve rekürrensiz sağkalımın HIF 1-alfa ekspresyonu ile olan ilişkisini araştırdılar. Hastaların %24 kadarında HIF 1-alfa nükleer boyanma tespit ettiler. HIF 1-alfa, tümör büyüklüğü (p=0.009), tümör greydi (p< 0.0001), Ki-67 proliferasyon markırı (p=0.005) ile pozitif olarak ilişkili idi. Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü negatif tümör dokularında anlamlı HIF 1-alfa aşırı ekspresyonu bildirildi (p<0.0001, p< 0.0001). Ayrıca, cerbB2 ekspresyonu pozitif hastalarda HIF 1-alfa ekspresyon oranı cerbB2 ekspresyonu olmayanlardan daha fazla olarak bildirildi (p=0.015). Aynı çalışmada, HIF 1-alfa aşırı ekspresyonu olan ve olmayan hastalar karşılaştırıldığında, HIF 1-alfa aşırı ekspresyonu olan hastalarda, daha kötü rekürrensiz sağkalım (p=0.048) ve meme kanseri spesifik sağkalım (p=0.028) bildirilirken, toplam sağkalım süresi (P=0.12) ile ilişki bildirilmedi (89). Bizim çalışmamızdaki hastalar pre-ve postmenapozal hastalardı. Bu çalışmanın sonuçları (toplam sağkalım süresi hariç), çalışmamızdaki östrojen ve progesteron reseptörü negatif, Her-2/neu pozitif (grup 2) grubun sonuçlarına benzer şekilde idi. Bu çalışmada HIF 1-alfa aşırı ekspresyonu ile toplam sağkalım süresi arasında ilişki bildirilmez iken, çalışmamızda HIF 1-alfa aşırı ekspresyon oranı daha fazla bulunan grup 2 hastalarda toplam sağkalım oranı daha düşük idi (log-rank p=0.0339).

Sonuç olarak, östrojen ve progesteron reseptörleri negatif, Her-2/neu pozitif meme kanseri tümör hücrelerinde, hipoksik tümör markırı olan HIF 1-alfa ve CA IX aşırı ekspresyonu

gözlenmektedir. HIF 1-alfa ve CA IX aşırı ekspresyonu bulunan hastalarda, hastalısız sağkalım ve toplam sağkalım süreleri daha kısa olmaktadır.

## ÖZET

Haziran 1996 ile Şubat 2008 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda takip edilen toplam 111 kadın meme kanseri hastası çalışmaya alındı. Bu çalışmada, östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, Her-2/neu negatif (grup 1) ve östrojen ve progesteron reseptörü negatif, Her-2/neu pozitif (grup 2) iki farklı prognostik grup oluşturuldu. Grup 1'de 56 hasta, grup 2'de 55 hasta vardı. Her iki grupta, tümör hipoksi markırları olarak kabul edilen HIF 1 alfa ve CA IX ekspresyonlarına bakıldı. Literatür bilgisi göz önüne alınarak HIF 1 alfa ekspresyonu, %2 ve üzeri değerler (nükleer boyanma oranı) pozitif, %2'nin altı değerler negatif olarak kabul edildi. CA IX ekspresyonu için, herhangi bir membranöz boyanma pozitif, hiç boyanma olmaması negatif olarak kabul edildi (166).Ayrıca, gruplardaki HIF 1 alfa ve CA IX ekspresyonlarının, evre, grade, lenf nodu metastazı, tümör büyüklüğü, menapoz durumu ile ilişkisini araştırdık.

Grup 1'deki hastaların ortanca yaşı 52 (aralık:34-77), grup 2'deki hastaların ortanca yaşı 47 (aralık: 27-83) idi. Grup 1'deki hastaların 23'ü (% 41.1) premenapozal, 33'ü (%58.9) postmenapozal idi. Grup 2'deki hastaların 33'ü (%60) premenapozal, 22'si (%40) postmenapozal idi. Grup 1'de 56 hastanın 26 (% 46.4)'sında HIF 1-alfa ekspresyonu nükleer pozitif bulunurken, 30'unda (% 53.6) HIF 1-alfa ekspresyonu gözlenmedi. Grup 2'de 55 hastanın 46 (% 83.6)'sında HIF 1-alfa ekspresyonu nükleer pozitif bulunurken, 9'unda (%16.4) nükleer boyanma negatif idi. Grup 2'de HIF-1 alfa ekspresyon pozitifliği grup 1'den daha fazla idi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0001$ ).

Grup 1'de 56 hastanın 25 (% 46.4)'inde CA IX ekspresyonu membranöz pozitif bulunurken, 31'inde (% 55.4) CA IX ekspresyonu gözlenmedi. Grup 2'de 55 hastanın 37 (% 67.3)'sinde CA IX ekspresyonu membranöz pozitif bulunurken, 18'inde (%32.7)

membranöz boyanma negatif idi. Grup 2'de CA IX ekspresyon membranöz pozitifliği grup 1'den daha fazla idi. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.013$ ).

Grup 1'de greyd 1, bir hasta (% 1.8), greyd 2, 43 hasta (% 76.8), greyd 3, 12 hasta (% 21.4) bulunurken, grup 2'de greyd 1 hasta yoktu, greyd 2, 24 hasta (% 43.6) ve greyd 3, 31 hasta (% 56.4) bulunuyordu. İki gruptaki tümör greydleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0.001$ ). İki grup tümör büyüklüğü ve lenf nodu durumu açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p=0.383$ ,  $p=0.703$ ).

Grup 1'de median hastalısız sağ kalıma ulaşamadı. Ortalama sağ kalım süresi,  $88.35 \pm 6.73$  ay idi. Grup 2'de median hastalısız sağ kalım, 46 ay (%95 CI: 42.98-49.02) idi.

Grup 2'de median hastalısız sağ kalım süresi daha kısa olarak bulundu. İki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi (log-rank  $p= 0.0308$ ). Grup 1'de median toplam sağkalım süresi, 108 ay (%95 CI: 90.65-125.35) iken grup 2'de toplam sağkalım süresi, 75 ay (%95 CI: 64.94-85.06) olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (log-rank  $p=0.0339$ ).

Sonuç olarak, HIF-1 alfa ve CA IX ekspresyonu, östrojen ve progesteron reseptörü negatif, Her-2/neu pozitif kötü prognostik faktörlü grupta daha fazla gözlenmekte olup, daha kısa hastalısız sağkalım ve toplam sağkalım süreleri ile ilişkili olarak bulunmuştur.

## **ABSTRACT**

111 women patients with breast cancer followed up by Medical Oncology Department of Gazi University Medical School in a period between June 1996 and February 2008 are included in the study. Two groups are set with 56 estrogen progesterone receptor positive, Her-2/neu negative patients and 55 estrogen progesterone receptor negative, Her-2/neu positive patients. HIF 1 alpha and CA IX expressions are investigated in both groups and compared with each other. Values of HIF-1 alpha expression above 2% are considered as positive and fewer than 2% (nuclear staining ratio) are considered as negative. For CA IX expression any membranous staining is accepted as positive and if there was no staining the samples were accepted as negative. Additionally, relation of HIF 1 alpha and CA IX expressions with stage, grade, lymph node metastasis, tumor dimensions and menopause is also examined.

Median age of patients in group 1 was 52 (range 34-77), and median age of patients in group 2 was 47 (range: 27-83). 23 (41, 1 %) of patients in group 1 were premenopausal and 33 of them (60 %) were postmenopausal. 33 (60%) of patients in group 2 were premenopausal and 22 of them (40 %) were postmenopausal. In 26 (% 46.4) of 56 estrogen and progesterone receptor positive/ Her-2/neu negative (group 1) patients HIF-1alpha expression was detected as nuclear positive and in remaining 30 patients (% 53.6) any HIF-1 alpha expression was not detected. 46 (% 83.6) of 55 estrogen and progesterone receptor negative/ Her-2/neu positive patients (Group 2) HIF-1 alpha expression was nuclear positive and in 9 patients (%16.4) nuclear staining was negative. Group 2 produced more positive results for HIF-1 alpha expression when compared to Group 1. The difference between two groups was statistically significant ( $p < 0.0001$ ).

In 25 (% 46.4) of 56 estrogen and progesterone receptor positive/ Her-2/neu negative (group 1) patients CA IX expression was detected as membranous positive and in remaining 31 patients (% 55,4) any CA IX expression was not detected. 37 (% 67.3) of 55 estrogen and progesterone receptor negative/ Her-2/neu positive patients (Group 2) CA IX expression was membranous positive and in 18 patients (%32.7) membranous staining was negative. Group 2 produced more positive results for CA IX expression when compared to Group 1. The difference between two groups was statistically significant ( $p < 0.013$ ).

In group 1, there were one grade 1 patient (1,8 %), 43 grade 2 patients (76,8 %) and 12 grade 3 patients (21,4 %). In group 2 there were no grade 1 patient, 24 grade 2 patients (43,6 %) and 31 Grade 3 patients (56,4 %). Difference in tumor grades between groups was statistically significant ( $p=0.001$ ). When two groups were compared for tumor size and lymph node status no statistically significant difference was detected ( $p=0.383$ ,  $p=0.703$ ).

Median disease free survival in group 1 was not reached. Mean survival time was 88.35  $\pm$ 6.73 months. For group 2\ median disease free survival was 46 months (%95 CI: 42.98-49.02). Median disease free survival duration found to be shorter in endocrine insensitive Her-2/neu positive (Group 2) patients. Difference between two groups was significant. (log-rank  $p= 0.0308$ ). In group 1, median overall survival was 108 months ( 95% CI: 90.65-125.35). In group 2, median overall survival was 75 months (95 % CI: 64.94-85.06). Difference between two groups was statistically significant. (log-rank  $p= 0.0339$ )

In conclusion, hypoxic tumor indicators HIF-1 alpha and CA IX expressions are observed more in ER and PR negative, Her-2/neu (c-erbB2) positive breast cancer. For the patients with HIF-1 alpha and CA IX over expression, disease free survival and total survival durations are shorter.

## KAYNAKLAR

1. Aapro MS. In: Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th international conference, St. Gallen, February 2001. *Oncologist* 2001;6(4):376–385.
2. Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911–2916.
3. AJCC cancer staging handbook. In: Grene F, Page D, Fleming I, Fritz A, Balch C, editors. Part VII-Breast. 6th ed. Chicago (IL): Springer-Verlag;2002,pp:257-81.
4. AJCC, Cancer Staging Manual, 6th edn. Springer-Verlag, Berlin pp 257-281, 2002.
5. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Mongr* 1994;16:35–42.
6. Amadori D, Silvestrini R. Prognostic and predictive value of thymidine labelling index in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:267–281.
7. Anderson DE, Badzioch MD. Familial breast cancer risks. Effects of prostate and other cancers. *Cancer* 1993;72:114-9.
8. Axelson, H., Fredlund, E., Ovenberger, M., Landberg, G. And Pahlman, S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin. Cell. Dev. Biol* 2005; 16: 554–563.
9. Bachtiry B, Schindl M, Pötter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, Horvat R, Birner P. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2234–2240.

10. Balslev I, Christensen IJ, Rasmussen BB, Larsen JK, Lykkesfeldt AE, Thorpe SM, Rose C, Briand P, Mouridsen HT. Flow cytometric DNA ploidy defines patients with poor prognosis in node negative breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 56: 16–25.
11. Bartosova M, Parkkila S, Pohlodek K, Karttunen TJ, Galbavy S, Mucha V, Harris AL, Pastorek J & Pastorekova S. Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2. *Journal of Pathology* 2002;197:314–321.
12. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti185 HER-2 monoclonal antibody in patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:737-44.
13. Beenken SW, Urist MM, Zhang Y, Desmond R, Krontiras H, Medina H, Bland KI. Axillary lymph node status, but not tumor size, predicts locoregional recurrence and overall survival after mastectomy for breast cancer. *Ann Surg* 2003;237(5):732-8.
14. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod. Pathol* 2003;16(2):173–182.
15. Blackwood MA, Weber BL. BRCA1 and BRCA2 . From molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol* 1998;16: 1969-77.
16. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11:359–377.
17. Bonadonna G, Valagussa P. Dose-response effect of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *N Engl J Med*. 1981 Jan 1;304(1):10-5.

18. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL. HER-2/*neu* amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:4322–4327.
19. Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology* 2005;46:31-6.
20. Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53297 women with breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1996;347:1713-1727.
21. Breast cancer and hormone replacement therapy: Colloborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet* 1997;350:1047-1059.
22. Brennan DJ, Jirstrom K, Kronblad A, Millikan RC, Landberg G, Duffy MJ, Rydén L, Gallagher WM, O'Brien SL. CA IX is an independent prognostic marker in premenopausal breast cancer patients with one to three positive lymph nodes and a putative marker of radiation resistance. *Clin Cancer Res* 2006 12:6421-31.
23. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:437-47.
24. Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:585–592.
25. Bryant J, Fisher B, Gündüz N, Costantino JP, Emir B. S-phase fraction combined with patient and tumor characteristics for the prognosis of node-negative estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51: 239–253.

26. Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1479-83.
27. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-7.
28. Carstens PH, Greenberg RA, Francis D, Lyon H. Tubular carcinoma of the breast. A long term follow-up. *Histopathol* 1985;99:271–280.
29. Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Gatter KC, Ratcliffe P & Harris AL. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19:3660–3668.
30. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Review. *The Oncologist* 2004;9:606-616.
31. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/*neu* amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:944–948.
32. Clayton F. Pure mucinous carcinomas of the breast: morphologic features and prognostic correlates. *Hum Pathol* 1986;17:34–38.
33. Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* 2001;53(1):25–71.
34. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275:25733–25741.
35. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Gusterson B, Neville AM. Role of immunohistochemical detection of lymph-node

- metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1999;354:896–900.
36. Couch FJ, Farid LM, DeShano ML, Tavtigian SV, Calzone K, Campeau L, Peng Y, Bogden B, Chen Q, Neuhausen S, Shattuck-Eidens D, Godwin AK, Daly M, Radford DM, Sedlacek S, Rommens J, Simard J, Garber J, Merajver S, Weber BL. BCRA2 germ-line mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 1996;13:123-5.
37. Daly MB, Clark GM, McGuire WL. Breast cancer prognosis in a mixed Caucasian-Hispanic population. *J Natl Cancer Inst* 1985;74:753–757.
38. Dupont WD, Page DL.: Risk factors for breast cancer cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312:146-151.
39. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, Schuyler PA, Plummer WD. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 1993;71:1258-1265.
40. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ Jr, Deshler A, Fulton S, Hendricks CB, Kemeny M, Kornblith AB, Louis TA, Markman M, Mayer R, Roter D National institutes of health consensus development conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1–3, 2000. *J Natl Cancer Inst*, 2001;93 (13): 979–989.
41. Elledge RM, Clark GM, Chamness GC, Osborne CK. Tumor biologic factors and breast cancer prognosis among white, Hispanic and black women in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:705–712.
42. Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. In: ElstonCW, Ellis IO, eds. *The breast*, Edinburg:Churchill Livingstone, 1998:365.

43. Firat D, Çelik İ: Cancer Statistics in Turkey and in the World 1993-1995. Turkish Association For the Cancer Research and Control, Ankara 1998.
44. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983;52:1551–1557.
45. Fisher B, Dignam J, Bryant J, Wolmark N. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(9): 684–690.
46. Fisher B, Gebhardt MC. The evolution of breast cancer surgery: past, present and future. *Semin Oncol* 1978;5:385-394.
47. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988;6:1076–1087.
48. Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No.4). VI. Discriminants for five-year treatment failure. *Cancer* 1980;46:908-18.
49. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, Solin LJ, Fox K, Jardines L, Orel S, Glick JH. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:23–33.
50. Freedman LS, Clifford C, Messina M: Analyses of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: A review. *Cancer Res* 1990;50:5710-5719.

51. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:38205–38211.
52. Gao N, M. Ding, J.Z. Zheng, Z. Zhang, S.S. Leonard, K.J. Liu, X. Shi, B.H. Jiang, Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species, *J. Biol. Chem* 2002; 277:31963–31971.
53. Gao N, L. Shen, Z. Zhang, S.S. Leonard, H. He, X.G. Zhang, X. Shi, B.H. Jiang, Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells, *Mol. Cell. Biochem* 2004;255:33–45.
54. Generali D, Fox SB, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Wigfield SM, Bruzzi P, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX expression in prediction of the efficacy and outcome of primary epirubicin/tamoxifen therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:921-30.
55. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001;61:7992-8.
56. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. Seventh international conference on adjuvant therapy of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-27.

57. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16(10):1569-83.
58. Gorlach A, U. Berchner-Pfannschmidt, C. Wotzlaw, R.H. Cool, J. Fandrey, H. Acker, K. Jungermann, T. Kietzmann. Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1, *Thromb. Haemost* 2003;89:926–935.
59. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379:88-91.
60. Haerslev T, Jacobson GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Br Cancer Res Treat* 1996; 37: 101–113.
61. Hainsworth PJ, Tjandra JJ, Stillwell RG, Machet D, Henderson MA, Rennie GC, McKenzie IF, Bennett RC. Detection and significance of occult metastases in node-negative breast cancer. *Br J Surg* 1993;80:459–463.
62. Hakama M, Riihimaki H. End results of breast cancer patients in Finland 1953–1968. *Ann Clin Res* 1974;6:115–121.
63. Hansen NM, Grube BJ, Te W. Clinical significance of axillary micrometastases in breast cancer: how small is too small? *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:24a.
64. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: six-year median follow-up. *Br J Cancer* 1999;80:419–426.

65. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to uPA and PAI-1 ( $n = 3424$ ). *Br Cancer Res* 2002;62:4617–4622.
66. Harbeck N, Kates R, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors uPA and PAI-1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002;20:1000–1007.
67. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
68. Harvey EB, Schairer C, Brinton LA, Hoover RN, Fraumeni JF Jr: Alcohol consumption and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:657-661.
69. Helczynska, K., Kronblad, A., Jogi, A., Nilsson, E., Beckman, S., Landberg, G. and Pahlman, S. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003; 63: 1441–1444.
70. Hess KR, Pusztai L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:105-18.
71. Hibberd AD, Horwood LJ, Wells JE. Long term prognosis of women with breast cancer in New Zealand: study of survival to 30 years. *BMJ* 1983;286:1777–177
72. Histological typing of breast tumours. 2nd ad. Geneva, Switzerland:World Health Organization,1981.
73. Hockel M. Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266-76.
74. Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz T. Kufe DW, Bast RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III E (eds). Neoplasms of the breast. *Cancer Medicine*, Seventh edition. pp:1600.

75. Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz T. Neoplasms of the Breast. Kufe DW, Bast RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III e (eds). *Cancer Medicine*. 7th edition. Hamilton, Ontario 2006, pp:1585.
76. Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, Wilson GD. GLUT1 and CA IX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer* 2003;89: 1290–1297.
77. Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, Katsouyanni K, Lubin F, Marubini E, Modan B, Rohan T. Dietary factors and risk of breast cancer: Combined analyses of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:561-569.
78. Huang AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
79. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996;271:32253–32259.
80. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 1991;335:1565–1568.
81. Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Johnson BE, Stanbridge EJ, Lerman MI. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type Von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12596-601.
82. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905-19.

83. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 Study Group. Randomized adjuvant therapy trial in high-risk lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator inhibitor type I. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:913–920.
84. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004;54(1):8-29.
85. Jiang BH, J.Z. Zheng, S.W. Leung, R. Roe, G.L. Semenza, Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha Modulation of transcriptional activity by oxygen tension, *J. Biol. Chem* 1997; 272:19253–19260.
86. Jogi A, Ora I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H and Pahlman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2002; 99: 7021–7026.
87. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG, Halberg F, Somerfield MR, Davidson NE; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol* 2006;24(31):5091-7.
88. Kizaka-Kondoh, Inoue SM, Harada H and Hiraoka M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*. 2003;94:1021–1028.
89. Kronblad A, Jirström K, Rydén L, Nordenskjöld B, Landberg G. Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *Int J Cancer*. 2006 May 15;118(10):2609-1

90. Kvale G, Heuch I: Menstuel factors and breast cancer risk. *Cancer* 1988;62:1625-1631.
91. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storfer-Isser A, Smyth E, Steel CM, Haites N, Scott RJ, Goldgar D, Neuhausen S, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Scherneck S, Ponder BA, Ford D, Peto J, Stoppa-Lyonnet D, Bignon YJ, Struewing JP, Spurr NK, Bishop DT, Klijn JG, Devilee P, Cornelisse CJ, Lasset C, Lenoir G, Barkardottir RB, Egilsson V, Hamann U, Chang-Claude J, Sobol H, Weber B, Stratton MR, Easton DF. Multifactorial analyses of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1138-45.
92. Landis SH, Murray T, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;51:15-36.
93. Leon DA: A prospective study of the independent effects of parity and age at first birth on breast cancer incidence in England and Wales. *Int J Cancer* 1989;43:986-991.
94. 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.
95. Lee AK, Loda M, Mackarem G, Bosari S, DeLellis RA, Heatley GJ, Hughes K. Lymph node negative invasive breast carcinoma 1 centimeter or less in size (T1a,bN0M0): Clinicopathologic features and outcome. *Cancer* 79:761-771, 1997.
96. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, Norris BD, Shepherd LE, Abu-Zahra H, Findlay B, Warr D, Bowman D, Myles J, Arnold A, Vandenberg T, MacKenzie R, Robert J, Ottaway J, Burnell M, Williams CK, Tu D. Randomized trila of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with

- cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol* 1998;16:2651–2658.
97. Liao D, R.S. Johnson, Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer, *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 281–290.
98. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wyckoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ & West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Research* 2001;61:6394–6399.
99. Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell. Mol. Life Sci* 2007;64:3233-3247.
100. Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population. Analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *JAMA* 1998;279:922-9.
101. Mann GB, Port ER, Rizza C, Tan LK, Borgen PI, Van Zee KJ. Six-year follow-up of patients with microinvasive, T1a, and T1b breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 6:591-598, 1999.
102. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wyckoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399::271–275.

103. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG. Occult axillary node metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance. *Br J Cancer* 1996;73:88–95.
104. Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:138-144.
105. Mohamed I. Handbook of Cancer Chemotherapy, Skeel RT (ed). Carcinoma of the Breast. Philadelphia 2007. pp: 308.
106. Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, Vana J, Murphy GP. Breast cancer in the medial half; results of the 1978 national survey of the American College of Surgeons. *Cancer* 1983;51:1333–1338.
107. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1980;45(12):2917-24.
108. Neuhausen S, Gilewski T, Norton L, Tran T, McGuire P, Swensen J, Hampel H, Borgen P, Brown K, Skolnick M, Shattuck-Eidens D, Jhanwar S, Goldgar D, Offit K. Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer. *Nat Genet* 1996;13:126-8.
109. Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Säve-Söderbergh J, Davis BW, Reed R, Torhorst J, Golouh R, Peterson HF, Price KN. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;10:696–705.
110. Nilsson H, Jogi A, Beckman S, Haris AL, Poellinger L and Pahlman S. HIF-2alpha expression in human fetal paraganglia and neuroblastoma: relation to sympathetic differentiation, glucose deficiency, and hypoxia. *Exp. Cell. Res* 2005; 303:447–456.

111. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:888–894.
112. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2:423–427.
113. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
114. Pastorek J, Pastrekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavský R, Zatošovicová M, Liao S, Portetelle D, Stanbridge EJ. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 1994;9:2877-88.
115. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AH, Lees AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA Correlation between c-erb-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:566–567.
116. Potter CP & Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *British Journal of Cancer* 2003;89:2–7.
117. Preston DL, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD Jr: radiation effects on breast cancer risk: A pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res* 2002;158:220-235.

118. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki 67, p53, ER receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol* 1997; 36: 369–374.
119. Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP, Campbell WS, Taylor PR. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:722-727.
120. Reis LAG, Eisner MP, Kosary CL. SEER cancer statistics review, 1973-1999, Bethesda (MD): National Cancer Institute;2002.
121. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Miké V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with a ten year follow-up. *Cancer* 1977;40:1365–1385. Reis LAG, Eisner MP, Kosary CL. SEER cancer statistics review, 1973-1999, Bethesda (MD): National Cancer Institute;2002.
122. Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival and invasion. *Cancer Research* 2004;64:6160-6165.
123. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostics factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989;7:1239-51.
124. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993;11:2090–2100.
125. Rosen PP, Oberman HA. Tumors of the mammary gland. In: Atlas of tumor pathology, Series 3, Fascicle 7. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1993.

126. Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B, Fernö M, Parwaresch R, Alm P. Correlation between p53, c-erb B-2, and topoisomerase IIa expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node negative breast carcinomas: Prognostic implications. *J Pathol* 1999; 187: 207–216.
- Sainson, R. C. and Harris, A. L. (2006) Hypoxia-regulated differentiation: let\_s step it up a Notch. *Trends Mol. Med* 2006; 12:141–143.
127. Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989;5:102-110.
128. Sainson RC and Harris AL. Hypoxia-regulated differentiation: let\_s step it up a Notch. *Trends Mol Med* 2006;12:141-143.
129. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984;312:513–516.
130. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
131. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447–5454.
132. Seshadri R, Leong AS, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Int J Cancer* 1996; 69: 135–141.
133. Shi YH, Wang YX, Bingle L, Gong LH, Heng WJ, Li Y, Fang WG. In vitro study of HIF-1 activation and VEGF release by bFGF in the T47D breast cancer cell line under normoxic conditions: involvement of PI-3K/Akt and MEK1/ERK pathways, *J. Pathol* 2005; 205:530–536.

134. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(17):3628-36.
135. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–182.
136. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783–792.
137. Smart CR, Byrne C, Smith RA, Garfinkel L, Letton AH, Dodd GD, Beahrs OH. Twenty-year follow-up of the breast cancers diagnosed during the Breast Cancer Detection Demonstration Project. *CA Cancer J Clin* 1997; 47:134-49.
138. Span PN, Bussink J, Manders P, Beex LV & Sweep CG. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *British Journal of Cancer* 2003;89: 271–276.
139. Stal O, Dufmats M, Hatschek T, Carstensen J, Klintenberg C, Rutqvist LE, Skoog L, Sullivan S, Wingren S, Nordenskjöld B. S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1717–1722.
140. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Eng J Med* 1997;336:1401-8.

141. Supuran CT, Vullo D, Manole G, Casini A & Scozzafava A. Designing of novel carbonic anhydrase inhibitors and activators. *Current Medicinal Chemistry Cardiovascular & Hematological Agents* 2004;2: 51–70. Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989;5:102–110.
142. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, Zat'ovicova M, Gibadulinova A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia activates the capacity of tumour-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004;577: 439–445.
143. Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, Taub N, Harris AL, O'Byrne KJ. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumour hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:473-482.
144. Thor AD, Liu S, Moore DH 2nd, Edgerton SM. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:470–477.
145. Tokunaga M, Land CE, Tokuoka S, Nishimori I, Soda M, Akiba S: Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, 1950-1985. *Radiat Res* 1994;138:209-223.
146. Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, Berra E. HIF-1 alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: Prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer* 2007;120:1451-1458.
147. Trisciuglio D, A. Iervolino, G. Zupi, D. Del Bufalo, Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells, *Mol. Biol. Cell* 2005;16:4153–4162.

148. Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, Watson PH, Poulsom R, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Cranston D, Harris AL. The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1276–1282.
149. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2008, I:10.1016/J.CANLET.2008.02.044 (in press).
150. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003;22:3213–3220.
151. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-26.
152. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92: 5510–5514.
153. Weiss MC, Fowble BL, Solin LJ, Yeh IT, Schultz DJ. Outcome of conservative therapy for invasive breast cancer by histologic subtype. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:941.
154. Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer—a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:255–265.
155. Wingren S, Stål O, Sullivan S, Brisfors A, Nordenskjöld B. S-phase fraction after gating on epithelial cells predicts recurrence in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 59: 7–10.

156. Wood WC, Muss HB, Solin LJ. Malignant tumors of the breast. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 7th edition. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (ed). Philadelphia 2005, pp:1420-1421.
157. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;60:7075-83.
158. [www.nccn.org](http://www.nccn.org). Invasive Breast Cancer. Surveillance/Follow –Up. Practice Guidelines in Oncology-v.2.2008.

