

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Patoloji Anabilim Dalı

**HER2 POZİTİF MEME KARSİNOMU DOKULARINDA İMMUNHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE HER3, CD1A VE KI-67 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI,
SONUÇLARIN PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Burcu Güzelbey

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Rıdvan İlhan

İSTANBUL
2013

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Patoloji Anabilim Dalı

**HER2 POZİTİF MEME KARSİNOMU DOKULARINDA İMMUNHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE HER3, CD1A VE Kİ-67 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI,
SONUÇLARIN PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Burcu Güzelbey

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Rıdvan İlhan

İSTANBUL
2013

TEŞEKKÜRLER

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde desteklerinden ve deneyimlerinden yararlandığım anabilim dalı başkanları

Sn. Prof. Dr. Yersu Kapran, Sn. Prof. Dr..Bilge Bilgiç
ve Sn. Prof. Dr. Dilek Yılmazbayhan'a,

Tezimin ve eğitimimin her aşamasında desteğinden güç bulduğum, beni her zaman sabırla dinleyen değerli hocam

Sn. Prof. Dr. Ekrem Yavuz'a,

Tezimin ve eğitimimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım

Sn. Prof. Dr. H. Rıdvan İlhan'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini özveri ve sabırla aktaran, bana patolojiyi sevdiren tüm değerli hocalarıma,

İstatistiksel değerlendirme konusundaki yardımlarından dolayı Onkoloji Enstitüsü Cerrahi Birimi Öğretim Üyesi

Sn. Doç. Dr. Hasan Karanlık'a

Onkoloji Enstitüsü'ne ait hasta dosyalarına ulaşmamı sağlayan Onkoloji enstitüsü öğretim üyesi

Sn. Prof. Dr. Adnan Aydın'er'e,

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum, tezimin laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen biyolog arkadaşlarım Fatma Ay ve Mehmet Ali Doğan'a ve tüm laboratuvar ekibine,

Pek çok güzel anıyı paylaştığım, bana her zaman destek olan asistan arkadaşlarım ve uzmanlarıma,

Her zaman destekleriyle yanımda olan eşim ve aileme,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER**SAYFA NO**

Bölüm I:

I-ÖZET..... VIII

II-ABSTRACT..... XI

Bölüm II:

I-GİRİŞ..... 1

II-GENEL BİLGİLER..... 3

A. Meme karsinomu genel bilgiler 3

1. Epidemiyoloji ve insidans..... 3

2. Etiyoloji 4

3. Lokalizasyon 5

4. Klinik bulgular 5

5. Histolojik tipler..... 6

6. Prognostik faktörler 6

7. Meme karsinomu tedavisi 11

B. Meme karsinomlarında hedefe yönelik tedavi 12

1. Meme karsinomunda moleküler sınıflama 12

2. Tamoksifen kullanımı 13

3. EGFR ailesi 14

4. HER2 nedir? 15

5. HER2'nin prognostik değeri 15

6. HER2'nin prediktif değeri 16

7. HER2 sinyalizasyonu 18

8. HER2 testi 20

9. Trastuzumab etki ve direnci 21

10. Trastuzumab tedavisine rezistans gelişimi 22

11. HER3 ve malignite 23

12. HER3 ve tedavi direnci 25

13. HER3 ve prognoz 26

14. HER3'ü hedefleyen tedaviler 27

C. Meme kanserinde dendritik hücrelerin rolü 27

1. Dendritik hücrelerin kökeni 28

2. Dendritik hücrelerin matürasyonu 28

3. Tümöral hücrelerde dendritik hücre infiltrasyonu 29

4. Meme karsinomlarında dendritik hücrelerin rolü	30
Bölüm III:	
I- GEREÇ VE YÖNTEM	
A. Araştırma olgularının belirlenmesi	33
B. Hormon reseptörleri ve HER2 incelemesi	34
C. İmmünohistokimyasal yöntem.....	37
D. İmmünohistokimyasal boyaların değerlendirilmesi	39
E. İstatistiksel yöntem	40
Bölüm IV:	
BULGULAR.....	41
Bölüm V:	
TARTIŞMA.....	59
Bölüm VI:	
SONUÇLAR	67
Bölüm VII:	
I-RESİMLER	69
II-GENEL TABLO	75
Bölüm VIII:	
KAYNAKLAR	76

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü tarafından düzenlenen sınıflaması

Tablo 2. Meme karsinomlarında klinik ve patolojik evrelemesi.

Tablo 3. Meme karsinomunda TNM evrelemesi

Tablo 4. Modifiye Bloom-Richardson Sistemi

Tablo 5. Her2'nin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Tablo 6. American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists rehberine göre Her2 pozitifliğinin değerlendirilmesi

Tablo 7. İmmünohistokimyada kullanılan primer antikörlara ait bilgiler.

Tablo 8. Her3 ve östrojen reseptörü ilişkisi.

Tablo 9. Her3 ve progesteron reseptörü ilişkisi

Tablo 10. Her3 ve lenf gangliyonu tutulumu ilişkisi.

Tablo 11. Her3 ve tümör boyutu ilişkisi.

Tablo 12. Her3 ve nükleer derece ilişkisi

Tablo 13. Her3 ve Ki-67 ilişkisi (eşik değeri %20 için)

Tablo 14. Her3 ve Ki-67 ilişkisi (eşik değeri %15 için)

Tablo 15 . Her3 ve dokunun neoadjuvan durumu ilişkisi

Tablo 16. Her3 ve nüks ilişkisi.

Tablo 17. Allred skoru ve dokunun neoadjuvan durumu ilişkisi.

Tablo 18. CD1a ve nükleer derece ilişkisi.

Tablo 19. CD1a ve Ki-67 ilişkisi (eşik değeri %20).

Tablo 20. Ki-67 (%15) ve nükleer derece ilişkisi.

Tablo 21. Ki-67 (%20) ve nükleer derece ilişkisi.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: EGFR reseptör ailesi.

Şekil 2. Her3'ün PI3K/AKT yolağı sinyalizasyonundaki anahtar rolü.

Şekil 3. Her3 ve total sağ kalım ilişkisi

Şekil 4. Her3 ve hastalıksız sağkalım ilişkisi.

Şekil 5. Allred skoru ve hastalıksız sağkalım oranı ilişkisi.

Şekil 6. CD1a pozitivitesi ve total sağkalım ilişkisi.

Şekil 7. CD1a yüksekliği ve total sağkalım ilişkisi.

Şekil 8. KI-67 (%20) ve total sağkalım ilişkisi.

Şekil 9. KI-67 (%20) ve hastalıksız sağkalım ilişkisi.

BÖLÜM I

I-ÖZET:

AMAÇ: İnvaziv meme kansinimleri kadınlarda en sık görülen tümör olup, kadın kanserlerinin %22'sini, gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturur. Prognozunda hastanın yaşı, tümör boyutu, deri ve göğüs duvarı invazyonu, lenfovasküler invazyon, evre, histolojik derece, lenf nodu tutulumu, hormon reseptör durumu, histolojik tip, Her2 onkojen aşırı sentezi gibi faktörler rol oynar. Tümör hücrelerinin proliferasyon kapasitesi de bu faktörlerden birisidir. Tümörün proliferatif kapasitesini göstermede kullanılan yöntemler çok çeşitli olup Ki-67 non-histon proteini ölçümü en sık kullanılan immünhistokimyasal yöntemdir. Ki-67 proliferasyon indeksi pek çok çalışmada hastalıksız ve total sağ kalımla ters ilişkili bulunmuştur.

Meme kansinomu tedavisinde hedefe yönelik tedavide hormon reseptör durumu ve Her2 onkojen tayini büyük öneme sahiptir.

Her2, EGFR diğer adıyla ERB reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörler ekstrasellüler sinyallerin hücre içi iletiminde görev alırlar. Bu sinyal iletimlerinin sonucu hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve sağkalımı sağlanır. Bu aile üyelerinin diğer bir özelliği de birbirleriyle heterodimer ya da homodimerler yaparak aktif hale gelmeleridir. Bu dimer yapılarından en potent olanı Her2'nin Her3 ile yaptığı heterodimerdir. Her2-Her3 heterodimeri aynı zamanda Her2'yi hedefleyen kemoterapötik ajan olan Trastuzumaba direnç gelişmesinde etkilidir. Her3 aşırı ekspresyonunun Trastuzumab tedavisinde başarısızlığa neden olması dikkatleri Her3 'e çevirmiş, bu reseptörün prognoz üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmaların büyük bir bölümünde Her3 aşırı ekspresyonunun total sağ kalımda negatif etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Günümüzde meme kanserinin non-immunojenik bir tümör olduğu yönündeki düşünceler geride kalmıştır. Son yıllarda meme kansinimlerinde antijen sunan hücrelerin rolü konusunda pek çok çalışma yapılmış, gerek tümördeki dendritik hücre yoğunluğu, gerekse dendritik hücrelerin yerleşim paterni ile prognoz arasında ilişki gösterilmiştir. CD1a glikolize tip I transmembran proteini olup insan tümörlerinde dendritik hücre belirleyicisi olarak sıklıkla kullanılır.

Bu çalışmada Her2'yi aşırı sentezleyen ve Trastuzumab içeren neoadjuvan kemoterapi alan meme kansinimlerinde Her3, CD1a düzeyinin ve Ki67 proliferasyon indeksinin immünhistokimyasal yöntem ile saptanması hedeflenmiştir. Elde edilen veriler ile prognostik parametreler karşılaştırılmış ve sağ kalıma etkileri saptanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda bilgisayar ortamında oluşturulan arşiv kayıtlarındaki raporlar incelenerek 2003-2010 yılları arasında invaziv meme karsinomu tanısı almış hasta kayıtlarına ulaşıldı. İçlerinden immünohistokimya veya SISH yöntemiyle Her2 gen amplifikasyonu saptanan 48 adet olgu tespit edildi. Olguların tamamı neoadjuvan terapi olarak Trastuzumab tedavisi almış olduğu öğrenildi. Olguların tedavi rejimi ve nüks bilgilerine ulaşıldı, total ve hastalıksız sağ kalım süreleri belirlendi.

Meme karsinomlu dokulardan elde edilen parafin kesitlere Her3,CD1a ve Ki67 immünohistokimyasal boyaları uygulandı.

HER3 boyanmasının değerlendirilmesi amacıyla invaziv tümör hücrelerinin boyanma yüzdesi belirlendi . Boyanma yüzdesi ve kuvvetini birlikte değerlendirebilmek amacıyla Allred skorlama indeksi hesaplandı.

Dendritik hücreler 50 BBA'da sayıldı. Dendritik hücrelerin tümör hücreleri ile ilişkisi, dokudaki homojen ve heterojen dağılımları, çevre dokuda dendritik hücre varlığı araştırıldı.

Ki67 ile boyanmanın en yoğun olduğu alanda 100 hücre sayılarak çekirdek boyanması olanların sayısı belirlendi. Heterojen boyanmanın olduğu tümörlerde dokunu genelindeki Ki67 proliferasyon indeksi ile en yoğun alandaki boyanmanın ortalaması alındı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların deskriptif bilgileri ve immünohistokimya sonuçları SPSS programına aktarıldı. Değişkenler arasındaki ilişki Pearson χ^2 , Fischer's exact test kullanılarak saptandı. Total ve hastalıksız sağ kalım analizi Kaplan Meier testi ile yapıldı.

BULGULAR: Her3 pozitifliği 48 vakanın 23'ünde (%47.9) izlenmiştir. Boyanma yüzdesi ortalama %16'dır. Olguların tamamında sitoplazmik boyanma izlenmiş, membranöz boyanma görülmemiştir.. Boyanma yüzdesi ile boyanma kuvvetini birlikte değerlendirildiği Allred skorlama sistemi kullanılmış, tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu ve sağ kalım ile arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Her3 pozitifliği hasta yaşı, tümör boyutu ve reseptör durumu ile ilişkisiz bulunmuştur. Her3 pozitif ve negatif tümörlerde 5 yıllık total ve hastalıksız sağ kalım açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte sonuçlar oransal açıdan dikkat çekicidir. Her3 negatif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %62, Her3 pozitif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %53'tür. Her3 negatif olguların 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %51, Her3 pozitif olanların 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %40'tır. Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde nükleer grad ($p=0.02$), Ki67 proliferasyon indeksi ($p=0.05$) ve lenf gangliyonu tutulumu daha yüksektir. Olguların yaklaşık yarısında (%47.9) CD1a pozitif dendritik hücreler saptanmıştır. Ortalama CD1a pozitif hücre sayısı 16, median değer ise 7 olarak belirlenmiştir. CD1a pozitif dendritik hücreler tümör hücreleri ile iç

içe yerleşimliyidiler. CD1a pozitivitesi görülen hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %58 iken , CD1a'sı negatif olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %48'dir. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p= 0.73$) oransal olarak CD1a pozitif tümörlerde 5 yıllık sağ kalım daha yüksektir. Hastaliksız sağ kalım açısından bakıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p= 0.9$) oransal olarak CD1a pozitif tümörlerde 5 yıllık hastaliksız sağ kalım daha yüksektir. CD1a pozitif dendritik hücre içeren tümörlerde 5 yıllık hastaliksız sağ kalım oranı %49 iken CD1a negatif olan tümörlerde %36'dır. CD1a (+) immatür dendritik hücre varlığı ve sayısı, tümör boyutu ve aksiler lenf gangliyonu metastazı arasında belirgin ilişki saptanmamıştır. Nükleer derecesi yüksek olan olgularda ($p=0.01$) ve Ki67 proliferasyon indeksinin yüksek olduğu tümörlerde ($p=0.02$) CD1a pozitivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ki67 proliferasyon indeksi tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu ve nüks durumu ile ilişkisiz bulunmuştur. Ki67'si yüksek olan olgularda nükleer gradın daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.0001$). Beş yıllık genel sağ kalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %83, %20'nin üstünde olan tümörlerde %47'dir. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı olmaya yakındır ($p=0.07$).

SONUÇ: Her 3 pozitif olgularda oransal olarak 5 yıllık total ve hastaliksız sağ kalım daha düşüktür. Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde nükleer grad ($p=0.02$), Ki67 proliferasyon indeksi ($p=0.05$) ve lenf gangliyonu tutulumu daha yüksektir. CD1a ile boyanma görülen olgularda oransal olarak 5 yıllık total ve hastaliksız sağ kalım daha yüksektir. Nükleer derecesi yüksek olan olgularda ($p=0.01$) ve Ki67 proliferasyon indeksinin yüksek olduğu tümörlerde ($p=0.02$) CD1a pozitivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ki67'si yüksek olan olgularda nükleer gradın daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.0001$). Beş yıllık genel sağ kalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %83, %20'nin üstünde olan tümörlerde %47'dir. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı olmaya yakındır ($p=0.07$).

II-ABSTRACT

Breast carcinoma is the second leading cause of cancer-related mortality among women. Recognized disease prognosticators for individuals diagnosed with breast carcinoma include tumor size, histologic grade, and the presence of lymph node or distant metastases. The proliferation rate of tumor cells is one of these prognosticators. There are many ways to show proliferation capacity of the tumor. Ki-67 non-histon protein is the most practical way . In many studies higher Ki-67 proliferation indices are related to worse prognosis.

Hormone receptor status is a very important indicator to determine and decide therapy options. Recently, there has been much interest in the prognostic and treatment implications of the expression by breast tumors of the HER-2 receptor, a member of the type 1 growth factor receptor (EGFR) family

The EGFR family consists of 4 transmembrane receptors: HER-1 (also known as epidermal growth factor receptor and *c-erb B-1*), HER-2 (*c-erb B-2*), HER-3 (*c-erb B-3*), and HER-4 (*c-erb B-4*). The EGFR receptors exist as dimers (homodimers or heterodimers). HER-2 and HER-3 are only active when they form a heterodimer because HER-2 is a ligandless receptor and HER-3 lacks tyrosine kinase activity. The HER-2/HER-3 heterodimer is the most potent dimerization of this family. Her2-Her3 heterodimer causes trastuzumab resistance as well. Majority of the studies determine that Her3 has a negative effect on overall survival.

Breast carcinoma was known as a non immunogenic tumor in the past. Recently, many studies investigated the role of antigen presenting cells in breast carcinoma and determined that higher dendritic cell infiltration causes favourable outcome. CD1a is a glikolise type I transmembran protein which is used as a marker of dendritic cells.

The objective of the current study was to determine the association between HER-3, CD1a and Ki-67 expression and known clinicopathologic breast carcinoma prognosticators (tumor size, lymph node status, tumor grade, receptor status) and also disease-free and overall survival in Her2 positive breast carcinomas cases.

Archival samples of 48 patients with invasive breast carcinoma, with available paraffin blocks, whose biopsies examined at Pathology Department of İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi between 2003 and 2010. All the cases have either shown overexpression of Her2 protein or amplification of Her2 gene.

The tumor tissues were immunostained using Her3, CD1a and Ki-67 antibodies. Her3 staining was assessed according to the percentage of cytoplasmic staining. We used Allred

scoring index to evaluate Her3 staining percentage and intensity together. Number of dendritic cells determined at 50 high power area. We counted at least 100 cells in each case and defined the percentage of Ki-67 positive cells .

All the statistical analyses were performed using SPSS software. Relationships between variables analysed with Pearson χ^2 , Fischer's exact tests. Survival data were examined by Kaplan Meier method.

Of 48 cases, 23 (47.9%) revealed positive immunoreactivity for Her3. The mean percentage of staining for Her3 was 16%. All of the positive samples showed only cytoplasmic staining. There was no statistical association between Allred scoring index of Her3 and tumour size, axillary lymph node positivity , receptor status or survival. Nor was any statistical association between Her3 positivity and patient age, tumor size or receptor status. Although overall and disease free survival percentages were higher at Her3 negative patients , there was no statistical association between Her3 positivity and survival. There was a statistically significant association between Her3 positivity and higher tumor grade, higher Ki-67 proliferation index and axillary lymph node metastasis.

The mean and median number of CD1a positive dendritic cells were 16 and 7, respectively. CD1a positive cells were localised inside tumor cell groups at all samples. Although overall and disease free survival percentages were higher at CD1a positive patients , there was no statistical association between CD1a positivity and survival. Nor was any statistical association between CD1a positivity and tumour size or axillary lymph node metastasis. However a statistically significant association between CD1a positivity and higher tumour grade, higher Ki-67 proliferation index were observed.

There was a statistically significant association between Ki-67 proliferation index and some pathological prognostic factors including tumor size, axillary lymph node metastasis and recurrences. Similarly a significant association between higher Ki-67 proliferation index and higher tumour grade was detected. Overall and disease free survival were worse at patients with higher Ki-67 proliferation indices although they did not reach to statistical significance.

BÖLÜM II

I-GİRİŞ

İnvaziv meme karsinomları kadınlarda en sık görülen tümör olup, kadın kanserlerinin %22'sini, gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturur. Prognozunda hastanın yaşı, tümör boyutu, deri ve göğüs duvarı invazyonu, lenfovasküler invazyon, evre, histolojik derece, lenf nodu tutulumu, hormon reseptör durumu, histolojik tip, Her2 onkojen aşırı sentezi gibi faktörler rol oynar. Tümör hücrelerinin proliferasyon kapasitesi de bu faktörlerden birisidir. Tümörün proliferatif kapasitesini göstermede kullanılan yöntemler çok çeşitli olup Ki-67 non-histon proteini ölçümü en sık kullanılan immünhistokimyasal yöntemdir. Benign meme lezyonlarında Ki-67 (+) hücre oranı ortalama %3-4 civarında olup, invaziv karsinomlardaki ortalama değer olan %16-17'nin altındadır. Ki-67 proliferasyon indeksi pek çok çalışmada hastaliksız ve total sağkalımla ters ilişkili bulunmuştur.

Meme karsinomu tedavisinde cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri kullanılır. Hedefe yönelik tedavide hormon reseptör durumu ve Her2 onkojen tayini büyük öneme sahiptir.

Her2, EGFR diğer adıyla ERB ailesinin bir üyesidir. ERB reseptör ailesi HER1(EGFR), HER2, HER3 ve HER4 olarak adlandırılan tip I transmembran büyüme faktörü proteinleridir. Bu reseptörler ekstrasellüler sinyallerin hücre içi iletiminde görev alırlar. Bu sinyal iletimlerinin sonucu hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve sağkalımı sağlanır. Bu aile üyelerinin diğer bir özelliği de dayanışma içinde çalışmaları, birbirlerinin fonksiyonlarını tamamlayıcı olarak iş görmeleridir. Birbirleriyle heterodimer ya da homodimerler yaparak aktif hale gelebilirler. Bu dimer yapılarından en potent olanı Her2'nin Her3 ile yaptığı heterodimerdir. Her2-Her3 heterodimeri aynı zamanda Her2'yi hedefleyen kemoterapötik ajan olan Trastuzumaba direnç gelişmesinde etkilidir. Her3 aşırı ekspresyonunun Trastuzumab tedavisinde başarısızlığa neden olması dikkatleri Her3 'e çevirmiş, bu reseptörün prognoz üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmaların büyük bir bölümünde Her3 aşırı ekspresyonunun total sağkalımda negatif etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Dendritik hücreler Yunancada ağaç anlamına gelen “dendron” kelimesinden türemiş olup, ağaçsı uzantılara sahip olduğu için bu adı almıştır. Dendritik hücreler primer immün yanıtı başlatmada çok önemli göreve sahiptirler. Kemik iliği kökenli olan bu hücreler antijenleri işleyip T hücrelerine sunmada görevlidirler.

Günümüzde meme kanserinin non-immunojenik bir tümör olduğu yönündeki düşünceler geride kalmıştır. Son yıllarda meme karsinomlarında antijen sunan hücrelerin rolü

konusunda pek çok çalışma yapılmış, gerek tümördeki dendritik hücre yoğunluğu, gerekse dendritik hücrelerin yerleşim paterni ile prognoz arasında ilişki gösterilmiştir.

CD1a glikolize tip I transmembran proteini olup class I-II major histokompabilite kompleksi (MHC) molekülleri ile yapısal homoloji gösterir. İnsan tümörlerinde dendritik hücre markırı olarak sıklıkla kullanılır.

Bu çalışmada Her2'yi aşırı sentezleyen ve Trastuzumab tedavisi alan meme karsinomlarında Her3, CD1a düzeyinin ve Ki67 proliferasyon indeksinin immünohistokimyasal yöntem ile saptanması hedeflenmiştir. Elde edilen veriler ile prognostik parametreler karşılaştırılmış ve sağkalıma etkileri saptanmıştır.

II-GENEL BİLGİLER

II-A-MEME KARSİNOMU GENEL BİLGİLER:

İnvaziv meme karsinomu çevre dokulara invazyon yapan, uzak metastaz yapma eğilimli malign epitelyal tümörler grubudur. Bu tümörlerin büyük çoğunluğunu terminal duktal lobüler ünitenin parankimal epitel hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlar oluşturur. İnvaziv meme karsinomu farklı morfolojik, moleküler tiplere sahip, farklı klinik gidişleri olan heterojen bir tümörler grubudur.

II-A-1.EPİDEMİYOLOJİ VE İNSİDANS

İnvaziv meme karsinomları kadınlarda en sık görülen tümör olup, kadın kanserlerinin %22'sini, gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturur. Riskin yüksek olduğu Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da kadınların %6'sında 75 yaşından önce meme karsinomu gelişir. Bu oran Sahraaltı Afrika, Güney ve Doğu Asya –Japonya dahil- gibi gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelerin 1/3'ü kadardır. Bu bölgelerdeki ülkelere sadece Japonya gelişmiş bir ülke olmasına karşın buradaki insidans halen düşük seviyededir(1). Amerika Birleşik Devletlerinde her 8 kadından biri yaşamı boyunca invaziv meme karsinomuna yakalanmakla birlikte 2011 yılında 230.480 hasta invaziv, 57.650 hasta in-situ meme karsinomu tanısı almıştır. Ülkede 1999-2005 yılları arasında meme karsinomu insidansı her yıl %2 oranında azalmakta olup (50 yaş ve sonrası kadınlarda), bu durum hormon replasman tedavisi (HRT) kullanımının azalmasına bağlanmaktadır (2).

Sağkalım oranlarında 1970'lerden itibaren gelişme gözlenmeye başlanmış, ancak asıl önemli gelişmeler 1990'lı yıllarda görüntüleme yöntemlerinin gelişip yaygınlaşması ve tedavide hormonoterapinin kullanılmasıyla gerçekleşmiştir (1).

Ülkemizde kanser insidansları ile ilgili bilgiler yeterli düzeyde olmamakla birlikte 1999 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre meme karsinomu kadınlarda en çok görülen kanser türleri arasında 2390 olgu ve %24.1 oran ile birinci sırada yer almaktadır. Yine bu belgelere göre Türkiye'de meme kanseri insidansı 7.32/100.000 oranındadır. İki binsekiz yılı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı verilerine göre bu oran tüm kadın karsinomlarının %40,7'sine ulaşmıştır (3).

II-A-2. ETYOLOJİ

Meme karsinomu gelişiminde etkili olan risk faktörleri hormonal faktörler, nutrisyon, radyasyon ve genetik faktörler gibi ana başlıklar altında sınıflandırılır.

Yaş: insidans kadının yaşamı boyunca giderek artarak 75-80 yaşında pik yapar, seksen yaşından sonra ise risk belirgin olarak azalır. Tanı anındaki ortalama yaş beyazlarda 61 iken Hispanik kadınlarda 56, Afrikalı kadınlarda ise 46'dır. Hispanik olmayan beyaz kadınların sadece %20'sinde tümör 50 yaşın altında görülür. Tüm ırklarda 25 yaşından önce tümör görülme riski oldukça düşüktür. Genç kadınlarda tümör nadir olarak görülmekle birlikte, bu tip hastaların yaklaşık yarısında östrojen reseptörü (ÖR) negatif, Her2 pozitifdir. Bu tip kanserler 40 yaşın üstündeki hasta tümörlerinin üçte birinden azını oluşturur (4).

Hormonal faktörler: İnsan karsinogenezi iki aşamalı bir süreç olarak kabul edildiğinde reproduktif steroid hormonlar proliferasyon ve diferansiyasyon kinetiklerini değiştirerek karsinogenezin erken aşamalarında etkili olurlar. Östrojen duktal sistemdeki büyüme ve proliferatif aktiviteyi düzenler. İndiferansiye hücrelerin de çoğalmasına etki göstererek karsinogeneze rol oynar. Progesteron hem hücre büyümesi hem de diferansiyasyonunda görevlidir. Bu nedenle memedeki proliferatif etkinin en yüksek olduğu dönem östrojen ve progesteronun sinerjik etki gösterdiği luteal fazdır. Bunun yanında androjenler meme epitel proliferasyonunu deprese ederek meme karsinomundan koruyucu etki gösterirler. Laktasyonu uyaran prolaktin ise karsinogenez sürecinde etkili değildir. Oral kontraseptif kullanımı ve hormon replasman tedavisi gibi dışarıdan hormon alımının yanı sıra normal siklustaki normal seviyelerdeki reproduktif hormonlara uzun süreli maruziyet de riski arttırmaktadır. Erken menarş, geç menapoz ve nulliparite gibi durumlarda meme karsinomu riski artar. Menstrüel siklusu 13 yaşından önce başlayan kadınlarda, 13 yaşında sonra başlayan kadınlara göre risk 2 kat artar. Menapoza 55 yaşından sonra giren kadınlarda da 45 yaşından önce menapoza giren kadınlara göre risk 2 kat artmıştır. Nullipar kadınlardaki relatif risk 1 olarak kabul edildiğinde, 20 yaşın altında ilk doğumunu yapan kadınlarda risk %0.5 oranındadır (5).

Kombine oral kontraseptif kullanımı özellikle de 10 yıldan fazla kullanımda meme karsinomu gelişme riskini artırır. Risk kullanım süresince olduğu gibi ilaç kesildikten 10 yıl sonra da devam eder ve sonrasında giderek azalır (5). Risk 20-34 yaşlar arasında kullanıldığında artarken, 35-44 yaşlar arasında oral kontraseptif kullanımı ile meme karsinomu gelişimi arasında bağlantı bulunamamıştır (6).

Hormon replasman tedavisi koroner arter hastalıkları ve osteoporoz riskini azaltmakla birlikte meme karsinomu riskini artırır. Tek başına östrojen kullanımına göre kombine olarak östrojen ve progesteron kullanımında risk daha yüksektir (6).

Nutrisyon: Yüksek vücut kitle indeksi (>24) ve total kalori alımında artış postmenapozal kadında meme karsinomu gelişimi için risk faktörüdür. Obezite ve fiziksel aktivite azlığı insülin rezistansına neden olur. Artmış insülin seviyeleri ovaryan ve adrenal seks steroidlerinin sentezine neden olur. Seks hormonu bağlayıcı globülinin hepatik sentezinin ve dolayısıyla dolaşan seks hormonlarının artmasına yol açar. Plazma androjenleri de periferik yağ dokusunda östron ve östradiol dönüşür. Bu şekilde endojen östrojen maruziyeti artar. İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGF-BP) artışı da riski artırır. Doymuş yağ asitlerinden ve özellikle de kırmızı etle beslenme riski artırırken yüksek meyve ve sebze tüketimi koruyucu etkiye sahiptir. Sigara antiöstrojen etkisi nedeniyle koruyucu etkiye sahipken alkol tüketimi riski hafif artırır. Fiziksel aktivite menapozal durumdan bağımsız olarak riski %20-40 oranında azaltır (1).

Radyasyon: DNA hasarına neden olarak karsinogenezisin erken evrelerinde görev alır. Karsinom 10-15 yıllık latent periyodu takiben gelişir. Hiroshima ve Nagasaki'de radyasyona puberte döneminde maruz kalan kadınlarda, ayrıca postpartum mastit nedeniyle radyoterapi alan kadınlarda meme karsinomunun gelişme riskinin arttığı saptanmıştır (1,5).

Genetik faktörler: Meme karsinomlarının %20'sinde ailede meme karsinomu öyküsü vardır. Bu grubun $\frac{1}{4}$ 'ünde otozomal dominant kalıtım söz konusudur. Birinci derecede akrabasında (anne-kız kardeş) meme karsinomu öyküsü olanlarda risk çok daha fazladır. Aile öyküsü olan kadınlarda erken yaşta meme karsinomu görülme riski ve bilateralite daha sıktır. Bugüne kadar meme karsinomuna yatkınlık yaratan 6 gen ve gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunlardan en önemli 2 tanesi mutasyonlarında over karsinomu riskinin de arttığı, DNA hasar tamir genleri olan BRCA-1 ve BRCA-2 'dir. p53 mutasyonu (Li-Fraumeni), ataksi-telenjektazi, Cowden sendromu genetik yatkınlığı arttıran diğer genetik faktörlerdir (5,6).

II-A-3.LOKALİZASYON

Meme karsinomların büyük çoğunluğu terminal duktal lobüler ünitenin epitelinden köken alır. Sol memede tümör görülme olasılığı sağ memeye göre daha yüksektir (oran:1.07/1). Meme karsinomlarının %40-50'si üst dış kadranda lokalize olur. Bunu sırayla santral, üst iç kadranda, alt dış ve alt iç kadranda izler (1).

II-A-4. KLİNİK BULGULAR

Hastaların %60'ı doktora kitle şikayeti ile başvurur. Yeni fark edilen kitle haricinde daha önce var olan kitlede değişiklik, menstürasyon sonrası devam eden nodülerite, antibiyotik kullanımı ile geçmeyen meme inflamasyonu ve rekürren kistler de tümörü akla

getiren bulgulardır. Yüzde 14 hastada görülen ağrı şikayetinin kitle ile birlikte olması, tümör dışı nedenlerin ekarte edilmesi, tek taraflı ve inatçı olması ve postmenopozal kadında görülmesi tümöre bağlı ağrıyı işaret eden durumlardır. Daha nadir olarak da meme başı akıntısı, meme başı retraksiyonu, meme kontüründe değişiklik, meme derisinde ekzematize görünüm gibi bulgular izlenebilir (1).

II-A- 5. HİSTOLOJİK TİPLER :

Meme tümörlerinin histolojik klasifikasyonu 1982 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılmıştır ve uzun süre kullanılmıştır. 2012’de Dünya Sağlık Örgütü yeni bir histolojik sınıflandırma yayınlamıştır (1) (Tablo 1).

II-A-6. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Hastanın yaşı: Kadınlarda meme karsinomunun pik yaptığı yaşlar 75-80 arasındır. Daha sonra insidans giderek azalır. Beyaz kadınlarda tanı anındaki yaş ortalama 61’dir. Yirmibeş yaşın altında meme karsinomu oldukça nadirdir. Nadir olmakla birlikte genç yaşta ortaya çıkan tümörlerde hormon reseptörleri negatif, Her2 pozitif olma eğilimindedir (4).

Tümör boyutu: Aksiller lenf nodu metastazı riski tümör boyutu ile doğru orantılı olarak artar. Boyutu 1 cm’nin altında olan tümörlerde 10 yıllık sağkalım %90’ın üzerindeyken, 2 cm’den büyük tümörlerde bu oran %77’ye düşer (4).

Lokal ileri hastalık: Deriyi ya da göğüs duvarını invaze eden karsinomlar genellikle daha büyük boyutlu olup cerrahi eksizyonu daha zordur. Günümüzde tanı açısından farkındalığın artmasıyla bu tip lokal ileri tümörler daha nadir görülmektedir (4).

Lenfovasküler invazyon: Özellikle T1, nod negatif hastalarda önemli bir bağımsız prognostik faktördür. En önemli görevi aksiller lenf gangliyonu tutulum riskini göstermesidir. Erken lokal rekürrens ve uzak metastaz ile de ilişkilidir (5).

Uzak metastaz: Uzak metastaz varlığı kötü prognostik bir faktör olmakla birlikte, özellikle hormon reseptörü pozitif tümörlerde tümör metastatik olsa bile uzun dönem remisyon ve palyasyon başarılı olabilmektedir (4).

• Epiteyal tümörler	○ Mikroglândüler adenozis ○ Adenomyoepiteyal adenozis
İnvaziv karsinom NST(spesifik tip olmayan) (eski sınıflamada İnvaziv duktal karsinom, NOS) ✓ Mikst karsinom ✓ Pleomorfik karsinom ✓ Osteoklastik dev hücreli karsinom ✓ Koryokarsinomatöz özellikleri olan karsinom ✓ Melanotik özellikleri olan karsinom	✓ Radyal skar/kompleks sklerozan lezyon ✓ Adenomlar ○ Tübüler adenom ○ Laktasyon adenomu ○ Apokrin adenom ○ Pleomorfik adenom ○ Duktal adenom
İnvaziv lobüler karsinom Tübüler karsinom İnvaziv kribriform karsinom Medüller karsinom Müsinöz karsinom ve bol müsin içeren diğer tümörler ✓ Müsinöz karsinom ✓ Kistadenokarsinom ve prizmatik hücreli müsinöz karsinom ✓ Taşlı yüzük hücreli karsinom	• Myoepiteyal lezyonlar - Myoepiteyozis - Adenomyoepiteyal adenozis - Adenomyoepiteyoma - Malign myoepiteyoma
Nöroendokrin tümörler ✓ Solid nöroendokrin hücreli karsinom ✓ Apikal karsinoid tümör ✓ Küçük hücreli / yulaf hücreli karsinom ✓ Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	• Mezenkimal tümörler - Hemanjioma - Angiomatozis - Hemangioperisitom - Psödoangiomatöz stromal hiperplazi - Myofibroblastoma - Fibromatozis (agresif) - İnflamatuvar myofibroblastik tümör - Lipom ✓ Anjiolipom - Granüler hücreli tümör - Nörofibrom - Schwannoma - Anjiosarkom - Liposarkom - Rabdomyosarkom - Osteosarkom - Leiomyom - Leiomyosarkom
İnvaziv papiller karsinom İnvaziv mikropapiller karsinom Apokrin karsinom Metaplastik karsinomlar ✓ Saf epiteyal metaplastik karsinomlar ○ Skuamoz hücreli karsinom ○ İğsi hücre metaplastik adenokarsinom ○ Adenoskuamoz karsinom ○ Mukoepidemoid karsinom ✓ Mikst epiteyal/mezenkimal metaplastik karsinomlar	• Fibroepiteyal tümörler - Fibroadenom - Fillodes tümörü ✓ Benign ✓ Borderline ✓ Malign - Periduktal stromal sarkom , düşük dereceli - Meme hamartomu
Lipidden zengin karsinom Sekretuar karsinom Onkositik karsinom Adenoid kistik karsinom Asinik hücreli karsinom Glikojenden zengin berrak hücreli karsinom Sebaseöz karsinom İnflamatuvar karsinom Lobüler neoplazi ✓ Lobüler karsinoma in situ	• Meme başı tümörleri - Meme başı adenomu - Siringomatöz adenom - Meme başının Paget hastalığı
İntraduktal proliferatif lezyonlar ✓ Olağan duktal hiperplazi (Usual ductal hyperplasia) ✓ Düz epiteyal atipi (Flat epithelial atypia) ✓ Atipik duktal hiperplazi ✓ Duktal karsinoma in situ	• Malign lenfoma - Diffüz büyük B-hücreli lenfoma - Burkitt lenfoma - MALT tipi ektranodal marjinal-zon-B-hücreli lenfoma - Foliküler lenfoma
Mikroinvaziv karsinom İntraduktal papiller neoplaziler ✓ Santral papillom ✓ Periferik papillom ✓ Atipik papillom ✓ İntraduktal papiller karsinom ✓ İntrakistik papiller karsinom	• Metastatik tümörler
Benign epiteyal proliferasyonlar ✓ Adenozis (varyantlar dahil) ○ Sklerozan adenozis ○ Apokrin adenozis ○ Blunt duktus adenozis	

Tablo 1. Meme tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü tarafından düzenlenen sınıflaması

Derecelendirme: İnvaziv duktal karsinomlar tübül/gland formasyonu yapmaları, nükleer pleomorfizm ve mitoz miktarı esas alınarak derecelendirilirler. İlk kez Bloom ve Richardson tarafından 1957 de geliştirilen, 1991 de Elston ve Ellis tarafından modifiye edilen bu derecelendirme sistemi yaygın olarak kullanılır. Elston-Ellis modifikasyonunda apoptotik cisimcikler ve hiperkromazi gibi bulgular sınıflamadan çıkartılmıştır. Daha objektif hale gelen modifiye Bloom-Richardson- Elston sistemi (Nottingham derecelendirme sistemi) günümüzde halen kullanılmaktadır (7).

Histolojik tip: Tübüler, müsinöz ve adenoid kistik karsinom gibi meme karsinomları düşük dereceli ve daha iyi prognozlu tiplerdir. Az diferansiye, taşlı yüzük hücreli ve inflamatuvar karsinomlar ile karsinosarkomlar ise memenin agresif davranışlı tümörleridir. İnflamatuvar karsinomlarda 5 yıllık sağkalım oranı %11’dir. Derecesi yüksek olduğu halde saf medüller karsinomlar nispeten iyi prognozlu tümörlerdir ancak tanı kriterleri açısından değerlendiriciler arasındaki uyum yetersiz olduğundan bu konu tartışmalıdır (5).

Evreleme: Meme karsinomlarının evrelemesinde American Joint Comitte on Cancer (AJCC) 2002 sistemi kullanılmaktadır (8). Bu sistemde tümör boyutlarına, lenf nodu tutulumuna ve uzak metastaz varlığına göre sınıflandırma yapılır (TABLO 2-3).

Nekroz: Nekroz tümör boyutu ve derecesi ile ilişkili bir özelliktir. Çeşitli yayınlarda nekrozun hem nod pozitif hem nod negatif hastalarda önemli bir kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (5).

Tümör hücre proliferasyonu: Mitoz sayısı tümörün derecelendirilmesinde kullanılan önemli bir parametredir. DNA-flow sitometri ile S-faz fraksiyonu ölçümü ve PCR metodları ile de tümör hücre proliferasyonu gösterilebilir. Tümörün proliferatif kapasitesini göstermede kullanılan yöntemlerden birisi de Ki-67 non-histon proteini ölçümüdür (1). Ki-67 antijeni ilk olarak 1980’lerde Gerdes tarafından Hodgkin lenfoma derive hücre dizininden idantifiye edilmiştir. Bu protein araştırmanın yapıldığı lokasyon olan Kiel Üniversitesi’ne ithafen “Ki” adını, klon numarasına ithafen de “67” ekini almıştır (9). Mitoz bölünmenin G1, S, G2 ve M fazlarında sentezlenir. Dinlenme fazı olan G0’da Ki-67 protein ekspresyonu olmaz (10). G1 ve S fazlarındayken düşük miktarlardayken mitoz fazı sırasında maksimum değerine ulaşır ve mitozun son aşamalarında hızla azalır. Sentezlendiği fazdan bağımsız olarak yarılanma ömrü

1-1,5 saattir. Başlangıçta fiksasyona bağlı azalmış boyanma nedeniyle sadece frozen kesitlerde Ki-67 çalışılırken, MM-1, Ki-S5, SP-6 MIB-1 antikor klonlarını bulunmasıyla parafin bloklarda da Ki-67 çalışılmasına olanak sağlandı (11). Benign meme lezyonlarında Ki-67 (+) hücre oranı ortalama %3-4 civarında olup, invaziv karsinomlardaki ortalama değer olan %16-17'nin altındadır. Ki-67 proliferasyon indeksi pek çok çalışmada hastaliksız ve total sağ kalımla ters ilişkili bulunmuştur. Az diferansiye karsinomlarda ve komedo nekroz içeren invaziv duktal karsinomlarda en yüksek değere ulaşırken, invaziv lobüler ve müsinöz karsinomlarda daha düşük seviyededir (12). Medüller karsinomlarda genellikle %50'nin üzerindedir. Yapılan çalışmalarda hormon reseptörü negatif olan tümörlerde Ki-67 indeksinin daha yüksek olma eğiliminde olduğu görülmüştür (12).

Steroid hormon reseptör durumu: Östrojen (ÖR) ve progesteron reseptör (PR) durumu tedaviyi belirlemede önemli role sahiptirler. Adjuvan tamoksifene yanıtı öngörmede kullanılırlar. ÖR(+)/PR(+) tümörlerde bu tedaviye yanıt oranı %60-70, ÖR(-)/PR(-) tümörlerde %10 oranındadır. ÖR(+)/PR(-) tümörlerde ise oran %40'tır. Meme karsinomlarının %60'ı ÖR sentezler ve bu tümörlerin daha iyi prognoza sahip oldukları düşünülür. Bu tümörler daha yavaş büyümekle birlikte metastaz yapma potansiyelleri aynı oranda düşük değildir (1).

Her2 onkojen tayini: Her2'nin prognoza etkisini araştırmak amacıyla yapılan 39730 hastayı içeren toplam 107 yayında çeşitli yöntemler ile (southern blot, slot blot, PCR, CISH, FISH, İHK, ELISA vb) ile Her 2 geni ve proteini ölçülmüş, prognoz üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalardan 95'inde (%88) Her 2 gen amplifikasyonu ya da protein aşırı ekspresyonu önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmiştir. Multivariate analiz 93 çalışmada yapılmış, 13 çalışmada (%12) Her 2 ile prognoz arasında ilişki bulunmamış, 68 çalışmada (% 73) ise Her 2'nin bağımsız bir olumsuz prognostik faktör olduğu saptanmıştır (13).

Kombine morfolojik prognostik faktörler: Farklı histolojik prognostik faktörlerin kombinasyonu ile oluşturulmuş indeksler de prognozu öngörmede kullanılabilir. Nottingham prognostik indeksinde tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve histolojik derecelendirmeye bakılarak tümör iyi, orta ve kötü prognostik gruplara ayrılır. Bu alt gruplarda mortalite oranları sırasıyla %3, %7 ve %30 oranındadır (1).

Diğer: In-situ karsinom varlığı, tümör stromasındaki elastosis varlığı, cerrahi sınırların durumu, mikrodamar yoğunluğu, fibrotik odak varlığı, BRCA1 durumu, inflamatuvar hücre

infiltrasyonu ve p53 mutasyonu gibi faktörler ile de tümör prognozu arasında ilişki gösterilmiştir (1,4).

Tümör boyutu: TX Primer tümör saptanamamaktadır T0 Primer tümör yok Tis Karsinoma in situ T1: Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az T1mic: En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroiinvazyon T1a: En büyük boyutu 0.1 cm'den büyük olan ancak 0.5 cm'yi geçmeyen tümör T1b: En büyük boyutu 0.5 cm'den büyük olan ancak 1 cm'yi geçmeyen tümör T1c: En büyük boyutu 1 cm'den büyük olan ancak 2 cm'yi geçmeyen tümör T2: En büyük boyutu 2 cm'den büyük olan ancak 5 cm'yi geçmeyen tümör T3: En büyük boyutu 5 cm'den büyük olan tümör T4: Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım mevcut T4a: Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı T4b: Meme cildinde ödem (peau d'orange da dahil) veya ülserasyon, veya aynı memede satelliit deri nodülleri T4c: T4a ve T4b birlikte T4d: İnflamatuvar karsinom Bölgesel Lenf Nodülleri (N) Klinik Sınıflama NX: Bölgesel lenf nodları saptanamamaktadır (örn. daha önce çıkartılmış) N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok N1: Ipsilateral lenf nodlarında metastaz (fikse değil) N2: Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin* aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz N2a: Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz N2b: Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığında klinik olarak belirgin N3: Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(lar) metastazı veya klinik olarak belirgin* ipsilateral internal mammaryal lenf nod(lar) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiller ya da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(lar) metastazı. N3a: ipsilateral infraklavikular lenf nod(lar)nda metastaz N3b: ipsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)nda veya aksiller lenf nod(lar)nda metastaz N3c: ipsilateral supraklaviküler lenf nod(lar)nda metastaz	Patolojik Sınıflama (pN) pNX: Bölgesel lenf nodları saptanamamakta (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış) veya çıkartılmış. pN0: Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı olmayan, izole tümör hücreleri (ITH) için ek inceleme yok Not: H&E boyası ile verifiye edilebilen ancak sıklıkla sadece immünohistokimyasal (IHK) veya moleküler metodlarla saptanan, 0.2 mm'den daha geniş olmayan tek tümör hücreleri veya küçük hücre kümeleri 'izole tümör hücreleri (ITH)' olarak tanımlanır. pN0(i-): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif IHK pN0(i+): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif IHK, 0.2 mm'den geniş IHK kümesi yok pN0(mol-): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif moleküler bulgular (RT-PCR) pN0(mol+): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif moleküler bulgular (RT-PCR) pN1mi: Mikrometastaz (0.2 mm'den geniş, 2.0 mm'den geniş değil) pN1a 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz pN1b: Sentinel lenf nodu diseksiyonu ile internal mammaryal nodlarda mikroskopik hastalık olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil** pN1c 1-3 adet aksiller lenf nodunda ve internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile mikroskopik olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil**. (3 aksiller lenf nodundan fazla pozitif nod varsa, artmış tümör yükünü göstermek için internal mammaryal lenf nodları pN3b olarak sınıflandırılır). (pN1a + pN1b) pN2 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz, veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin* metastaz pN2a 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm'den büyük en az bir tümör odağı) pN2b: Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin* metastaz pN3 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda, veya infraklaviküler lenf nodlarında, veya 1 ya da daha fazla aksiller lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin* ipsilateral internalmammaryal lenf nodlarında metastaz; veya internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak negatif mikroskopik metastazla birlikte 3'ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz pN3a 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm'den büyük en az bir tümör odağı), veya infraklaviküler lenf nodlarında metastaz pN3b 1 veya daha fazla pozitif aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak belirgin* ipsilateral internal mammaryal lenf nodu metastazı; veya sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan fakat klinik olarak belirgin olmayan** mikroskopik hastalıkla birlikte 3 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya internal mammaryal lenf nodlarında metastaz.	pN3c ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz *Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile saptanan metastazlarda 'klinik olarak belirgin' terimi kullanılır. ** Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile saptanamayan metastazlarda 'klinik olarak belirgin olmayan' terimi kullanılır. Uzak Metastaz (M) MX Uzak metastaz bulunamıyor M0 Uzak metastaz yok
---	---	---

Tablo 2. Meme karsinomlarında klinik ve patolojik TNM evrelemesi.

Stage I	T1 N1 M0
Stage IIA	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N1 M0
Stage IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Stage IIIA	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1, N2 M0
Stage IIIB	T4 N0, N1, N2 M0
Stage IIIC	Tx N3 M0
Stage IV	Tx Nx M1

Tablo 3. Meme karsinomunda TNM evrelemesi

II-A-7. MEME KARSİNOMU TEDAVİSİ

Meme Karsinomu tedavisinde cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri kullanılır. Hangi tedavinin kullanılacağına tümörün tipi ve davranışına, hastalığın yaygınlığına göre karar verilir. Cerrahi tedavi modifiye radikal mastektomi, basit mastektomi ve meme koruyucu cerrahi yöntemlerinden oluşmaktadır. Radyoterapi daha çok postoperatif kullanılırken, nadiren primer tümör tedavisinde ve lokal rekürrenslerin kontrolünde de kullanılabilir. Kemoterapi özellikle de metastatik karsinomlu hastaların sağkalımında önemli etkiye sahiptir. En iyi sonuçlar kombinasyon kemoterapisi ile alınır. Hormon reseptörleri pozitif olan hastalarda Tamoksifen kullanımı ve Her2'si pozitif hastalarda Trastuzumab kullanımı hasta sağkalımını önemli ölçüde etkilemekte, tedavinin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır.(

II-B. MEME KARSİNOMLARINDA HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ

Meme karsinomu farklı patolojik özellikler ve klinik davranışlar içeren farklı tiplerin meydana getirdiği bir hastalıklar grubudur. Bu heterojenitenin bilinmesi her bir olgunun bu evrimsel spektrum içerisindeki yerine ayrı ayrı yerleştirilmesi ihtiyacını doğurur. Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik veriler ile morfolojiye dayalı olmayan bazı moleküler belirteçlerin saptanmasıyla olur. Bu şekilde her hasta için ayrı bir bireysel tedavi planı oluşturulabilir (15).

II-B-1. MEME KARSİNOMUNDA MOLEKÜLER SINIFLAMA

Böylece meme karsinomu tedavisinde hormonoterapinin başarısızlığına neden olan faktörlerden birisi olan EGFR ailesi ve diğer yeni moleküller üzerindeki araştırmalar ağırlık kazanmıştır. Binlerce geni içeren arrayler kullanılarak meme karsinomlarının moleküler özellikleri belirlenmiş, rutin kullanıma daha uygun olan immünohistokimyasal yöntem ile moleküler özelliklerin kabaca immünohistokimyasal karşılığı 5 ana grupta tanımlanmıştır.

1)Östrojen pozitif tip (Luminal tip): Bu grubu genel ekspresyon paterni meme duktus ve glandlarını döşeyen normal hücrelere benzeyen, luminal sitokinler olan sitokeratin 8/18 ile pozitif boyanan düşük gradlı tümörler oluşturur. Bu grup da kendi içinde iki kola ayrılır:

A)Luminal A tipi: Yüksek miktarda östrojen (ÖR) sentezler ve Luminal B tipine göre daha iyi prognozludur.

B)Luminal B tipi: Daha düşük miktarlarda östrojen (ÖR) ile birlikte HER2 ve EGFR de sentezler. Tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinden yararlanım ve sağkalım Luminal A tipine göre daha azdır. Luminal B'nin iki subtipi olup, bunlardan birincisi ÖR(+), PR(+) veya (-), HER2 (+), diğeri ise ÖR (+), PR (-), Her2 (-) olup Ki67'si yüksektir.

2)HER2 pozitif tip: Bu tümörler HER2 geninin ekstra kopyalarını içerir ve genellikle yüksek derecelidirler. Hızlı gelişim gösterirler. Tedavilerinde Trastuzumab, Lapatinip gibi ajanlar kullanılır. Bu tip tümörlerde östrojen (ÖR) ve progesteron (PR) negatiftir.

3)Bazal tip: Gen ekspresyon paternleri meme duktusundaki bazal tabakayı döşeyen bazal hücrelerinkine benzer. Sitokeratin 5/6/17 ve 4, kallikrein genlerine sahiptir. Bu tümörlerde östrojen sentezi düşük, HER2 geni normal seviyededir. Bu grup tümörlerin alt tipi olan “ triple negatif “ tipte östrojen ve progesteron negatif olup p53 mutasyonuna sahiptirler. Bu gruptaki tümörler yüksek dereceli ve kötü prognozludurlar. Bu hastalarda genellikle BRCA1 geninde mutasyon vardır. Hormonoterapi ve trastuzumaba yanıt kötü olup tedavilerinde Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP) kullanılır. Bazal hücreli tipin %60'ında

EGFR mutasyonu da olduğundan seçilmiş hastalarda EGFR inhibitörleri de kullanılmaktadır (16, 17,18).

4) Normal meme benzeri tip: Prognoz açısından luminal ve bazal tipler arasındadır. Östrojen, progesteron ve Her2'si genellikle negatiftir ve neo-adjuvan kemoterapiden genellikle fayda görmezler. Bazal tipten farklı olarak sitokeratin 5 ve EGFR eksprese etmezler (19).

5) Claudin-düşük tip: Östrojen ve progesteron reseptörü negatiftir. Düşük oranda Her2 sentezleyebilir. E-kaderin, claudin 3,4,7, singulin ve okludin gibi hücreler arası bağlantı proteinlerini düşük oranda eksprese ederler. Kötü prognozlu tümörlerdir (19).

II-B-2. TAMOKSİFEN KULLANIMI

1980'lerde klinik araştırmalar sonucu meme karsinomu tedavisinde taksanlar/paklitaksel ve dosetaksel kullanılmaya başlandı. Bu ajanlar tümörde gerilemeye neden olmakla birlikte oldukça toksik etkiye sahiptiler. Vakaların çoğunda östrojen-gama pozitifliğinin saptanması ve östrojen yolağının tümör gelişimindeki rolünün aydınlatılmasıyla birlikte selektif östrojen modülatörleri geliştirildi ve meme karsinomlarında ilk hedefe yönelik tedavi Tamoksifen kullanımı ile başlamış oldu (16). Tamoksifen günümüzde halen östrojen reseptörü pozitif vakalarda ilk basamak tedavide kullanılmaktadır. Adjuvan terapide Tamoksifen kullanılmaya başlandıktan sonra dünya çapında meme karsinomuna bağlı ölümlerde (pre-postmenapozal kadınlarda) %25 oranında azalma izlenmiştir (20).

Kemik dansitesini da koruyan Tamoksifenin kullanımının yaygınlaşmasıyla çeşitli yan etkileri de fark edilmeye başlanmıştır. Bu etkilerden en önemlisi de hormonoterapi alan postmenapozal kadınlarda endometriyal kanser riskinin artışıdır (16,21).

Başka bir problem de Tamoksifen tedavisi alan metastatik karsinomlu hastaların %40'ında relaps ve mortalitenin gerçekleşmesi, reseptörü pozitif pek çok vakada da tamoksifene yanıt alınamamasıdır. Tamoksifen tedavisinde dirence neden olan mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir.1) Östrojen reseptörü ekspresyon kaybı 2) Koaktivatör proteinlerin artışı 3) Nükleer reseptör korepresör (NCoR) gibi transkripsiyonu azaltan moleküllerin azalması 4) Östrojen ve EGFR/HER2 yolakları arasında cross-talk oluşması. Bu sonuncu mekanizma şu şekilde açıklanabilir: Membran östrojeni fonksiyonel olarak büyüme faktörü ligandlarını taklit eder ve c-AMP gibi hücre içi ikinci habercilerin seviyelerinin artışına neden olur. Bu ikinci haberciler IGF-1R, EGFR, HER2 gibi tirozin kinaz reseptörleri aktive ederek hücre proliferasyonuna neden olur. Östrojen, EGFR/HER2'yi cAMP gibi başka adaptör

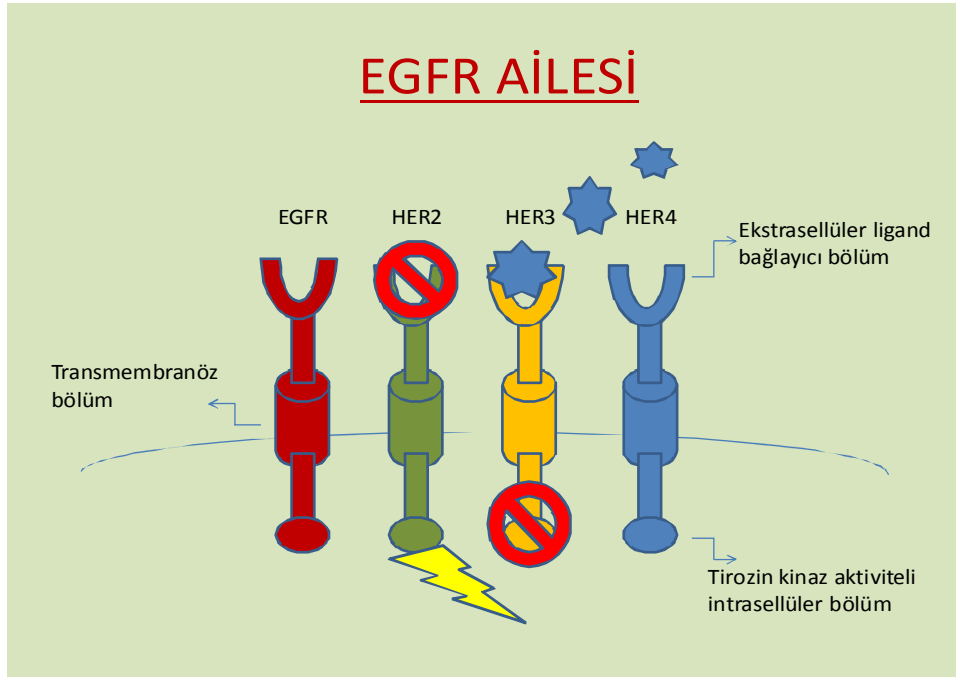
moleküller aracılığıyla ya da direkt fosforile ederek de aktive edebilir. Östrojen-büyüme faktörü reseptörleri arasındaki bu ilişki çift yönlüdür. Östrojen reseptörü de EGFR/HER2 yolağında ortaya çıkan ara moleküller tarafında aktive edilebilir (16).

II-B-3. EGFR AİLESİ:

ERB reseptör ailesi HER1(EGFR), HER2, HER3 ve HER4 olarak adlandırılan Tip I transmembran büyüme faktörü proteinleridir (Şekil 1). Bu reseptörler ekstrasellüler sinyallerin hücre içi iletiminde görev alırlar. Bu sinyal iletimlerinin sonucu hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve sağkalımı sağlanır. Bu aile üyelerinin diğer bir özelliği de dayanışma içinde çalışmaları, birbirlerinin fonksiyonlarını tamamlayıcı olarak iş görmeleridir. Bu reseptörler birbirleriyle heterodimer ya da homodimerler yaparak aktif hale gelebilirler. Bu dimer yapılarından en potent olanı Her2'nin Her3 ile yaptığı heterodimerdir (22).

EGFR ailesi reseptörleri başlıca 3 bölümden oluşur. Bunlardan ilki membranın dış yüzünde bulunan ligand bağlayıcı ekstrasellüler bölümdür. Bu bölüm sisteinden zengin 4 ligand bağlayıcı bölümden oluşur (Domain I (L1), domain II (CR1), domain III (L2), domain IV (CR2)). Reseptörün membranı geçen kısmına transmembran bölümü adı verilir. İntrasellüler bölüm ise jukstamembran, tirozin kinaz ve regülatör bölgeden oluşan 3 parçadan meydana gelir. Jukstramembran parçası reseptörün birçok fonksiyonunu düzenler (tirozin kinaz aktivite kontrolü, reseptör down regülasyonu, ligand internalizasyonu, reseptör sınıflaması gibi). Bu parça aynı zamanda kalmodulin gibi 2. haberciler ile iletişime geçer. Tirozin kinaz parçasının enzim aktivitesi vardır ve tirozin otofosforilasyon bölgeleri içeren karboksiterminal uca sahiptir (16,22).

Sağlıklı hücre membranında da bulunan bu reseptör ailesinin tümöral hücrelerde aşırı sentezlendiğinin saptanmasıyla Her ailesi üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Her1, diğer adıyla EGFR insan meme karsinomlarının %18-35'inde eksprese edilir ve kötü prognozla ilişkilidir (23). Agresif gidişli olan “triple negatif“ tipte EGFR aşırı ekspresyonu sıktır. EGFR ayrıca baş-boyun kanserlerinin %80'ninde, gliomların %50'sinde mutasyon ve/veya amplifikasyona uğrar. Her2 amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu meme karsinomlarının %25-30'unda saptanmakla birlikte yine bazı akciğer ve mide karsinomlarında Her2 mutasyonları ve aşırı sentezi saptanmıştır (22,24). Her3 de Her2 gibi meme karsinomlarının bir kısmında aşırı sentezlenir. Bu aile üyelerinden sadece Her4'ün aşırı ekspresyonunun kanser patogeneziindeki majör rolü saptanmamıştır (22).



Şekil 1: EGFR reseptör ailesi. Her2'nin ligand bağlayıcı, Her3'ün tirozin kinaz aktivitesi yoktur.

II-B-4. HER2 NEDİR?

Her2 geni kromozom 17q 12'de lokalize olup 185 kilo daltonluk, tirozin kinaz aktiviteli bir transmembran proteini olan Her2'yi kodlar. Bu protein normal meme epitelinde de düşük miktarlarda eksprese edilir. Normal hücrelerde Her2 geninin sadece bir kopyası bulunur. Meme kansinonlarının %25-30'unda kromozom 17 sayısında bir değışiklik olmaksızın Her2 geni amplifiye olarak 2 katın, bazen de 20 katın üzerine çıkar. Genin artışı sonucu sentezlediğı reseptör proteini sayısı artar. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile hücre içi sinyal yolakları harekete geçerek tümör hücresinin sağ kalımını ve proliferasyonunu sağlar (25).

II-B-5. HER 2'NİN PROGNOSTİK DEĞERİ

Her2 amplifikasyonuun prognostik değeri ilk olarak 1987 yılında Slamon ve ark. tarafından araştırıldı (26). Çalışmalarında 189 primer meme kansinonlu hastada gen alternasyonlarını araştırdılar. Her2/neu geninin olguların % 30'unda 2 ile 20 kat arasında değışen oranda ya da daha fazla sayıda amplifiye edildiğini saptadılar. Her2/neu gen amplifikasyonu hem total sağ kalım hem de relapsa kadar geçen sürede belirgin prediktif rol oynuyordu. Gen amplifikasyonu ile çeşitli hastalık parametrelerini karşılaştırdırncı Her/neu amplifikasyonunun kullanımda olan çeşitli prognostik faktörlerden (hormon reseptör durumu,

lenf nodu pozitifliği gibi) daha önemli bir prognostik değere sahip olduğunu tespit ettiler (26,27).

Bu konuda yapılan 39.730 hastayı içeren toplam 107 yayında çeşitli yöntemler ile (southern blot, slot blot, PCR, CISH, FISH, İHK, ELISA vb) ile Her 2 geni ve proteini ölçülmüş, prognoz üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalardan 95'inde (%88) Her2 gen amplifikasyonu ya da protein aşırı ekspresyonu önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmiştir. Multivariate analiz 93 çalışmada yapılmış, 13 çalışmada (%12) Her2 ile prognoz arasında ilişki bulunmamış, 68 çalışmada (% 73) ise Her2'nin bağımsız bir olumsuz prognostik faktör olduğu saptanmıştır (13).

Tandon ve arkadaşları (28) ise nod pozitif ve negatif olgularda Her2/neu onkogen proteininin prognostik potansiyelini araştırmak amacıyla 728 primer meme karsinomlu hasta dokusunda Western blot yöntemi ile Her2 proteinini ölçmüşler, nod negatif olan 378 hastada Her 2 proteininin hastalık gidişatını tahmin etmede başarısız olduğunu saptamışlardır. Ancak nod pozitif olan 350 hastada Her2 proteini daha yüksek olgularda, protein miktarı daha düşük olanlara göre hastalıksız ve total sağ kalımın daha az olduğunu göstermişlerdir.

Nod negatif hastalarda Her2'nin prediktif değeri tartışmalı olup, bir tarafta bunun nod negatif hastalarda olumsuz bir prognostik faktör olduğunu savunan, diğer tarafta ise belirgin bir korelasyon olmadığını gösteren karışık yayınlar vardır. Çalışmalar arasındaki bu farklılıkların hasta sayısına, hastaların tedavi rejimlerine, hasta takip süresine, en önemlisi de Her2 saptama tekniklerine bağlı olduğu düşünülmektedir (27).

II-B-6. HER 2'NİN PREDİKTİF DEĞERİ

Prognostik bir belirteç olarak kullanımının yanı sıra Her2 gen ve protein aşırı ekspresyonu geleneksel kemoterapötik ajanlara verilen tedavi yanıtını öngörmeye de kullanılabilir.

1)Kombinasyon kemoterapisi

Çalışmalar siklofosamid, metotreksat ve fluourasilden oluşan (CMF) kombinasyon kemoterapisine olan tedavi duyarlılığının Her2 pozitif tümörlerde daha az olduğunu göstermektedir. Gusterson ve ark. (29) 1.506 meme karsinomlu hastayı (International Ludwig Breast Cancer Study Group Trial V) lenf nodu pozitif olanlar (746 olgu) ve lenf nodu negatif olanlar (740 olgu) olmak üzere 2 gruba ayırmışlar, nod pozitif olanlara uzun süreli CMF tedavisi ya da tek doz perioperatif kemoterapi; nod negatif olanlara ise tek doz perioperatif kemoterapi vermişler ya da tedavisiz izleme almışlardır. Sonuç olarak nod pozitif olup uzun

sürekli CMF tedavisi alanlarda ve nod negatif olup tek doz perioperatif kemoterapi alanlarda Her2 negatif ise hastalıklı sağ kalımın daha uzun olduğunu göstermişlerdir.

2) Antrasiklin bazlı kemoterapi:

Her ne kadar çalışmaların bir kısmı lokal ileri Her2 aşırı eksprese eden meme kansinomlarında uzun süreli ya da yüksek doz antrasiklin bazlı kemoterapi alanlarda sağ kalım, tedavi başarısı ve uzak metastaz açısından belirgin bir fark yaratmadığını savunsada, bunun tam tersini ortaya koyan yayınlar da mevcuttur (27). Muss ve ark. (30) 1.572 nod pozitif erken meme kansinomlu hastaya düşük, orta ve yüksek dozlarda siklofosamid/doksorubisin fluorosil uygulanmış, hastalardan 442'sinde immünhistokimyasal olarak Her2'yi pozitif bulmuştur. Sonuç olarak yüksek doz antrasiklin alan gruptaki olgulardan Her2 ekspresyonu yüksek olanlarda ($\geq 50\%$), Her2'si düşük ya da negatif olan gruba göre hastalıklı ve total sağkalımın daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır.

3) Tamoksifen:

Tüm invaziv meme kansinomlarının yaklaşık %75'inde östrojen ve progesteron reseptörü pozitifdir (27). Bununla birlikte Her2'si pozitif tümörlerde hormon reseptörü ekspresyon oranı Her2'si negatif olanlara göre daha düşüktür (31). Wright ve ark. (32) östrojen ve EGFR reseptör proteini pozitif olan 221 vakanın 99'unda ortalama 24 ay içerisinde rekürrensler geliştiğini görmüşlerdir. Bu 99 hastanın 72'sinde ilk basamak tedavisinde hormonoterapi kullanılmış olup 65'inde Her2 protein ekspresyonu saptamışlardır. Sonuç olarak Her 2 protein aşırı ekspresyonunun endokrin tedaviye azalmış yanıtın ve kötü prognozun bir göstergesi olduğu sonucuna varmışlardır.

Buna karşıt olarak başka bir çalışmada Berry ve ark. (33) 651 östrojen reseptörü ve lenf nodu pozitif vakada İHK, FISH ve PCR ile Her2 durumu değerlendirilmiş, tamoksifen tedavisi sonrası klinik sonuçlar ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak tamoksifen tedavisi alan hastalarda hastalıklı ve total sağkalım sürelerinin Her2 ile ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır.

4)Taksanlar:

Paklitaksel (Taxol) geleneksel kemoterapiye refrakter tümörlerde hücre mikrotübül yapısını bozarak sitotoksik etki sağlar (27). Baselga ve ark. (34) metastatik meme kansinomlu hastalarda taksan sensitivitesini araştırmışlar, Her 2 pozitif tümörlerde (%65), negatif olanlara (% 36) göre taksan sensitivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır.

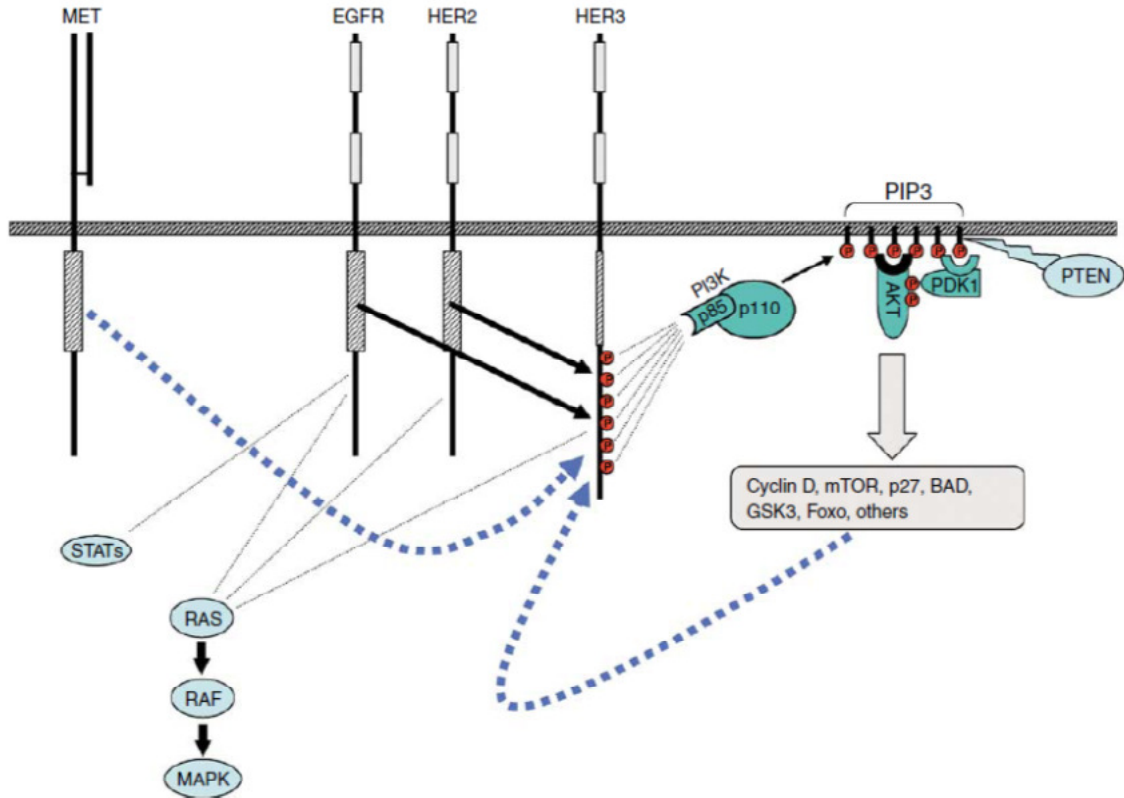
II-B-7. HER2 SİNYALİZASYONU

Ligand yokluğunda reseptör inaktif monomerlerden oluşur. EGF ya da TGF alfa gibi bir ligand reseptöre bağlandığı zaman reseptörde birtakım konformasyonel değişikliklere neden olur ve reseptörler kendi aralarında hetero ve homodimerler meydana getirir. Reseptör dimerizasyonu sonucu intraselüler C terminal tirozin kinaz bölümleri etkileşime geçer ve otofosforilasyon gerçekleşir. Fosforile olan tirozin kinaz bölümüne ikinci haberciler olan Src, Shc ve Grb2 (SH2 ve PTB içerir) bağlanır. Sonuç olarak tümör progresyonuna ve metastazına yol açan çeşitli yolaklar harekete geçmiş olur. Bu yolakların en önemli olanları şöyle sıralanabilir: 1) RAS-MAPK yolağı 2) Fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI3K)-AKT yolağı 3) Janus kinaz (JAK)-STAT yolağı 4) Fosfolipaz c gama (PLCL) yolağı (16).

EGFR ailesi reseptörlerine bağlanan ligandlar ise şu şekilde sınıflandırılır: 1) EGF, TGF-alfa ve amfiregulin EGFR'ye bağlanır. 2) Betaselülin, heparin bağlayan büyüme faktörü ve epiregulin hem EGFR hem de Her4'e bağlanır. 3) Tomoregulinler ve Nöroglinler (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4) Her4'e bağlanır. NRG1 ve NRG aynı zamanda HER4'e bağlanabilir (16).

Her2 için tanımlanmış ligand yoktur. Bunun nedeni Her2'nin ligand bağlayıcı monomerlere sahip olmayışdır. Aktive olabilmesi için ligand bağlayıcı aktivitesi olan diğer aile üyeleri ile heterodimerler yapmak mecburiyetindedir. Her2 gibi Her3 de ailenin diğer üyelerinden farklı olarak tek başına fonksiyonel açıdan inkomplettir. Her2'nin ligand bağlayıcı aktivitesi olmadığı gibi Her3'ün de intrasellüler kinaz domaini nonfonksiyoneldir. Diğer bir deyişle katalitik kinaz aktivitesine sahip değildir. Tek başlarına etkisiz oldukları halde Her2 ve Her3 dimerize olduklarında birbirlerinin eksik fonksiyonlarını tamamlayarak ailenin en aktif ve en potent sinyali üretirler (22). Özellikle de PI3K-AKT yolağının en potent stimülatörüdür. Bu yolak hücre büyümesi ve sağ kalımında en önemli düzenleyicilerdendir (35) (Şekil 2).

Siegel ve ark. (36) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada Her2 ve Her3 koekspresyonunun tümör progresyonu ve uzak metastazlarda önemli rolleri olduğunu kanıtlamışlardır. Alimandi ve ark. (37) Her2 ve Her3'ün kooperatif sinyalizasyonunun neoplastik transformasyonda etkili olduğunu göstermişlerdir. Hudelist ve ark (38) ise 74 invaziv meme karsinomlu hasta üzerinde kohort bir çalışma yaparak Her2 ve Her3'ün lenf gangliyonu metastazlı hastalarda büyük ölçüde koeksprese edildiklerini göstermişlerdir. Bütün bu çalışmalar da Her2-Her3 heterodimerinin kanser gelişim sürecinde ne kadar önemli bir etkiye sahip olduklarını desteklemektedir (39).



Şekil 2. Her3'ün PI3K/AKT yolağı sinyalizasyonundaki anahtar rolü. Üç reseptör de (EGFR, Her2, Her3) Grb2'ye bağlanarak RAS,RAF-MAPK yolağını aktive edebilir. İçlerinden sadece Her3 PI3K/AKT yolağına direkt olarak bağlanıp yolağı aktive edebilir. EGFR ve Her2 PI3K'ya direkt olarak bağlanamazken Her3, PI3K için 6 bağlanma bölgesi içerir EGFR ve Her2'nin tirozin kinaz inhibitörleri ile etkisiz hale getirildiği durumlarda Her3 ile C-met arasında çapraz reaksiyon oluşarak PI3K/AKT yolağını aktive eder (22).

II-B-8. HER2 TESTİ:

Her2'nin prognostik, prediktif ve terapötik belirteç olarak öneminin anlaşılması üzerine doğru ve eksiksiz bir inceleme yapmak için Her2 ölçüm tekniklerinin standardizasyonuna daha çok önem verilmeye başlandı. Bu amaçla 2007 yılında ASCO (American Society of Clinical Onchology) Her2'nin belirteç olarak kullanımında uygulanması gereken basamakları içeren bir düzenleme yayınladı. Bu düzenlemede Her 2 testi ve değerlendirmesiyle ilgili yöntemlerin standardizasyonu yanı sıra Her2 nin tanı ile aynı zamanda ya da nüks sırasında hastayı trastuzumaba yönlendirebilmek için ilk aşamada test edilmesi gereğinin üzerinde duruldu. Son olarak 2013 yılı ASCO Her2 kriterlerinde güncellemeler yapılmış, immünhistokimya ve in-situ hibridizasyon değerlendirme kriterleri değiştirilmiştir (40).

Her2 protein ekspresyonu immünhistokimya, ELISA, Western blot gibi yöntemlerle saptanırken Her2 gen amplifikasyonunu gösteren testler Southern blot, slot blot, CISH, FISH, SISH, PCR yöntemleridir. PCR ve blot temelli yöntemlerde eş zamanlı morfolojiyi değerlendirmek mümkün değilken, immünhistokimya ve in situ hibridizasyon yöntemleri (CISH, FISH, SISH) morfolojinin de değerlendirilebildiği, dilüsyonel artefaktlar içermeyen ve daha standardize edilebilir yöntemlerdir. İmmünhistokimya kolay, kullanışlı ve ucuz bir yöntem olmakla birlikte doku sensitivitesi, fiksasyon metodu, antikor spesifite ve sensitivitesi, skorlama gibi pek çok değişkenden etkilenir (27). Her2 'nin immünhistokimyasal skorlaması şu şekildedir.

İnvaziv tümör hücrelerinde hiç membranöz boyanma görülmezse veya %10 ve daha az hücrede inkomplet, belli belirsiz membran boyanması varsa skor 0, invaziv tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında membranı çepeçevre sarmayan belli belirsiz membranöz boyanma varlığında skor 1 olarak sınıflanır. İnvaziv tümör hücrelerinin en az %10'undan fazlasında membranı tam olarak çevrelemeyen zayıf-orta şiddette boyanma veya %10 ve daha az tümör hücresinde membranı çepeçevre saran kuvvetli boyanma varlığı skor 2 olarak sınıflandırılırken, tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında membranı çepeçevre saran kuvvetli boyanma varlığında skor 3 olarak kabul edilir.

In situ hibridizasyon yöntemleri daha güvenilir, sensitif ve tekrarlanabilir testlerdir. Başlıca in situ hibridizasyon yöntemleri floresan in situ hibridizasyon (FISH), kromojenik in situ hibridizasyon (CISH), silver in situ hibridizasyon (SISH) ve brightfield double in situ hibridizasyon (BDISH)'dir. Bu yöntemlerden FISH, SISH ve BDISH hem kromozom 17 hem de Her 2 gen kopya sayısını bir arada değerlendirme fırsatını sağlar. Her2 ve kromozom 17 probu bulunan kitlerde hücredeki Her2 sinyali kromozom 17 sinyaline orantılanarak bulunur.

Sadece Her2 probu olan kitlerde ise hücredeki Her2 sinyali sayısına göre değerlendirme yapılır. Ancak bu yöntem çift probu FISH testine göre daha az güvenilir bir methodur. Kromozom 17 polizomisi sık görülen bir durum olup invaziv meme karsinomlarının %20-30'unda kromozom 17 kopyası 3 veya daha fazla sayıdadır. Bu vakalarda sadece her2 probunun kullanılması yanlış pozitifliğe neden olmaktadır (27).

In situ hibridizasyon yöntemleri doku fiksasyonu gibi faktörlerden daha az etkilenir. Morfoloji ve gen amplifikasyonu aynı anda gösterilebilir. Kötü yanı immünohistokimyaya göre maliyeti yüksek, teknik açıdan ise daha zahmetli ve komplike olmasıdır.

Yapılan çalışmalarda iki yöntemin ne kadar korele sonuçlar verdiğini araştırmak amacıyla immünohistokimya yapılan olgu grubuna bir de FISH yöntemi uygulanmış, immünohistokimyasal olarak (+) ve (+++) olan vakaların FISH sonuçları da benzerlik gösterirken, (++) vakalarda iki yöntem arasında uyumsuzluklar saptanmıştır. Bu nedenle immünohistokimya ile Her2'si (++) saptanan hastalarda FISH yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır (27).

II-B-9. TRASTUZUMAB ETKİ VE DİRENÇ:

Her2'nin meme karsinomlarının %20-30'unda aşırı sentezlenmesi tedavide Her2'nin hedeflenmesini çekici hale getirmiştir. Bu amaçla FDA tarafından ilk onaylanan ajan Trastuzumab'dır (Herceptin-Genentech Inc. San Fransisco, U.S.A.). Rekombinant hümanize monoklonal antikor olarak geliştirilen Trastuzumab, Her2 nin ekstrasellüler domain IV'üne bağlanarak etki göstermektedir (41). Klinik çalışmalar da göstermektedir ki Trastuzumab'ın standart kemoterapiye eklenmesi, tek başına standart kemoterapiye göre daha iyi tedavi yanıtı sağlamaktadır (42).

Trastuzumab'ın etki mekanizması şu başlıklar altında incelenebilir:

- 1) Trastuzumab hücre membranındaki Her2 reseptörünün endositozunu uyarak sayısını azaltır (42,43,44).
- 2) Her2'nin bir metalloproteaz olan ADAM10 tarafından ekstrasellüler kısmının kesilmesini engeller. Başka bir deyişle p95Her2 (Trunke Her2) oluşmasını engeller (44,45).
- 3) Trastuzumab'ın en önemli görevlerinden birisi de antikor bağımlı sellüler sitotoksinite (ADCC) ile immün sistem hücrelerini Her2'nin eksprese edildiği tümör sahalarına çekmesidir. Natural killer hücrelerindeki Fc gamma reseptörüne bağlanmayı sağlar. Böylelikle tümör hücresi NK hücresinin saldırısına uğrayarak yok edilir (41,43,46).
- 4) Trastuzumab Her2 reseptörünün dimerizasyonunu engeller (44,47).

- 5) P27 seviyesini arttırarak PI3K ve MAPK yolaklarındaki sinyalizasyonu azaltır. (46,47).
- 6) Bir non-reseptör tirozin kinaz olan Src'yi Her2'den ayırır. Böylece Src aktivitesini azaltarak hücre içi sinyalizasyonu engeller. Hücre siklusunda arreste neden olur (46).
- 7) Tümör anjiyogenezisini inhibe eder. Endotelial hücre migrasyonunu in vitro, mikrodamar dansitesini ise in vivo azaltır. Özellikle Paklitaksel ile kombine kullanımda anjiyogenezi daha potent bir şekilde inhibe eder (43,46).

II-B-10. TRASTUZUMAB TEDAVİSİNE REZİSTANS GELİŞİMİ

Trastuzumab tedavisinin olumlu yöndeki sonuçları başlangıçta umut verici olsa da bir süre sonra tedaviye yanıt süresinin oldukça sınırlı olduğu fark edildi. Tedavi yanıtının azalması ya da hiç yanıt alınamamasında primer ve kazanılmış direnç etkilidir. Her2'si pozitif meme karsinomu vakalarının %35'inden azı başlangıçta tedaviye yanıt verirken bu vakaların da %70'i 1 yıl içinde metastatik hastalığa progrese olmaktadır (41).

Trastuzumab direnç mekanizmaları şu başlıklar altında özetlenebilir:

MUC-4 aşırı sentezlenmesi:

Membran band glikoprotein müsin 4 (MUC-4) O-glikozile bir membran proteini olup, ekspresyonu meme karsinomu dahil birçok karsinomda kötü prognoz göstergesidir. MUC-4 molekülü Her2 reseptörüne bağlanarak tümör hücresinin immun sistem tarafından tanınmasını engeller. Her2'ye bağlanmak için Trastumab ile yarışır. Bağlandığında ise reseptörü fosforile ederek hücre içi yolların aktivasyonunu sağlar, tümöröenez ve metastazı uyarır (41,46,47).

Trunke Her2 oluşumu:

Boyutu 185 kd olan Her2 ADAM10 adındaki metalloproteinaz tarafından parçalanabilir. Bu kırılma sonucu ekstrasellüler kısmını kaybederek p95 Her2 (trunke Her2) adını alır. Ekstrasellüler kısmı olmadığı için Trastuzumab'ın bağlanamadığı bu Her2 formu herhangi bir blokaj olmadan kinaz aktivitesini devam ettirebilir (47,48).

IGF-1R sinyalizasyonu:

IGF-1R meme karsinomlarında sıklıkla eksprese edilen, proliferasyon ve metastatik yayılımdan sorumlu bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Trastuzumab'a sensitif hücreler ile fiziksel etkileşime geçerek bu hücreleri tedaviye rezistan hale getirir. Hücre proliferasyon ve büyümesinden sorumlu olan önemli yolları aktive eder (41,46,47).

PTEN mutasyonu ve Siklin E amplifikasyonu/aşırı ekspresyonu:

PTEN, PI3K üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Mutasyona uğradığı ve/veya sentezinin azaldığı durumlarda Trastuzumab yanıtı azalır. Siklin E meme karsinomlarında kötü klinik gidişi gösteren bir moleküldür (47).

PI3K-AKT yolağında mutasyon gelişimi (47).

İmmün yanıtta meydana gelen değişiklikler:

NK hücrelerinin Fc kısmı tümör hücrelerindeki Fc gama reseptörüne bağlanarak etki gösterir. Fc reseptör kaybı olduğu durumlarda NK hücreleri tümör hücresine bağlanamaz ve Trastuzumab etkinliği azalır (47).

C-met aşırı sentezi:

C-met epitelyal ve endotelyal hücrelerde rejenerasyon ve büyümeyi sağlayan, onkojen özelliğinde bir reseptördür. Bilinen tek ligandı hepatosit büyüme faktörüdür (HGF) . C-met, Her2'si pozitif meme karsinomlu hastaların %25'inde aşırı sentez edilmekte olup kötü prognoz göstergesidir. Trastuzumab tedavisine yanıt olarak karsinom hücreleri tarafından sentezi arttırılır (48).

Eritropoetin kullanımı:

Anemi tedavisinde kullanılan rekombinan insan eritropoetini Trastuzumab etkisini antagonize eder. Bu etkiyi PI3K-AKT ve Src yolaklarını aktive ederek gösterir (41).

Diğer büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu:

Trastuzumab Her2 aktivitesini engeller ancak EGFR ve Her3'ün katıldığı hetero ve homodimerler alternatif yollarla PI3K/AKT sinyalizasyonunu aktive edebilirler (47).

II-B-11. HER3 VE MALİGNİTE

Her3 ilk olarak Kraus ve ark. tarafından 1989'da keşfedilmiştir (49). Kromozom 12q13'te yer alır ve yapısal olarak EGFR ailesinin diğer üyeleri ile homoloji gösterir. Her3 reseptör geni 6,2 kb'lık mRNA'yı transkribe eder. Oluşan protein glikolize olur ve 160 kilo daltonluk matür reseptör proteini ortaya çıkar (50).

Her 3 reseptörü ligand bağlayıcı ve tirozin kinaz domainlerinden oluşur ancak tirozin kinaz aktivitesi yoktur (51). Her 3'ün çok zayıf bir tirozin kinaz aktivitesinin olduğunu savunan kaynaklar da mevcuttur. Bu nedenle inaktif psödokinaz olarak yorumlanır (52). Ligand bağlayıcı domaini ise 4 alt bölümden oluşur (I, II, III, IV). Bu bölgelerden ikisi sisteinden zengin bölgeler olup (II ve IV), diğer ikisi de ligand spesifitesini belirler (I, III). Ligand bağlayıcı kısım EGFR ile %40-50, Her2 ile %40-45 oranında; tirozin kinaz kısmı ise

EGFR ile %60, Her2 ile %62 oranında benzerlik gösterir. Kinaz domainlerindeki aminoasitleri %83 oranında benzerlik gösteren EGFR ve Her2 bu açıdan birbirlerine daha yakın benzerliktedirler. EGFR ve Her2 gibi Her3 RNA'sı da normal keratinosit ve glandüler epitelde sentezlenir ancak diğerlerinden farklı olarak fibroblast, iskelet kası ve lenfoid hücrelerde sentezlenmez (51).

Her3 aşırı ekspresyonunun pek çok malignite ile ilişkisi gösterilmiştir. Gasparini (53) ve Travis (54) meme karsinomlarında, Lemoine (55) pankreatik kanserlerde, Sanidas (56) gastrik kanserlerde, Hunt (57) serviks kanserinde, Poller (58) prostat kanserlerinde, Rajkumar (59) mesane karsinomlarında, Mandau (60) ise ovaryan karsinomlarda Her3'ün aşırı ekspresyonunu göstermişlerdir. Ayrıca baş-boyun bölgesinin skuamöz hücreli karsinomu (61) ve üveal melanomlarda (62) da Her3 aşırı ekspresyonu saptanmıştır.

Her3, Her2 bağımlı tümörogeneizde anahtar role sahiptir. Meme karsinomlarında sıklıkla Her2 ile birlikte eksprese edilir (22,50). In vivo çalışmalar göstermiştir ki Her3 tek başına veya EGFR ile kombine edilince tümörojenik değildir. Ancak Her3'ün ve Her2'nin birlikte transfekte edildiği hücrelerin daha agresif bir büyüme paternine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bu hücrelerde VEGF seviyeleri, dolayısıyla tümör vaskülarizasyonu daha fazla olur. Her3'ün asıl etkisi Her2 pozitif meme karsinomlarının tedavi direncinde ortaya çıkar. Direnç mekanizmalarına geçmeden önce Her2-Her3 heterodimerinin nasıl fonksiyon gösterdiğine göz atmak gereklidir.

Her ailesi reseptör sentezi ve dağılımı normal koşullarda ligandların ekspresyonu ile kontrol edilir. Ligandların reseptöre bağlanması ile EGFR reseptör aile bireyleri arasında hetero ve homodimerler oluşur (63). EGFR ailesinin aktive ettiği en önemli 2 hücre içi yolak şunlardır:

1. Proliferasiyondan sorumlu RAS/RAF/MAPK yolağı.
2. Hücre sağkalımından sorumlu PI3K/AKT yolağı.

EGFR, Her2 ve Her3 reseptörlerinin üçü de Grb2'ye bağlanarak RAS/RAF/MAPK yolağını aktive edebilir. Ancak sadece Her3 PI3K/AKT yolağını direkt olarak aktive etme yeteneğine sahiptir. EGFR ve Her2, PI3K'ya direkt olarak bağlanamaz. Her3 ise 6 adet bağlantı noktasıyla PI3K'ya bağlanabilir. Her2 ile fosforile edildiğinde Her3 üzerindeki fosforile edilmiş tirozinler PI3K'nın p85 subünitesine bağlanırlar. P85 membran fosfoinozitollerini fosfoinozitol trifosfata çevirir (PIP3). PIP3, AKT'yi aktive eden PDK1 subünitesine sahiptir. PIP3 fosforilasyonu PTEN tarafından negatif feed-back ile kontrol

edilir. PIP3 tarafından aktive edilen AKT, hücre döngüsü kontrol eder, hücre sağkalımını sağlar, hücre metabolizmasını ve gen transkripsiyonunu kontrol eder (22).

II-B-12. HER3 VE TEDAVİ DİRENCİ

EGFR ailesini hedefleyen tedaviler, tümör gelişimindeki rolleri daha iyi bilindiğinden çoğunlukla EGFR ve Her2'ye yöneliktir. Tedavi gruplarından ilki reseptörün ekstrasellüler domainine tutunarak inhibisyonu sağlar. Bu gruptaki tedavi ajanları Trastuzumab ve Setüksimab'dır. Diğer grup ise Gefitinib ve Erlotinib'den oluşan küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleridir (51).

In vivo olarak olarak ligandın ne kadar sıklıkla upregüle edildiği bilinmiyor olsa da ek ligand stimülasyonu yolu ile Her2/Her3 heterodimer aktivasyonu trastuzumabın antisinyal etkisini yenebilir (64). Trastuzumabın ligand tarafından indüklenen Her2/Her3 heterodimer formasyonunu etkili olarak bozmadığı kanıtına dayanılarak Her3 aşırı ekspresyonu ve ligand tarafından stimüle edilen Her2/Her3 heterodimerinin yüksek düzeylerde oluşumu da trastuzumab direncine katkıda bulunabilir (65-66). Her2/Her3 heterodimerinin PI3K yolağını aktive etmesi Her2'nin Her3'e bağlanmasını engelleyen monoklonal bir antikör olan pertuzumabın geliştirilmesine neden olmuştur (67)

Sergina ve ark ise Her3'ün tirozin kinaz inhibitörlerine dirençteki rolünü araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada B474 meme karsinom hücrelerine EGFR ve Her2'yi non-selektif olarak inhibe eden dozlarda 96 saat boyunca sürekli olarak gefitinib uygulamışlardır. Tirozin kinaz inhibitör tedavisinin EGFR ve Her2 fosforilasyonunu engelleyerek MAPK ve JNK yolaklarını sürekli olarak inhibe ettiğini ama ailenin kinaz inaktif üyesi olan Her3'ün fosforilasyonunun zaman zaman duraklamakla birlikte sinyalizasyonun ısrarla devam ettiğini saptamışlardır (Sürekli ilaç infüzyonu ve Her2, EGFR inhibisyonuna rağmen). Bu durum MAPK/JNK yolağının inaktif olmasına rağmen tümörögenizde asıl etkili yolak olan PI3K/AKT yolağının ısrarla persiste edilmesini açıklamaktadır (66).

Her2 inhibisyonuna rağmen Her3 sinyalizasyonunun devam etmesi nedenleri günümüzde halen tartışmaya açık olsa da bu konuda kabul gören temel iki teori vardır.

Bunlardan ilki Her3'ün EGFR ailesinden olmayan tirozin kinaz reseptörü C-met tarafından fosforile edilmesidir (68). İkinci ve daha çok etkili olan yolak yine Sergina ve ark. tarafından açıklanmaktadır. Sergina Her2 inhibisyonuna rağmen Her3 fosforilasyonunu AKT bağımlı negatif feedback ile açıklar. Aktive olmuş AKT öncelikle membrandaki Her3 reseptör miktarını artırır ve fosforile Her3 miktarı artar. AKT yine negatif feedback ile Her3 fosfatazı

inaktive eder. Defosforile olamayan Her3 aktivasyonuna devam eder ve sonuç olarak Her3 aşırı ekspresyonu tirozin kinaz inhibitörü etkinliğini azaltır (66).

EGFR ailesi reseptörlerine EGF, epiregulin, betaselülin, TGF-alfa, nöroglin ve heregulin gibi ligandlar bağlanır. Bunlardan heregulin aile üyelerinden sadece Her3 ve Her4'e bağlanabilir (51). Heregulinin ortaya çıkışı özellikle de Her2 kinaz inhibisyonunun tirozin kinaz inhibitörleri ile yeteri kadar yapılmadığı durumlarda Her3'ün tampon rol oynamasında görevlidir. Otokrin ve parakrin salgılanan heregulin, mekanizması tam açıklanamamakla birlikte direk nükleusu uyararak hedef gen ve nükleer proteinlerin yapısını değiştirebilir. Heregulinin asıl etkisi nükleer Her3'ün membrana transportunu sağlamaktır (69).

Temelde membran proteini olarak bilinen EGFR ailesi üyelerinin sitoplazma ve nükleus yerleşimleri de saptanmıştır. İmmortalize insan meme hücrelerinde ve meme karsinomu hücrelerinde Her3'ün sıklıkla nükleer yerleşimli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte nöroglin ve heregulin ligandlarına maruz kalınca nükleustan sitoplazma ve membrana geçiş yaptığı görülür (51,69). Her3 lokalizasyonunun kanser tipi ve evresine göre de değişiklik gösterdiği söylenebilir. Gastrik karsinomlarda dominant olarak sitoplazmada yer alırken, çekirdek yerleşimli olması vasküler ve lenfatik invazyonla ilişkili bulunmuştur (70). Prostat karsinomlarında ise Her3'ün nükleer lokalizasyonunun predominant olması hormon refrakter hastalık ve kötü prognozla ilişkilidir (71). Baş boyun skuamöz hücreli karsinomlarında ise Her3 hem membranöz hem sitoplazmik yerleşimli olabilirken membranöz yerleşim daha kötü prognoz ile ilişkilidir (61).

II-B-13. HER3 VE PROGNOZ:

Her3 aşırı ekspresyonunun Trastuzumab tedavisinde başarısızlığı neden olması dikkatleri Her3 'e çevirmiş bu reseptörün prognoz üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu konuyla ilgili olarak Ocana ve ark.'ları (72) solid tümörlerdeki Her3 oranını konu alan 12 çalışmayı meta-analiz yöntemiyle değerlendirmiştir. Çalışmaların 3'ü kolorektal, 2'si gastrik, 2'si meme, diğerleri de melanom, over, baş-boyun, pankreatik karsinomlarda Her3 aşırı ekspresyonunu sağkalıma etkisini 1965 hasta üzerinde araştırmaktadır. Kolorektal karsinomlarda Her3 ekspresyonunu araştıran 2 çalışma haricinde çalışmaların tümünde Her3 ekspresyonunun 3 yıllık sağkalımı kötü yönde etkilediği, negatif bir prognostik faktör olduğu saptanmıştır. Travis ve ark (54) 145'i ileri evre olan toplam 346 hastaya ait meme dokularında Her3 aşırı ekspresyonunu araştırmış, total sağkalım, hastalıksız sağkalım, bölgesel rekürrens, uzak metastaz, yaş, menopozal durum, histolojik grad, reseptör

durumu, vasküler invazyon ve lenf nodu durumu ile Her3 aşırı ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bununla birlikte tm boyutu (>2 cm) ve kötü histolojik tipli meme karsinomları ile Her3 aşırı ekspresyonu arasında belirgin ilişki saptanmıştır. Başka bir çalışmada 4046 meme karsinomlu hastada Her3 aşırı ekspresyonunun prognoza etkisi araştırılmış, azalmış sağkalımla belirgin ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca Her3 ekspresyonu östrojen reseptör negatifliği ve lenfovasküler invazyon yokluğu ile ilişkili bulunmuştur. Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde histolojik derecenin daha yüksek olma eğiliminde olduğu saptanmıştır (73). Naidu ve ark.'larının (50) 104 meme karsinomlu hastada yaptığı çalışmada Her3 aşırı ekspresyonu yüksek histolojik derece ile ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak çalışmaların büyük bir bölümünde Her3 aşırı ekspresyonunun tek tek prognostik faktörlerden bağımsız olarak total sağkalımda negatif etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

II-B-14. HER3'Ü HEDEFLEYEN TEDAVİLER:

Geliştirilmekte olan Her3 inhibitörleri reseptör proteininin ekstraselüler bölümünü hedef alır. Her3'ün enzimatik katalitik aktivitesi olmadığından ATP bağlayan tirozin kinaz inhibitörleri ile durdurulamaz. MM-125 full hümanize anti Her3 antikoru olup, spesifik olarak HRG1-beta ligandının Her3'e bağlanmasını inhibe eder. Başka bir tedavi ajanı olan U3-1287 proksimal ve distal Her sinyalizasyonunu engeller. Pertuzumab Her2 ile Her3'ün dimerizasyonunu engeller. Tüm Her ailesini inhibe eden Canertinib de başka bir tedavi seçeneğidir (51).

II-C. MEME KARSİNOMUNDA DENDRİTİK HÜCRELERİN ROLÜ

Dendritik hücreler Yunancada ağaç anlamına gelen “dendron” kelimesinden türemiş olup, ağaçsı uzantılara sahip olduğu için bu adı almıştır. İlk olarak 1972 yılında Michael Sela tarafından lenfoid organların merkezinde saptanan bu hücreler dendritik makrofajlar adını almışlardı (günümüzde bu hücreler folliküler dendritik hücre olarak bilinmektedir) (74).

Dendritik hücreler primer immun yanıtı başlatmada çok önemli göreve sahip hücrelerdir. Kemik iliği kökenli olan bu hücreler antijenleri işleyip T hücrelerine sunmada görevlidirler.

II-C-1. DENDRİTİK HÜCRELERİN KÖKENİ

CD 34 + myeloid progenitör hücreler GM-CSF ve TNF alfa varlığında, gelişimlerinin 5. gününde CD1a + ve CD14 + olmak üzere 2 farklı tip dendritik hücre oluşturlar. Bu 2 alt grup 12. günde tipik dendritik hücrelere dönüşür.

CD1a + prekürsörler Birbeck granülleri içeren, Lag antijeni ve e-kaderin eksprese eden epidermal langerhens hücrelerine dönüşür.

CD14 + alt grup ise GM-CSF ve TNF alfa maruziyeti devam ederse dendritik hücreler CD14 antijeninin kaybederek CD14-, CD1a +, Lag antijeni, birbeck granülleri ve e-kaderin sentezlemeyen, ancak CD2, CD9 ve CD68 ve faktör VIIIa eksprese eden hücrelere dönüşürler. Bu antijen paneli ise dermiste görülen dendritik hücreler için spesifik.

CD 14 + prekürsörler M-CSF varlığında makrofaja dönüşebilirken CD1a + prekürsörlerin böyle bir özelliği yoktur.

CD14 + periferik kan monositleri de GM-CSF ve IL4 'e maruz kaldıklarında immatür dendritik hücrelere dönüşebilir. Bu hücreler TNF-alfa, IL1, LPS varlığında matüre olabilir. Myeloid kökenli dendritik hücrelerden sadece monositlerden differansiye olanlar B hücre proliferasyonu sağlayabilir.

Myeloid kökenli dendritik hücre sentezlendiği gibi GM-CSF yokluğunda lenfoid prekürsörlerden lenfoid dendritik hücreler meydana gelir (75).

B hücre germinal merkezlerde folliküler dendritik hücreler bulunur. Bu hücreler kemik iliği kökenli olmayıp antijenleri fagosite edip sunma aktiviteleri yoktur. CD1a içermezler. MHC class II molekülü içermezler ancak Ig G için Fc reseptörleri taşırlar. Antijenleri yüzey membranlarında tutarak B hücreleri uyarır, böylece immünolojik hafızanın devamına katkıda bulunurlar (76).

Kemik iliği kökenli dendritik hücreler dolaşıma katılarak periferik organlara yerleşip burada immatür hücreler olarak beklerler (75). Deri, burun mukozası, respiratuar ve intestinal sistem gibi vücudun dışa açılan bölgelerinde yoğunluk gösterir (76).

II-C-2. DENDRİTİK HÜCRELERİN MATÜRASYONU

İmmatür halindeki dendritik hücrelerin antijenleri yakalamasından T hücrelerine sunumuna kadar 3 aşamadan geçerek matür hale gelir.

Antijen yakalama ve işleme:

İmmatür dendritik hücrelerin antijen yakalama ve işleme fonksiyonları yüksek, ancak T hücre uyarıcı fonksiyonları düşüktür (75). Ekzojen antijenler (bakteriyel ürünler, proteinler

vs) dendritik hücreler tarafından fagosite edilir. Endozomlarda proteolize uğrayarak peptidlere ayrılır. Endoplazmik retikulumda sentezlenen MHC class II molekülleri ile birleşerek antijen-MHC II kompleksini oluşturur. Bu kompleks hücre membranına göç ederek burada yerleşir. (77).

Migrasyon:

Bu aşamada dendritik hücreler inflamatuvar medyatörlerin etkisiyle afferent lenfatikler yoluyla sekonder lenfoid organlara ulaşırlar (75). İnhalasyon ile akciğere verilen bakteriyel maddelerin bölgesel lenf nodlarında, intestinal lümene verilen antijenlerin Peyer plaklarından izole edilebilmesi bu nedenledir (75,78).

Dendritik migrasyon aşamasında fagositik fonksiyonlarını büyük ölçüde kaybederler, ancak antijen sunma kapasiteleri maksimum düzeydedir (75).

T hücrelerine antijen sunumu:

Dendritik hücreler MHC Class II molekülleri ile CD4+ yardımcı T hücrelerine antijen sunarlar. Antijenlerin T hücreler tarafından tanınabilmeleri için MHC molekülleri ile birlikte sunulmaları gerekir (74). Aktive yardımcı T hücrelerin salgıladıkları IL2, IFN gama, IL5 gibi sitokinler ile diğer T hücrelerinin, B hücrelerinin, nötrofil, eozinofil mast hücresi gibi diğer inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu gerçekleşir (77).

Tümör hücreleri de bu basamaklara karşı çeşitli medyatörler ile savaşır. IL6, IL10, M-CSF, VEGF salgılayarak dendritik hücre diferansiyasyonu engelleyebilirler (79,80).

Matür dendritik hücreler CD 83 ile pozitif olup yüksek miktarda MHC class II molekülü, CD40, CD80 ve CD86 eksprese ederler. İmmatür dendritik hücreler ise CD1a ile pozitif reaksiyon verir. CD40, CD80, CD86 düşük oranda eksprese edilir (81).

CD1a glikolize tip I transmembran proteini olup class I-II MHC molekülleri ile yapısal homoloji gösterir (82). İnsan tümörlerinde dendritik hücre markırı olarak sıklıkla kullanılır. Normal lenforetiküler sistemde sadece dendritik hücrelerin bir kısmı ve bazı timik hücreler CD1a eksprese edebilir. Diğer normal lenfoid hücrelerin hiçbiri CD1a sentezleyemez (83).

II-C-3. TÜMÖRAL DOKULARDA DENDRİTİK HÜCRE İNFİLTRASYONU

Tümöral dokulardaki dendritik hücre yoğunluğu ve klinik gidiş arasında pek çok tümör tipinde ilişki gösterilmiştir.

Furukova ve ark. Akciğer evre 1a adenokarsinomlarında S100 immünohistokimyası ile Langerhans hücre yoğunluğunu araştırmış, belirgin dendritik hücre infiltrasyonu olan tümörlerde sağkalımın daha yüksek olduğunu saptamışlardır (82,84).

Tsujitani ve ark. mide kanserlerinde S100 ile dendritik hücre yoğunluğunu araştırmış, derece III olgularda dendritik hücre infiltrasyonu ile sağ kalımı doğru orantılı bulmuşlardır (85).

Gallo ve ark. nazofarengeal ve laringeal karsinomlarda (86,87), Goldman ise dil karsinomlarında dendritik hücre yoğunluğu ve prognoz arasında ilişki bulmuştur (88).

II-C-4. MEME KARSİNOMLARINDA DENDRİTİK HÜCRELERİN ROLÜ

Günümüzde meme kanserinin non-immunojenik bir tümör olduğu yönündeki düşünceler geride kalmıştır. Meme karsinomu antijenlerine spesifik antikorların varlığı, tümörü infiltre eden lenfositler arasında tümöre duyarlı T hücre dizilerinin çoğalması bu görüşü desteklemektedir (89).

Son yıllarda meme karsinomlarında antijen sunan hücrelerin rolü konusunda pek çok çalışma yapılmış, gerek tümördeki dendritik hücre yoğunluğu, gerekse dendritik hücrelerin yerleşim paterni ile prognoz arasında ilişki gösterilmiştir.

Bell ve ark (89) 32 meme adenokarsinomunda frozen kesitler üzerinde dendritik hücre yoğunluğu ve yerleşimini araştırmış, CD1a ve Langerin ile immatür, CD83 ve DC-lamp ile matür dendritik hücre yoğunluğunu saptamışlardır. Sonuç olarak CD1 A ve langerin eksprese eden immatür dendritik hücreler olguların tamamında izlenmiştir (n:32). Sayıları 1BBA'da (x400) 1ile 48 arasında immatür dendritik hücre saptanmış, median ve ortalama değer 7 ile 12 bulunmuştur. Bu hücrelerin yoğunluğunu CD1a+ / lag+ hücreler oluşturmakla birlikte meme dokusuna ait 9 örnekten 5'inde CD1a+ dendritik hücre izlenmemiş, 4'ünde ise tümöral alandan çok daha az sayıda olmak üzere immatür dendritik hücre izlenmiştir. Antitümöral MIB3 alfa gibi kemokinlerin immatür dendritik hücreleri çağırdığını öne sürmüşlerdir. Matür dendritik hücreler ise 32 olgunun 20'sinde izlenmiştir.

Bell ve ark.yine aynı çalışmada immatür ve matür dendritik hücrelerin tümörün farklı alanlarında lokalize olduğunu göstermişlerdir. İmmatür dendritik hücreler tümöral hücreler ile yakın ilişkili lokalizasyonlarda bulunurken matür dendritik hücrelerin özellikle peritümöral alanlarda yerleşim gösterdiğini saptamışlardır. Buradan yola çıkarak stromal faktörlerin dendritik hücre adherensini etkilediğini göstermişlerdir (89).

Dendritik hücrelerin sadece lenfoid organlarda, T hücreleri ile sıkı yakınlık gösterdikleri alanlarda matür halde görüldüklerinden, peritümöral alanlarda matür dendritik hücrelerin ortaya çıkışı muhtemel tümör spesifik immun yanıtın peritümöral alanlarda gelişmekte olduğunu göstermektedir (89).

Coventry ve ark. ise (82) 48 olgu üzerinde (42 İDK ve 6 DKIS) CD1a(+) dendritik hücre yoğunluğu ile 5 yıllık sağkalım ile ilişkisini araştırmışlardır. Rastgele seçilen 50 BBA'da dendritik hücre yoğunluğuna bakmış, 0-14.85 arasında CD1a+ hücre saptamışlardır. CD1a'sı daha düşük olan olgularda ölüm oranı %32 iken daha yüksek olanlarda bu oran %18 olarak bulunmuştur. Buna rağmen 5 yıllık sağkalım ile CD1a + hücre sayısı arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır ($P=0,331$). Ayrıca CD1a ile tümör boyutu, derece, lenf nodu tutulumu, metastaz, Ki67 indeksi, lenfovasküler invazyon gibi prognostik parametreler ile ilişki saptanmamıştır (82).

Treilleux ve ark. ise 152 non-metastatik primer meme karsinomlu hastada T lenfosit ve dendritik hücre infiltrasyonunu araştırmışlar, immatür dendritik hücreler ile prognoz arasında belirgin ilişki saptamamış ancak CD208/DC-Lamp dendritik hücre pozitivitesi ile CD3+ T hücre infiltrasyonu, tümör derecesi ve lenf nodu tutulumu ile kuvvetle korele bulmuşlardır (90).

Coventry ve ark. başka bir çalışmada ise 40 meme karsinomlu hastada CD1a yoğunluğunu incelemiş, örneklerin yarısında CD1a pozitivitesi saptamışlardır. Ortalama CD1a + hücre sayısı 5,5/mm² olarak saptanırken yoğunluk ile tümör derecesi arasında ilişki gösterilememiştir. Buna neden olarak öncelikle tümör tarafından salgılanan IL-10 ve VEGF gibi moleküllerin dendritik hücre matürasyonunu engellemesini ileri sürmüşlerdir. CD1a+ hücrelerin tümör adaları arasındaki stromada yerleşim gösterdikleri, daha iyi diferansiye tümörlerde ise duktal formasyonların etrafında toplandıklarını saptamışlardır (91).

Bu çalışmalara ek olarak Hillebrand ve ark. (83) 52 duktal karsinomlu olguda frozen dokularda CD1a ile dendritik hücre yoğunluğunu araştırmışlar, tümöral dokuların %84'ünde CD1a + dendritik hücreler saptanırken, dendritik hücre yoğunluğu ve tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak CD1a + hücre yaygınlığının tümöral alanlarda non tümöral dokulara göre daha fazla miktarda görülmüştür. Dendritik hücrelerin dağılım paternine bakıldığında düşük dereceli tümörlerde daha çok periduktal alanlarda ya da duktus içerisinde yerleşim gösterirken, yüksek dereceli tümörlerde infiltratif tümör hücreleri ile iç içe oldukları saptanmıştır.

Tümörü infiltre eden dendritik hücrelerin kökeni ise tartışmalıdır. Bu konudaki yayınlardan bir kısmı tümörü infiltre eden dendritik hücreler ile Langerhans hücrelerinin farklı ırklardan geldiğini savunur (92). Bu görüşe alternatif olarak lenfosintigrafik yayınlarda meme derisindeki langerhans hücrelerinin meme dokusu içerisine transit olduğunu, oradan da aksiler lenf noduna gittiklerini göstermektedir (83). Yine bu teoriyi destekleyen yayınlarda

Langerhans hücrelerinin CD1a + olduğu ve kültürde 24 saat inkübe edildikten sonra CD1a pozitifliğinin yükseldiği, Langerhans hücrelerinin kendilerine has bir özellik olan birbeck granüllerini kaybettikleri saptanmıştır (93).

BÖLÜM III

I-GEREÇ VE YÖNTEM

I-A. ARAŞTIRMA OLGULARININ BELİRLENMESİ VE HAZIRLANMASI:

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'nda bilgisayar ortamında oluşturulan arşiv kayıtlarındaki raporlar incelenerek 2003-2010 yılları arasında invaziv meme karsinomu tanısı almış hasta kayıtlarına ulaşıldı. İçlerinden Her2'si immünohistokimya ile kuvvetli pozitif olanlar (+++) ya da immünohistokimyasal yöntemle (++) saptanıp SISH yöntemiyle Her2 gen amplifikasyonu doğrulanan olguların (5 olgu) hematoxilen eozin (HE) boyalı preparatları incelenerek araştırma için uygun bulunan 48 adet olgu tespit edildi. Anabilimdalı arşivimizden seçilen preparatlara ait parafin bloklar çıkarıldı. Olguların tamamı neoadjuvan terapi olarak Trastuzumab tedavisi almışlardı. Bu olgulara ait dokuların 24'ü (%50) hastaların meme karsinomu tanısı aldığı dokular olup tedaviye bağlı değişiklikler içermemekteydi. Diğer 24 olgu (%50) ise neoadjuvan tedaviden sonra eksize edilmiş tümöral dokuya ait kesitlerdi.

İmmünohistokimya çalışmalarının sağlıklı yapılabilmesi için her bir antikor için kontrol blokları belirlendi. Her3 için normal kolon mukozası, CD1a için langerhans hücreli histiyositoz ve Ki67 için meme karsinomu kontrol blokları seçilerek bu dokularda uygun inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlar belirlendi.

Hastaların prognozlarını belirlemek amacıyla İstanbul Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü hasta dosyaları arşivinden yararlanıldı. Bu dosyaların incelenmesiyle çalışmaya alınan olguların tedavi rejimi ve nüks bilgilerine ulaşıldı. Yine onkoloji arşivi ve bölümümüze ait bilgisayar sisteminden hastaların iletişim bilgileri alındı. Hasta ya da hasta yakınına ulaşılarak total ve hastalıksız sağkalım süreleri belirlendi.

Histolojik derecelendirme Modifiye Bloom-Richardson derecelendirme sistemi ile yapıldı (7) (Tablo 4).

Özellik	Puanlama	Tanım
Tübül formasyonu	1 puan	Tümörün %75'inden fazlasında tübül formasyonu
	2 puan	Tümörün %10-75'inde tübül formasyonu
	3 puan	Tümörün %10'undan azında tübül formasyonu
Nükleer pleomorfizm	1 puan	Çekirdeklerin boyutu ve şeklinde minimal varyasyon
	2 puan	Çekirdeklerin boyut ve şeklinde orta düzeyde varyasyon
	3 puan	Çekirdeklerin boyutu ve şeklinde belirgin varyasyon
Mitotik indeks	1 puan	Düşük
	2 puan	Orta
	3 puan	Yüksek
Toplam	3-5	Düşük (Grad I)
	6-7	Orta (Grad II)
	8-9	Yüksek (Grad II)

Tablo 4. Modifiye Bloom-Richardson Sistemi

I-B. HORMON RESEPTÖRLERİ VE HER2 İNCELEMESİ

ÖSTROJEN VE PROGESTERON RESEPTÖR İNCELEMESİ:

Reseptör tayininde immünohistokimyasal yöntem kullanıldı. Parafin bloklardan parafin kesitler elde edildi. Yüksek basınçlı ısı ile antijen retrieval işlemi yapıldı. Monoklonal fare anti-östrojen protein antikoru (Neomarks, Clone SP1, 1/400 dilüsyonda) ve monoklonal fare anti-progesteron reseptör protein antikoru (Novo Castra, 1A6, 1/100 dilüsyonda) 60 dakika oda sıcaklığında uygulandı. Hücrelerdeki intranükleer boyanma oranına göre boyanan hücre yüzdesi belirlendi. Boyanma yoğunluğu da hafif, orta ve kuvvetli olarak üç kademede değerlendirildi.

HER2 İNCELEMESİ (İHK VE SISH İLE TEKNİK VE SKORLAMA)

Her2 pozitifliği immünohistokimya ve/veya silver in situ hibridizasyon (SISH) teknikleri kullanılarak belirlendi.

İmmünohistokimyasal teknik ile Her2 analizi: Parafin blok materyalinden hazırlanan parafin kesitler kullanıldı. Yüksek basınçlı ısı ile antijen retrieval işlemi yapıldı. Monoklonal fare anti Her2 antikoru (Novo Castra, CBE-356), 1/100 dilüsyonda 60 dk uygulandı. Tümör hücrelerinde oluşan membranöz boyanma, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma gücüne göre skorlandı. Vakalar immünohistokimyasal olarak skorlanırken “American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists (ASCO)” kriterleri baz alındı (94) (tablo 5).

Skorlama	Tanım
Skor 3	İnvaziv tümör hücrelerinin %30’undan fazlasında üniform, kuvvetli membranöz boyanma
Skor 2	İnvaziv tümör hücrelerinin en az %10’unda belirgin olarak tüm hücreyi çevreleyen boyanma olmak şartı ile uniform olmayan veya orta yoğunlukta tam membranöz boyanma veya İnvaziv tümör hücrelerinin %30’u veya daha azında tam kuvvetli membranöz boyanma
Skor 1	İnvaziv tümörün herhangi bir yüzdesinde, hücreleri tam çevrelemeyen veya belli belirsiz , zayıf membranöz boyanma veya İnvaziv hücrelerin %10’undan azında zayıf, tam membranöz boyanma
Skor 0	İnvaziv hücrelerde hiç boyanma olmaması

Tablo 5. Her2’nin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Silver in situ hibridizasyon (SISH) tekniği ile Her2 analizi: Ventana Benchmark XT ya da LT makinede otomatik olarak yapıldı. Her2 (Her2 gen lokusu) ve kromozom 17'ye (kromozom 17'nin sentromik bölgesinde bulunan alfa satellit DNA sekansı –CEP17) karşı geliştirilmiş probler iki ayrı camda çalışıldı.

Her2 pozitifliğinin değerlendirmesinde “American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists” rehberi temel alındı (tablo 6). İmmünohistokimyasal olarak 1+ boyanma negatif kabul edilirken 3+ boyanma pozitif olarak değerlendirildi, 2+ boyanma ise SISH testi ile tekrar değerlendirildi, SISH pozitifliği saptanması durumunda tümör “Her2 pozitif” olarak değerlendirildi.

Her2 pozitifliği	Tanım
Pozitif	İHK Skor 3+ veya SISH Her2/CEP17 oranı 2.2'den büyük
Equivocal	İHK Skor2+ veya SISH Her2/CEP17 oranı 1.8-2.2 veya SISH Her2 gen kopya sayısı 4.0-6.0
Negatif	İHK Skor 0 veya 1+ veya SISH Her2/CEP17 oranı < 1.8 veya SISH Her2 gen kopya sayısı <4.0

Tablo 6. American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists rehberine göre Her2 pozitifliğinin değerlendirilmesi

I-C. İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

Belirlenen parafin bloklardan birer adet HE boyanması için, 3 adet immünhistokimyasal boyama için toplam 4'er lama 3 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlandı. İmmünhistokimyasal yöntemde kullanılacak olan kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Bu preparatlar etüvde bir gece boyunca bekletilerek kurutuldu.

HER3 İLE İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA:

Bir gece etüvde bekletilen lamlar 30 dk ksilende bekletilerek deparafinizasyon işlemine başlandı. Daha sonra 15 dk absolu alkol ve yine 15 dk %96'lık alkolden geçirildi, distile suya alınarak hidrate edildi. Böylece deparafinizasyon basamakları tamamlandı.

Antijenleri açığa çıkarmak amacıyla yapılan antijen retrieval işlemi için 2 ml target retrieval solüsyonuna (Envision Flex Target Retrieval Solution (50x), High Ph, DM 828, Lot No:00096056, Dako) 98 ml distile su eklendi. Lamlar bu solüsyon içerisinde, 1,5 atmosfer basınç altında Daklo chamber içerisinde 25 dk bekletildi. Oda sıcaklığında 20 dk soğumaya bırakıldı.

Antijen retrieval işlemi sonrasında kesitlerin çevresi hidrofobik kalem ile çizildi, fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için %3'lük hidrojen peroksit içinde 20 dk bekletildi. Non-spesifik bağlanmaları engellemek amacıyla 15 dk protein blokajı (Scy Tek Super Block Logan, Utah, USA Ref No: AAA125, Lot No:21292) uygulandı.

Primer antikor Her3 (Klon DAK-H3-IC Dako) 1/50 oranında dilüe edilerek kesitlerin üzerine damlatıldı. Kesitler +4 derecede gece inkübasyonuna bırakıldı. Sonraki gün lamlar PBS ile yıkandı. Yıkanan kesitler üzerine antijen-antikor kompleksi işaretlemesi için 25 dk biyotin işaretli sekonder link antikor solüsyonu (Scy Tek SensiTek Anti-Polyvalent, Biotinylated Antibody Logan, Utah, USA, Ref No: ABF125, Lot No: 21020) uygulandı. Lamlar fosfat tamponlu serum fizyolojik, pH:7.4 (PBS) ile 5 dk yıkandı. Yıkanan kesitler üzerine antijen-antikor-link kompleksinin etiketleme (label) işlemi için 25 dk horse radish peroksidaz ile işaretli streptavidin molekül içeren enzim solüsyonu (Scy Tek SensiTek HRB Logan, Utah, USA, Ref No: ABG125, Lot No: 21026) uygulandı. Lamlar PBS ile 5 dk yıkandı. Aminoethyl carbazole (AEC) kromojen solüsyonu (Scy Tek Bulk Pack AEC Kromogen/Substrat System, Logan, Utah, USA, Lot No: 15923) kullanılarak renklendirme yapıldı. Yirmi mililitre AEC kromojen, 1 mililitre AEC substrat ile karıştırıldıktan sonra kesitlere 15 dk süre ile uygulandı.

Kesitler distile su ile yıkanıp distile su dolu şaleye alındı. Yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilen ile 5 dk zıt boyama uygulandı, ardından kısa bir yıkama yapıldı. Amonyak ile yıkanan lamalar su bazlı kapatma maddesi (Vision mount 60 ml TA-060-UG Thermo Scientific/Lab Vision) ile kapatıldı.

CD1A İLE İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA:

Bir gece etüvde bekletilen lamalar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining modüle yerleştirildi ve aşağıdaki prosedür uygulandı.

- 1-Onbeş dakika deparafinizasyon
- 2-EDTA ile pH:8'de antijen geri kazanım yöntemi.
- 3- Kırk dakika boyunca 37 derecede primer antikor inkübasyonu.
- 4-İki kez 8 dakika boyunca amplifier A ve B.
- 5-Dört dakika boyunca asetat buffer içinde bakır sülfat çözeltisi.
- 6-HE ile zıt boyama.

Makineden çıkarılan lamalar deterjanlı suyla çalkalanıp saf alkolde 3 kez 3 dk boyunca bekletildi. Ardından 3 kez 3 dk boyunca ksilende bekletildi. "Vision mount" kapatma maddesi ile kapatma yapıldı.

Kİ 67 İLE İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA:

Bir gece etüvde bekletilen lamalar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining modüle yerleştirildi ve aşağıdaki prosedür uygulandı.

- 1-Onbeş dk deparafinizasyon
- 2-EDTA ile pH:8'de antijen geri kazanım yöntemi.
- 3- Otuziki dk boyunca 37 derecede primer antikor inkübasyonu.
- 4-Dört dk boyunca asetat buffer içinde bakır sülfat çözeltisi.
- 5-HE ile zıt boyama.

Makineden çıkarılan lamalar deterjanlı suyla çalkalanıp saf alkolde 3 kez 3 dk boyunca bekletildi. Ardından 3 kez 3 dk boyunca ksilende bekletildi. "Vision mount" kapatma maddesi ile kapatma yapıldı.

Antikor ve klon	Üretici	Sulandırma oranı	İnkübasyon süresi ve sıcaklığı
Monoklonal Mo A Hu Her3 (Klon DAK-H3-IC)	Dako	1/50	24 saat, +4 derece
CD1a (Klon EP3622)	Cell marque	1/50	40 dakika, +37 derece
Ki67 (SP6)	Cell marque	1/100	32 dakika, +37 derece

Tablo 7. İmmünohistokimya da kullanılan primer antikorlara ait bilgiler.

I-D. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYANMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

HER3 boyanmasının değerlendirilmesi:

İnvaziv tümör hücrelerinin boyanma yüzdesi belirlendi. Boyanma kuvveti zayıf, orta ve kuvvetli olarak 3 kategoriye ayrıldı. Hiç boyanma görülmeyen ya da belli belirsiz boyanan olgular negatif olarak değerlendirildi. Boyanma yüzdesi ve kuvvetini birlikte değerlendirebilmek amacıyla Allred skorlama indeksi hesaplandı (95). Boyanma yüzdesi %0-1 arası 1, %1-10 arası 2, %10-33 arası 3, %33-66 arası 4, %66-100 arası 5 olarak, boyanma kuvveti zayıf olanlar 1, orta olanlar 2, kuvvetli olanlar 3 olarak skorlandı. Boyanma yüzde skoru ve boyanma kuvvet skoru her vaka için ayrı ayrı toplanarak, toplam skoru 0-2 olan olgular Allred negatif, 3-8 olanlar Allred pozitif olarak kabul edildi.

CD1a boyanmasının değerlendirilmesi:

Toplam 50 BBA'daki sitoplazmik olarak boyanan dendritik hücre sayısı saptandı. Pozitif boyanan hücrelerin dendritik uzantılara sahip hücreler olduğu görüldü. Daha küçük boyutlu dokularda 50 BBA yokluğunda var olan tüm tümöral alanlardaki dendritik hücre sayısı belirlendi. Dendritik hücrelerin tümör hücreleri ile ilişkisi, dokudaki homojen ve heterojen dağılımları, çevre dokuda dendritik hücre varlığı araştırıldı.

Ki67 ile boyanmanın değerlendirilmesi:

Boyanmanın en yoğun olduğu alanda 100 hücre sayılarak çekirdek boyanması olanların sayısı belirlendi. Heterojen boyanmanın olduğu tümörlerde dokunu genelindeki Ki67 proliferasyon indeksi ile en yoğun alandaki boyanmanın ortalaması alındı.

I-F. İSTATİKSEL YÖNTEM:

Çalışmaya dahil edilen hastaların deskriptif bilgileri ve immünohistokimya sonuçları SPSS 16 programına aktarıldı. Değişkenler arasındaki ilişki Pearson χ^2 , Fischer's exact test kullanılarak saptandı. Total ve hastalıksız sağkalım analizi Kaplan Meier testi ile yapıldı. “p değeri<0.05” olması halinde fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM IV

BULGULAR

Çalışma kapsamına 2003-2010 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında tanı almış, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde tedavi görmüş 48 meme karsinomu olgusu alındı. Onkoloji Enstitüsüne ait hasta dosyalarından klinik bilgiler ve tedavi bilgileri elde edildi. Anabilim dalımızın bilgisayar kayıt sisteminden elde edilen iletişim bilgileri ile hasta ve hasta yakınlarından sağ kalım durumları öğrenildi.

Çalışmaya alınan hastaların tümü kadın olup medyan yaş 52 (30-80 yıl) olarak saptandı. Hastalardan 43'ü (%89.5) invaziv duktal karsinom, 2'si (%4.16) invaziv lobüler karsinom, 3'ü de invaziv duktal ve invaziv lobüler karsinom (ikili kombine tip) (%6.25) tanılıydı.

Tüm hastalar evre III hastalık nedeniyle neoadjuvan kemoterapi almış olup, olguların tamamını Her2'si immünohistokimya ile kuvvetli pozitif olanlar (+++) ya da immünohistokimyasal yöntemle (++) saptanıp SISH yöntemiyle Her2 aşırı ekspresyonu doğrulanmış meme karsinomları oluşturmaktaydı. Bu nedenle neoadjuvan kemoterapi ajanı olarak tüm hastalarda trastuzumab kullanılmıştı.

Üzerinde çalışılan dokuların 24 tanesi (%50) hastaların ilk tanı aldıkları dokular olup tamamı tru-cut biyopsi materyallerinden oluşmaktaydı. Diğer 24 tanesi (%50) neoadjuvan tedavi görmüş dokular olup, bunlardan biri tru-cut biyopsi materyali, diğer 23 tanesi meme eksizyonlarına ait dokulardı.

Olguların tamamının ÖR ve PR ekspresyon durumu tanı anında anabilim dalımızda belirlenmişti. ÖR düzeyi 0 ile %100 arasında değişmekte olup toplam 20 olguda (%41.6) pozitiflik saptandı. PR düzeyi 0 ile %90 arasında değişmekte olup toplam 19 olguda (%39.5) pozitiflik görüldü. Toplam 16 olguda her iki reseptör de pozitif (%33.3), 25 olguda (%52) her iki reseptör de negatifti.

Toplam 44 olgunun tümör boyutu bilgisine ulaşıldı. Tümör boyutları 0-18 cm arasında değişmekte olup ortalama 3,85 cm'di. Sekiz olguda (%18.1) neoadjuvan kemoterapi sonrası patolojik tam regresyon izlendi. Tümör boyutu 26 olguda (%59.1) 2 cm'den büyük, 18 olguda (%40.9) 2 cm'den küçüktü.

Aksiler lenf gangliyonu metastazı 26 olguda (%54.2) var olup, kalan 22 olguda (%45.8) lenf gangliyonu tutulumu izlenmedi.

Olguların büyük bir kısmını tru-cut biyopsiler oluşturduğundan, standardizasyon amacıyla modifiye Bloom-Richardson sisteminden sadece nükleer derece dikkate alındı. Olguların 37'sinin (%77.1) nükleer derece 3, 11 olgunun (%22.9) ise nükleer derecesi 2 idi.

Hastaların sağ kalımı 6 ile 108 ay arasında değişmekte olup ortalama 55 aydı. Toplam 18 olguda nüks saptanmış olup hastalıksız sağ kalım 1 ile 108 ay arasındaydı (ortalama 48 ay).

Her3 immünohistokimyasal boyası ile 23 olguda (%47.9) boyanma izlendi, 25 olguda (%52.1) boyanma görülmedi ya da belli belirsiz boyanma izlendi. Boyanma yüzdesi %0 ile %90 arasında değişmekte olup ortalama %16'ydı. Boyanma yoğunluğu zayıf, orta ve kuvvetli olarak 3 gruba ayrıldı, 11 olguda zayıf, 10 olguda orta şiddette ve 2 olguda kuvvetli boyanma izlendi. Boyanmaların hepsi sitoplazmik olup membranöz boyanma izlenmedi. Boyanma yüzdesi ve kuvvetini birlikte değerlendirebilmek amacıyla Allred skorlama sistemi kullanıldı (94). Skor 3 ve üstü olan 21 olgu (%43.7) Allred pozitif; skor 3'ten düşük olan 27 olgu (%56.3) Allred negatif olarak değerlendirildi. Hem Her3 ile boyanma olup olmaması, hem de Her3 boyanma yüzdesi ve kuvvetinin birlikte değerlendirildiği Allred indeksi ile total ve hastalıksız sağ kalım, ayrıca prognostik veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Her3'ü negatif olan olgularda ortalama yaş 52.7 iken Her3 pozitif vakalarda ortalama yaş 52.3 olarak saptandı. Her3 ekspresyonu ile hasta yaşı arasında anlamlı ilişki izlenmedi ($p=0.9$).

Her3 pozitifliği –negatifliği ile östrojen ve progesteron reseptörlerinin pozitif-negatifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
OR	neg	Count	16	12	28
		% within HER3_poz-neg	64,0%	52,2%	58,3%
	poz	Count	9	11	20
		% within HER3_poz-neg	36,0%	47,8%	41,7%
Total	Count		25	23	48
	% within HER3_poz-neg		100,0%	100,0%	100,0%

p=0.56

Tablo 8. Her3 ve östrojen reseptörü ilişkisi.

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
PR	0	Count	15	14	29
		% within HER3_poz-neg	60,0%	60,9%	60,4%
	1	Count	10	9	19
		% within HER3_poz-neg	40,0%	39,1%	39,6%
Total	Count		25	23	48
	% within HER3_poz-neg		100,0%	100,0%	100,0%

p=1

Tablo 9. Her3 ve progesteron reseptörü ilişkisi

Her3 pozitif olgularda lenf gangiyonu tutulum oranı %69.6 iken Her3 negatif olgularda gangliyon tutulum oranı %40'tır. Her3 pozitifliği ile aksiler lenf gangliyonu tutulum ilişkisi anlamlı bulunmadı (p=0.04).

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
LG	0	Count	15	7	22
		% within HER3_poz-neg	60,0%	30,4%	45,8%
	1	Count	10	16	26
		% within HER3_poz-neg	40,0%	69,6%	54,2%
Total		Count	25	23	48
		% within HER3_poz-neg	100,0%	100,0%	100,0%

p=0.04

Tablo 10. Her3 ve lenf gangliyonu tutulumu ilişkisi.

Tümör boyutunun 2 cm'in üzerinde ve altında olduğu olgularda Her3 pozitivitesi açısından anlamlı sonuç elde edilmedi (p=0.5)

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
TM	0	Count	8	10	18
		% within HER3_poz-neg	36,4%	45,5%	40,9%
boyut	1	Count	14	12	26
		% within HER3_poz-neg	63,6%	54,5%	59,1%
Total		Count	22	22	44
		% within HER3_poz-neg	100,0%	100,0%	100,0%

p=0.5

Tablo 11. Her3 ve tümör boyutu ilişkisi.

Her3 pozitif olguların %91.3'ünü nükleer derecesi 3 olan olgular oluştururken, Her3 negatif olan olguların %64'ü grad 3 olarak saptandı. Nükleer derecesi 2 olan olguların %18.1'i, derecesi 3 olan olguların ise %56.7'si Her3 pozitif idi. Her3 pozitifliği ile nükleer derece arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı ($p=0.02$)

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
grad 2	Count		9	2	11
	% within HER3_poz-neg		36,0%	8,7%	22,9%
3	Count		16	21	37
	% within HER3_poz-neg		64,0%	91,3%	77,1%
Total	Count		25	23	48
	% within HER3_poz-neg		100,0%	100,0%	100,0%

$p=0.025$

Tablo 12. Her3 ve nükleer derece ilişkisi

Ki67 proliferasyon indeksi için literatürde farklı sınır değerler kullanılmıştır. En çok kullanılan sınır değerler %15 ile %20'dir. Olgular her iki sınır değer için 2 gruba ayrıldı, sınır değer %15 olarak kabul edildiği istatistiklerde Her3 pozitivitesi ile Ki67 yüksekliği anlamlı bulundu ($p=0.05$). Sınır değer %20 olarak kabul edildiği istatistiklerde sonuç anlamlı bulunmadı ($p=0.08$)

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
Ki67_%20	0	Count	10	4	14
		% within HER3_poz-neg	40,0%	17,4%	29,2%
	1	Count	15	19	34
		% within HER3_poz-neg	60,0%	82,6%	70,8%
Total		Count	25	23	48
		% within HER3_poz-neg	100,0%	100,0%	100,0%

$p=0.085$

Tablo 13. Her3 ve Ki-67 ilişkisi (eşik değer %20 için)

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
Ki67_%15	0	Count	6	1	7
		% within HER3_poz-neg	24,0%	4,3%	14,6%
	1	Count	19	22	41
		% within HER3_poz-neg	76,0%	95,7%	85,4%
Total		Count	25	23	48
		% within HER3_poz-neg	100,0%	100,0%	100,0%

$p=0.05$

Tablo 14. Her3 ve Ki-67 ilişkisi (eşik değer %20 için)

Her3 pozitifliği-negatifliği ile dokunun neoadjuvan kemoterapili olup olmaması arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki elde edilmedi ($p=0.1$).

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
neoadj 0	Count	10	14	24	
	% within HER3_poz-neg	40,0%	60,9%	50,0%	
1	Count	15	9	24	
	% within HER3_poz-neg	60,0%	39,1%	50,0%	
Total	Count	25	23	48	
	% within HER3_poz-neg	100,0%	100,0%	100,0%	

$p=0.1$

Tablo 15 . Her3 ve dokunun neoadjuvan durumu ilişkisi

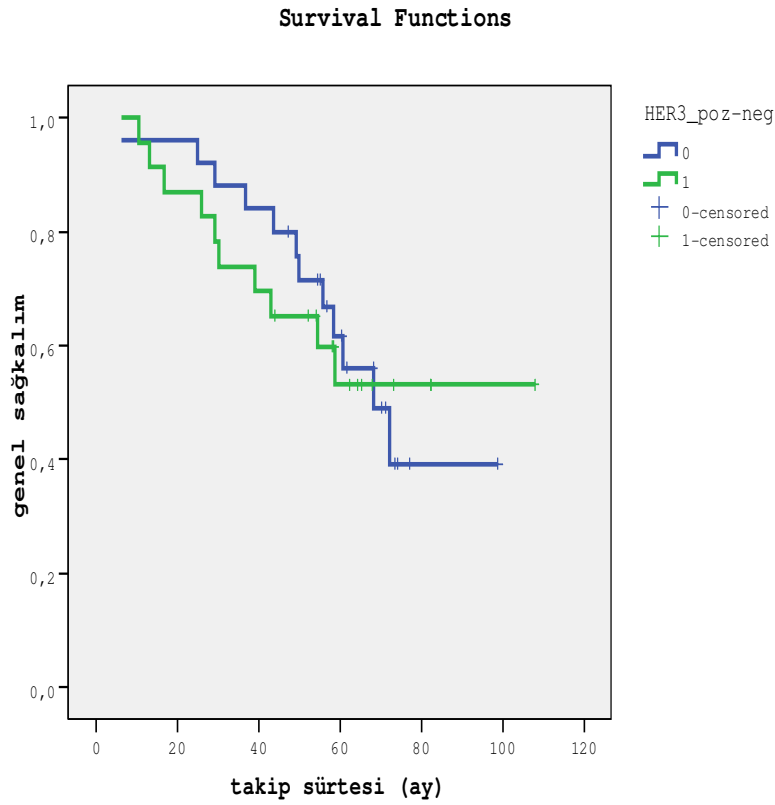
Her3 pozitivitesi ile nüks varlığı-yokluğu arasında hem oransal hem istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi.

			HER3_poz-neg		Total
			0	1	0
nüks_ var-yok	0	Count	12	10	22
		% within HER3_poz-neg	48,0%	43,5%	45,8%
	1	Count	13	13	26
		% within HER3_poz-neg	52,0%	56,5%	54,2%
Total		Count	25	23	48
		% within HER3_poz-neg	100,0%	100,0%	100,0%

$p=0.7$

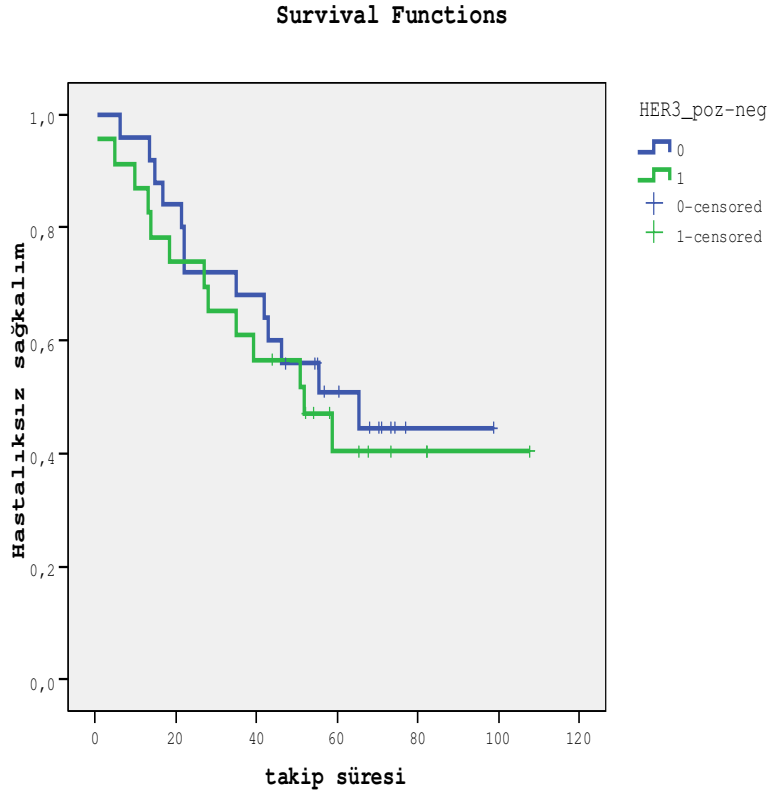
Tablo 16. Her3 ve nüks ilişkisi.

Her3 pozitivitesi ile 5 yıllık sağ kalım karşılaştırıldığında Her3 negatif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %62, Her3 pozitif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %53'tü. Aradaki fark oransal olarak anlamlı olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.8$).



Şekil 3. Her3 ve total sağ kalım ilişkisi

Her3 pozitivitesi ile 5 yıllık hastalıksız sağ kalım karşılaştırıldığında Her3 negatif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %51, Her3 pozitif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %40'tı. Aradaki fark oransal olarak anlamlı olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.64$).



Şekil 4. Her3 ve hastalıksız sağkalım ilişkisi.

Her3'ün yüzdesi ve boyanma kuvvetinin değerlendirildiği Allred indeksi ile yaş, grad, reseptör durumu, lenf gangliyonu tutulumu, tümör boyutu, nüks durumu arasında anlamlı ilişki elde edilemedi. Dokunun neoadjuvan kemoterapi durumu ile anlamlı ilişkili saptandı.

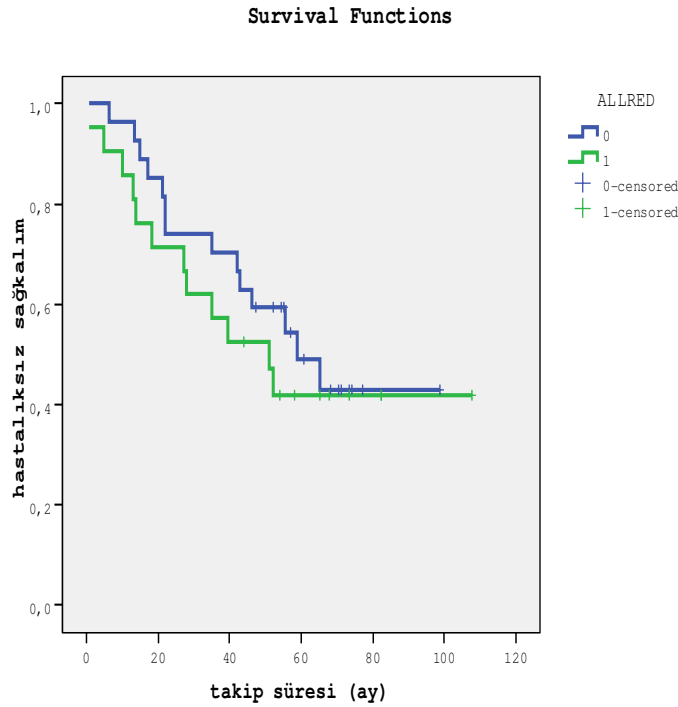
		ALLRED		Total
		0	1	0
neoadj 0	Count	10	14	24
	% within ALLRED	37,0%	66,7%	50,0%
1	Count	17	7	24
	% within ALLRED	63,0%	33,3%	50,0%
Total	Count	27	21	48
	% within ALLRED	100,0%	100,0%	100,0%

p=0.04

Tablo 17. Allred skoru ve dokunun neoadjuvan durumu ilişkisi.

Allred skorlama indeksi 0-2 olan olgularda 5 yıllık sağ kalım oranı %64, boyanma indeksi 3-8 olan olgularda sağ kalım oranı %49'du. Sağ kalımla Allred indeksi ilişkisi oransal olarak belirgin olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamsızdı (p=0.6).

Allred skorlama indeksi 0-2 olan olgularda 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %49, boyanma indeksi 3-8 olan olgularda hastalıksız sağkalım oranı %42 idi. Sağkalımla Allred indeksi ilişkisi oransal olarak belirgin olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0.5$).



Şekil 5. Allred skoru ve hastalıksız sağkalım oranı ilişkisi.

Olgularda 50 BBA’da CD1a (+) boyanan dendritik hücre sayısına bakılıp 0 ile 150 arası değerler izlendi. Median değer 7, ortama CD1a (+) dendritik hücre sayısı 17.3 olarak saptandı. Toplam 16 olguda (%33.3) hiç boyanma izlenmedi, 32 olguda (%66.7) değişen yoğunlukta dendritik hücre izlendi. Olguların 15’inde (%46.8) dendritik hücreler tümöral dokuya homojen olarak dağılmıştı, 17 olguda (%53.2) ise gruplar halinde ve heterojen boyanma izlendi. Dendritik hücre izlenen olguların tümünde bu hücreler tümör hücreleri ile iç içe yerleşim göstermekteydi. Olguların hiçbirinde tümöre komşu çevre dokuda dendritik hücre izlenmedi. CD1a (+) dendritik hücrelerin saptandığı 5 olguda tümör çevresinde yoğun lenfositik infiltrasyon dikkati çekti.

CD1 a ile sağ kalım ve prognostik faktörler arasında ilişki araştırılırken CD1a ‘nın herhangi bir değerde pozitifliği ile sınır değere göre yüksekliği göz önünde bulunduruldu.

CD1a pozitivitesi ile hasta yaşı, tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu, nüks varlığı arasında oransal ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmazken, nükleer derece ve Ki67 indeksi ile CD1a pozitivitesi ilişkili bulundu.

Nükleer derecesi 2 olan tümörlerde CD1a pozitiflik oranı %36,4 olarak saptanırken, nükleer derecesi 3 olan tümörlerde CD1a pozitivitesi %5.7'ye yükselmekteydi. Tümör nükleer derece yüksekliği ile CD1a pozitivitesi ilişkili bulundu ($p=0.01$).

			CD1a_poz-neg		Total
			0	1	0
grad 2	Count		7	4	11
	% within grad		63,6%	36,4%	100,0%
3	Count		9	28	37
	% within grad		24,3%	75,7%	100,0%
Total	Count		16	32	48
	% within grad		33,3%	66,7%	100,0%

$p=0.015$

Tablo 18. CD1a ve nükleer derece ilişkisi.

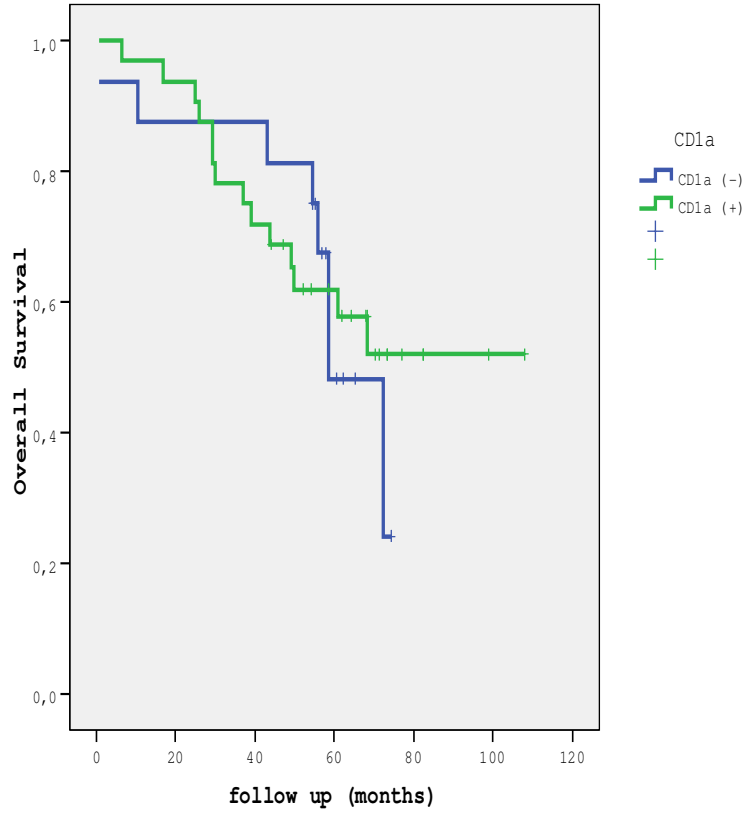
CD1a pozitivitesi ile Ki 67 arasındaki ilişki Ki67 sınırı %15 ve %20 alınarak araştırıldı, eşik değeri %20 olarak kabul edildiğinde anlamlı sonuçlar elde edildi.

			CD1a_poz-neg		Total
			0	1	0
Ki67_%20	0	Count	8	6	14
		% within			
		Ki67_%20	57,1%	42,9%	100,0%
	1	Count	8	26	34
		% within			
		Ki67_%20	23,5%	76,5%	100,0%
Total		Count	16	32	48
		% within			
		Ki67_%20	33,3%	66,7%	100,0%

p=0.025

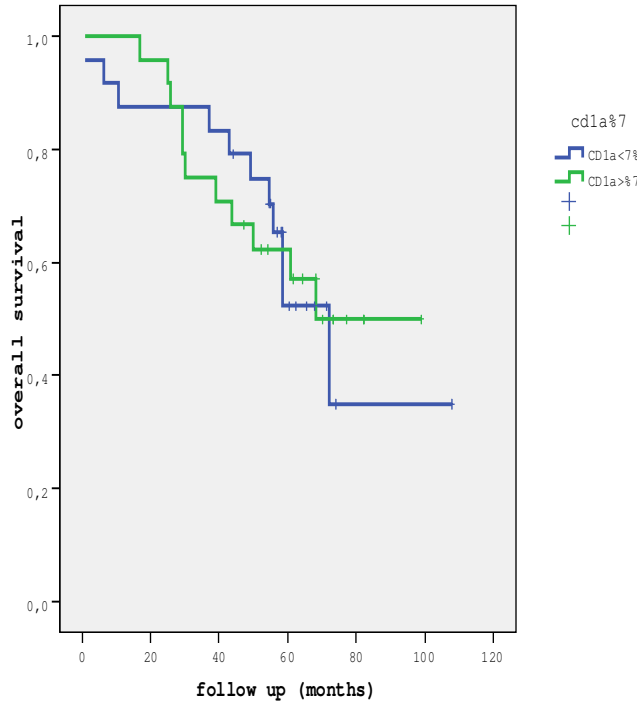
Tablo 19. CD1a ve Ki-67 ilişkisi (eşik değeri %20).

CD1a pozitivitesi görülen hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %58 iken , CD1a'sı negatif olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %48'dir. Oransal olarak CD1A (+) dendritik hücreler içeren hastalarda sağ kalımın daha yüksek olduğu saptanırken, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P= 0.73$).



Şekil 6. CD1a pozitivitesi ve total sağkalım ilişkisi.

Eşik değer median dendritik hücre sayısı olan 7 olarak alındığında, CD1a (+) hücre sayısı yüksek olan olgularda 5 yıllık sağ kalım %57 iken bu oran CD1a (+) hücre sayısı düşük veya negatif olanlarda %52 idi. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.89$).



Şekil 7. CD1a yüksekliği ve total sağkalım ilişkisi.

Beş yıllık hastalıksız sağ kalım oranları CD1a (+) olgular için %49, CD1a (-) olgular için %36 idi ($p=0.9$). Sınır CD1a pozitif hücre sayısı median değer olan 7 olarak kabul edildiğinde CD1a(+) hücre sayısı yüksek olan olgularda 5 yıllık sağ kalım oranı %49 olarak saptanırken, CD1a pozitif hücre sayısı düşük olan olgularda bu oran %41'dir. Sonuçlar oransal olarak ilişkili olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Ki67 proliferasyon indeksi %3 ile %95 arasında değişmekte olup ortalama %42.8 idi. Ki67 oranı olguların 34'ünde (%70.8) %20'nin üzerinde, %14'ünde (%29.2) ise %20 ve altında saptandı. Eşik değer %15 olarak kabul edildiğinde olguların 41'inde (%85.5) %15'nin üzerinde, 7'sinde (%14.5) ise %15 ve altında saptandı. Ki67 proliferasyon indeksi ile hasta yaşı, lenf gangliyonu durumu, tümör boyutu, nüks ve neoadjuvan durumu arasında belirgin ilişki saptanmadı.

Ki67 için sınır %15 ve %20 kabul edildiğinde her iki değerin de nükleer derece ile anlamlı ilişkili olduğu saptandı ($p<0.0001$).

			Ki67_%15		Total
			0	1	0
grad	2	Count	6	5	11
		% within Ki67_%15	85,7%	12,2%	22,9%
	3	Count	1	36	37
		% within Ki67_%15	14,3%	87,8%	77,1%
Total		Count	7	41	48
		% within Ki67_%15	100,0%	100,0%	100,0%

$p<0.0001$

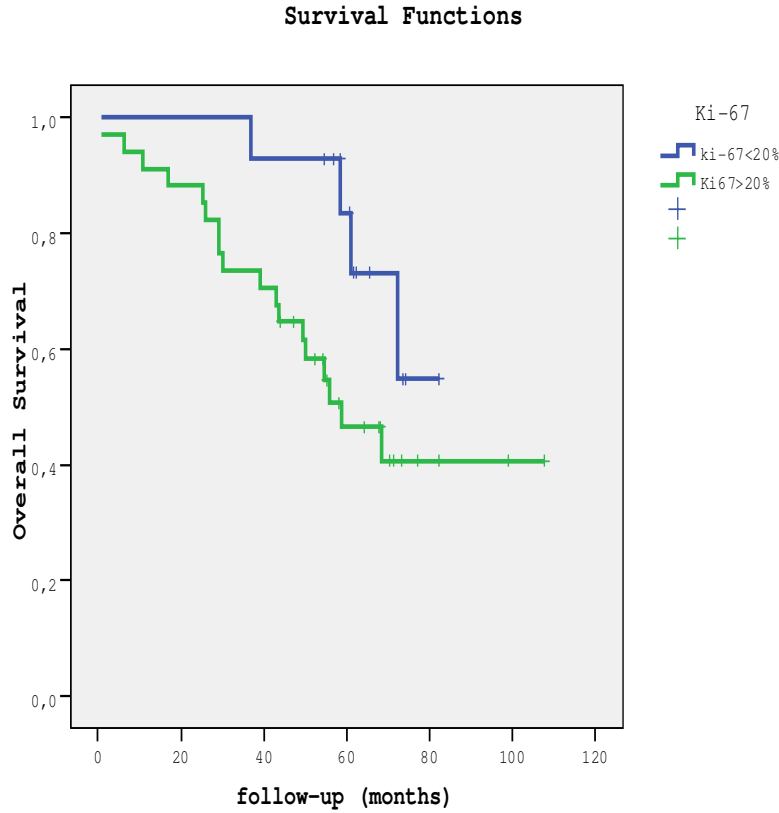
Tablo 20. KI-67 (%15) ve nükleer derece ilişkisi.

			Ki67_%20		Total
			0	1	0
grad	2	Count	8	3	11
		% within Ki67_%20	57,1%	8,8%	22,9%
	3	Count	6	31	37
		% within Ki67_%20	42,9%	91,2%	77,1%
Total		Count	14	34	48
		% within Ki67_%20	100,0%	100,0%	100,0%

$p<0.0001$

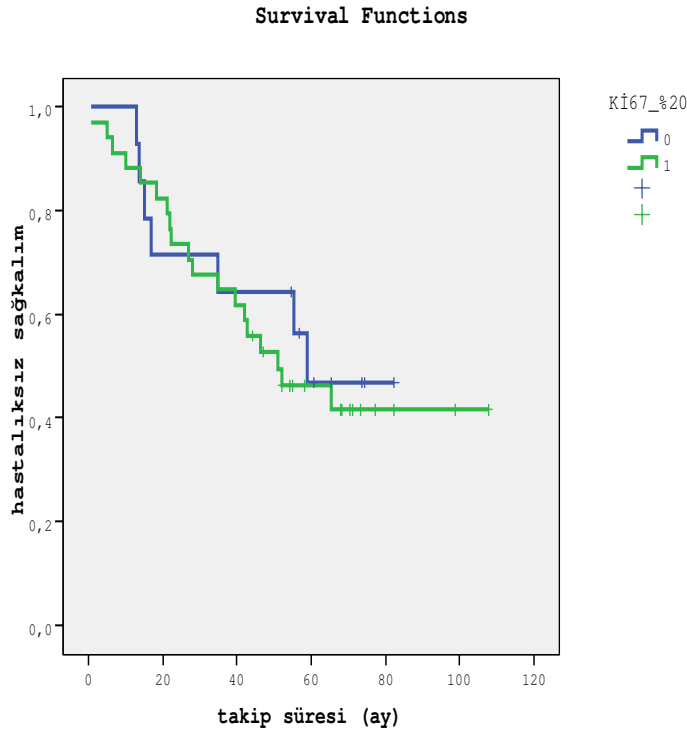
Tablo 21. KI-67 (%20) ve nükleer derece ilişkisi.

Beş yıllık genel sağkalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %83, %20'nin üstünde olan olgularda %47 idi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıya yakındı ($p=0.07$). Eşik değer %15 alındığında 5 yıllık genel sağ kalım Ki67'si %15'nin altında olan olgularda %68, %15'in üstünde olan tümörlerde %56'dır ($p=0.64$).



Şekil 8. Ki-67 (%20) ve total sağkalım ilişkisi.

Beş yıllık hastalıksız sağ kalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %47, %20'nin üstünde olanlarda %46 idi. Oranlar birbirine çok yakın olup istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0.67$). Beş yıllık hastalıksız sağ kalım Ki67'si %15'nin altında olan olgularda %54, %15'nin üstünde olanlarda %45 idi ($p=0.45$). Sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 9. Ki-67 (%20) ve hastalıksız sağkalım ilişkisi.

5 yıllık hastalıksız sağ kalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %47, %20'nin üstünde olanlarda %46 idi. Oranlar birbirine çok yakın olup istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0.67$).

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Bu çalışmada, immünohistokimya ya da in situ hibridizasyon yöntemiyle Her2 pozitifliği gösteren ve erken evre olmayan 48 olgu üzerinde araştırılma yapıldı. Bu anlamda çalışmaya alınan olgular tüm meme kansinimleri düşünöldüğünde özel bir alt grubu oluşturmaktadır. Çalışmamızın temel amacı, bu özel meme kansinomu alt grubunda trastuzumab içeren kemoterapiye yanıtı etkileme ve genel prognoz özellikleri açısından ileri değeriendirme yapmaktır. Bu nedenle Her3 gibi bu alt grupta kemoterapi direnci ile ilişkili olması olası bir molekülü, tümörü infiltrate eden dendritik hücre miktarını, dolayısıyla tümöre karşı oluşan immün yanıtın etkisini değeriendirmek amacıyla CD1a molekülünü kullandık. Bu özel meme kansinomu alt grubunda tümör hücre proliferasyonunun yüksek olduğu bilinmektedir. Buna rağmen bu gruptaki tümörlerin proliferasyon özelliklerinin kendi içlerindeki farklılıklarının prognoza ilişkisi değeriendirmek amacıyla da Ki-67 molekülünü kullandık.

Her3 ile ilgili yapılan çalışmalar genelinde farklı histolojik tiplerde ve farklı evrelerde, heterojen yapıdaki olgu popölasyonları üzerinde yapılmış, Her2 ile Her3 ilişkisi araştırılabilirse bile bizim yayınıımızda olduğu gibi tamamı Her2 (+) tümörlerden oluşan bir olgu grubu üzerinde çalışılmamıştır. Her2(+) ve (-) tümörlerden oluşan olgu serileri üzerinde yapılan çalışmalar Her2 ve Her3 ilişkisi açısından farklı sonuçlar vermişlerdir. Naidu (50), Travis (54) Her2 ve Her3 aşırı ekspresyonları arasında anlamlı ilişki saptamazken, Connie ve ark. Her3 ve Her2 aşırı ekspresyonunun korele olduğunu göstermişlerdir (73).

Geçmişte yapılan meme kansinimleri ile ilgili çalışmalarda Her3 boyanma yüzdesi geniş bir aralıkta dağılım göstermektedir. Travis ve ark 145'i ileri evre toplam 346 olgulu meme kansinomu serisinde Her3 ekspresyonunu araştırmış, tüm olguların %95'inde değışik oranda boyanma saptamıştır. Olguların %32'si zayıf, %48'i orta, %15'i kuvvetli boyanma göstermiştir. İleri evre meme kansinimlerinde ise boyanma oranının %99'a kuvvetli boyanma oranının ise %35'e çıktığı görölmüştür (54). Lemoine ve ark yine meme kansinomu dokularında yaptıkları çalışmada tümörlerin %22'sinde Her3 aşırı ekspresyonu saptamıştır (55). Naidu ve ark 104 meme kansinomu dokusunun %65'inde Her3 ile değışik oranlarda boyanma saptamıştır. Dokuların %54'ü kuvvetli, %11'i zayıf boyanma göstermiştir. İnvaziv duktal kansinimlerin %52'sinde kuvvetli, invaziv lobüler kansinimlerin %25'inde kuvvetli boyanma görölmüştür (50).

Bizim çalışmamızda 48 olgunun 23'ünde (%47.9) boyanma izlenmiştir. Boyanma yüzdesi 0-%90 arasında olup ortalama %16'dır. Çalışmamızda saptanan Her3 pozitifliği yüzdesi geçmişteki çalışmalarla kıyaslandığında biraz daha düşüktür. Bu sonuç çalışmaya aldığımız olguların özel bir grupta olması (Her2'si pozitif hastalar) olduğu gibi, çalışmalarda farklı tip antikor klonu kullanımı, immünohistokimyasal yöntem (antijen yeniden kazanımı, dilüsyon, inkübasyon) ve değerlendirme ile ilgili farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

EGFR ailesi reseptörlerinin daha çok membranöz boyanma göstermesi beklenmektedir. Bununla birlikte Her3'ün immünohistokimyasal yöntemle çalışıldığı yayınların hemen hepsinde membranözden çok sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Travis ve ark olguların sadece %1'inden azında membranöz boyanma saptamış, kalan olguların tamamında sitoplazmik boyanma olduğunu belirlemiştir. Sitoplazmik boyanmanın granüler ya da diffüz şekilde olduğu görülmüştür. Bu durumu ölçülen proteinin internalize edilmiş ve membranla ilişkisiz olabileceği ihtimali ile açıklamışlardır (54). Lemoine ve ark sadece olguların birinde membranöz, diğerlerinde ise sitoplazmik boyanma olduğunu görmüşlerdir (55). Naidu ve ark 104 meme karsinomu dokusunun hiçbirinde membranöz boyanma saptamamış, hepsinde sitoplazmik boyanma olduğunu görmüşlerdir (50).

Bizim çalışmamızda Naidu ve ark. çalışmasına benzer şekilde olguların tamamında sitoplazmik boyanma izlenmiş, membranöz boyanma görülmemiştir.

Temelde membran proteini olarak bilinen EGFR ailesi üyelerinin sitoplazma ve nükleus yerleşimleri de saptanmıştır. İmmortalize insan meme hücrelerinde ve meme karsinomu hücrelerinde Her3'ün sıklıkla nükleer yerleşimli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte nöroglin ve heregulin ligandlarına maruz kalınca nükleustan sitoplazma ve membrana geçiş yaptığı görülür (51,69). Prigent ve ark da Her3 proteininin büyük bölümünün sitoplazmada küçük gölcükler halinde olduğunu öne sürmüşler, sitoplazmik boyanmayı bu nedene bağlamışlardır (96).

Her3 ile farklı oranlarda boyanma gösteren tümörlerde boyanma şiddetleri de farklılık göstermektedir. Boyanma şiddetinin prognozla ilişkisini araştıran yayınlar da mevcuttur. Travis ve ark kötü prognozlu tiplerde daha çok orta ve kuvvetli boyanma saptarken, iyi prognozlu tiplerde daha zayıf boyanma olduğunu göstermişlerdir. Tümör boyutu 2 cm'den büyük olan olgularda daha kuvvetli boyanma izlenmiştir. Yine kuvvetli boyananlarda lokal nüksün daha yüksek olduğu görülmüştür (54).

Bizim çalışmamızda 11 olguda zayıf, 10 olguda orta, 2 olguda kuvvetli boyanma saptanmıştır. Boyanma yüzdesi ile boyanma kuvvetini birlikte değerlendirildiği Allred

skorlama sistemi kullanılmış, tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu ve sağkalım ile Her3 pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Her3 aşırı ekspresyonunun sağ kalım üzerindeki etkisi pek çok organ tümöründe incelenmiştir. Çalışmalar bizim çalışmamızdan farklı olarak sadece Her2'si (+) tümör grubu üzerinde değil daha heterojen bir olgu grubu üzerinde yapılmıştır. Ocana ve ark. (72) Her3 aşırı ekspresyonunun araştırıldığı 3 kolorektal karsinom (97, 98, 99), 2 gastrik karsinom (100-70), 2 meme karsinomu (101-102) ile melanom (103), over karsinomu (104), baş-boyun (61), pankreas (105) ve servikal (106) karsinomdan oluşan 12 makaleyi meta-analiz yöntemiyle değerlendirmiştir. Sonuç olarak 2 kolorektal karsinom çalışması hariç yayınların hepsinde Her3 aşırı ekspresyonu daha düşük 3 yıllık sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur. Travis ve ark Her3 aşırı ekspresyonu ile total ve hastalıksız sağ kalım arasında ilişki saptamamıştır (54). Lemoine ve ark sadece lenf gangliyonu tutulumu olan hastalarda Her3 aşırı ekspresyonunu sağ kalımla ilişkili bulmuştur (55). Connie ve ark 4046 hastada Her3 aşırı sentezini araştırmış, Her3'ün EGFR ve Her2'si negatif olan olgularda azalmış sağ kalımla belirgin ilişkili, bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir (73).

Çalışmamızdaki olguların tamamının Her2'si pozitif ve trastuzumab tedavisi gören olgular olduğu; Her3 pozitifliğini de tedavi direnci nedenlerinden biri olduğu gözönünde bulundurulduğunda Her3'ün azalmış sağ kalımla ilişkili olması beklenmektedir. Travis ve ark.'nın (54) çalışmasına benzer şekilde bizim çalışmamızda da Her3 pozitif ve negatif tümörlerde 5 yıllık total ve hastalıksız sağ kalım açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte sonuçlar oransal açıdan dikkat çekicidir. Her3 negatif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %62, Her3 pozitif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %53'tür. Her3 negatif olguların 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %51, Her3 pozitif olguların 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %40'tır. Oransal olarak belirgin ilişkinin istatistiksel olarak anlamsız çıkması olgu sayısının azlığına bağlı olabilir.

Her3 aşırı ekspresyonu ile meme karsinomlarındaki diğer prognostik faktörlerin karşılaştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur: Travis ve ark Her3 aşırı ekspresyonu ile yaş, tümör boyutu, reseptör durumu, tümörün derecesi, lenf gangliyonu durumu ve uzak metastaz arasında ilişki saptamamıştır (54). Lemoine ve ark sadece lenf gangliyonu tutulumu olan hastalarda Her3 aşırı ekspresyonunu tümör boyutu, evre ve tümör derecesi ile ilişkili olduğunu saptamıştır (55). Naidu ve ark Her3 aşırı ekspresyonu ile yaş, lenf gangliyonu durumu, reseptör durumu ile istatistiksel ilişki saptamamıştır ($p>0.05$). Bununla birlikte tümör derecesi ile anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0.05$). Östrojen reseptörü negatif olguların

%59'unda, lenf gangliyonu pozitif tümörlerin %63'ünde Her3 pozitifliği saptanmış, ancak her ikisi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (50). Gasparini ve ark Her3 pozitifliği ile yaş, histolojik derece, reseptör durumu arasında belirgin ilişki saptamamıştır (53). Connie ve ark Her3 aşırı ekspresyonunu ÖR negatifliği ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Ayrıca bu Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde histolojik derecenin daha yüksek olma eğiliminde olduğunu göstermişlerdir (73).

Bizim çalışmamızda Travis, Gasparini ve Naidu'nun (50,53,54) çalışmalarına benzer şekilde Her3 pozitifliği hasta yaşı, tümör boyutu ve reseptör durumu ile ilişkisiz bulunmuştur. Gasparini ve ark.'dan (53) farklı olarak, Connie ve ark.'nın (73) çalışmasına benzer şekilde Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde nükleer derece Her3 (-) tümörlere göre daha yüksek olarak belirlenmiştir ($p=0.02$). Benzer şekilde Her3(+) olgularda Her3(-) olgulara göre Ki67 proliferasyon indeksi daha yüksek olma eğilimindedir. Naidu ve Travis'ten (50,54) farklı olarak bizim çalışmamızda Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde Her3 (-) tümörlere göre lenf gangliyonu tutulumu daha yüksektir.

Kötü prognozla ilişkili olduğu düşünülen Her3'ün aşırı eksprese edildiği tümörlerde proliferasyon indeksinin ve nükleer derecenin yüksek olması ile artmış aksiler lenf gangliyonu tutulumu beklenen bir bulgudur.

Meme karsinomu dokularında CD1a pozitif immatür dendritik hücre varlığı ve yoğunluğu çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. Bell ve ark 32 meme karsinomu dokusuna CD1a ve Langerin uygulamış, olguların tamamında immatür dendritik hücre varlığını saptamışlardır. Dendritik hücre sayısının 10BBA'da 1 ile 48 adet arasında değiştiğini görmüşler, median değeri 7, ortalama değeri ise 12 adet bulmuşlardır (89). Coventry ve ark 30 adet invaziv duktal karsinom tanımlı frozen dokusunda CD1a (+) dendritik hücre dansitesini araştırmış, dokuların yarısında immatür dendritik hücre varlığını saptamışlardır ($0.00-6.05/1$ bba, $0.00-13.75/\text{mm}^2$ ortalama 2.49 hücre/ mm^2) (82). Coventry ve ark başka bir çalışmada 40 meme karsinomu dokusunda CD1a (+) dendritik hücre dansitesini araştırmış, yirmi olguda (%50) dendritik hücre varlığını saptamışlardır. Ortalama CD1a (+) hücre sayısı $5.5/ \text{mm}^2$ olarak belirlemiştir (91). Hillebrand ve ark 52 invaziv duktal karsinom dokusunun %84'ünde CD1a (+) dendritik hücre varlığını göstermişlerdir (83).

Bizim çalışmamızda 50 BBA'da CD1a pozitif dendritik hücreler sayılmış, Coventry ve ark. çalışmasına benzer şekilde olguların yaklaşık yarısında (%47.9) CD1a pozitif dendritik hücreler saptanmıştır. Ortalama CD1a pozitif hücre sayısı 16 median değer ise Bell ve ark (89) çalışmasına benzer şekilde 7 olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda immatür dendritik hücrelerin dağılım ve lokalizasyonlarına da bakılmış benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bell ve ark. CD1a (+) immatür dendritik hücrelerin tümör hücreleri ile yakın ilişkili olduklarını, CD83 (+) matür dendritik hücrelerin ise peritümöral alanda lenfosit toplulukları ile yakın ilişkili olduklarını göstermişlerdir (89). Coventry ve ark. CD1a(+) dendritik hücreleri tümör hücreleri arasındaki stromada gevşek topluluklar halinde saptamışlardır. İyi diferansiye tümörlerde ise duktal formasyonların etrafında toplandıklarını görmüşlerdir (91). Treilleux ve ark. 152 hastanın 1/3'ünde Langerin ve CD1a (+) hücreler tümör hücreleri ile sıkı ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (90). Hillebrand ve ark. tümöral alandaki CD1a (+) dendritik hücre sayısının non-tümöral alanlara göre daha fazla olduğunu saptamışlardır (83).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde CD1a pozitif dendritik hücreler tümör hücreleri ile iç içe yerleşimlidirler. Coventry ve ark.'nın çalışmalarının aksine tümöral alanlar arasındaki stromada balırgin dendritik hücre infiltrasyonu görülmemiştir. Tümör çevresi dokularda CD1a pozitif dendritik hücre izlenmemiştir. CD1a pozitif dendritik hücrelerin tümör hücreleri ile olan bu sıkı ilişkisi açıklayan bazı kaynaklar mevcuttur. Kradin ve ark granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktörün (GM-CSF) ve IL-2'nin dendritik hücreleri tümöral alana migrasyonunu uyardığını saptamışlardır (107).

CD1a pozitif dendritik hücrelerin genel ve hastalıksız sağ kalım üzerindeki etkisi pek çok tümör tipinde daha iyi prognozla ilişkili bulunmuş, meme karsinomlarında ise oransal olarak ilişkili ancak istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar elde edilmiştir. Coventry ve ark 48 olgu üzerinde (42 invaziv duktal karsinom ve 6 in-situ duktal karsinom) CD1a (+) hücre yoğunluğu ve 5 yıllık sağ kalım ilişkisini araştırmışlar, CD1a (+) yoğunluğu düşük olanlarda ölüm oranı %32 iken, CD1a (+) yoğunluğu yüksek olanlarda bu oranın %18 olduğunu saptamışlardır. Buna karşın CD1a pozitivitesi ile 5 yıllık sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($P=0.331$) (82). Treilleux ve ark 152 non-metastatik primer meme karsinomunda CD1a dansitesi ile total ve hastalıksız sağ kalım arasında belirgin ilişki saptamamıştır, ancak matür CD208/DC-Lamp dendritik hücre pozitivitesi ile CD3(+) T hücre infiltrasyonu, tümör derecesi ve lenf gangliyonu durumunun kuvvetle korele olduğunu belirlemişlerdir (90). Diğer pek çok tümör tipinde immatür dendritik hücre sayısının iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Furukowa ve ark (108) akciğer adenokarsinomlarında, Ambe ve ark (109) kolorektal karsinomlarda, Goldman ve ark (88) dil karsinomlarında, Tsujitani ve ark (85) gastrik karsinomlarda bu ilişkiyi göstermişlerdir. Eisenthal ve ark (110) CD1a (+) dendritik hücre yoğunluğunun ovaryan karsinom

rekürrensini azalttığını göstermişlerdir. Lewko (111), Lespagnard (112) ve Iwamoto (113) ise meme karsinomlarında immatür dendritik hücrelerin prognoza etkisini araştırmış ancak anlamlı bir ilişki saptamamışlardır. Iwamoto (113) CD83 (+) matür dendritik hücreleri klinik gidişle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Bizim çalışmamızda CD1a pozitivitesi görülen hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %58 iken , CD1a'sı negatif olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %48'dir. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p= 0.73$) oransal olarak CD1a pozitif tümörlerde 5 yıllık sağ kalım daha yüksektir. Benzer durum eşik değer 7 olarak alındığında dendritik hücre sayısı yüksek olan tümörler için de geçerlidir.

Çalışmamızda hastalısız sağ kalım açısından bakıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p= 0.9$) oransal olarak CD1a pozitif tümörlerde 5 yıllık hastalısız sağ kalım daha yüksektir. CD1a pozitif dendritik hücre içeren tümörlerde 5 yıllık hastalısız sağ kalım oranı %49 iken CD1a negatif olan tümörlerde %36'dır. Benzer durum eşik değer 7 olarak alındığında dendritik hücre sayısı yüksek olan tümörler için de geçerlidir.

Yayınlarda CD83 (+) matür dendritik hücre yoğunlu ve varlığı sağ kalımı olumlu yönde etkilerken CD1a(+) immatür dendritik hücre varlığının sağ kalıma olumlu etkisi istatistiksel olarak gösterilememektedir. Bu durum meme karsinomlarında immatür hücrelerin matürasyonunda bir sorun olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Bununla ilgili tümör hücreleri ve tümör mikroçevresinden salınan birtakım medyatörler sorumlu tutulmaktadır. Kradin ve ark tümöral hücrelerden salınan IL-10'un da, CD1a (+) immatür dendritik hücreleri inaktive ettiğini öne sürmüşlerdir (107). Inoshima ve ark ise tümöral hücrelerden salınan vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) dendritik hücrelerin matürasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (80). Gabrilovich ve ark da Inoshima gibi VEGF'nin dendritik hücrelerin matürasyonunu ve fonksiyonlarını inaktive ettiğini belirlemişlerdir (79).

CD1a pozitif immatür hücre varlığı ve yoğunluğu ile prognostik faktörlerin ilişkisini araştıran yayınlar da mevcuttur. Coventry ve ark CD1a(+) hücre sayısı ile tümör boyutu, derecesi, lenf gangliyonu tutulumu, metastaz ve lenfovasküler invazyon arasında belirgin ilişki saptamamıştır (82). Hillebrand ve ark da tm derecesi ve CD1a(+) hücre sayısı arasında belirgin ilişki saptamamıştır (83).

Bizim çalışmamızda Coventry ve ark. çalışmasına benzer şekilde CD1a (+) immatür dendritik hücre varlığı ve sayısıyla, tümör boyutu ve aksiler lenf gangliyonu metastazı arasında belirgin ilişki saptanmamıştır. Ancak diğer yayınlardan farklı olarak nükleer derecesi yüksek olan olgularda CD1a pozitivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır

($p=0.01$). Benzer şekilde Ki67 proliferasyon indeksinin yüksek olduğu tümörlerde CD1a pozitivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Nükleer derecesi ve çoğalma hızı yüksek tümörlerde immatür dendritik hücre sayısının daha fazla olması bu tip tümörlerde dendritik hücre migrasyonunu uyaran kemokinlerin (GM-CSF ve IL-2) yüksek miktarda salınmasına bağlı olabilir.

Mitoz sayısı tümörün derecelendirilmesinde kullanılan önemli bir parametredir. DNA-flow sitometri ile S-faz fraksiyonu ölçümü ve PCR metodları ile de tümör hücre proliferasyonu gösterilebilir. Tümörün proliferatif kapasitesini göstermede kullanılan yöntemlerden birisi de Ki-67 non-histon proteini ölçümüdür (1). Bugüne kadar meme karsinomlu olgularda Ki67 proliferasyon indeksinin sağ kalımla ilişkisi, prognostik faktörler ile ilişkisini araştıran pek çok makale yayınlanmıştır. Wrba ve ark (114) Ki67 proliferasyon indeksini lenf nodu tutulumu ve tümör boyutu ile, Sahin ve ark (115) hasta yaşı ile, Veronese ve ark (116) tümör boyutu, hormon reseptör durumu ile, Veronese ve ark (117) başka bir çalışmada hastalıksız ve total sağ kalım ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında ilişki saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda Ki67 proliferasyon indeksi tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu ve nüks durumu ile ilişkisiz bulunmuştur. Ki67'si yüksek olan olgularda nükleer derecenin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.0001$). Beş yıllık genel sağ kalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %83, %20'nin üstünde olan tümörlerde %47'dir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmaya yakındır ($p=0.07$). Sağkalımla ilişkinin anlamlılığının düşük olması hasta sayısının azlığına bağlanmıştır. Buna rağmen genelde yüksek dereceli olduğu bilinen bu özel meme karsinomu alt grubunda da Ki67 proliferasyon derecesinin prognostik değeri olabileceği anlaşılmaktadır.

Her3 ün kötü prognostik etkisi pek çok tümör tipinde gösterilmiş olup, meme karsinomlarındaki sağ kalıma etkisi halen tartışılmaktadır. Meme karsinomlarında Her3 aşırı ekspresyonunun azalmış sağ kalım ile ilişkili olduğu sonucuna varılan çalışmalarda bizim çalışmamıza göre daha heterojen olgu serileri kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda olgu grubunu Her2'si pozitif hastalar oluşturmaktadır. Meme karsinomlarının sadece %25-30'unu Her2 (+) meme karsinomlarının oluşturduğu düşünülürse çalışmanın oldukça spesifik ve homojen bir hasta grubu üzerinde yapıldığı söylenebilir. Olumsuz bir prognostik faktör olan Her2 pozitifliği ve olgu grubunun erken evrede olmayan hastalardan oluşması nedeniyle çalışma sağ kalımın daha az olması beklenen homojen bir olgu grubu üzerinde yapılmıştır. Bu nedenle Her3, CD1a ve Ki-67 immünohistokimyasal boyaları ile sağkalım arasındaki ilişki

oransal olarak anlamlı ancak istatistiksel olarak anlamsızdır. Anlamlı sonuçlar elde edebilmek için daha fazla sayıda olgu üzerinde çalışma yapmak ya da olgu grubunu oluştururken prognostik özellikleri açısından heterojen olgular seçmek gerekmektedir. Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler ile bu alt grupta daha büyük bir hasta sayısı ile yeniden değerlendirme yapmaya değer bir durumun söz konusu olduğu söylenebilir.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR:

- 1) Çalışmaya alınan olguların tamamı Her2 aşırı ekspresyonu saptanan ve trastuzumab tedavisi alan olgulardan oluşmaktadır.
- 2) Çalışmaya alınan hastaların tümü kadın olup medyan yaş 52 (30-80 yıl) olarak saptanmıştır. Hastalardan 43'ü (%89.5) invaziv duktal karsinom, 2'si (%4.16) invaziv lobüler karsinom, 3'ü de invaziv duktal ve invaziv lobüler karsinom ikili kombine tip (%6.25) tanılıdır.
- 3) Her3 pozitifliği 48 olgunun 23'ünde (%47.9) izlenmiştir. Boyanma yüzdesi 0-%90 arasında olup ortalama %16'dır. Olguların tamamında sitoplazmik boyanma izlenmiş, membranöz boyanma görülmemiştir.
- 4) Her3 ile 11 olguda zayıf, 10 olguda orta, 2 olguda kuvvetli boyanma saptanmıştır. Boyanma yüzdesi ile boyanma kuvvetini birlikte değerlendirildiği Allred skorlama sistemi kullanılmış, tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu ve sağ kalım ile her3 varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- 5) Her3 pozitif ve negatif tümörlerde 5 yıllık total ve hastalıksız sağ kalım açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte sonuçlar oransal açıdan dikkat çekicidir. Her3 negatif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %62, Her3 pozitif olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %53'tür. Her3 negatif olguların 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %51, Her3 pozitif olguların 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %40'tır. Oransal olarak belirgin ilişkinin istatistiksel olarak anlamsız çıkması olgu sayısının azlığına bağlı olduğu düşünülmüştür.
- 6) Her3 pozitifliği hasta yaşı, tümör boyutu ve reseptör durumu ile ilişkisiz bulunmuştur.
- 7) Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde nükleer derece Her3 (-) tümörlere göre daha yüksek olarak belirlenmiştir ($p=0.02$).
- 8) Her3(+) olgularda Her3(-) olgulara göre Ki67 proliferasyon indeksi daha yüksek olma eğilimindedir ($p=0.05$).
- 9) Her3 aşırı eksprese eden tümörlerde Her3 (-) tümörlere göre lenf gangliyonu tutulumu daha yüksektir.
- 10) Olguların yaklaşık yarısında (%47.9) CD1a pozitif dendritik hücreler saptanmıştır. Ortalama CD1a pozitif hücre sayısı 16 median değer ise 7 olarak belirlenmiştir.

11) CD1a pozitif dendritik hücreler tümör hücreleri ile iç içe yerleşimlidirler. Tümör çevresi dokularda CD1a pozitif dendritik hücre izlenmemiştir.

12) CD1a pozitivitesi görülen hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %58 iken , CD1a'sı negatif olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %48'dir. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p= 0.73$) oransal olarak CD1a pozitif tümörlerde 5 yıllık sağ kalım daha yüksektir. Benzer durum eşik değer 7 olarak alındığında dendritik hücre sayısı yüksek olan tümörler için de geçerlidir. Bu durumun olgu sayısının yetersiz olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

13) Hastaliksız sağ kalım açısından bakıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p= 0.9$) oransal olarak CD1a pozitif tümörlerde 5 yıllık hastaliksız sağ kalım daha yüksektir. CD1a pozitif dendritik hücre içeren tümörlerde 5 yıllık hastaliksız sağ kalım oranı %49 iken CD1a negatif olan tümörlerde %36'dır. Benzer durum eşik değer 7 olarak alındığında dendritik hücre sayısı yüksek olan tümörler için de geçerlidir.

14) CD1a (+) immatür dendritik hücre varlığı ve sayısı, tümör boyutu ve aksiler lenf gangliyonu metastazı arasında belirgin ilişki saptanmamıştır.

15) Nükleer derecesi yüksek olan olgularda CD1a pozitivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p=0.01$).

16) Ki67 proliferasyon indeksinin yüksek olduğu tümörlerde CD1a pozitivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.02$)

17) Ki67 proliferasyon indeksi tümör boyutu, lenf gangliyonu tutulumu ve nüks durumu ile ilişkisiz bulunmuştur.

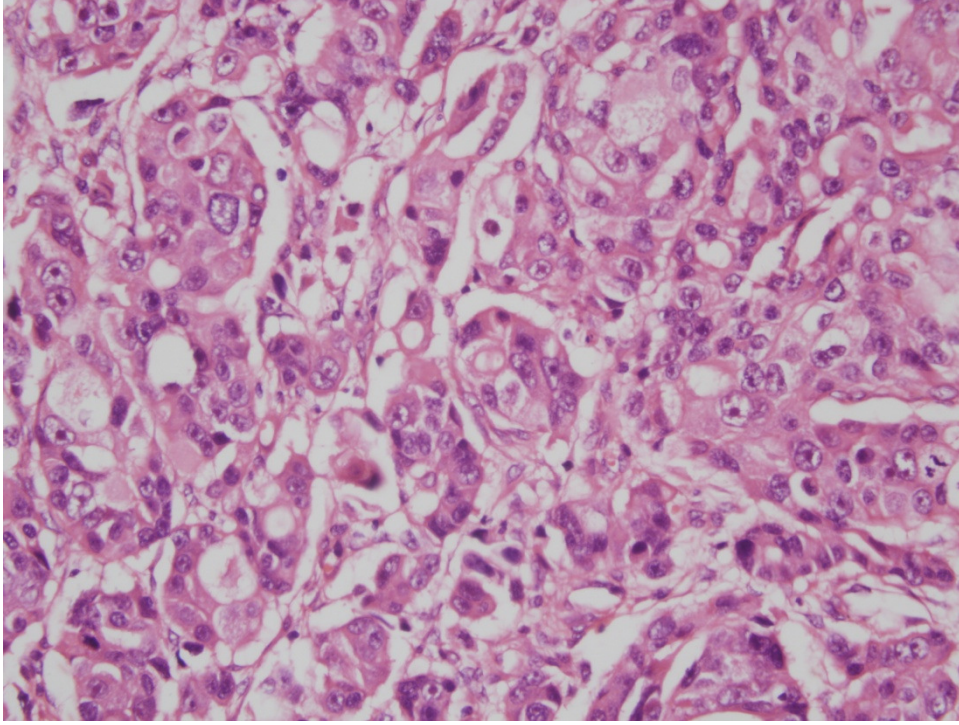
18) Ki67'si yüksek olan olgularda nükleer derecenin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.0001$).

19) Beş yıllık genel sağkalım Ki67'si %20'nin altında olan olgularda %83, %20'nin üstünde olan tümörlerde %47'dir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmaya yakındır ($p=0.07$).

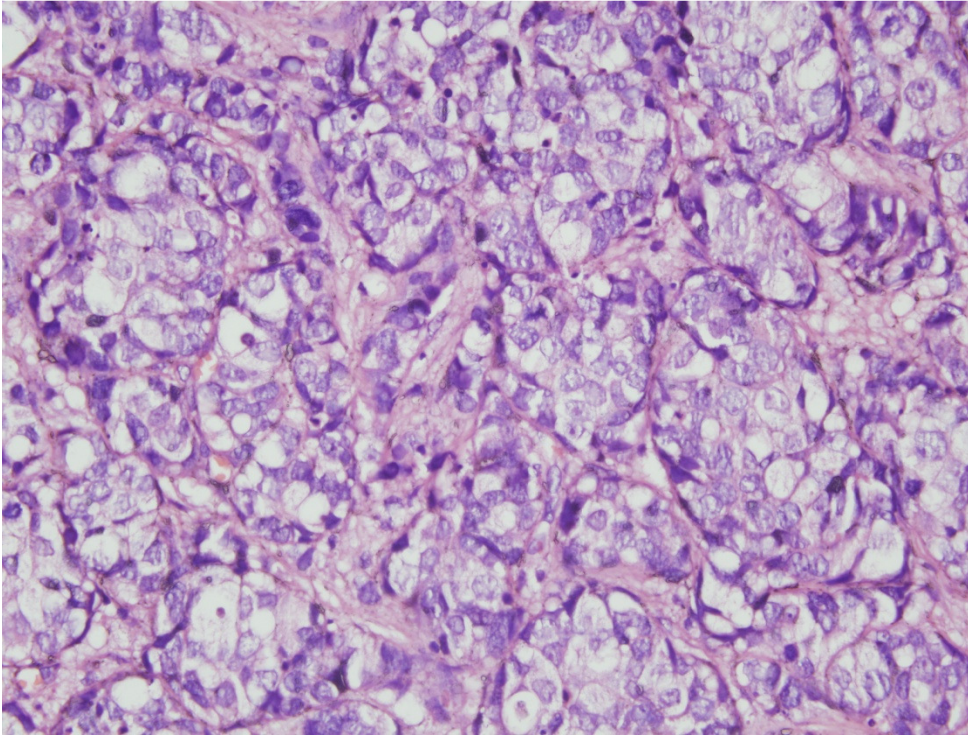
20) Her3, CD1a ve Ki-67 immünohistokimyasal boyaları ile sağ kalım arasındaki ilişki oransal olarak anlamlı ancak istatistiksel olarak anlamsızdır. Anlamlı sonuçlar elde edebilmek için daha fazla sayıda olgu üzerinde çalışma yapmak ya da olgu grubunu oluştururken prognostik özellikleri açısından heterojen olgular seçmek gerekmektedir. Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler ile bu alt grupta daha büyük bir hasta sayısı ile yeniden değerlendirme yapmaya değer bir durumun söz konusu olduğu söylenebilir.

BÖLÜM VII

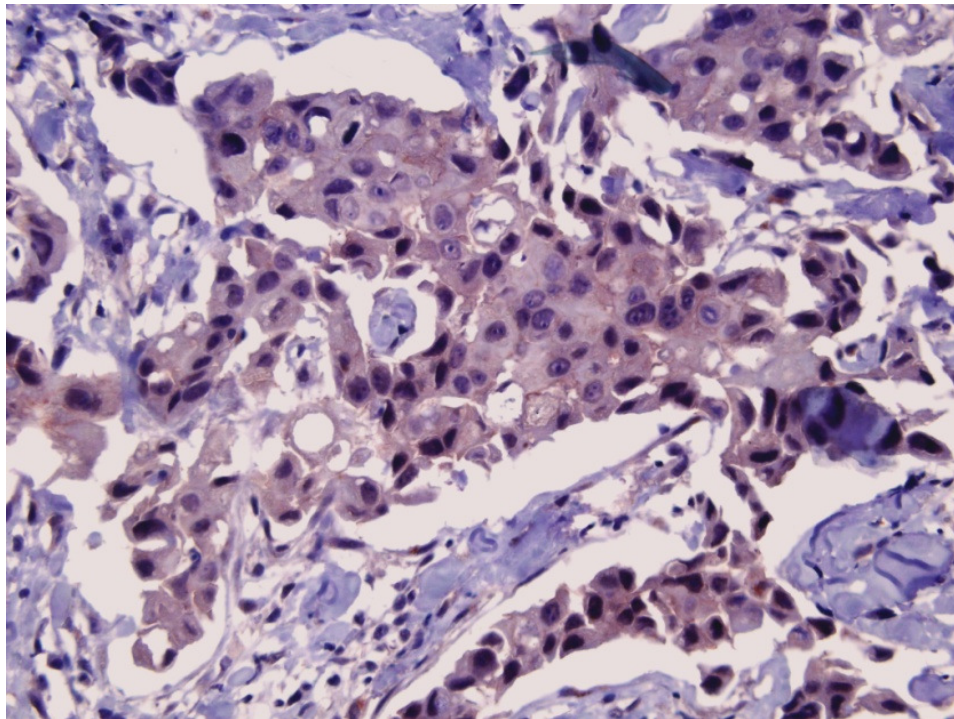
I-RESİMLER



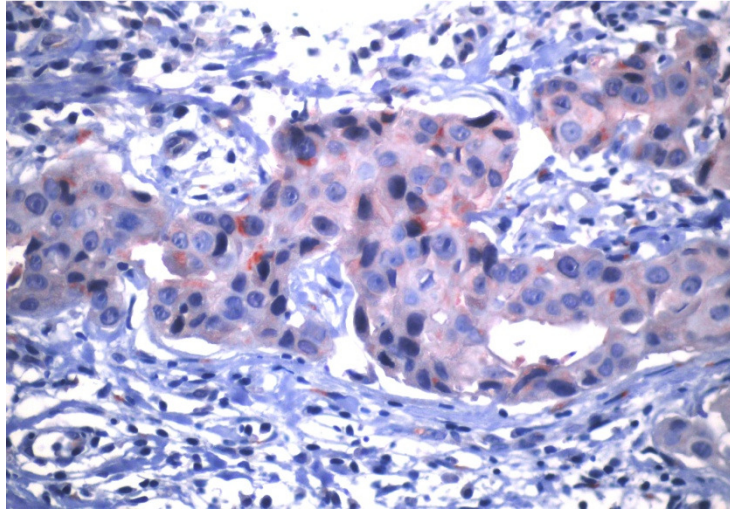
Resim 1. İnvaziv duktal karsinom (Prot no:9509-07 HEx40)



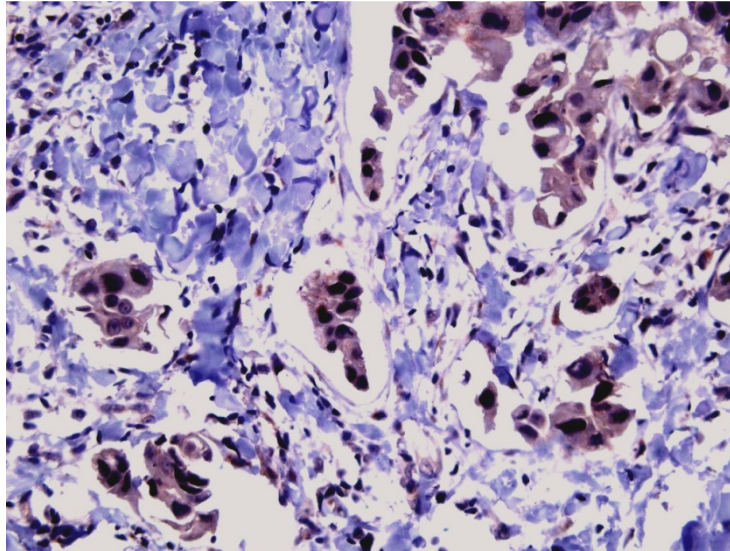
Resim 2. İnvaziv duktal karsinom (Prot no: 580-07 HEx40)



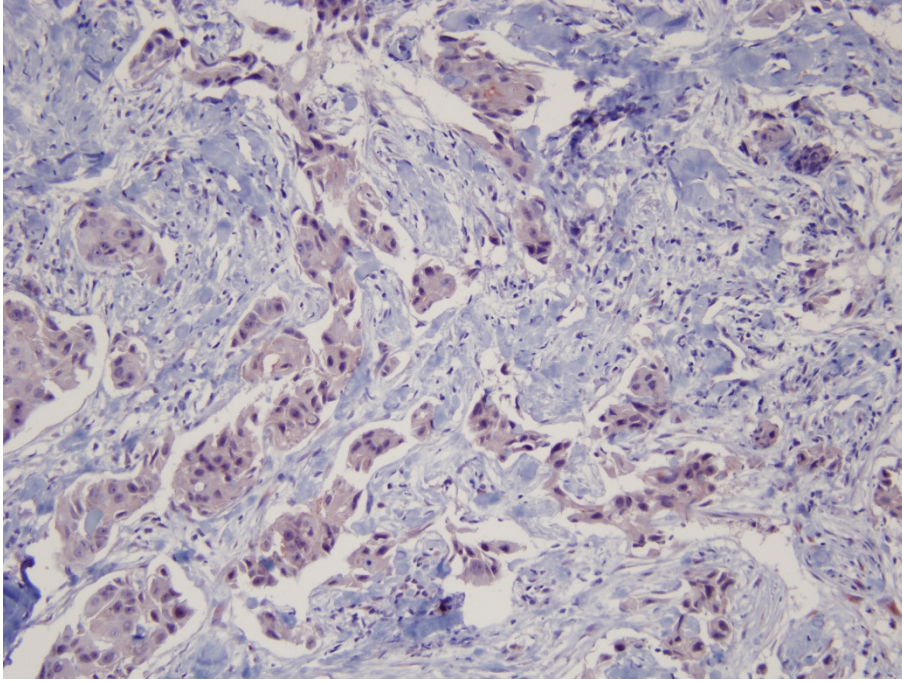
Resim 3. HER3 ile kuvvetli boyanma (prot no:32576-07-x40).



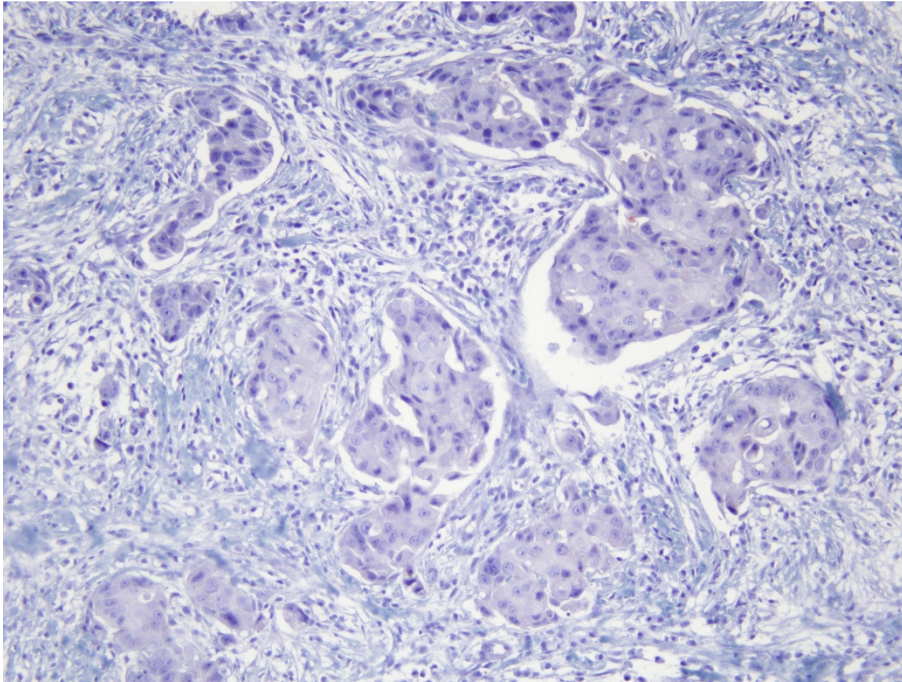
Resim 4. HER3 ile kuvvetli boyanma (prot no:28437-03-x100)



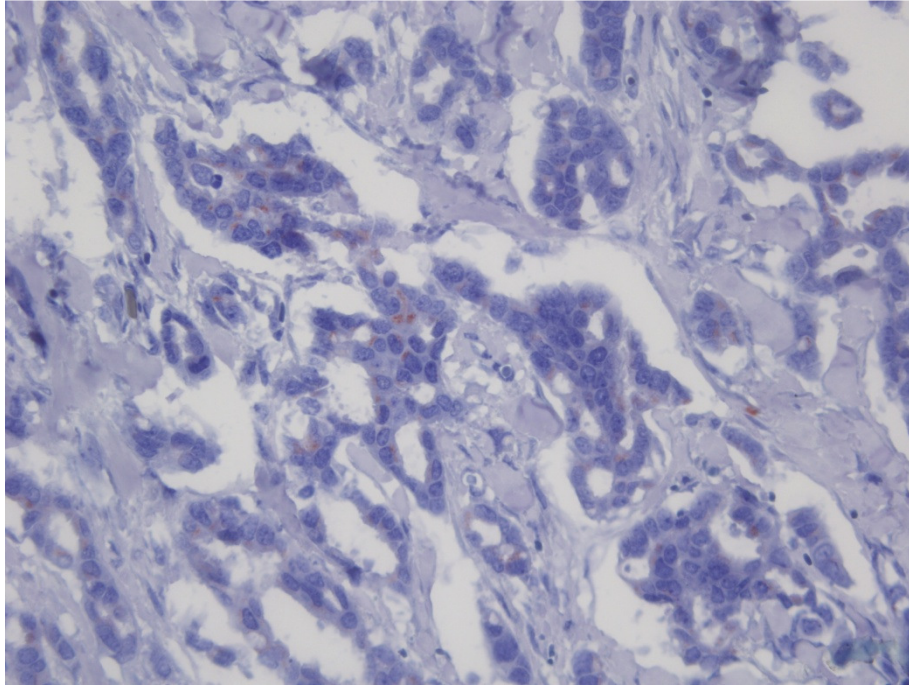
Resim 5. HER3 ile kuvvetli boyanma (prot no:32576-07-x40).



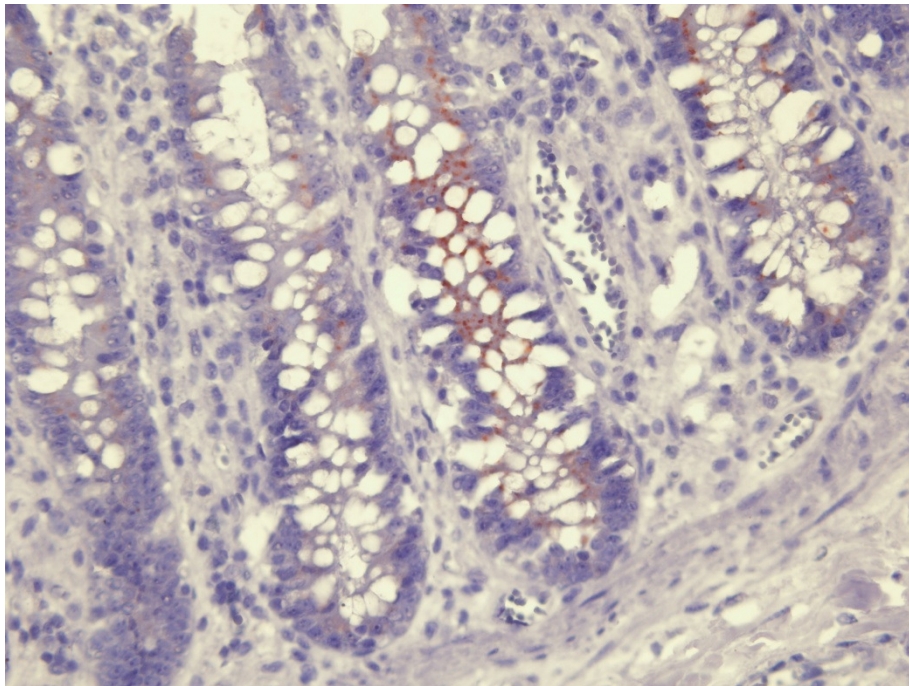
Resim 6. HER3 ile orta şiddette pozitivite (prot no:17015-08-x20)



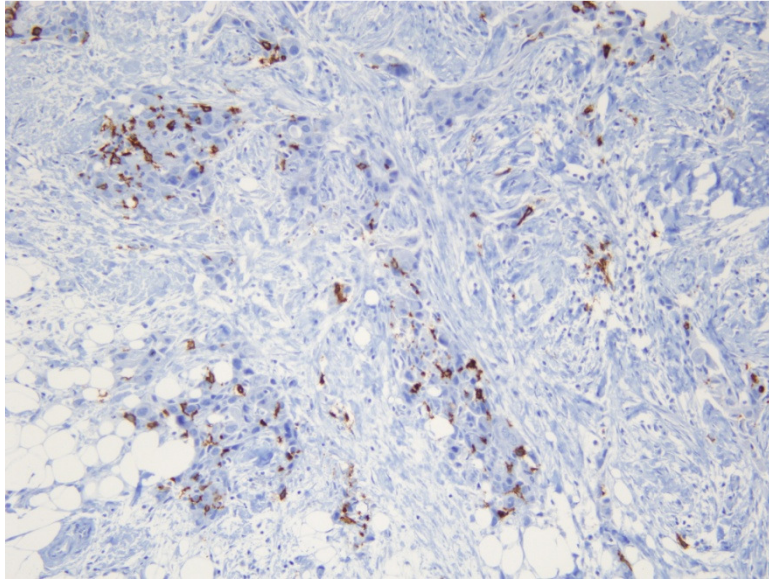
Resim 7. HER3 ile zayıf- negatif boyanma (prot no:8524-09-x20)



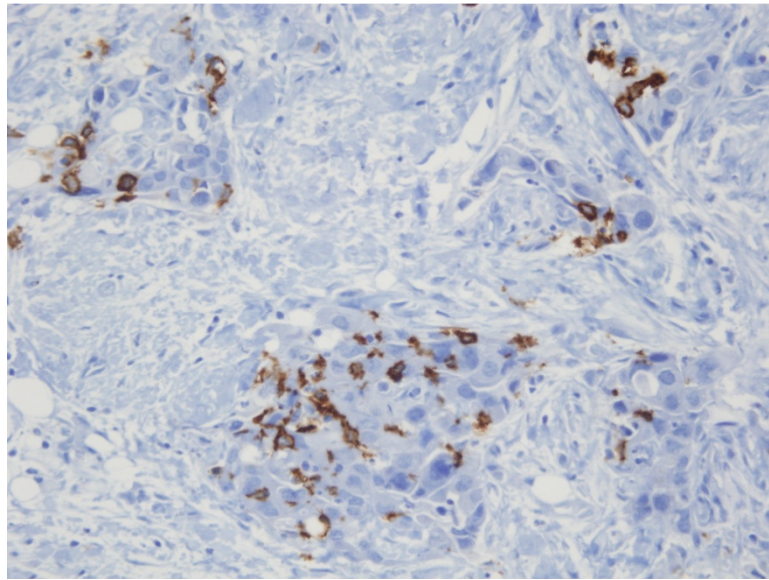
Resim 8. HER3 ile negatif boyanma (prot no:19682-09-x40).



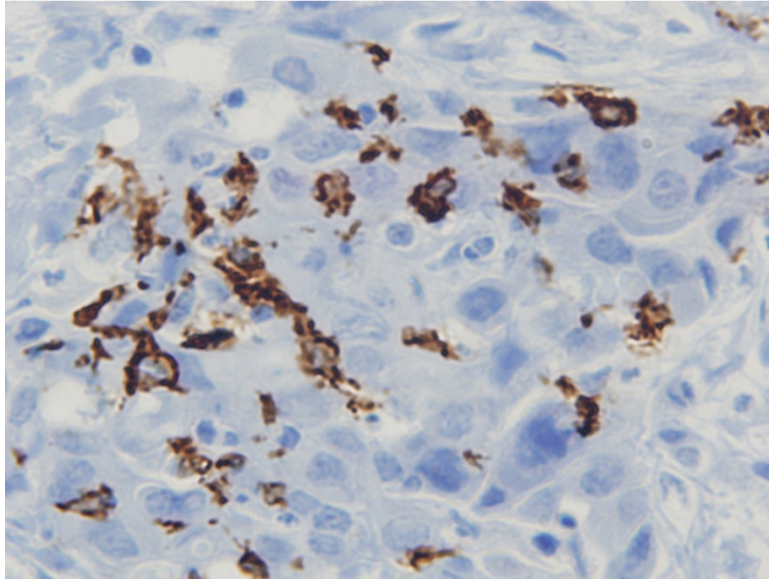
Resim 9. Kontrol dokusu olan kolon epitelinde HER3 boyanması (x40).



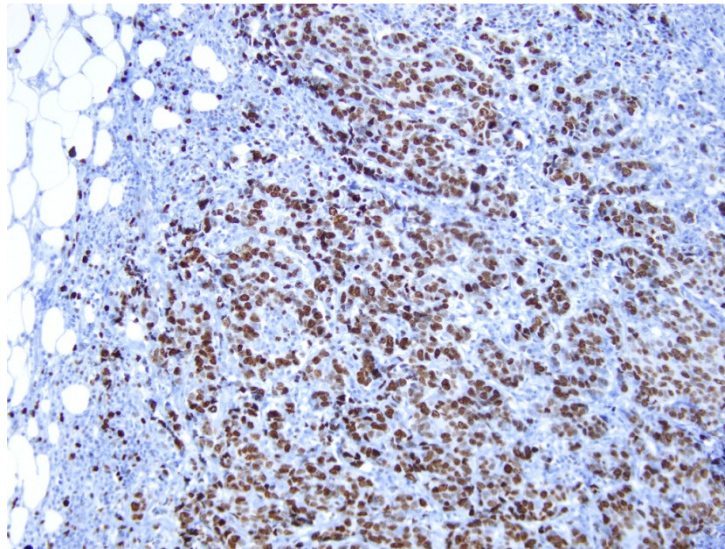
Resim 10. Tümör hücre grupları içerisinde CD1a pozitif dendritik hücreler (prot no:13241-09-x20)



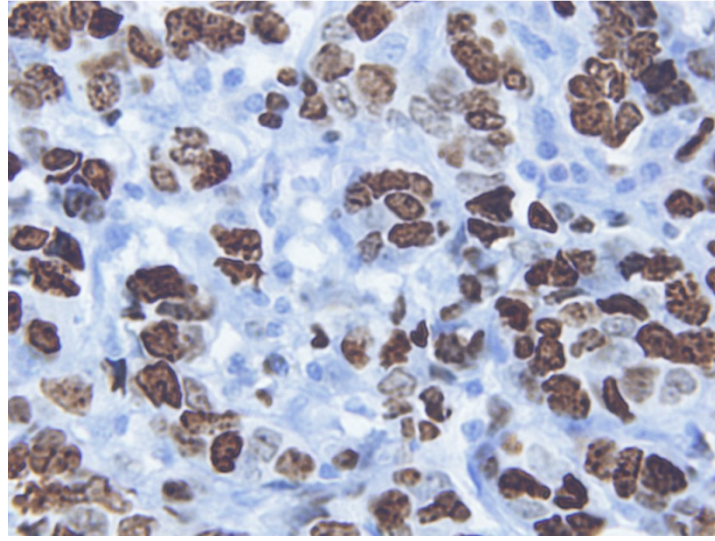
Resim 11. Tümör hücre grupları içerisinde CD1a pozitif dendritik hücreler (prot no:13241-09-x40)



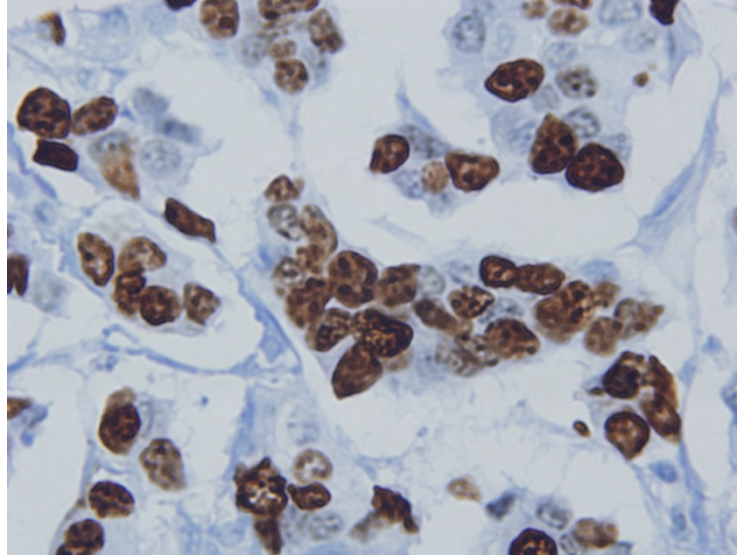
Resim 12. Tümör hücre grupları içerisinde CD1a pozitif dendritik hücreler (prot no:13241-09-x100)



Resim 13. Ki-67 ile boyanma (prot no:14224-05-x20)



Resim 14. Kİ-67 ile boyanma (prot no:14224-05-x40)



Resim 15. Kİ-67 ile boyanma (prot no:14224-05-x100)

KAYNAKLAR

- 1.Tavassoli A, Devilee P, World Health Organisation Classification of Tumours, Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC pres; 2012
2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures: 2011.
3. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı-Türkiye kanser istatistikleri, belgeler 2008

4. Kumar V, Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease-8th ed. Philadelphia: 2010
5. Tavassoli A, Pathology Of The Breast-2nd ed. Stamford, Connecticut: 1999
6. Boecker W, Preneoplasia Of The Breast-a New Conceptual Approach to Proliferative Breast Disease. Elsevier: 2006
7. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
8. Singletary E, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20no:17 3628-3636.
9. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
10. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast cancer research* 2006; 8:216
11. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;11:174-83.
12. Rosen PP, Rosen's Breast Pathology, 3rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins: 2009
13. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The oncologist* 2008;14: 320–68.
14. Rosai J, Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th Ed. Elsevier: 2011
15. Özdemir D, Pak I. C-erbB-2 Skor 2 Olan Meme Karsinomlarında HER-2 Amplifikasyonu ve Prognostik Etkinliği. *Türk Patoloji Dergisi* 2010;26:140–146.
16. Saxena R, Dwivedi A. ErbB Family Receptor Inhibitors as Therapeutic Agents in Breast Cancer□: Current Status and Future Clinical Perspective. *Medicinal research reviews* 2011;32:166–215.
17. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:10869–74.
18. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast cancer research* 2011;13: 221.

19. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 2012;38:698-707.
20. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years. *The Lancet* 2000;355:1822.
21. MacGregor JJ, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews* 1998; 50:151–96.
22. Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *British journal of cancer* 2007;97:453–7.
23. Foley J, Nickerson N, Nam S, Allen KT, Jennifer L, Nephew KP, Ii DJR. EGFR Signaling in Breast Cancer: Bad to the Bone. *Seminars in cell & developmental biology* 2010;21:951–960.
24. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
25. Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *American journal of clinical pathology* 2008;129:263–73.
26. 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;235:177-82.
27. Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Pathology research international* 2011; 903202.
28. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1120-8.
29. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sävje-Söderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-56
30. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*. 1994 May 5;330(18):1260-6.
31. Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 Status With Estrogen and Progesterone Receptors and Histologic Features in 3,655 Invasive Breast Carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology* 2005;123: 541-546.
32. Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, et al. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *British journal of cancer* 1992;65:118-21.

33. Berry DA, Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G, et al. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:3471-9.
34. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology* □: official journal of the European Society for Medical Oncology 2010;21 Suppl 7:vii36-40.
35. Alimandi M, Wang LM, Bottaro D, Lee CC, Kuo A, Frankel M, et al. Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *The EMBO journal* 1997;16:5608-17.
36. Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *The EMBO journal* 1999;18:2149-64.
37. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 1995;10:1813-21.
38. Hudelist G, Singer CF, Manavi M, Pischinger K, Kubista E, Czerwenka K. Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:353-61.
39. Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, Gilks B, Yorida E, Cheang M, et al. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer* 2005;103:1770-7.
40. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. Guideline Summary □: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practise Guideline Update. *American Society of Clinical Oncology* 2013;25:118-145.
41. Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in oncology* 2012;62.
42. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2000;344:783-92.
43. Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-related cancer* 2002;9:75-85.
44. Dokmanovic M, Wu WJ. Trastuzumab-Resistance and Breast Cancer. *Breast Cancer – Carcinogenesis, Cell Growth and Signaling Pathways* 2011:171-204
45. Arteaga CL. Trastuzumab , an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer, *Breast Cancer Res* 2003;5:96-100.

46. Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast cancer research* 2006;8;215.
47. Shojaei S, Gardaneh M, Rahimi Shamabadi A. Target points in trastuzumab resistance. *Int J Breast Cancer* 2012;2012:761917.
48. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical cancer research*: an official journal of the American Association for Cancer Research 2009;15:7479-7491.
49. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86:9193-7.
50. Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty MK. Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *British journal of cancer* 1998;78:1385-90.
51. Jiang N, Saba NF, Chen ZG. Advances in Targeting HER3 as an Anticancer Therapy. *Chemotherapy research and practice* 2012;817304.
52. Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:7692-7.
53. Gasparini G, Gullick WJ, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Leonardi E, et al. C-erbB-3 and c-erbB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma--an immunocytochemical study. *Eur J Cancer* 1994;30A:16-22.
54. Travis A, Pinder SE, Robertson JF, Bell JA, Wencyk P, Gullick WJ, et al. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *British journal of cancer* 1996;74:229-33.
55. Lemoine NR, Lobresco M, Leung H, Barton C, Hughes CM, Prigent SA, et al. The erbB-3 gene in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1992;168:269-73.
56. Sanidas EE, Filipe MI, Linehan J, Lemoine NR, Gullick WJ, Rajkumar T, et al. Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer. *Int J Cancer* 1993;54:935-40.
57. Hunt CR, Hale RJ, Armstrong C, Rajkumar T, Gullick WJ, Buckley CH. C-erbB-3 proto-oncogene expression in uterine cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 1995;5:282-285.
58. Poller DN, Spendlove I, Baker C, Church R, Ellis IO, Plowman GD, et al. Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas. *J Pathol* 1992;168:275-80.

59. Rajkumar T, Stamp GW, Pandha HS, Waxman J, Gullick WJ. Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB2 and c-erbB3 in bladder cancer. *J Pathol* 1996;179:381-5.
60. Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Correlation C. Expression of Metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 Genes in Ovarian Carcinomas: Correlation with Clinicopathology , EGFR , c- erb B-2 , and c- erb B-3 Genes , and Sex Steroid Receptor Expression. *Cancer Res* 1994;54:1825-30.
61. Takikita M, Xie R, Chung JY, Cho H, Ylaya K, Hong SM, et al. Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of translational medicine* 2011; 9:126.
62. Trocmé E, Mougiakakos D, Johansson CC, All-Eriksson C, Economou MA, Larsson O, et al. Nuclear HER3 is associated with favorable overall survival in uveal melanoma. *Int J Cancer* 2012;130:1120-7.
63. Hynes NE, Dey JH. PI3K inhibition overcomes trastuzumab resistance: blockade of ErbB2/ErbB3 is not always enough. *Cancer cell* 2009;15:353-5.
64. Chakrabarty A, Rexer BN, Wang SE, Cook RS, Engelman JA, Arteaga CL. H1047R phosphatidylinositol 3-kinase mutant enhances HER2-mediated transformation by heregulin production and activation of HER3. *Oncogene* 2010;29:5193-203.
65. Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 2004;23:646-53.
66. Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445:437-41.
67. Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, et al. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:717-27.
68. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y.)* 2007;316:1039-43.
69. Menendez JA, Lupu R. Transphosphorylation of kinase-dead HER3 and breast cancer progression: a new standpoint or an old concept revisited? *Breast Cancer Res* 2007;9:111.
70. Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JHTG, Nonogaki S, Montagnini AL, Da Costa WL, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29:3030-6.

71. Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C, Lessard L, Gleave M, Bégin LR, et al. Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clinical cancer research*: an official journal of the American Association for Cancer Research 2006;12:2730-7.
72. Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E. HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:266-73.
73. Chiu CG, Masoudi H, Leung S, Voduc DK, Gilks B, Huntsman DG, et al. HER-3 overexpression is prognostic of reduced breast cancer survival: a study of 4046 patients. *Ann Surg* 2010;251:1107-16.
74. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European journal of immunology* 2007;37 Suppl 1: 53-60.
75. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:10-6.
76. Söker S. Dendritik hücreler. *Dicle tıp dergisi* 2005;3:152-160.
77. Jaffe S, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Hematopathology. Elsevier 2011
78. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996;86:345-8.
79. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-103.
80. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92:4778-91.
81. Reid DC. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *Br J Haematol* 2001;112:874-87.
82. Coventry BJ, Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *British journal of cancer* 2003;89:533-8.
83. Hillenbrand EE, Neville AM, Coventry BJ. Immunohistochemical localization of CD1a-positive putative dendritic cells in human breast tumours. *British journal of cancer* 1999;79:940-4.
84. Furukawa T, Watanabe S, Kodama T, Sato Y, Shimosato Y, Suemasu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer* 1985;56:2651-6.

85. Tsujitani S, Furukawa T, Tamada R, Okamura T, Yasumoto K, Sugimachi K. Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1987;59:501-5.
86. Gallo O, Bianchi S, Giannini A, Gallina E, Libonati GA, Fini-Storchi O. Correlations between histopathological and biological findings in nasopharyngeal carcinoma and its prognostic significance. *Laryngoscope* 1991;101:487-93.
87. Gallo O, Libonati GA, Gallina E, Fini-Storchi O, Giannini A, Urso C, et al. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:1007-10.
88. Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:641-6.
89. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999;190:1417-26.
90. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clinical cancer research*: an official journal of the American Association for Cancer Research 2004;10:7466-74.
91. Coventry BJ, Lee PL, Gibbs D, Hart DN. Dendritic cell density and activation status in human breast cancer - CD1a, CMRF-44, CMRF-56 and CD-83 expression. *Br J Cancer* 2002;86:546-51.
92. Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:1131-6.
93. Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, Du Pont J S, Hoefsmit EC, Kamperdijk EW. Isolation and characterization of migratory human skin dendritic cells. *Immunol* 1994;98:330-336.
94. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. Guideline Summary: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor HER2 Testing in Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology* 2006;25:118-145
95. Qureshi A, Khanum S, Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. *J Pak Med Assoc* 2010;60:350-3
96. Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1992;7:1273-1278.

97. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrri A, et al. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:46.
98. Baiocchi G, Lopes A, Coudry RA, et al. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:1059-1068.
99. Beji A, Horst D, Engel J, Kirchner T, Ullrich A. Toward the prognostic significance and therapeutic potential of HER3 receptor tyrosine kinase in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:956-968.
100. Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, et al. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7843-7849.
101. Spears M, Taylor KJ, Munro AF, et al. In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein-protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132:463-470.
102. Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003;200:290-297.
103. Reschke M, Mihic-Probst D, van der Horst EH, et al. HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:5188-5197.
104. Tanner B, Hasenclever D, Stern K, et al. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4317-4323.
105. Hirakawa T, Nakata B, Amano R, et al. HER3 overexpression as an independent indicator of poor prognosis for patients with curatively resected pancreatic cancer. *Oncology* 2011;81:192-198.
106. Lee CM, Shrieve DC, Zempolich KA, et al. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2005;99:415-421.
107. Kradin RL, Xia W, Pike M, Byers HR, Pinto C. Interleukin-2 promotes the motility of dendritic cells and their accumulation in lung and skin. *Pathobiology* 1996;64:180-6.
108. Furukawa T, Watanabe S, Kodama T, Sato Y, Shimosato Y, Suemasu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer* 1985;56:2651-6.
109. Ambe K, Mori M, Enjoji M. S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer* 1989;63:496-503.
110. Eisenthal A, Polyvkin N, Bramante-Schreiber L, Misonznik F, Hassner A, Lifschitz-Mercer B. Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum Pathol* 2001;32:803-7.

111. Lewko B, Zółtowska A, Stepieński J, Roszkiewicz A, Moszkowska G. Dendritic and cancer cells in the breast tumors--an immunohistochemical study: short communication. *Med Sci Monit* 2000;6:892-5.
112. Lespagnard L, Gancberg D, Rouas G, Leclercq G, de Saint-Aubain Somerhausen N, Di Leo A, Piccart M, Verhest A, Larsimont D. Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int J Cancer* 1999;84:309-14.
113. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003;104:92-7.
114. Wrba F, Chott A, Reiner A, Markis-Ritzinger EM, Holtzner JH. Ki-67 immunoreactivity in breast carcinomas in relation to transferrin receptor expression, estrogen receptor status and morphological criteria. An immunohistochemical study. *Oncology* 1989;46:255-259.
115. Sahin AA, Ro JY, Block MB, et al. Ki-67 immunostaining in node-negative Stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 1991;68:549-557
116. Veronese SM, Gambacorta M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol* 1991;95:30-34
117. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lambertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993;71:3926-3931

n	prot	sagk	DFS var	vas	neoac	grac	OR	PR	Ki67	Y	Ki67	%	Ki67	CD1a	CD1a	CD1a	HER3	p	her3 yuz	HER	ALLRE	ilknt	sonknt	nukstar	takip O	takip D	LG	TMboy		
1	27640-08	0	1	71	1	3	0	0	20	1	0	0	1	22	1	1	1	0	0	0	0	0	11.09.2008	08.10.2013	22.10.2009	62	14	0	0	
2	8524-09	0	0	51	1	2	1	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17.04.2009	08.10.2013	08.10.2013	55	55	1	1		
3	7833-08	1	1	79	1	2	0	1	35	1	1	1	1	8	1	1	0	0	0	0	0	24.09.2008	19.02.2011	26.06.2010	29	21	0	0		
4	19682-09	0	1	53	0	3	1	1	20	0	1	1	3	1	1	0	1	2	1	1	1	18.12.2008	08.10.2013	14.01.2010	59	13	1	1		
5	4600-08	0	0	43	1	3	1	1	40	1	1	1	1	30	1	1	0	0	0	0	0	01.03.2008	08.10.2013	08.10.2013	68	68	0	1		
6	9509-07	1	1	39	1	3	0	0	35	1	1	1	1	25	1	1	1	5	1	1	1	1	05.04.2007	29.08.2009	23.06.2009	29	27	1	0	
7	37077-07	0	0	45	1	3	0	1	85	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	03.12.2007	08.10.2013	08.10.2013	71	71	0	0	
8	31490-04	0	0	76	1	3	0	0	30	1	1	1	1	6	1	1	40	1	1	1	1	1	29.11.2004	08.10.2013	08.10.2013	108	108	0	0	
9	32566-07	0	0	35	1	3	1	1	70	1	1	1	1	12	1	1	1	90	2	1	1	1	01.10.2007	08.10.2013	08.10.2013	73	73	1	1	
10	4148-09	0	0	56	1	2	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	04.02.2009	08.10.2013	08.10.2013	57	57	0	1	
11	7679-09	0	0	63	0	3	0	0	50	1	1	1	1	37	1	1	1	80	1	1	1	1	01.01.2007	08.10.2013	08.10.2013	82	82	0	0	
12	6581-10	0	0	40	1	3	1	1	65	1	1	1	1	2	1	0	1	10	1	1	1	1	1	24.02.2010	08.10.2013	08.10.2013	44	44	1	1
13	38234-08	0	1	48	0	3	1	1	30	1	1	1	1	38	1	1	1	50	3	1	1	1	1	25.06.2008	08.10.2013	01.10.2012	64	52	1	0
14	24837-07	0	0	42	1	2	1	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	03.09.2007	08.10.2013	08.10.2013	74	74	0	0
15	15615-08	1	1	75	0	3	0	0	70	1	1	1	1	47	1	1	1	30	2	1	1	1	1	29.07.2008	16.09.2010	15.08.2008	26	1	1	1
16	28233-09	1	1	61	0	3	1	1	60	1	1	1	1	18	1	1	1	50	2	1	1	1	1	27.08.2007	16.02.2010	16.12.2009	30	28	1	1
17	16580-07	0	0	66	1	3	0	0	30	1	1	1	1	20	1	1	0	0	0	0	0	0	0	11.06.2007	08.10.2013	08.10.2013	77	77	0	0
18	14224-05	1	1	36	0	3	0	0	80	1	1	1	1	0	0	0	1	5	1	1	1	1	1	03.02.2005	18.08.2008	28.04.2008	43	39	1	1
19	17015-08	0	0	80	1	3	1	1	18	0	1	0	0	0	0	0	1	60	2	1	1	1	1	26.05.2008	08.10.2013	08.10.2013	65	65	0	0
20	26280-08	0	1	41	1	2	1	0	18	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	28.08.2008	08.10.2013	01.07.2013	62	59	0	0
21	28437-03	1	1	54	1	3	1	1	40	1	1	1	1	23	1	1	0	0	0	0	0	0	0	23.10.2003	27.05.2007	05.04.2007	44	42	1	1
22	14212-09	0	0	48	1	3	0	0	55	1	1	1	1	9	1	1	1	90	3	1	1	1	1	28.04.2009	08.10.2013	08.10.2013	54	54	0	0
23	9084-06	1	1	58	0	3	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21.03.2006	28.02.2012	11.06.2007	72	15	0	0
24	23170-08	1	1	37	1	3	0	0	30	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28.08.2008	08.03.2009	05.03.2009	6	6	0	1
25	8615-08	0	0	40	1	3	1	0	80	1	1	1	1	2	1	0	1	70	1	1	1	1	1	12.03.2008	08.10.2013	08.10.2013	68	68	1	1
26	27799-09	1	1	49	0	3	0	0	80	1	1	1	1	0	0	0	1	10	2	1	1	1	1	03.09.2009	21.07.2010	29.01.2010	11	5	0	1
27	16983-09	0	0	52	1	3	1	1	60	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	26.06.2009	08.10.2013	08.10.2013	52	52	1	0
28	38256-07	1	1	47	0	3	1	1	70	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	09.07.2007	27.07.2011	27.04.2011	49	46	0	0
29	3642-08	0	0	54	0	3	0	0	35	1	1	1	1	93	1	1	0	0	0	0	0	0	0	01.01.2008	08.10.2013	08.10.2013	70	70	0	1
30	25279-07	1	1	43	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	01.01.2007	23.10.2011	23.07.2011	59	55	0	1
31	4095-09	0	0	59	0	3	1	1	62	1	1	1	1	0	0	0	1	20	2	1	1	1	1	01.01.2009	08.10.2013	08.10.2013	58	58	0	1
32	2542-10	0	0	42	0	3	1	1	90	1	1	1	1	66	1	1	0	0	0	0	0	0	0	23.11.2009	08.10.2013	08.10.2013	47	47	1	1
33	39449-08	1	1	32	0	2	1	1	15	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	01.01.2008	13.01.2011	13.11.2010	37	35	1	1
34	38490-08	1	1	61	0	3	0	0	45	1	1	1	1	0	0	0	1	70	2	1	1	1	1	16.12.2008	13.01.2010	13.10.2009	13	10	1	1
35	2257-07	1	1	64	1	2	0	0	15	0	0	0	0	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	24.01.2007	25.01.2012	17.06.2008	61	17	0	1
36	10848-06	1	1	57	0	3	0	0	40	1	1	1	1	18	1	1	1	2	2	1	1	1	1	01.01.2006	22.05.2007	22.02.2007	17	14	1	1
37	19472-08	0	0	39	0	3	0	0	35	1	1	1	1	39	1	1	0	0	0	0	0	0	0	26.08.2005	08.10.2013	08.10.2013	99	99	1	1
38	22651-07	1	1	56	0	3	0	0	95	1	1	1	1	16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	01.01.2007	13.08.2012	13.05.2012	68	65	0	0
39	8465-08	1	1	48	0	3	0	0	80	1	1	1	1	28	1	1	1	2	1	1	1	1	1	01.01.2008	19.03.2011	13.11.2010	39	35	1	1
40	13180-07	0	0	30	0	3	1	1	7	0	0	0	0	13	1	1	1	2	2	1	1	1	1	01.01.2007	08.10.2013	08.10.2013	82	82	1	1
41	30006-07	0	0	72	1	3	0	0	18	0	0	0	0	34	1	1	0	0	0	0	0	0	0	27.09.2007	08.10.2013	08.10.2013	73	73	1	0
42	36983-05	1	1	60	0	3	0	1	35	1	1	1	1	0	0	0	1	70	2	1	1	1	1	28.09.2005	23.07.2010	04.12.2009	59	51	1	0
43	29965-08	0	0	79	1	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17.10.2008	08.10.2013	08.10.2013	61	61	1	1
44	29124-08	1	1	52	0	2	0	0	25	1	1	1	1	0	0	0	1	50	1	1	1	1	1	17.09.2008	08.03.2013	22.03.2010	54	18	1	1
45	31493-07	1	1	54	1	3	0	0	27	1	1	1	1	40	1	1	0	0	0	0	0	0	0	02.11.2007	25.11.2009	27.08.2009	25	22	1	0
46	10944-09	0	0	48	1	3	1	1	75	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31.03.2009	08.10.2013	08.10.2013	55	55	1	1
47	13241-09	1	1	47	0	2	0	0	85	1	1	1	1	150	1	1	1	0	0	0	0	0	0	31.10.2008	07.12.2012	24.08.2010	50	22	0	1
48	35516-09	1	1	39	0	3	1	1	35	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.01.2008	21.08.2012	25.07.2011	56	43	1	1