

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

ERKEN EVRE MEME KANSERİNDE AKSİLLER LENF NODU
METASTAZINA ETKİ EDEN GENETİK FAKTÖRLER

UZMANLIK TEZİ
Arş. Gör. Dr. İLKER ERMİŞ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. ORHAN BAYRAM

ANKARA
ARALIK 2019

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

ERKEN EVRE MEME KANSERİNDE AKSİLLER LENF NODU
METASTAZINA ETKİ EDEN GENETİK FAKTÖRLER

UZMANLIK TEZİ
Arş. Gör. Dr. İLKER ERMİŞ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. ORHAN BAYRAM

ANKARA
ARALIK 2019

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi Anabilim Dalında eğitim sürecimde ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmamın başından sonuna kadar her türlü bilgi ve deneyiminden yararlandığım Genel Cerrahi Anabilim Dalı Bölüm Başkanı ve danışman hocam Prof. Dr. Orhan Bayram'a;

Cerrahi eğitim hayatım boyunca her türlü bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, iyi bir cerrah ve iyi bir hekim olmam için sabırla emek veren tüm hocalarıma;

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında her daim desteğini hissettiğim, kıymetli zamanlarını ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık'a, Doç. Dr. Özgür Ekinci'ye, Dr. Nihan Örüklü'ye ve Arş. Gör. Dr. Kübra Çalışkan'a;

En önemlisi de bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan sevgili eşim Dt. Gülşen Ermiş'e ve biricik kızım Gülce'ye teşekkür ederim.

Dr. İlker ERMİŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.1.1. Memenin arteriyel anatomisi.....	6
2.1.2. Memenin venöz drenajı	7
2.2. Fizyoloji.....	10
2.3. Meme kanseri.....	11
2.3.1. Epidemiyoloji	11
2.3.2. Meme kanseri ile ilişkili risk faktörleri	12
2.3.3. Meme kanseri histopatolojisi.....	12
2.3.3.1. Lobüler Karsinoma In Situ.....	13
2.3.3.2. Duktal Karsinoma In Situ	13
2.3.3.3. İnvaziv Meme Karsinomları	13
2.3.4. Meme Kanserinde Evreleme	14
2.3.5. Meme kanserinde görüntüleme	23
2.3.5.1. Ultrasonografi	23

2.3.5.2.	Mamografi.....	24
2.3.5.3.	Duktografi	24
2.3.5.4.	Manyetik Rezonans Görüntüleme.....	24
2.3.5.5.	BI-RADS Sınıflaması	25
2.3.6.	Meme kanserinde tedavi seçenekleri.....	27
2.3.6.1.	Cerrahi tedavi	27
2.3.6.2.	Radyoterapi	29
2.3.6.3.	Kemoterapi ve hormonoterapi	29
2.4.	Genetik Dizileme	31
2.4.1.	Yeni nesil dizileme (NGS)	31
3.	MATERYAL VE METOD	36
3.1.	Hasta Seçimi	36
3.2.	Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	37
3.3.	DNA İzolasyonu	37
3.4.	DNA Ölçümü ve NGS İşlemi	37
3.5.	Sonuçların Değerlendirilmesi	38
4.	BULGULAR.....	39
5.	TARTIŞMA	45
6.	SONUÇLAR	55
7.	KAYNAKLAR	56

KISALTMALAR

NGS	:Yeni Nesil Dizileme (<i>Next Generation Sequencing</i>)
IDC	:İnvaziv Duktal Kanser
LCIS	:Lobüler Karsinoma In-Situ
DCIS	:Duktal Karsinoma In-Situ
MKC	:Meme Koruyucu Cerrahi
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ER	:Östrojen Reseptörü
PR	:Progesteron Reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Meme Anatomisi.....	5
Şekil 2. Memenin Arteriyel Anatomisi	6
Şekil 3. Memenin Lenfatik Drenajı	9
Şekil 4. Hasta seçimi	36



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. AJCC 7.edisyona göre meme kanserinin anatomik evrelemesi	17
Tablo 2. AJCC 8.edisyona göre meme kanserinin klinik evrelemesi	23
Tablo 3. Gruplara ait klinik özellikler	39
Tablo 4. Gruplarda izlenen genetik mutasyonlar	44



ÖZET

Erken Evre Meme Kanserinde Aksiller Lenf Nodu Metastazına Etki Eden Genetik Faktörler

Meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser tipidir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Her 9 kadından biri hayatı boyunca meme kanseri ile karşı karşıya gelmektedir. Tüm bu sebepler meme kanserini oldukça önemli bir sağlık sorunu haline getirmiştir. Meme kanseri günümüzde üzerinde en çok çalışma yapılan konulardan biridir. Meme kanseri patogeneğinde etkili çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bu genlerin etki mekanizmaları ve prognoz üzerine etkilerinin tanımlanması meme kanserinde hedefe yönelik gen tedavilerini gündeme getirmiştir. Günümüzde en iyi bilinen ve tedavide hedef olarak seçilen gen HER2 genidir, ancak teknolojinin ilerlemesi ve yeni genetik sekanslama yöntemlerinin keşfedilmesiyle hedefe yönelik tedavide kullanılmaya aday birçok gen ortaya atılmıştır. Bu çalışmada invaziv duktal meme kanseri tanımlı hastalarda aksiller yayılım üzerine etkili genlerin değerlendirilmesi ve spesifik mutasyonların saptanması amaçlanmıştır. Bunun için Ocak 2015 – Aralık 2017 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinde meme kanseri nedeniyle mastektomi yapılan hastalar araştırıldı. Tümör boyutu >20 mm olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. T1N1 ve T1N0 tümör özellikleri gösteren hastalardan 10’ar kişilik iki grup oluşturuldu. Hastalara ait FFPE bloklar halinde saklanan tümör dokusundan uygun işlemler uygulanarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen DNA, QIAseq Meme Kanseri Paneli (QIAGEN, Hilde, Almanya) kullanılarak 93 adet genin somatik

mutasyonları açısından tarandı. Sonuçlar QIAGEN Clinical Insight (QIAGEN, Hilde, Almanya) programı kullanılarak yorumlandı. Hastalarda patojenik olduğu bilinen veya yüksek ihtimalle patojenik olduğu düşünülen 31 adet gende, 131 adet mutasyon saptandı. Her iki grup mutasyon oranları açısından karşılaştırıldı. Metastatik grupta PIK3CA, NF1, MSH6, PIK3R1, CDKN2A ve ERCC4 genlerinde non-metastatik gruba oranla artmış mutasyon oranı görüldü. Bu sonuçlar daha sonraki çalışmalar için yol gösterici nitelikte olmakla birlikte bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, aksiller lenf nodu, NGS

SUMMARY

Genetic Factors Affecting Axillary Lymph Node Metastasis in Early Stage Breast Cancer

Breast cancer is the most common cancer and the second most common cancer related death cause after lung cancer in women. Every one of 9 women faces breast cancer in her life. All these reasons make breast cancer an important health problem. Breast cancer is one of the most studied topics today. Many genes have been identified that are effective in the pathogenesis of breast cancer. Defining the effect mechanisms and the impact on breast cancer prognosis of these genes has led targeted gene therapies. HER2 is the most famous gene used in targeted gene therapies today. With the improvements on technology and the discovery of next generation sequencing methods many genes have become possible candidates for that matter. In this study, we aim to evaluate the genes and to determine the specific genetic mutations that have effects on axillary lymphatic metastasis. We examined the patients who have gone under surgery with breast cancer diagnosis in our clinic between January 2015 and December 2017. Patients with tumors larger than 20 mm have been excluded from the study. Two groups containing 10 patients each have been established according to axillary status. DNA have been extracted from the FFPE tumor tissues of all patients using the proper methods. Isolated DNA have been investigated for mutations of 93 known genes using QIAseq Breast Cancer Targeted Panel (QIAGEN, Hilde, Germany). The results have been evaluated using Clinical Insight Program (QIAGEN, Hilde, Germany). One hundred and thirty one pathogenic or likely pathogenic mutations

have been detected in 31 genes. These mutations have been compared between two groups. Increased mutation rate was observed in PIK3CA, NF1, MSH6, PIK3R1, CDKN2A and ERCC4 genes in metastatic group compared to non-metastatic group. Although these results provide guidance for further studies, more comprehensive studies are needed.

Keywords: Breast cancer, axillar metastasis, NGS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser tipidir. Her 9 kadından biri meme kanseri ile karşı karşıya gelmektedir[1]. 20-59 yaş arası kadınlarda kanser nedeniyle ölümlerin en sık sebebidir. Meme kanserinin sıklığı tüm dünyada artmakta iken, mortalitesi gelişmiş ülkelerde tanı ve tedavi için kullanılan yöntemlerin gelişmesine paralel olarak azalmakta, düşük-orta gelirli ülkelerde artmaktadır. Ortalama yaşam süresinin uzaması, yaşam tarzının (çevresel faktörler, beslenme, egzersiz, stres vs.) değişmesi, tarama çalışmalarının yaygınlaşması ve kanser olgularının bildirimindeki artışlar meme kanseri insidansında artışa başlıca sebepler olarak sayılabilir.

Meme kanserinde en önemli, bağımsız prognostik faktörlerden biri aksiller lenf nodu durumudur[2]. Aksiller lenf nodu metastazını etkileyen başlıca faktörler; tümör boyutu, tümör lokalizasyonu, tümörün histolojik evresi ve lenfovasküler invazyon olarak sayılabilir.

Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte tümörün histolojik evresi, metastaz potansiyeli ve tedaviye yanıtı üzerine etkili genetik mutasyonlar saptanmaya başlanmıştır. Gen dizileme metotları uzun yıllardır bu genlerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Ancak, Sanger metodu gibi konvansiyonel gen dizileme metotları tek seferde birden fazla genetik mutasyonu değerlendirmede yetersiz kaldığından son dönemde yeni nesil dizileme metotları ortaya atılmıştır. Bu metotlar ile çok sayıda genetik mutasyon çok daha kısa zamanda değerlendirilebilmektedir.

Literatürde kadınlarda meme kanseri riskini artıran genetik faktörleri irdeleyen çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak bu genetik faktörlerin prognoza olan etkisi çok daha nadiren araştırılmıştır. Bizim çalışmamız yeni nesil dizileme metotları kullanılarak erken evre meme kanseri tanılı hastalarda önemli bir prognostik belirteç olan aksiller lenf nodu metastazı üzerine etkili genetik faktörlerin değerlendirilmesini amaçlamaktadır. Bu şekilde özellikle preoperatif dönemde yapılacak olan genetik analizin neoadjuvan ve adjuvan kemoradyoterapi protokolünün belirlenmesinde ve cerrahi aksiller diseksiyonun genişliğine karar verilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Meme kanseri asırlardır cerrahların ilgisini çekmektedir. Meme kanserinden bahsedilen ilk döküman M.Ö. 3000’li yıllarda İmhotep tarafından Mısır’da yazıldığı düşünülen tıbbi papirüslerdir. Edwin Smith tarafından ortaya çıkarılan bu papirüslerde hastaların hepsi erkek olarak tanımlanmış ve hastalığın tedavisi olmadığı belirtilmiştir.

Meme kanseri ilk olarak MS 1.yy’da yaşamış İskenderiyeli Leonidas tarafından cerrahi olarak çıkarılmıştır.

Meme kanseri cerrahi tedavisi; modern şeklinin ilk halini 19.yüzyılın sonunda Halstead tarafından tanımlanması ile almıştır. Halstead, pektoralis majör kasını da içerecek şekilde tek parça halinde meme dokusunun çıkarılmasının; hem hastalığın tedavisinde, hem de yayılım ve rekürrensin önlenmesinde etkili olduğunu belirtmiştir.

Meme kanseri tedavisinde köşe taşları:

1882: William Halsted, ilk radikal mastektomiği yapmıştır. Bu ameliyat 20. yüzyıla kadar meme kanseri tedavisinde standart ameliyat olmuştur.

1895: Meme kanseri tanısında X ışını kullanılarak ilk mammografi çekilmiştir.

1898: Marie ve Pierre Curie radyoaktif elementlerden radyum ve polonyumu keşfetmiştir. Kısa zaman sonra radyum kanser tedavisinde kullanılmıştır.

1937: Cerrahiye ek olarak radyoterapi meme kanseri tedavisinde kullanılmıştır.

1948: Patey ve Dyson pektoral kasın korunduğu modifiye radikal mastektomi tanımlamışlardır.

1978: Tamoksifen FDA tarafından meme kanseri tedavisinde onaylanmıştır.

1984: HER2'nin meme kanserinin kötü seyreden şekliyle alakalı olduğu anlaşıldı.

1991: Toth ve Lappert cilt koruyucu mastektomi tanımlamışlardır.

1994: Guiliano mavi boya kullanılarak sentinel lenf nodu biyopsisini tanımlamıştır.

1995: Bilim adamları tümör baskılayıcı gen BRCA 1 VE BRCA 2 klonlamışlardır.

1996: FDA, meme kanseri tedavisinde anastrozol u onaylamıştır.

1998: FDA, meme kanseri tedavisinde Transtuzumab' ı onaylamıştır.

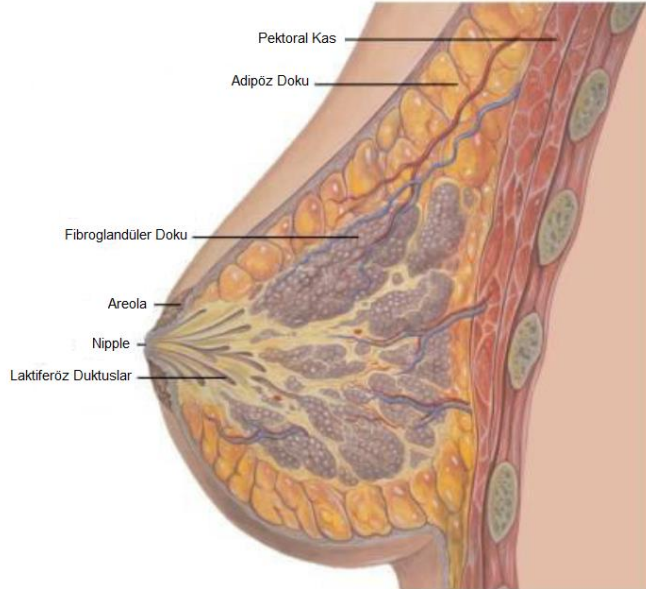
2006: Postmenopozal yüksek riskli kadınlarda Raloxifene'in meme kanseri riskini azalttığı tespit edilmiştir.

1.1.Anatomi

Meme reproduktif sistemin fonksiyonel yönden bir parçası olmakla beraber yapı ve gelişim açısından deriye bağlı bir çeşit apokrin bezdir. Meme

dokusu üç temel yapıdan oluşur; cilt, cilt altı yağ dokusu ve meme dokusu (parankim ve stroma). Meme, meme başından başlayarak ışınsal tarzda yerleşmiş 15-20 lobdan oluşur. Her lob ayrı bir kanalla meme başına açılır. Her lob 20-40 lobülünden, her bir lobülüs de 10-100 asinüsten oluşur. Asinüsler birleşerek terminal duktusa açılır. Terminal duktusun başlangıç bölümü ve buna açılan asinüsler birlikte memenin en küçük işlevsel birimi olan “terminal duktal lobüler üniteyi” oluşturur[3].

Meme dokusunu septalara ayıran, meme parankimini saran, cilt ile yüzeysel fasyanın yüzeysel tabakası arasında uzanan ve yönleri cilde dik olan Cooper ligamentleri; memenin asıcı fibröz bağlarıdır. Cooper ligamentlerinin malign tümörlerle infiltrasyon olması deride karakteristik içeri çekilmeye neden olur. Kanserin sekonder işaretlerinden olan ciltte retraksiyonun nedeni budur.



Şekil 1. Meme Anatomisi

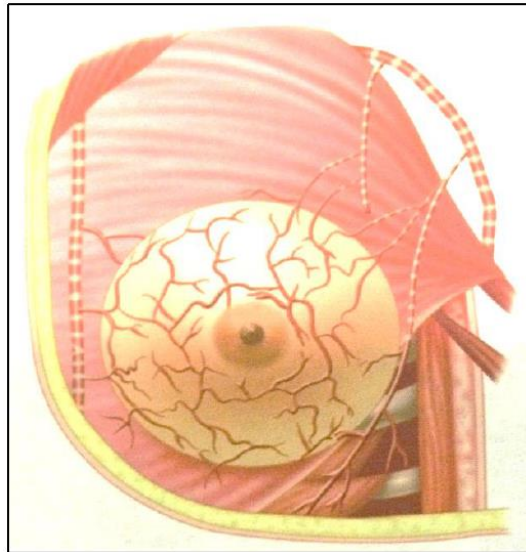
2.1.1. Memenin arteriyel anatomisi

Memenin arteriyel kanlanması internal mammariyan arterin perforan dalları, posterior interkostal arterlerin lateral dalları ve aksiller arterin dallarından sağlanmaktadır. İnternal mammariyan arter subklavian arterin bir dalıdır. Bu arterden çıkan perforan dallar (medial perforan arterler) ikinci, üçüncü ve dördüncü interkostal aralıktan interkostal kasları ve pektoralis majör kasını geçerek memenin medial yarısının ve bu bölge cildinin kanlanmasını sağlarlar.

Posterior interkostal arterler ikinci, üçüncü ve dördüncü interkostal aralıklarda mammariyan dallarını verirler ve memenin lateral yarısının arteriyel beslenmesini sağlarlar.

Aksiller arterin dalları daha çok üst dış kadranı ve memenin kuyruğunu besler.

Memenin yaklaşık olarak %60'ını internal mammariyan arterin perforan dalları, %30'unu da lateral torasik arter besler.



Şekil 2. Memenin Arteriyel Anatomisi

2.1.2. Memenin venöz drenajı

Memenin venöz kanı temel olarak arteriyel sistemi takip eden venler aracılığıyla drene olur. Medial mamaryan venler internal torasik vene drene olur. Lateral mamaryan venöz sistem ise lateral torasik ven aracılığıyla aksiller vene katılır. Memenin posterior sınırının venöz akımı ise interkostal venler aracılığıyla yine internal torasik ven ve Batson'un vertebral venöz pleksusuna katılır. Batson pleksusuna olan venöz drenaj, meme kanserinin hematojen yolla vertebra, kranium, pelvis ve santral sinir sistemine metastaz yapması için bir yolak oluşturmaktadır.

1.1.1. Aksillanın lenfatik drenajı

Meme lenfatikleri yüzeysel ve derin grup olarak iki grup altında incelenebilir. Yüzeysel lenfatikler derin lenfatikler üzerinden aksiller lenf nodlarına drene olurlar. Subepitelyal pleksus ve subdermal pleksus olarak ikiye ayrılırlar.

Memenin derin lenfatik drenajı üç yoldan olur;

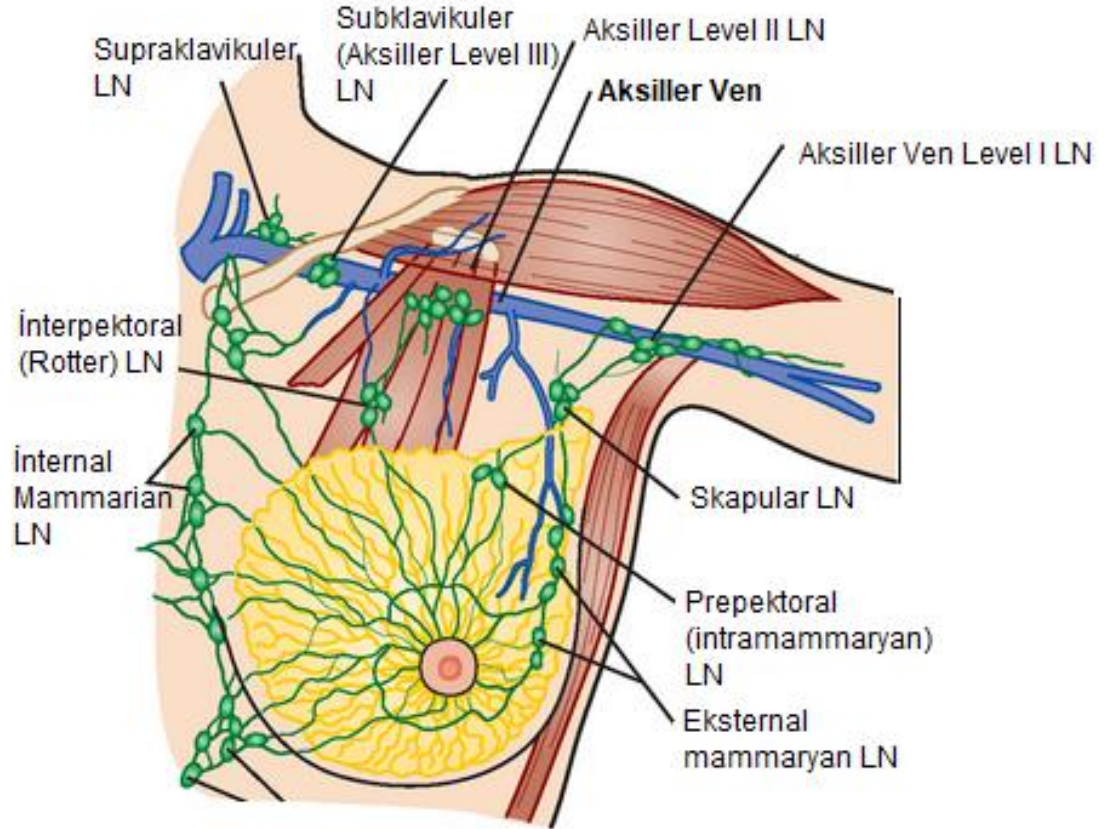
- a. Aksiller yol: Meme üst ve alt yarısından gelen lenfi toplayan ikinci ve üçüncü interkostal boşluk hizasında yerleşmiş ana istasyondur.
- b. Mamaria interna yolu: Parasternal yerleşimli meme medialinin ve bir miktar lateralinin lenfatik akımını alan nodlardır.
- c. Transpektoral yol: Pektoralis majör kasını delerek supraklavikuler nodlara ulaşır.

Memenin lenfatik drenajı ön planda aksiller lenf nodlarına olur. Aksiller bölge lenf nodları Pickren tarafından 6 grupta sınıflanmıştır.

- 1) Aksiller ven grubu (lateral grup): Aksiller venin medial ve posteriorunda yerleşim gösteren 4–6 adet lenf gangliyonundan oluşur. Üst ekstremiteden gelen lenf drenajının büyük bölümü bu gangliyonlara olur.
- 2) Eksternal mammaryan grup (anterior ya da pektoral grup): 4–5 lenf gangliyonundan oluşan bu grup pektoral minör kasının alt sınırı boyunca lateral torasik damarlara yakın olarak yerleşim gösterir. Lenf akımı bu lenf gangliyonlarından santral ya da subklavikuler lenf gangliyonlarına doğrudur.
- 3) Skapular grup (posterior ya da subskapular grup): Skapulanın lateral sınırı boyunca, aksillanın posterior duvarında yerleşen ve 6–7 lenf gangliyonundan oluşan bu grup, boyun, omuz ve gövdenin posterior kısmının lenfatik drenajını sağlar.
- 4) Santral grup: Bu grup 3–4 lenf gangliyonundan oluşur. Genelde pektoralis minör kasının posteriorunda yer alır. Diğer üç gruptan ve direk olarak memeden lenf akımını alır.
- 5) Subklavikuler grup (apikal grup): Pektoralis minör kasının üst sınırının posteriorundaki 6–12 adet lenf gangliyonundan oluşan bu grup, aksiller venin mediali boyunca aksilla apeksine kadar uzanır. Bu gangliyonlardan çıkan lenfatik damarlar birleşerek subklavian trunkusu oluştururlar.
- 6) İnterpektoral grup (Rotter grubu): Pektoralis majör ve minör kasları arasında 1–4 adet küçük lenf gangliyonundan oluşan bu gruptan

çıkan lenfatikler santral ve subklavikuler lenf gangliyonlarına giderler.

Ancak günümüzde Berg tarafından tanımlanan, lenfatiklerin pektoralis minör kası ile olan anatomik komşuluklarına göre yapılan sınıflama daha sık kullanılmaktadır. Pektoral minör kasının lateralinde veya alt sınırında yer alan lenf nodları level I, arkasında yer alan lenf nodları level II ve pektoral kasın medialinde veya üst sınırının üzerinde yer alan lenf nodları level III olarak isimlendirilir.



Şekil 3. Memenin Lenfatik Drenajı

2.2.Fizyoloji

Meme glandı, parankimatöz doku, lobları birbirine bağlayan fibröz destek dokusu ve aralarındaki yağ dokusundan oluşur. Fibröz doku ve yağ dokusu miktarı bireyin yapısal özelliklerine göre değişir. Meme gelişmesi ve fonksiyonu birçok hormonun etkisi ile olur. Bu hormonların en önemlileri östrojen, progesteron, prolaktin, oksitosin, tiroid hormonları, kortisol ve büyüme hormonudur. Bu hormonların salgısı hipotalamus, hipofiz ve overlerin nörohümorale kontrolündedir. Meme üzerine etkili bu hormonların etkileri in vitro olarak gösterilmiştir. Bazı hormonların insanda in vivo etkileri kesin değildir. Kesin olan östrojenin duktus gelişimini başlattığı, prolaktin ve progesteronun lobül ve asinüs gelişimini kontrol ettiği ve prolaktinin süt salgısını oluşturduğudur. Östrojenin meme üzerine etkisi sitoplazma ve çekirdekteki reseptörlere bağlandıktan sonra görülür. Östrojen reseptörlerinin sentezini hem östrojen hem de progesteron uyarır. Östrojen meme epitel, özellikle de duktal epitelin gelişiminde etkilidir. Progesteronun tek başına memeye etkisi yoktur. Östrojen reseptörlerinin sentezini uyarır. Prolaktin ile sinerjik etki gösterir. Epitel hücrelerinin diferansiasyonunda, lobül ve asinüs gelişiminde etkilidir. Laktasyonu inhibe eder. Prolaktin hipofizde yapılır. Hamileliğin son döneminde doğumdan hemen sonra yükselir ve lohusalık döneminde yüksek kalır. Meme gelişiminin her safhasında önemlidir. Memedeki östrojen reseptörlerinin sayısını artırır. Progesteronla birlikte lobül ve asinüs gelişmesini uyarır. Süt sekresyonunu ve süt proteinlerinin sentezini kontrol eder. İlerleyen yaşla beraber meme, glanduler elemanlarını kaybetmeye başlar ve bunların yerini yağ dokusu

alır. Menapozla beraber bu kayıp hızla artar ve atrofi, dejenerasyon ve de hiyalinizasyon sonucu meme bezlerinde büyük kayıplar meydana gelir. Bu kayıpların yerini yağ dokusu alır.

2.3.Meme kanseri

2.3.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri kadınlarda görülen alana spesifik en sık kanserdir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedenidir. Ülkemizde meme kanseri insidansı 100 binde 43 olup, her yıl 15000 kadın meme kanserine yakalanmaktadır.

Meme kanseri tanısı alan kadınların %70 kadarında ilk bulgu memede bir kitlenin varlığıdır. Bu kitleler genellikle ağrısız, sert ve immobildir. Meme kitlelerinin %49'u üst-dış kadranda yerleşmiştir[4].

Tümör Cooper bağlarını infiltre etmişse deride çekintiler izlenebilir. Yüzeyel lenfatiklerin infiltrasyonu portakal kabuğu (Peau D'Orange) görünümüne neden olabilir.

Primer meme kanserinin boyutu arttıkça, bazı hücreler intersellüler alana geçerek lenfatik ağ vasıtasıyla aksiller lenf nodlarına taşınırlar. Tipik olarak aksiller lenf nodları sırasıyla level I, II ve III lenf nodu gruplarına doğru tutulurlar. Hastalıksız sağ kalım ve genel sağ kalım ile korelasyon gösteren en önemli prognostik faktör aksiller lenf nodu tutulumudur.

Meme kanseri hastalarında tedaviden sonraki 10 yıl içerisinde en sık ölüm nedeni uzak metastazlardır. Sık tutulan yerler sıklık sırasına göre kemik, akciğer, plevra, yumuşak dokular ve karaciğerdir.

2.3.2. Meme kanseri ile ilişkili risk faktörleri

Yaş, aile öyküsü, östrojen etkisi altında kalma süresi, hormonal tedavi alma öyküsü, benign meme hastalığı öyküsü, diyet ve çevresel faktörler gibi çok sayıda risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin gelişiminde genetik yatkınlığın ve spontan mutasyonların da rol oynadığı bilinmektedir.

2.3.3. Meme kanseri histopatolojisi

Kanser hücreleri bazal membranı tutup tutmamalarına göre in situ veya invaziv kanser olarak ikiye ayrılırlar. İnvazyon çok ufak bir alanda sınırlı olabileceği için in situ kanserlerin en doğru tanısı multipl mikroskopik kesitlerin invazyonu dışlamak amacıyla analizi ile konulur.

Multisentrisite primer kanserin yerleştiği meme kadrından farklı bir kadranda (ya da en azından 4 cm uzaklıkta) ikinci bir tümörden bahsederken, multifokalite ise ikinci kanser odağının primer meme kanserinin bulunduğu kadrana aynı kadranda (ya da 4 cm'den yakın) bulunmasından bahseder. Multisentrisite LCIS hastalarının %60-90'ında izlenirken, bu oran DCIS'te bu oran %40-80 civarındadır. LCIS %50-70 oranında bilateral izlenirken, DCIS'te bu oran %10-20 oranındadır[5].

2.3.3.1.Lobüler Karsinoma In Situ

LCIS terminal duktusun lobüler ünitelerinden orjinlenir ve sadece kadınlarda gelişir. Toplumdaki LCIS sıklığı tam olarak bilinmemektedir çünkü tanısı insidental olarak konulur. LCIS tanısı alan kadınların %25-35'inde invaziv kanser gelişir. Bu kanser sadece LCIS saptanan memede değil, her iki memeden birinde gelişebilir. LCIS hikayesi bulunan kadınların üçte ikisinde invaziv duktal kanser gelişir. Bu nedenle LCIS premalign bir lezyondan çok meme kanseri riskini arttıran bir faktör olarak kabul edilir.

2.3.3.2.Duktal Karsinoma In Situ

DCIS histolojik olarak minör duktusları örten epitelin proliferasyonu ile karakterizedir. Daha çok postmenopozal kadınlarda görülürler ve tarama mamografilerin yaygınlaşmasıyla bugün meme malign hastalıklarının %30'unu oluştururlar. Tedavi edilmediklerinde 10 yıl içerisinde %30-50 oranında invaziv duktal karsinom gelişir. İnvaziv kanserler DCIS'in geliştiği aynı taraf memede, genellikle de aynı kadranda izlenirler. Bu yüzden DCIS, invaziv karsinomun anatomik öncülü olarak kabul edilebilir.

2.3.3.3.İnvaziv Meme Karsinomları

İnvaziv meme karsinomlarının; duktal, medüller, müsinöz, papiller, lobüler gibi birçok tipi tanımlanmıştır. İnvaziv duktal karsinom tüm meme kanserlerinin %80'ini oluşturur[6]. En sık 5-6. dekattaki kadın hastalarda soliter sert bir kitle olarak ortaya çıkar. Duktal kanserlerin yüzde %75'inde östrojen

reseptörü pozitif izlenmiştir. Medüller karsinom tüm meme kanserlerinin %4'ünü oluşturur. BRCA1 herediter meme kanserinin sık bir fenotipidir. Vakaların %20'sinde bilateralite izlenir. Müsinöz karsinom tüm meme kanserlerinin %2'sini oluşturur ve tipik olarak ileri yaşta, büyük bir kitle ile prezente olur. Müsinöz karsinomların %90'dan fazlasında hormon reseptörleri pozitif olarak izlenir. Lobüler karsinom tüm meme kanserlerinin %10'unu oluşturur. Sıklıkla multifokal, multisentrik ve bilateralidir.

2.3.4. Meme Kanseri Evreleme

Meme kanseri evrelemesinde American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in TNM sınıflaması kullanılmaktadır. AJCC'nin 7.edisyonunda tanımlanan TNM sınıflamasında evreleme, tümör boyutu, lenf nodu ve uzak metastaz durumuna göre yapılırken (Tablo-1), 8.edisyonda evrelemeye hormon reseptör ve HER2-neu durumu eklenmiştir (Tablo-2)[7].

1.1.2. Meme kanseri için TNM Sınıflaması

Primer Tümör (T)

TX: Primer tümör değerlendirilememiştir

T0: Primer tümör yoktur

Tis: Karsinoma in situ

T1: En büyük tümör çapı ≤ 20 mm

T2: En büyük tümör çapı > 20 mm fakat ≤ 50 mm

T3: En büyük tümör çapı > 50 mm

T4: Herhangi bir boyutta ancak göğüs duvarına ve/veya cilde direk invazyon mevcut

Rejyonel lenf nodları – Klinik (N)

NX: Rejyonel lenf nodları değerlendirilemez

N0: Rejyonel lenf nodu metastazı yok

N1: İpsilateral level I, II aksiller lenf nodlarına metastaz (nodlar hareket ettirilebilir)

N2: İpsilateral level I, II aksiller lenf nodlarına metastaz (nodlar fikse veya konglomera); veya klinik olarak tespit edilmiş ipsilateral internal mammariyan nodlarda metastaz var ancak klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı yok

N3: İpsilateral infraklaviküler (level III aksiller) lenf nodu veya nodlarında metastaz var ancak level I, II aksiller lenf nodu tutulumu yok veya hem klinik olarak tespit edilmiş ipsilateral internal mammariyan lenf nodu veya nodları hem de klinik olarak gösterilmiş level I, II aksiller lenf nodu metastazı mevcut veya aksiller ya da internal mammariyan lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın ipsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

Rejyonel lenf nodları – Patolojik (N)

pNX: Rejyonel lenf nodları değerlendirilemez

pN0: Histolojik olarak lenf nodu metastazı tespit edilmemiş

pN1: Mikrometastaz veya 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz ve/veya sentinel lenf nodu biyopsisi sırasında internal mammariyan lenf nodunda metastaz tespit edilmiş ancak klinik olarak tespit edilmemiş

pN2: 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodlarında tutulum yok ancak klinik olarak da tespit edilmiş internal mammariyan lenf nodu metastazı

pN3: 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya infraklaviküler (level III aksiller) lenf nodunda; veya level I, II aksiller tutulum ile beraber klinik olarak tespit edilmiş ipsilateral internal mammariyan lenf nodunda; veya 3'ten fazla aksiller lenf nodu ile beraber klinik olarak tespit edilmemiş ancak sentinel lenf nodu biyopsisi ile mikrometastaz veya makrometastaz tespit edilmiş internal mammariyan lenf nodunda; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

Uzak metastaz (M)

M0: Klinik veya radyolojik olarak tespit edilmiş uzak metastaz yok

M1: Klinik veya radyografik olarak tespit edilmiş ve/veya histolojik olarak da kanıtlanmış 0,2 mm'den büyük uzak metastaz mevcut

T	N	M	Anatomik Evre
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Herhangi T	N3	M0	IIIC
Herhangi T	Herhangi N	M1	IV

Tablo 1. AJCC 7.edisyona göre meme kanserinin anatomik evrelemesi

TNM	Grade	HER2	ER	PR	Evre
Tis N0 M0	Herhangi	Herhangi	Herhangi	Herhangi	0
T1 N0 M0 T0 N1mi M0 T1 N1mi M0	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
			Negatif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
			Negatif	Pozitif	IA
				Negatif	IB
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
			Negatif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
			Negatif	Pozitif	IA
				Negatif	IB
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
			Negatif	Pozitif	IA
				Negatif	IA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IB

T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0			Negatif	Pozitif	IB
				Negatif	IB
	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA

T2 N1 M0 T3 N0 M0				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIB
	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIB
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIIB
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIB

T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIIA
		Negatif	Negatif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB
	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIIA
			Negatif	Pozitif	IIIA

		Negatif	Pozitif	Negatif	IIIA
				Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB
				Pozitif	IIIB
T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0 Herhangi T N3 M0	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB
			Negatif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIC
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIB
			Negatif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIC
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB
			Negatif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIB
			Negatif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIC
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIB

			Negatif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIIB
				Negatif	IIIC
			Negatif	Pozitif	IIIC
				Negatif	IIIC
Herhangi T Herhangi N M1	Herhangi	Herhangi	Herhangi	Herhangi	IV

Tablo 2. AJCC 8.edisyona göre meme kanserinin klinik evrelemesi

2.3.5. Meme kanserinde görüntüleme

2.3.5.1.Ultrasonografi

Ultrasonografi, memenin görüntülenmesinde mamografiden sonra en sık kullanılan ikinci tetkiktir[8]. Kistik kitlelerin tarifinde, spesifik solid anormalliklerin ekojenik kalitesinin tanımlanmasında ve mamografinin yetersiz kaldığı bazı lezyonların aydınlatılmasında kullanılır. Meme kanserli hastalarda aksiller lenf nodu durumunun değerlendirilmesinde kullanılabilir. Non-invaziv bir işlem olduğundan sık aralıklarla kullanılabilir ancak 1 cm ve altındaki lezyonlarda etkinliği azalmaktadır. Ultrasonografi ayrıca kist aspirasyonu, iğne biyopsisi gibi işlemlere kılavuzluk etmek için de sıkça kullanılır.

2.3.5.2.Mamografi

Mamografi uzun yıllardır meme kanseri taramasında ve memede tanımlanmış lezyonların takibinde rutin olarak kullanılmaktadır. Tarama mamografisi 40 yaş üstü, asemptomatik kadınlarda olası bir meme kanserini tespit etmek için uygulanır. Konvansiyonel mamografide film başına 0.1 cGy radyasyon dozu kullanılır. Tarama mamografisi sırasında verilen radyasyon meme kanseri riskini artırmaz. Bunun yanında iğne lokalizasyon ve iğne biyopsisi gibi girişimsel işlemlere kılavuzluk etmek için de kullanılabilir.

2.3.5.3.Duktografi

Duktografi için primer endikasyon meme başı (özellikle kanlı) akıntısıdır. Radyoopak kontrast madde bir veya birkaç majör duktustan verilir ve mamografi çekilir.

2.3.5.4.Manyetik Rezonans Görüntüleme

MR görüntüleme günümüzde yüksek riskli kadınların taramasında ve yeni tanı almış meme kanserli kadınlarda uygulanmaktadır. Belirgin aile hikayesi ya da bilinen genetik mutasyon taşıyıcılığı olan, erken yaşlardan itibaren taranması gereken kadınlarda taramada kullanılır. Yeni tanı almış kadınlarda diğer memenin MR görüntüleme ile incelenmesiyle %5.7 oranda karşı memede kontralateral kanser tespit edilmiştir. Aynı zamanda aynı taraf memede ayrı odaklar da (multisentrik/multifokal) tespit edilebilir.

2.3.5.5.BI-RADS Sınıflaması

Meme kanserinde radyolojik bulguların standardize edilmesi amacıyla *American College of Radiology* tarafından BI-RADS sınıflaması geliştirilmiştir. BI-RADS sınıflamasında görüntüleme yöntemleriyle memede saptanan lezyonlar tariflenir:

BI-RADS 0: İlave görüntüleme yöntemlerine ihtiyaç var

BI-RADS 1: Normal radyolojik bulgular

BI-RADS 2: Benign bulgular

BI-RADS 3: Muhtemelen benign bulgular

BI-RADS 4: Şüpheli bulgular (4A: hafif, 4B: orta, 4C: ileri derece kuşkulu)

BI-RADS 5: Yüksek olasılıkla malignite düşündüren bulgular

BI-RADS 6: Biyopsi ile malignite tanısı almış ancak henüz kesin tedavi uygulanmamış hastalar

1.1.3. Meme kanserinde prognostik faktörler

a. Yaş: Hastanın tanı anındaki yaşı prognostik bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Erken yaşta gelişen meme kanseri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. 35 yaş altında tanı alan hastalarda 5 yıllık ortalama sağkalım %74,7 iken, 35-69 yaşları arasında tanı alan hastalarda 5 yıllık sağkalım %83,8-88,3 olarak bulunmuştur[9].

b. Tümör boyutu: Tümör boyutu primer lezyonun en uzun çapını ifade eder. Aksiller lenf nodu metastazı ile direk ilişki içerisinde

olsa da, tek başına bağımsız bir prognostik belirteç kabul edilmiştir. 5 yıllık ortalama sağkalım T1, T2 ve T3 tümörlerde sırasıyla %91, %80 ve %63 olarak bulunmuştur[10].

c. Aksiller lenf nodu durumu: Aksiller lenf nodu metastazı meme kanserinde oldukça önemli, bağımsız bir kötü prognoz kriteridir. 2 cm'den küçük tümörlerde bile kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. T1 tümörlerde yapılan bir çalışmada, 5 yıllık ortalama sağkalım, aksiller tutulum olmayan hastalarda %96, 1-3 arası lenf nodu tutulumu olan hastalarda %86, 4'ten fazla lenf nodu tutulumu olan hastalarda %66 olarak bulunmuştur[11].

d. Hormon reseptör durumu: Östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu iyi prognozla ilişkilendirilmiştir[12]. Bunun en önemli sebebi bu tümörlerin adjuvan endokrin tedavilerden fayda görmesidir. Ayrıca bilinmeyen bir nedenle, hormon reseptörü eksprese eden tümörler daha sıklıkla kemik, yumuşak dokular ve üreme sistemine metastaz yaparken, reseptör eksprese etmeyen tümörler ise sıklıkla daha kısa sağ kalım süresiyle ilişkili olan beyin ve karaciğere metastaz yapmaktadır.

e. HER2 aşırı ekspresyonu: HER2 geninin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu özellikle sistemik adjuvan kemoterapi ve anti-HER2 tedavi almayan hastalarda kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle HER2 ekspresyon düzeyi meme

kanserinde rutin olarak değerdendirilen ve adjuvan tedaviye y6n veren bir belirte7 haline gelmiřtir.

2.3.6. Meme kanserinde tedavi se7enekleri

2.3.6.1.Cerrahi tedavi

a. Eksizyonel Biyopsi

Eksizyonel biyopsi memedeki lezyonun normal meme dokusu sınırına kadar b6t6n6yle 7ıkarılmasını ifade eder. Palpe edilemeyen lezyonlarda eksize edilecek lezyonun yeri radyolojik y6ntemler kullanılarak işaretlenmeli ve lezyon iğne rehberliğinde 7ıkarılmalıdır.

b. Meme Koruyucu Cerrahi

Meme koruyucu cerrahi; lumpektomi, segmental rezeksiyon, kadranektomi ve tilektomi tekniklerinin hepsine birden verilen ortak addır. 6zellikle T1 ve T2 t6m6rlerde mastektomiyi kabul etmeyen hastalarda meme estetiğini korumak amacıyla sıklıkla tercih edilen bir y6ntemdir. Meme koruyucu cerrahi sonrası postoperatif radyoterapi standart olarak uygulanmalıdır. Postoperatif radyoterapi ile birlikte uygulanan meme koruyucu cerrahi, mastektomi ile sağ kalım a7ısından benzer sonu7lara sahiptir.

c. Simple ve Modifiye Radikal Mastektomi

Simple mastektomi meme başı, areola, meme cildinin bir kısmı, meme dokusunun tamamı ve pektoralis maj6r kasının fasyasının 7ıkartılması işlemidir. T3 t6m6rlerde, multisentrik t6m6rlerde, radyoterapi istemeyen veya radyoterapi alması kontraendike olan hastalarda ve meme koruyucu cerrahi sonrası gelişen

lokal nükslerde tercih edilen yöntemdir. Çoğunlukla eş zamanlı olarak intraoperatif aksiller lenf nodu değerlendirmesi gerektirir. Modifiye radikal mastektomide simple mastektomiye ek olarak level I ve II aksiller lenf nodu diseksiyonu yapılır. Preoperatif dönemde aksiller bölge lenf nodlarında yayılım şüphesi olan hastalarda tercih edilir. Mastektomi sonrası erken dönem komplikasyonları olarak pnömotoraks, kanama, enfeksiyon, sinir hasarı, seroma ve flep nekrozu sayılabilirken; geç dönemde görülen en sık komplikasyon lenfödemdir. Lenfödem hastaların %4-30'unda görülür. Aksiller diseksiyonun genişliği ve postoperatif dönemde aksiller bölgeye radyoterapi yapılması lenfödem riskini artıran faktörlerdir. Postoperatif erken dönemde gelişen lenfödem genellikle teknik hatalara bağlı olup, kol elevasyonu gibi yöntemlerle kendiliğinden geçebilirken; geç dönemde gelişen lenfödemin tedavisi oldukça zordur.

d. Radikal Mastektomi (Halsted Ameliyatı)

Modifiye radikal mastektomide çıkarılan dokulara ek olarak pectoralis majör kası da çıkarılır. Tüm aksiller lenfatikler, interpektoral lenf nodu (Rotter ganglionu) çıkarılır. Radikal mastektominin, tarihsel önemi dışında uygulama alanı hemen hemen hiç kalmamıştır.

e. Sentinel Lenf Nodu Biyopsisi

Sentinel lenf nodu örnekleme fizik muayene ve görüntüleme sonucu aksiller lenf nodu metastazı düşünülmeyen hastalarda aksillanın durumunun tayin edilmesi amacıyla yapılır. Sentinel lenf nodu hipotezine göre memenin tümör hücreleri öncelikle birkaç lenf noduna metastaz yapar. Kanıtların gösterdiğine

göre enjeksiyon yerine bakılmaksızın tüm memenin lenfatik drenajı ilk önce birkaç lenf noduna olur. Bu lenf nodları sentinel lenf nodu olarak adlandırılır ve memenin tüm lenfatik drenajı hakkında bilgi verir. Sentinel lenf nodunun işaretlenmesinde vital boyalar ve radyofarmasötikler kullanılır.

2.3.6.2.Radyoterapi

Meme kanseri tedavisinde radyoterapi hem primer tedavide hem de neoadjuvan tedavide önemli yer tutmaktadır. Radyoterapinin hem lokal kontrolü artırdığı, hem de genel sağ kalımı uzattığı ve radyoterapi ile kombine edilen meme koruyucu cerrahinin, radikal cerrahi tedavilerle benzer sağ kalım oranlarına sahip olduğu bildirilmiştir[13].

2.3.6.3.Kemoterapi ve hormonoterapi

Meme kanseri ameliyatı sonrası adjuvan tedavi protokolünü belirleyen parametreler; aksiller lenf nodu durumu, tümör boyutu, yaş, menopozal durum, östrojen, progesteron reseptör durumu ve tümörün grade derecesidir. Östrojen ve progesteron reseptörü eksprese eden tümörlerin tedavisinde hormonal terapötiklerden faydalanılır. Antiöstrojen ilaçlar ve aromataz inhibitörleri en sık kullanılan hormonal terapötiklerdir. Antiöstrojen ilaçlar sitozoldeki östrojen reseptörlerine bağlanıp, hücre için östrojen girişini engelleyerek etki gösterirler. Özellikle hormon duyarlı meme kanserinde adjuvan tedavide kullanılmaktadırlar. Tamoksifen en sık kullanılan antiöstrojen ilaçtır. Aromataz inhibitörleri androjen, androstenedion ve testosteronu östrojene çeviren aromataz enzimini inhibe ederek

etki gösterirler. Premenopozal kadınlarda over hiperstimülasyonuna neden oldukları için kullanılmazlar. Meme kanserinde tedavi prosedürleri planlanırken değerlendirilen diğer bir belirteç de tümörün HER2-neu mutasyon durumudur. HER2-neu gen mutasyonu meme kanserinde rutin olarak taranır. İnvaziv meme kanserinin %18-25'inde saptanmıştır ve kötü prognozla ilişkilidir. HER2-neu mutasyonu saptanan hastalarda tedaviye anti-HER2 ajanlar eklenmelidir. En sık kullanılan anti-HER2 ajan transtuzumabtır.

Son 10 yıl içerisinde yapılan bazı randomize klinik çalışmalarda bazı ajanların östrojen reseptörleri üzerinden etki ederek endokrin tedavinin etkinliğini artırdığı gözlenmiştir. Örneğin palbosiklib, ribosiklib ve abemasiklib gibi CDK 4/6 inhibitörlerinin tedaviye eklenmesinin ortalama sağkalım üzerine olumlu etkileri izlenmiştir. Ayrıca PIK3CA mutasyonuna sahip tümörlerde endokrin tedaviye PI3K inhibitörü alpesilib eklenmesinin tümör progresyonunu azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Aynı şekilde tümörün endokrin tedaviye direnç geliştirmesine neden olan genetik mutasyonlar da gösterilmiştir. Bu genetik mutasyonlara örnek olarak ESR1 ve CYP2D6 genlerindeki mutasyonlar örnek verilebilir. ESR1 geni östrojen reseptörlerini kodlar ve mutasyonu tümörün vücuttaki östrojenin tükenmesine direnç geliştirmesine neden olur. Bu nedenle bu hastalarda aromataz inhibitörlerinin etkisini azalır. Yapılan bazı çalışmalarda ER(+), metastatik meme kanserinde %30 oranında ESR1 mutasyonu saptanmıştır. CYP2D6 geni ise tamoksifenin metabolizmasını etkileyerek etkinliğini azaltır. Tüm bu veriler meme kanserinde genetik dizilemenin önemini gündeme getirmiştir.

2.4.Genetik Dizileme

Genetik dizileme metodları temel olarak iki grupta incelenir.

1. Birinci nesil (konvansiyonel) dizileme metotları
2. İkinci (yeni) nesil dizileme metotları (NGS)

2.5.1. Konvansiyonel dizileme

Sanger, Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilen birinci kuşak dizileme metotları konvansiyonel dizileme metotları olarak adlandırılır. Konvansiyonel dizileme metotlarıyla ortalama 500-900 arası bazdan oluşan DNA fragmanları oluşturulabilir ve bu metotlar klinik olarak spesifik bir gen araştırılırken kullanılır. Bu yöntemlerle birden fazla genin tek seferde değerlendirilmesi pratikte mümkün değildir. Tüm insan genomunun bu yöntemlerle dizilenmesi yaklaşık 60 yıl sürer[14].

2.4.1. Yeni nesil dizileme (NGS)

Yeni nesil gen dizileme metodunda konvansiyonel metotların aksine aynı anda birden çok DNA fragmanı dizilenir. Konvansiyonel dizileme metotlarına oranla çok daha hızlı ve çok daha düşük maliyetlidir. NGS yapılırken ilk basamak “kütüphane hazırlama” basamağıdır. Bu basamakta hastaya ait kalıp olarak kullanılacak olan DNA saflaştırılır, çoğaltılır ve parçalara ayrılır. Bu parçalar solid yüzeylere tutturularak fiziksel olarak izole edilir. Dizileme sonrası ortaya çıkan genom bilgisayar yardımıyla referans genom ile karşılaştırılır. Bu yöntem çok sayıda genin aynı anda değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

NGS işleminin yapılabilmesi için hastaya ait çift sarmallı nükleer DNA'ya ihtiyaç vardır. En sık kullanılan DNA kaynağı tam kandan steril olarak elde edilen lökositlerdir. Ağız içi sürüntü gibi non-steril kaynaklardan elde edilen örnekler bakteri DNA'sı ile kontamine olabileceğinden genellikle tercih edilmemektedir[15]. DNA izolasyonu işlemi parafin veya formalin ile fikse edilmiş doku örneklerinden de yapılabilir.

NGS ile tüm genomun dizilenmesi mümkündür. Ancak bu işlem çok maliyetlidir. Bu yüzden günümüzde ekzom dizileme veya gen panelleri kullanılmaktadır. Ekzomlar tüm genomun %2'sini oluşturan ve proteinleri kodlayan gen bölgeleridir. Hastalığa neden olduğu bilinen genlerin %85'i ekzomlarda yerleşmiştir. Ekzom dizilemenin en büyük dezavantajı, genomun ekzom dışı bölümünde yer alan genetik bozuklukları saptayamamasıdır. Ekzom dizilemenin tanı koyamadığı durumlarda tüm genom dizilemesi yapılabilir. Gen panelleri kullanılarak belirli hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülen gen bölgeleri spesifik olarak dizilenebilir. Genelde tek seferde 10-200 arası gen çalışılır. Ekzom dizilemeye göre daha düşük maliyetlidir ve sadece hedeflenmiş genler çalışıldığından, hastalıkla ilişkisiz mutasyonların tespit edilmesi riski daha düşüktür. Elde edilen sonuçların doğruluk oranlarına bakıldığında gen dizilemede altın standart metot hala konservatif dizileme metotlarıdır. Bu yöntemlerin doğruluk oranı %99.99'dur. Yeni nesil dizileme metotları arasında doğruluk oranı en yüksek olan yöntem %96'nın üzerinde doğruluk oranına sahip olan gen paneli dizileme metodudur. Tüm genom dizileme ve ekzom dizileme metotlarının doğruluk oranı %92-96 arasında bulunmuştur[16].

NGS işlemi günümüzde yüksek riskli aile öyküsü bulunan kadınların herediter kanser sendromları açısından detaylı olarak taranmasında ve profilaktik mastektomi planlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları kadınlarda herediter meme kanserinin en bilinen nedenleri olmakla birlikte yapılan çalışmalarda meme kanseri riskini anlamlı şekilde artıran birçok gen tanımlanmıştır.

a. TP53: Tümör protein P53 geninin patolojik varyantları Li-Fraumeni Sendromu ile ilişkilidir. Bu hastalarda 60 yaşına kadar meme kanseri geliştirme riski %50 civarında bulunmuştur. Meme kanseri daha sıklıkla premenopozal dönemde görülür. Bu hastalarda radyasyon nedenli sekonder tümör odaklarının engellenmesi amacıyla meme koruyucu cerrahiden kaçınılması önerilmektedir[17].

b. STK11: Serin/treonin kinaz 11 geninin patolojik varyantları Peutz-Jeghers Sendromu ile ilişkilidir. Bu hastalarda meme kanseri riski %55 olarak bulunmuştur[18]. Ortalama meme kanseri gelişme yaşı 37'dir. Bu hastalarda genç yaştan itibaren MR ile tarama önerilmektedir. Profilaktik mastektomi açısından fikir birliği olmamakla birlikte meme kanseri açısından yüksek riskli aile öyküsü olan hastalarda düşünülebilir.

c. PTEN: PTEN geni tümör supresör bir gendir ve patolojik varyantları meme, endometriyum, over ve tiroid malignitesi gelişimi açısından yüksek risk oluşturur. Yapılan çalışmalarda bu

hastalarda hayat boyu meme kanseri gelişim riski %85 bulunmuştur[19]. Bu hastalara profilaktik mastektomi önerilmektedir. Fakat genç yaştan itibaren MR ile yakın takip de yapılabilir.

d. CDH1: Bu genin patolojik varyantları hereditör diffüz gastrik kanser sendromu ile ilişkilidir. Bu hastalarda invaziv lobüler meme kanseri gelişim riski %50-60 civarındadır. Profilaktik mastektomi açısından yeterli delil yoktur ancak yüksek riskli hasta grubunda önerilebilir. Genç yaştan itibaren MR ile tarama önerilmektedir[20].

e. MSH1, MLH1, MSH6, PMS2 ve EPCAM: MSH1, MLH1, MSH6, PMS2 genleri “*mismatch repair (MMR)*” genleri olarak adlandırılır. MMR genleri ve EPCAM geninin patolojik varyantları Lynch Sendromu ile ilişkilidir. Bu hastalarda artmış kolon, mide, endometrium ve over malignitesi riski gözlenir. Meme kanseri riskinin arttığını gösteren çalışmalar olmasına rağmen profilaktik mastektomi önerilecek düzeyde kanıt yoktur.

f. PALB2: PALB2 geni BRCA-ilişkili protein üretimini kodlayan gendir. BRCA2-PALB2 etkileşimi BRCA2 geninin tümör supresör aktivitesini yerine getirebilmesi için oldukça önemlidir. Bu genin monoallel patolojik varyantını taşıyan kadınlarda meme kanseri riskinin, aile öyküsüne bağlı olarak %33-58 oranında arttığı belirlenmiştir[21]. Bu kadınlarda 30 yaşından itibaren MR ile

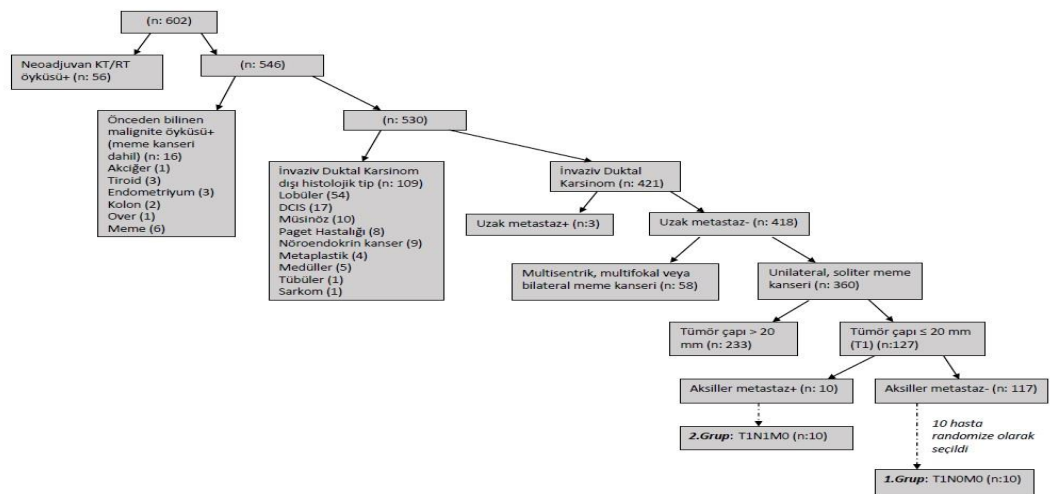
tarama önerilir. Yüksek risk grubunda olan kadınlarda profilaktik mastektomi önerilebilir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta Seçimi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında Ocak 2015 – Aralık 2017 tarihleri arasında meme kanseri tanısıyla mastektomi yapılan 602 adet kadın hasta retrospektif olarak incelendi. Daha önce bilinen malignite öyküsü olan hastalar, mastektomi öncesi neoadjuvan KT/RT öyküsü olan hastalar, invaziv duktal karsinom dışı histolojik tanısı olan hastalar, multisentrik, multifokal veya bilateral kanser tanılı hastalar, uzak metastazı olan hastalar ve tümör boyutu 2 cm’den büyük olan hastalar çalışmadan çıkarıldı. Geride kalan 127 hasta aksiller metastaz durumlarına göre 2 gruba ayrıldı. Aksiller metastazı bulunan 10 hasta “1.Grup”a dahil edildi. Aksiller metastazı bulunmayan 117 hastadan 10 tanesi randomize olarak seçildi ve “2.Grup” oluşturuldu. (Şekil-4)



Şekil 4. Hasta seçimi

3.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Hastalara ait mastektomi materyallerinden elde edilen formaline fikse edilmiş parafin tespitli doku blokları deneyimli bir patolog tarafından değerlendirildi. Nekroz oranı düşük, tümör hücre yoğunluğu en yüksek bloklar seçildi. Bu bloklardan 7-8 µm kalınlığında 2'şer adet kesit alındı. Kesitler Eppendorf tüplerine konulup oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3. DNA İzolasyonu

Eppendorf tüplerinde muhafaza edilen örnekler, deparafinizasyon solüsyonu eklendikten sonra, 56°C'de 3 dakika süreyle inkübe edildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra nükleik asitlerin formaldehit modifikasyonunu geriye çevirmek amacıyla örnekler RNAz içermeyen su, Buffer FTB ve proteinaz K eklendi. Örnekler 90°C'de 1 saat inkübe edildi ve kısaca santrifüjlendi. Tüplerin alt kısımlarında kalan berrak faz ayrılıp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı, su ve UNG eklendi ve 50°C'de bir saat inkübe edildi. Daha sonra bu örnekler QIAcube cihazına yüklendi. Elde edilen izole DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

3.4. DNA Ölçümü ve NGS İşlemi

Örneklerdeki DNA miktarı, Qubit dsDNA HS Assay Kit kullanılarak Qubit cihazında ölçüldü. Fragmentasyon aşamasında elde edilen genomik DNA örneği, kontrollü bir multi enzim reaksiyon ile fragmente edildi, end repair yapıldı ve A-tail eklendi. Hazır DNA fragmanları 5' uçlarından PCR reaksiyonu ile

bağlandı. Daha sonra ligasyon solüsyonu kullanılarak adaptör bağlanması aşaması yapıldı. Adaptör bağlanan DNA, QIAseq Bead solüsyonu kullanılarak temizlendi. Bead temizliğini takiben bir bölge spesifik primer ve bir universal primer seti kullanılarak PCR’da hedef zenginleştirme gerçekleştirildi. PCR sonrası tekrar QIAseq Bead solüsyonu ile temizlik yapıldı. Temizlik sonrası oluşturulan kitaplık ürünlerinin kalite kontrolü QIAxcel DNA High Sensitivity kit kullanılarak gerçekleştirildi. Kalite kontrolü sonrası uygun bp boyutu gösteren örneklerle MiSeq cihazı kullanılarak sekans analizi yapıldı.

3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler FASTQ dosyası şeklinde alındı. QIAGEN Clinical Insight programı kullanılarak veriler düzenlendi. Göreceli ekspresyon değerleri her örnek için Count-Per-Million (CPM) olarak hesaplandı. 3 CPM altı ortalama ekspresyon değerine sahip genler ve bilinen klinik önemi olmayan mutasyonlar çalışma dışı bırakıldı. Her iki gruba ait karşılaştırılacak veriler Statistical Program for Social Science (SPSS) 15.0 versiyonu programından yararlanılarak bilgisayara kaydedildi. Nümerik değerler Mann-Whitney-U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Kliniğimizde Ocak 2015 - Aralık 2017 tarihleri arasında meme kanseri nedeniyle mastektomi yapılan hastalar retrospektif olarak incelendi. Uygun kriterlere sahip 10'ar adet hastadan oluşan iki grup; yaş, tümör çapı, çıkarılan toplam lenf nodu sayısı, metastatik lenf nodu sayısı ve NGS işlemi sonrası saptanan genetik mutasyonlarına göre karşılaştırıldı. Tüm çalışma grubunun ortalama yaşı 63,9 (SS=11,17), ortalama tümör çapı 15,35 (SS=3,88) ve hastalardan cerrahi sırasında çıkarılan toplam lenf nodu sayısı ortalama 13,3 (SS=7,58) olarak bulundu. Aksiller metastazı mevcut olan hastalarda ortalama 2,3 (SS=1,56) adet metastatik lenf nodu tespit edildi (Tablo-3). İki grup karşılaştırıldığında metastatik grupta bulunan hastaların diğer grupta bulunan hastalara göre anlamlı olarak daha genç olduğu ($p=0,011$) ve bu gruptaki hastalara daha geniş lenf nodu diseksiyonu yapıldığı görüldü ($p=0,011$).

	1.Grup (N =10)	2.Grup (N = 10)	Toplam (N = 20)
Yaş (yıl)	57 (46-73)	72,5 (48-82)	63 (46-82)
Tümör Boyutu	17,5 (8-20)	14,5 (10-20)	15 (8-20)
Çıkarılan LN	16,5 (7-26)	6,5 (2-22)	14,5 (2-26)
Metastatik LN	1,5 (1-5)	0	0,5 (0-5)
ER(+)	9 (%90)	9 (%90)	18 (%90)
ER(-)	1 (%10)	1 (%10)	2 (%10)
HER2 (+)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
HER2 (-)	10 (%100)	10 (%100)	20 (%100)
ki67 (%)	10 (2-70)	12,5 (2-30)	10 (2-70)

Tablo 3. Gruplara ait klinik özellikler

Hastalara ait parafin bloklar uygun şekilde hazırlanıp, DNA izolasyonu yapıldıktan sonra QIAGEN meme kanseri paneli kullanılarak NGS işlemi yapıldı. Toplam 93 adet genin tüm ekzon bölgeleri mutasyon açısından tarandı. 3 CPM'nin altında okuma değerleri olan ve bilinen klinik patojeniteye sahip olmayan mutasyonlar dışlandıktan sonra toplam 31 gene ait 131 adet farklı mutasyon saptandı. En sık mutasyon saptanan gen KMT2C geni olarak bulundu. Her iki grupta da tüm hastalarda KMT2C genine ait en az bir adet mutant varyant saptandı. Tek başına varyantlar değerlendirildiğinde en sık saptanan mutasyonlar, PMS2 genine ait *p.V63M c.187G>A* (%100) mutasyonu ve KMT2C genine ait *p.R973G c.2917A>G* (%95) olarak bulundu. Her iki grup karşılaştırıldığında, gruplar arasında farklılık gösteren mutasyonlar; KMT2C genine ait *p.Y987* c.2961C>G* (%60-%90), NF1 genine ait *p.T467I c.1400C>T* (%60-%30), PIK3CA genine ait *p.E545A c.1634A>C* (%40-%0), PIK3CA genine ait *p.H1047R c.3140A>G* (%0-%40) ve NF1 genine ait *c.2325+3A>G* (%40-%10) olarak bulundu. Aksiller metastaz bulunan grupta PIK3R1 genine ait 2 adet mutasyon izlenirken, aksiller metastaz bulunmayan grupta bu gene ait metastaz izlenmedi. Gruplarda izlenen genetik mutasyonlar Tablo-4'te detaylı olarak gösterilmiştir.

	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A1 0	Topla m	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7	B 8	B 9	B1 0	Topla m
ABRAXAS1 p.L135* c.404T>G											20%											30%
AKT1 p.E17K c.49G>A											0%											10%
APC p.E1663fs*6 c.4985dupT											0%											10%
APC p.I632fs*2 c.1893dupT											10%											0%
AR p.L57del c.170_172delITGC											20%											0%
AR p.L57Q c.170T>A											40%											40%
ATM p.A2986E c.8957C>A											0%											10%
ATM p.D2085fs*3 c.6254dupA											10%											0%
ATM p.H192fs*12 c.573dupT											0%											10%
ATM p.L55fs*2 c.161_162dupAT											10%											0%
ATM p.V194fs*12 c.579delT											0%											10%
ATR p.G481fs*2 c.1442delG											10%											0%
ATR p.H1449fs*34 c.4346dupA											10%											0%
ATR p.I774fs*5 c.2320delA											40%											50%
ATR p.L182fs*3 c.543dupA											0%											10%
ATR p.L809* c.2426T>A											10%											0%
ATR p.N1031* c.3089_3090dupTA											0%											10%
BARD1 p.A40fs*19 c.115_116dupGC											10%											0%
BARD1 p.A613del c.1838_1840delCAG											0%											10%
BARD1 p.C362fs*10 c.1083dupA											0%											10%
BARD1 p.M621fs*14 c.1861dupA											0%											10%
BRCA1 p.I946fs*55 c.2836_2837insAA											10%											0%
BRCA1 p.N243fs*5 c.727_728dupAA											0%											10%
BRCA2 c.8754+2_8754+5dupTGAG											0%											10%
BRCA2 p.E1806fs*10 c.5414_5415dupAT											10%											0%
BRCA2 p.F1241* c.3720_3721delGT											10%											0%
BRCA2 p.I1436fs*2 c.4306dupA											0%											10%
BRCA2 p.Q3206* c.9616C>T											10%											0%
BRCA2 p.R2949* c.8844dupT											0%											10%
BRCA2 p.S3303fs*24 c.9906dupG											0%											10%
BRCA2 p.Y2854* c.8561dupA											0%											10%
CDH1 p.Q23* c.67C>T											10%											0%
CDH1 p.R524fs*34 c.1569_1570insTT											0%											10%
CDKN2A p.A127fs*14 c.379_380delGC											0%											10%
CDKN2A p.A134fs*13 c.398_399dupCT											0%											10%
CDKN2A p.E120fs*21 c.357_358delGG											0%											10%
CDKN2A p.L65del c.192_194delGCT											0%											10%
CHEK2 p.D101fs*7 c.302dupA											0%											10%
CHEK2 p.L380fs*14 c.1139_1140delTC											10%											0%

5. TARTIŞMA

Meme kanserinde gen ekspresyon çalışmaları, meme kanserinin ve metastazın biyolojisini anlamak amacıyla sıkça yapılmaktadır. Bu çalışmalarda amaç, ilaç gelişimine katkı sağlamak, ilaç direncinin mekanizmasını anlamak veya prognostik gen ekspresyon kalıplarını keşfetmektir. Yakın tarihte, teknolojinin de ilerlemesiyle, meme kanseri patogenezinde rol alan birçok genetik mutasyon tanımlanmıştır.

PIK3CA geni fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) enziminin bir subuniti olan p110 α proteinini kodlayan gendir. PI3K enzimi hücre içi fosforilasyondan sorumludur ve hücre büyümesi ve çoğalmasını indükler. PIK3CA geninin overekspresyonu ilk olarak kolorektal kanser etyolojisinde tanımlanmıştır. Campbell ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri hastalarında %40 oranda PIK3CA gen mutasyonu saptamışlardır. PIK3CA gen mutasyonları iyi prognozla ilişkilendirilmiştir[22]. Kalinsky ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada PIK3CA gen mutasyonuna sahip hastaların daha düşük grade, daha düşük aksiller metastaz oranı ve daha yüksek hormon pozitiflik oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada bu mutasyona sahip hastaların genel ve hastalıksız sağkalımları anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur[23]. Bizim çalışmamızda PIK3CA gen mutasyonu hastaların 13 tanesinde (%65) saptanmıştır. *p.E545A c.1634A>C* mutasyonu çıkarıldığında diğer mutasyonlar belirgin olarak aksiller metastazı olmayan grupta daha sık görülmüştür. Bu sonuç literatürü destekler niteliktedir. Ancak *p.E545A c.1634A>C* mutasyonu 4 hastada saptanmıştır ve bu hastaların tümünün metastatik olduğu gözlenmiştir. Bu durum

literatürle ters düşmekle birlikte daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyan bir konu da olabilir.

Çalışmamızda en sık KMT2C genine ait mutasyonlar izlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda bu gene ait en az bir adet, toplamda 23 adet farklı mutasyon saptanmıştır. KMT2C geni myeloid/lenfoid lenfoma gen ailesinin bir üyesi olan, protein kodlayan bir gendir. Birçok kanserin gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir[24]. Chen ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmada meme kanserinde %8-14 oranında saptanmıştır, ancak prognoz üzerine etkisi bulunamamıştır[25]. Bizim çalışmamızda bu gene ait saptanan en sık mutasyon *p.R973G c.2917A>G* mutasyonudur ve hastaların %95'inde gözlenmiştir. KMT2c genine ait saptanan tüm mutasyonlar değerlendirildiğinde her iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

ABRAXAS1 geni, BRCA1 genine bağlanarak bu genin DNA tamir fonksiyonunu sağlayan Abraxas adlı bir proteini kodlar. Bu genin fonksiyon kaybının BRCA1 geni üzerinden herediter meme kanseri etyolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir[26]. Bak ve arkadaşlarının 2018 yılında Polonya'da BRCA1(-) herediter kanser tanılı ailelere mensup hastalar üzerinde yaptığı çalışmada bu gene ait iki adet missense (*c.422C>T* ve *c.1042G>A*) ve iki adet intronik (*IVS3-34G>A* ve *IVS3-44T>C*) mutasyon saptanmıştır[27]. Ancak hasta grup ve kontrol grubu arasında görülme sıklığı açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda ABRAXAS1 geninde *p.L135* c.404T>G* mutasyonu saptanmıştır, ancak iki grup arasında görülme sıklığı açısından fark bulunamamıştır.

AKT1 geni PI3K/AKT/MTOR yolağının aktivasyonu üzerinden etkili olan onkojenik bir serin/treonin protein kinazdır. AKT1 gen mutasyonlarının meme kanserinde görülme sıklığı %3-5 olup, en sık görülen varyant *p.E17K c.49G>A* mutasyonudur[28]. Bizim çalışmamızda da AKT1 geninde bu varyant metastatik gruptan 1 (%10) hastada saptanmış olup, aksiller lenf nodu metastazı olmayan grupta hiçbir hastada saptanmamıştır. Tüm çalışma grubunda görülme oranı literatüre paralel %5 olarak saptanmıştır. Hasta sayısının düşük olması ve nadir bir mutasyon olması nedeniyle aksiller lenf nodu üzerine etkisi tam olarak değerlendirilememiştir.

APC geni Wnt sinyal yolağının inhibitörü olarak işlev gören bir tümör supresör gendir. En sık kolon kanseriyle ilişkilendirilmiştir. 2017 yılında Li ve arkadaşlarının kolon kanseri tanılı 60 hastanın rezeksiyon materyalleri üzerinde PCR kullanarak yaptığı çalışmada APC geninde mutasyon görülme oranı %68 olarak bulunmuştur[29]. Meme kanseri gelişiminde ve bu hastaların tedaviye direnç göstermesindeki rolü uzun zamandır araştırılmaktadır. Bizim çalışmamızda tüm çalışma grubunda görülme oranı %10 saptanmış olup, gruplar arasında farklılık görülmemiştir.

AR (androjen reseptör) geni hücre proliferasyonu üzerine etkili bir onkojendir. AR ekspresyonu meme kanserinde özellikle ER ile birlikte sıklıkla görülmektedir. Yapılan çalışmalarda meme kanseri hastalarında AR ekspresyonu %60-70 arasında bulunmuştur[30]. AR ekspresyonu gösteren hastaların daha uzun sağkalım sürelerine sahip olduğu gösterilmiştir[31]. Bizim çalışmamızda tüm çalışma grubunda 8 (%40) hastada AR geninde mutasyon saptanmıştır. Bu

hastaların iki grup arasında eşit olarak dağıldığı görülmüştür ve AR gen mutasyonlarının aksiller nodal yayılım üzerine etkisi gösterilememiştir.

ATM geni PI3/PI4-kinaz ailesine ait bir proteini kodlar. Bu protein p53 ve BRCA1 gibi tümör supresör genlerin çalışmasında büyük öneme sahiptir. ATM gen mutasyonları birçok kanserin patogenezinde etkilidir. Son dönemde yeni nesil gen sekanslama metotlarının gelişmesiyle ATM gen mutasyonlarının sporadik kanserlerde en sık görülen mutasyonlardan biri olduğu gösterilmiştir. 2001 yılında Dörk ve arkadaşları tarafından meme kanseri tanılı 192 hastada, PCR kullanılarak yapılan çalışmada ATM genine ait mutasyon görülme oranı %46 olarak bulunmuştur[32]. Chuanzhong ve arkadaşlarının 2007 yılında 471 hasta üzerinde yaptığı çalışmada ATM genindeki mutasyonların kötü prognoz ve kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur[33]. Bizim çalışmamızda ATM gen mutasyonları tüm çalışma grubunda 3 (%15) hastada izlenmiştir. Gruplar arasında görülme oranı benzer bulunmuştur (%20/%10).

ATR geni serin/treonin kinaz ailesinden, DNA hasar sensörü olarak işlev gören bir proteini kodlar. Bu protein DNA replikasyonunu ve mitozisi inhibe edip, apoptozu uyaran proteinleri fosforile ederek çalışır. ATR geninin 10 numaralı ekzonundaki somatik mutasyonlar endometrium tümörlerinde tanımlanmıştır[34]. ATR mutasyonları bu hastalarda kötü prognozla ilişkilidir. 2019 yılında Chang ve arkadaşları meme kanseri tanılı 24 hastada NGS kullanarak yaptıkları çalışmada ATR genine ait *p.V1581fs* mutasyonunu tanımlamıştır[35]. Bizim çalışmamızda tüm çalışma grubunda 5 adet farklı mutasyon saptanmıştır, bu mutasyonlar 13

(%65) hastada tespit edilmiştir. Gruplar arasında görülme oranı benzer bulunmuştur (%70-%60).

BRCA1 ve BRCA2 meme kanseri patogenezinde rol oynadığı uzun süredir bilinen genlerdir. Tüm meme kanseri vakalarının %5-10'u herediterdir[36]. Herediter meme kanseri gelişimde en büyük rolü BRCA1 ve BRCA2 genleri üstlenmiştir[37]. Herediter meme kanseri tanılı ailelerde BRCA1 mutasyonu görülme oranı %40 olarak saptanmıştır[38]. Atchley ve arkadaşları 2008 yılında sporadik meme kanseri tanılı 491 hasta ile yaptıkları çalışmada BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının görülme oranını sırasıyla %11,4 ve %6,1 olarak saptamışlardır. Bu çalışmada BRCA gen mutasyonu taşıyan hastaların tümör özellikleri, tanı yaşı ve sağ kalım süresinde belirgin farklılık izlenmemiştir[39]. Bizim çalışmamızda tüm çalışma grubunda BRCA1 mutasyonu 2 (%10) hastada, BRCA2 mutasyonu 5 (%25) izlenmiştir. BRCA1 mutasyonu her iki grupta eşit olarak saptanmıştır. BRCA2 mutasyonu ise lenf nodu metastazı bulunan grupta %30, bulunmayan grupta %20 olarak izlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. BARD1 geni BRCA1 geninin N-terminal bölgesine bağlanıp, BRCA1 geninin tümör supresör etkisini düzenleyen bir proteini kodlar. BARD1 genindeki mutasyonlar BRCA1 üzerinden meme kanseri patogenezi ile ilişkilendirilmiştir[40]. Rana ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmada meme kanserinde BARD1 mutasyonu görülme oranı %3,6 olarak bulunmuştur[41]. Chen ve arkadaşlarının yine 2019 yılında yaptığı bir başka çalışmada BARD1 mutasyonları kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir[42]. Bizim çalışmamızda her iki grupta da birer adet olmak üzere toplam 2 (%10) BARD1

gen mutasyonu saptanmıştır. İki grup arasında farklılık saptanmamasına rağmen BARD1 mutasyonu taşıyan hastalarda eş zamanlı olarak BRCA gen mutasyonu izlenmesi dikkat çekicidir.

CDH1 geni kadherin proteinini kodlayan gendir. Diffüz mide kanseri ve invaziv lobüler meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir[43]. Yapılan çalışmalarda meme kanseri tanılı hastalarda CDH1 mutasyonu görülme oranı %5-10 arasında bulunmuştur[44]. 2016 yılında Liu ve arkadaşları tarafından meme kanseri tanılı 137 hastada yapılan çalışmada CDH1 mutasyonunun kötü prognoz ve kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir[45]. Bizim çalışmamızda CDH1 geninde patojenik özellik gösteren iki farklı mutant varyant saptanmıştır. Bu varyantların tüm çalışma grubu içinde görülme oranı %10 olarak izlenmiş ve her iki grup arasında farklılık saptanmamıştır.

CDKN2A geni CDK4 kinaz inhibisyonu ile etki gösteren tümör supresör bir gendir. Bu genin fonksiyon kaybı birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiştir. 2005 yılında Debniak ve arkadaşları tarafından meme kanseri tanılı 4209 hasta ve 3000 kişiden oluşan kontrol grubu üzerinde yapılan araştırmada CDKN2A geninde saptanan *A148T* mutasyonunun meme kanseri patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir[46]. 2019 yılında Seifi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada CDKN2A mutasyonlarının yüksek grade ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir[47]. Bizim çalışmamızda tüm çalışma grubunda 4 (%20) hastada bu gene ait patojenik mutant varyant saptanmıştır. Mutasyon saptanan hastaların tümünün metastatik grupta saptanması dikkat çekicidir.

CHEK2 geni hücre bölünmesinin kontrol basamaklarından G1 fazında görev alan bir proteini kodlayan, tümör supresör özellik gösteren bir gendir. 2002’de yapılan bir çalışmada normal popülasyonda ve BRCA mutasyonu taşımadığı bilinen herediter meme kanseri tanılı hastalarda görülme oranı sırasıyla %1,1 ve %5,1 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada CHEK2 mutasyonunun kadınlarda meme kanseri riskini 2 kat artırdığı saptanmıştır[48]. Çalışmamızda toplam 11 (%55) hastada CHEK2 gen mutasyonu izlenmiştir. Gruplar arasında farklılık saptanmamıştır (%50-%60).

EGFR geni protein kinaz ailesine üye bir transmembran proteinini kodlar. Hücre bölünmesinde ve proliferasyonda etkilidir. Aktivasyonunun birçok malignite ile ve kötü prognoz ile ilişkisi tanımlanmıştır. 2007 yılında Rakha ve arkadaşları tarafından meme kanseri tanılı 1944 hasta üzerinde yapılan araştırmada EGFR gen mutasyonu görülme oranı %19 olarak bildirilmiştir[49]. Lee ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada EGFR mutasyonunun hastalıksız ve ortalama sağ kalım üzerine etkili bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır[50]. Çalışmamızda EGFR geninde aktivasyona neden olan bir adet mutant varyant saptanmıştır. *p.G724S c.2170G>A* mutasyonu tüm çalışma grubunda sadece non-metastatik gruba dahil 1 (%5) hastada saptanmıştır. Bu bulgular literatürle çelişmektedir ve daha doğru bir karşılaştırma yapabilmek için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ERBB2 veya daha sık kullanılan adıyla HER2 geni meme kanseri patogenezinde etkili olduğu uzun zamandır bilinen ve üzerinde çokça çalışılmış bir gendir. HER2 overekspresyonu invaziv meme kanserinde %20 oranda

görülmektedir ve kötü prognoz ile ilişkilidir[51]. Çalışmamızda HER2 mutasyonu metastatik grupta %10 oranda saptanmıştır. Non-metastatik grupta ise hiçbir hastada saptanmamıştır. Ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.

ERCC4 geni DNA tamirinde rol alan bir proteini kodlar. Bu protein ERCC1 ile kompleks oluşturur ve nükleoid tamiri sırasında 5' ucunun insizyonu işleminde rol alır. 2009 yılında meme kanseri tanılı 30000 hasta ve 30000 kişiden oluşan kontrol grubu üzerinde yapılan bir araştırmada ERCC4 mutasyonunun görülme sıklığı %27,5 olarak bildirilmiştir[52]. ERCC4 gen mutasyonlarının prognoz üzerine etkisi tartışmalı bir konudur ve bu konuda yeterli çalışma yoktur. Bizim çalışmamızda tüm çalışma grubunda 3 (%15) hastada ERCC4 mutasyonu saptanmıştır. Bu hastaların tümünün metastatik grupta olması özellikle ilgi çekicidir.

NBN geni Nibrin proteinini kodlayan gendir. Nibrin DNA çift sarmal kırıklarının tamirinde rol alır. Yapılan çalışmalarda NBN gen mutasyonlarının meme kanseri riskini 2-3 kat artırdığı gösterilmiştir[53]. 2013 yılında Cybulski ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada prostat kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir[54]. Meme kanserinde prognoz üzerine etkisi hakkında literatürde yeterli bilgi yoktur. Çalışmamızda NBN gen mutasyonu 3 (%15) hastada saptanmıştır. Görülme oranı metastatik hastalarda daha yüksek bulunmuştur.

NF1 geni nörofibromin proteinini kodlar. Bu protein Ras-GTP'nin Ras-GDP'ye intrinsik hidrolizini uyararak Ras-MAPK yolu üzerindeki

sinyalizasyonu azaltarak kontrolsüz hücre bölünmesini engeller. NF1 geninde işlev kaybı kontrolsüz hücre bölünmesine ve kanser gelişimine neden olur. Azalmış NF1 ekspresyonunun artmış meme kanseri gelişim riskiyle ilişkisi bildirilmiştir[55]. NF1 mutasyonu taşıyan meme kanseri hastaları daha kötü prognoza sahiptir[56]. Çalışmamızda NF1 genine ait 14 adet farklı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlardan çalışma grubumuzda en sık görüleni *p.G127E c.380G>A* mutasyonu olmuştur. 13 hastada görülmüştür ve gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. *p.T467I c.1400C>T* mutasyonu metastatik grupta belirgin olarak daha saptanmıştır. Aksiller nodal yayılım üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

RB1 ve TP53 genleri tümör supresör genlerdir ve hücre siklusunda negatif regülatör olarak rol alırlar. Mutasyonlarının meme kanserinde görülme oranı sırasıyla %58 ve %23 olarak bildirilmiştir[57]. RB1 geninin prognoz üzerine etkisi bulunmamıştır. Ancak TP53 gen mutasyonlarının kötü prognoz üzerine etkisi tanımlanmıştır. Çalışmamızda RB1 ve TP53 genlerinde sırasıyla 4 ve 2 farklı mutasyon saptanmıştır. RB1 gen mutasyonları gruplar arasında eşit dağılırken, TP53 gen mutasyonları metastatik grupta daha sık izlenmiştir. Bu durum literatürü destekler niteliktedir.

STK11 geni serin/treonin kinaz ailesinden bir proteini kodlar. Tümör supresör özellik gösterir. Mutasyonları Peutz-Jeghers Sendromuna neden olur. Bu sendromda artmış meme kanseri riski (20 kat) tanımlanmıştır. Aynı zamanda bu gene ait somatik mutasyonların PJS dışında da meme kanseri riskini artırdığı

bildirilmiştir[58]. Bizim çalışmamızda toplam 4 (%20) hastada STK11 mutasyonu izlenmiştir. Gruplar arasında fark saptanmamıştır.



6. SONUÇLAR

Yaptığımız çalışmada literatürde patojenik veya yüksek ihtimalle patojenik olarak sınıflandırılan toplam 31 gende 131 adet farklı mutasyon saptandı. Özellikle PIK3CA, NF1, MSH6, PIK3R1, CDKN2A ve ERCC4 gen mutasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasa da sayısal olarak metastatik grupta daha fazla bulunduğu saptanmıştır. Bu genlerin aksiller metastaz üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için daha geniş hasta grupları üzerinde, daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Greenlee, R.T., et al., *Cancer statistics, 2000*. 2000. **50**(1): p. 7-33.
2. Fitzgibbons, P.L., et al., *Prognostic Factors in Breast Cancer*. 2000. **124**(7): p. 966-978.
3. Sainsbury, J.R.C., *Diseases of the breast*. J. R. Harris, M. E. Lippman, M. Morrow and S. Hellman (eds). 285 × 225 mm. Pp. 1047. Illustrated. 1996. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven. £118. 1996. **83**(11): p. 1660-1660.
4. Earl, H., Donegan WL, Spratt JS: *Cancer of the Breast 5th Edition*. London, UK: Elsevier Science Ltd.; 2002. 1050pp. Breast Cancer Research, 2004. **6**(2): p. 88.
5. Buckley, E., et al., *Risk profile of breast cancer following atypical hyperplasia detected through organized screening*. Breast, 2015. **24**(3): p. 208-12.
6. Nutter, E.L., et al., *Personal history of proliferative breast disease with atypia and risk of multifocal breast cancer*. Cancer, 2018. **124**(7): p. 1350-1357.
7. Amin, M.B., et al., *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(2): p. 93-99.
8. Corsetti, V., et al., *Breast screening with ultrasound in women with mammography-negative dense breasts: Evidence on incremental cancer*

- detection and false positives, and associated cost. European Journal of Cancer, 2008. 44(4): p. 539-544.*
9. Anders, C.K., et al., *Breast cancer before age 40 years. Seminars in oncology, 2009. 36(3): p. 237-249.*
 10. Page, D.L., *Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. The American journal of surgical pathology, 1991. 15(4): p. 334-349.*
 11. International Breast Cancer Study, G., *Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. The Lancet, 1990. 335(8705): p. 1565-1568.*
 12. Dunnwald, L.K., M.A. Rossing, and C.I. Li, *Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. Breast Cancer Research, 2007. 9(1): p. R6.*
 13. Lazovich, D., et al., *Underutilization of Breast-Conserving Surgery and Radiation Therapy Among Women With Stage I or II Breast Cancer. JAMA, 1991. 266(24): p. 3433-3438.*
 14. Bennett, S.T., et al., *Toward the 1,000 dollars human genome. Pharmacogenomics, 2005. 6(4): p. 373-82.*
 15. Hong, Y.C., et al., *Hair follicle: a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 2007. 40(9): p. 871-4.*

16. Strom, S.P., et al., *Assessing the necessity of confirmatory testing for exome-sequencing results in a clinical molecular diagnostic laboratory*. Genet Med, 2014. **16**(7): p. 510-5.
17. Cho, Y., et al., *A case of late-onset Li-Fraumeni-like syndrome with unilateral breast cancer*. Ann Lab Med, 2013. **33**(3): p. 212-6.
18. Giardiello, F.M., et al., *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1447-53.
19. Tan, M.H., et al., *Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(2): p. 400-7.
20. Hansford, S., et al., *Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond*. JAMA Oncol, 2015. **1**(1): p. 23-32.
21. Antoniou, A.C., et al., *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 497-506.
22. Campbell, I.G., et al., *Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7678-81.
23. Kalinsky, K., et al., *PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5049-59.
24. Rao, R.C. and Y. Dou, *Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 334-46.
25. Chen, X., et al., *Association between histone lysine methyltransferase KMT2C mutation and clinicopathological factors in breast cancer*. Biomed Pharmacother, 2019. **116**: p. 108997.

26. Wang, B., et al., *Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response*. Science (New York, N.Y.), 2007. **316**(5828): p. 1194-1198.
27. Båk, A., et al., *Original paper Searching for new breast cancer-associated genes. ABRAXAS1 gene mutations in the group of BRCA1-negative patients*. Polish Journal of Pathology, 2019. **69**.
28. Yi, K.H. and J. Lanning, *Recurrent AKT mutations in human cancers: functional consequences and effects on drug sensitivity*. Oncotarget, 2016. **7**(4): p. 4241-4251.
29. Li, B.-Q., P.-P. Liu, and C.-H. Zhang, *Correlation between the methylation of APC gene promoter and colon cancer*. Oncology letters, 2017. **14**(2): p. 2315-2319.
30. Moinfar, F., et al., *Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies*. Cancer, 2003. **98**(4): p. 703-11.
31. Schippinger, W., et al., *Evaluation of the prognostic significance of androgen receptor expression in metastatic breast cancer*. Virchows Archiv, 2006. **449**(1): p. 24-30.
32. Dork, T., et al., *Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(20): p. 7608-15.

33. Ye, C., et al., *Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival*. Cancer, 2007. **109**(9): p. 1729-1735.
34. Lewis, K.A., et al., *Heterozygous ATR Mutations in Mismatch Repair–Deficient Cancer Cells Have Functional Significance*. Cancer Research, 2005. **65**(16): p. 7091.
35. Chang, Y.S., et al., *Pathway mutations in breast cancer using whole-exome sequencing*. Oncol Res, 2019.
36. Claus, E.B., N. Risch, and W.D. Thompson, *Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(2): p. 232-42.
37. Miki, Y., et al., *A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
38. Karppinen, S.M., et al., *Mutation screening of the BARD1 gene: evidence for involvement of the Cys557Ser allele in hereditary susceptibility to breast cancer*. Journal of Medical Genetics, 2004. **41**(9): p. e114.
39. Atchley, D.P., et al., *Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(26): p. 4282-8.
40. Hashizume, R., et al., *The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14537-40.

41. Rana, H.Q., et al., *Prevalence of germline variants in inflammatory breast cancer*. Cancer, 2019.
42. Chen, Y.-Z., et al., *Bioinformatics Analysis of Expression and Alterations of BARD1 in Breast Cancer*. Technology in cancer research & treatment, 2019. **18**: p. 1533033819892260-1533033819892260.
43. Xicola, R.M., et al., *Clinical features and cancer risk in families with pathogenic CDH1 variants irrespective of clinical criteria*. Journal of Medical Genetics, 2019. **56**(12): p. 838.
44. Lei, H., et al., *CDH1 mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk*. Int J Cancer, 2002. **98**(2): p. 199-204.
45. Liu, J., et al., *CDH1 promoter methylation correlates with decreased gene expression and poor prognosis in patients with breast cancer*. Oncology letters, 2016. **11**(4): p. 2635-2643.
46. Dębniak, T., et al., *A common variant of CDKN2A (p16) predisposes to breast cancer*. Journal of Medical Genetics, 2005. **42**(10): p. 763.
47. Seifi, S., et al., *Association of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B with increased risk of developing breast cancer*. Journal of Cellular Physiology, 2019. **n/a**(n/a).
48. Meijers-Heijboer, H., et al., *Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. Nat Genet, 2002. **31**(1): p. 55-9.

49. Rakha, E.A., et al., *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. Cancer, 2007. **109**(1): p. 25-32.
50. Lee, H.J., et al., *Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer*. British Journal of Cancer, 2015. **112**(1): p. 103-111.
51. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
52. Gaudet, M.M., et al., *Five polymorphisms and breast cancer risk: results from the Breast Cancer Association Consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(5): p. 1610-6.
53. Desjardins, S., et al., *Variations in the NBN/NBS1 gene and the risk of breast cancer in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 181.
54. Cybulski, C., et al., *An inherited NBN mutation is associated with poor prognosis prostate cancer*. British Journal of Cancer, 2013. **108**(2): p. 461-468.
55. Riccardi, V.M., *Neurofibromatosis type 1 is a disorder of dysplasia: the importance of distinguishing features, consequences, and complications*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(1): p. 9-14.
56. Uusitalo, E., et al., *Breast cancer in neurofibromatosis type 1: overrepresentation of unfavourable prognostic factors*. British Journal of Cancer, 2017. **116**(2): p. 211-217.

57. Spandidos, D.A., et al., *Expression of ras Rb1 and p53 proteins in human breast cancer*. Anticancer research, 1992. **12**(1): p. 81-89.
58. Esteller, M., et al., *Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome*. Oncogene, 2000. **19**(1): p. 164-168.

