

T.C.

**DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ANKARA ONKOLOJİ
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ**

**MEMEDE İNVAZİV DUKTAL KARSİNOMALARDA
CK5/6 İLE BAZAL DİFERANSİYASYON VE
PROGNOSTİK FAKTÖRLER**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Eda YILMAZ AKÇAY

ANKARA, 2007



ÖNSÖZ

**Patoloji eğitimim süresince büyük emeği olan ve tez seçiminde yol gösteren hocam Dr. IşınPAK'a,
Asistanlık süresi boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan bölümümüz başasistan ve uzmanlarına,
Teknik yardımları nedeniyle teknisyen arkadaşlara,
Destek ve dostlukları için tüm asistan arkadaşlarıma,
Her zaman yanımda olan eşim ve tüm aileme
En içten teşekkürlerimi sunarım.**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
1 GİRİŞ VE AMAC	1
2 MEME GENEL BİLGİLER	3
2.1 EMBRİYOLOJİ, ANATOMİ, HİSTOLOJİ	3
2.2 MEME KARSİNOMLARI GENEL BİLGİ	7
2.2.1 İNSİDANS, EPİDEMİYOLOJİ, ETYOLOJİ	7
2.2.2 PROGNOSTİK FAKTÖRLER	9
2.2.3 MEME TÜMÖRLERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLAMASI	20
2.2.4 İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM (NOS)	22
2.2.5 MEME KANSERLERİNDE EVRELEME	22
2.2.6 TEDAVİ	25
2.3 KERATİNLER HAKKINDA GENEL BİLGİ VE CK5/6, CK8/18, SMA	25
2.4 MEME KÖK HÜCRESİ / PROGENİTÖR HÜCRE	28
3 GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1 ARAŞTIRMA GRUBUNUN TANIMLANMASI	32
3.2 HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME	32
3.2.1 TÜMÖR BOYUTU	32
3.2.2 TÜMÖR HİSTOLOJİK GRADE	33
3.2.3 MİTOZ SAYISI	33
3.2.4 TÜMÖR NEKROZ VARLIĞI	33
3.2.5 LENFOVASKÜLER İNVAZYON	33
3.2.6 LENF NODU METASTAZI	34
3.2.7 METASTATİK LENF NODLARINDA KONGLOMERASYON VARLIĞI	34
3.2.8 METASTATİK LENF NODLARINDA EKSTRAKAPSÜLER TÜMÖR YAYILIMI	34
3.3 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA YÖNTEMİ VE DEĞERLENDİRME	34
3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	37
4 BULGULAR	38
4.1 HİSTOMORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	38
4.2 İSTATİSTİKSEL BULGULAR	45
5 TARTIŞMA	58
6 SONUÇLAR	70
7 ÖZET	72
8 KAYNAKLAR	74

1 GİRİŞ VE AMAÇ

İnvaziv meme kanseri komşu dokulara invazyon ve uzak metastaz yapma eğilimi ile karakterize bir grup malign epitelyal tümördür. Bu tümörlerin büyük bir kısmı adenokarsinomdur ve meme parankim epitelinden, özellikle de terminal duktal lobuler ünite (TDLU) hücrelerinden geliştiği bilinmektedir (1).

Normal meme dokusunda daha önceden yapılan çeşitli histomorfolojik, immünohistokimyasal (İHK) ve ultrastruktürel incelemeler iki tip parankimal hücre tabakasından oluştuğunu ortaya koymuştur. Bunlar, glandular hücrelerden oluşan içteki lüminal hücre tabakası ve bazal membran üzerinde lokalize, düz kas ve epitelyal özellikler gösteren myoepitelyal hücrelerle karakterize bazal hücre tabakasıdır (2-4). Lüminal epitelyal hücreler, CK7, CK8, CK18 ve CK19 gibi basit epitelyal keratinlerin yanısıra MUC1, alfa laktalbumin ve epitelyal hücre adezyon moleküllerini eksprese edebilirler. Myoepitelyal hücreler CK5, CK14 ve CK17 gibi yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinleri (HMWCK), düz kas aktini (SMA), düz kas miyozin ağır zincir (SMMHC), kalponin, kaldesmon, CD10, P63 ve S100 eksprese ederler (4-8).

Son zamanlarda bu iki diferansiye hücre modelinin dinamik bir organ olan memenin gelişimini, fonksiyonlarını ve tümörlerini açıklamak için çok yetersiz olduğu ve memenin kendini yenileyen, diferansiyasyon kapasitesine sahip hücreler içeren daha kompleks bir yapıya sahip olması gerektiği yönünde görüşler ortaya atılmıştır. Normal meme dokusu, benign lezyonlar ve in situ karsinomlar içeren çalışmalarda, immünohistokimyasal olarak CK8/18/19 ve SMA negatif, bazal sitokeratinlerle (CK14, CK5/6) eksprese olan, pluripotent kök hücre veya progenitör hücre varlığı gösterilmektedir (9-14).

İnvaziv meme kanserlerinde yapılan gen profilini ortaya koyan çalışmalarda, doku mikroarray (TMA) ve immünohistokimyasal yöntemlerle daha önce bilinenlerden farklı, hasta prognozu ile bağımsız bir ilişki gösteren farklı bir meme kanser alt tipi olduğunu belirlemişlerdir. Bütün bu çalışmalarda bazal epitelyal hücre

özelliği gösteren tümörlerin daha kötü prognozla ve aksine lüminal epitelyal belirleyici ile boyanan ve bazal belirleyici ile negatif olan tümörlerin ise daha iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (15-22).

Meme kanserinde klinik ve patolojik özelliklere dayanan, hastalığın biyolojik davranışını ve tedavisini etkileyen prognostik faktörler tanımlanmıştır. Bunlar; tümör boyutu, tümörün tipi, histolojik grade'i, aksiller lenf nodu metastazı, nekroz, vasküler invazyon, c-erbB-2 onkogeninin aşırı ekspresyonu, ER ve PR reseptör varlığıdır (23-28, 4).

Biz çalışmamızda 01.12.2004 ile 30.10.2006 tarihleri arasında Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde invaziv duktal karsinom tanısı almış 93 olguda, invaziv tümörde CK8/18, CK5/6 ve SMA ekspresyonunu immünohistokimyasal yöntemle araştırdık. CK5/6 pozitif boyanan tümörleri bazal diferansiyasyon gösteren grup olarak belirledik. Bazal diferansiyasyon gösteren grubu diğer grupla hasta yaşı, tümör boyutu, grade, mitoz sayısı, lenfovasküler tümör invazyonu, nekroz varlığı, lenf nodu metastaz varlığı ve metastatik lenf nodlarında konglomerasyon, ekstrakapsüler invazyon varlığı ve ER, PR ve c-erbB-2 gibi klinikopatolojik prognostik parametrelerle karşılaştırdık.

Bu çalışmanın amacı hastanemizde invaziv duktal karsinom tanısı alan tümörlerde; literatürde meme karsinomlarının kötü prognozlu alt tipi olarak kabul edilen bazal fenotip varlığını CK5/6 ile immünohistokimyasal yöntemle belirlemek ve klinikopatolojik prognostik parametrelerle karşılaştırarak kliniğe prognoza yönelik bilgi vermektir.

2 MEME GENEL BİLGİLER

2.1 Embriyoloji, Anatomi, Histoloji

Meme glandı özelleşmiş bir tübüloalveolar modifiye ter bezidir (4). Meme gelişiminin erken dönemleri seks steroid hormonlarından bağımsızdır ama fetal gelişimin 15. haftasında meme dokusu testosterona sensitiftir. Testosteron mezenşimi etkiler, mezenşim epitelyal sapsın etrafında kondanse olur. Testosteronun stimülasyonu ile meme tomurcuğı subdermal olarak izole olur ve alveolar duktus sisteminin gelişimi önlenir. Eğer testosteron etkisi olmazsa epiyelyal tomurcuklar kanalize olmaya başlar ve 20-32. haftalarda süt kanalları oluşur. Dallanan lobuloasiner gelişim 32-40. haftalarda oluşur. Fetüs mature oldukça, fetal meme maternal ve plasental steroidlerden etkilenir ve tek sıralı asini yapıları sekretuar hal alır. Doğumdan hemen sonra çoğı bebekte sekretuar fonksiyonda hafif artış olur. Oluşan basit duktular organizasyon puberteye kadar inaktif fazda kalır. Basit duktular organizasyon oluştuktan sonraki gelişim steroid, peptid hormonlar ve büyüme faktörlerine bağıdır (29, 30).

Pubertede büyüme hormonu veya prolaktin varlığında siklik östrojen duktus büyümesini tekrar stimüle eder. Relatif östrojen dominansına bağı olarak periduktal alanlarda bağı doku yoğunluğunda artış olur. Lobuloasiner yapıların oluşumu progesterona ihtiyaç duyar. Meme duktus ve alveolar yapının oluşumu, çeşitli kombinasyon ve sırayla multiple hormonlara bağıdır (29, 30).

Matür meme dokusu uterus endometriumu gibi ovaryan siklusa bağı değişiklikler gösterir. Proliferatif fazda meme dokusu az sayıda terminal duktal yapı içeren küçük lobullerden oluşur. Terminal duktus epitelinde mitoz azdır . İntralobuler stroma kondansedir ve interlobuler stroma ile devamlılık gösterir. Bu dönemde myoepitelyal hücrelerde vakuolizasyon belirgin değildir. Sekretuar fazda lobullerin boyutu bazal vakuolizasyon ve epiteldeki mitoz sayısı artar. İntralobular stroma gevşek ve ödemli hale gelir. Sekretuar fazın sonlarına doğru stromal lenfositik infiltrasyon artar (31).

Perimenopozal memede lobular kontraksiyon olur ve duktus epitelinde dökülme olur. Lobular stromal lenfositik infiltrat ve metakromazide belirgin artış görülür (31). Menopozda meme küçülür ve yoğunluğu azalır. Glandların büyüklükleri ve sayıları azalır. Belirgin olarak stromada elastik komponent artar (30).

Gebelikte memede oluşan değişiklikler konsepsiyondan bir iki hafta sonra başlar. Memede duktal ve lobular elemanlar proliferer olurlar. Daha sonraki aylarda lobullerdeki epitelyal elemanlarda sekresyon oluşur (29,30,).

Normal meme dokusunda siklik değişikliklerde c-erbB-2 ve EGFR ekspresyonlarında farklılıklar olduğu gösterilmiştir . Bu tirozin kinaz reseptörlerinin meme gelişim ve diferansiyasyonunda farklı rolleri olabileceği düşünülmüştür (32).

Makroskopik anatomi

Toraksın ön yüzünde pektoralis major ve serratus anterior kasları üzerinde uzanır ve 2.-3. kosta ile 6.-7. kosta arasında, sternumun yan kenarı ile ön veya orta aksiller çizgi arasında bulunur. Meme dokusunu pektoral kasın fasyası çevreler ve bunun uzantısı olan fibröz bağlar ‘Cooper ligamentleri’ meme dokusu lobları arasından dermaya ilerler ve memeyi destekler. Boyutları ve ağırlığı oldukça değişkendir. 150-1500 gram (ortalama 200-300) ağırlığında , ortalama 10-12 cm genişlikte 5-7 cm kalınlıktadır. Her bir meme üst dış kadran, alt dış kadran, üst iç kadran , alt iç kadran ve areola olmak üzere bölümlere ayrılarak incelenir. Üst dış kadran daha geniştir ve aksillaya doğru kuyruk biçiminde uzanır (4, 33, 34).

İnternal torasik, interkostal, aksiller ve torakoakromial arterlerin pektoral dallarından beslenir. Her iki memede simetrik değildir. İnterkostal, aksillar ve internal torasik venlere drene olur. Venöz kanallardaki tümör embolizasyonu meme karsinomunun beyin, karaciğer, akciğer , kemik ve diğer dokulara yayılmasında rol alır. Sinirleri: 2.-6. interkostal sinirlerin dallarıdır (4, 29, 33).

Meme lenfatiklerinin %75-97'si aksiller lenf düğümlerine ,% 3-25'i internal mammaryan lenf düğümlerine ve çok az bir kısmı ise kostovertebral ekleme yakın posterior interkostal lenf düğümlerine drene olur (4, 33, 34).

Aksillar lenf düğümleri 3 anatomik bölgede incelenir (4):

Level 1: Pektoralis minör kasının lateral kenarının lateralinde uzanan lenf düğümleridir. Eksternal mammaryan, aksillar ve skapular lenf düğümlerini içerir.

Level 2: Pektoralis minör kasının arkasında , medial ve lateral sınırlar arasındadır. Santral bölge lenf düğümlerini içerir.

Level 3: Pektoralis minör kasının medial sınırının medialinde ve süperiorunda lokalize lenf düğümleridir. Rotter lenf düğümleri pektoralis majör ve minör arasında bulunur.

Erişkin duktus sisteminin yapısı ve mikroskopik anatomi

Meme başı çok katlı yassı epitelle döşelidir. Menarşdan sonra melanin pigmentasyonu oluşur, gebelik sırasında artar ve değişken oranlarda devam eder. Meme başı derisinde sebace glandlar mevcuttur. Meme başını çevreleyen areola derisi de meme başına benzer şekilde pigmentasyon değişiklikleri gösterir. Bu alanda deride bulunan modifiye sebace glandlar olan Montgomery glandları Morgagni tüberkülleri ile areolanın yüzeyine açılır (3, 4, 34,).

Fonksiyonel glandular ve duktal elemanlar çoğu meme dokusunda fibroadipoz dokuya gömülü haldedir. Adipoz doku ve kollajenöz stroma miktarı bireyler arasında ve yaşla farklılık gösterir (4, 34).

Terminal duktal lobuler ünite, asini ve terminal duktusun küçük bir bölümü ile birlikte lobülü oluşturur.

Matür kadın memesi 15-20 lobdan oluşur. Arada fibröz bağ dokusu, yağ dokusu, kan ve lenf damarları ve periferik sinirler bulunur. Duktal sistem meme ucundan sırasıyla majör laktiferöz duktus , laktiferöz sinüs, laktiferöz segmental

duktus, subsegmental duktus , terminal duktus ve onun lobül içi dallarından oluşur. Her bir majör laktiferöz duktus orifis oluşturarak meme başında sonlanır. Duktus orifisinin yüzeysel bölümü skuamöz epitelle döşelidir. Skuamöz epitel laktifer duktusun terminal bölümüne kadar uzanabilir. Eğer laktifer sinüsün içine veya ilerisine uzanırsa patolojik olur ve buna skuamöz metaplazi denir (3, 4).

Normal meme dokusunda daha önceden yapılan çeşitli histomorfolojik, immünohistokimyasal ve ultrastruktürel incelemeler iki tip parankimal hücre tabakasından oluştuğunu ortaya koymuştur. Bunlar , glandular hücrelerden oluşan içteki lüminal hücre tabakası ve bazal membran üzerinde lokalize, düz kas ve epitelyal özellikler gösteren myoepitelyal hücrelerle karakterize bazal hücre tabakasıdır (2-4). Lüminal epitelyal hücreler siklusun proliferatif döneminde soluk sitoplazmalı, koyu yuvarlak santral nükleusa sahip, küçük, poligonal hücrelerdir. Sekretuar dönemde daha çok kolumnar şekillidir ve izole apikal sekretuar ‘snoutlar’ görülür (31). Myoepitelyal hücreler elonge spindle şekillidir ve periferal lokalizasyondadır (35) . Hormonal siklusun sonlarına doğru myoepitelyal hücrelerde vakuolizasyon artar (31).

İmmünohistokimyasal olarak lüminal epitelyal hücreler , CK7, CK8, CK18 ve CK19 gibi basit epitelyal keratinlerin yanısıra MUC1, alfa laktalbumin ve epitelyal hücre adezyon moleküllerini eksprese edebilirler. Myoepitelyal hücreler CK5, CK14 ve CK17 gibi HMWCK’leri ve SMA, SMMHC, kalponin, kaldesmon, CD10, P63 ve S100 eksprese ederler (4-8).

2.2 Meme Karsinomları Genel Bilgi

2.2.1 İnsidans, Epidemiyoloji, Etyoloji

Karsinomlar memede en sık görülen malignansidir ve meme kanseri gelişmiş ülkelerde kadınlarda en sık görülen malignansidir (36, 3). Bütün sosyoekonomik düzeydeki kadınlarda meme kanser riski artmaktadır (37). Türkiyede bir merkezde araştırılan 33,592 kanser olgusunun %12,7'si meme kanseridir (38).

Meme kanseri tanı ve tedavisinde gelişmeler arttıkça önlem stratejileri ve hastalık gelişiminde belirleyici olan risk faktörleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (34, 3). Tarama programları ile birlikte daha küçük boyutlu , daha düşük gradeli ve daha az agresif tümörlerin sayısı artmakta ve hastaların agresif tedavi riski azalmaktadır (39).

Meme kanseri genellikle 50 yaş üzerinde görülmekle birlikte tanı anında ortalama yaş 64'dür. 'National cancer institute'(NCI) 'Surveillance, Epidemiology , End Result' SEER programında yaşa özel insidans oranının yüksek riskli tümörler için 50 yaşına kadar arttığı, sonra sabit kaldığı ancak düşük riskli tümörler için 50 yaşından sonra da artmaya devam ettiği saptanmıştır (40).

Menarş yaşı 11'den önce olanlarda, 14 yaşından sonra olanlara göre %20 artmış risk vardır. Geç menopoza, birinci derece akrabalarda meme kanseri hikayesi, geç yaşta ilk gebelik, nulliparite , östrojen alımı, radyasyon maruziyeti, karşı memede tümör, yağlı diyet, obezite, çevresel toksinler kanser riskini artıran etkenler arasında sayılmaktadır (3, 26, 34, 41, 42).

Enerji ve yağdan zengin diyet, oral kontraseptif kullanımı meme kanser riskinde ve tanı, tedavi sonrası prognozda önemlidir (43). Oral kontraseptif kullanımının invaziv ve in situ meme karsinomları için risk oluşturmadığı da bazı yazarlar tarafından savunulmaktadır (44). Tip2 diabetli postmenopozal kadınlarda ve diabet gelişiminden önceki dönemde, muhtemelen insülin direncine bağlı artmış meme kanseri riski mevcuttur (45, 46). Maternal yaş ve kızlarında görülen kanser riski arasında pozitif bir ilişki vardır ve muhtemelen hormonal faktörler aracılığıyla olmaktadır (47).

Daha önceki biyopsilerde tesbit edilen atipik hiperplazi de invaziv karsinom gelişiminde artmış risk oluşturur. Bu risk aile hikayesi olanlarda ve premenopozal dönemde artış gösterir. Karsinoma in situ olgularında relatif risk daha yüksektir (1,3, 42). Benign meme hastalığı olanlarda da meme kanser gelişme riski mevcuttur ve nükleer morfolojik özellikler bu hastalarda meme kanser gelişiminin belirlenmesinde etkili olabilir (48).

Meme kanseri gelişiminde majör risk faktörleri hormonal ve genetikdir. Bu yüzden karsinomlar 1- sporadik; muhtemelen hormon maruziyetine bağlı ve 2- herediter; aile hikayesi veya germline mutasyona bağlı olarak 2 grupta incelenebilir (3). Ailesel kanserlerin yaklaşık %25'i veya tüm meme kanserlerinin % 3'ünün 2 otozomal dominant gene bağlı olduğu söylenebilir; BRCA-1 ve BRCA-2. Bu genlerde mutasyonu olan kadınların hayat boyu kanser olma riski % 60-85'tir ve mutasyona sahip olmayan diğer kadınlarla karşılaştırıldığında tanı anında median yaş 20 yıl daha erkendir. BRCA-1'e bağlı meme kanserleri sporadik meme kanserleri ile karşılaştırıldıklarında, medüller karsinom insidansı (%13) daha fazladır. Ayrıca bu tümörler sıklıkla ER , PR ve Her2/neu negatif karsinomlardır. BRCA-2'ye bağlı olanların ise belirgin morfolojik özellikleri yoktur ve sporadik karsinomlara benzerler (3, 49-51). Diğer genlere bağlı herediter karsinomlar daha azdır; CHEK 2 (cell cycle check point kinaz) gen mutasyonu, Li Fraumeni sendromu (p53 geninde germline mutasyon), Cowden sendromu (kromozom 10q da PTEN mutasyonu) gibi (3,4).

Son yıllarda bilinen genetik genlerden farklı çalışmalar yapılmaktadır. İnterlökin-10, integrin alfa-2 ve beta-3 gen polimorfizmi ile meme kanser riski belirlenmektedir (52, 53). 2006 yılında multigen analizi ile genetik polimorfizmler saptanmış tümörler, meme kanser riskine sahip farklı gruplara ayrılmıştır (54).

2.2.2 Prognostik Faktörler

Meme kanseri oluşumunda rol alan çok çeşitli risk faktörleri olduğu gibi, hastalık oldukça farklı prognoza sahip olabilir. Tedavi yöntemleri geliştikçe meme karsinomlu hastalarda tedaviyi belirlemek ve planlamak için birçok özellik prognostik faktör olarak kullanılmış ve bu konuyla ilgili günümüze kadar biyolojik ve immünohistokimyasal belirleyici ve genomik analizler gibi çeşitli çalışmalar yapılmıştır (25-27, 55-60).

Prognostik faktörler tedaviden bağımsız olarak uzun veya kısa sağkalımı belirlerken, prediktif faktörler ise hastanın tedaviden faydalanıp faydalanmayacağını belirler. Literatürde çalışılan bu faktörlerin prognostik veya prediktif olduğunun belirlenmesi için ileri çalışmalar gereklidir. Ama lenf nodlarının metastaz durumu veya tümör boyutu gibi bazı faktörlerin sadece prognostik , ER, PR ve HER/neu gibi belirleyicilerin ise prognostik ve prediktif öneme sahip oldukları bilinmektedir (61). Prognostik/prediktif faktörlerin belirlenmesi 3 şekilde yardımcı olabilir; bazı tümörler o kadar iyi prognozludur ki bu hastalara lokal rezeksiyon sonrası adjuvan tedavi vermek gereksiz ve pahalı olabilir; bazı hasta grubu ise çok kötü prognoza sahiptir ve bunlara daha agresif tedavi verilmesi gerekebilir; bu faktörler tedaviye cevabın olup olmayacağını veya direnci belirlerler (62).

Bir ölçütün prognozu belirlemede kullanılabilmesi için bazı ideal özelliklere sahip olması gereklidir. Ölçütlerin laboratuvar incelemesinde ve prognostik olarak güvenilirliği olması gerekir. Farklı laboratuvarlarda uygulanabilmeli ve klinik karar verilirken ihtiyaç duyulduğunda kolay uygulanabilir olmalıdır. Bu kullanılan ölçütlerin, diğer testlerde ihtiyaç halinde kullanılabilme olasılığı nedeniyle dokuları tamamen tüketmemesi gereklidir (55, 61).

Şimdiye kadar yayınlamış ve yaygın olarak kabul edilmiş prognostik göstergeler; tümör boyutu, patolojik evre, tümör tipi, lenf nodu durumu, histolojik grade, proliferasyon oranı, lenfovasküler invazyon, hormon reseptör durumudur (24-26, 28, 55, 59, 63-65). Tedavi sonrası izlemde bu prognostik faktörlerin etkileri değişebilir ve önemlerini ne zaman kaybedecekleri veya sürekli etkili mi olacakları hala tam olarak belli değildir. Bin dört yüz yirmi üç invaziv meme kanseri içeren,

prognostik faktörlerin sürekliliğinin incelendiği çalışmada tümör boyutunun 7,5 yıla kadar önemini koruduğu, hasta yaşı, vasküler tutulum ve hormon reseptörlerinin ise zamanla prognozu belirlemedeki etkilerinin değiştiği rapor edilmiştir (66). Binyüzaltmış iki invaziv meme karsinomu içeren diğer seride yine tümör boyutunun prognostik öneminin zamanla değişmediği, lenf nodlarının prognostik değerinin zamanla azaldığı ve hormon reseptörlerinin ise 4 yıl sonra prognostik önemlerini yitirdikleri açıklanmıştır (67).

Hasta yaşı: Bazı yazarlar genç hastaların daha kötü prognoza sahip olduğunu savunmuşlar ayrıca gebelik ve laktasyonun prognozu kötüleştirdiğini belirtmişlerdir (68). NCI SEER programında 1973 ve 1998 yılları arasında tanı almış hastalarda grade, tümör boyutu ve ırkın hastalısız sağkalım için sabit olarak etkili olduğu ancak tümör evresi ve tanı anında hasta yaşının zamanla değişen etkisi olduğunu göstermişlerdir (69).

Tümör evresi: Meme kanserinin evrelemesi, primer tümörün (T), bölgesel lenf nodlarının (N) ve uzak metastazların (M) değerlendirilmesine dayanır. Bunların çeşitli kombinasyonları ile 4 evre belirlenir ve klinik ve patolojik TNM evreleme sistemi olarak adlandırılır. Patolojik evrelemede invaziv tümörün boyutuna göre T belirlenir. Bölgesel lenf nodlarını değerlendirirken en azından 'low' aksillar disseksiyon (Level 1) olmalıdır (70). (1997 TNM klasifikasyonu 22-24 nolu sayfalarda anlatılmıştır).

Tümör boyutu: İnvaziv primer tümörün en büyük çapı en önemli prognostik parametrelerdendir (4, 34). Evrelemede lenf nodu tutulumu ve uzak metastazla birlikte kullanılır. Artan tümör boyutu ile aksiller lenf nodu tutulumu olasılığı arasında direkt ilişki vardır (30). Mammografinin yaygın olarak kullanılması ile birlikte tanı konulan meme kanserlerinin boyutları küçülmektedir. Böylelikle 1 cm ve altında tümör boyutuna sahip meme kanser sayısı artmıştır. Bunlar genellikle iyi prognozlidir ve çok azına pozitif lenf nodu eşlik eder (71). Binaltıyüz primer opere edilebilir meme kanserli hastada, 2 cm ve altında tümör boyutu olanların 10 yıllık yaşam şansı %65 iken, 4-5 cm çapında tümöre sahip olanların ise %24 olarak belirlenmiştir (24)

Lenf nodu metastazı: Cerrahi ile tedavi edilen invaziv karsinomlu hastalarda pozitif aksiller lenf nodlarının sayısı prognostik faktör olarak önemlidir. Yapılan disseksiyonda en az 10 lenf nodu bulunmalıdır (72). Metastaz içeren lenf nodlarının sayısı arttıkça prognoz kötüleşir. On ve daha fazla pozitif lenf nodu bulunan invaziv meme kanserli hastalarda rekürrens riski yüksek olarak bulunmuştur ve RT-PCR ile yapılan TP53BP2 ve bcl-2 içeren birçok gen ekspresyonu bununla koreledir (59). Aksiller lenf nodu metastazından elde edilen proliferatif değerlerin prognozu belirlemede kullanılabileceği düşünülmüştür. Bunu göstermek için yapılan çalışmada aynı hastada bulunan pozitif lenf nodlarında değişken proliferatif aktivite değerleri bulunmuş ve lenf nodu metastazlarının primer tümörün farklı klonlarından köken almış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (63). Lenf nodlarının durumunun prognozu ve tedaviyi belirlemede gerekliliği belli olmakla birlikte aksiller disseksiyon yapılan hasta sayısını ve böylelikle komplikasyonları azaltmak için sentinel lenf nodu (meme karsinomunun ilk drene olduğu lenf nodu veya nodları) örnekleme önem kazanmıştır. İntraoperatif olarak vital mavi boya veya technitium işaretli sülfür kolloid ile yapılır (4). Sentinal lenf nodu pozitif olmayan hastalarda aksiller lenf nodu disseksiyonu yapılması için 2 cm'in üzerinde tümör boyutu, lenfatik invazyon bulunması gibi faktörler etkili olabilir (72).

Lenf nodlarının durumu zaman bağımlı prognostik faktördür, tümör ne kadar uzun süre büyümeye devam ederse lenf nodların yayılması o kadar fazladır (24).

Lenfovasküler invazyon: Lenfovasküler invazyon (LVI) meme karsinomunda kötü prognoz göstergelerinden biridir. İnvaziv karsinomun içinde ve çevresindeki kan damarları ve lenfatik boşluklara tümör hücreleri invaze olabilir. Eğer tümör embolisi endotelle döşeli boşlukta görülürse vasküler invazyon olarak tanımlanır. LVI'nin lenfatik mi, venöz veya arterial mi olduğu rutin Hemotoksilen-Eozin (HE) kesitlerde anlaşılması zordur. Tümör embolisi yanında eritrosit de bulunuyorsa ve damar duvarında düz kas izleniyorsa venöz invazyon düşünülebilir (4, 25,34,58, 65). Lenfatiklerle ayırımı vasküler endotel belirleyici olan CD31 ve lenfatik endotel belirleyici olan D2-40 kullanılabilir (65). Ancak immünohistokimyanın ayırımı çok faydalı olmadığını savunanlar da vardır (4, 25, 34). LVI, daha çok tümör içinde görülen ve hücre kümelerinin çekilmesi ile oluşan

retraksiyon artefaktı ile karışabilir. Ancak retrakte tümör hücreleri boşluğun şeklini alırlar. Retraksiyon artefaktı ile karışabileceğinden invazyon daha çok tümör periferinde aranmalıdır. Problemlili vakalarda endoteli göstermek için immünohistokimyasal veya histokimyasal çalışma yapılabilir (58, 65). LVI, lenf nodu metastazı ile koreledir ve lenfatik metastaz, tümör içinde ve periferinde yeni oluşan lenfatikler aracılığıyla oluşabilir (73). Primer opere edilebilir 400 invaziv meme karsinom olgusunun %22,8' inde vasküler invazyon saptanmıştır. Bu özellik lenf nodu evresi, tümör boyutu, histolojik grade ve tümör tipi ile ilişkili bulunmuş ve 'multivariate' analizlerde lokal rekürrens ve hastalık survi için lenf nodu evresi ve grade'den sonra 3. olarak bağımsız prognostik öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır (25). Yüzaltmışdört meme karsinomu olgusunun 36'sında (%22), tümör periferinde LVI saptanmış ve diğer prognostik parametrelerle karşılaştırılmıştır. LVI'nin sadece lenf nodu pozitiflerde değil negatif olan olgularda da kötü prognoz göstergesi olduğu düşünülmüştür. Aksiller lenf nodu tutulumu, tümör boyutu ve histolojik grade ile ilişkili iken steroid hormon ekspresyonu ve proliferatif aktivite ile ilişki izlenmemiştir. Bu çalışmada LVI'nin kötü prognoz göstergesi olmakla birlikte diğer çalışmanın aksine 'multivariate' analizlerde bağımsız prognostik parametre olmadığı saptanmıştır (74). Neri ve arkadaşları bcl-2 ekspresyon kaybı ile birlikte LVI'nin kötü prognostik parametre olduğunu göstermişlerdir (75).

Histolojik Grade: Tümör histolojik grade'i (HG) evrelemede kullanılmadığı halde önemli bir prognostik göstergedir (4,70). İnvaziv duktal karsinomun sitolojik özelliklerini ve mikroskopik büyüme paternlerini gösterir. Birçok yazar gradeleme sistemi önermişlerdir (26, 76, 77). Nottingham/Tenovus Primary Breast Cancer çalışmasında Bloom ve Richardson metodu kriterleri daha objektif olsun diye Elston ve Ellis tarafından modifiye edilmiştir. Bu teknik, 3 morfolojik özelliğin semikantitatif değerlendirmesini içerir. Bunlar; tübül formasyon yüzdesi, nükleer pleomorfizm derecesi ve tanımlı alanda mitoz sayımıdır. Nümerik skorlama sistemi kullanılır ve tüm grade bu skorların toplamıyla belirlenir. Tübül formasyonunu belirlerken açık lümen içeren tübüler yapılar dikkate alınır. Nükleer pleomorfizmde ise hem kantitatif hem de kalitatif değerlendirme yapılır. Nükleus küçükse ve normal meme epitelyal hücreleri ile karşılaştırıldığında hafif olarak boyut artışı gösteriyorsa, sınırları düzenli ve nükleer kromatin uniform ise 1 puan verilir.

Hücreler normalden büyükse, belirgin nükleol, açık veziküler nükleusa sahipse, boyut ve şekilde orta derecede değişkenlik mevcutsa 2 puan, şekil ve boyutta belirgin değişkenlik, bizar büyük nükleus içeriyorsa 3 puan verilir. Mitoz tümörün periferinde 10 ardışık alanda değerlendirilir. Metafaz, anafaz ve telofazın morfolojik özelliklerini taşıyan nükleuslar sayılır. Hiperkromatik ve apoptotik nükleuslar gözardı edilir. (26) (Tablo 2.1).

Tablo.1 Modifiye Bloom Richardson gradeleme yöntemi (Elston&Ellis)

Özellik	Skor
Tübül formasyonu:	
Tümörün çoğunluğu (>%75)	1
Orta derecede (%10-75)	2
Çok az (<%10)	3
Nükleer pleomorfizm:	
Küçük,regüler uniform hücreler	1
Boyut ve değişkenlikte orta derecede artış	2
Belirgin hücre boyut ve şekil farklılığı	3
Mitoz sayısı	
Mikroskop alanına göre değişir (Nikon Lapophot için)	
0-5	1
6-10	2
>11	3

Total skor: 3-5: grade1

6-7: grade 2

8-9: grade 3

Elston ve Elis'in 1830 vakalık bu çalışmasında 342 (%19) grade 1, 631 (%34) grade 2 ve 857 (%47) grade 3 meme karsinomu saptanmıştır. HG ve prognoz arasında önemli bir korrelasyon bulunmuş ve kötü diferansiye grade 3 tümörlerde tüm sağkalımın daha düşük olduğu gösterilmiştir.

HG'nin prognostik parametre olarak avantajı invaziv meme karsinomlarında boyut ve nekroz içeriği dikkate alınmaksızın uygulanabilmesidir. Sundquist ve ark.'larının 654 vaka içeren raporunda tümör boyutu, lenf nodu durumu, ER ekspresyonu , DNA ploidi ve 'S Phase Fraction' (SPF) içeren parametreler arasında HG'nin prognozu belirlemede diğerlerinden daha üstün olduğu belirtilmiştir (78).

Tümör evresi ve grade birlikte kullanıldıklarında prognozu belirlemede tek başına kullanıldıklarından daha etkilidir. Tümör evresi arttıkça düşük ve yüksek grade tümör grupları arasında sağkalım farkı daha fazla olur (79).

Nottingham grubu, tümör boyutu , lenf nodu evresi ve HG gibi prognostik parametreleri birlikte kullanarak Nottingham prognostik indeks (NPI) oluşturmuşlardır. $NPI = 0.2 \times \text{tümör boyutu} + \text{lenf nodu evresi}(1-3) + \text{histolojik grade}(1-3)$. Prognostik indeks arttıkça prognoz kötüleşir (26) . Bu üç prognostik parametreyi içeren NPI'nın 1629 hastada kullanılması sonucu meme tümörleri, 15 yıllık sağkalım oranları %80, %42 ve % 13 olan 3 prognostik gruba ayrılırlar (24). Dokuzbinyüzkırkdokuz meme karsinom olgusu içeren diğer geniş seride NPI ile 10 yıllık sağkalım oranları sırayla % 83 , %52, %13 olan 3 gruba ayrılmış ve NPI'da yer alan faktörlerden en fazla HG'nin prognostik önemi olduğu belirtilmiştir. NPI'ya ek olarak tedaviyi belirlerken diğer prognostik parametrelerin de kullanılmasını önermişlerdir (80).

Tümör tipi: Dünya sağlık örgütünün (WHO) 2002 klasifikasyonunda meme tümörlerinin birçok farklı tipi vardır. Bunlardan invaziv duktal karsinom (NOS) en sık görülendir (1). Tümör tipi evreyi etkilemez. Tübüler, müsinöz (kolloid) ve adenoid kistik karsinom gibi bazı histolojik tipler düşük grade'lidir, aksiller lenf nodu metastazı yoktur veya çok azdır ve nispeten iyi prognozludur. Kötü diferansiye taşlı yüzük hücreli karsinom, inflamatuvar karsinom ve karsinosarkomlar kötü prognozludur (4, 81). İnflamatuvar karsinom spesifik RNA ekspresyon profiline sahip, agresif, HER/neu2 aşırı ekspresyonu ve azalmış ER ekspresyonu olan kötü prognozlu bir tümör tipidir (82). Medüller karsinom grade 3 özellikleri taşısa da invaziv duktal karsinomdan daha iyi prognozludur (83) .

Nekroz: Diğer parametreler gibi tümör nekrozu da prognostik önem açısından araştırılmıştır. Ekstensif nekroz nadiren tümörün büyük bir kısmını ortadan kaldırıır. Bu genellikle invaziv duktal karsinomda izlenir (34). Tomes ve ark. 48 ekstensif nekroz içeren , 49 nekroz içermeyen invaziv duktal karsinom olgularıyla yaptıkları çalışmada; nekrotik tümörlerin %90'ı, nekrotik olmayanların ise %30'unun, HIF1, CA9 ve GLUT1 içeren hipoksi belirleyicilerinden en az birini eksprese ettiğini göstermişler ve nekrozun genellikle hipoksi ile birlikte olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada nekrozun ER ve PR negatifliği ve yüksek grade gibi kötü prognoz göstergeleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (84). Fibroblast ve kollajenöz liflerden oluşan fibrotik odaklar invaziv duktal karsinomun merkezinde lokalize olur ve agresif kliniğe sahip bu tümörler CA9 ile eksprese olurlar (85). İnvaziv meme kanserinin stromasında eksprese olan hücre yüzey nötral endopeptidaz olan CD10 da kötü prognozla ilişkilidir (86).

Apoptoz: Apoptoz hücre ölümünün önemli bir mekanizmasıdır. Rutin histolojik kesitlerde kromatin ve sitoplazma kondensasyonu ve intrasellüler ve ekstrasellüler küçük kromatin fragmanları ile karakterizedir (34). Apoptotik hücreler 'terminal deoxynükleotidyl transferases mediated dUTP- biotin end labelling' (TUNEL) metoduyla ve apoptoz regülasyonu ile ilgili proteinlerin (bcl-2 gen ailesi) ekspresyonları ile gösterilebilir. Bcl-2, bcl-x ve MCL1 apoptozu süprese eder ve bax ve bak gibi diğerleri ise hücre ölümünü artırır (34, 87). İnvaziv duktal karsinomlarda evre 2 tümörlerde bcl-2 pozitifliği %21'dir ve bu değer, evre 3 olgularda ise %12'ye düşmektedir ve bu sonuçlara göre bcl-2'nin prognostik belirleyici olarak kullanılması önerilmiştir (88) . Kröger ve ark. yüksek riskli primer meme tümörlerinde bcl-2'nin HER2/neu ile birlikte prognostik önemi olduğunu ancak yüksek doz veya standart kemoterapiden sonra sağkalımda belirleyici değeri olmadığını göstermişlerdir. Tümör süpressör gen olan ve hücre siklusunda regülatör olarak görev alan P53 pozitif tümörlerin yüksek doz kemoterapiden , negatif olanların ise standart kemoterapiden daha fazla fayda görebilecekleri savunulmuştur (27).

Proliferasyon: Proliferatif aktivite meme karsinomlarında, metastatik potansiyelin veya prognozun önemli bir göstergesidir. Bunu göstermek için PCNA, Ki-67, AgNOR gibi çeşitli immünohistokimyasal belirleyiciler ve flow sitometrik

SPF ölçümü gibi çeşitli çalışmalar mevcuttur (88- 91). Altıyüzyedi lenf nodu negatif invaziv meme karsinomlu hastanın flow sitometrik DNA analizinde SPF ile ve histolojik olarak mitotik indeks ile proliferatif aktivite belirlenmiş ve önemli prognostik parametre olduğu savunulmuştur (89). Tedavi edilmemiş, lenf nodu negatif meme karsinomuna sahip hastalarda Ki-67 önemli bir prognostik faktördür (92). Kidogowa ve ark. double immün boyama tekniğiyle meme karsinomlarında Ki-67 ve AgNOR çalışmış ve Ki-67 pozitif hücrelerdeki yüksek AgNOR sayımlarının daha büyük tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve rezeksiyon sonrası kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (91). Dokuzyüzkırkiki meme karsinomu içeren geniş bir seride Ki-67 ile birlikte diğer bir proliferasyon göstergesi olan Topoizomeraz 2-alfa değerlendirilmiş ve klinik, histolojik ve diğer moleküler parametrelerden bağımsız olarak prognostik olarak öneme sahip oldukları bildirilmiştir (93).

Anjiogenezis: Yeni damar oluşumu ile karakterize anjiogenezis, meme kanserinin büyümesi ve metastazı için gereklidir. Meme karsinomlarında angiogenezi saptamak için damar endoteline karşı antikolar kullanılıp mikrodamar yoğunluk (MVD) ölçümleri yapılabilir. Yüzoniki invaziv duktal karsinom olgusunda Faktör 8 ile MVD ölçülmüş ve bağımsız prognostik parametre olabileceği düşünülmüştür (94). Bu ölçüm için kullanılan diğer belirleyici olan CD34 ile yapılan çalışmada 20 yıllık izlemde düşük MVD'ye sahip olguların daha iyi prognozlu olduğu bildirilmiştir (95). Adjuvan kemoterapi alan lenf nodu pozitif meme karsinomuna sahip olgularda CD31 ile saptanan angiogenezis bağımsız prognostik öneme sahiptir (96). İmmünohistokimyasal çalışmalar haricinde anjiogenezi saptamak ve prognozla ilişkisini belirlemek için vasküler endotelyal büyüme faktörü etkilerine aracılık eden 2 reseptörden biri olan kinaz domain reseptör (KDR) ve anjiogenez ve tümör progresyonunda rol aldığı düşünülen periostin (POSTN) içeren gen çalışmaları yapılmaktadır (97).

Fibroblastik odağı bulunan invaziv duktal karsinomların bulunmayanlara göre CD31 ile saptanan MVD ve Ki-67 ile proliferasyon indeksi daha yüksektir ve kötü prognozla ilişkilidir (98).

Steroid reseptörler: Meme kanserinde, prognoz göstergesi olarak ve endokrin tedaviye cevabın belirlenmesinde daha önceleri biyokimyasal olarak östrojen reseptör (ER) ölçümleri yapılmış ancak daha sonraları immünohistokimyasal olarak ER analizleri bu amaçla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır . Biyokimyasal metodla 5 yıla kadar olan hasta izlemleri anlamlı olurken İHK metoduyla 5 yıl sonrası bile anlamlı çıkmaktadır. Her iki metodun kullanıldığı 257 meme kanseri içeren çalışmada, İHK ile ER pozitif tümörü olan hastalarda ER negatif olanlara göre daha uzun sağkalım izlenmiştir . ER reseptör durumunun hastaliksız sağkalımla istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi olmakla birlikte sağkalımla ile ilişkisi daha kuvvetli bulunmuştur (28).

Genellikle ER negatif tümörler daha kötü diferansiyedir ve kötü prognoz gösterirler. Bazı ER negatif meme kanserleri farklı mikroskopik özelliklere sahip olabilir. Örneğin medüller pattern, komedo tip nekroz alanları, ekstensif santral fibrozis , skuamöz, spindle ve apokrin hücre diferansiyasyon alanları ve bizar dev hücre içeren bazı tümörlerde ER negatiftir. Bunların hepsi kötü prognozlu değildir, örneğin medüller karsinom nispeten invaziv duktal karsinomdan daha iyi prognoza sahiptir (83, 99).

İmmünohistokimyasal olarak yaygın olarak kullanılan antikorların tanıdığı ER- alfa'dır. Ancak yeni kullanılan reseptör olan ER-beta da meme kanserleriyle yapılan çalışmalarda kullanılmıştır. Kırkyedi meme kanserinin hepsinde ER-alfa negatifken , bunların 8'inde ER-beta pozitif olarak bulunmuştur. Tamoksifenle adjuvan hormonal tedavi alan hastalarda tedaviye cevapta ER-beta'nın sağkalımı belirlemede önemli bir gösterge olabileceği öngörülmüş, ER-alfa negatif ve ER-beta pozitif olan vakaların da tedavi almaları yönünde öneriler yapılmıştır (100).

C-erbB-2 veya HER2/neu protoonkogeni: HER2/neu ; 185 Kd ağırlığında, intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran proteinini kodlar ve epidermal growth faktör reseptör ailesinin üyesidir. Tümör hücrelerinin diferansiyasyonunda ve büyümenin düzenlenmesinde rol alır (4, 102, 103). İki şekilde gösterilebilir: İmmünohistokimya ve direkt olarak gen amplifikasyonunu ölçen 'fluorescence in situ hybridization (FISH) ile (101). Meme, over, akciğer ve

mide gibi birçok kanserde aşırı ekspresyonu görülür. C-erbB-2 aşırı ekspresyonu meme kanserlerinde kötü prognozla ilişkilidir. Bu yüzden c-erbB-2 aşırı eksprese eden hücreleri hedef alan çeşitli tedavi yaklaşımları vardır, bunlardan biri de rekombinan humanize monoklonal antikor olan transtuzumab'dır (102,103). Transtuzumab ile tedavi olacak hastaların belirlenmesi için c-erbB-2 pozitifliği ölçülmelidir (104). Genellikle iyi prognoza sahip tübüler karsinom c-erbB-2 eksprese etmez ve %96 olgu ER, %57 ise PR pozitifdir (105). %42 invaziv duktal karsinom vakasında pozitif olan c-erbB-2'nin diğer prognostik faktörler olan tümör boyutu, evresi, HG, hormon reseptör durumu ve lenf nodu tutulumu ile ilişkisi saptanmamıştır (101). Bunun aksine bu prognostik parametrelerle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (106-110). Dokuzyüzyirmiüç primer meme karsinomu içeren geniş seride %17,3 vakada c-erbB-2 pozitif bulunmuş ve ER, PR negatifliği, grade 3 tümör ve genç hasta yaşı ile korele bulunmuştur. ER, PR ve grade'in durumuna göre c-erbB-2 pozitif olabilecek vakalarda çalışılmasını önermişlerdir. Lenf nodu pozitif ve negatif olan gruplar arasında c-erbB-2 pozitifliği eşit olarak dağılmıştır. Bununla da lenf nodu durumunun sadece prognostik önemi olduğunu fakat adjuvan tedavi seçimi için bir kriter olmaması gerektiğini savunmuşlardır (107). Dokuzyüzkırkiki invaziv duktal karsinom olgusunda tümörlerin %24'ünde c-erbB-2 pozitifdir ve bu pozitiflik yüksek HG ve ER, PR negatifliği ile birliktedir. Lenf nodu negatif olan vakalarda metastaz ve relaps yönünden kötü prognozla ilişkilidir (108). C-erbB-2 pozitifliği genellikle ER, PR negatifliğiyle birliktedir ve genellikle bu hastalar hormon tedavisine dirençlidir. C-erbB-2 pozitif ve ER, PR pozitif tümörler de mevcuttur ve bu hastalarda hormon tedavisine direnç ancak ER/PR ekspresyonundaki azalma ile açıklanabilir ve klinik sonuçlar ileri çalışmalarda incelenmelidir (109, 110). Paralel 'clustering' metod ile ER, PR, Ki-67, P53 ve c-erbB-2 belirleyici profillerini kullanarak yapılan meme kanserinin moleküler subtiplemesinde c-erbB-2 aşırı ekspresyonu olan tümör subtipi, intermediate prognoz ve hormon tedavisine kötü cevap ile birlikte, yüksek ER/PR seviyesine sahip grup ise iyi prognoz ve hormon tedavisine iyi cevapla birliktedir (92).

Diğer prognostik faktörler: Yeni TMA teknolojileriyle yapılan moleküler profil çalışmaları meme kanserindeki klinik heterojeniteyi, tümörlerin moleküler genetik kompozisyonundaki farklılıklarla açıklamaktadır. Gen ekspresyon profil çalışmaları ile tümörler , ER+/Lüminal, ‘bazal-like’, c-erbB-2 pozitif ve normal meme tipi olmak üzere 4 farklı gruba ayrılmıştır. Bunlardan bazal gruptakiler, ER negatiftir fakat bazal sitokeratinleri (CK5, CK6 ve CK17) güçlü olarak eksprese ederler. Bu gruptakiler agresiftir ve kötü prognoza sahiptir (17-19, 60).

Nielsen ve ark. gen ekspresyon profilleriyle karakterize edilen bazal-like tümörlerin ER ve c-erbB-2 negatif olduklarını fakat CK5/6 ve EGFR pozitif olduklarını göstermişlerdir. EGFR, bazal CK’lerle pozitif tümörlerin %54’ünde pozitifdir ve bununla birlikte lenf nodu durumu ve tümör boyutundan bağımsız olarak kötü prognozla ilişkilidir (18). Bu tip meme kanserlerinin akciğer, beyin metastazına yatkınlığı ile ilişkisini araştıran ilk çalışmada Tsuda ve ark. 20 yüksek gradeli büyük asellüler santral zon içeren invaziv duktal karsinom olgusu ve 40 kontrol olgu kullanmışlardır. Bu çalışmada büyük asellüler santral nekrotik alan içeren invaziv karsinomların CK 14 ve diğer myopitelyal veya bazal belirleyicileri eksprese ettiğini ve özellikle beyin ve akciğere olmak üzere artmış metastaz riski ile birlikte agresif klinikleri olduğunu belirtmişlerdir (16). Hicks ve ark. da CK5/6 ve EGFR eksprese eden bazal-like tümörlerin daha çok santral sinir sisteminde rekürrens yaptıklarını rapor etmişlerdir (111).

Meme karsinomlarının prognozunu belirleme ve tedaviye cevabı değerlendirmede yukarıda anlatılanların haricinde de çalışılan belirleyiciler literatürde mevcuttur. MUC-1, CEA, Catepsin-D, Ep-CAM pozitifliği, Helix Pomatia Lectin bağlanması ve E-cadherin negatifliğinin kötü prognozun göstergesi olduğu rapor edilmiştir (112-117).

Meme kanserlerinin küçük bir grubu olan bilateral senkron meme kanserlerinin çoğunluğu invaziv duktal karsinom tipindedir ve unilateral olanlardan daha fazla c-erbB-2 aşırı ekspresyon gösterme insidansları olabilir ve bu da kötü prognozla birlikte (118).

Bilateral meme kanserlerinde, prognostik faktörlerin, CK5/6 ve PTEN ekspresyonu ile ilişkinin incelendiği 44 kadındaki 88 primer meme kanseri olgusunda ; CK5/6 ekspresyonu, ER, PR negatifliği ve p53 güçlü pozitifliği ile korele bulunmuştur. PTEN ise aksiller metastaz, c-erbB-2 aşırı ekspresyonu ER' nin azalmış ekspresyonu ile koreledir (21).

2.2.3 Meme Tümörlerinin Histolojik Sınıflaması

Dünya sağlık örgütünün 2002'de yayınladığı meme tümörleri histolojik klasifikasyonunda tümörlerin büyük kısmını epitelyal tümörler oluşturmaktadır. Epitelyal tümörler ve bütün tümör tipleri arasında invaziv duktal karsinom , NOS meme tümörlerinin büyük kısmını oluşturur (1).

Birçok araştırmacı tarafından farklı bir alt grup olarak öngörülen bazal fenotipteki invaziv meme tümörleri bu sınıflamada mevcut değildir (17, 18, 60, 119).

WHO çalışma grubu invaziv ve preinvaziv meme lezyonlarını daha iyi anlamak için daha fazla genetik bilgi ve klinik izleme ihtiyacı olduğu sonucuna varmışlardır.

2002 WHO histolojik klasifikasyonu

Epitelyal tümörler
İnvaziv duktal karsinom , NOS (not otherwise specified)
Mikst tip karsinom Pleomorfik karsinom Osteoklastik dev hücre içeren karsinom Koryokarsinomatöz özellikler gösteren karsinom Melanotik özellikler gösteren karsinom
İnvaziv lobuler karsinom
Tübüler karsinom
İnvaziv kribriform karsinom
Medüller karsinom
Müsinöz karsinom ve müsin içeren diğer tümörler
Müsinöz karsinom
Kistadenokarsinom ve kolumnar hücreli müsinöz karsinom
Taşlı yüzük hücreli karsinom
Nöroendokrin tümörler Solid nöroendokrin karsinom Atipik karsinoid tümör Küçük hücreli/ 'oat cell' karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
İnvaziv papiller karsinom
İnvaziv mikropapiller karsinom
Apokrin karsinom
Metaplastik karsinom 'Pure' epitelyal metaplastik karsinom Skvamöz hücreli karsinom Spindle hücre metaplazisi gösteren adenokarsinom Adenoskuamöz karsinom Mukoepidermoid karsinom Mikst epitelyal/mezenşimal metaplastik karsinom
'Lipid rich ' karsinom
Sekretuar karsinom
Onkositik karsinom
Adenoid kistik karsinom
Asinik hücreli karsinom
' Glikojen rich' berrak hücreli karsinom
Sebasöz karsinom
İnflamatuar karsinom
Lobuler neoplazi
İntraduktal proliferatif lezyonlar
Mikroinvaziv karsinom
İntraduktal papiller neoplaziler
Benign epitelyal proliferasyonlar
Myoepitelyal lezyonlar
Mezenkimal tümörler
Fibroepitelyal tümörler
Meme başının tümörleri
Malign lenfoma
Metastatik tümörler

2.2.4 İnvaziv Duktal Karsinom (NOS)

İnvaziv duktal karsinom memenin en sık görülen, ancak diğer histolojik tiplere uymayan malign tümördür. Bu gruba özel tip göstermeyen (NST: ‘no special type’) veya (NOS: ‘not otherwise specified’) invaziv duktal karsinom (İDK) veya klasik İDK gibi adlar verilir (1, 3, 4).

Bu tümörlerin spesifik makroskopik özellikleri yoktur. 1cm’in altından 10 cm’in üzerine kadar değişen boyutlarda olabilirler. Genellikle irregüler sınırlı, çevreye doğru spiküler uzantılar gösterir, bazen de noduler olabilirler ve sert kıvamlıdırlar. Kesit yüzeyleri gri-beyaz, ince sarı çizgilenmeler gösterebilir ve sıklıkla pürüklüdür. Bazı tümörler nekroz, kanama, kistik dejenerasyon alanları, kalsifikasyon veya elastozise bağlı tebeşir beyazı çizgilenmeler içerebilir. (1, 4, 34).

Histopatolojik görünüm olgudan olguya değişkenlik gösterebilir. Tümör hücreleri irili ufaklı gruplar, kordonlar, yuvalanmalar veya tek hücre infiltrasyonu halinde izlenebilir. Değişen derecelerde glandular diferansiyasyon gösterebilirler. Bazı tümörler ise çok az stroma içinde sinsityal adalar şeklinde gelişim gösterebilirler. Myoepitelyal hücre içermezler. Tümör hücreleri değişken görünümde olabilirler. Belirgin ve sıklıkla multipl nükleol içeren regüler, uniform veya oldukça pleomorfik nükleus içerebilirler. Sitoplazma genellikle abundant ve eozinofiliktir. Mitotik aktivite değişkendir. Stroma olgudan olguya değişkenlik gösterebilir. Oldukça sellüler fibroblastik proliferasyon olabileceği gibi, hyalinizasyon, elastozis, fokal nekroz ve nadir olmak üzere lenfosit infiltrasyonu da görülebilir. Çoğu olguda duktal karsinoma in situ komponentinin varlığı görülür (1, 4, 23).

2.2.5 Meme Kanserlerinde Evreleme

Meme kanseri için en son belirlenen evreleme sistemi American Joint Comitte on Cancer (AJCC) tarafından önerilen ve benimsenen klinik ve patolojik evreleri içeren sistemdir (70). Primer tümör (T) tanımlamaları klinik ve patolojik evreleme için aynıdır.

Primer tümör (T)

TX: Primer tümör saptanamamış

T0: Primer tümöre ait bulgu yok

Tis: Tümör bulgusu olmayan meme başının Paget's hastalığı, in situ tümör

T1: Tümör 2cm veya daha küçük

T1mic: En büyük çapı 0.1 cm veya daha küçük mikroinvazyon

T1A: 0.1 cm'den büyük ama 0.5 cm'den büyük olmayan tümörler

T1b: 0.5 cm'den büyük ama 1 cm'den büyük olmayan tümörler

T1c: 1cm'den büyük ama 2 cm' den büyük olmayan tümörler

T2: 2 cm'den büyük ama 5 cm' den büyük olmayan tümörler

T3: 5 cm'den büyük tümörler

T4: Herhangi boyutta ancak toraks duvarı veya deriye direkt uzanım gösteren tümörler

T4a: Toraks duvarına ulaşmış

T4b: Meme derisinde ödem (Peau d'orange), ülserasyon , aynı memede satellit deri nodulleri

T4c: T4a ve TDb birlikte

T4d: İnflamatuvar karsinom

Bölgesel lenf nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf nodlarının durumu değerlendirilemeyen

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Aynı tarafta aksiller mobil bir veya birden fazla lenf nodu metastazı

N2: Aynı tarafta aksiller lenf nodlarında bir diğerine veya farklı diğer yapılara fiksasyon

N3: Aynı tarafta internal mammary lenf nodu veya nodlarına metastaz

Uzak metastaz (M)

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemeyen

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var (Aynı tarafta supraklavikular lenf nodları dahildir)

Patolojik evrelemede T ve M klinik evrelemeden farklılık göstermez ancak lenf nodları farklı değerlendirilir (pN).

PNx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez

PN0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

PN1: Aynı tarafta mobil aksillar lenf nodu/ları metastazı

PN1a: 0.2 cm'den büyük olmayan mikrometastaz

PN1b: 0.2 cm'den büyük lenf nodu/ları metastazı

PN1bi: En büyük çapları 0.2 cm'den büyük 2 cm'den küçük
1-3 lenf nodu metastazı

PN1bii: En büyük çapları 0.2 cm'den büyük 2 cm'den küçük
4 veya fazla lenf nodu metastazı

PN1biii: En büyük çapı 2 cm'den küçük metastatik lenf nodu
kapsülünün dışına tümör yayılımı

PN1b: 2 cm veya daha fazla çapa sahip lenf noduna metastaz

PN2: Aynı tarafta aksiller lenf nodlarında bir diğerine veya farklı diğer
yapılara fiksasyon

PN3: Aynı tarafta internal mammary lenf nodu veya nodlarına metastaz

EVRE GRUPLARI (Stage)

EVRE 0:	Tis	N0	M0
EVRE 1:	T1	N0	M0
EVRE2A:	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE2B:	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE3A:	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
EVRE3B:	T4	Herhangi N	M0
	Herhangi T	N3	M0
EVRE4:	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.6 Tedavi

Meme kanser tedavisi, cerrahi, hormonoterapi, kemoterapi ve radyoterapiyi içerir. Günümüzde cerrahi tedavide modifiye radikal mastektomi, parsiyel mastektomi (lumpektomi, segmentektomi), basit mastektomi ve radikal mastektomi gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır (4, 23,30).

Tedavi yaklaşımları patolojik ve klinik bilgilere göre yapılır ve bunların küçük bir kısmı hastalığın heterojenitesini yansıtır. Benzer evrede olan ve tedavi alan hastalarda farklı klinik gidiş olabilir. Şu anda kullanılan sitotoksik ilaçlar kanserli ve normal hücreyi ayıramaz ve bu ilaçların yan etkileri vardır (10). Postmenopozal kadınlarda ER pozitif meme kanserlerinde Tamoksifen kullanılmaktadır. Hormonal tedaviye dirençte östrojen reseptörleri yanında olarak serin protein kinase olan AKT' nin tamoksifen direncine aracılık ettiği ve klinik sonucu belirleyebileceği düşünülmektedir (120). Kanser kök hücre modeli bazı klinik gözlemlerle uyumludur. Standart kemoterapi tümördeki çoğu hücreyi öldürse de kanser kök hücreleri canlı kalabilir. Bu hücrelerin sayısı az olmasına rağmen tümör rekürrensinden sorumlu olabilirler. Kanser kök hücrelerinin karakterizasyonu, onları yok etmek için yol bulmada gereklidir ve bu da malign tümörlerin tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilir (121).

2.3 Keratinler Hakkında Genel Bilgi ve CK5/6, CK8/18, SMA

Epitelyal hücrelerin tiplerini belirlemek için spesifik belirleyici bulma çalışmaları yapılmış ve hala yapılmaktadır. Sitokeratinler (CK) epitelyal hücre tipini belirlemek için en yaygın kullanılan belirleyicilerdir. Bütün memeli hücreleri 3 temel yapısal birim ve proteinlerden oluşan kompleks intrasitoplazmik hücre iskeleti içerirler. Bunlar; aktin içeren mikrofilamanlar, tübülün içeren mikrotübüller ve intermediate filamanlardır (IF). Altı ayrı IF tipi vardır: Tip 1 ve 2 keratin filamanları, mezenşimal hücrelerde bulunan vimentin, kas hücrelerinde desmin, glial hücrelerde glial fibriller asidik protein (GFAP) ve nöronlarda nörofilaman proteinleri. Bunların arasında keratinler en kompleks yapıda olanlardır ve hemen hemen bütün gerçek epitellerde bulunur. Keratinlerde 40- 70 kDa arasında değişen molekül ağırlığına

sahip 20 farklı alt ünite mevcuttur. Keratinler molekül ağırlıklarına göre düşük ve yüksek (LMWCK ve HMWCK) moleküler formlara ve izoelektrik noktasına göre asidik ve bazik formlara ayrılırlar. Genel olarak çoğu LMWCK bir HMWCK ile ve bazik keratin ise asidik keratinle çift oluşturur ve bu 'coexpression' olarak tanımlanır. Daha küçük ve asidik olan tip 1 keratinler (K9-20) kromozom 17q üzerinde kodlanmıştır. Daha büyük ve bazik olan tip 2 keratinler (K1-8) ise kromozom 12q üzerinde kodlanırlar. Basit veya kompleks olsun bütün epiteller CK protein ekspresyonuna göre sınıflandırılabilir. Epitel malign transformasyon gösterse bile keratin profili sabit kalması ve farklı epitelde keratin ekspresyonunun değişken olması nedeniyle, keratinler karsinomların tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (122, 123).

Basit epitel genellikle basit epitelyal sitokeratinleri (CK7 , CK18, CK19 ve CK20) , kompleks epitel ise CK5/6, CK10, CK14 ve CK15 gibi kompleks epitelyal sitokeratinleri eksprese ederler.

CK5/6 antikoru keratin 5 ve 6 ile reaksiyon verir fakat keratin 1, 7, 8, 10,13, 14, 18 veya 19 ile reaksiyon vermez. Özofagus çok katlı yassı epitel ve prostat bazal hücrelerini, epidermiste stratum spinosumun bazı hücrelerini, meme ve ter bezlerinin myoepitel hücrelerini, mezotel hücrelerini ve nadir olarak pankreas asini hücrelerini tanıır. Mezotelyomaların büyük çoğunluğu, skuamöz hücreli karsinom, bazal hücreli karsinom ve transizyonel hücreli karsinomların 2/3'ü, tükürük bezi tümörlerinin bazıları, timoma, seröz papiller over karsinomlarının bir kısmı, %50 endometrial adenokarsinom, pankretik adenokarsinom ve değişen oranlarda meme tümörlerinde CK5/6 pozitifdir. Non epitelyal neoplazmlar CK5/6 ile ekspresyon göstermez ancak bir metastatik malign melanom vakasında tümöral hücrelerde (%5) hafif boyanma bildirilmiştir. (5, 123, 124)

Düşük molekül ağırlıklı tip2 keratin 8 ve tip1 keratin 18 çoğunlukla çift olarak , basit epitel, duktal epitel ve psödostratifiye epitelde ve tümörlerinde eksprese olurlar (123).

Sitokeratinler ve diğer immünohistokimyasal belirleyiciler, memenin normal yapısını , benign lezyonlarını incelemek, preinvaziv ve invaziv lezyonlarına tanı

koymak, tümörlü olgularda ise özellikle prognoz ve tedavi planını belirlemek için, double immünfloresan, western-blotting analiz, elektron mikroskop, gen çalışmaları ve doku mikroarray (TMA) gibi diğer tekniklerle birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (7, 13-15, 22, 92, 125-131).

Normal meme dokusunda yapılan incelemelerde CK8/18, CK19, CK7 ile lüminal epitelyal hücrelerde ekspresyon gösterilmiştir (6, 9-11, 13-15, 50). Myoepitelyal hücreler rutin HE kesitlerde çok iyi görülmezler. Özellikle benign ve in situ proliferasyonları invaziv karsinomdan ayırmak için myoepitel hücreleri göstermek gerekir. Bunun için de birçok immün belirleyici kullanılmıştır. CK5/6, CK14, CK17, SMA, P63, Kalponin, SMMHC, S100, CD10 ile bazal/myoepitelyal hücrelerde ekspresyon gösterilmiştir (6-11,13-15,17,132-134). Bu bazal/myoepitelyal belirleyiciler, adenoid kistik karsinom, adenoskuamöz karsinom, malign myoepitelyoma ve metaplastik meme karsinomu gibi invaziv meme karsinomunun nadir görülen bazı spesifik subtiplerinde ve adenomyoepitelyoma, myoepitelyoma, pleomorfik adenoma gibi benign tümörlerinde eksprese olabilirler (135-140). SMA myoepitel hücrelerin sitoplazmalarında eksprese olur. Aynı zamanda invaziv karsinom, duktal karsinoma in situ ve sklerozan adenozisnin reaktif stromasında myofibroblastları da boyayabilir. Myofibroblastlar tümör adalarının etrafında olduğu zaman myoepitel gibi görülebilir ve invazyon gözden kaçabilir. SMA damar duvarlarındaki düz kasları da eksprese eder, bu da myofibroblastlara benzer şekilde tanısal problemlere yol açabilir. Diğer ikisinden farklı olarak myoepitelyal hücreler lümene doğru hafif bir bombeleşme gösterirler (7).

Progenitör/ kök hücre varlığını göstermek için yapılan birçok çalışmada farklı boyanma paternleri içeren hücre tipleri olduğu gösterilmiştir. Glandular ve myoepitelyal hücrelere diferansiye olabilen CK5/6 (+) progenitör hücreler, CK5/6 ve CK8/18 (+) intermediate glandular hücreler , CK5/6 ve SMA (+) intermediate myoepitelyal hücreler ,CK8/18 (+) glandular 'end' hücreler ve SMA (+) myoepitelyal 'end' hücreler double immünfloresan teknikle gösterilmiştir (13, 14).

2.4 Meme Kök Hücresi / Projenitör Hücre

Uzun yıllardır lüminal epitelyal ve bazal myoepitelyal hücreler ile karakterize iki hücre modeli meme patolojisini şekillendirmiştir. Her gebelikte, laktasyonda, involüsyonda ve menstrüel siklusta epitelyal proliferasyon, diferansiyasyon ve regresyon gösteren meme dokusunu açıklamak için bu iki hücre modelinin basit ve yetersiz olduğu ve memenin kendini yenileyen hücre sistemi içeren daha komplike bir yapıya sahip olması gerektiği yönünde görüşler ortaya çıkmıştır. Buna yönelik bazı çalışmalarda normal meme dokusu, benign meme lezyonları, premalign ve malign meme lezyonlarının gelişiminde ve progresyonunda farklı hücre tiplerinin yer aldığı rapor edilmiştir (6,11, 13, 14, 60).

Smith ve ark. gelişimin farklı dönemlerindeki fare ve rat meme dokularının elektron mikroskopi ve ışık mikroskopisindeki görünümünü retrospektif olarak incelemişlerdir. Bu inceleme sonunda meme dokusunu lüminal epitel ve bazal myoepitel içeren 2 hücre tipinden genişleterek, primitif küçük açık renkli hücreler (KAH), andiferansiye büyük açık hücreler (ABAH), diferansiye büyük açık hücreler (DBAH), klasik koyu renkli diferansiye lüminal hücreler ve myoepitelyal hücreler olmak üzere 5 farklı yapısal fenotipe sahip hücre tiplerine ayırmışlardır. KAH'lerin oranının nullipariteden involüsyona kadar değişmediği izlenmiş ve bölünme yeteneğine sahip olan KAH'ların primer kök hücre ve progenitör hücre popülasyonlarının kombinasyonunu temsil ettiği düşünülmüştür. Bu hücrelerin HE kesitlerde bazal epitelin arasında lokalize olduğu yorumlanmıştır. ABAH'lar ise bölünme yeteneğine sahip, bazölüminal yerleşim gösteren lümenle ilişkisi olabilen ve sekonder progenitör hücre olduğu düşünülen hücrelerdir. DBAH ise bölünme yeteneği olmayan, protein ve lipid sentez eden, diferansiyasyon kapasitesine sahip sekretuar hücrelerdir. Diferansiye koyu renkli lüminal ve myoepitelyal hücrelerin ise diferansiyasyon kapasitesi olmadığı bildirilmiştir (128).

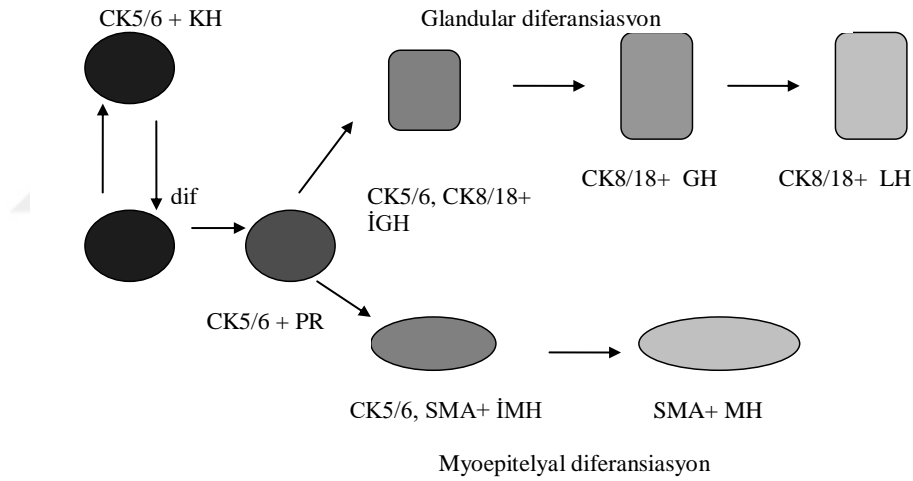
Sleeman ve ark. fare meme dokusunda CD24 ile lüminal epitelyal, myoepitelyal/bazal ve nonepitelyal hücrelerinin izolasyonunu sağlamışlar , bu hücreleri CK8/18(lüminal) ve CK14 (bazal) ile direk floresan mikroskopi ve PCR ile tanımladıktan sonra bu hücreleri in vivo olarak meme yağ dokusuna transplante

etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda lüminal epitelyal grupta sınırlı büyüme potansiyeline sahip, az miktarda yeni popülasyon oluşturan progenitör olduğu düşünülen hücreler bulunmuştur. CK 14 ekspres eden bazal hücre grubunda ise proliferasyon oldukça yüksek bulunmuş ve hem lüminal hem de bazal epitel yönünde yeni popülasyonlar rapor edilmiştir. Bu gruptaki hücrelerin kök hücre olduğu düşünülmüştür (141).

Meme kanserinin meme epitelyal kök hücrelerinden geliştiği düşünülmektedir ve karsinogenez etyolojisini anlamak için kök hücrelerini belirlemek birçok çalışmanın ilgi odağı olmaktadır. Normal kök hücrelerin karsinogenezde rol aldıklarına kanıt oluşturan önemli fenotipik özellikleri kanser hücreleri ile paylaştığı gözlemlenmiştir. Bunlar; 1) kendini yenileme kapasitesi; 2) diferansiyasyon kapasitesi; 3) aktif telomeraz ve anti apoptotik yollar; 4) artmış membran tranport aktivitesi; 5) migrasyon yeteneği. Bu ortak fenotipik özelliklere ek olarak Dontu ve ark. meme stem hücrelerinin ve progenitör hücrelerinin fonksiyonunda yer alan yollarda oluşan deregulasyonun meme karsinogenezinde rol aldığını öne sürmüşler ve bunu için in vitro kültür sistemi kurmuşlardır. Önerdikleri modelde farklı hastalarda görülen tümörlerdeki fenotipik çeşitlilik, klinik davranışlar ve tedaviye cevaptaki farklılıkların, tümörün farklı kök/ progenitör hücre popülasyonlarından transformasyonla olduğunu ortaya koymuşlardır (12). Fetal gelişim sırasında ER negatif kök hücreler östrojen stimülasyonundan bağımsız olarak dallanan yapıları oluşturan, myoepitel ve ER negatif progenitörlere dönüşürler. Gestasyonun 30. haftasında ER pozitif progenitörler oluşur ve östrojen stimülasyonuna cevap vererek proliferasyon olurlar ve erişkin meme yapısını oluşturan duktal epitelyal hücreler ve alveolar hücrelere dönüşürler. Karsinogenez farklı aşamalardan başlayabilir ve buna göre tümörler farklı prognoza sahip olabilirler (142).

Progenitör/kök hücreleri göstermek için yapılan deneysel çalışmalar haricinde immünohistokimyasal olarak insan meme dokusunda kök hücre varlığını kanıtlamaya çalışan birçok çalışma mevcuttur (13, 14).

Normal memede lobuller geniş spektrumda hücre tipi içerirler; (CK5 +) progenitör hücre ve bu hücrelerin diferansiyasyonu ile (CK5 ve CK8/18 +) intermediate glandular hücre, (CK5 ve SMA +) intermediate myoepitelyal hücre , (CK8/18 +) glandular end hücre ve (SMA +) myoepitelyal end hücre . Gebelik ve laktasyonda hormonların etkisiyle lüminal hücreler , süt üreten (CK8/18 +) sekretuar end hücreleri oluştururken, progenitör hücreler terminal duktuslarda egemen olurlar. Bu progenitör hücreler süttten kesildikten sonra laktasyonel hücrelerinin yerini almada rol alırlar (14). Western blotting analiz ve double immünfloresan ile CK5/6, CK8/18/19 ve SMA kullanılarak normal memede benzer sonuçlar elde edilmiş ve sadece CK5 ekspres eden hücrelerin epitelyal ve myoepitelyal hücrelerin öncüsü olduğu öne sürülmüştür (13). (Bu hücreler Şekil 2.1’de şematize edilmiştir)



Şekil 2.1 (10-14 nolu referanslardan modifiye edilmiştir.)

PR: Progenitör hücre, KH: Kök hücre, İGH:İntermedier glandular hücre, İMH:İntermedier myoepitelyal hücre, MH: Myoepitelyal hücre, GH:Glandular hücre, LH:Laktasyonel hücre, dif:diferansiyasyon. Kök hücrelerinin kendini yenileme ve diferansiyasyon kapasitesi vardır. Myoepitel ve glandular hücreler diferansiye olma aşamalarında ara hücreler oluşur ve bunların diferansiyasyon kapasitesi mevcuttur.

Farklı hücre tipleri CK ekspresyonu paternleri ile belirlenebilir. Normal memede progenitör hücreleri göstermek için en sık CK5/6 kullanılmıştır. CK5/6 ve CK14, CK17, CK4, P- cadherin, cyclinE gibi diğer bazal belirleyiciler benign ve malign lezyonlarda ise bazal diferansiyasyonu göstermek için kullanılmıştır. Özellikle tümörlerde bu belirleyicilerin ekspresyonu ilk önceleri myoepitelyal diferansiyasyon olarak kabul edilse de , bu tümörlerde görülen bazal belirleyici boyanmasının , meme normal gelişiminin herhangi bir aşamasında karsinogenezin başlamasına bağlı olarak kök/progenitör hücreyi temsil ettiği savunulmuş ve bu tümörler için daha çok bazal/bazaloid diferansiyasyon gibi terimler kullanılmıştır (9, 12, 17, 50, 119, 126, 132, 143).

Kök hücre varlığını ve karsinogenezdeki rolünü anlamak için yapılan bu çalışmalar haricinde meme karsinomlarının biyolojik davranışını ve natürünü anlamak için morfolojik karakteristiğini ve immünohistokimyasal profilini ortaya çıkaran çalışmalar yapılmıştır.

Moleküler düzeyde farklı meme kanser fenotiplerini belirlemek için Perou ve ark. komplementer DNA mikroarray yöntemi ile 65 meme tümöründe gen ekspresyon paternlerini belirlemişler ve bu farklı gen paternlerine göre tümörleri farklı alt gruplara ayırmışlardır. ER, c-erbB-2, lüminal belirleyici CK8/18 ve CK5/6, CK17 gibi bazal CK'ler kullanılmıştır. Farklı moleküler özelliklerine göre meme tümörlerini 4 gruba ayırmışlardır (60);

1. ER+/'lüminal-like'
2. 'bazal-like'
3. C-erbB-2 +
4. normal meme tipi

Benzer çalışmalarda bazal fenotipteki tümörlerin ve c-erbB-2 aşırı eksprese eden tümörlerin kötü prognozlu oldukları gözlenmiştir (60, 18, 130).

Daha sonra invaziv meme tümörleri bazal fenotip ve myoepitelyal fenotip olarak 2 grupta incelenmiş ve bazal fenotipin myoepitelyal fenotipten daha kötü prognozlu olduğu gösterilmiştir (119).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırma Grubunun Tanımlanması

Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde 01.12.2004 ile 30.10.2006 tarihleri arasında invaziv duktal karsinom (NOS) tanısı alan, modifiye radikal mastektomi veya lumpektomi ve aksiller disseksiyon yapılmış 93 olgu incelenmiştir.

Olgular yaş, tümör çapı, histolojik grade, mitoz sayısı, lenfovasküler invazyon, nekroz varlığı, lenf nodu metastaz varlığı ve sayısı, metastaz varsa konglomerasyon ve ekstrakapsüler invazyon varlığı, ER, PR ve c-erbB-2 ekspresyonu açısından geriye dönük olarak incelenmiş olup tümörlerde immünohistokimyasal olarak CK8/18, CK5/6 ve SMA çalışılmıştır.

3.2 Histomorfolojik Değerlendirme

Daha önce bölümümüzde ; %10'luk formalinle fikse edilmiş materyallerden makroskopik inceleme sonrası tümör ve lenf nodlarından elde edilen örnekler rutin takip işlemi sonrası parafin bloklara gömülmüş ve 5 mikron kalınlığında kesitler alınıp, rutin olarak HE ile ve İHK'sal olarak ER, PR, c-erbB2 ile boyanmıştır. Olgulara ait HE boyalı ve İHK preparatlar, parafin bloklar patoloji arşivinden temin edilmiştir. Olgulara ait tüm HE boyalı preparatlar incelenmiş, belirlenen histomorfolojik parametreler değerlendirilmiştir. Ayrıca İHK çalışma için uygun bloklar seçilip adezivli cama 5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır.

Histomorfolojik parametreler aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir:

3.2.1 Tümör Boyutu

Tümörlerin en büyük çapı alınarak 2 cm'den büyük ve küçük olarak 2 grupta incelenmiştir (24).

1. ≤ 2 cm
2. > 2 cm

3.2.2 Tümör Histolojik Grade

Tümörler modifiye Bloom- Richardson yöntemi kullanılarak 3 grupta incelenmiştir (26).

1. Grade 1
2. Grade 2
3. Grade 3

3.2.3 Mitoz Sayısı

Tümör periferinden alınan örneklerin kesitlerinde ve en fazla mitoz bulunan alandan başlanarak 10 büyük büyütme alanında (Nikon Optiphot 2 mikroskop -40 objektif x 10 okuler) mitoz sayılmıştır. Mitoz sayıları 3 gruba ayrılarak incelenmiştir (26,144) .

1. 1-5 arası
2. 6-10 arası
3. 11 ve üzeri

3.2.4 Tümör Nekroz Varlığı

Herhangi br 'cut off' değeri veya derecelendirme kullanmadan sadece var yok olarak 2 grupta incelenmiştir (145).

1. nekroz var
2. nekroz yok

3.2.5 Lenfovasküler invazyon

Tümörün lenfovasküler invazyonu HE boyalı kesitlerde incelenmiştir. Lenf veya vasküler damar ayırımı yapılmamıştır. Endotelle döşeli boşlukta tümör embolisi, endotel içermeyen boşluktan farklı şekil ve konfigürasyondaki tümör embolisi lenfovasküler invazyon olarak kabul edildi. Şüpheli bazı vakalarda CD31 ile damar duvarında boyanma ile karar verilmiştir (25, 58, 65). Lenfovasküler invazyon varlığına göre 2 grupta incelenmiştir.

1. Lenfovasküler invazyon var
2. Lenfovasküler invazyon yok

3.2.6 Lenf Nodu Metastazı

Lenf nodu metastazı varlığına göre ve metastaz olan lenf nodlarının sayısına göre 3 grupta incelenmiştir (19).

1. Metastaz yok
2. Metastaz içeren lenf nodu sayısı < 4
3. Metastatik lenf nodu sayısı ≥ 4

3.2.7 Metastatik Lenf Nodlarında Konglomerasyon Varlığı

Diğer lenf nodlarına fikse metastatik lenf nodu konglomere olarak değerlendirildi (70).

1. Konglomerasyon var
2. Konglomerasyon yok

3.2.8 Metastatik Lenf Nodlarında Ekstrakapsüler Tümör Yayılımı

1. Ekstakapsüler invazyon var
2. Ekstrakapsüler invazyon yok

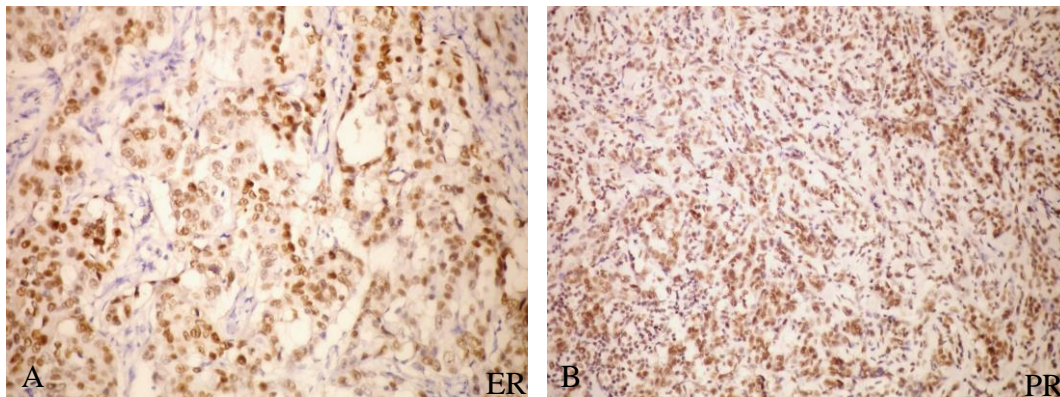
3.3 İmmünohistokimyasal Çalışma Yöntemi ve Değerlendirme

İmmünohistokimyasal inceleme %10'luk formalin solüsyonunda fikse edilmiş dokuların parafin bloklarından hazırlanan kesitlerinde çalışılmıştır. Her olgudan internal kontrol olması amacıyla çevre meme doku ve tümör içeren en uygun 1 blok seçilmiştir. İmmünohistokimya için standart streptavidin –biotin kompleks yöntemi kullanıldı. SMA haricindeki immün belirleyiciler için antijen açığa çıkarma işlemi (pretreatment) sitrat tampon (pH 6.0) ile yüksek basınçta kaynatılarak yapıldı.

Tablo 3.1 Kullanılan primer antikorların özellikleri

Primer antikor	Klon,Tip	Dilüsyon	Firma	Boyanma paterni
CK5\6	D5+16B4, mouse monoklonal	1/25	Cell Marque	Sitoplazmik
CK8\18	K8.8+DC10, mouse monoklonal	1/150	Neomarker	Sitoplazmik
SMA	1A-4, mouse monoklonal	1/200	Neomarker	Sitoplazmik
ER	SP-1, mouse monoklonal	1/250	Neomarker	Nükleer
PR	SP-2, rabbit monoklonal	1/1000	Neomarker	Nükleer
CerbB2	E2-4001+3B5, mouse monoklonal	1/400	Neomarker	Membranöz

CK5/6 ve SMA için invaziv tümöral hücre sitoplazmalarında herhangi bir boyanma pozitif kabul edildi. CK8/18 için invaziv tümör hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz boyanma pozitif kabul edildi. ER için %10'un üzerinde, PR için %5'in üzerinde tümöral hücrede nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir (Resim 1).



Resim 1: ER ve PR ile nükleer boyanma gösteren tümöral hücreler. **A.**ER x200, **B.** PR x100

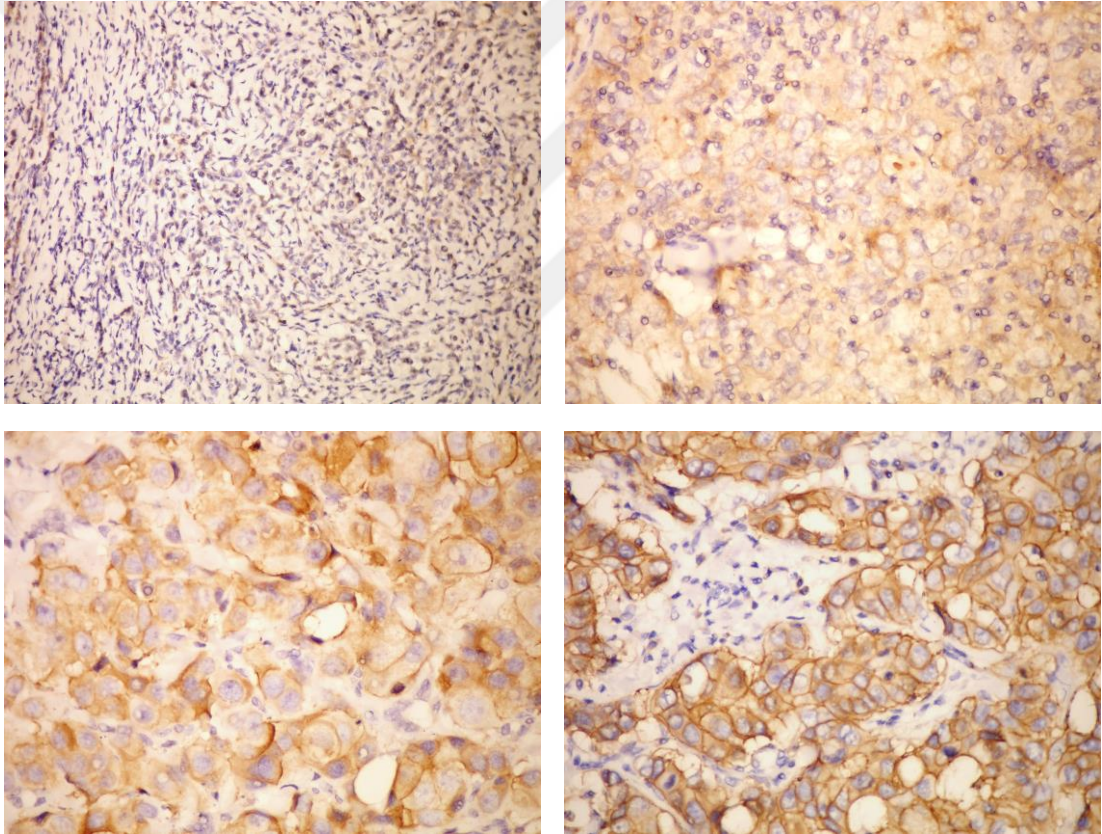
C-erbB-2 için Dako skalası (HercepTest kit skorlama rehberi) kullanılarak skorlama yapıldı: Buna göre:

Skor 0 : Boyanma yok veya %10'dan daha az tümör hücresinde membranöz boyanma.

Skor 1 : %10'dan fazla tümör hücresinde parsiyel hafif membranöz boyanma.

Skor 2 : %10'dan fazla tümör hücresinde hafif-orta komplet membranöz boyanma.

Skor 3 : %10'dan fazla tümör hücresinde kuvvetli komplet membranöz boyanma. Skor 0 , 1 ve 2 negatif, 3 pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 2).



Resim 2: C-erbB-2 incelemesinde sadece skor 3 boyanma pozitif kabul edildi.

Bazı olgularımızda izlenen c-erbB-2 boyanma skorları:

A. Skor 0 x200 **B.** Skor1 x400 **C.** Skor2 x400 **D.** Skor3 x400

SMA internal kontrollerde damar duvarındaki düz kas ile incelendi . CK8/18 için kalın barsak epiteli, ER, PR ve c-erbB-2 için meme tümörü , CK5/6 için prostat dokusu kontrol olarak incelendi.

3.4 İstatistiksel Analiz

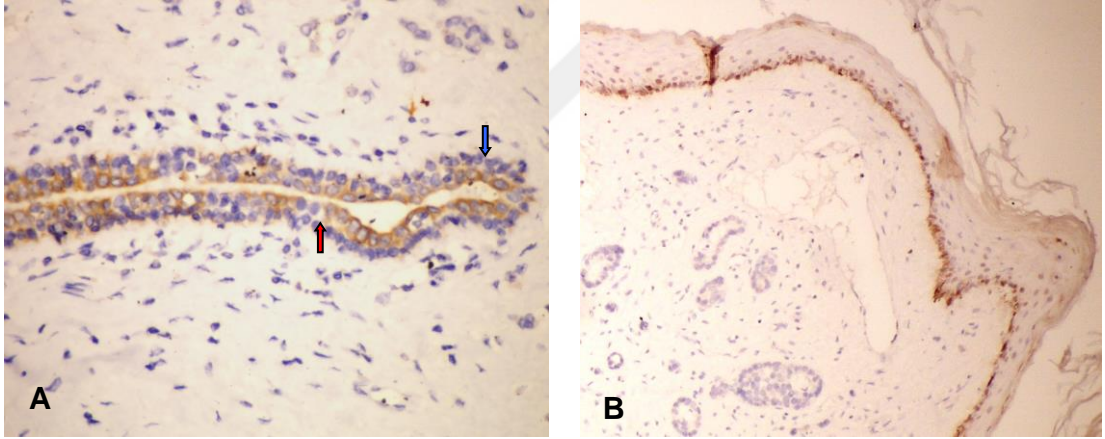
Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Sürekli ölçümlü değişkenler ortanca, ortalama (minimum –maksimum) şeklinde gösterildi. Kategorik özellikler ise % ile gösterildi. CK5/6 ile invaziv tümörde boyanma izlenenler ile izlenmeyen vakalar arasında kategorik özellikler yönünden farkın anlamlı olup olmadığı Ki-kare veya Fisher's Exact Test ile incelendi. İki grup arasında sürekli ve ordinal özellikler yönünden farkın anlamlılığı ise Mann Whitney testi ile araştırıldı. $P < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



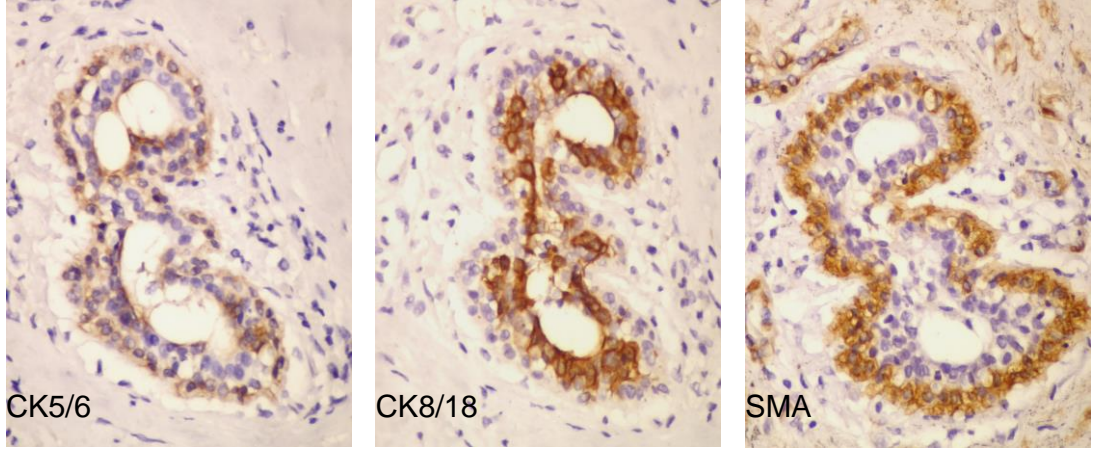
4 BULGULAR

4.1 Histomorfolojik Ve İmmünohistokimyasal Bulgular

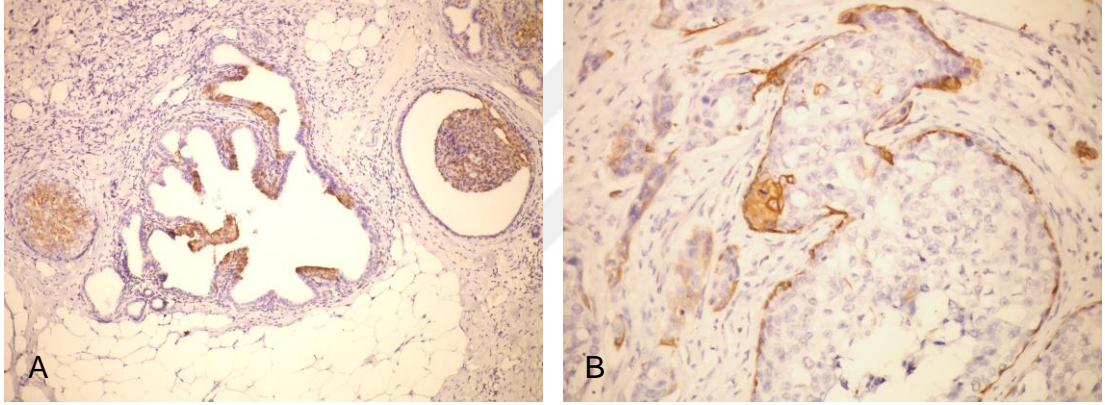
CK5/6 ile herhangi bir kahverenkli sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. Normal asini ve duktuslarda genellikle lüminal alana lokalize heterojen ve değişken derecelerde boyanma görülürken bazal tabakada da boyanma görüldü (Resim 3,4). CK5/6 pozitif tümörlerin 6'sının kesitlerinde eşlik eden intraduktal karsinom odağı izlenmiştir. Sadece 1 olguda bu alanlarda neoplastik hücrelerde boyanma izlendi. Komşu meme dokusunda epitelyal hiperplazi alanlarında boyanma görüldü (Resim 5).



Resim 3: A. Normal meme duktusunda CK5/6 ile lüminal epitelyal hücrelerde heterojen boyanma. Arada boyanmayan lüminal epitelyal (kırmızı ok) ve myoepitelyal (mavi ok) hücreler (x400). **B.** Epidermiste bazal tabaka hücrelerinde CK5/6 ile boyanma, dermise infiltre tümöral dokuda boyanma izlenmiyor (x100).

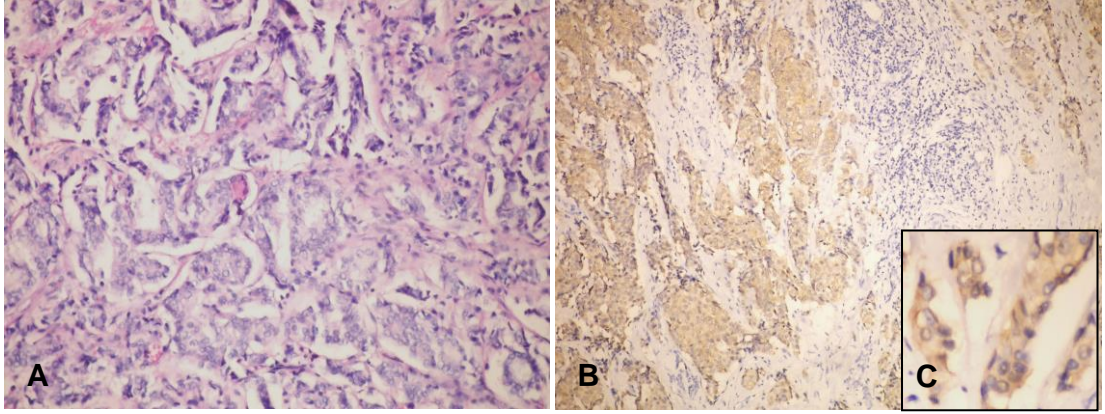


Resim 4: Tümör içermeyen meme parankiminde CK5/6 ile bazal tabakada myoepitelyal hücrelerde hafif sitoplazmik boyanma, CK8/18 ile lüminal glandular hücrelerde, SMA ile myoepitelyal hücrelerde kuvvetli sitoplazmik boyanma (x 400).

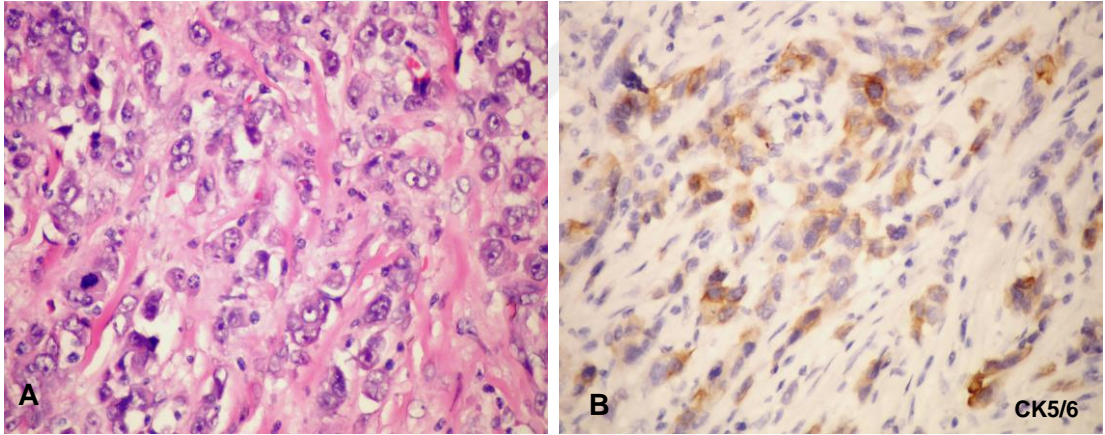


Resim 5: **A.** CK5/6 ile hiperplazi alanlarında boyanma (x100). **B:** CK5/6 ile intraduktal karsinom hücrelerinde boyanma izlenmezken myoepitelyal hücrelerde ve tümöral hücrelerde fokal boyanma mevcuttur (x400).

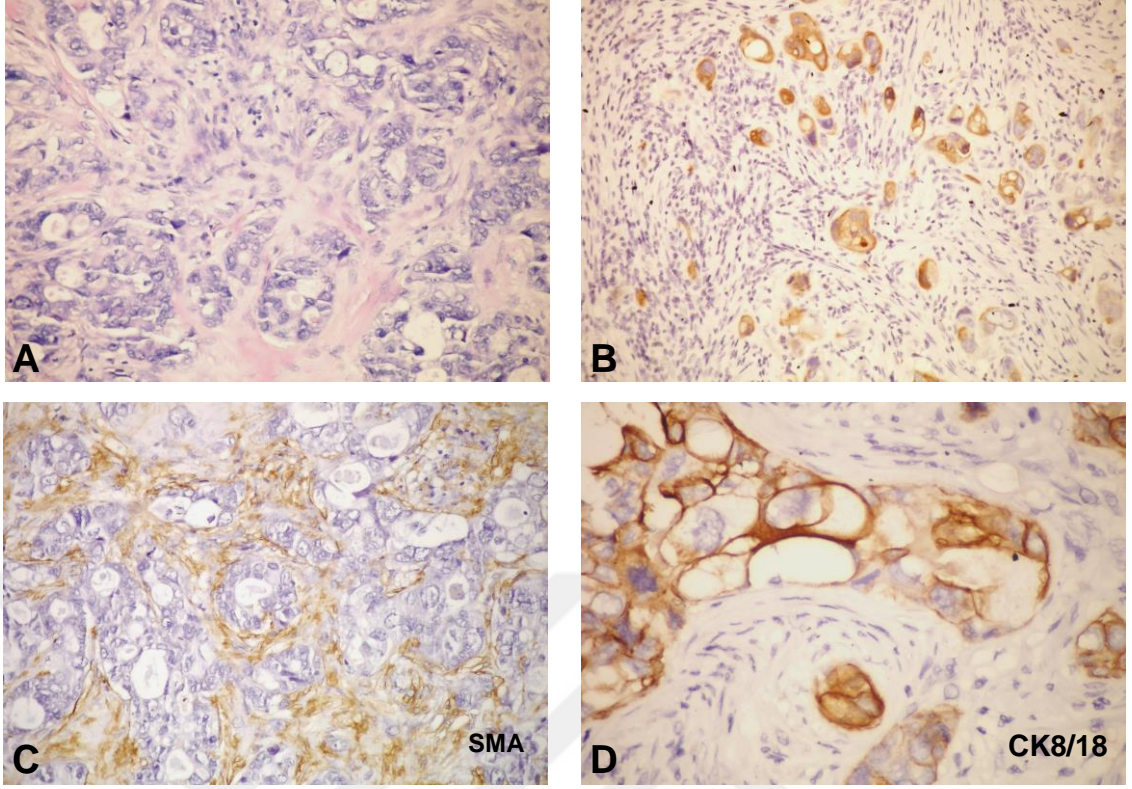
16 olguda invaziv tümöral sahalarda zayıftan kuvvetliye kadar değişen derecelerde, genellikle fokal , bazı olgularda ise diffüz olarak boyanma izlendi. CK5/6 pozitif tümörler, bazıları lenfositik infiltrasyon içeren, yer yer ise çok az desmoplastik stroma içinde genellikle tübül oluşturmayan, bazıları sınırsız solid adalar şeklinde gelişim paternine sahip; pleomorfik, veziküler , hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleollü, sık mitoz içeren atipik hücrelerden oluşmaktadır. Bu olguları diğerlerinden ayıran belirgin histomorfolojik bulguya rastlanmadı (Resim 6 - 10).



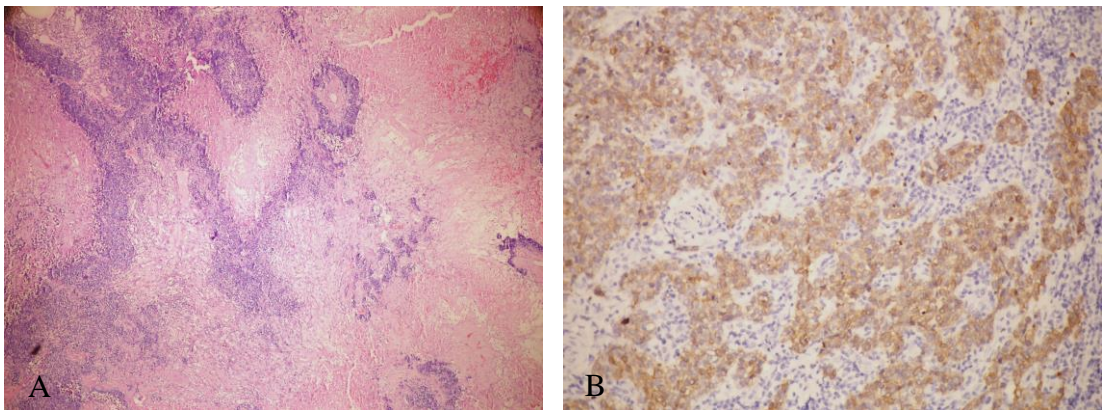
Resim 6: İnvaziv duktal karsinom grade 2 olan bu olguda tümörün daha az diferansiye sahalalarında CK5/6 ile yaygın ve hafif sitoplazmik boyanma izlendi. Aynı zamanda bu olguda ER ve c-erbB-2 negatifken PR pozitif olarak izlendi. **A.** HEx200, **B.** CK5/6x100, **C.** CK5/6x400.



Resim 7: Grade 3 invaziv duktal karsinomda CK5/6 ile hafif ve fokal boyanma. Olguda ER ve c-erbB-2 negatifken PR ile boyanma izlendi. **A:**HEx400 **B:**CK5/6x400

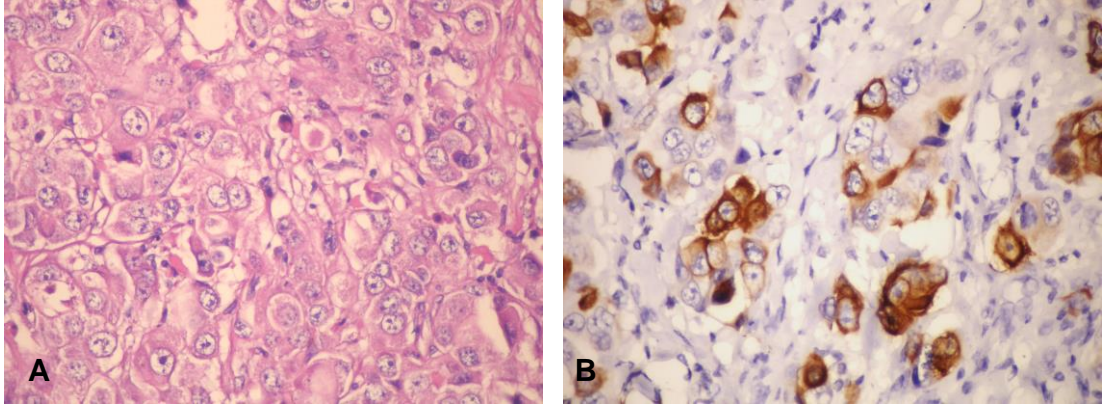


Resim 8: A. Desmoplastik stromada tübül yapıları ve küçük gruplar halinde tümöral hücrelerden oluşan invaziv duktal karsinom, grade2 (HEx200). B. Tümöral hücrelerde CK5/6 ile fokal ve orta şiddetli sitoplazmik boyanma (x400). C. Tümöral doku SMA ile boyanmazken stromada boyanma izleniyor (x400) D. Tümöral hücrelerde CK8/18 ile kuvvetli boyanma (x400). Deriye invazyon gösteren bu olguda ER, PR ve c-erbB-2 negatiftir.



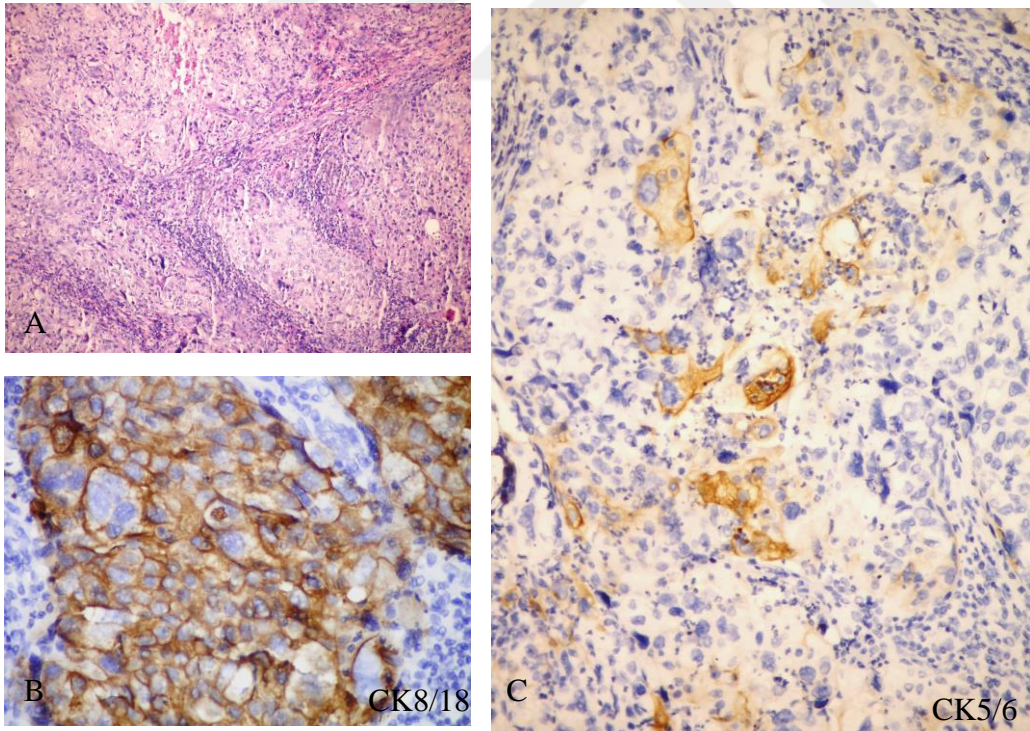
Resim 9: Yaygın nekroz alanları içeren grade 3 tümörde CK5/6 ile yaygın ve orta şiddetli boyanma.

A. HEx40 B. CK5/6x200

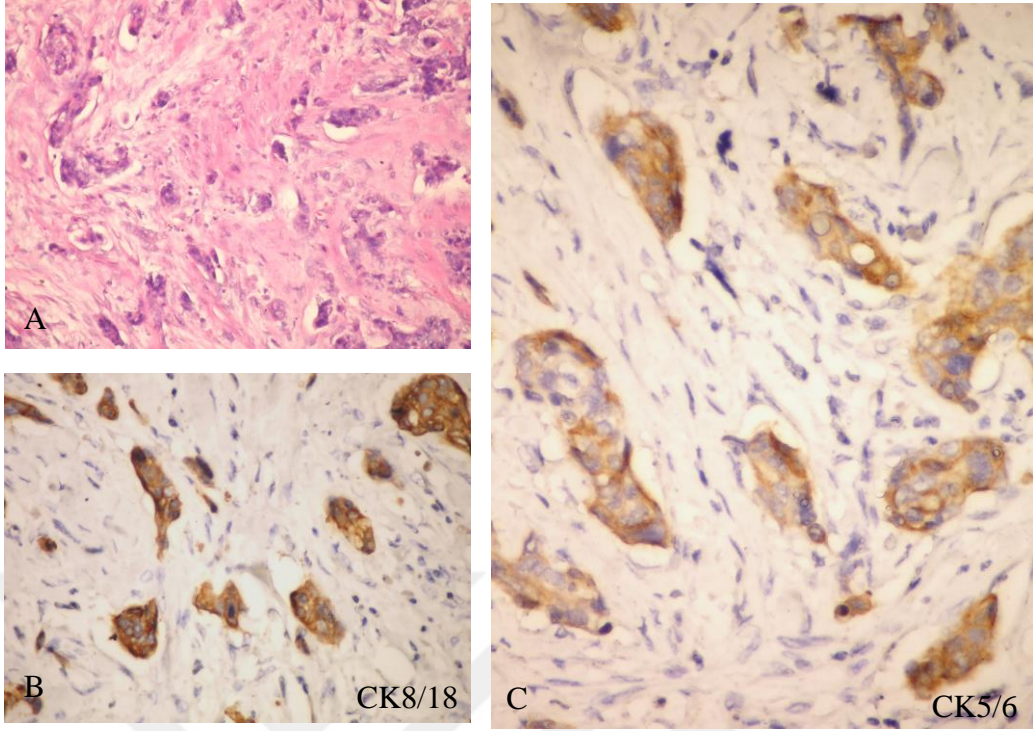


Resim 10: Pleomorfik veziküler nükleuslu belirgin nükleollü geniş eozinofilik sitoplazmalı atipik epitelyal hücrelerden oluşan tümöral dokuda CK5/6 ile fokal , tek tek hücrelerde kuvvetli boyanma. **A.** HEx400 **B.** CK5/6x400

CK8/18 pozitifliği kahverenkli sitoplazmik ve membranöz boyanma olarak izlendi. Normal asini ve duktusların lüminal hücrelerinde , intraduktal karsinomlarda neoplastik hücrelerde ve bütün invaziv tümörlerde boyanma izlendi (Resim 11,12) .



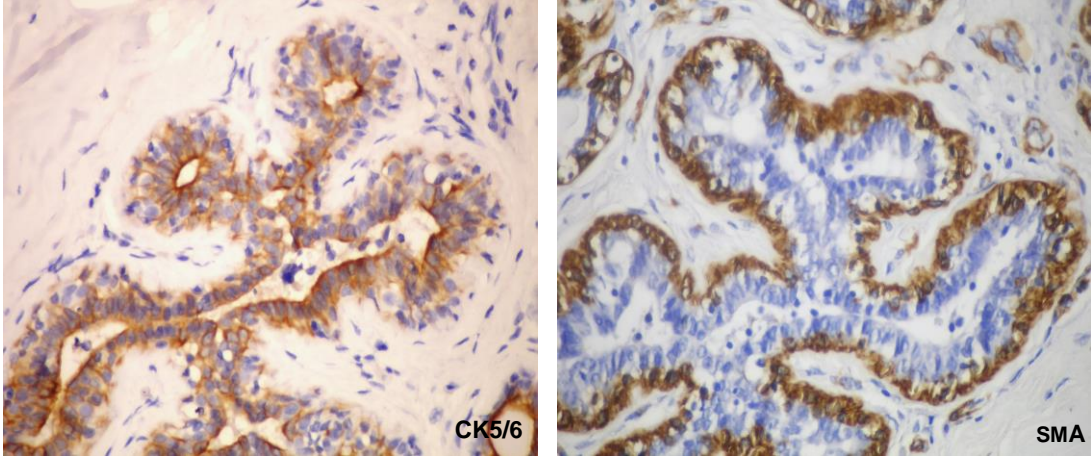
Resim11: Mononükleer iltihabi hücrelerin bulunduğu zeminde solid sinsityal adalar şeklinde tümöral dokuda CK8/18 ile yaygın ve CK5/6 ile fokal boyanma. **A.**HEx100, **B.**CK8/18x400, **C.**CK5/6x200.



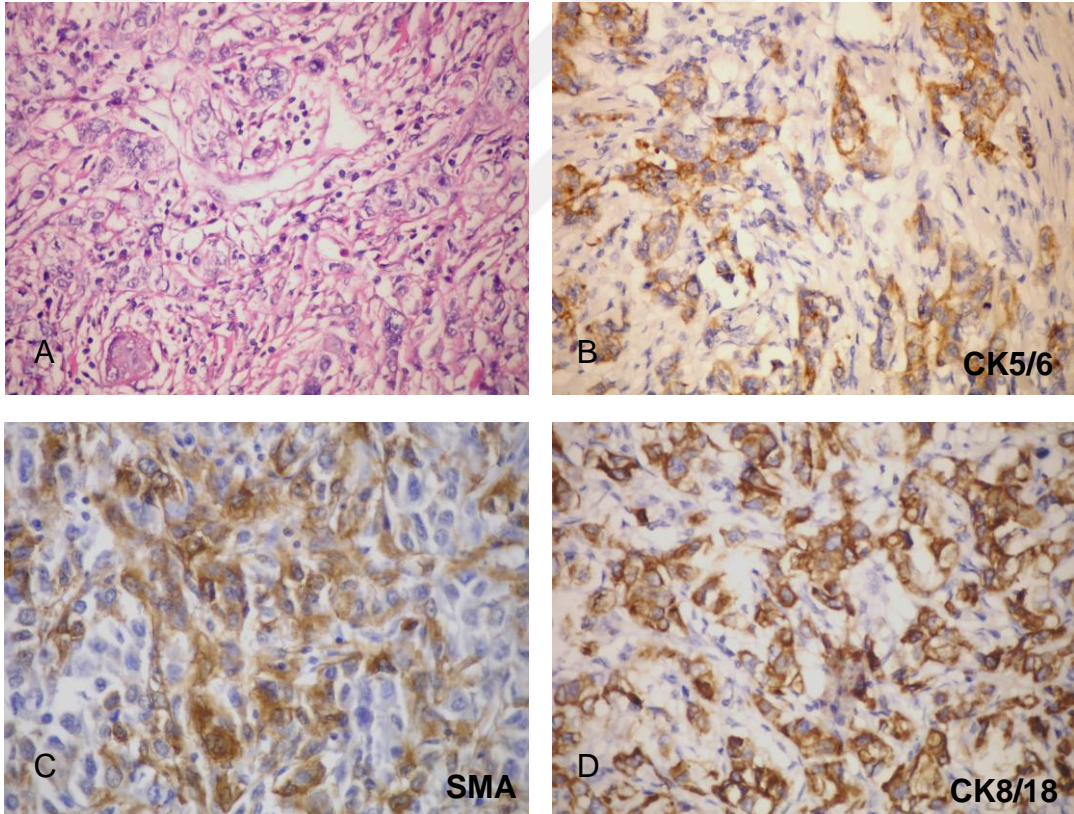
Resim 12: Hyalinize ve desmoplastik stromada küçük solid adalar şeklinde gelişim gösteren tümöral dokuda CK8/18 ile kuvvetli, CK5/6 ile orta şiddette boyanma. A.HEx200, B. CK8/18x400, C. CK5/6x400.

CK8/18 ile genellikle kuvvetli ve diffüz boyanma izlenirken sadece bir olguda orta derecede boyanma görüldü . Grade 3 olan bu tümörde CK5/6 ile daha kuvvetli boyanma izlenirken ER negatif, PR pozitif ve c-erbB-2 ise Skor 1 negatif olarak değerlendirildi. Hiçbir alanda myoepitelyal hücrelerde boyanma görülmedi.

SMA pozitifliği kahverenkli sitoplazmik boyanma olarak tesbit edildi. Kan damarlarının duvarında olduğu gibi, normal asini ve duktusların myoepitel hücrelerinde ve intraduktal karsinomların myoepitel hücrelerinde boyanma izlendi. Normal lüminal epitel hücrelerde boyanma izlenmedi (Resim13). T1 evresinde ve grade 3 olan bir olguda invaziv tümörde SMA pozitif izlendi ve bu pozitiflik damar duvarlarında düz kasın boyanması kadar kuvvetli idi . Bu olguda CK8/18 ile diffüz ve kuvvetli boyanma izlenirken , CK5/6 ile SMA ile benzer kuvvette ve dağılımda boyanma görüldü (Resim 14). Olguda ER ve PR negatif, c-erbB-2 ise Skor 0 olarak izlendi. Onbeş adet metastatik lenf nodu, bu nodlarda konglomerasyon ve ekstrakapsüler invazyon mevcuttu. Tümör stromalarında SMA ile değişen derecelerde myofibroblastlarda boyanma izlendi.



Resim 13: Tümöre komşu meme asini ve duktuslarında CK 5/6 ile daha çok lümenal glandular hücrelerde izlenen sitoplazmik boyanma ve paralel kesitte SMA ile sadece myoepitelyal hücrelerde boyanma (x400).



Resim 14: SMA pozitif tek histolojik grade 3 invaziv duktal karsinom (NOS) olgusu. (A) Pleomorfik , veziküler nükleuslu , belirgin nükleollü, bazıları bizar görünümde atipik epitelyal hücrelerden oluşan tümöral doku. (B) CK5/6 ile yaygın ve orta-kuvvetli sitoplazmik boyanma (C) SMA ile orta-kuvvetli sitoplazmik (D) CK8/18 ile kuvvetli sitoplazmik boyanma (x400).

4.2 İstatistiksel Bulgular

Araştırmaya dahil edilen toplam 93 olguda maksimum yaş 80, minimum yaş 26 olup, ortalama yaş 51,8 ($\pm 11,88$), ortanca yaş 51 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

Olgular boyutlarına göre incelendiğinde tümör çapı maksimum 10 cm, minimum 1 cm olup , ortalama tümör çapı 3,88 cm ($\pm 2,21$), ortanca çap ise 2,21 cm olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Tümör boyutu 2 cm ve altı ve 2 cm üzeri olarak 2 gruba ayrılarak incelendiğinde 28 olgu (%30,1) ilk grupta , 65 olgu (%69,9) 2. grupta saptanmıştır.

Doksanüç olgunun 25 adeti (%26,9) evre T1, 25 adeti (%26,9) T2, 25 adeti (%26,9) T3 ve 18 adeti (%19,3) evre T4'dür (Tablo 4.2)

Tümörler grade'lere ayrılarak incelendiğinde 5 tanesinin (%5,4) grade 1, 41 tanesinin (44,1) grade 2, 47 tanesinin ise (%50,5) grade 3 olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2)

Olgular mitoz sayısına göre incelendiğinde; 1-5 arasında mitoz içeren olgu sayısı 22 (%23,7), 6-10 arasında mitoz içeren olgu sayısı 31 (%33,3), 11 ve üzerinde mitoz içeren olgu sayısı ise 40 (%43) olarak saptanmıştır (Tablo 4.2)

İncelenen olguların 6 (%6,5) tanesinde nekroz görülürken geri kalan 87 (%93,5) olguda nekroz mevcut değildir (Tablo 4.2).

Olgular lenfovasküler tümör invazyonu durumuna göre incelendiğinde 93 olgunun 37 tanesinde (%39,8) lenfovasküler invazyon mevcut olup, geri kalan 56 olguda (60,2) saptanmamıştır (Tablo 4.2)

Otuzüç olguda (%35,5) lenf nodu metastazı izlenmezken geri kalan 60 olguda (%64,5) lenf nodu metastazı görülmüştür. Metastatik lenf nodu içeren 60 olguda maksimum 34, minimum 1 adet metastatik lenf nodu görülmüştür. Ortanca metastatik lenf nodu sayısı 4 olarak saptanmıştır (Tablo4.1) Olgular lenf nodlarının

metastaz durumuna göre 3 grupta incelendiğinde metastatik lenf nodu içermeyen 33 (%35,5) olgu, 4'den az sayıda metastatik lenf nodu içeren 28 (%30,1) olgu, 4 ve üzerinde metastatik lenf nodu içeren 32 (% 34,4) olgu saptanmıştır (Tablo 4.3).

Metastatik lenf nodu içeren 60 olgu lenf nodlarındaki konglomerasyon varlığına göre incelendiğinde; 14 olguda (%23,3) konglomerasyon izlenirken , 46 olguda (%76,7) izlenmemiştir (Tablo 4.3).

Metastatik lenf nodu içeren 60 olgu lenf nodlarındaki tümörün ekstrakapsüler invazyon yapıp yapmadığına göre değerlendirildiğinde; 37 olguda (%61,7) ekstrakapsüler invazyon izlenirken, 23 olguda (%38,3) ekstrakapsüler invazyon saptanmamıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.1 Olguların yaş, tümör boyutu ve metastatik lenf nodlarına göre incelenmesi

	Olgu sayısı	Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum
Yaş	93	51,82	51,0	26,0	80,0
Tümör boyutu/ cm	93	3,88	3,0	1,0	10,0
Metastatik lenf nodu sayısı	60	7,2	7,6	1	34

Tablo 4.2 Olguların grade, evre, mitoz, nekroz ve lenfovasküler invazyon açısından değerlendirilmesi

	Olgu sayısı (toplam 93)	Olgu % değeri (toplam %100,0)
Grade 1	5	5,4
Grade2	41	44,1
Grade3	47	50,5
Evre T1	25	26,9
Evre T2	25	26,9
Evre T3	25	26,9
Evre T4	18	19,3
Mitoz sayısı 1-5 arası	22	23,7
6-10 arası	31	33,3
11 ve üzeri	40	43,0
Nekroz var	6	6,5
yok	87	93,5
Lenfovasküler invazyon var	37	39,8
yok	56	60,2

Tablo 4.3 Lenf nodlarının metastaz sayısına göre, konglomerasyon ve ekstrakapsüler invazyon varlığına göre incelenmesi

	Olgu sayısı	Olgu % değeri
Lenf nodu metastazı yok	33	35,5
<4	28	30,1
>= 4	32	34,4
Toplam	93	100,0
Konglomerasyon Var	14	23,3
Yok	46	76,7
Toplam	60	100,0
Ekstrakapsüler invazyon		
Var	37	61,7
Yok	23	38,3
Toplam	60	100,0

İmmünohistokimyasal sonuçlara göre 74 olgu ER pozitif (%79,6), 19 olgu ER negatif (%20,4) saptanmıştır. PR 81 olguda pozitifken (%87,1), 12 olguda negatiftir (%12,9). c-erbB-2 skorlarına göre incelendiğinde 42 olgu skor 0 (%45,1), 16 olgu skor 1 (%17,2), 10 olgu skor 2 (%10,8) ve 25 olgu skor 3 (+) (%26,9) olarak saptanmıştır.

Araştırmaya dahil edilen 93 olgunun 16'sında (%17,2) tümöral dokuda CK5/6 pozitif olarak izlenmiştir. Geri kalan 77 olguda (%82,8) CK5/6 ile boyanma izlenmemiştir.

Olguların tümünde (%100) tümöral alanlarda CK8/18 pozitif olarak izlenirken sadece 1 olguda (%1,1) SMA pozitif olarak izlenmiştir. Bu olgu aynı zamanda CK5/6 ile de pozitif boyanmıştır.

Tablo 4.4 Olguların immünohistokimyasal sonuçları

		Olgu sayısı (toplam 93)	Olgu %değeri (toplam %100,0)
ER	Pozitif	74	79,6
	Negatif	19	20,4
PR	Pozitif	81	87,1
	Negatif	12	12,9
CerbB2	Skor0	42	45,1
	Skor1	16	17,2
	Skor2	10	10,8
	Skor3 (+)	25	26,9
CK5/6	Pozitif	16	17,2
	Negatif	77	82,8
SMA	Pozitif	1	1,1
	Negatif	92	98,9
CK8/18	Pozitif	93	100,0
	Negatif	0	

Olgular tümörlerin CK5/6 ile boyanma (CK5/6 pozitif) ve boyanmama (CK5/6 negatif) durumuna göre 2 gruba ayrılarak bütün parametrelerle karşılaştırılmıştır.

CK5/6 ile pozitif boyanan 16 olguda maksimum yaş 74, minimum yaş 41 ortalama yaş 53 ve yaş ortalaması 53,62 ($\pm 8,98$) olarak , CK5/6 negatif olgularda yaş, maksimum 80, minimum 26, ortalama yaş 50 ve yaş ortalaması 51,45 ($\pm 12,41$) olarak saptanmıştır. CK5/6 pozitif ve negatif gruplar arasında yaş yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p=0,509$) (Tablo4-5).

Tümör boyutları yönünden incelendiğinde CK5/6 pozitif grupta tümör boyutu maksimum 9 cm, minimum 1,7 cm, ortalama boyut 4,5 cm ve ortalama boyut 4,68 cm

($\pm 2,30$) olarak saptanmıştır. Her iki grup arasında tümör boyut ortalaması yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p=0,078$) (Tablo4-5).

Tablo 4.5 CK5/6 pozitif ve negatif grupların yaş ve tümör boyutlarına göre değerlendirilmesi. *P değeri > 0,05 istatistiksel olarak anlamlı değildir (İAD). **n=olgu sayısı

	CK5/6 negatif (**n= 77)	CK5/6 pozitif (n=16)	P değeri
Yaş / ortalama(minimum- maksimum)	51,45 (26-80)	53,6 (41-74)	*0,509-(İAD)
Tümör boyutu/ ortalama(minimum- maksimum)cm	3,72 (1-10)	4,68 (1,7-9)	*0,078-(İAD)

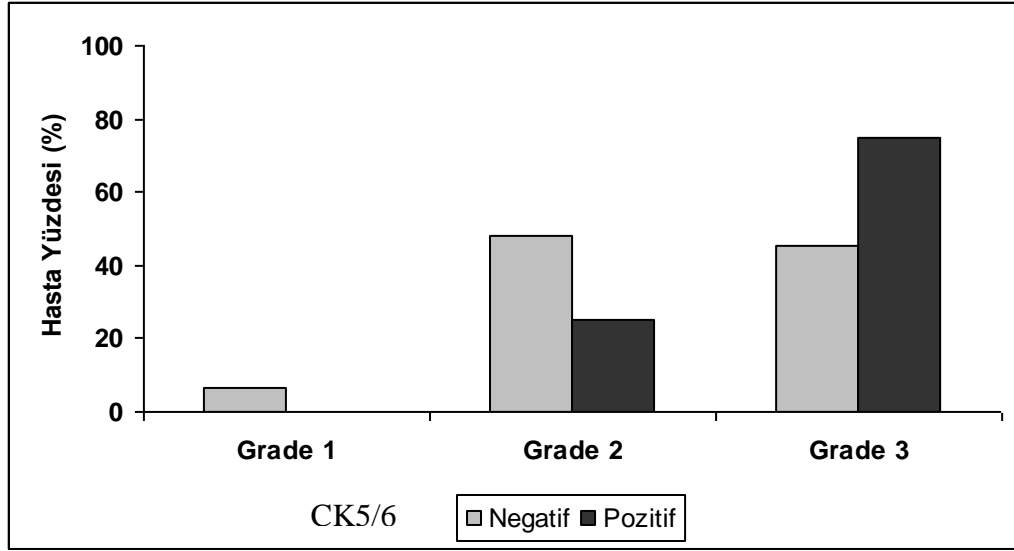
Tümör boyutu 2 cm ve altı ve 2 cm üzeri olarak 2 gruba ayrıldığında ; CK5/6 pozitif 16 vakanın 2 tanesinde (%12,5) tümör boyutu 2 cm ve altında, 14 tanesinde ise (%87,5) 2 cm üzerinde saptanmıştır. C5/6 negatif olan 2. grupta ise 77 olgunun 26 tanesinde tümör boyutu 2cm ve altında (%33,8), 51 tanesinde ise 2 cm üzerinde (%66,2) olarak saptanmıştır. Bulgular çapraz tablo ile karşılaştırıldığında CK5/6 pozitif ve negatif gruplar arasında tümör boyutu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,135$).(Tablo 4.6)

Tablo 4.6 Tümör boyutunun, 2 cm altı ve üzeri olarak 2 gruba ayrıldığında CK5/6 boyanma durumu ile değerlendirilmesi. *P değeri >0,05 istatistiksel olarak anlamlı değildir (İAD).

	CK5/6 negatif (n=77)	CK5/6 pozitif (n=16)	P değeri
Tümör boyutu			*0,135 (İAD)
<=2cm	26 (%33,8)	2 (%12,5)	
>2cm	51 (%66,2)	14(%87,5)	

Olgular mitoz sayısına göre incelendiğinde CK5/6 pozitif grupta 1-5 arası mitoz içeren 2 olgu (%12,5), 6-9 arası mitoz içeren 7 olgu (%43,8) , 10 ve üzerinde mitoz içeren 7 olgu (%43,8) saptanmıştır. CK5/6 negatif grupta 1-5 arası mitoz içeren 20 olgu (%26,0), 6-9 arası mitoz içeren 24 olgu (%31,1) ve 10 ve üzeri mitoz içeren 33 olgu (%42,9) izlenmiştir. CK5/6 pozitif ve negatif gruplar arasında mitoz sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,439) (Tablo 4.7).

CK5/6 pozitif grupta grade 1 olgu izlenmezken, 4 adet grade 2 (%25,0), 12 adet grade 3 (%75,0) olgu saptanmıştır. CK5/6 negatif grupta 5 adet grade 1 (% 6,4), 37 adet grade 2 (%48,1) ve 35 adet grade 3 (%45,5) olgu saptanmıştır. İki grup arasında tümör grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p= 0,027). Buna göre CK5/6 ile boyanan grubun , boyanmayanlara göre daha yüksek gradeli olduğu söylenebilir (Şekil 4.1,Tablo 4.7).



Şekil 4.1 CK5/6 pozitif ve negatif grupların grade yönünden dağılımı

Olgular nekroz varlığına göre incelendiğinde CK5/6 pozitif grupta 3 adet olguda (%18,8), CK5/6 negatif grupta 3 adet olguda (%3,9) nekroz görülmüştür. İki grup arasında nekroz varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,061$) (Tablo 4.7).

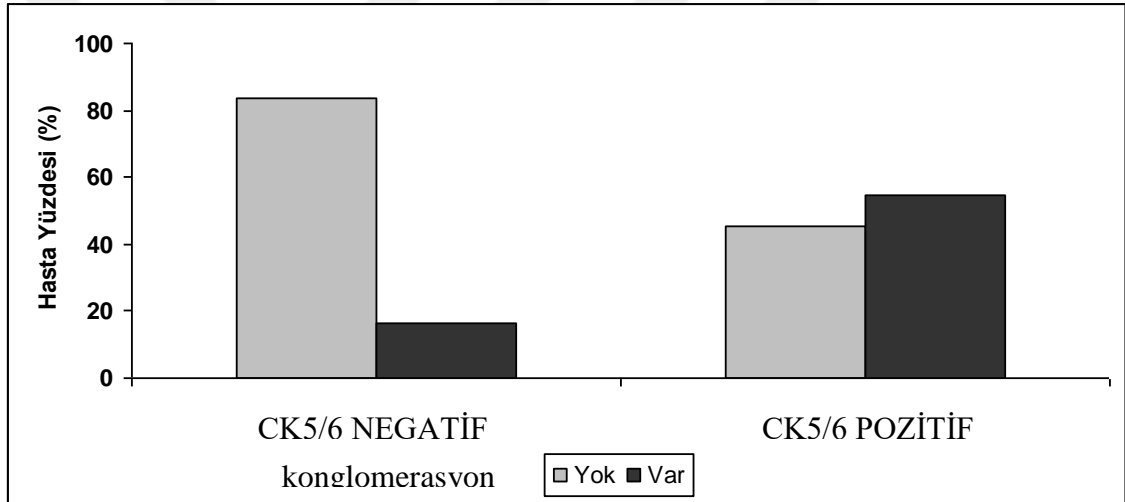
CK5/6 pozitif 16 olgunun 7 adetinde (%43,8) tümörün lenfovasküler invazyon yaptığı izlenirken, 77 olgu içeren CK5/6 negatif grupta 30 olguda (%39,0) lenfovasküler invazyon saptanmıştır. Her iki grup arasında lenfovasküler invazyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,722$) (Tablo 4.7).

Olgular lenf nodu metastazı yönünden incelendiğinde CK5/6 pozitif grupta 16 vakanın 11'inde (%68,8) metastatik lenf nodu izlenirken, CK5/6 negatif 77 olgunun 49'unda (%63,7) metastatik lenf nodu mevcuttur. İki grup arasında metastatik lenf nodu varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,697$).

Lenf nodları 3 grupta incelendiğinde ise CK5/6 pozitif 5 olguda (%31,3) metastaz görülmezken, 5 olguda (%31,3) 4'den az sayıda metastatik lenf nodu, 6 olguda (%37,5) 4 ve üzerinde sayıda metastatik lenf nodu saptanmıştır. CK5/6 boyanmayan grupta ise 28 olguda (%36,3) metastaz izlenmezken, 23 olguda (%29,9)

4'den az, 26 olguda (% 33,8) 4 ve üzerinde sayıda lenf nodunda metastaz görülmüştür. Yine her iki grup arasında metastatik lenf nodu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,701$). (tablo 4.7)

Metastatik lenf nodları konglomerasyon varlığı açısından değerlendirildiğinde CK5/6 boyanan grupta 6 olguda (%54,5) lenf nodunda konglomerasyon mevcuttur. CK5/6 negatif grupta ise 8 olguda (% 16,3) lenf nodunda konglomerasyon izlenmiştir. İki grup arasında konglomerasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,014$). Buna göre CK5/6 pozitif olan grupta konglomerasyon varlığının negatif gruba göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.2, Tablo 4.7).



Şekil 4.2 CK5/6 pozitif ve negatif grupların metastatik lenf nodlarında konglomerasyon bulunması yönünden dağılımı (Şekil alt açıklamasında var/yok ile belirtilen: konglomerasyon varlığı ve yokluğuna ilişkindir).

Metastatik lenf nodları ektrakapsüler tümör invazyonu açısından değerlendirildiğinde CK5/6 boyanan ve lenf nodu metastazı gösteren 11 olgunun 8'inde (%72,7) ektrakapsüler invazyon izlenmiştir. CK5/6 negatif grupta ise 29 olguda (%59,2) ektrakapsüler invazyon izlenmiştir. CK5/6 pozitif ve negatif gruplar arasında ektrakapsüler invazyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,506$) (Tablo 4.7).

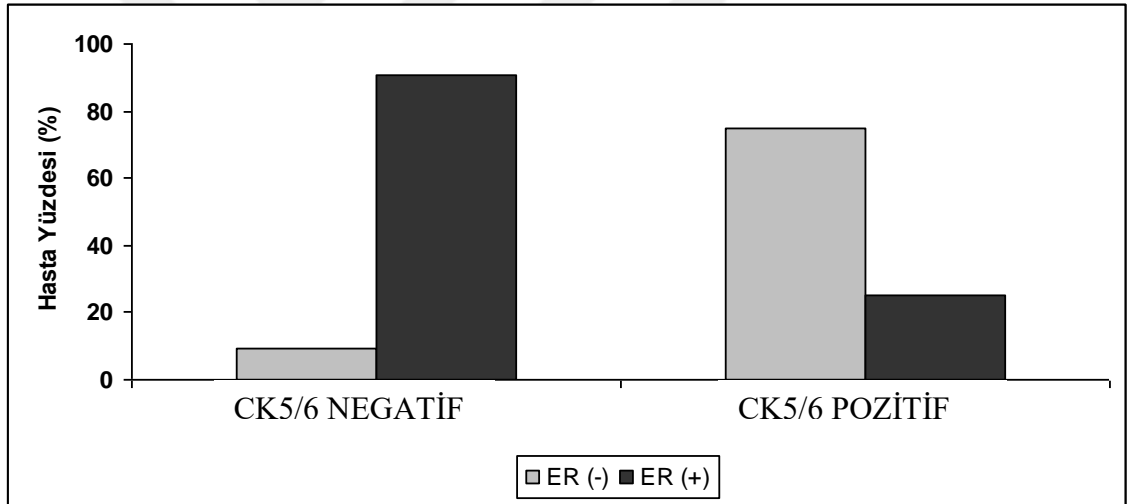
Tablo 4.7 CK5/6 pozitif ve negatif olguların çeşitli parametreler yönünden karşılaştırılması. *p değeri<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır (İA).

	CK5/6 negatif (n=77)	CK5/6 pozitif (n=16)	P değeri
Mitoz sayısı			0,439
1-5 arası	20 (%26,0)	2 (%12,5)	
6-10 arası	24 (%31,1)	7 (%43,8)	
11 ve üzeri	33 (%42,9)	7 (43,8)	
Grade			*0,027 (İA)
Grade 1	5 (%6,4)	0 (%0)	
Grade 2	37 (%48,1)	4 (%25,0)	
Grade3	35 (%45,5)	12 (%75,0)	
Nekroz			0,061
Var	3 (%3,9)	3 (%18,8)	
Yok	74 (96,1)	13 (%81,2)	
Lenfovasküler invazyon			0,722
Var	30 (39,0)	7 (%43,8)	
Yok	47 (%61,0)	9 (%56,3)	
Lenf nodu metastazi			0,701
Yok	28 (%36,3)	5 (%31,3)	
<4	23 (%29,9)	5 (%31,3)	
>=4	26 (%33,8)	6 (%37,5)	
Konglomerasyon			*0,014 (İA)
Var	8 (%16,3)	6 (%54,5)	
Yok	41 (%83,7)	5 (%45,5)	
Ekstrakapsüler invazyon			0,506
Var	29 (%59,2)	8 (%72,7)	
Yok	20 (%40,8)	3 (%27,3)	

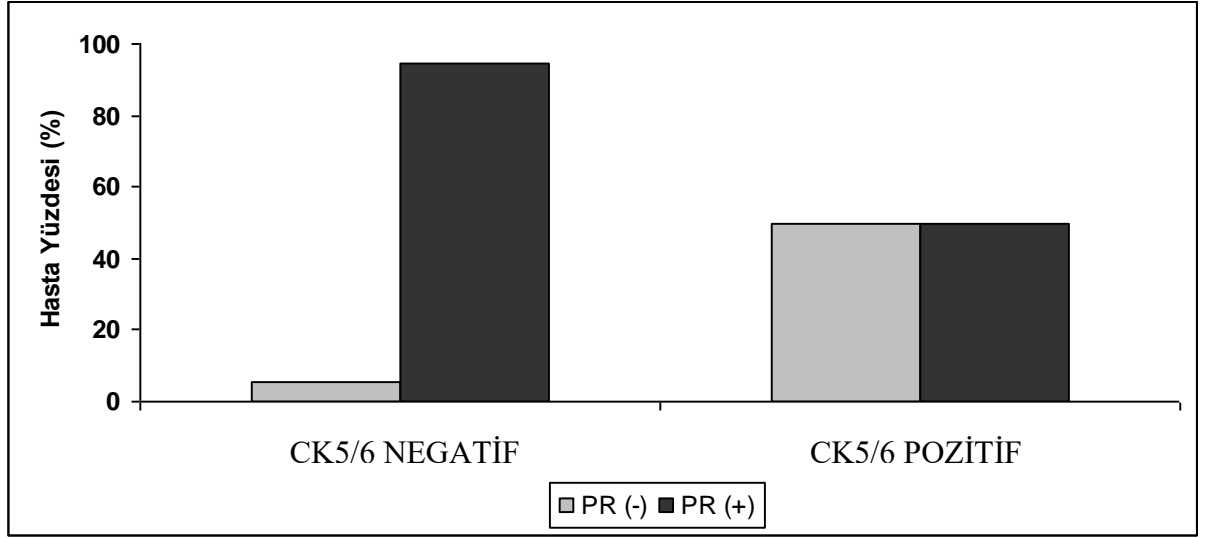
İmmünohistokimyasal boyanma (ER, PR, c-erbB-2, CK8/18, SMA) sonuçları CK5/6 pozitif ve negatif grup arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

CK5/6 pozitif 16 olgunun 4 adetinde (%25,0) ER pozitif , 12 adetinde (%75,0) negatif izlenirken, CK5/6 negatif grupta ise 70 olguda (%90,9) ER pozitif, 7 olguda (%9,10) ise ER negatiftir (Şekil 4.3).

CK5/6 pozitif 16 olgunun 8 adetinde (%50,0) PR pozitif , 8 adetinde (%50,0) negatif izlenirken, CK5/6 negatif grupta ise 73 olguda (%94,8) PR pozitif, 4 olguda (%5,2) ise PR negatiftir (Şekil4.4). Gruplar arasında hem ER hem de PR boyanma pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Buna göre CK5/6 pozitif grupta ER ve PR negatifliği , diğer gruba göre daha yaygın olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.3 CK5/6 pozitif ve negatif grupların ER boyanması yönünden dağılımı



Şekil 4.4 CK5/6 pozitif ve negatif grupların PR boyanması yönünden dağılımı

C-erbB-2 skor 0,1,2 ve 3 olarak 4 grupta incelenmiştir. CK5/6 pozitif grupta 4 olgu (%25,0) skor 0, 4 olgu (%25,0) skor 1, 3 olgu (%18,8) skor 2, ve 5 olgu (%31,2) skor 3 olarak bulunmuştur. CK5/6 negatif grupta ise 38 olgu (%49,3) skor 0, 12 olgu (%15,6) skor 1, 7 olgu (%9,1) skor 2 ve 20 olgu (%26,0) skor 3 olarak saptanmıştır. C-erbB-2 boyanma skorları yönünden 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,154$).

SMA sadece CK5/6 pozitif olan 1 olguda (%6,3) boyanmıştır. Her iki grup arasında SMA yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,172$).

CK8/18 bütün olgularda boyandığı için istatistiksel olarak değerlendirme yapılmadı.

Tablo 4.8 İmmünohistokimyasal boyanma (ER, PR, CerbB2, SMA) sonuçlarının CK5/6 pozitif ve negatif grup arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması.* p değeri<0,001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (İA).

	CK5/6 negatif (n=77)	CK5/6 pozitif (n=16)	P değeri
ER			*<0,001 (İA)
Pozitif	70 (%90,9)	4 (%25,0)	
Negatif	7 (%9,1)	12 (%75,0)	
PR			*<0,001 (İA)
Pozitif	73 (%94,8)	8 (%50)	
Negatif	4 (%5,2)	8 (%50)	
CerbB2			0,154
Skor0	38 (%49,3)	4 (%25,0)	
Skor1	12 (%15,6)	4 (%25,0)	
Skor2	7 (%9,1)	3 (%18,8)	
Skor3	20 (%26,0)	5 (%31,2)	
SMA			0,172
Pozitif	0 (%0)	1 (%6,3)	
Negatif	77 (%100,0)	15 (%93,7)	

5 TARTIŞMA

Kullanılan meme tümörü sınıflandırması klasik histopatolojiye dayanır (1). Tümör boyutu, histolojik grade, lenf nodu metastazı prognostik gösterge olmasına rağmen, histolojik görünüm tümörlerin moleküler heterojenitesini yansıtmaz ve benzer morfolojik subtipteki tümörler farklı biyolojik davranış gösterebilir. Farklı davranışa sahip çoğu tümör (%75-80) aynı histolojik gruptadır, invaziv duktal karsinom, NOS. Bu tümörlerin çoğunluğu, normal meme duktus ve asinilerin lüminal hücrelerinde bulunan CK8, CK18 ve CK19 gibi basit sitokeratinleri eksprese eden lüminal fenotiptedir. Bir süredir invaziv duktal karsinomun bir grubunun aynı zamanda normal meme duktus ve asinilerin dış kısmındaki myoepitel/bazal tabakada bulunan proteinleri eksprese ettiği gösterilmektedir. Bunlar CK5/6, CK14 ve CK17 gibi yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler, SMA, kalponin, S100 gibi düz kas belirleyicileridir (6, 15-19, 126, 129, 132, 146, 147). Rutin değerlendirmede bu inceleme standart değildir ve terminolojide fikir birliğine varılmamıştır. Farklı araştırmacılar bu tümörleri anlatırken; bazaloid, 'bazal-like', bazal fenotip, myoepitelyal fenotip, myoepitelyal diferansiyasyon gösteren duktal kanserler gibi kendi tercih ettikleri terimleri kullanmışlardır (18, 22, 60, 129, 145,148). Bu tümör gruplarının ayrı bir subgrup olarak kabul edilmesini ve buna göre tedavi planlanması gerektiğini önermişlerdir. Bazal hücre terimi benign meme dokusunda bazal sitokeratinleri eksprese eden hücreler için kullanılır ve bu hücrelerin progenitör veya kök hücreyi temsil ettikleri, lüminal ve myoepitelyal hücrelerin öncüleri oldukları çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir (13, 14, 128, 141). Fenotipteki bu çeşitlilik, meme gelişiminin farklı basamaklarında karsinogenezin başlamasıyla ortaya çıkar (12).

Bindokuzyüzkırkdört invaziv meme karsinomu içeren seride Abd El-Rehim ve ark. bazal (CK5/6, CK14), lüminal CK8, CK18, CK19 ve ilaveten SMA ve ER ekspresyonlarını incelemişlerdir. Boyanma paternlerine göre tümörler; saf lüminal (CK8/18/19 +), mikst lüminal/bazal (CK8/18/19 ve CK5/6 +), saf bazal (CK5/6 +) ve 'null' (CK8/18/19 ve CK5/6 -) olmak üzere 4 farklı kategoriye ayrılmıştır. Bu gruplar farklı biyolojik özelliklere sahiptir ve klinik sonuçları farklı olabilir. Lüminal tiptekiler ER pozitifliği, daha büyük hasta yaşı ile birlikte ve iyi prognoza sahiptir.

Kombine mikst lüminal/bazal ve sadece bazal gruptaki tümörler ER negatiftir ve kötü prognozla birlikte. Yine bu çalışmada relapsız interval için CK5/6'nın bağımsız faktör olduğu gösterilmiştir (19). Birkaç yıl sonra aynı hasta grubuyla yapılan incelemede; tümörler immünohistokimyasal boyanmalarına göre 2 gruba ayrılmıştır. 1. Bir veya daha fazla bazal belirleyici (CK5/6, CK14) eksprese eden bazal fenotip 2. SMA ve / veya p63 eksprese eden myoepitelyal fenotip. İlk grup; 1A. %50'den fazla hücrenin pozitif olduğu dominant bazal patern ve 1B. %10-50 hücrenin pozitif olduğu bazal karakteristik olarak 2 subgruba ayrılmıştır. Bazal fenotipteki tümörler %18,6 (1A (%8,6) 1B (%10) ve myoepitel fenotip grubu ise vakaların %13,7'sini oluşturmuştur. Her iki grupta da en sık histolojik tip invaziv duktal karsinom (NOS) olarak bulunmuştur. Bazal ve myoepitelyal fenotipe sahip tümörler aynı morfolojik özellikleri taşımalarına rağmen 2. gruptan farklı olarak , bazal grup prognozu belirlemede bağımsız bir özellik olarak kabul edilmiştir (22).

Altıyüzonbir meme karsinomu olgusunda, %16 tümörde CK5/6 ve/veya CK17 ekspresyonu görülmüştür. Bu grubun prognozu, negatif olan tümörlerden daha kötü bulunmuştur. Lenf nodu metastazı olmayan hastalarda bazal CK ekspresyonu tümör boyutu, grade, HER2/neu ve ER'den bağımsız prognostik faktör olarak kabul edilmiştir (17).

Biz çalışmamızda invaziv duktal karsinomda bazal diferansiyasyonu göstermek için CK5/6, myoepitelyal diferansiyasyon için SMA ve ayrıca lüminaldiferansiyasyon için CK8/18 kullandık. Çalışmamızdaki 93 olgunun hepsi CK8/18 ile boyanırken , sadece 1 tanesi SMA ile ve 16 tanesi CK5/6 ile boyanmıştır. T1 evresinde ve grade 3 olan SMA pozitif tek olguda CK8/18 ile diffüz ve kuvvetli boyanma izlenirken , CK5/6 ile SMA ile benzer kuvvette ve dağılımda boyanma görüldü. Olguda ER ve PR negatif, c-erbB-2 skor 0 olarak izlendi. 15 adet metastatik lenf nodu ve bu nodlarda konglomerasyon ve ekstrakapsüler invazyon mevcuttu.

Birçok myoepitelyal belirleyici bulunmasına rağmen, normal meme dokusunda ve malign meme lezyonlarında SMA güvenilir olarak kullanılmaktadır (11, 14-16, 19, 20, 35, 149). Yüz meme karsinomu ile çalışılan seride Nayar ve ark.

%10 olguda SMA ile pozitif boyanan tümör hücreleri göstermişlerdir. SMA pozitifliğinin bu olgularda tümör adalarında daha çok tek tek hücreler şeklinde ve kuvvetli olarak boyandığı rapor edilmiştir. Bu sonuçla tümör hücrelerinin en azından parsiyel olarak myoepitelyal diferansiyasyon gösterdiklerini ve SMA pozitifliğinin her zaman benign anlamına gelmediğini belirtmişlerdir (35). Yetmişyedi ER negatif, 40 ER pozitif invaziv meme karsinomu olgusunda myoepitelyal belirleyiciler olan CD10, SMA ve S100 çalışılmış ve ER negatif grupta en az %29 olguda myoepitelyal belirleyiciler pozitif olarak bulunmuştur (146).

Altmışbeş primer invaziv karsinom içeren ve çeşitli belirleyicilerle diferansiyasyonları incelenen çalışmada , tümörler 3 ana gruba ayrılmıştır; sadece basit epitelyal CK'leri eksprese eden , 34BE12 ve K8.12 antikorlarını eksprese eden ve 3. olarak CK14, CK17, SMA ve vimentin eksprese eden grup. Bazal ve myoepitelyal belirleyicileri birlikte eksprese eden 3. grup tümörler diğer grupların aksine kötü prognoz göstergeleri olan yüksek Ki-67 düzeyi, EGFR pozitifliği ve ER-PR negatifliği ile birlikte (15). Bizim SMA ve CK5/6 pozitif olan tek olgumuz, kötü prognoz göstergeleri olan grade 3, ER ve PR negatifliği ve lenf nodu metastazı ile birlikte. Rakha ve ark.'larının 1944 olguluk serisinde CK5/6 ve SMA'yı aynı anda eksprese eden tümörlerin bu belirleyicileri tek başına eksprese eden bazal ve myoepitelyal fenotipteki tümörlerden daha kötü prognoza sahip olduklarını savunmuşlardır (22).

S100, SMA ve CK14' den en az birini eksprese eden, myoepitelyal diferansiyasyon gösteren 30 yüksek gradeli invaziv duktal karsinom ve 36 konvansiyonel invaziv duktal karsinomun incelendiği çalışmada myoepitelyal diferansiyasyon gösteren gruptaki tümörlerde c-erbB-2 , ER ve PR çoğu olguda negatif, P53 ve EGFR pozitif izlenmiştir.Yine bu grupta cerrahi tedavi sonrası izlemde beyin, akciğer, kemik başta olmak üzere , diğer gruptan daha fazla metastaz gelişimi görülmüş ve myoepitelyal diferansiyasyon göstermeyen gruptan daha düşük hastaliksız sağkalım saptanmıştır (147). Bizim olgumuzda da bu çalışmayla uygun olarak c-erbB-2 negatif bulunmuştur .

Bizim olgumuzdaki sitoplazmik SMA boyanması tümör adalarında yaygın olarak ve bazı alanlarda tek tek hücreler halindedir. Ancak literatürle uyumsuz olarak (%10 ve 13,7) 93 olgunun sadece birinde boyanma görülmüştür (22, 35). Bu yüzden myoepitelyal diferansiyasyon istatistiksel olarak anlamsız olacağı için diğer parametrelerle birlikte değerlendirmeye alınmamıştır.

Daha önceki yayınlanan meme karsinomu serilerinde CK5/6 ekspresyonu %14 ile % 38,4 arasında değişmektedir (17, 18, 21, 50, 124, 130, 148, 150). Bizim çalışmamızda bu değer literatürle uyumlu olarak %17,2 bulunmuştur.

Daha önce invaziv meme tümörlerinde CK5/6 ile yapılan çalışmalarda pozitiflik için farklı değerlendirmeler yapılmıştır. Bazıları %10'un üzerinde sitoplazmik (22, 148), %5'in üzerinde sitoplazmik (124, 126) ve çoğu ise bizim çalışmamızda olduğu gibi herhangi bir 'cut-off' değeri kullanmadan sitoplazmik boyanmayı pozitif kabul etmişlerdir (17, 18, 21, 22, 119, 130, 148). Bir çalışmada ise diğerlerinden farklı olarak sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir (126).

Olgularımızda komşu tümör içermeyen meme dokusunda, normal asini ve duktuslarda CK5/6 ile genellikle lüminal alana lokalize heterojen ve değişken derecelerde boyanma görüldü. Bazı alanlarda bazal tabakada da boyanma izlenmiştir. CK8/18 ile sadece lüminal epitelde boyanma izlenirken SMA ile sadece bazal myoepitelyal hücrelerde boyanma olmuştur.

Daha önceki çalışmalarda normal meme dokusunda CK5/6 ekspresyonu için farklı sonuçlar mevcuttur. Bazı vakalarda sadece myoepitelyal hücrelerde eksprese olurken, diğerlerinde ise bizim çalışmamızda olduğu gibi, hem lüminal epitelial hücrelerde hem de myoepitelyal hücrelerde değişen derecelerde ve heterojen boyanma izlenmiştir (5, 11, 13, 17, 127). Meme epitelinde progenitor/kök hücre varlığını gösteren bir çalışmada lüminal epitelial hücrelerin çoğunluğu CK5 ve CK8/18'i aynı anda eksprese ederken, sadece CK8/18 pozitif az sayıda hücre olduğu double immünfloresan teknikte gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bazal tabaka hücrelerinin çoğunluğu CK5 ve SMA aynı anda pozitifken, sadece SMA pozitif hücre sayısı çok azdır (14). Yine bu yayınlarda bizim çalışmamızla uyumlu olarak

CK8/18 ile lüminal epitelyal hücrelerde, SMA ile bazal tabaka hücrelerinde boyanma görülmüştür.

Çalışmamızda CK5/6 pozitif tümörlerin 6'sının kesitlerinde eşlik eden intraduktal karsinom odağı izlenmiştir. Sadece 1 olguda bu alanlarda neoplastik hücrelerde boyanma izlenirken diğerlerinde boyanma görülmemiştir.

CK5/6 duktal hiperplazide proliferatif hücrelerde pozitifken, apokrin metaplazi ve kolumnar hücre değişikliği gösteren hücrelerde , atipik duktal hiperplazi , duktal karsinoma insitu ve lobuler karsinoma insituda neoplastik hücrelerde negatiftir (11, 13, 127, 151). Bir çalışmada DCIS olgularının %3,7'sinde CK5/6 ile az sayıda pozitif hücre izlenmiştir (127).

Onaltı olguda invaziv tümöral sahalarda zayıftan kuvvetliye kadar değişen derecelerde, genellikle fokal , bazı olgularda ise diffüz olarak CK5/6 ile boyanma izlendi. CK5/6 pozitif olan 16 olgumuzda yaş aralığı 41-74, ortalama yaş 53,62'dir. Literatürde bazı çalışmalarda CK5/6 pozitif olgularda ortalama hasta yaşı 50'nin üzerinde olmakla birlikte bizim çalışmamızda olduğu gibi , negatif grupla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (150). Bazı çalışmalarda ise bu fark anlamlı bulunmuş ve CK5/6 eksprese eden tümöre sahip hastaların daha genç (25-50) oldukları ve bu tümörlerin genellikle daha büyük boyutlu ve kötü prognoza sahip oldukları belirtilmiştir (19-50). Kırküç grade 3 invaziv duktal karsinom olgusunda CK14 ve 'comperative genomic hybridisation' (CGH) analizi ile farklı prognoza sahip alt gruplar olduğunu göstermek için yapılan çalışmada, CK14 pozitif gruptaki tümörler ER, PR, c-erbB-2 negatiftir ve ortalama tümör boyutu 3,4 cm'dir. Bazal fenotipteki tümörlerin ise genetik farklılıklarla gösterilen ve kötü prognoza sahip, alt grubu mevcuttur (152). Bizim çalışmamızda tümör boyutu CK5/6 pozitif grupta ortalama 4, 48 cm olup, 1,7-9 cm arasında değişmektedir. Bu gruptaki tümörlerin (%87,5) çoğu literatürle uyumlu olarak 2 cm ve üzerindedir. Ancak CK5/6 pozitif ve negatif gruplar arasında tümör boyutu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.135).

Bazal ve myoepitelyal diferansiyasyon gösteren meme karsinomlarının morfolojik incelemesinde, bazal fenotipteki grupta artmış mitotik aktivite, belirgin

nükleer pleomorfizm, tübül formasyon kaybı, komedo nekroz ve adenoid kistik değişiklikler en sık görülen morfolojik değişikliklerdir. Sadece SMA eksprese eden grupta ise artmış mitotik aktivite, belirgin nükleer pleomorfizm, spindle, bazaloid ve 'clear' hücre değişiklikleri ve santral asellüler alanlar sık izlenmiştir (22). Tsuda ve ark. S100, SMA ve CK14 ekspresyonu gösteren büyük santral asellüler alan içeren invaziv duktal karsinomların akciğer ve beyin metastaz risklerinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir (16). Fulford ve ark.'nın bazal fenotipe sahip grade 3 invaziv duktal karsinom morfolojik özellikleri araştırdığı çalışmasında, yüksek mitoz sayımı, sinsityal büyüme paterni, santral skar, tümör nekrozu, spindle, şeffaf ve bazaloid hücre, belirgin sitoplazma yokluğu ve skuamöz metaplazi varlığı bazal fenotip içeren tümörlerde sık olarak izlenmiş fakat skuamöz metaplazi, yüksek mitoz, belirgin tümör nekrozu santral asellüler alanlar ve spindle hücre varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Böylelikle farklı bir antite olarak kabul edilen bazal fenotipi belirlemede morfolojik özellikler patoloğlara uyarıcı nitelikte olabileceğini göstermişlerdir (145). Bizim çalışmamızda CK5/6 pozitif tümörler diğer çalışmalarla benzer şekilde genellikle tübül oluşturmeyen, bazıları sinsityal solid adalar şeklinde gelişim paternine sahip; pleomorfik, veziküler, hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleollü, sık mitoz içeren atipik hücrelerden oluşmaktadır. CK5/6 pozitif grupta sadece 3 olguda (%18,8) tümör nekrozu izlendi, bu değer literatürde yayınlanan değerden (%76) oldukça düşüktür ve negatif grupla arasında nekroz yönünden istatistiksel fark bulunmamıştır (p=0.061) (145).

Lenfovasküler tümör invazyonu, meme karsinomlarında prognostik parametre olarak kabul edilmiştir (25, 74, 75). Bu yüzden biz de çalışmamızda LVİ'yi patolojik prognostik parametre olarak kullandık ve CK5/6 pozitif gruptaki olguların %43,8'inde saptadık. Bu değer diğer çalışmalardan daha yüksektir ancak onlarla uyumlu olarak bazal ve bazal olmayan grupla arasında anlamlı fark yoktur. (22, 145). Jones ve ark. 92 invaziv duktal karsinomun 7'sinde CK14 ile bazal hücre fenotipi belirlemişlerdir. Bu tümörlerin hepsinin de boyutları büyük, mitoz sayısı yüksek ve grade 3 olarak saptanmıştır. Ortak morfolojik özellik olarak itici veya invaziv tümör sınırlarına sahip, büyük tabakalar, solid adalardan oluştuğunu ve sınırlarda orta veya belirgin lenfositik infiltrat içerdiğini belirtmişlerdir. Hepsi ER, PR ve c-erbB-2 negatiftir ve 4 tanesinin aynı zamanda SMA eksprese ederken

konvansiyonel myoepitelyal karsinoma benzer moleküler sitogenetik profile sahip olduğunu CGH analiz çalışmalarla göstermişlerdir. (129)

Olgularımızda CK5/6 pozitif grupta mitoz sayısı diğer çalışmalarla uyumlu olarak yüksek çıkmıştır ancak negatif grupla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.439$) (22, 129, 145).

İnvaziv meme karsinomlarında tübül formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayımı ile belirlenen histolojik grade önemli bir prognostik faktördür (4, 11, 26, 78). Tümör boyutu, evresi ve lenf nodu metastazı gibi diğer prognostik parametrelerle birlikte kullanıldığında prognozu belirlemede daha etkili olabilir (24, 79). Bazal hücre fenotipi gösteren invaziv meme karsinomlarının çoğunluğu bizim çalışmamızla uyumlu olarak grade 3'tür ve kötü prognozla ilişkilidir. Bizim çalışmamızda CK5/6 pozitif 16 olgunun 12'sinde (%75) tümörler grade 3'tür. İki grup arasında grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.027$).

Rakha ve ark 1944 invaziv meme karsinomu içeren geniş serilerinde CK5/6 pozitif, bazal hücre fenotipindeki tümörlerin çoğunluğunun (%71,5) grade 3 olduğunu saptamışlardır. Bu tümörlerin çoğu invaziv duktal karsinom, NOS'dur . Grade 3 morfolojiye ek olarak, tümör boyutu, ER, PR negatifliği, p53, EGFR, BRCA-1, P-cadherin ve nöroendokrin belirleyici pozitifliği ile ilişkili bulunmuştur. Kısa hastalısız sağkalım ve tüm sağkalım ile önemli ilişkisi saptanmış ve prognoz için bağımsız bir gösterge olduğu savunulmuştur (22). Santini ve ark. CK14 ve CK17 ile belirledikleri gruptaki tümörlerin grade, EGFR ekspresyonu, ER, PR negatifliği ve yüksek Ki-67 skoru ile güçlü ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu tümörlerin hepsinin İDK/NOS olduğunu ve morfolojik olarak diğer gruplardan ayıramayacağını belirtmişlerdir. Bu yüzden de meme karsinomunun durumunu belirlerken konvansiyonel ışık mikroskopundan daha etkili olabileceğini savunmuşlardır (15).

Yüzaltmışsekiz invaziv meme karsinomunda TMA ile yapılan çalışmada tümörler lüminal, bazal ve c-erbB-2 aşırı eksprese eden gruplara ayrılarak incelemiş ve bazal gruptaki tümörlerin %75'inin grade 3 olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda

bu gruptaki tümörlerin çoğunluğu aileseldir ve CK5 yanında P-cadherin de eksprese etmişlerdir (148).

Stratifiye epitelyal keratinlerin invaziv duktal karsinomlardaki biyolojik ve prognostik önemini araştıran daha önceki bir çalışmada lüminal ve bazal sitokeratinleri eksprese eden bi-modal ve sadece lüminal sitokeratinleri eksprese eden lüminal olarak tümörleri 2 grupta incelemişlerdir. Bi-modal gruptaki tümörlerin çoğunluğu (%62) Grade 3'tür, aynı zamanda steroid reseptör negatifliği ve kötü prognozla birlikte (126). Grade 3 invaziv duktal karsinomların yaklaşık %20'si bazal fenotiplidir (145,152). Bazal CK eksprese eden ve etmeyen diğer grup arasında CGH analiz ile saptanan genetik farklılıklar mevcuttur. Bu çalışmada en önemli prognostik gösterge olarak lenf nodlarının durumu saptanmıştır (152). 88 ve 195 meme karsinomu içeren 2 çalışmada CK5/6 pozitif gruptaki tümörlerin çoğu yüksek gradeli olmasına rağmen, bizim sonuçlarımızla uyumsuz olarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (21, 150). Bilateral meme karsinomlarında CK5/6 ve PTEN ekspresyonunun klinik önemini araştıran Piekarski & Biernat bunun sebebinin CK5/6 negatif gruptaki tümörlerin de yüksek gradeli olmasına ve diğer çalışmalara oranla daha az sayıda (88) olgu içermesine bağlamışlardır. Bu çalışmada bazal gruptaki tümörlerin hepsi ER negatif, büyük kısmı PR negatiftir ve aralarında güçlü bir korelasyon mevcuttur. Ancak c-erbB-2 ile aralarında ilişki saptanmamıştır (21).

Birçok yayında bizim çalışmamızda olduğu gibi lenf nodlarının metastaz durumu ile CK5/6 veya diğer bazal belirleyicilerin pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki yoktur (19, 21, 126, 152). Callagy ve ark. 107 meme kanserinde çeşitli belirleyicilerle ve TMA yöntemiyle moleküler klasifikasyon için yaptıkları çalışmada çoğu tümör %95 lüminal sitokeratin (CK8/18) eksprese ederken, bazal sitokeratin (CK5/6) sadece tümörlerin %20'sinde eksprese olmuştur. Lenf nodlarının durumu MIB-1, Mcm2, c-erbB-2 ve CK5/6 boyanması ile ilişkili bulunmuş ve CK5/6 ekspresyonu lenf nodu pozitif tümörlerin %36'sında görülmüştür CK5/6 eksprese eden bazal tip tümörler ER negatiftir. (130). Lenf nodu pozitif meme tümörlerinin rekürrens riski yüksektir ve çoğu adjuvan tedavi alırlar. Lenf nodu negatif olan hastaların durumu çok açık değildir ve bu grupta yeni prognostik faktörlere ihtiyaç

vardır. Altıyüzonbir meme tümörünün TMA ve bazal belirleyicilerle (CK5-CK17) yapılan incelemesinde , lenf nodu negatif grupta bazal belirleyicilerin ekspresyonunun, tümör boyut ve grade'den bağımsız olarak prognostik faktör olduğu ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (17). Daha sonra 195 olgu içeren çalışmada yine lenf nodu negatif grupta CK5/6 ve CK17 ekspresyonunun kötü prognozla birlikte olduğu fakat bazal fenotipteki tümörlerin kötü prognozunun, bazal CK ekspresyonu ile değil, ER negatifliği ve 'cyclin E' ekspresyonu ile belirlenebileceği sonucuna varmışlardır (150). Bizim çalışmamızda CK5/6 pozitif grupta lenf nodu metastazı %68,8 iken negatif grupta bu değer değerine çok yakın (%63,6) bulunmuştur. İki grup arasında lenf nodu metastaz pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır(p=0,71). Bunun sebebi her iki grupta benzer oranda pozitif lenf nodu bulunması olabilir, ayrıca CK5/6 pozitif olgu sayısının az olması nedeniyle lenf nodu pozitif ve negatif gruplar arasında karşılaştırma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızın lenf nodu yönünden diğer çalışmalardan farkı; metastatik lenf nodlarında konglomerasyon ve ekstrakapsüler invazyonun incelenmesidir. Metastatik lenf nodları, ekstrakapsüler tümör invazyonu açısından değerlendirildiğinde CK5/6 boyanan olguların %72,7'sinde ekstrakapsüler invazyon izlenirken, CK5/6 negatif grupta ise %59,2 olguda ekstrakapsüler invazyon izlenmiştir. CK5/6 pozitif ve negatif gruplar arasında ekstrakapsüler invazyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,506).

Ancak metastatik lenf nodları konglomerasyon varlığı açısından değerlendirildiğinde CK5/6 boyanan grupta 6 olguda (%54,5) lenf nodunda konglomerasyon mevcuttur. CK5/6 negatif grupta ise 8 olguda (%16,3) lenf nodunda konglomerasyon izlenmiştir. İki grup arasında konglomerasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,014). Buna göre CK5/6 pozitif olan grupta konglomerasyon varlığının negatif gruba göre daha fazla olduğu görülmüştür.

ER , PR gibi hormon reseptörleri ve c-erbB-2 gibi belirleyiciler, prognostik gösterge olarak ve tedavi seçiminde rehber olarak kullanılmaktadır. Hasta sağkalımını daha iyi belirlemek ve yeni tedavi yaklaşımları amacıyla son yıllarda diğer moleküler prognostik faktörler üzerinde çalışılmaktadır. ER ve PR hormonal

tedaviye cevabın belirlenmesinde ve prognostik gösterge olarak rutin olarak kullanılmaktadır. ER pozitif meme karsinomuna sahip hastalar , negatif olanlara göre daha uzun sağkalıma sahiptir (28, 100).

C-erbB-2 aşırı ekspresyonu meme kanserlerinde kötü prognozla ilişkilidir. Bu yüzden c-erbB-2 aşırı eksprese eden hücreleri hedef alan çeşitli tedavi yaklaşımları vardır, bunlardan biri de rekombinan humanize monoklonal antikor olan transtuzumab'dır (102,103). Transtuzumab ile tedavi olacak hastaların belirlenmesi için c-erbB-2 pozitifliği ölçülmelidir (104).

Bazal belirleyicilerle pozitif olan meme karsinomlarının hemen hemen hepsi hormon reseptörleri negatif ve c-erbB-2 negatiftir (18, 19, 21, 119, 129, 130, 147, 150). Ancak bunların bir kısmında bazal sitokeratin pozitifliği ile c-erbB-2 arasında anlamlı ilişki görülmemiştir (17, 21, 22) .

Bizim olgularımızda CK5/6 pozitif grupta c-erbB-2 negatifliği yönünden literatürle uyumlu olmasına rağmen negatif grupta da c-erbB-2 aşırı ekspresyonu fazla görülmemesi nedeniyle iki grup arasında c-erbB-2 yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.154$). Ancak literatürle uyumlu olarak CK5/6 pozitifliği, ER ve PR negatifliği ile ilişkili bulunmuştur ($p<0.001$). CK5/6 pozitif grupta ER negatif %75 , PR negatif %50 olgu izlenirken , diğer grupta bu değerler sırasıyla %9,10 ve %5,20' dir.

Jones ve ark 92 invaziv meme karsinomu içeren çalışmasında bazal fenotipe sahip 7 olgu mevcuttur ve bunların hepsi de ER, PR ve c-erbB-2 negatiftir. Erkek meme kanserleri de kadınlardakine benzer oranda bazal fenotipe sahiptir ve benzer şekilde c-erbB-2 negatiftir, ancak kadındaki aksine ER pozitifliği bu grupta daha fazladır (119).

Bazal keratinleri eksprese eden tümörler veya c-erbB-2 aşırı eksprese eden tümörler kötü prognoza sahiptir ve santral sinir sistem metastazı için artmış riske sahiptir (17, 19, 111).

Moleküler düzeyde farklı meme kanser fenotiplerini belirlemek c-DNA mikroarray teknolojilerinin gelişmesi ile mümkün olmuştur (18, 60,130). Perou ve ark. komplementer DNA mikroarray yöntemi ile 65 meme tümöründe gen ekspresyon paternlerini belirlemişler ve bu farklı gen paternlerine göre tümörleri farklı alt gruplara ayırmışlardır. ER, c-erbB-2, lüminal belirleyici CK8/18 ve CK5/6, CK17 gibi bazal CK'ler kullanılmıştır. Farklı moleküler özelliklerine göre meme tümörlerini 4 gruba ayırmışlardır ;

1. ER+/'lüminal-like' 2. 'bazal-like' 3. c-erbB-2 + 4. normal meme tipi . 'Bazal-like' subtipde olan tümörler ER ve c-erbB-2 negatiftir ve CK5/6 ekspresyonu gösterirler (60).

Nielsen ve ark bazal-like fenotipin İHK profilini belirleyen çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmada, daha önce c-DNA mikroarray yöntemiyle gösterdikleri bazal-like fenotipte olan tümörleri belirlemede kullanılan immünohistokimyasal analizin, %100 spesifik ve %76 sensitif olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bu fenotipteki meme kanserlerinin ER ve c-erbB-2 negatif ancak CK5/6 veya CK17 pozitif ve/veya c- KIT pozitif olduklarını bulmuşlardır. Bu fenotipin ER+ lüminal tiple karşılaştırıldığında ortalama 17,4 yıllık izlemde kısa sağkalımla korele olduğunu gözlemlemişlerdir (18). Potemski ve ark.'nın yaptıkları çalışmada CK5/6 ekspresyonu %36 iken, CK5/6 pozitifliği, ER ve c-erbB-2 negatifliği ile belirlenen bazal fenotipe sahip % 25 tümör vardır bu değer Nielsen ve ark'nın bulunduğu değerden (%15) daha yüksektir (18, 119). Bizim çalışmamızda CK5/6 pozitif 16 (% 17,2) tümör varken literatürle uyumsuz olarak bu pozitif grupta aynı anda ER ve c-erbB-2 negatif 8 (% 8,69) tümör mevcuttur.

Foulkes ve ark, BRCA-1 geninin memede kök hücre regulasyonunda rol aldığını, glandular diferansiyasyonu arttırdığı hipotezini ortaya atmıştır. BRCA-1 mutasyonu olan tümörlerde bu glandular diferansiyasyonun azaldığı veya tamamlanmadığı ama bazal hücre fenotip geninin devam ettiği düşünülmüştür (153). Daha sonra bunu destekleyen çalışmalarda BRCA-1 germline mutasyonuna sahip meme kanserlerinin , bazal fenotipe ilişkili olduğu gösterilmiştir. (50, 51, 143, 154). Laakso ve ark.'nın 288 sporadik ve 42 herediter meme kanserini inceledikleri

çalışmalarında , sporadik grupta CK5/14 pozitif %9 tümör izlenirken, BRCA-1 ilişkili tümörlerde bu değer % 78'dir. BRCA-2 ilişkili 15 tümörden sadece birinde pozitiflik görülmüştür. CK5/14 pozitif tümörler grade 3 ve steroid hormon negatifliği ile ilişkili ancak sadece ER negatif olan tümörlerde HER2 onkogen amplifikasyonu ile ters ilişkilidir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde bazal belirleyici pozitif tümörlerde aynı anda CK8/18 pozitifliği de mevcut ve SMA negatiftir (51).

Doksanüç invaziv duktal karsinom içeren çalışmamızda, 16 tümörde CK5/6 ekspresyonu olup bunlar aynı zamanda CK8/18 pozitifdir. Bu tümörlerin , tamamen diferansiye lüminal hücrelere maturasyonu sırasında glandular progenitör hücrelerden köken aldığı düşünülmüştür. Bu grupta sadece bir olguda myoepitelyal belirleyici olan SMA ile boyanma olmuştur. Literatürle uyumlu olarak ; CK5/6 ekspresyonu ile kötü prognoz göstergeleri olan yüksek grade ve ER, PR negatifliği arasında anlamlı ilişki bulunmuş fakat c-erbB-2 ekspresyonu, hasta yaşı, tümör boyutu , tümör nekrozu, lenfovasküler tümör invazyonu, lenf nodlarının durumu ile ilişki saptanmamıştır. Literatürden farklı olarak metastatik lenf nodlarında konglomerasyon yönünden CK5/6 pozitif ve negatif iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmamızda 93 NOS invaziv duktal meme kanserinde bazal hücre kökenli olanlar literatür bilgileri ışığında değerlendirilmiş, literatür incelemelerinden farklı olarak metastatik lenf nodlarında AJCC meme tümörü evrelemesinde yer alan konglomerasyon ve ekstrakapsüler yayılım parametreleri eklenerek yüksek grade, ER ve PR negatifliği ve konglomere lenf nodları ile istatistiksel anlamlı bulunmuş, bu parametrelerin kliniğe ilk cerrahi tedavisinden sonra bildirilmesinin hastanın prognoz tahmininde ve adjuvan tedavi belirlemede yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

6 SONUÇLAR

- Bu çalışmada 93 invaziv duktal karsinom olgusunda CK5/6, CK8/18 ve SMA ekspresyonunu inceledik.
- Olgularımızda komşu tümör içermeyen meme dokusunda, normal asini ve duktuslarda CK5/6 ile lüminal ve bazal alana lokalize heterojen ve değişken derecelerde boyanma görüldü. CK8/18 ile sadece lüminal epitelde boyanma izlenirken SMA ile sadece bazal myoepitelyal hücrelerde boyanma olmuştur.
- Bazal belirleyici CK5/6 ile 16 olguda (%17,2) invaziv tümöral alanda, değişen kuvvet ve derecelerde, genellikle fokal, bazı olgularda ise difüz sitoplazmik boyanma izlenmiştir.
- Bütün olgularda invaziv tümörler lüminal epitelial belirleyici olan CK8/18 ile genellikle kuvvetli boyanma göstermiştir.
- SMA ile sadece bir olguda invaziv tümör alanında kuvvetli sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Bu olgu T1 evrede ve histolojik grade 3 olup, aynı zamanda CK5/6 ile benzer kuvvet ve dağılımda ve CK8/18 ile de difüz boyanma göstermiştir. Olguda, çoğu CK5/6 pozitif tümörde olduğu gibi kötü prognoz göstergeleri olan ER ve PR negatifliği görüldü . C-erbB-2 skor 0, negatif olarak izlendi. Kötü prognoz göstergesi olarak 4'ün üzerinde (15 adet) metastatik lenf nodu ve bu lenf nodlarında konglomerasyon ve ekstrakapsüler invazyon izlendi.
- Olgular , bazal diferansiyasyon gösteren CK5/6 pozitif grup ve sadece lüminal olan CK5/6 negatif gruplara ayrılarak diğer prognostik parametrelerle karşılaştırılarak incelendi.
- Bazal diferansiyasyon gösteren grupta tümörler, dezmoplastik, bazıları lenfositik ve yer yer çok az stroma içermektedir. Genellikle tübül oluşturmayan , bazıları sinsityal solid adalar şeklinde olmakla birlikte histomorfolojik olarak diğer gruptan ayırt edici belirgin özelliğe rastlanmamıştır.
- Bazal diferansiyasyon gösteren grupta grade 1 tümör izlenmezken tümörlerin çoğu (% 75) grade 3'tür.

- Olgular lenf nodu metastaz varlığı ve metastatik lenf nodu sayısı açısından incelendiğinde iki grup arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Ancak metastatik lenf nodlarında konglomerasyon varlığına göre iki grup arasında farklılık mevcuttur. CK5/6 pozitif grupta bu oran %54,5, negatif grupta ise %16,3 olarak saptanmıştır. Literatürde bazal hücre diferansiyasyonu ve konglomerasyon arasında ilişki araştırılmamıştır. Bu bulgu bize bazal diferansiyasyon gösteren tümörlerin daha agresif davranışa sahip olabileceğini düşündürmüştür.
- İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan diğer parametre de steroid hormon reseptörlerinin durumudur. ER negatifliği CK5/6 pozitif ve negatif grupta sırasıyla %75 ve %9,10'dur. PR negatifliği ise aynı sırayla %50 ve %5,20'dir. Bu sonuca göre bazal diferansiyasyon gösteren tümörler daha fazla ER ve PR negatifliği ile birlikte .
- Literatürde bazal diferansiyasyon gösteren tümörlerde c-erbB-2/HER2/neu onkogen amplifikasyonu için farklı sonuçlar olmakla birlikte genellikle c-erbB-2 negatifliği ile birlikte . Bizim çalışmamızda bazal diferansiyasyon gösteren tümör grubunda c-erbB-2 negatif (Skor 0-1-2) olgu sayısı daha fazla olmakla birlikte 2 grup arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
- Bu çalışmada hasta yaşı, tümör evresi, mitoz sayısı, tümör nekrozu, lenfovasküler tümör invazyonu, lenf nodlarının metastaz durumu ve sayısı, metastatik lenf nodlarında ekstrakapsüler tümör invazyonu ile CK5/6 pozitif bazal diferansiyasyon gösteren tümörler arasında ilişki saptanmamıştır.
- Biz bu çalışma ile meme tümörlerinde, benzer morfolojik görünümde olan, klasik histolojik sınıflamada bulunmayan , diğerlerinden daha kötü prognoza sahip ve standart tedavilere kötü cevap verebilecek olan , immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenebilen farklı alt grup olabileceğini düşündük.

7 ÖZET

Meme kanserlerinde; hasta yaşı, tümör tipi, tümör boyutu, histolojik grade, lenf nodlarının metastaz durumu, nekroz, lenfovasküler invazyon gibi klinik ve patolojik birçok özelliği içeren prognostik faktörler mevcuttur. Tedavi belirlenmesinde ve tedaviye cevapta önemli olan ve rutinde kullanıma girmiş olan ER, PR ve HER2/neu onkogen ekspresyonu da önemli prognostik gösterge ve belirleyicilerdir.

Son yıllarda invaziv meme kanserlerinde yapılan gen profil çalışmaları, TMA ve immünohistokimyasal yöntemlerle aynı histomorfolojik görünümde ve klasifikasyonda olan ve daha önce bilinenlerden farklı olarak prognozla bağımsız ilişki gösteren alt tipler belirlenmiştir. Bunlardan biri de araştırmacılar tarafından henüz fikir birliğine varılmamış olan ; ‘bazaloid’, ‘bazal-like’, myoepitelyal fenotip, bazal fenotip, bazal diferansiyasyon ve myoepitelyal diferansiyasyon olarak farklı terimler kullanılan alt gruptur. Bu alt grup ER, PR ve c-erbB-2 negatiftir ve daha agresif ve kötü prognozla birlikte dir. İmmünohistokimyasal olarak bazal fenotipteki tümörler bazal belirleyiciler olan CK5/6, CK14, CK17 ile gösterilmektedir .

Biz çalışmamızda 93 invaziv duktal karsinom, NOS olgusunda, invaziv tümörde CK8/18, CK5/6 ve SMA ekspresyonunu immünohistokimyasal yöntemle araştırdık. CK5/6 pozitif boyanan tümörleri bazal diferansiyasyon gösteren grup olarak belirledik. Bazal diferansiyasyon gösteren grubu diğer grupla hasta yaşı, tümör boyutu, histolojik grade, mitoz sayısı, lenfovasküler tümör invazyonu, nekroz varlığı, lenf nodu metastaz varlığı ve metastatik lenf nodlarında konglomerasyon, ekstrakapsüler invazyon varlığı ve ER, PR ve c-erbB-2 ekspresyonu gibi klinikopatolojik prognostik parametrelerle karşılaştırdık.

Bu çalışmada hasta yaşı, tümör evresi, mitoz sayısı, tümör nekrozu, lenfovasküler tümör invazyonu, lenf nodlarının metastaz durumu ve sayısı, metastatik lenf nodlarında ekstrakapsüler tümör invazyonu ile CK5/6 pozitif bazal diferansiyasyon gösteren tümörler arasında ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda CK5/6 pozitif tümörler, literatürle uyumlu olarak çoğunlukla grade 3'tür ve ER , PR negatiftir . Ancak farklı olarak bazal diferansiyasyon gösteren ve göstermeyen grup arasında metastatik lenf nodlarında konglomerasyon bulunması yönünden anlamlı farklılık bulunmuştur. Bu gruptaki tümörler çoğunlukla c-erbB-2 negatiftir ancak iki grup arasında bu yönden anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak CK5/6 pozitif, ER, PR ve c-erbB-2 negatif yüksek grade'li agresif ve kötü prognoza sahip farklı bir tümör alt grubu mevcuttur. Bu alt grubu benzer morfolojideki diğer tümörlerden ayırt etmek ve tedaviye yaklaşımı belirlemek ve yeni tedavi yöntemleri geliştirebilmek için klinik çalışmalarla birlikte, fazla olgu sayısı içeren ve diğer prognostik parametreler ve immünohistokimyasal inceleme içeren çalışmalar faydalı olabilir.

8 KAYNAKLAR

1. Tavassoli FA, Devilee P.(Eds.): World Health Organisation Classification of Tumors Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female organs. IARC Press, Lyon 2003: 10-59
2. Junqueira C, Carneiro J, O.Kelley R. The Female Reproductive System in: Basic Histology. 7th ed. Appleton&Lange, US. 1992: 462-466.
3. Lester SC. The Breast in: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005: 1129-1144.
4. Tavassoli FA. Pathology of the Breast. 2nd ed. Norwalk Appleton & Lange,Stanford. 1992
5. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A,et al. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. Virchows Arch. 2003 Aug;443(2):122-32.
6. Wetzels RHW, Kuijpers HJH, Lane EB, et al. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. Am J Pathol .1991 **138**: 751–763.
7. Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. Am J Surg Pathol. 2004 Aug; 28(8): 1076-91.
8. Kalof AN, Tam D, Beatty B, Cooper K. Immunostaining patterns of myoepithelial cells in breast lesions: a comparison of CD10 and smooth muscle myosin heavy chain. J Clin Pathol. 2004 Jun;57(6):625-9.
9. Altmannsberger M, Dirk T, Droese M, et al. Keratin polypeptide distribution in benign and malignant breast tumors: subdivision of ductal carcinomas using monoclonal antibodies. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1986 51(3):265-75.
10. Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C,et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). Int J Oncol. 2004 Aug;25(2):249-58.
11. Bankfalvi A, Ludwig A, De-Hesselle B,et al. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. Mod Pathol. 2004 Sep;17(9):1051-61.
12. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. Cell Prolif. 2003 Oct;36 Suppl 1:59-72.
13. Boecker W, Moll R, Dervan P, et al. Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. J Pathol. 2002 Dec;198(4):458-67.
14. Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. Cell Prolif. 2003;36 (Suppl 1):73–84.

15. Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, et al. Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression. *J Pathol.* 1996 Aug;179(4):386-91.
16. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, et al. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol.* 2000 **24**: 197–202.
17. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002 **161**:1991–6.
18. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 **10**: 5367- 74.
19. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):661-71.
20. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol.* 2005 Nov;207(3):260-8.
21. Piekarski JH, Biernat W. Clinical significance of CK5/6 and PTEN protein expression in patients with bilateral breast carcinoma. *Histopathology.* 2006 Sep;49(3):248-55.
22. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol.* 2006 Mar;208(4):495-506.
23. Rosai J. (Ed). *Ackerman's Surgical Pathology.* 9th ed. Mosby, Philadelphia. 2004.
24. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992 **22**(3):207-19.
25. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1994 Jan;24(1):41-7.
26. BBF. 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**:403–410.
27. Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006 Jan **12**(1):159-68.
28. Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, et al. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res.* 1989 Feb **49**(4):1052-6.
29. Mc Carty SK, Jr. Nath M. Breast in: Sternberg SS (edt). *Histology for Pathologist.* 2nd ed. Lippincot-Raven, Philadelphia. 1997: 71-82.
30. CD Haagensen. *Diseases of the Breast.* 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1986.
31. Longacre TA, Bartow SA. A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. *Am J Surg Pathol.* 1986 Jun;10(6):382-93.

32. Gompel A, Martin A, Simon P, et al. Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 expression in normal breast tissues during the menstrual cycle. *Breast Cancer Res Treat.* 1996 38:227-235.
33. Moore KL. *The Thorax in: Clinically Oriented Anatomy.* 3rd ed. William & Wilkins, Baltimore. 1992:45-47.
34. Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology.* 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001.
35. Nayar R, Breland C, Bedrossian U, et al. Immunoreactivity of ductal cells with putative myoepithelial markers: A potential pitfall in breast carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 1999 3(3):165-73.
36. Grosclaude P, Colonna M, Hedelin G, et al. Survival of women with breast cancer in France: variation with age, stage and treatment. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Nov;70(2):137-43.
37. Brown SB, Hole DJ, Cooke TG. Breast cancer incidence trends in deprived and affluent Scottish women. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Oct 11; [Epub ahead of print]
38. Haydaroglu A, Dubova S, Özsaran Z. Ege Üniversitesinde meme kanserleri: 3987 olgunun değerlendirilmesi. *Meme sağlığı dergisi.* 2005 1 (1):6-11.
39. Olivetto IA, Mates D, Kan L, et al. Prognosis, treatment, and recurrence of breast cancer for women attending or not attending the Screening Mammography Program of British Columbia. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Mar;54(1):73-81.
40. Anderson WF, Jatoi I, Devesa SS. Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI's SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Mar;90(2):127-37.
41. Trock BJ. Breast cancer in African American women: epidemiology and tumor biology. *Breast Cancer Res Treat.* 1996 40(1):11-24.
42. Boyle P, Leake R. Progress in understanding breast cancer: epidemiological and biological interactions. *Breast Cancer Res Treat.* 1988 May;11(2):91-112.
43. Saxe GA, Rock CL, Wicha MS, Schottenfeld D. Diet and risk for breast cancer recurrence and survival. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Feb;53(3):241-53.
44. Claus EB, Stowe M, Carter D. Oral contraceptives and the risk of ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Sep;81(2):129-36.
45. Lipscombe LL, Goodwin PJ, Zinman B, et al. Diabetes mellitus and breast cancer: a retrospective population-based cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Aug;98(3):349-56.
46. Lipscombe LL, Goodwin PJ, Zinman B, et al. Increased prevalence of prior breast cancer in women with newly diagnosed diabetes. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Aug;98(3):303-9.
47. Xue F, Colditz GA, Willett WC, et al. Parental age at delivery and incidence of breast cancer: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Nov 18; [Epub ahead of print]
48. Cui Y, Koop EA, van Diest PJ, et al. Nuclear morphometric features in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Oct 24; [Epub ahead of print]
49. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, et al. Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res.* 2005 7(4):R465-9.

50. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, et al. The Prognostic Implication of the Basal-Like (Cyclin E high/p27low/p53/Glomeruloid-Microvascular-Proliferation) Phenotype of *BRCA1*-Related Breast Cancer. *Cancer Research*. 2004 64: 830–835
51. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to *BRCA1* tumors. *Mod Pathol*. 2005 Oct;18(10):1321-8.
52. Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Mar;90(2):113-5.
53. Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, et al. Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 May;97(1):67-72.
54. Gerger A, Langsenlehner U, Renner W, et al. A multigenic approach to predict breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Oct 21; [Epub ahead of print]
55. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol*. 1991 Apr;15(4):334-49.
56. Dowsett M. Designing the future shape of breast cancer diagnosis, prognosis and treatment. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;87 Suppl 1:S27-9.
57. Gradishar WJ. The future of breast cancer: the role of prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;89 Suppl 1:S17-26.
58. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Histological characteristics of tumor in vessels and lymph nodes are significant predictors of progression of invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective study. *Hum Pathol*. 2004 Mar;35(3):298-308.
59. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, et al. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2005 Dec 15;11(24 Pt 1):8623-31.
60. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 406: 747–752.
61. Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998 52(1-3):261-88.
62. Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*. 1994 30(2):117-26.
63. P J van Diest, E Matze-Cok, J P A Baak. Prognostic value of proliferative activity in lymph node metastases of patients with breast cancer. *J Clin Pathol*. 1991 44: 416-418.
64. Guth U, Wight E, Schotzau A, et al. Correlation and significance of histopathological and clinical features in breast cancer with skin involvement (T4b). *Hum Pathol*. 2006 Mar;37(3):264-71.
65. Hoda SA, Hoda RS, Merlin S. Issues relating to lymphovascular invasion in breast carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2006 Nov;13(6):308-15.
66. Takeuchi H, Baba H, Kano T, The time-related changes of the importance of prognostic factors in breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1423 Japanese patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Dec;94(3):273-8.

67. Gebauer G, Fehm T, Lang N, Jager W. Tumor size, axillary lymph node status and steroid receptor expression in breast cancer: prognostic relevance 5 years after surgery. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Sep;75(2):167-73.
68. Tabbane F, el May A, Hachiche M, Breast cancer in women under 30 years of age. *Breast Cancer Res Treat.* 1985 6(2):137-44.
69. Rosenberg J, Chia YL, Plevritis S. The effect of age, race, tumor size, tumor grade, and disease stage on invasive ductal breast cancer survival in the U.S. SEER database. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Jan;89(1):47-54.
70. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al (edt). Staging of cancer at Specific Anatomic Sites, Breast in: *AJCC Cancer Staging Handbook (from the AJCC Cancer Staging Manual, 5th ed).* 1998:159-170.
71. Chen YY, Schnitt SJ. Prognostic factors for patients with breast cancers 1cm and smaller. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 51(3):209-25.
72. Schaapveld M, de Vries EG, van der Graaf WT, et al. The prognostic effect of the number of histologically examined axillary lymph nodes in breast cancer: stage migration or age association? *Ann Surg Oncol.* 2006 Apr;13(4):465-74.
73. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 91(2):125-32.
74. Gasparini G, Meli S, Panizzoni GA, et al. Peritumoral lymphatic vessel invasion compared with DNA ploidy, proliferative activity, and other pathologic features as prognostic indicators in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992 Mar;20(3):195-204.
75. Neri A, Marrelli D, Roviello F, et al. Bcl-2 expression correlates with lymphovascular invasion and long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Sep;99(1):77-83.
76. Helpap B. Nucleolar grading of breast cancer. Comparative studies on frequency and localization of nucleoli and histology, stage, hormonal receptor status and lectin histochemistry. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1989 415(6):501-8.
77. Schumacher M, Schmoor C, Sauerbrei W, et al. The prognostic effect of histological tumor grade in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1993 25(3):235-45.
78. Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, et al. A comparison between flow cytometric assessment of S-phase fraction and Nottingham histologic grade as prognostic instruments in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Sep;63(1):11-5.
79. F E. Sharkey, Biological meaning of stage and grade in human breast cancer: review and hypothesis. *Breast Cancer Res Treat.* 1982 2:299-322 .
80. Balslev I, Axelsson CK, Zedeler K, et al. The Nottingham prognostic index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish breast cancer cooperative group (DBCG). *Breast Cancer Res Treat* 1994 32:281-90.
81. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 51(3):195-208.

82. Van Laere S, Van der Auwera I, Van den Eynden GG, et al. Distinct molecular signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Oct;93(3):237-46.
83. Fisher ER, Kenny JP, Sass R, et al. Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res Treat.* 1990 Oct;16(3):215-29.
84. Tomes L, Emberley E, Niu Y, et al. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Sep;81(1):61-9.
85. Colpaert CG, Vermeulen PB, Fox SB, et al. The presence of a fibrotic focus in invasive breast carcinoma correlates with the expression of carbonic anhydrase IX and is a marker of hypoxia and poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Sep;81(2):137-47.
86. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, et al. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch.* 2002 Jun;440(6):589-93.
87. Feuerhake F, Sigg W, Hofter EA, et al. Cell proliferation, apoptosis, and expression of Bcl-2 and Bax in non-lactating human breast epithelium in relation to the menstrual cycle and reproductive history. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Jan;77(1):37-48.
88. Soyuer I, Soyuer S, Canöz Ö ve ark. Evre 2-3 invaziv duktal karsinom olgularında c-erbB-2, PCNA, p53, bcl-2, F8 immünreaktivitesi. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2005 27(4): 141-146.
89. Michels JJ, Duigou F, Marnay J. Flow cytometry in primary breast carcinomas. Prognostic impact of proliferative activity. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Jul;62(2):117-26.
90. Bryant J, Fisher B, Gunduz N, et al. S-phase fraction combined with other patient and tumor characteristics for the prognosis of node-negative, estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 51(3):239-53.
91. Kidogawa H, Nanashima A, Yano H, et al. Clinical significance of double staining of MIB-1 and AgNORs in primary breast carcinoma. *Anticancer Res* 2005 Nov-Dec;25(6B):3957-62.
92. Ambrogi F, Biganzoli E, Querzoli P, et al. Molecular subtyping of breast cancer from traditional tumor marker profiles using parallel clustering methods. *Clin Cancer Res* 2006 1;12(3 Pt 1):781-90.
93. Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, et al. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase II α expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 May;55(1):61-71.
94. Acenero MJ, Gallego MG, Ballesteros PA, Gonzalez JF. Vascular density as a prognostic indicator for invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch.* 1998 Feb;432(2):113-7.
95. Heimann R, Ferguson D, Gray S, Hellman S. Assessment of intratumoral vascularization (angiogenesis) in breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 52(1-3):147-58.
96. Viens P, Jacquemier J, Bardou VJ, et al. Association of angiogenesis and poor prognosis in node-positive patients receiving anthracycline-based adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Apr;54(3):205-12.
97. Forsti A, Jin Q, Altieri et al. Polymorphisms in the KDR and POSTN Genes: Association with Breast Cancer Susceptibility and Prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Jun 29; [Epub ahead of print]

98. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Highly proliferative fibroblasts forming fibrotic focus govern metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol*. 2001 Apr;14(4):325-37.
99. Scawn R, Shousha S. Morphologic spectrum of estrogen receptor-negative breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2002 Mar;126(3):325-30.
100. Mann S, Laucirica R, Carlson N, et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2001 Jan;32(1):113-8.
101. Sutterlin MW, Haller A, Gassel AM, et al. The correlation of c-erbB-2 oncoprotein and established prognostic factors in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6D):5083-8.
102. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol*. 1999 Aug;26(4 Suppl 12):51-9.
103. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001 61 Suppl 2:1-13.
104. Di Leo A, Dowsett M, Horten B, Penault-Llorca F. Current status of HER2 testing. *Oncology*. 2002 63 Suppl 1:25-32.
105. Oakley GJ 3rd, Tubbs RR, Crowe J, et al. HER-2 amplification in tubular carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jul;126(1):55-8.
106. Berger MS, Locher GW, Saurer S, et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res*. 1988 Mar 1;48(5):1238-43.
107. Taucher S, Rudas M, Mader R, et al. Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer*. 2003 Dec 15;98(12):2547-53.
108. Quenel N, Wafflard J, Bonichon F, et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 1995 Sep;35(3):283-91.
109. Konecny G, Pualetti G, Pegram M, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Jan 15;95(2):142-53.
110. Collins LC, Schnitt SJ. HER2 protein overexpression in estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ of the breast: frequency and implications for tamoxifen therapy. *Mod Pathol*. 2005 May;18(5):615-20.
111. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol* 2006; Sep;30(9):1097-104
112. Hanson JM, Browell DA, Cunliffe W, et al. MUC1 expression in primary breast cancer: the effect of tamoxifen treatment. *Breast Cancer Res Treat*. 2001 Jun;67(3):215-22.
113. Hegg R, De Souza AZ, Pestana CB, Cardoso de Almeida PC. Tissue carcinoembryonic antigen in the prognosis of early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1990 May;15(3):213-6.
114. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, et al. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998 May;49(2):145-54.

115. Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Aug;86(3):207-13.
116. Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin Immunohistochemical Expression as a Prognostic Factor in Infiltrating Ductal Carcinoma of the Breast: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Nov;100(2):139-48.
117. Brooks SA, Leatham AJ, Camplejohn RS, Gregory W. Markers of prognosis in breast cancer--the relationship between binding of the lectin HPA and histological grade, SPF, and ploidy. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;25(3):247-56.
118. Safal M, Lower EE, Hasselgren PO, et al. Bilateral synchronous breast cancer and HER-2/neu overexpression. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Apr;72(3):195-201.
119. Ciocca V, Bombonati A, Gatalica Z, et al. Dreher D, Folch N, Monzon F, Santeusano G, Perou CM, Bernard PS, Palazzo JP. Cytokeratin profiles of male breast cancers. *Histopathology.* 2006 Oct;49(4):365-70.
120. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol.* 2005 207:139-146.
121. Soltysova A, Altanerova V, Altaner C. Cancer stem cells. *Neoplasma.* 2005 52(6):435-40.
122. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest.* 1985 Mar;52(3):243-56.
123. PG Chu, LM Weiss. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002 40: 403-436.
124. Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol.* 2002 Jan;15(1):6-10.
125. Wetzels RHW, Holland R, Vanhaelst UJGM, et al. Detection of basement membrane components and basal-cell keratin-14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am J Pathol.* 1989;134:571-579.
126. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M and Moll R . Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch.* 1998 433: 119–129.
127. Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, et al. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology.* 2000 Sep;37(3):232-40.
128. Smith GH, Chepko G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech.* 2001 Jan 15;52(2):190-203.
129. C Jones, AV Nonni, L Fulford, et al. CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation. *British Journal of Cancer.* 2001 85(3): 422–427.
130. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol.* 2003 Mar;12(1):27-34.

131. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*. 2005 1;116(3): 340-50.
132. Nagle RB, Bocker W, Davis JR, et al. Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 1986 34: 869–881.
133. Koker MM, Kleeer CG. p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2004 Nov;28(11):1506-12.
134. Hill CB, Yeh IT. Myoepithelial cell staining patterns of papillary breast lesions: from intraductal papillomas to invasive papillary carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2005 123(1):36-44.
135. Tavassoli FA . Myoepithelial lesions of the breast. Myoepitheliosis, adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1991 15: 554–568.
136. Foschini MP, Eusebi V. Carcinomas of the breast showing myoepithelial cell differentiation. A review of the literature. *Virchows Arch*. 1998 Apr;432(4):303-10.
137. Rasbridge SA, Millis RR. Adenomyoepithelioma of the breast with malignant features. *Virchows Arch*. 1998 Feb;432(2):123-30.
138. Ahmed AA, Heller DS. Malignant adenomyoepithelioma of the breast with malignant proliferation of epithelial and myoepithelial elements: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Apr;124(4):632-6.
139. Pia-Foschini M, Reis-Filho JS, Eusebi V, Lakhani SR. Salivary gland-like tumours of the breast: surgical and molecular pathology. *Clin Pathol*. 2003 Jul;56(7):497-506.
140. Leibl S, Gogg-Kammerer M, Sommersacher A, et al. Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation?: Immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers. *Am J Surg Pathol*. 2005 Mar;29(3):347-53.
141. Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Research* 2006 8:1(R7).
142. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Jul;15(5):193-7.
143. Jarle B. Arnes, Jean-Sebastien Brunet, Ingunn Stefansson, et al. Placental Cadherin and the Basal Epithelial Phenotype of BRCA1-Related Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 11(11): 4003-4010
144. Baak JPA. Counting mitosis. *Hum Pathol* 1990 21: 683-5.
145. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):22-34.
146. Kesse-Adu R, Shousha S. Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2004 Jun;17(6):646-52.
147. Shien T, Tashiro T, Omatsu M, et al. Frequent overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mammary high grade ductal carcinomas with myoepithelial differentiation. *J Clin Pathol*. 2005 Dec;58(12):1299-304.

148. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2005 447(4): 688-94.
149. Coyne JD, Dervan PA, Barr L. High-grade carcinomas of the breast showing patterns of mixed ductal and myoepithelial differentiation (including myoepithelial cell-rich carcinoma of the breast). *Histopathology*. 2004 Jun;44(6):580-4.
150. Potemski P, Kusinska R, Watala C, et al. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*. 2005 69 (6): 478-85.
151. Simpson PT, Gale T, Reis-Filho JS, et al. Columnar cell lesions of the breast: the missing link in breast cancer progression? A morphological and molecular analysis. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jun;29(6):734-46.
152. Jones C, Ford E, Gillett C, Ryder K, et al. Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):5988-97.
153. Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. *J Med Genet*. 2004 41:1-5.
154. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, et al. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology*. 2005 Nov;47(5):458-66.