

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇLÜ NEGATİF MEME KARSİNOM OLGULARINDA
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE PARP-1, P-mTOR,
SİTOKERATİN 5/6 VE SİTOKERATİN 14 EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman ZEKİOĞLU**

**Dr. Müge ÇALIK
İZMİR 2016**

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesinden faydalandığım, çalışma disiplini ile örnek aldığım değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mine HEKİMGİL'e

Uzmanlık eğitimimin tüm aşamalarında yardımını ve bilgisini esirgemeyen ve beni destekleyen, en zor anlarımda yoluma ışık tutan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Osman ZEKİOĞLU'na,

Aktardıkları bilgi ve tecrübeleriyle bu mesleğe donanımlı birer uzman olarak adım atmamızı sağladıkları için başta Prof. Dr. Necmettin ÖZDEMİR olmak üzere tüm değerli hocalarımıza,

Tezimin istatistiksel analizinde ve yazım aşamasında büyük desteğini gördüğüm Uzm. Dr. Banu YAMAN'a

Tezimin istatistiksel analiz kısmının hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Hatice ULUER'e

Asistanlık eğitimim boyunca yardımlarından dolayı, birlikte çalışmaktan mutlu olduğum asistan arkadaşlarıma ve tüm Ege Patoloji ailesine,

Bu zor süreçte hayatımı kolaylaştıran başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme,

Hayat yolunda elini tutmaktan mutluluk duyduğum, aşkıyla bana en büyük gücü veren, sevgili eşim Dr. Esat ÇALIK'a ve biricik oğlum, şans meleğim Efe ÇALIK'a

sonsuz teşekkürlerimi iletmekten onur duyuyorum.

Ayrıca Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna projemize verdikleri destek nedeniyle teşekkür ederim.

Dr. Müge ÇALIK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR	iii
ŞEKİL DİZİNİ	v
TABLO DİZİNİ	vi
GRAFİK DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Meme Anatomisi ve Histolojisi	4
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	6
2.3. Meme Kanseri Etiyolojisi	6
2.4. Klinik Bulgular	7
2.5. Görüntüleme	7
2.6. Evreleme	8
2.7. Prognostik Faktörler	10
2.7.1. Aksiller Lenf Nodu Durumu	10
2.7.2. Tümör Boyutu	11
2.7.3. Tümör Derecesi	12
2.7.4. Histolojik Tip	12
2.7.5. Lenfovasküler İnvazyon	13
2.7.6. Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler (TİL)	13
2.7.7. P53	13
2.7.8. Proliferasyon indeksi	14
2.7.9. Hormon Reseptörleri	14
2.7.10. HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2)	15
2.8. Meme Kanserinde Moleküler Sınıflama	16
2.8.1. Üçlü Negatif Meme Karsinomları (ÜNMK) ve Moleküler Sınıflama	18
2.8.2. ÜNMK'nda Tedavi	22
2.8.2.1. Poli ADP riboz polimeraz-1 (PARP1) inhibisyonu	22
2.8.2.2. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K/AKT/mTOR) yolağı inhibisyonu	25
3. Gereç ve Yöntem	28
3.1. Olgu Seçim Kriterleri	28
3.2. Etik Kurul Onayı	28
3.3. Klinik Verilerin Toplanması	28
3.4. Histopatolojik İnceleme	29
3.4.1. Histolojik Tip ve Derece	29
3.4.2. Diğer Histopatolojik Değerlendirme Ölçütleri	29
3.4.2.1. İmmünohistokimyasal İnceleme	29
3.4.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	30
3.4.2.3. İHK'sal incelemede pozitif ve negatif kontrol seçimi	31
3.4.2.4. İHK'sal incelemede PAPR1 ve p-mTOR değerlendirme kriterleri	31
3.4.2.5. Sitokeratin 5/6 ve14 ekspresyonunun değerlendirilmesi	33
3.4.2.6. P53 ve Ki67 ekspresyonlarının değerlendirilmesi	35
3.4.3. Tümör infiltrate eden lenfositler (TİL)	35
3.5. İstatistiksel analiz	37
4. Bulgular	38
4.1. Yaş Dağılımı, Lokalizasyon ve takip süresi	38

4.2.	Tümör Tipi	39
4.3.	Tümör Boyutu	40
4.4.	Lenfovasküler invazyon (LVİ)	40
4.5.	Lenf nodu metastazı	41
4.6.	Evre ve Modifiye Bloom Richardson Derecesi (MBRD)	41
4.7.	Ki67 proliferasyon indeksi ve p53	42
4.8.	Tümör infiltre eden lenfositler (TİL)	43
4.9.	Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14 ekspresyonu	45
4.10.	PARP1 ekspresyonu	49
4.11.	p-mTOR ekspresyonu	53
5.	Tartışma	58
6.	Sonuçlar	68
7.	Kaynaklar	70



KISALTMALAR

- AJCC:** Amerikan Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer)
- ASCO/CAP:** Amerikan Klinik Onkoloji Derneği ve Amerikan Patologlar Derneği (American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists)
- BER:** Baz kesip çıkarma (base-excision repair)
- ÜNMK:** Üçlü negatif meme karsinomu
- BL 1:** Bazal benzeri 1
- BL 2:** Bazal benzeri 2
- BRCA1:** Breast cancer 1, early onset geni
- BRCA 2:** Breast cancer 2, early onset geni
- DKIS:** Duktal karsinoma in situ
- DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü
- ER:** Östrojen reseptörü
- EÜTF:** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
- HER2:** İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Human epidermal growth factor receptor 2)
- HR:** Homolog rekombinasyon
- İDK, NOS:** İnvaziv duktal karsinom, başka türlü sınıflandırılmayan
- İHK:** İmmunohistokimya
- İM:** İmmunomodulatör
- LAR:** Luminal androjen reseptör
- LKIS:** Lobuler karsinoma in situ
- LNM:** Lenf nodu metastazı
- LVİ:** Lenfovasküler invazyon
- M:** Mezenkimal
- MBRD:** Modifiye Bloom Richardson Derecesi
- MMG:** Mamografi
- MSL:** Mezenkimal kök hücre benzeri

mTOR: Rapamisinin memelilerdeki hedefi (mammalian target of rapamycin)

OKS: Oral kontraseptifler

PARP1: Poli ADP riboz polimeraz-1

PDGF: Platelet kökenli büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor)

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz

PI3K/AKT/mTOR: Fosfatidilinositol 3-kinaz

PR: Progesteron reseptörü

RB: Retinoblastom

SLN: Sentinel lenf nodu

TDLU: Terminal duktal lobüler ünite

TİL: Tümör infiltre eden lenfositler (Tumor-infiltrating lymphocytes)

USG: Ultrasonografi

ŞEKİL DİZİNİ

ŞEKİL 1: Meme anatomisi	4
ŞEKİL 2: Memenin tubuloalveolar yapısı ve TDLU	5
ŞEKİL 3: PARP sinyal yolağı	23
ŞEKİL 4: p-mTOR sinyal yolağı	26
ŞEKİL 5: PARP1 boyanma güçleri	32
ŞEKİL 6: p-mTOR boyanma yüzdeleri	33
ŞEKİL 7: Sitokeratin 5/6 ekspresyon paternleri	34
ŞEKİL 8: Sitokeratin 14 ekspresyon paternleri	34
ŞEKİL 9: Tümör infiltre eden lenfositleri hesaplamak için şematize edilmiş H&E görüntüsü	36
ŞEKİL 10: TİL gruplarının morfolojik görünümü	36
ŞEKİL 11: Bazal benzeri grupta sınıflanan vakaya ait H&E görüntüsü ve aynı vakaya ait sitokeratin pozitiflikleri	45
ŞEKİL 12: Yüksek nükleer dereceli vakaya ait genel görünüm, aynı vakanın sitokeratin 5/6 pozitifliği ve yüksek Ki67 proliferasyon indeksi	47
ŞEKİL 13: Yüksek nükleer dereceye sahip vaka ve PARP1 boyanması: 1büyük büyütme alanındaki 3 mitotik figür görülen, yüksek nükleer dereceli vakaya ait görünüm, aynı vakaya ait PARP1 boyanması	51

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: Meme tümörlerinde TNM evrelemesi	8
TABLO 2: Meme kanserinde evreleme	10
TABLO 3: MBRD derecelendirme sistemi	12
TABLO 4: PARP1 ekspresyon değerlendirmesinde QS sistemi	31
TABLO 5: p-mTOR ekspresyonu skorlama sistemi	32
TABLO 6: Tavsiye edilen TİL değerlendirme kriterleri	35
TABLO 7: Sitokeratin ekspresyonları ve alt grupların sağkalım ilişkisi	48
TABLO 8: MBRD ile PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ortalamaları	50
TABLO 9: PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ile M derecesi ilişkisi	51
TABLO 10: PARP1, p-mTOR, sitokeratin 5/6, sitokeratin 14 ekspresyonu, alt gruplar ve tümör infiltre eden lenfositlerin ortalama hastaliksız ve genel sağkalımları	56
TABLO 11: Vakaların genel ve alt gruplara göre klinik ve histopatolojik özellikleri	57

GRAFİK DİZİNİ

GRAFİK 1: Olguların genel yaş dağılımı.....	38
GRAFİK 2: İnvaziv duktal karsinom grubu ve diğer morfolojik meme karsinomlarının pN evresine göre dağılımı	39
GRAFİK 3: Vakaların evrelere göre dağılımı.....	42
GRAFİK 4: Lenfosit fakir ve zengin tümörlerin hastalısız ve genel sağkalım eğrileri	44
GRAFİK 5: Alt grupların öngörülen hastalısız ve genel sağkalım eğrileri	48
GRAFİK 6: PARP1 boyanma gücü ile öngörülen hastalısız ve genel sağkalım eğrileri	52
GRAFİK 7: PARP1 ekspresyonu ile öngörülen hastalısız ve genel sağkalım eğrileri.....	53
GRAFİK 8: p-mTOR ekspresyonu ile öngörülen hastalısız ve genel sağkalım eğrileri.....	55

ÖZET

Üçlü negatif meme karsinomları (ÜNMK) immunohistokimyasal olarak ER, PR, HER2 negatif tümörler olup tüm meme kanserlerinin ortalama %10-20'sini oluştururlar. ÜNMK'ları içerisinde en büyük grubu bazal benzeri grup oluşturmaktadır. Bazal benzeri meme tümörleri, bazal sitokeratin ekspresyonu gösteren, yüksek proliferatif aktiviteye ve kötü klinik gidişe sahip tümörlerdir. ÜNMK'larının, hormonoterapi ve transtuzumab tedavilerinden yoksun kalmaları hedefe yönelik tedavi ajanlarının araştırılmasına neden olmaktadır. Bu ajanlardan güncel olan iki tanesi PARP1 ve p-mTOR inhibitörleridir.

Bu çalışmada ÜNMK'ları için tedavi kılavuzlarına girmeye başlayan PARP1 ve p-mTOR'un immunohistokimyasal ekspresyonunun değerlendirilmesi ile birlikte bazal benzeri grubu ayırt edebilmek için sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 ekspresyonlarının değerlendirilmesi amaçlandı. 2005 ile 2010 yılları arasında, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda immunohistokimyasal olarak ER, PR, HER2 negatif olan 82 meme karsinomu olgusu çalışmaya dahil edildi. Olguların tümünde PARP1, p-mTOR, sitokeratin 5/6, sitokeratin14 ekspresyonunun, morfolojik parametreler ve sağkalım analizlerine göre karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldı.

Çalışmamızda sitokeratin 5/6 ekspresyonu 59 (%72) olguda saptanırken, 23 (%28) olguda ekspresyon izlenmedi. Sitokeratin 14, ise 31 (%37,8) olguda pozitif bulunurken, 51 olguda (%62,2) negatif olarak değerlendirildi. Olgularımızın %14,6'sı (n=12) PARP1 ile güçlü pozitiflik; %56,1'i (n=46) zayıf-orta kuvvette pozitiflik gösterirken, 24 olguda (%29,3) PARP1 ile boyanma görülmedi. Çalışma grubu içerisindeki 34 olgu (%41,5) nihai p-mTOR ekspresyonu açısından negatif kabul edildi, 48 olgunun (%58,5) ise p-mTOR ekspresyonunun pozitif olduğu görüldü.

Bazal benzeri gruptaki vaka sayısı 64 (%78) iken bazal benzeri olmayan gruptaki olgu sayısı 18 (%22)'di. Bazal benzeri grupta nükleer derecenin daha

yüksek olduğu görüldü, ancak diğer morfolojik parametreler ve sağkalım açısından bazal benzeri olmayan grupla fark saptanmadı.

PARP1 ve sitokeratin 5/6 pozitif saptanan vakaların yüksek dereceli tümörler olduğu ve proliferasyon kapasitelerinin yüksek olduğu görüldü ve bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı saptandı. MBRD'si 3 olan olguların PARP1 boyanma yüzdesi %26,16; PARP1 boyanma skoru ise 4,9 olarak saptandı ($p=0,033$ / $p=0,035$). Ayrıca yüksek PARP1 ekspresyonu olan tümörlerin artmış mitotik indekse sahip oldukları dikkati çekti ($p=0,044$). Yüksek PARP1 ekspresyonu saptanan olguların öngörülen ortalama sağkalımları 106,1 ay bulundu, düşük PARP1 ekspresyonu saptanan olgularda ise bu ortalamanın 78,4 ay olduğu görüldü. Sağkalım süresi ile PARP1 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olmasa da dikkat çekiciydi ($p=0,706$).

Bulgularımız özellikle, PARP1 ve sitokeratin 5/6 ekspresyonu için literatür ile uyumlu bulundu. Ancak p-mTOR ve sitokeratin 14 ekspresyonlarının etkisini araştırmak için standart bir değerlendirme sistemi gerekli görüldü ve bunun için yapılacak geniş ölçekli çalışma serilerine ihtiyaç duyulduğu düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Üçlü negatif meme karsinomu, bazal benzeri meme karsinomu, PARP1, p-mTOR, sitokeratin 5/6, sitokeratin 14

ABSTRACT

Triple negative breast carcinomas (TNBCs) are immunohistochemically estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and c-erbB2 negative tumors constituting 10-20% of breast carcinomas. Majority of TNBCs are basal-like tumors with basal cytokeratin expression, high proliferative activity and are associated with aggressive behavior. Targeted therapies, including PARP1 and mTOR inhibitors, have been investigated in treatment of TNBCs, as those patients cannot benefit from hormone therapy and trastuzumab therapy. We aimed to evaluate immunohistochemical expression of PARP1 and p-mTOR in TNBCs as well as immunohistochemical expression of cytokeratin 5/6 and 14 in basal-like subtype.

Eighty-two TNBC cases diagnosed in our center between 2005 and 2010 were included in the study. Expressions of PARP1, p-mTOR, cytokeratin 5/6 and 14, morphological parameters and survival analyses were performed.

We observed cytokeratin 5/6 expression in 59 patients (72%) and cytokeratin 14 expression in 31 patients (37,8%). Of 82, 14,6% (n=12) showed strong PARP1 positivity, 56,1% (n=46) showed weak-moderate PARP1 positivity as 24 cases (29,3%) did not express PARP1. More than half of the cases (58,5%; n=48) were considered positive for overall p-mTOR expression and 41,5% (n=34) were considered negative for overall p-mTOR expression.

Sixty-four (78%) cases were classified as basal-like carcinoma. Nuclear grade was higher in basal-like tumors, compared to non-basal-like tumors. However, no significant statistical difference was found between two groups regarding other morphological parameters and survival.

PARP1 and cytokeratin 5/6 positive tumors were high-grade tumors with high proliferative activity. PARP1 staining ratio was 26,16%, staining score was 4,9 among grade 3 tumors ($p=0,033$ / $p=0,035$). Also, tumors with high PARP1 expression had high mitotic index ($p=0,044$). Average expected survival was 106,1 months and 78,4 months for cases with high and low

PARP1 expression, respectively. The association between survival and PARP1 expression was notable, however, no statistical significance was found ($p=0,706$).

Our findings, particularly on PARP1 and cytokeratin 5/6 expression, appear to be consistent with literature. However, standard criteria should be established in large study groups to evaluate the effects of p-mTOR and cytokeratin 14 expressions.

Key words: triple negative breast carcinomas, basal-like breast carcinoma, PARP1, p-mTOR, cytokeratin 5/6, cytokeratin 14



1. Giriş

Meme kanseri, genellikle duktal lobuler ünitten köken alan heterojen bir hastalık grubudur. İnsidansı tüm kanserler içinde %23'dür [1]. Her yıl dünyada 1.300.000'den fazla yeni olgu ve 450.000 ölüme neden olmaktadır [2]. Etiyolojide diyet (yüksek kalorili beslenme), fiziksel aktiviteden yoksunluk, reproduktif faktörler (erken menarş, geç menapoz, nulliparite, infertilite), hormonlar, çevresel faktörler (radyasyon) ve genetik yatkınlık (BRCA1 ve BRCA2) gibi bir çok faktör rol oynamaktadır [1].

Tümör derecesi (histolojik ve nükleer derece, mitotik aktivite durumu) önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir [1]. TNM evreleme sistemi (tümör boyutu, deri veya göğüs duvarı invazyonu, lenf nodu invazyonu ve uzak metastaz), östrojen reseptörü (ER) ile progesteron reseptörü (PR)'nün durumu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ("Human epidermal growth factor receptor 2", HER2) ekspresyonu, Ki67 proliferasyon indeksi, p53 pozitifliği prognozda ve tedavi modelinin belirlenmesinde önemlidir.

Meme kanseri morfolojik, immunohistokimyasal ve klinik açıdan çeşitlilik göstermektedir ve gen ekspresyon analizleri ile çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. Bu gruplar ER pozitif tipler (Luminal A ve Luminal B), ER negatif tipler (HER2 pozitif, Üçlü negatif, Normal meme benzeri) olarak şekillenmektedir [3].

Üçlü negatif meme karsinomları (ÜNMK) immunohistokimyasal olarak ER, PR, HER2 negatif tümörlerdir ve tüm meme kanserlerinin ortalama %10-20'sini oluştururlar [4, 5]. ÜNMK'ları daha genç yaşta görülürler, hızlı progresyon ve kısa sağkalıma sahip, agresif tümörlerdir. Lehmann ve arkadaşları, 2011 yılında üçlü negatif meme tümörüne sahip geniş bir hasta grubunda yaptıkları araştırmada, bu tümörleri farklı gen ekspresyonlarına ve farklı prognozlara sahip 6 alt gruba ayırdılar. Bu alt tipler; bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immunomodulatör (İM), mezenkimal (M),

mezenkimal kök hücre benzeri (MSL), luminal androjen reseptör (LAR) alt gruplarıdır [5, 6].

ÜNМК'larının yaklaşık %75'ini bazal benzeri grup oluşturur [2]. Bazal benzeri grup, bazal sitokeratinler (sitokeratin 5/6, sitokeratin 14, sitokeratin 17) ve epidermal büyüme faktör reseptörü ("epidermal growth factor receptor", EGFR) ile pozitiflik gösterir [7]. Alt tiplendirmenin yapılması hastaların tedavi yaklaşımı ve takibinde önem taşımaktadır. Bu nedenle alt tipin en azından bazal benzeri grup ve bazal benzeri dışı olarak belirtilmesi önemlidir.

ÜNМК'ları günümüzde hormonoterapi ve transtuzumab tedavilerinden yoksun kalmaktadır. Bu tümör grubunda yeni hedefe yönelik tedavi ajanlarının araştırılması için dikkatler hücre büyümesi, invazyon ve metastaz için gerekli hücre içi sinyal yolları üzerine çekildi. Bu yollardan biri membran tirozin kinaz reseptörleri ile aktive olan PI3K/AKT/mTOR yolağıdır. Rapamisinin memelilerdeki hedefi ("mammalian target of rapamycin", mTOR), Fosfoinositol 3 kinaz (PI3K) yoloğının anahtar bileşenlerinden biri olup, tümör dönüşümü ve ilerlemesinden sorumlu bir serin/ tireonin kinazdır [8]. mTOR, PI3K kinaz/AKT yolağında Ser2448 bölgesinden fosforilize olarak ya da Ser2481'den otofosforilizasyon ile aktive olur. Ribozomal p70 S6 kinaz (S6K1) ve ökeyotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein (4E-BP1) mTOR'un ana iki mesajcıdır. Bu mesajcılar mTOR etkisiyle aktive olduğunda RNA translasyonu artar, bunun sonucu olarak protein sentezi, hücre büyümesi ve çoğalması gerçekleşir [8]. Bu rolünden ötürü mTOR'a karşı hedefe yönelik tedavi modelleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Fosforilize mTOR (p-mTOR) nükleer seviyede tespit edilen, mTOR'un aktive formudur. Literatürde p-mTOR ekspresyonu olan meme karsinomları lenf nodu metastazı, kötü sağkalım ve hastalık tekrarı ile ilişkili bulundu [9, 10]. ÜNМК'larının üçlü negatif olmayan gruba göre p-mTOR ekspresyonu daha fazladır [11], ancak literatürde ÜNМК grubunda p-mTOR ekspresyonunu araştıran çalışma sayısı azdır. Fosforilize mTOR'un diğer meme karsinomu tiplerine göre ÜNМК grubunda daha fazla önemi olduğu düşünülmekte ve bu gruba yönelik tedavi ajaları geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Hedefe yönelik tedavi ajanı araştırılmasında dikkat çeken konulardan biri de Poli ADP riboz polimeraz-1 (PARP1)'dir. PARP1, DNA hasarıyla aktive olan, transkripsiyon, hücre siklusu, tümörögenenez ve DNA tamirinde rol alan kromatin ilişkili, önemli bir enzimdir [12]. PARP1 aktive olduğunda nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'i substrat olarak kullanarak Poli ADP-riboz (PAR) sentezler ve PAR'ı kovalent olarak nükleer proteinlere (nükleozomal kor histonları, topoizomeraz I-II, yüksek değışken grup proteinleri, p53) transfer eder [13]. PARP1 bağımlı baz kesip çıkarma onarımı bozulduğunda DNA tek zincir kırıkları oluşur. Homolog rekombinasyonun bozuk olduğu BRCA mutasyonu olan tümörlerde biriken tek zincir kırıkları çift zincir kırıklarına ve takiben replikasyon çatalının çökmesine neden olur. Bu yüzden BRCA ilişkili ve üçlü negatif tümörlerde PARP inhibitörleri kullanımı, PARP1 aktivitesinin kaybına ve tümör hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. BRCA ilişkili meme tümörleri homolog rekombinasyon nedeniyle PARP1 inhibitörlerine daha duyarlıdır [12, 13]. Literatürde, quantitative real-time multiplex polymerase zincir reaksiyonu (QRT-PCR) ile PARP1'in ÜNMK'larında reseptör pozitif gruba göre daha çok arttığı belirtilmektedir. Bu nedenle ÜNMK'ları ve reseptör pozitif gruba yönelik PARP inhibitörlerinin kullanımı denenmektedir.

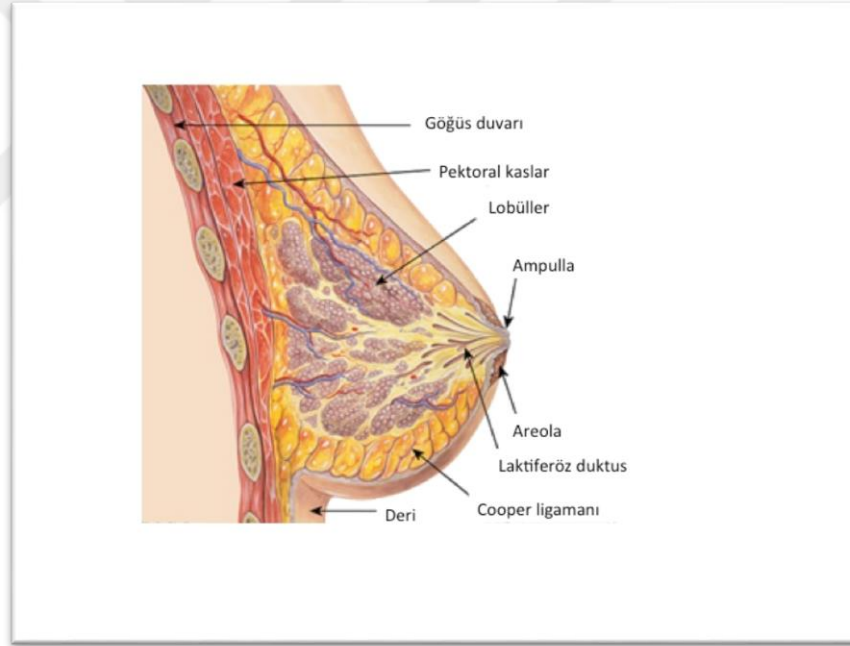
Bu çalışmada bölümümüzde 2005-2010 yılları arasında meme karsinomu tanısı almış ve ER, PR, HER2 negatif toplam 82 olguda, immunohistokimyasal yöntemle hedefe yönelik tedavilerde araştırılan PARP-1, p-mTOR ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi, karşılaştırılması, yorumlanması ve varsa prognoz üzerine etkisinin araştırılması planlandı. Ayrıca ÜNMK'ları içerisinde daha sık görülen ve daha kötü klinik gidişe sahip olduğu bildirilen bazal benzeri grubun, yüksek moleköl ağırlıklı sitokeratinler olan sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 ile immunohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlandı.

2. Genel Bilgiler

2.1. Meme Anatomisi ve Histolojisi

Erişkin meme dokusu, göğüs ön duvarında vertikal olarak 2. ve 7. kotlar arasında, yatay olarak ise sternumun sonlandığı yerden orta aksiller çizgiye uzanan hatta yerleşmiştir. Ağırlığı ortalama 30g ile 1000g arasında olup kişiye, yaşa, menstürel sıklusa ve gebeliğe bağlı olarak değişmektedir [14].

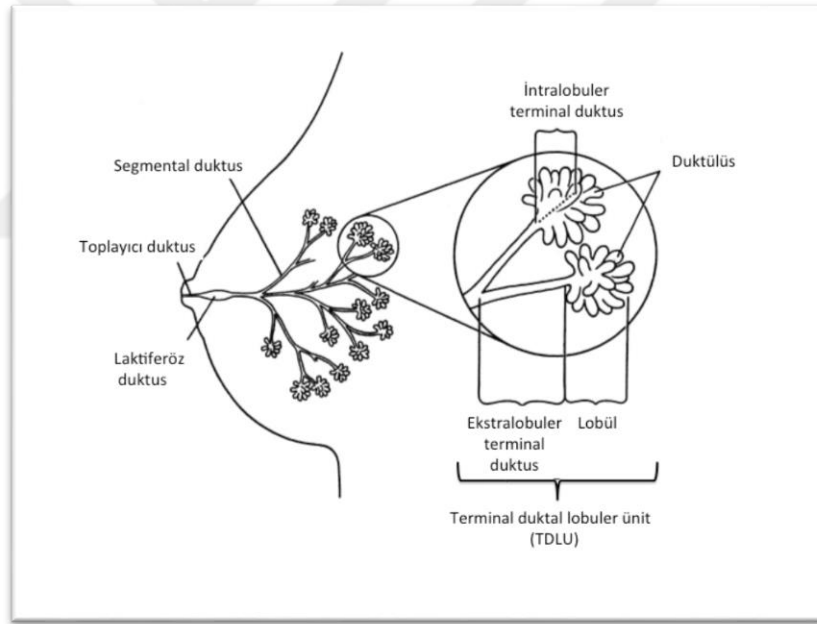
Memenin kanlanması başlıca internal mammaryan arter ve lateral torasik arterler yoluyla sağlanır. Lenfatik damarları %75 oranında ipsilateral aksiller lenf nodlarına, daha az oranda ise parasternal ve abdominal lenf nodlarına açılır.



ŞEKİL 1: Meme anatomisi

Meme dokusu dallanan tubuloalveolar glandlardan meydana gelen 15–20 adet lobdan oluşur. Fibröz bağ dokusu lobları birbirine bağlar. Her lob 20-40 lobüle ayrılır. Dermisle yüzeysel fasyanın derin tabakası arasında, memenin iskeletini oluşturan fibröz bantlar uzanır (Cooper ligamanı) (Şekil 1).

Memeyi oluşturan ve sekresyonu sağlayan temel yapısal birim terminal duktal lobüler ünitedir (TDLU). TDLU, asinüsler ile intralobüler terminal duktuslardan oluşan lobül ve bunların açıldığı ekstralobüler terminal duktustan oluşur (Şekil 2). TDLU'nun histolojik yapısı incelendiğinde dış tarafta yerleşmiş myoepitelyal hücreler ile içteki sekretuar luminal hücrelerden oluştuğu görülür. Luminal (sekretuar) hücreler kübik ya da prizmatik şekilli, soluk eozinofilik sitoplazmalı, oval uniform çekirdekli hücrelerdir. Myoepitelyal hücreler ise genelde yassı çekirdekli, berrak belirgin sitoplazmalı epitelioid ya da düz kasa benzer morfolojide iğsi hücreler şeklinde görülürler. Myoepitelyal hücre tabakasının dışında tip IV kollagen ve laminin içeren bazal lamina bulunur. Ayrıca lüminal yüzde glandüler veya öncü myoepitelyal hücelere diferansiye olabilen üçüncü bir hücre tipi olan kök hücre bulunur.



ŞEKİL 2: Memenin tubuloalveolar yapısı ve TDLU

Meme kanserinin çoğu TDLU'den köken alır. Bu yapısal birimin hücrelerinin immunohistokimyasal fenotip olarak farklılıklar gösterdiği bilinmektedir ve bu farklar da prognozu etkilemektedir.

2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

İnvaziv meme karsinomları, kadınlarda en sık görülen tümör olup, kadın kanserlerinin %22'sini, gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturur. Riskin yüksek olduğu Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da kadınların %6'sında 75 yaşından önce meme karsinomu gelişir. Bu oran, Japonya'nın da içinde bulunduğu Güney ve Doğu Asya ile Sahraaltı Afrika, gibi gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelerin 1/3'ü kadardır. Bu bölgelerdeki ülkelere sadece Japonya gelişmiş bir ülke olmasına karşın buradaki insidans halen düşük seviyededir [1].

Meme kanserli hastalarda tüm evrelere göre 5 yıllık sağkalım oranı, gelişmiş ülkelerde %83 iken, gelişmekte olan ülkelerde %53 olarak bildirilmektedir. Aradaki bu önemli fark, gelişmiş ülkelerde tarama programları sayesinde erken tanı oranının daha yüksek olması ve daha iyi tedavi olanaklarına atfedilmektedir [15].

2.3. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır ve olguların çoğunda kanser gelişiminde birden fazla faktör rol almaktadır.

- Yaş: Meme kanseri sıklığı çoğu epitelyal tümör gibi yaşla artmaktadır.
- Diyet ve yaşam tarzı: Yüksek kalorili beslenme, yetersiz fiziksel aktivite, alkol ve sigara kullanımı meme kanseri riskini artırır.
- Hormonal durum ve reproduktif faktörler: Erken menarş (<12 yaş), düzensiz ve anovulatuvar adet siklusları, geç doğum yapma (>30 yaş), hiç doğum yapmamış olma, geç yaşta menopoz (>55 yaş), oral kontraseptifler (OKS), postmenapozal hormon replasman tedavisi ve karşılanmamış östrojen tedavisi meme kanseri riskini artırır.

- İyonizan radyasyon: Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi, meme kanseri riskini de artırır.
- Ailede meme kanseri öyküsü: Tüm meme kanserlerinin sadece %10-15'i kalıtsaldır. Ailede meme kanseri öyküsü olması, BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde ve P53 geninde mutasyon olması meme kanseri riskini artırmaktadır. Bu genlerin dışında meme kanseri ile ilişkili olduğu bildirilen 15'ten fazla gen bulunmaktadır [1].

2.4. Klinik Bulgular

Memede kitle, en sık başvuru şikayetidir. Yeni fark edilen kitle haricinde daha önce var olan kitlede değişiklik, menstürasyon sonrası devam eden nodülarite, antibiyotik kullanımı ile geçmeyen meme inflamasyonu ve rekürren kistler öyküde tümörü akla getiren bulgulardır. Daha az görülen ancak görüldüğünde çoğunlukla tümörü düşündüren, meme başı akıntısı, meme başı retraksiyonu, meme kontüründe değişiklik, meme başı derisinde ekzematize görünüm gibi bulgular izlenebilir.

2.5. Görüntüleme

- Mamografi (MMG): Üç boyutlu meme yapılarının X ışını kullanarak iki boyutlu (kraniokaudal ve lateral) görüntülenmesi esasına dayanır. Memede ele gelen lezyonlara göre çok daha erken bir evrede olan, klinik olarak gizli durumdaki, palpe edilemeyen meme kanserlerini açığa çıkarır. Memede kuşkulu kitleler MMG'ye düzensiz sınırlı, mikrokalsifikasyonlar içeren görüntüler şeklinde yansımaktadır.

- Ultrasonografi (USG): Kırk yaşından genç kadınlarda meme görüntülemesinde USG kullanılmaktadır. Premenopozal dönemde meme yoğunluğu fazla olduğundan kitlenin büyüklüğü ve sınırlarını belirlemek için MMG ile birlikte USG değerlendirme yapılabilir.

2.6. Evreleme

Evreleme, hastanın prognozunu ön görmede ve hasta için en uygun tedavi modelinin oluşturulabilmesi için önem taşımaktadır. Meme kanseri evrelemesinde Amerikan Kanser Komitesi'nin (AJCC) önerdiği, 2009 yılında son güncellemesi yapılan TNM sistemi kullanılmaktadır.

TABLO 1: Meme tümörlerinde TNM evrelemesi

T (Tümör)	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulgusu yok
Tis (DCIS)	Duktal karsinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobüler karsinoma in situ
Tis (Paget)	Meme başının Paget Hastalığı +/- invaziv/in situ karsinom
T1mi	≤1 mm (mikroinvazyon)
T1a	>1 mm ≤5 mm
T1b	>5 mm ≤10 mm
T1c	>10 mm ≤20mm
T2	>20 mm ≤50 mm
T3	>50 mm
T4a	Göğüs duvarına invazyon (Sadece pektoral kas invazyonu yeterli değil)
T4b	Ülserasyon ve/veya satellit nodül ve/veya ödem
T4c	T4a+T4b
T4d	İnflamatuvar karsinom

N (Bölgesel Lenf Nodları) (Klinik)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral seviye I, II lenf nodu metastazı (fikse değil)
N2a	Fikse ya da grup oluşturmuş ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz
N2b	Klinik olarak aşikar aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak saptanmış ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı
N3a	İpsilateral infraklavikuler lenf nodu metastazı
N3b	İpsilateral aksiller ve internal mammaryan lenf nodu metastazı
N3c	İpsilateral supraklavikuler lenf nodu metastazı
N (Bölgesel Lenf Nodları) (Patolojik)	
pNX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
pN0(i-)	Histolojik ve immunohistokimyasal olarak negatif
pN0(i+)	Histolojik ve immunohistokimyasal olarak saptanmış izole tümör hücreleri
pN0(mol-)	Histolojik olarak metastaz yok, moleküler bulgu (RT-PCR*) yok
pN0(mol+)	Pozitif moleküler bulgular (RT-PCR*) var, histolojik ya da immunohistokimyasal bulgusu yok
pN1mi	Mikrometastaz (>0,2mm <2 mm)
pN1a	1-3 aksiller lenf nodunda metastaz
pN1b	İnternal mammaryan lenf nodunda makro ya da mikrometastaz
pN1c	pN1a+pN1b
pN2a	4-9 aksiller lenf nodunda metastaz
pN2b	Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın klinik olarak saptanmış internal mammaryan lenf nodu metastazı
pN3a	10 ya da daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz ya da infraklaviküler (seviye III) lenf nodlarına metastaz
pN3b	Bir ya da daha fazla metastatik aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak aşikar ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı ya da üçten fazla aksiller lenf nodunda metastaz ve internal mammaryan lenf nodlarında sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanan mikrometastaz ya da makrometastaz
pN3c	İpsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

M(Uzak Metastaz)	
M0	Uzak metastaz yok
cM0(i+)	Klinik ve radyolojik bulgu olmaksızın kemik iliği, uzak organ, lenf nodları ve kanda dolaşan $\leq 0,2$ mm tümör hücreleri
M1	Uzak metastaz var

*: RT-PCR: real time polimeraz zincir reaksiyonu

TABLO 2: Meme kanserinde evreleme

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T0, T1	Nmi	M0
Evre 2A	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre 3A	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Evre 3B	T4	N0, N1, N2	M0
Evre 3C	Herhangi bir T	N3	M0
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.7. Prognostik Faktörler

2.7.1. Aksiller Lenf Nodu Durumu

Günümüzde meme kanserinin prognozunu belirleyen en önemli faktör, aksiller lenf nodu metastazının varlığıdır. Hastalısız ve toplam sağkalım süreleriyle doğrudan ilişkilidir. Meme kanseri tanısı alan, özellikle ilk 5 yıl içerisinde lenf nodu tutulumu olmayan, 1-3 metastatik lenf nodu olan ve 4'ten fazla metastatik lenf nodu olan olgularda sağkalım oranları açısından anlamlı

fark olduğu saptandı [16] . Aksiller lenf nodu metastazının varlığı 5 yıllık toplam sağkalımı %40'a kadar indirebilmektedir [17].

Aksilladan diseke edilmesi gereken lenf nodu sayısı AJCC tarafından minimum 6 olarak tanımlandı.

Günümüzde aksiller lenf nodu diseksiyonunun neden olduğu morbiditeyi azaltmak için aksiller lenf nodları korunmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle de sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB) yapılmakta ve sonuca göre aksiller diseksiyon kararı verilmektedir. Sentinel lenf nodu (SLN), tümörün direne olduğu ilk lenf nodudur. SLN işaretlemelerinde radyoaktif izotoplar ya da mavi boya kullanılmaktadır.

Aksiller lenf nodu metastazı; makrometastaz (> 2 mm), mikrometastaz (< 2 mm, > 0,2 mm) ve izole tümör hücreleri/submikrometastaz (tek hücreler veya boyutu 0,2 mm'yi geçmeyen, en fazla 200 hücreden oluşan küçük tümöral hücre grupları) şeklinde gruplandırılmaktadır. Makrometastazların prognozla ilişkisi net olarak bilinmekle birlikte submikrometastazlar ve mikrometastazların prognozla ilişkisi net olarak bilinmemektedir [18].

2.7.2. Tümör Boyutu

Öncelikle invaziv komponentin büyüklüğü olmak üzere tümör çapı, aksiller lenf nodu tutulumunu öngören önemli bir prognostik faktördür [19] . Tümör çapı arttıkça sağkalım süresi azalmakta ve aksiller lenf nodu tutulumu olasılığı artmaktadır [20]. Boyutu 1 cm'nin altında olan tümörlerde 10 yıllık sağkalım %90'ın üzerindeyken, 2 cm'den büyük tümörlerde bu oran %77'ye düşmektedir [21].

2.7.3. Tümör Derecesi

Tümör derecesi önemli prognostik faktörlerden biridir. İnvaziv meme karsinomları tubuler/glanduler diferansiyasyon durumu, nükleer pleomorfizm ve mitotik aktivite indeksine göre derecelendirilmektedir. Modifiye Bloom Richardson Derecesi (MBRD) günümüzde meme kanserinin derecesini belirtmede kullanılmaktadır. MBRD'ye göre 3, 4 ve 5 olarak skorlanan olgular derece 1; 6 ve 7 olarak skorlanan olgular derece 2; 8 ve 9 olarak skorlanan olgular derece 3 tümörlerdir.

TABLO 3: MBRD derecelendirme sistemi

	Puan
Tübül Oluşumu >%75 %10-75 Minimal veya hiç yok (<10)	1 2 3
Nükleus özellikleri Küçük nükleus, düzgün sınırlar, üniform kromatin paterni Normalden büyük, veziküler nükleuslu, nükleolü seçilebilen, ılımlı boyut ve şekil farkı gösteren hücreler Veziküler nükleus, belirgin nükleol, belirgin boyut ve şekil farkı gösteren hücreler	1 2 3
Mitoz sayısı (x25, alan çap> 0.59 mm-10 alan) 0-9 10-19 >20	1 2 3

2.7.4. Histolojik Tip

En sık görülen meme karsinom tipi invaziv duktal karsinom (İDK), başka türlü sınıflandırılmayan ("not otherwise specified", NOS)'dur ve yayınlardaki sıklığı %40 ile %75 arasında değişmektedir [1]. İDK, NOS grubundan sonra

gelen grup invaziv lobuler karsinom (İLK)'dur ve sıklığı %5-15 arasında bildirilmektedir. Daha az oranda görülen invaziv kribriform, tubüler, tubülobüler gibi daha düşük dereceli tümörlerde sağkalım beklentisi daha yüksek olup 10 yıllık sağkalım %80'in üzerindedir [22].

2.7.5. *Lenfovasküler İnvazyon*

Özellikle T1, nod negatif hastalarda önemli bir bağımsız prognostik faktördür. LVI'nin lenf nodu tutulum oranını arttırdığı gösterilmektedir. Erken lokal rekürrens riskinde 3 kat artış ve uzak metastaz ile de ilişkilidir [23, 24].

2.7.6. *Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler (TİL)*

Neoplastik gelişim dokuların yapısal düzenini bozarak immun yanıtı aktive eder ve aktive olan immun sistem tümörü ortadan kaldırmaya çalışır. Solid tümörlerde spesifik immun sistem hücreleri ve klinik yanıt arasında ilişkinin bulunduğu birçok araştırmada gösterildi [25]. Özellikle HER2 (+) ve ÜNMK'larında TİL değerlendirmesi prediktif ve prognostik öneme sahiptir. ÜNMK'larında büyük serilerde yapılan çalışmalarda, tanı anında yoğun TİL varlığı kemoterapi sonrası sağkalımı arttırmaktadır [26, 27].

2.7.7. *P53*

P53 bir tümör supresör genidir ve 'genomun bekçisi' olarak tanımlanmaktadır. P53 mutasyonu sporadik ve ailesel sendromlar şeklinde karşımıza çıkarak pek çok kansere neden olabilmektedir. Meme karsinomunda

%23 oranında p53 mutasyonu bildirilmektedir [28]. P53 durumu, rutin patoloji uygulamasında İHK ile değerlendirilmektedir. İHK yöntem ile mutasyon analizlerinin uyumluluğunu değerlendiren çalışmalarda yoğun, aşırı p53 ekspresyonu varlığında ve p53 ekspresyonunun tamamen kaybolmuş olduğu durumlarda mutasyon saptandığı, buna karşılık daha seyrek İHK boyanmaların gösteren vakalarda mutasyon görülmediği dikkati çekmektedir [28, 29]. Meme karsinomlarında p53 pozitifliği kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir [30].

2.7.8. Proliferasyon indeksi

Ki67, mitoz bölünmenin G1, S, G2 ve M fazlarında sentezlenir. Dinlenme fazı olan G0'da Ki-67 protein ekspresyonu olmaz [31]. G1 ve S fazlarında düşük miktarlardayken, mitoz fazı sırasında maksimum değerine ulaşır ve mitozun son aşamalarında hızla azalır. Ki67, tümörün mitotik aktivitesi hakkında fikir vermekte ve proliferasyon aktivitesini göstermek için kullanılmaktadır. İHK yöntemle nükleer boyanma yüzdesi hesaplanarak belirlenmektedir. Erken evre meme kanserinde önemli bir prognostik parametre olarak kabul edilmektedir [32]. Ki67 ayrıca Luminal A ve B grupları arasındaki ayrımı yapabilmek amacıyla da kullanılmaktadır. Buna göre ER pozitif tümörlerin Ki67 proliferasyon indeksi %14 ve üzerinde olduğunda Luminal B olarak değerlendirilmektedir.

2.7.9. Hormon Reseptörleri

Östrojen 18 karbonlu steroid yapıda seks hormonudur. Progesteron ise, temel sentez yeri korpus luteum olan, steroid yapıda ve 21 karbon atomu içeren bir hormondur. Östrojen ve progesteron, nükleustaki reseptörlerine bağlanarak transkripsiyon kaskadı üzerinden etki gösterirler. Bu hormonların meme kanseri oluşumunda mutajenik etki yaptıkları bilinmektedir.

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

ER ve PR, rutin uygulamada İHK yöntemiyle değerlendirilir ve nükleer boyanma pozitif kabul edilir. Boyanma yüzdesi ve şiddeti dikkate alınmaktadır. Şiddet zayıf (1+), orta (2+) ve kuvvetli (3+) boyanma olarak ifade edilmektedir. Değerlendirme için mutlaka internal kontrol bulunmalıdır.

2.7.10. *HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2)*

HER2, 17q12'de yerleşmiş olan ERBB2 geni tarafından kodlanır, 185 kD ağırlığında olup tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir. HER2 normal hücre gelişim ve proliferasyonunda görevlidir ve pek çok epitel hücresinde düşük düzeyde eksprese edilir. Bu protein membranöz yerleşimli olup, hücre membranının dış kısmında, transmembranöz ve hücre membranının iç kısmında yerleşmiş olan üç parçadan oluşmaktadır. Lenf nodu metastazı olan meme kanseri olgularında kötü prognoz için bağımsız bir faktör olduğu gösterildi [33].

İHK sonuç değerlendirmesi ASCO/CAP önerileri doğrultusunda membranöz boyanma skorlanarak yapılmaktadır [34]. Bu skorlamaya göre invaziv tümör hücrelerinin >%10'unda üniform, yoğun, komplet membranöz boyanma (3+) olarak kabul edilmekte; tümör hücrelerinin \geq %10'unda aşikar sirkumferansiyel dağılım gösteren non-üniform ya da zayıf komplet membranöz boyanma ise (2+) olarak değerlendirilmektedir. Zayıf, inkomplet membranöz boyanma (1+), tümör hücrelerinde hiç boyanma olmaması (0)

olarak kabul edilmektedir. (2+) olarak raporlanan olguların bir kısmı yanlış pozitif olduğundan bu olgularda yine ASCO/CAP önerileri doğrultusunda FISH yöntemiyle amplifikasyon değerlendirilerek doğrulama testi yapılmaktadır. FISH yöntemiyle negatif sonuç alınan (2+) olgular ile, İHK yöntemle (1+) ve (0) değerlendirilen olgular HER2 amplifikasyonu açısından negatif kabul edilmektedir.

2.8. Meme Kanserinde Moleküler Sınıflama

Meme kanserinin doğası, tedavi cevaplarının birbirinden farklı olması, moleküler durumunu anlayabilmek ve fenotipini belirleyebilmek için gen ekspresyon profili analizlerinin hız kazanmasına neden oldu [24, 30].

İnsan meme dokusu bazal (ve/veya myoepitelyal) epitelyal hücreleri ve luminal epitelyal hücreleri içermektedir [35, 36]. İki hücre tipi de birbirinden oldukça farklı İHK'sal fenotip göstermektedirler. Bazal hücreler sitokeratin 5/6 gibi keratinler (sitokeratin 5, sitokeratin 6a, sitokeratin 6b, sitokeratin 14, sitokeratin 16, sitokeratin 17) ile boyanma gösterirken, luminal epitelyal hücreler sitokeratin 7, sitokeratin 8, sitokeratin 18, sitokeratin 19 ile pozitiflik göstermektedir. Ayrıca bu iki hücre tipinde bir çok gen eksprese olmaktadır ancak bu genler de birbirinden farklıdır. Bazal hücrelerde keratin 5, keratin 17, keratin 14, integrin $\beta 4$ ve laminin gen ekspresyonu olurken; luminal hücrelerde ER transkripsiyon faktörünü de içeren bir dizi gen ekspresyonu gerçekleşmektedir [35].

İmmunohistokimyasal olarak bazal ve luminal sitokeratinler ile boyanma, oldukça değişkenlik gösterebilmekte ise de invaziv meme karsinomunu alt tiplere ayırmaya yardımcı olabilmektedir [37]. Ancak bazal sitokeratinler, bazal benzeri grubun tamamında eksprese edilmemektedir, bu yüzden farklı belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır [38].

Sorlie ve Perou, farklı gen ekspresyon paternleri gösteren dört ana moleküler grup tanımladı ve meme karsinomu moleküler alt grupları, ER+/luminal benzeri, bazal benzeri, HER2 pozitif, normal meme benzeri şeklinde sınıflandırıldı [3]. Bu çalışmaya göre klinik olarak ER negatif olarak ifade edilen grup, bazal benzeri ve HER2 + gruplarını içermektedir. Son yıllarda mesajcı RNA ekspresyon analizlerine göre yapılan farklı çalışmalarda ise luminal A, luminal B, bazal benzeri, Her2 zengin, klaudin düşük grupları olmak üzere beş intirinsik moleküler gruba ayrıldı [39]. Bu gruplamalar temelde meme karsinomlarının sitokeratin gen ekspresyonlarına göre yapıldı.

- Luminal A; Tüm meme karsinomlarının yaklaşık %40'ını oluşturur ve en sık izlenen alt tiptir. Genelde düşük dereceli tümörler olup belirgin olarak en iyi prognozlu grubu oluşturur [30, 40]. Memenin luminal epiteline benzerlik gösteren, ER pozitif kanserlerin çoğu bu gruptadır. ER ve PR ilişkili diğer genlerin aktivasyonu sonucu gelişir, HER2 negatiftir.

- Luminal B; ER (+) olan ancak Luminal A'ya göre proliferatif aktivitesi daha yüksek tümörlerdir ve Ki67 proliferasyon indeksi %14'ün üstünde beklenmektedir. Tüm meme kanserlerinin %20'sini oluşturur. Luminal A'ya göre görece düşük ER ekspresyonu, artmış HER2 ekspresyonu ve proliferatif aktivite nedeniyle prognozu Luminal A'ya göre daha kötüdür [41, 42].

- HER2 pozitif; HER2 amplifikasyonu olan, genellikle ER, PR negatif tümörleri içerir. Meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. HER2 ve proliferasyon gen kümelerinin yüksek ekspresyonu ile luminal ve bazal gen kümelerinin düşük ekspresyonu söz konusudur [3].

- Klaudin-düşük; Hücreler arası adezyon molekülleri olan klaudin 3, 4, e-kadherin ve luminal yüzey belirteçlerinin düşük ekspresyonu görülür [39]. Üçlü negatif meme kanserine ve meme kök hücrelerine benzer tümör hücreleri ile karakterizedir [43]. Meme karsinomlarının %5-10'unu temsil eder. Bazal benzeri tümörlere göre daha yavaş büyüme potansiyeline sahiptir.

- Normal benzeri; Normal meme dokusu ile aynı gen ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür. Bu lezyonların ayrı bir grup mu olduğu yoksa incelenen örnekte tümör dokusunun az olmasına bağlı bir sonuç mu olduğu tartışmalıdır [43].

- Bazal benzeri; Bazal benzeri meme kanseri tüm meme kanserlerinin %10-25'ini oluşturur. Kötü klinik gidişe sahiptir ve sağkalımı düşüktür. ER, PR negatif, Her2 amplifikasyonu olmayan tümörlerdir ve tipik olarak bazal tip sitokeratinler eksprese ederek myoepitelyal hücrelerin özelliklerini taşırlar [38]. Alt tipler içinde en yüksek proliferatif aktiviteye sahip gruptur. Artmış proliferasyon, hücre siklusunda kilit rol oynayan Retinoblastom (RB) protein fonksiyon kaybına bağlı gibi görünmektedir [44]. Ayrıca bu grubun %50'den fazlasında p53 mutasyonu saptandı. Tüm bu etkenler tümörün hızlı progresyonunda etkili olmaktadır. Bazal sitokeratin ekspresyonları ile yüksek tümör derecesi ve kötü prognoz arasındaki ilişki bir çok çalışmada ortaya kondu [45, 46] ve prognozu diğer gruplara kıyasla belirgin derecede kötü olduğu saptandı.

2.8.1. Üçlü Negatif Meme Karsinomları (ÜNMK) ve Moleküler Sınıflama

DNA mikroarray ve gen ekspresyon profillerinin araştırılması meme karsinomunda değişik alt grupların ortaya çıkmasında neden olmuştur [44]. ÜNMK'ları; tespit edilebilen ER, PR ekspresyonu ve HER2 gen amplifikasyonu yokluğu olarak tanımlanmaktadır [47] ve iyi tanınmış moleküler hedeflerden yoksundur [48].

Tüm meme kanserlerinin %10-20 kadarını oluşturmaktadır. ÜNMK'ları büyük boyutlu, yüksek dereceli, genellikle tanı anında lenf nodu metastazına sahip, kötü klinik gidiş gösteren tümörlerdir [49]. Diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha sık hastalık rekürrensi ve kötü sağkalım ile ilişkilidir [49, 50]. Tedavi modelinin temelini oluşturan adjuvan kemoterapiye rağmen hastaların ancak %30'unun sağkalımı ortalama 5 yıla ulaşabilmektedir [50].

Bu agresif tip meme kanserine karşı farklı tedavi ajanlarının geliştirilebilmesi için geniş genomik, moleküler ve biyolojik analizlere ihtiyaç duyuldu. Lehmann [5], yaptığı çalışmada bazal benzeri-1 (BL1); bazal benzeri-2 (BL2); immunmodulator (İM); mezenkimal (M); mezenkimal kök hücre benzeri (MSL); luminal androjen reseptör (LAR); olmak üzere altı alt grup tanımladı.

➤ Bazal benzeri 1 (BL1) ve Bazal benzeri 2 (BL2) alt tipleri : BL1 alt grubunun gen analizleri sonuçları, hücre siklusu, DNA replikasyonu, G2 yollağı, RNA polimeraz, ATR/BRCA yollağı, G1-S geçişi olmak üzere hücre siklusu ve hücre bölünmesinin yolaklarında yoğunlaştığını gösterdi [5]. Proliferasyon genleri ekspresyonunda artma, Ki67 proliferasyon indeksinde artmaya neden olmaktadır. Bu nedenle bazal benzeri grubun Ki67 proliferasyon indeksi diğer alt tiplere göre anlamlı derecede yüksek bulundu [5]. Bu artmış proliferasyon, taksanlar gibi antimitotik kemoterapotik ajanlara yanıtı arttırmaktadır [51]. Proliferasyonun artması ve hücre siklusunun kontrol noktalarının kaybı, DNA hasarından sorumlu genlerin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır.

BRCA, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde ve DNA stabilizasyonunda görevlidir [52]. BRCA1 germ-line mutasyonları ile bazal benzeri grup arasında ilişki mevcuttur. BRCA1 ilişkili meme kanserlerinin üçte biri bazal benzeri mikroarray ve İHK profili sergilemektedir [30]. BRCA genetik testine yönlendirilen hastalar arasında yapılan çalışmalarda, BRCA1 mutasyonu gösteren %57 hasta, BRCA2 mutasyonu gösteren %23 hasta ÜNМК tanısı aldı [53]. BRCA1 ve BRCA2 mutant tümörlerin de bazal benzeri alt tipe uyan gen ekspresyonu ve fenotip sergilediğı bilinmektedir [54].

BL2 alt tipi, büyüme faktör sinyal yolaklarında (EGF yollağı, NGF yollağı, MET yollağı, Wnt/ β -katenin, ve IGF1R yollağı), glikoliz ve glikoneogenez gibi aşamalarda etkili farklı gen profiline sahiptir. Bu alt tip bazal/myoepitelyal hücre diferansiasyonunu belirten yüksek P63 ve CD10 ekspresyonu gösterirler [5].

➤ İmmunmodulator (İM) alt tipi : İmmun sistem hücre sinyal yolları (Th1/Th2 yolağı, NK hücre yolağı, B hücre sinyal yolağı, T hücre reseptör sinyal iletimi), sitokin sinyalleri (sitokin yolları, IL-12 ve IL-7 yolları), antijen işleme-antijen sunumu ve immün sinyal iletim yolları (NFkB, TNF ve JAK/STAT sinyalleri) gibi immün yanıtta görevli olan belirgin bir gen profiline sahiptir. Morfolojik olarak değerlendirildiğinde bu grubun medüller meme kanseriyle örtüştüğü ve yüksek histolojik derecesine rağmen diğer ÜNМК'larından farklı olarak daha iyi prognoza sahip olduğu bildirildi [55]. Bu grubun histolojik incelemesinde tümör infiltrate eden lenfositlerin (TİL) yoğun bir şekilde görüldüğü ve iyi prognozla ilişkili olduğu iki adjuvan faz III çalışmada gösterildi [27].

➤ Mezenkimal ve Mezenkimal kök hücre benzeri (M ve MSL) alt tipleri: Mezenkimal alt tipi, tipik olarak hücre motilitesi, ekstraselüler matriks ile etkileşim reseptörleri ve hücre diferansiyasyon yollarında (WNT, ALK, TGF-β) etkili gen profiline sahiptir.

MSL alt tipi de M alt tipine benzer biyolojik işlevi bulunan gen profiline sahip olmakla birlikte EGFR, PDGF, kalsiyum sinyal iletimi, G protein ilişkili reseptör, ERK1-2 sinyal yolağı gibi büyüme faktör reseptörleri ilişkili gen ekspresyonlarında görev alır. Aynı zamanda kludinlerin (3, 4, 7) az miktarda ekspresyonu mevcuttur. M alt tipine göre proliferasyon gen ekspresyonlarında azalma söz konusudur [5, 6].

M ve MSL alt tipleri morfolojik olarak metaplastik (mezenkimal/sarkomatoid veya skuamöz özellikler gösteren) meme karsinomuna benzemektedir ve bu tümörler kemoterapiye dirençlidir.

➤ Luminal androjen reseptör (LAR) alt tipi: ÜNМК'ları içinde en diferansiye gruptur. ER negatif olmakla birlikte steroid sentezi, porfirin metabolizması, androjen/östrojen metabolizması olmak üzere hormonal düzenleyici yollarda etkili gen ekspresyonu görülür. Androjen reseptörü(AR) mRNA ve İHK'sal olarak nükleer AR boyanması ve yoğunluğu diğer alt tiplere göre belirgin olarak artmaktadır. Bazal sitokeratin ekspresyonu yok/azalmış

olmasına karşın lüminal sitokeratinlerin (FOXA1 and XBP1) artmış ekspresyonu görülür.

ÜNMK'larının bazal benzeri grupla eşdeğer olduğu düşünülmele birlikte 386 ÜNMK olgusunda yapılan gen ekspresyon set analizleri daha önce tarif edilen beş moleküler alt tipe uyumluluk göstermektedir [56]. Bu analiz sonuçlarına göre ÜNMK'larında 188 olgu (%49) bazal benzeri; 54 olgu (%14) luminal A; 42 olgu (%12) normal meme benzeri; 31 olgu (%8) luminal B; 19 olgu (%5) HER2 + olarak sınıflandırıldı. Vakaların %13 'ü (n=52) sınıflandırılmadı. Bu analiz ÜNMK'larının çoğunluğunun bazal benzeri alt gruptan oluştuğunu gösterdi.

BL1 alt grubu bazal benzeri intrinsik moleküler sınıflama ile güçlü şekilde ilintili iken; BL2, İM, M alt tipleri ılımlı derecede bazal benzeri moleküler grupla ilişkili görünmektedir [5]. Genel olarak alt gruplar incelendiğinde BL1, BL2, İM, M alt tipleri bazal benzeri grubu oluşturken, MSL ve LAR alt tipleri luminal ve HER2 alt tiplerini oluşturuyor gibi görünmektedir [6]. Ancak BL2, İM, ve M alt tiplerinin bir kısmı sınıflandırılmamakla birlikte M ve MSL gruplarının bir kısmı da normal meme benzeri grupta sınıflandırıldı. Bu nedenle BL2, M, MSL alt tipleri intrinsik sınıflamanın bir çok grubunu içermektedir ve karakteristik bir alt tipe uymamaktadır. ÜNMK'ları içersindeki LAR grubu luminal A ya da luminal B olarak sınıflanabilmektedir ve bu grup içerisinde bazal benzeri sınıf yer almamaktadır. Diğer bir alt grup olan klaudin düşük grup da epitelyal-mezenkimal geçiş, immün yanıt ve kanser kök hücre gen ekspresyon özelliğinden dolayı M ve MSL alt tipleri içinde yer almaktadır. Tüm bu verilerin ışığında ÜNMK'larını bazal ve bazal olmayan olarak gruplamak mümkün gözükmemektedir [47]. Bazal olmayan grubun çoğunluğunu LAR ve MSL alt tipleri oluşturmaktadır.

2.8.2. ÜNМК'nda Tedavi

ÜNМК'larının ER, PR ve HER2 negatif olması iyi bilinen hormonoterapi ve transtuzumab gibi tedavi modellerinden yoksun kalmasına neden olmaktadır. Bu tümör grubunun özellikle proliferasyon kapasitesi yüksek olan tipleri, taksanlar gibi antimitotik kemoterapi ajanlarından fayda görmeye birlikte, kemoterapi sonrası kalıntı hastalık bulunması durumunda üç yıl içindeki relaps artışı ve kötü sağkalım oranında artma bildirildi [57].

ÜNМК'ları içerisinde gen ekspresyon düzeylerine göre yapılan sınıflama ile HER2 zengin gruba girenler fenotipik olarak HER2 negatif olmalarına rağmen transtuzumab tedavisine yanıt verebilmektedir.

Tedavi ajanlarına farklı yanıtı ÜNМК'lerinin heterojen alt gruplardan oluşması sorumludur. Klinik araştırmalar sonucu farklı hedefe yönelik tedavi modelleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan bazıları PARP, AR, SRC ve PI3K/mTOR yollarını hedef almaktadır.

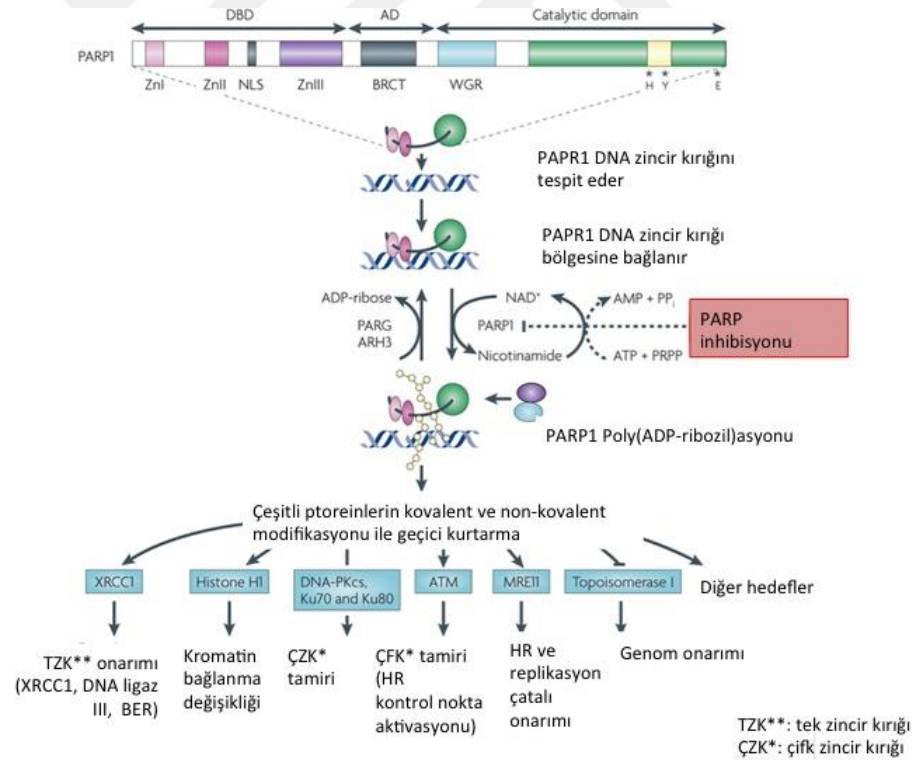
Hücre siklusu ve DNA hasarından sorumlu genlerin ekspresyonları BL1 ve BL2 alt tiplerine artış göstermektedir. Daha önce PARP inhibitörleri ve cisplatinle yapılmış klinik çalışmalar sonucuna göre DNA hasarı onarım mekanizması bozukluğu görülen BL1 ve BL2 alt tiplerinde hücre yaşayabilirliğini azaltmakta olduğu saptandı [58, 59].

2.8.2.1. PARP1 inhibisyonu

Normal hücrelerde DNA hasar tamiri, baz kesip çıkarma ("base-excision repair", BER) ve homolog rekombinasyon (HR, DNA çift zincir hasarı tamiri) ile gerçekleştirilir. BRCA mutant olgularda HR fonksiyonu ortadan kalkar ve PARP1 inhibisyonu ile de DNA tek zincir kırıkları birikmeye başlar. BER ve HR'nin ikisinin birden kaybı, hücrede DNA hasar onarımını mümkün

kılmamaktadır ve bu hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle hedefe yönelik tedavi ajanı araştırılmasında dikkat çeken konulardan biri Poli ADP riboz polimeraz-1 (PARP1)'dir. PARP1, PARP ailesinin en büyük grubudur ve ilgili gen bölgesi 1q41-42 'de lokalizedir. PARP1 DNA hasarıyla aktive olan, transkripsiyon, hücre siklusu, tümörögenезis ve DNA tamirinde rol alan kromatin ilişkili önemli bir enzimdir [12]. PARP proteini direkt olarak hasarlı DNA bölgesine bağlanır diğer DNA tamir enzimlerini aktifler (Şekil 3).

PARP1 aktive olduğunda nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'i substrat olarak kullanarak, Poli ADP-riboz (PAR) sentezler ve PAR'ı kovalent olarak nükleer proteinlere (nükleozomal kor histonları, topoizomeraz I-II, yüksek değişken grup proteinleri, p53) transfer eder [13]. PARP1 bağımlı baz kesip çıkarma onarımı bozulduğunda DNA tek zincir kırıkları oluşmaktadır.



ŞEKİL 3: PARP sinyal yoluğu

Kanserlerin çoğu kromozomun sayısal ve yapısal değişkenliğinden kaynaklanan genomik instabilite içermektedir. Homolog rekombinasyonun bozuk olduğu BRCA mutasyonu olan tümörlerde biriken tek zincir kırıkları, çift zincir kırıklarına ve takiben replikasyon çatalının çökmesine neden olur. Bu yüzden BRCA ilişkili ve üçlü negatif tümörler PARP inhibitörleri kullanımıyla PARP1 aktivitesinin kaybı tümör hücrelerinin ölümünü arttırmaktadır. BRCA ilişkili meme tümörleri homolog rekombinasyon nedeniyle PARP1 inhibitörlerine daha duyarlıdır.

Seçilmemiş hasta gruplarında, tek ajan PARP inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda çok çeşitli sonuçlar ortaya çıktığı gösterildi. Ancak PARP inhibitörlerinin kemoterapi ile kombine edildiğinde iyi tolare edildiği [60], BRCA1/2 mutant tümörlerde de gemitabin, karboplatin ile kombine edildiğinde genel sağkalımı %32-52 oranında arttırdığı gösterildi [61].

Kanser hücreleri hayatta kalabilmek için DNA hasar tamir mekanizmalarına bağımlıdır ve öldürücü seviyede DNA hasarından kaçınmaktadırlar [62]. PARP1'in mRNA ve protein düzeyinde artmış ekspresyonu bir çok kanser tipinde bildirildi ve bu artmış ekspresyon kötü klinik gidiş ile ilişkilendirildi [63]. Tümör hücrelerindeki artmış PARP1 ekspresyonunun anormal DNA hasarını kompanse etmek için gerçekleştiği düşünülmektedir.

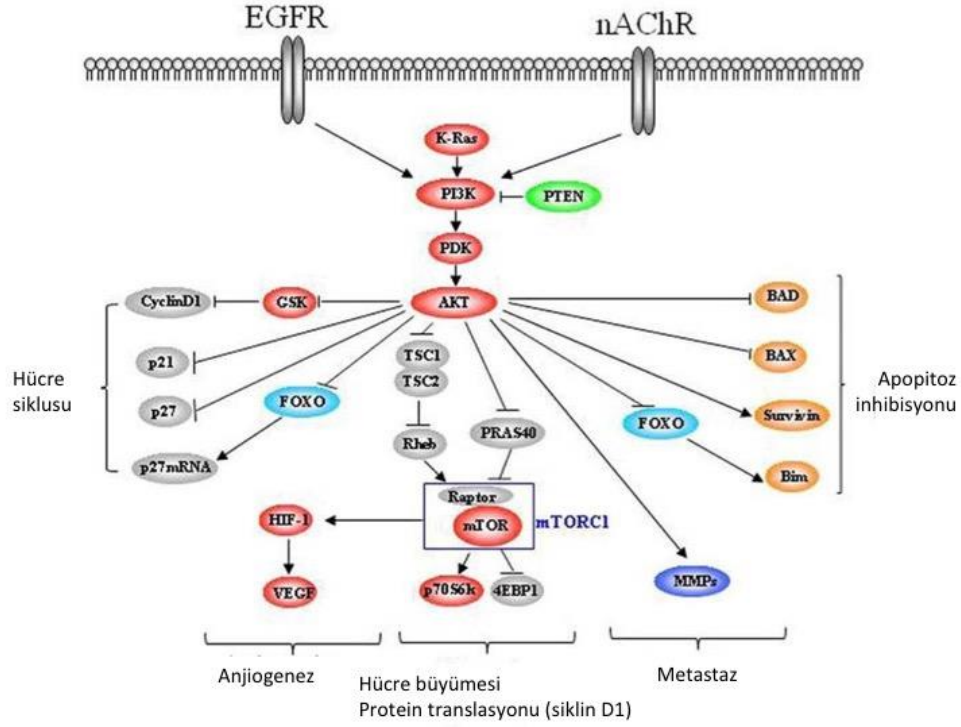
PARP1 mRNA ekspresyonunun, yüksek tümör derecesi, medüller histolojik tip, tümör boyutu, kötü hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım ile orantılı olduğu görüldü [64]. Başka çalışmalarda PARP1 ekspresyonunun neoadjuvant kemoterapiye yanıt ile doğru orantılı olduğu saptandı. PARP proteininin İHK'sal olarak gösterildiği çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildi. Gonçalves ve arkadaşları [64], 2485 adet meme kanseri içeren metaanalizde, PARP1 protein mRNA ekspresyonu, tüm meme kanser alt tiplerinde izlendi ancak ÜNМК'ları ve HER2 (+) grupta daha sık olarak saptandı. Aynı zamanda kötü tümör diferansiasyonu, non-lobuler histolojik tip ve hormon reseptör negativitesi ile ilişkili bulundu. Tüm bu veriler ışığında PARP1'in prognostik bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

2.8.2.2. *PI3K/AKT/mTOR yolağı inhibisyonu*

PI3K/AKT/mTOR yolağı hücre metabolizması, proliferasyonu, motilitesi, migrasyonu, invazyonu gibi birçok hücrel aktiviteden ve anjiogenezden sorumludur [65]. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (“epidermal growth factor receptor”, EGFR) ailesi büyüme faktörü reseptörleri, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü ve ER α gibi farklı membran ilişkili kinazlar ile aktive olur.

Bir tümör supresör gen olan fosfataz-tensin (PTEN) defosforilizasyonu ile fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) yolağı inhibe olur. Tümör hücrelerinde PTEN fonksiyon kaybı veya azalması, PI3K yolağının hiperaktif olmasına ve kontrolsüzce bir dizi kinaz aktivasyonuna yol açar. Bu kinazlardan biri de rapamisin’in memelilerdeki hedefi (“mammalian target of rapamycin”, mTOR) ‘dir.

mTOR, Fosfotidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağının anahtar bileşenlerinden biridir ve tümör dönüşümü, ilerlemesinden sorumlu bir serin/ tireonin kinazdır [8]. mTOR PI3K kinaz/AKT yolağında Ser2448 bölgesinden fosforilize olarak ya da Ser2481’den otofosforilizasyon ile aktive olur. Ribozomal p70 S6 kinaz (S6K1) ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein (4E-BP1) mTOR’un iki ana mesajcıdır. Bu mesajcılar mTOR etkisiyle aktive olduğunda RNA translasyonu artar, bu nedenle de protein sentezi, hücre büyümesi ve çoğalması gerçekleşir [8] (Şekil 4).



ŞEKİL 4: p-mTOR sinyal yolağı

Fosforilize mTOR (p-mTOR) nükleer seviyede tespit edilen, mTOR'un aktive formudur. Vazquez-Martin, p-mTOR'un nükleer birikimini proliferasyon kapasitesi ile korele buldu [66]. Literatürde p-mTOR ekspresyonu olan meme kanserleri lenf nodu metastazı, kötü sağkalım ve hastalık tekrarı ile ilişkili bulundu [9,10]. Bose ve arkadaşları [9], yaptığı çalışmada p-mTOR yüksek dereceli tümörlerde artmış olarak tespit edilirken, Zhou ve arkadaşları yaptığı çalışmada p-mTOR ve tümör derecesi arasında ilişki bulamadı [67]. ÜNMK'ların %36'sında artmış p-mTOR ekspresyonu saptandı ve bu oranın üçlü negatif olmayan gruba göre daha fazla olduğu bildirilmektedir [11].

mTOR aktivasyonu, PTEN mutasyonu ya da AKT aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak mTOR inhibitörlerine duyarlıdır bu nedenle mTOR'a karşı hedefe yönelik tedavi modeli geliştirme çalışmaları hız kazandı.

Tüm bu verilerin ışığında bu çalışmada merkezimizde tanı almış 82 ÜNMK olgusunun İHK'sal olarak PARP1 ve p-mTOR ekspresyon düzeyleri

araştırılarak, histomorfolojik parametreler ve sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi. Ayrıca İHK yöntemle sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 ekspresyonuna göre bazal benzeri grup ayırt edilmeye çalışıldı. Böylece daha kötü klinik gidiş potansiyeline sahip alt tip ayırımı yapıldı ve bazal benzeri olmayan grupla karşılaştırıldı.



3. Gereç ve Yöntem

3.1. Olgu Seçim Kriterleri

Çalışmaya 2005-2010 yılları arasında EÜTF Patoloji Anabilim dalında parsiyel/total mastektomi materyalleri ve/veya tümör eksizyon materyalleri ile incelenen ve İHK yöntemle ER, PR, HER2 negatif (-) olarak veya ER, PR negatif (-) HER2 durumu (2+) olarak rapor edilen ve FISH uygulanıp sonucu negatif (-) olarak değerlendirilen vakalar dahil edildi. Bu kriterlere uyan toplam 155 vaka içerisinde 65 adet konsültasyon vakası arşivimizde bloklarına ulaşamadığı için çalışmaya dahil edilmedi. Bloklarında yeterli tümör dokusu kalmayan beş vaka ile tekrarlayan İHK kesitlerinde doku elde edilemeyen iki vaka çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca bir adet mikroinvaziv meme karsinomu çalışmaya dahil edilmedi. Nihai olarak çalışmaya alınan 82 vaka detaylı olarak incelendi.

3.2. Etik Kurul Onayı

Çalışmamıza Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 14-9.1/3 karar numarası ile etik kurul onayı alındı.

3.3. Klinik Verilerin Toplanması

Olguların genel bilgileri ve laboratuvar sonuçlarına Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Medikal Onkoloji Anabilim Dalı hasta dosya kayıtlarından ve meme konseyi hasta kartlarından

ulaşıldı. Hasta bilgileri, patoloji rapor verileri, klinik bilgiler Microsoft Excel 2013 programına kaydedildi.

3.4. Histopatolojik İnceleme

3.4.1. Histolojik Tip ve Derece

Olguların arşivde bulunan H&E boyalı preparatları tekrar değerlendirildi. Tümörün histolojik tipi için DSÖ 2012 ölçütleri, derecesi için ise MBRD sistemi temel alındı.

3.4.2. Diğer Histopatolojik Değerlendirme Ölçütleri

3.4.2.1. İmmünohistokimyasal İnceleme

Arşivde yer alan preparatlarda meme karsinomu olgularının rutin histopatolojik incelemesinde kullanılan ER (Estrogen Receptor, Clone 1D5, dilüsyon 1:50, Dako / Clone 6F11, dilüsyon 1:50, Novacastra / Clone SP1, dilüsyon 1:400, NeoMarkers), PR (Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636, dilüsyon 1:150, Dako / Clone SP2, dilüsyon 1/400, NeoMarkers), HER2 (C-erbB-2/ HER2/ neu oncoprotein Ab-17, Clone=e2-4001 + 3B5, Mouse Monoclonal Antibody, 1:400, NeoMarkers / poliklonal, dilüsyon 1:300, Dako / Clone CB11, dilüsyon 1:100, Thermo), P53 (Clone DO7+ BP53-12, dilüsyon 1:150, NeomMrkers) ve Ki67 (Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Dako) İHK sonuçları kaydedildi.

Olgulara ait arşivimizde bulunan formalin tespitli parafine gömülü doku bloklarından hazırlanan 3 mikron kalınlığındaki kesitlere, İHK'sal olarak p-mTOR (p-FRAP clone Ser 2448, dilüsyon 1:20, Santa Cruz), PARP1 (Clone F2, dilüsyon 1:200, Santa Cruz), Sitokeratin 14 (Clone LL001, dilüsyon 1:20, Santa Cruz), Sitokeratin 5/6 (clone D5/16 B4, dilüsyon 1:50, Millipore) antikorları uygulandı.

3.4.2.2. *İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi*

İmmünohistokimyasal boyama yöntemi olarak biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3, 3' diaminabenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana) ve tam otomatik immünohistokimyasal boyama cihazı (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Inc) kullanıldı. Doku kesitleri elektrostatik yüklü lamlara (ISOTERM, ca.75x25mm/ 3x1 inch, positive charged, LOT: 20110601) alınıp, 60°C'de en az iki saat tutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm immünohistokimyasal boyama süreci BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc) tam otomatik immünohistokimyasal boyama cihazında gerçekleştirildi. Cihazda zıt boyaması hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu ve ksilen ile şeffaflandırılması elle; lamel kapatılması aşaması ise otomatik olarak (Dako CoverStainer, CS100-10073) yapılarak işlem sonlandırıldı.

3.4.2.3. İmmünohistokimyasal incelemede pozitif ve negatif kontrol seçimi

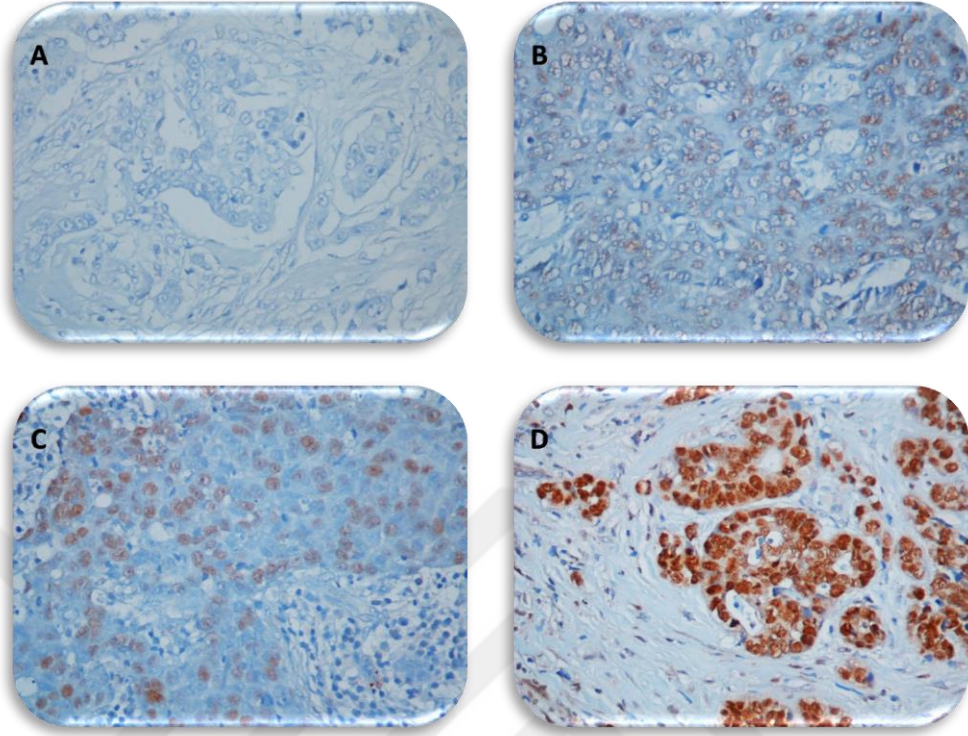
PARP-1 için pozitif kontrol örneği olarak testis dokusu, p-mTOR için pozitif kontrol olarak ise böbrek adenokarsinomu kullanıldı. Sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 antikorlarının her ikisi için de deri ve prostat dokusu pozitif kontrol olarak çalışıldı. Pozitif kontrol için seçilen ancak primer antikorun damlatılmadığı örnekler ise negatif kontrol olarak kabul edildi.

3.4.2.4. İmmünohistokimyasal incelemede PARP1 ve p-mTOR değerlendirme kriterleri

PARP1 için nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Ekspresyonu değerlendirmek için boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesini kullanarak elde edilen çarpımsal bir skora sistemi ("Quiscore method", QS) kullanıldı [68-70] (Tablo 4) (Şekil 5). Bu sisteme göre yüzde skoru ve yoğunluk skoru çarpımı 0-9 arasında ise düşük, 10-18 arasında ise yüksek olarak değerlendirildi.

TABLO 4: PARP1 ekspresyon değerlendirmesinde QS sistemi

Boyanma yüzdesi (%)	Yüzde Skoru	Boyanma yoğunluğu	Yoğunluk Skoru
1-4	1	Boyanma yok	0
5-19	2	Zayıf	1
20-39	3	Orta	2
40-59	4	Güçlü	3
60-79	5		
80-100	6		

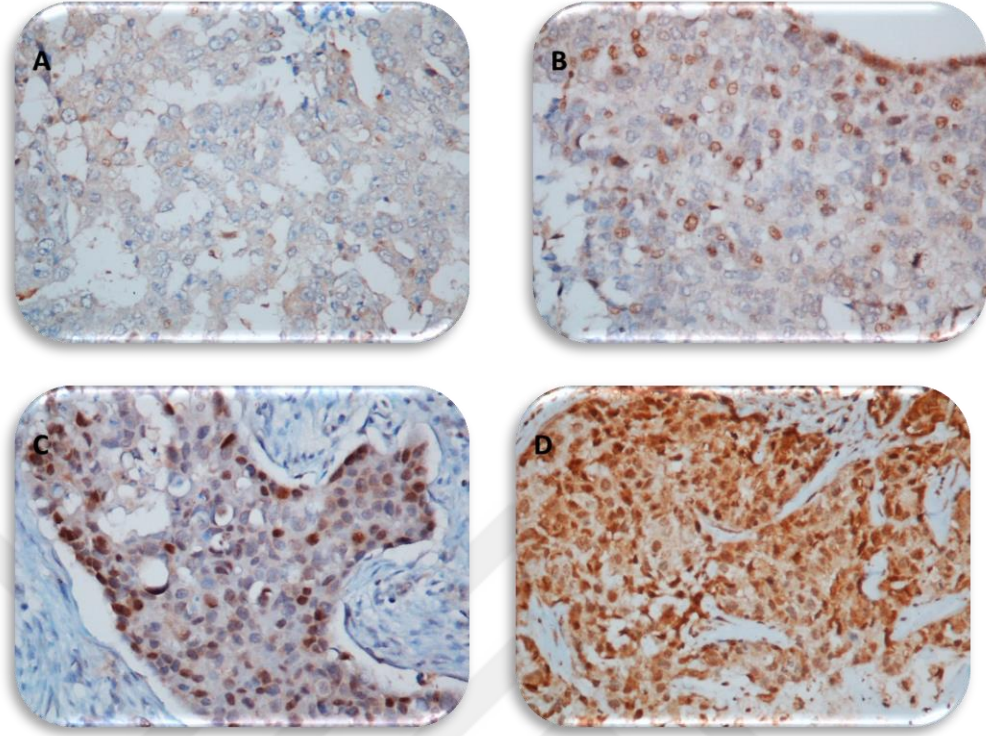


ŞEKİL 5: PARP1 boyanma güçleri (PARP1x400); negatif (A), zayıf pozitiflik (B), orta güçte pozitiflik (C), güçlü pozitiflik (D).

p-mTOR için non-neoplastik dokulardan daha yoğun nükleer ve sitoplazmik boyanma, belirgin boyanma olarak değerlendirildi ve %10'nun altında belirgin boyanma skor 0; %10-50 arası belirgin boyanma skor 1; %50'den fazla belirgin boyanma ise skor 2 olarak sınıflandı (Şekil 6). Skor 1 ve 2 p-mTOR için pozitif boyanma olarak değerlendirildi [71, 72] (Tablo 5).

TABLO 5: p-mTOR ekspresyonu skorum sistemi

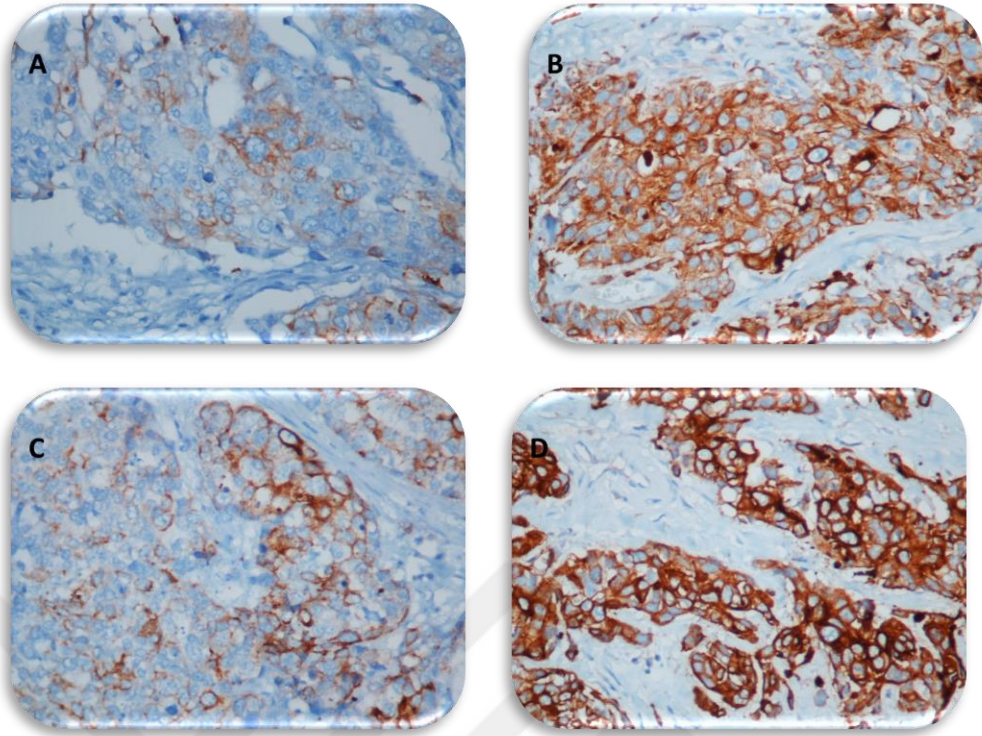
Boyanan hücre yüzdesi (%)	Skor
< % 10	0
% 10-50	1
> % 50	2
Skor 0 → negatif Skor 1-2 → pozitif	



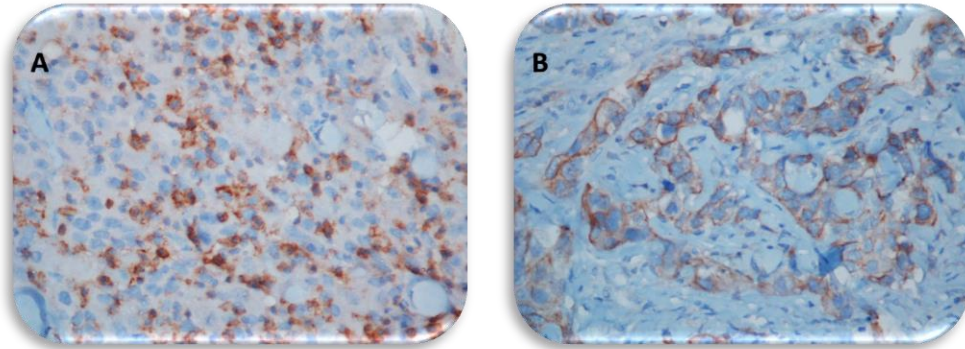
ŞEKİL 6: p-mTOR boyanma yüzdeleri (p-mTORx400): < %10 (A), %10-50 arası (B), >%50 (C, D).

3.4.2.5. Sitokeratin 5/6, sitokeratin 14 ekspresyonunun değerlendirilmesi

Sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 için herhangi zayıf veya güçlü, sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma pozitif olarak kabul edildi [73-75] (Şekil 7-8). Herhangi bir sitokeratin ekspresyonu varlığında olgu bazal benzeri meme karsinomu olarak gruplandırıldı [7].



ŞEKİL 7: Sitokeratin 5/6 ekspresyon paternleri (sitokeratin 5/6x400): sitoplazmik pozitiflik (A), Sitoplazmik ve membranöz pozitiflik (B), membranöz pozitiflik (C), güçlü membranöz pozitiflik (D).



ŞEKİL 8: Sitokeratin 14 ekspresyon paternleri (sitokeratin 14x400): sitoplazmik pozitiflik (A), membranöz pozitiflik (B).

3.4.2.6. P53 ve Ki67 ekspresyonularının değerlendirilmesi

p53 ile hiç boyanma olmaması durumu (%0) ve aşırı ekspresyon bulunması (\geq %50) mutasyon varlığının kabul edildiği grup olarak değerlendirildi [28, 29]. Arada kalan %1-50 arasında boyanma gösteren grup ise p53 mutasyonu açısından negatif kabul edildi.

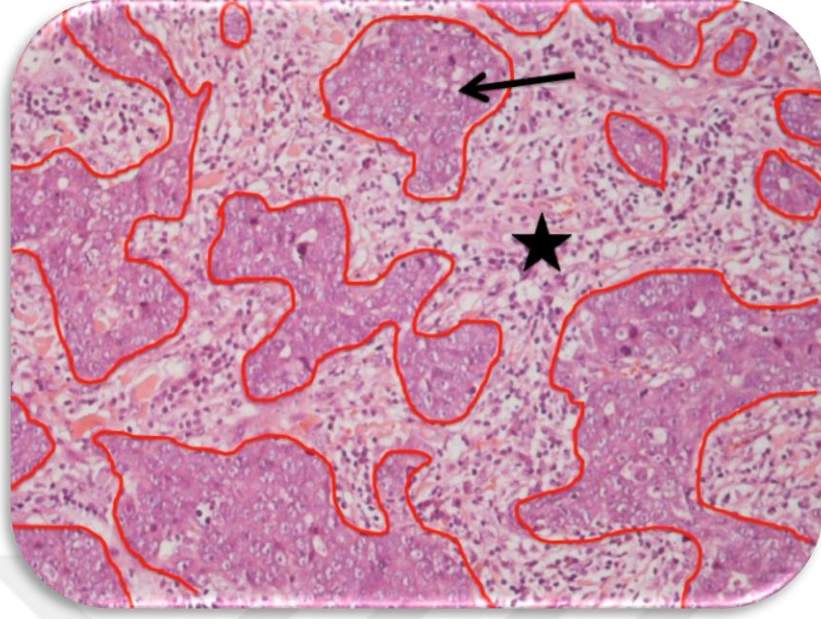
Ki67 proliferasyon indeksi için, nükleer boyanma 1000 hücrede sayılarak yüzde cinsinden değeri verildi.

3.4.3. Tümör infiltre eden lenfositler (TİL)

TİL değerlendirmesi, TİL Çalışma Grubu tarafından 2014 yılında belirlenmiş kriterlere uygun olarak, standart 4-5 µm kalınlığında, hematoksilin-eozin (H&E) boyalı kesitlerde 200-400x'lük büyütme ile yapıldı [76] (Tablo 6).

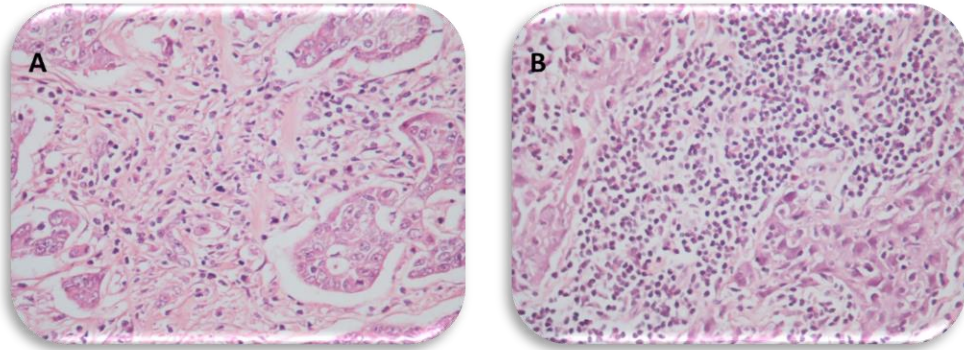
TABLO 6: Tavsiye edilen TİL değerlendirme kriterleri

TİL stromal komponentte araştırılmalı (stromal TİL/ stromal doku) (Şekil 9).
TİL invaziv tümör sınırları içerisinde araştırılmalı.
Tümör sınırları dışında kalan, in situ ve normal doku çevresi alanlar dışlanmalı
Ezilme artefaktı, nekroz, regresif hyalinizasyon, önceki biyopsi sahası dışlanmalı
Mononükleer hücreler (lenfosit, plama hücresi) skorlanmalı; polimorfonükleer lökositler dışlanmalı
Tüm tümör saha ortalaması kullanılmalı; yoğun odaklara sınırlı kalınmamalı.
TİL yüzdesi mümkün olduğunca detaylı verilmeli, aralık verilmekten kaçınılmalı



ŞEKİL 9: Tümör infiltrate eden lenfositleri hesaplamak için şematize edilmiş H&E görüntüsü (H&E x 100); hesaplama sahası (siyah yıldız), tümör adaları sahaya dahil edilmemeli (siyah ok).

Tümör içerisindeki lenfositlerin tümör stromasına oranı alınarak hesaplanan TİL yüzdesi $< \%60$ olanlar lenfosit fakir; $\geq \%60$ olanlar lenfosit zengin olacak şekilde iki gruba ayrılarak incelendi [77] (Şekil 10).



ŞEKİL 10: TİL gruplarının morfolojik görünümü (H&Ex200). Lenfosit fakir tümör örneği (TİL $< \%60$) (A), Lenfosit zengin tümör örneği (TİL $\geq \%60$) (B).

3.5. İstatistiksel analiz

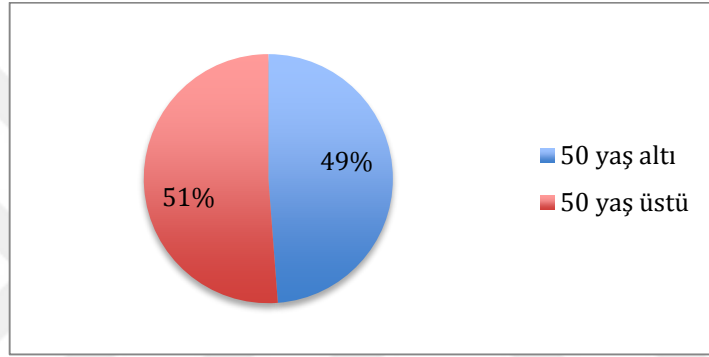
İstatistiksel analiz yöntemleri PC ortamında çalışan SPSS programının 20.0 sürümü kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda "Kruskall-Wallis" testi, "Mann-Whitney" testi, "Person Ki-Kare" testi, Fisher's Exact Testi ve Kaplan-Merier analizi kullanıldı. Tüm analizler için p değeri 0,05'in altında olanlar anlamlı kabul edildi.



4. Bulgular

4.1. Cinsiyet-Yaş Dağılımı, Lokalizasyon ve Takip Süresi

Olguların tamamı kadınlardan oluşmaktadır. Olgularımızın genel yaş ortalaması $51,2 \pm 12,2$ (min:27, max:81) olarak bulundu. Hastaların yaş dağılımı incelendiğinde 42 olgunun (%51,2) 50 yaş üstü, 40 olgunun da (%48,8) 50 yaş altında olduğu görüldü (Grafik 1).



GRAFİK 1:Olguların genel yaş dağılımı

Olgular içerisindeki bazal benzeri grubun yaş ortalaması $50,9 \pm 12,6$ iken bazal benzeri olmayan grubun yaş ortalaması $52,4 \pm 11,1$ olarak bulundu ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,618$).

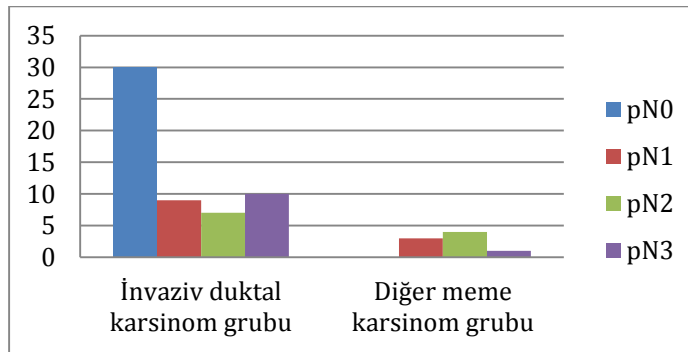
PARP1 ekspresyonu düşük olarak saptanan hastaların yaş ortalaması $52,5 \pm 11,8$ iken yüksek PARP1 ekspresyonu saptanan hastaların yaş ortalamasının $46,1 \pm 12,9$ olduğu görüldü ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlısız saptandı ($p=0,067$). p-mTOR pozitif gruptaki yaş ortalaması $52,5 \pm 30,8$ iken; p-mTOR negatif grupta ortalama $49,4 \pm 30,4$ olarak izlendi ($p=0,197$). Ayrıca 50 yaş üstü hasta grubunda p-mTOR ekspresyon sonucu pozitif değerlendirilen hastalar %69 iken aynı yaş grubunda p-mTOR sonucu negatif değerlendirilen hastaların oranı %31 olarak bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,072$).

Vakaların 35 tanesi sağ meme, 47 vaka ise sol meme yerleşimlidir. Ayrıca 4 vakada multifokal tümör izlendi.

Tüm olguların ortalama takip süresi en az 1 ay, en çok 120 ay (ort. 50,9)'dır. Seri içinde 3 hastaya ait hiçbir takip kaydı bulunamadı.

4.2. Tümör Tipi

Morfolojik olarak vakaların %86,6'sına (n=71) invaziv duktal karsinom tanısı verilmiş olup, %13,4 (n=11)'ü farklı morfolojik tipleri içerdiği için 'diğer meme karsinomları' tanı grubu içinde incelendi. Diğer meme karsinomları tanı grubu içerisinde; 5 adet invaziv mikropapiller karsinom, 2 adet İDK+İLK, birer adet pleomorfik İLK, mikst müsinöz karsinom, medüller karsinom, papiller karsinom bulunmaktadır. İDK tanısı alan vakaların %54,5'inde lenf nodu metastazı görüldü, diğer meme karsinomları tanı grubunun ise tamamında (%100, n=8) lenf nodu metastazı saptandı. Morfolojik tipler arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,018). Benzer şekilde morfolojik tipler ile pN arasındaki ilişki de anlamlı bulundu (p=0,010). İDK tanısı alan olguların %45,5'i (n=30) pN0, %28,8'i (n=19) pN1, %10,6'sı (n=7) pN2, %15,2 (n=10) pN3 saptandı. Diğer meme karsinomu olgularının %37,5'i (n=3) pN1, %50'si (n=4) pN2, %12,5'i (n=1) pN3 olarak bulundu (Grafik 2).



GRAFİK 2: İnvaziv duktal karsinom grubu ve diğer morfolojik meme karsinomlarının pN evresine göre dağılımı

4.3. Tümör Boyutu

Tümör boyutu toplamda 80 vakada değerlendirilebildi. İki vakaya ait tümör boyutuna ulaşılamadı. Ortalama tümör boyutu $30,6\pm 17,9$ (min:7, max:110) mm'dir. Bazal benzeri grupta ortalama tümör boyutu $31,6\pm 18,9$ mm iken bazal benzeri olmayan grupta $27,2\pm 14,2$ olarak bulundu ($p= 0,435$).

Hastaların yaşı ile tümör boyutu arasında ters orantı olduğu saptandı (korelasyon katsayısı=-240, $p=0,032$). Tümör boyutu ile hastadan diseke edilen toplam lenf nodülü sayısı doğru orantılı bulundu (korelasyon katsayısı=283), $p=0,015$). Ayrıca, tümör boyutu arttıkça Ki67 proliferasyon indeksinin de arttığı saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (korelasyon katsayısı=289, $p=0,009$).

Nüks ve/veya metastaz, pT4 kabul edilen 3 vakanın tamamında izlendi. pT1 olguların %36'sında ($n=9$) görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,036$).

4.4. Lenfovasküler invazyon (LVİ)

Genel olarak, 56 (%68,3) vakada LVİ izlendi, 26 vakada (%31,7) LVİ saptanmadı. LVİ görülen vakaların %83,9'u bazal benzeri grupta, %16,1'i bazal benzeri olmayan grupta yer aldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,085$).

LVİ görülen 56 vakanın %72'sinde lenf nodu metastazı (LNM) saptandı, %28'inde LNM görülmedi. LNM saptanan hastaların %81,8'inde LVİ mevcut iken, %18,2'sinde LVİ görülmedi. Bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,002$). Benzer ilişki LVİ ve pN arasında da saptandı. Buna göre pN0 vakalarda %46,7; pN1 olgularda %72,7; pN2 olgularda %81,8 oranında LVİ saptanırken, pN3 olgularda LVİ %100 olarak bulundu ve sonucun istatistiksel

olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,006$). Benzer şekilde, evre I vakaların %87,7'sinde ($n=7$) LVI görülemedi, evre IV vakaların tamamında ($n=4$) LVI saptandı. Evre ve LVI arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).

4.5. Lenf nodu metastazı

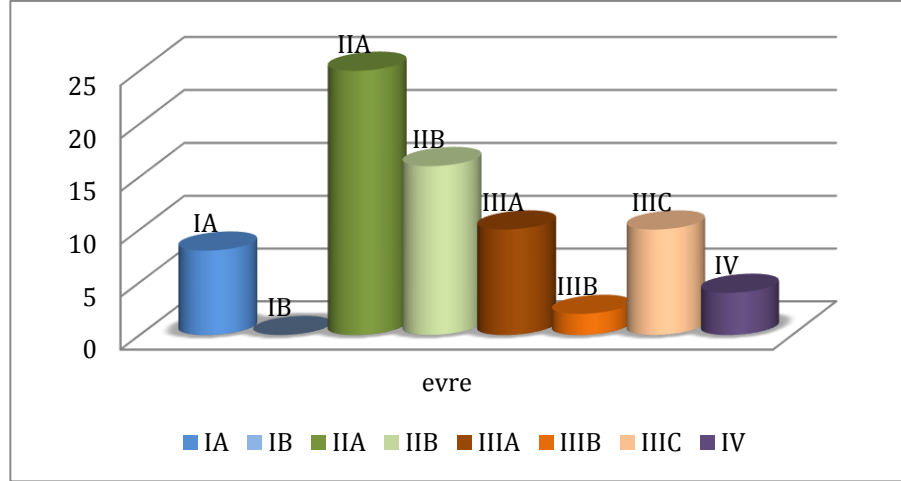
Klinik hasta dosyası, radyoloji ve patoloji raporları incelenen toplam 8 vakanın (%9,8) lenf nodu durumu hakkında bilgiye ulaşamadı. Vakalardan ortalama 15,4 (min=0, max=41) lenf nodülü diseke edildi.

Lenf nodülü durumuna ulaşılabilen 74 hastanın 44'ünde (%53,7) LNM mevcut olup, 30 vakada (%36,6) lenf nodüllerinde metastaz görülmedi. En büyük metastatik lenf nodülü boyutu ortalama 20,6 mm (min:1mm, max:55mm)'dir. pN evrelemesi pN0'da 30 vaka (%36,6), pN1'de 22 vaka (%26,8), pN2'de 11 vaka (%13,4) ve pN3'de 11 vaka (13,4) olacak şekilde dağılım göstermekte idi. LNM olan 44 hastanın 19'unda ekstrakapsüler yayılım izlendi.

Metastatik lenf nodülü sayısı ve metastatik lenf nodülü çapı arasındaki ilişki istatistiksel olarak doğru orantılı bulundu (korelasyon katsayısı=519, $p=0,001$).

4.6. Evre ve MBRD

Evresi hesaplanabilen 75 olgu; evre I'de 8 olgu, evre II'de 41 olgu, evre III'de 22 olgu ve evre IV'de 4 olgu olacak şekilde dağılım gösterdi. Evrelerin genel dağılımları Grafik 3'de verildi.



GRAFİK 3: Vakaların evrelere göre dağılımı

Evre I’de %28,6 nüks ve/veya metastaz görülürken, evre II’de %22,5, evre III’de %45,5, evre IV’de %100 oranında görüldü ve evre ile nüks/metastaz varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,009$). Benzer şekilde, ölüm bilgisine ulaşılabilen 6 vakanın 5 tanesinin (%83,3) evre III, 1 vakanın (%16,7) ise evre II olduğu görüldü ($p=0,031$).

Tüm tümörler MBRD’e göre yeniden değerlendirildi. Sonuç olarak 38 olgu MBRD II, 44 olgu MBRD III olarak gruplandı. Vakalar içerisinde MBRD I olgu bulunmamaktadır.

4.7. Ki67 proliferasyon indeksi ve p53

Ki67 proliferasyon indeksi ortalama $51,6 \pm 24,5$ olarak saptandı. Bazal benzeri grupta Ki67 proliferasyon indeksi ortalama %43,9 iken bazal benzeri olmayan grupta ortalama %32,7 olarak bulundu. Bazal benzeri grubun Ki67 proliferasyon indeksi daha yüksek olma eğiliminde görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,075$).

P53 mutasyonu açısından negatif kabul edilen 8 olgu (%9,8) mevcut iken pozitif kabul edilen 74 (%90,2) olgu saptandı. Nüks/metastaz saptanan 27

olgunun tamamının p53 mutasyonu pozitif kabul edilen grup içerisinde yer aldığı görüldü ($p=0,089$). Benzer şekilde ölüm bilgisine ulaşılan 8 vakanın tamamının p53 mutasyonu açısından pozitif kabul edilen grup içerisinde yer aldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p=0,1$).

Bazal benzeri grupta p53 mutasyonu açısından pozitiflik %92,2 görülürken bazal benzeri olmayan grupta %83,3 oranında görüldü. İstatistiksel olarak p53 ile alt gruplar arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p=0,364$).

p53 ile PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru arasında istatistiksel olarak doğru orantı bulundu (korelasyon katsayısı=224, $p=0,043$) ancak sonuç PARP1 ekspresyonu ile p53 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,183$). Diğer İHK'sal belirteçimiz olan p-mTOR ile p53 pozitifliği arasında da anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,713$).

4.8. Tümör infiltre eden lenfositler (TİL)

Vakaların ortalama TİL değeri $31,3\pm 26,2$ olup en düşük %1, en yüksek %90 olarak değerlendirildi. TİL skoru $< \%60$ olan 61 olgu (%74,4), TİL skoru $\geq \%60$ olan 21 olgu (%25,6) saptandı. Bazal benzeri gruptaki 15 olgu (%23,4) ile bazal benzeri olmayan grupta yer alan 6 olgu (%33,3) lenfositten zengin TİL grubunda yer aldı. Alt gruplar ile TİL grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,541$).

Lenfosit fakir olan 61 olgunun 46'sında (%75,4) LVİ görüldü. Lenfositten zengin olan 21 olgunun ise 11'inde (%52,4) LVİ görülmedi. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,029$). Lenfosit fakir grupta LNM varlığı %62,5 ($n=35$) iken, lenfosit zengin grupta %50 ($n=9$) olduğu görüldü. Bu oran istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p=0,413$).

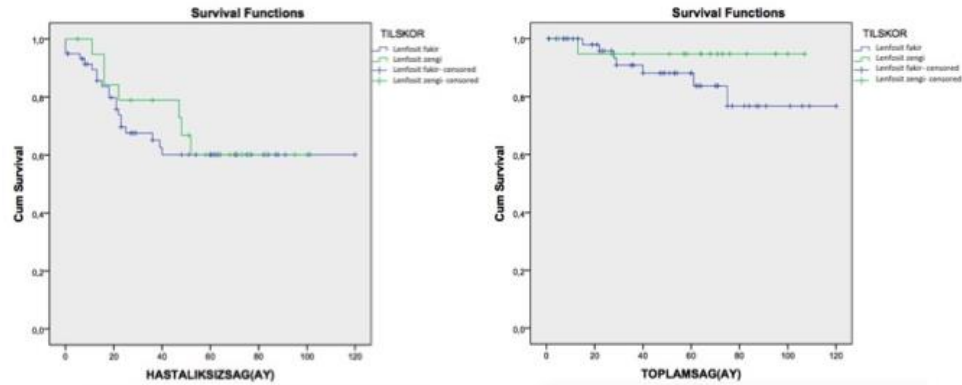
Tümör diferansiyasyonunu derecesi (T) 2 olan tümörlerde ortalama TİL % 21 bulundu, T3 tümörlerde bu ortalamanın %33,7 olduğu görüldü. Tümör

diferansiasyonu azaldıkça TİL yüzdesi artma eğiliminde olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,094$).

Tümörü infiltre eden lenfositler ile proliferasyon indeksi arasındaki ilişki araştırıldığında, lenfositten fakir olguların Ki67 proliferasyon indeksi %48,2, lenfositten zengin olguların Ki67 proliferasyon indeksi %61,4 olarak bulundu. Bu analize göre, lenfositten zengin grupta proliferasyon indeksi anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,045$).

Lenfositten fakir grubun hastaliksız sağkalımları Kaplan-Merier analizine göre $79,6\pm 7,1$ ay olup, lenfositten zengin grupta bu ortalamamın $72,7\pm 8,2$ ay olduğu görüldü. Sonuç olarak hastaliksız sağkalım ile lenfositten fakir ve lenfositten zengin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,696$).

Lenfositten fakir grubun genel sağ kalımları Kaplan-Merier analizine göre $103,2\pm 5,7$ ay, lenfositten zengin grupta ise $102\pm 4,8$ ay olarak saptandı. Gruplar arasındaki genel sağkalım değerlendirmesi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,266$) (Grafik 4).



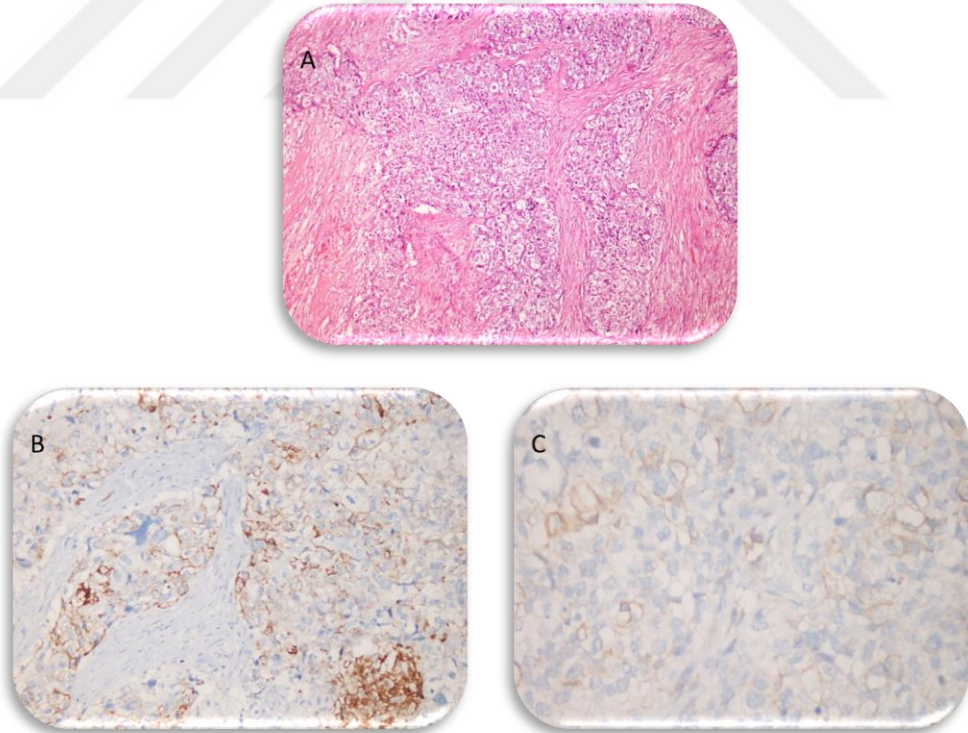
GRAFİK 4: Lenfosit fakir ve zengin tümörlerin hastaliksız ve genel sağkalım eğrileri

4.9. Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14 ekspresyonu

Sitokeratin 5/6 ekspresyonu 59 (%72) olguda saptanırken, 23 (%28) olguda ekspresyon izlenmedi. Sitokeratin 14 ise 31 (%37,8) olguda pozitif bulunurken, 51 olguda (%62,2) negatif olarak değerlendirildi.

Sitokeratin 5/6 pozitif iken sitokeratin 14 negatif olan 33 olgu saptandı, sitokeratin 14 pozitif iken sitokeratin 5/6 negatif 5 olgu olduğu görüldü. Her iki bazal sitokeratinin de pozitif olduğu 26 vaka tespit edildi (Şekil 11).

Sitokeratinlerden herhangi bir tanesinin pozitifliği hesaplanarak oluşturulan bazal benzeri gruptaki vaka sayısı 64 (%78) olarak belirlendi. Hiçbir sitokeratin ekspresyonu göstermeyen 18 (%22) vaka bazal benzeri olmayan grup başlığı altında toplandı.

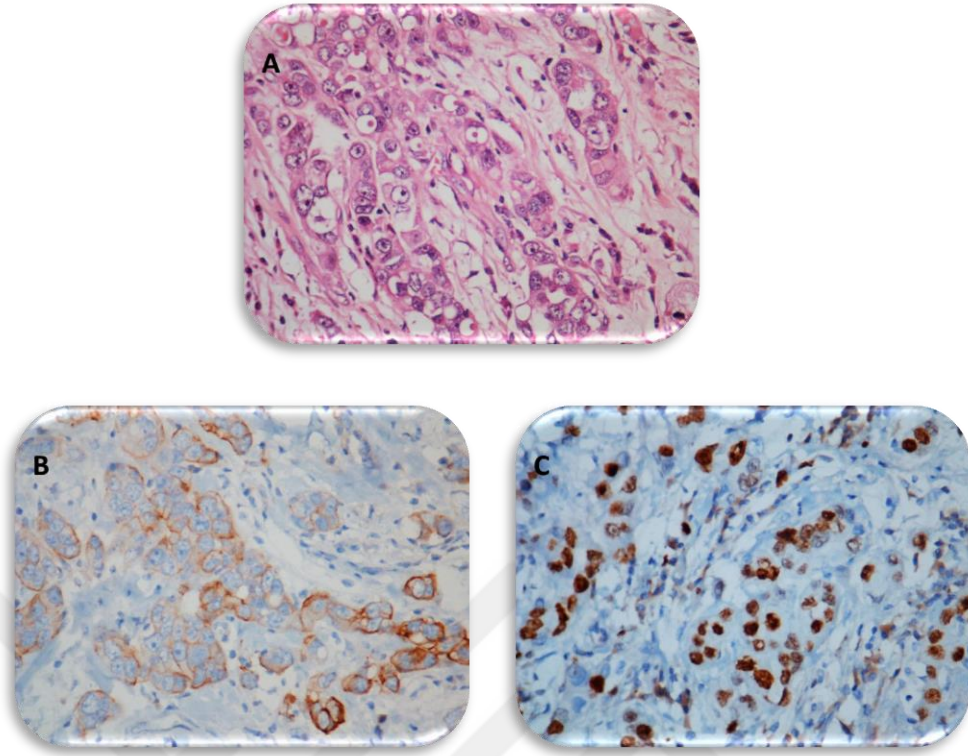


ŞEKİL 11: Bazal benzeri grupta sınıflanan vakaya ait H&E görüntüsü (A, H&Ex200). Aynı vakaya ait sitokeratin pozitiflikleri (B, Sitokeratin 5/6 x200; C, Sitokeratin 14x400)

Elli yaş ve altında sitokeratin 5/6 pozitifliği % 77,5 oranında , sitokeratin 14 pozitifliği %35 oranında görüldü. Sitokeratin 5/6 ile bu yaş grubunda yüksek oranda pozitiflik görülmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,330).

Sitokeratin 5/6 negatif olguların Ki67 proliferasyon indeksi ortalaması %41,4; pozitif olguların ortalaması ise %55,5 olarak hesaplandı. Sitokeratin 5/6 pozitif grupta proliferasyon indeksinin daha yüksek olduğu sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,035) (Şekil 12). Ancak benzer ilişki sitokeratin 14 ekspresyonu ve Ki67 proliferasyon indeksi arasında bulunmadı (p=0,765). Aynı şekilde bazal benzeri grupta Ki67 ortalaması %54,3; bazal benzeri olmayan grupta %41,8 olarak hesaplandı. Bazal benzeri grupta Ki67 proliferasyon indeksi daha yüksek görünmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,075).

Nükleer derece (N) ile sitokeratin 5/6 ekspresyonu arasındaki ilişki anlamlı bulundu (p=0,013) (Şekil 12). Bu analize göre sitokeratin 5/6 negatif olan olguların %65,2'si N2; sitokeratin 5/6 ekspresyonu olan olguların %66,1'inde N3 saptandı. Benzer şekilde alt gruplar (bazal benzeri ve bazal benzeri olmayan grup) ile nükleer derece arasında da istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi (p=0,030). Bazal benzeri grupta %64,1 oranında N3 olan tümörler görülürken, bazal benzeri olmayan grupta bu oran %33,3 olup, N2 tümörlerin %66,7'sini oluşturduğu izlendi. Farklı olarak sitokeratin 14 ekspresyonu ile nükleer derece arasında anlamlı bir ilişki görülmedi (p=0,361).



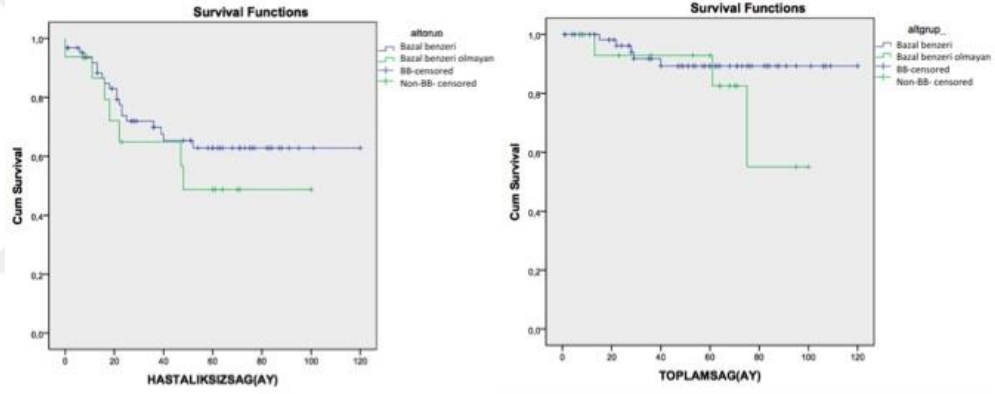
ŞEKİL 12: Yüksek nükleer dereceli vakaya ait genel görünüm (A, H&Ex400), aynı vakanın sitokeratin 5/6 pozitifliği (B, sitokeratin 5/6x400) ve yüksek Ki67 proliferasyon indeksi (C, Ki67x400)

Bazal benzeri grupta %73,4 (n=47) oranında LVİ mevcut iken, %26,6 (n=17) olguda LVİ görülmedi. Bazal benzeri olmayan grupta LVİ görülen ve görülmeyen olgular birbirine eşitti (n=9, n=9). Ancak aradaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,085).

Sitokeratin 5/6 pozitif vakaların öngörülen hastaliksız ve genel sağkalımları sırasıyla 79,9 ve 111,1 ay; sitokeratin 5/6 negatif vakaların ortalama hastaliksız ve genel sağkalımları sırasıyla 71,1 ve 85,5 ay olarak bulundu. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,822, p=0,232). Sitokeratin 14 ve alt gruplar (Grafik 5) için yapılan analizler de benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 7).

TABLO 7: Sitokeratin ekspresyonları ve alt grupların Kaplan-Merier sağ kalım analizi

	Hastaliksiz sağkalım		Toplam sağkalım	
Sitokeratin 5/6 -	71,1±8,8	p=0,822	85,5±6,5	p=0,232
Sitokeratin 5/6 +	79,9±7		111,1±4,2	
Sitokeratin 14 -	65,5±6,2	p=0,277	95,3±4,8	p=0,921
Sitokeratin 14 +	89,5±9		108,1±6,4	
Bazal benzeri grup	83,4±6,5	p=0,373	110,1±4,1	p=0,266
Non-bazal benzeri grup	61,2±10,6		82,8±8,2	



GRAFİK 5: Alt grupların öngörülen hastaliksiz ve genel sağkalım eğrileri

4.10. PARP1 ekspresyonu

Olgularımızın %14,6'sı (n=12) PARP1 ile güçlü pozitiflik, %56,1'i (n=46) zayıf-orta kuvvette pozitiflik gösterirken, 24 olguda (%29,3) PARP1 ile boyanma görülmedi. PARP1 boyanma yüzdesi ortalama %21,3 olarak bulundu. Sonuç olarak vakalar PARP1 ekspresyonlarına göre iki gruba ayrıldı. Buna göre 66 (%80,5) vaka düşük PARP1 ekspresyonu sergiledi, 16 (%19,5) vaka ise yüksek PARP1 ekspresyonu gösterdi.

Kuvvetli PARP1 boyanma paterni gösteren vakaların yaş ortalaması $43,25 \pm 11,7$ bulundu ve genel yaş ortalamasından ($51,2 \pm 12,2$) belirgin olarak daha düşük olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,063$). Benzer sonuç PARP1 sonucu ile yaş arasında da görüldü. Buna göre yüksek PARP1 ekspresyonu gösteren vakaların yaş ortalaması $46,1 \pm 12,9$ olarak saptandı. Bu değer de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,067$).

Diğer meme karsinomu tanı grubu içerisindeki vakaların %18,2'sinde (n=2) PARP1 ile boyanma görülmezken, % 81,8'inde (n=9) zayıf nükleer boyanma izlendi, orta ve güçlü pozitif boyanma görülmedi. İDK tanısı almış vakalar içerisinde ise 22 vakada (%31) PARP1 negatif, 27 vakada (%38) zayıf pozitif olarak bulundu. Toplam 22 vakada (%31) da orta ve güçlü boyanma elde edildi. Sonuç olarak İDK tanısı alan olgularda her tip PARP1 boyanma yoğunluğu izlenir iken, diğer tanı grubunda orta ve güçlü PARP1 boyanması izlenmedi. Tanı ile PARP1 boyanma gücü arasındaki bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,044$). Ancak bu ilişki nihai PARP1 ekspresyonu ve tanı arasında saptanmadı ($p=0,111$).

pT1 tümörlerin PARP1 ile boyanma yüzdesi ortalama %21,4 bulundu. pT2, pT3 ve pT4 tümörlerin ortalamaları sırasıyla: %17,3; %47; %50 bulundu. Tüm vakalardaki PARP1 boyanma yüzdesiyle karşılaştırıldığında, pT artıkcça PARP1 yüzdesi artmakla birlikte aradaki ilişki anlamlı bulunmadı ($p=0,080$).

PARP1 negatif olguların %66,7'si (n=16) MBRD 2 olan vakalar iken, PARP1 güçlü pozitif olguların %75'i (n=9) MBRD 3 olan vakalar olduğu izlendi. MBRD derecesi ile PARP1 boyanma gücünün arasındaki bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı saptanmakla birlikte (p=0,071), PARP1 boyanma yüzdesi ve PARP1 skoru ile MBRD arasında da istatistiksel olarak anlam bulundu (p=0,033 / p= 0,035) (Tablo 8).

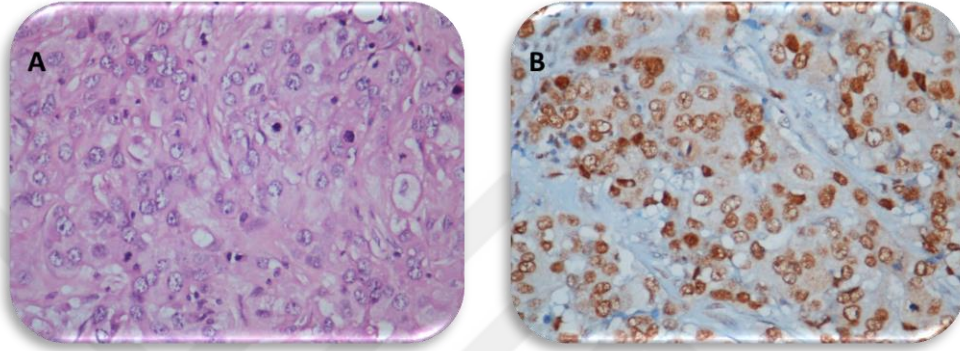
TABLO 8: MBRD ile PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ortalamaları

MBRD	PARP1 boyanma yüzdesi	PARP1 boyanma skoru
2	15,74±23,4	2,97±4,3
3	26,16±30,1	4,9±5,7
	P=0,033	P=0,035

PARP1 boyanma skoru ile nükleer derece arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulundu (p=0,043), buna göre N2 vakaların PARP1 skoru ortalama 2,7 iken, N3 olguların 4,9 olduğu görüldü. PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ile mitoz derecesi (M) arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi (p<0,001) (Tablo 9, Şekil 13). Elde edilen sonuç üstünden yapılan Mann-Whitney testi analizlerine göre M1 grubundaki vakaların ortalamasının diğer gruplardan anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü (p<0,001). Buna ek olarak, sonuç PARP1 ekspresyonu yüksek olarak değerlendirilen 16 vakanın 10 tanesi (%62,5) mitoz derecesi (M) 3; 5 tanesi (%31,3) M2; 1 tanesi ise (%6,3) M1 olarak saptandı. Yüksek PARP1 ekspresyonu ve artmış mitoz derecesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu (p=0,044).

TABLO 9: PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ile M derecesi ilişkisi

	M1 (n=17)	M2 (n=35)	M3 (n=30)	
PARP1 yüzdesi	%7	%19,3	%31,8	P<0,001
PARP1 skoru	1,5	3,4	6,1	P<0,001



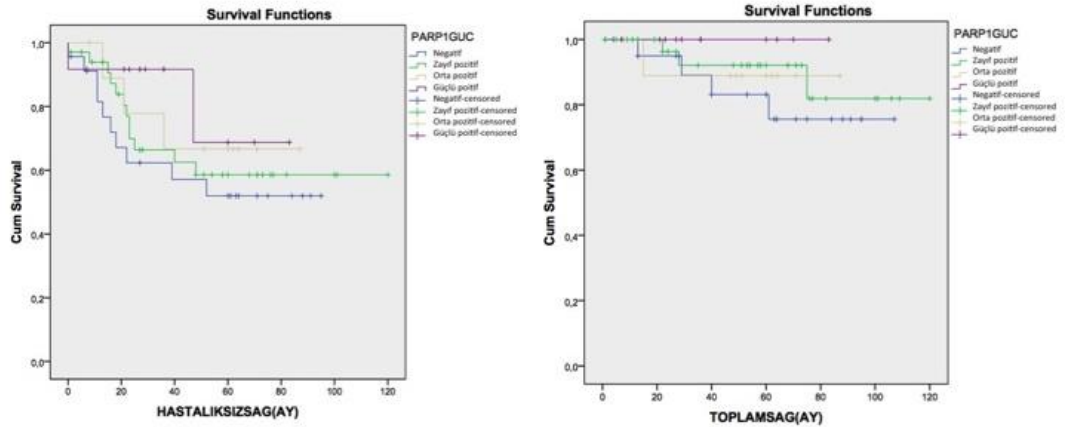
ŞEKİL 13: Yüksek nükleer dereceye sahip vaka ve PARP1 boyanması: 1BBA'nındaki 3 mitotik figür görülen, yüksek nükleer dereceli vakaya ait görünüm (A, H&Ex400), aynı vakaya ait PARP1 boyanması (B, PARP1x400)

PARP1 ekspresyonu düşük olan vakaların % 75,8'i (n=50) sitokeratin 5/6 ile pozitif saptandı, PARP1 ekspresyonu yüksek olan vakaların %56,3'ünde (n=9) sitokeratin 5/6 pozitif bulundu. PARP1 ekspresyonu düşük olan vakalarda sitokeratin 5/6 pozitifliği daha fazla bulunmakla birlikte anlamlı değildi (p=0,133). Farklı olarak, PARP1 ekspresyonu yüksek olan 16 olgudan 9'unda (%56,3) sitokeratin 14 pozitifken, PARP1 ekspresyonu düşük olan 51 olgunun 22'si (%33,3) sitokeratin 14 pozitif bulundu. PARP1 ekspresyonu yüksek olan vakalarda sitokeratin 14 pozitifliği daha çok görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,149).

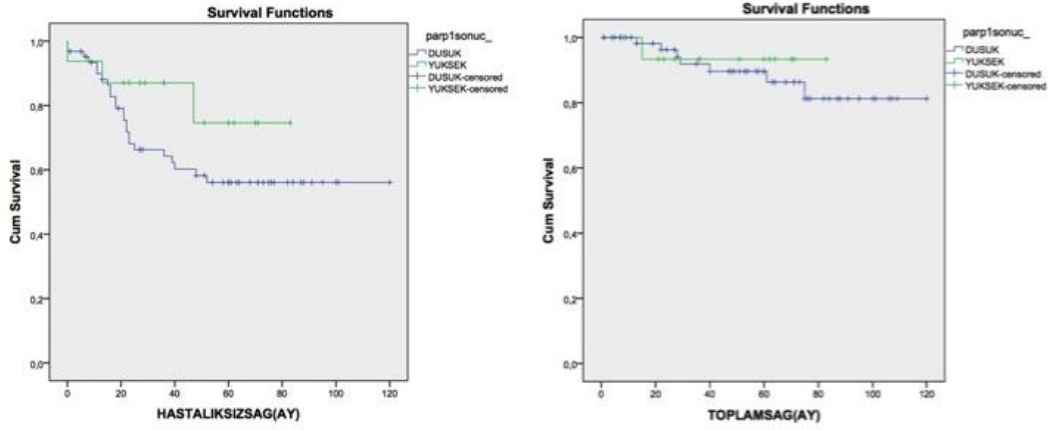
Bazal benzeri grupta yer alan 64 vakanın 53 tanesi (%82,8) ve bazal benzeri olmayan grupta yer alan 18 olgunun 13 tanesinde (%72,2) PARP1 ekspresyonu düşük bulundu ve istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p=0,327).

PARP1 boyanması göstermeyen vakalarda tahmini hastaliksız sağkalım 58,7 ay iken PARP1 ile zayıf boyanma olduğunda ortalama 79,6 ay bulundu; orta ve güçlü PARP1 boyanmalarında ise 65,7-67,8 ay olarak bulundu. PARP1 boyanma şiddeti ile hastaliksız sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,216$) (Grafik 6). Benzer şekilde genel sağkalım ile de anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü ($p=0,209$) (Grafik 6).

Sonuç olarak PARP1 ekspresyonu düşük bulunan vakaların öngörülen ortalama hastaliksız sağkalımı 76,9 ay olurken, PARP1 ekspresyonu yüksek olan grubun ortalaması 68,6 ay olarak bulundu ($p=0,205$) (Grafik 7). Öngörülen genel sağkalım ortalamalarına baktığımız da ise sırasıyla 106,1 ay ve 78,4 ay olduğu görüldü ($p=0,706$) (Grafik 7). Tüm bu verilere göre PARP1 ekspresyonu yüksek grupta sağkalım ortalamaları daha kısa beklenmekle birlikte istatistiksel olarak anlam bulunmadı.



GRAFİK 6: PARP1 boyanma gücü ile öngörülen hastaliksız ve genel sağkalım eğrileri



GRAFİK 7: PARP1 ekspresyonu ile öngörülen hastaliksız ve genel sağkalım eğrileri

4.11. p-mTOR ekspresyonu

p-mTOR boyanması 2 olgu (%2,4)'da görülmedi, 80 olguda en az %1 boyanma görüldü. Tüm vakaların p-mTOR boyanma yüzdesi ortalama %25,3 bulundu, en düşük %0, en yüksek %95 olarak değerlendirildi. p-mTOR boyanması <%10 olan 34 olgu (tüm vakaların %41,5'i), sonuç p-mTOR ekspresyonu açısından negatif kabul edildi. Boyanan hücre oranı %10-50 arasında olan 31 olgu (%37,8) ve oranı >%50 olan 17 olgu (%20,7) saptandı, bu hastalar da p-mTOR ekspresyonu pozitif vakalar (toplam 48 olgu, %58,5) olarak değerlendirildi.

Elli yaş üstü grupta p-mTOR boyanması ortalama %29,4; elli yaş ve altı grubunda ortalama %21 bulundu. Boyanma yüzdeleri açısından iki yaş grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,09$). Ayrıca elli yaş üstü hasta grubunda 29 tümörde (%69) p-mTOR sonucu pozitif iken, elli ve altı yaş grubunda 19 tümörde (%47,5) p-mTOR pozitif olarak değerlendirildi. İleri yaştaki hasta grubunda p-mTOR'un pozitifliği daha fazla saptanmakla birlikte anlamlı bulunmadı ($p=0,072$).

İDK tanısı almış 71 olgunun p-mTOR boyanması ortalama %27,3; diğer meme karsinom tanı grubundaki 11 olgunun ortalama değeri %12 bulundu. İDK olgularında p-mTOR boyanması daha yüksek oranlarda görülmekle birlikte anlamlı bir sonuç elde edilmedi ($p=0,065$).

LVI saptanan olgularda p-mTOR %21,9 oranında boyanma gösterirken, LVI bulunmayan olgularda ortalama %32,5 oranında görüldü. Buna göre p-mTOR boyanma yüzdesi LVI bulunmayan olgularda daha yüksek oranlarda saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,058$).

Lenf nodu metastazı mevcut olgularda p-mTOR boyanma yüzdesi ortalama % 20,4 iken lenf nodu metastazı bulunmayan olgularda %34,9 olarak saptandı. Lenf nodu metastazında p-mTOR boyanma yüzdesinin azalması istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0,015$). Ayrıca p-mTOR yüzdesi arttıkça metastatik lenf nodülü sayısında azalma olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,021$).

pN0 olgularda p-mTOR boyanma yüzdesi ortalama %34,9; pN1 olgularda %24,3; pN2 olgularda % 14,9; pN3 olgularda ise % 18,3 olarak bulundu, ancak bu veriler anlamlı değildi ($p=0,093$).

P-mTOR sonucu ile lenf nodu metastazı, LVI ve pN arasında ilişki saptanmadı ($p=0,153/p=0,231/p=0,456$).

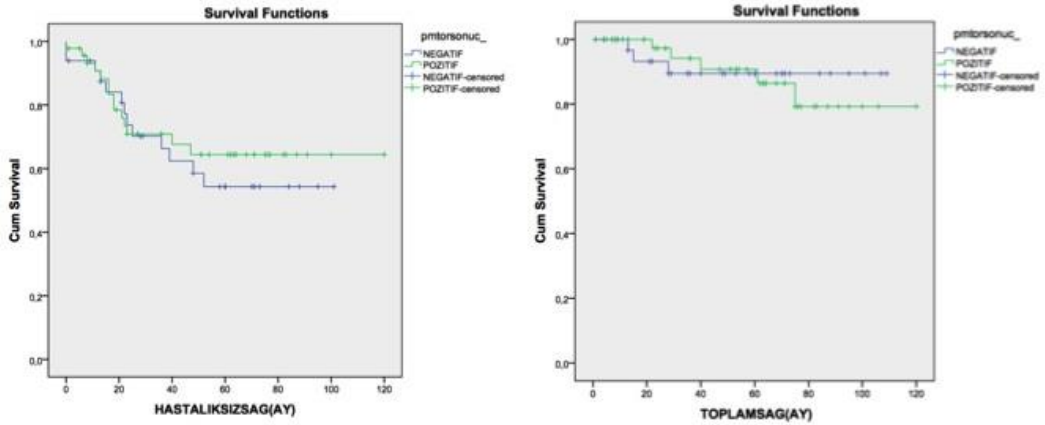
Sitokeratin 5/6 pozitif olan 59 olgunun 33'ünde (%55,9), sitokeratin 5/6 negatif olan 23 olgunun 15'inde (%65,2) p-mTOR pozitif saptanırken ($p=0,468$); sitokeratin 14 pozitif olan 31 olgunun 17'sinde (%54,8); sitokeratin 14 negatif 51 olgunun 31'inde (%60,8) p-mTOR pozitif saptandı ($p=0,648$). Her iki sitokeratin ve p-mTOR arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Bazal benzeri grupta 64 olgunun 37'si (%57,8) ve bazal benzeri olmayan grupta yer alan 18 olgunun 11 tanesi (%61,1) p-mTOR pozitif bulundu. İki alt grup arasında istatistiksel olarak p-mTOR ekspresyonu açısından fark bulunmadı ($p=1,000$).

p-mTOR negatif olguların %82,4'ünde ve p-mTOR pozitif olguların %79,2'sinde PARP1 ekspresyonu düşük bulundu, iki İHK inceleme arasında anlamlı ilişki bulunmadı (p=0,784).

p-mTOR boyanması <%10 olan olguların öngörülen hastaliksız ortalama sağkalımları 66,2 ay; boyanma oranı %10-50 arası olguların 69,2 ay; >%50'den fazla boyanma görülen olgularda ise 80,9 ay olarak bulundu. Aynı grupların öngörülen genel sağkalımlarının da sırasıyla 99,5 ay, 95,6 ay ve 101,9 ay olduğu görüldü. Her iki sağkalım analizi de p-mTOR boyanma yüzdesi ile anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,380/p=0,633).

Öngörülen hastaliksız sağkalım ortalamaları p-mTOR negatif grup için 66,2 ay, pozitif grup için 84,3 ay olarak bulundu; bu gruplar için öngörülen genel sağkalımlar sırasıyla 99,5 ay ve 106 ay olarak saptandı. Sonuç olarak p-mTOR negatif ve pozitif hastaların hastaliksız ve genel sağkalımları arasında da anlamlı ilişki görülmedi (p=0,575/p=0,871) (Grafik 8).



GRAFİK 8: p-mTOR ekspresyonu ile öngörülen hastaliksız ve genel sağkalım eğrileri

TABLO 10: PARP1, p-mTOR, sitokeratin 5/6, sitokeratin 14 ekspresyonu, alt gruplar ve tümör infiltrate eden lenfositlerin Kaplan-Merier analizine göre öngörülen ortalama hastalıksız ve genel sağkalımları

	Hastalıksız sağkalım (ay)			Genel sağkalım (ay)		
	Ortalama	std sapma	p	Ortalama	std sapma	p
PARP1 sonuc						
düşük	76,9	6,7	0,205	106,1	4,8	0,706
yüksek	68,6	7,3		78,4	4,3	
p-mTOR sonuc						
negatif	66,2	7,3	0,575	99,5	5,1	0,871
pozitif	84,3	7,7		106	5,7	
Sitokeratin 5/6						
negatif	71,1	8,8	0,822	85,1	6,5	0,232
pozitif	79,9	7		111,1	4,2	
Sitokeratin 14						
negatif	65,5	6,2	0,277	95,3	4,8	0,921
pozitif	89,5	9		108,1	6,4	
Alt grup						
Bazal benzeri	83,4	6,5	0,373	110,1	4,1	0,266
Bazal benzeri olmayan	61,2	10,6		82,8	8,2	
TİL grup						
Lenfosit fakir	79,6	7,1	0,696	103,2	5,7	0,266
Lenfosit zengin	72,7	8,2		102	4,8	

TABLO 11: Vakaların genel ve yapılan alt gruplara göre klinik ve histopatolojik özellikleri

Klinik ve histopatolojik özellikler		Üçlü negatif meme tümörleri (N / %)	Bazal benzeri alt tip (N / %)	Bazal benzeri olmayan alt tip (N / %)
Yaş	≤50	40 / (%48,8)	32 / (%50)	8 / (%44,4)
	>50	42 / (%51,2)	32 / (%50)	10 / (%55,6)
MBRD				
	2	38 / (%46,3)	27 / (%42,2)	11 / (%61,1)
	3	44 / (%53,7)	37 / (%57,8)	7 / (%38,9)
pT				
	pT1	26 / (%31,7)	19 / (%30,6)	7 / (%38,9)
	pT2	46 / (%56,1)	37 / (%59,7)	9 / (%50)
	pT3	5 / (%6,1)	5 / (%8,1)	0
	pT4	3 / (%3,7)	1 / (%1,6)	2 / (%11,1)
Evre				
	I	8 / (%9,8)	6 / (%10,3)	2 / (%11,8)
	II	41 / (%50)	32 / (%55,2)	9 / (%52,9)
	III	22 / (%26,8)	18 / (%31)	4 / (%23,5)
	IV	4 / (%4,9)	2 / (%3,4)	2 / (%11,8)
LN				
	Var	44 / (%53,7)	34 / (%58,6)	10 / (%62,5)
	Yok	30 / (%36,6)	24 / (%41,4)	6 / (%37,5)
TİL				
	Lenfosit fakir	61 / (%74,4)	49 / (%76,6)	12 / (%66,7)
	Lenfosit zengin	21 / (%25,6)	15 / (%23,4)	6 / (%33,3)
PARP1				
	Düşük	66 / (%80,5)	53 / (%82,8)	13 / (%72,2)
	Yüksek	16 / (%19,5)	11 / (%17,2)	5 / (%27,8)
p-mTOR				
	Negatif	34 / (%41,5)	27 / (%42,2)	7 / (%38,9)
	Pozitif	48 / (%58,5)	37 / (%57,8)	11 / (%61,1)

5. Tartışma

Meme kanseri, Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizdeki kadınlarda görülen kanser türleri arasında %22,9'luk insidansı ile birinci sırada yer almaktadır [78]. ER, PR ve HER2 negatif grubu oluşturan ÜNМК'ları ise meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturmaktadır [4, 5]. ÜNМК'ları daha genç yaşlarda görülen, hızlı progresyona ve kısa sağkalıma sahip agresif tümörlerdir. İyi bilinen hormonoterapi ve transtuzumab gibi tedavilerden yoksun kalmaları yanısıra kemoterapi ajanlarına farklı yanıtlar göstermeleri, bu heterojen grubun alt tiplere ayrıştırılmasına ve hedefe yönelik tedavi ajanlarının araştırılmasına neden olmaktadır.

Çalışmamızda, ÜNМК'ları için hedefe yönelik tedavide öne çıkan moleküllerden PARP1 ve p-mTOR'un immunohistokimyasal ekspresyonları, meme kanseri raporlamasında kullanılan parametreler ve klinik verilerle birlikte değerlendirilmeye çalışıldı ve saptanabilen belirgin özellikler ile literatür arası uyum değerlendirildi. Ayrıca ÜNМК'larının büyük kısmını oluşturan bazal benzeri grup, sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 ekspresyonu ile saptanmaya ve değerlendirilmeye çalışıldı.

ÜNМК'ları daha sık olarak 50 yaş altındaki ve premenapozal dönemdeki kadınları etkilemektedir [7, 79]. Kırk yaşın altındaki insidansının üçlü negatif olmayan gruba göre 1.53 kat daha fazla olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur [80]. Rao ve ark.'larının yaptığı çalışmada yaş ortalaması 46,8 bulundu [73], başka bir çalışmada ise tanı anındaki ortalama yaş 55 olarak saptandı [81]. Bizim çalışmamızdaki genel yaş ortalaması 51,2 olarak bulundu ve literatür ile uyumluydu.

İnvaziv duktal karsinom, NOS, meme karsinom sınıflamasında en geniş grubu oluşturmaktadır ve yapılan çalışmalarda sıklığı %40-75 dolayında bildirilmektedir [1]. ÜNМК'larının da içerisindeki en büyük morfolojik grubu İDK, NOS grubu oluşturmaktadır [73]. Doğu ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, ÜNМК içerisindeki İDK sıklığını % 86,7 idi [82]. ÜNМК'ları içerisinde yapılan başka bir çalışmada ise, İDK oranı %88 idi [73]. Bu

ortalamalar, çalışma grubumuz içerisindeki İDK sıklığıyla (%86,6) benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda tümör tipleri ile lenf nodu metastazı ve pN evreleri arasındaki ilişkiler anlamlı bulundu. İDK grubu dışında kalan, diğer meme kanser tanılı olgular pleomorfik lobüler kanser, invaziv mikropapiller kanser, mikst müsinöz kanser gibi tümör morfolojilerini içermektedir. Bu morfolojik tipler sık LVI ve LNM yapan tümörler olarak bilinmektedir [1]. Bu bulgulara göre, literatürle uyumlu olarak diğer meme kanser tanılı olgularda İDK grubuna göre daha fazla oranda lenf nodu metastazı görüldü ve pN evreleri daha ileri bulundu.

Bazal benzeri grup, ÜNMK'larının %50-75 kadarını oluşturmaktadır [44, 74, 83]. Bazı yayınlarda bu prevalansın %70-90'a kadar çıktığı bildirilmektedir [84]. Bazal benzeri grubu belirlemek için kullanılan altın standart yöntemin gen analizi olduğu bilinmektedir. Ancak geniş vaka gruplarında uygulanabilirlik için, araştırmacılar tarafından çeşitli immunohistokimyasal panellerin uyumluluğu araştırılmaktadır. EGFR ve sitokeratin 5/6 immunohistokimyasal boyama yönteminin gen mikroarray analizi ile karşılaştırıldığında, bazal grubu belirlemedeki özgüllüğü %100 iken, duyarlılığı %76 olarak bulundu [79]. Ancak araştırmacılar, bazal benzeri grubu belirlemek için farklı immunohistokimyasal belirteçler kullanmaktadır. Nielsen ve arkadaşları bazal benzeri grubu belirlemek için sitokeratin 5/6 ve EGFR içeren panelden en az bir tanesinin ekspresyonunun gösterilmesi gerektiğini belirtir iken [79], farklı yayınlarda yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinlerden (sitokeratin 5, sitokeratin 14, sitokeratin 17) bir tanesinin ekspresyonunun gösterilmesini yeterli bulmaktadır [85].

Çalışmamızdaki bazal benzeri grubun ÜNMK'larının %78'ini oluşturduğu görüldü. Mrklic ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ÜNMK'ları içerisindeki bazal benzeri grubu %66,3 olarak buldu [86]. Sonuç olarak ortaya çıkan oransal farklılığın, bazal benzeri grubu belirlemede kullanılan sitokeratin panelinin, uluslararası bir standardizasyonunun olmamasından ve bazal grubu belirlemede kullanılan kriterlerindeki değişkenlikten kaynaklandığı düşünüldü.

Çalışmamızda, sitokeratin 5/6 pozitifliği %72 iken, sitokeratin 14 pozitifliği %37,8 olarak bulundu. Her iki bazal sitokeratin ekspresyonu gösteren 26 olgu (%31,7) tespit edildi. Literatürde sitokeratin ekspresyonları oldukça değişkenlik göstermektedir. Bir çalışmada sitokeratin 14 pozitifliği %91,1; sitokeratin 5/6 %46,7 oranında saptanırken [87], başka bir çalışmada ise sitokeratin 5/6 %50,5; sitokeratin 14 % 24,2 olarından pozitiflik göstermekte idi [46]. Yayınlar arasındaki bu çeşitliliğe sebep olarak, farklı pozitiflik kriterlerinin kullanılması gösterilebilir. Literatürde bazı çalışmalarda, %1 tümör hücrelerinin boyanması pozitiflik için yeterli sayılmakta iken [73, 79]; bu oran, bazı yayınlarda %10 olarak kabul görmektedir [82, 88].

Literatürde, sitokeratin 14 ekspresyonu, yüksek mitotik indeks ile ilişkili bulundu ancak histoloji tip, derece ve LVI arasında ilişki bulunamadı. Sitokeratin 5/6 ekspresyonu gösteren tümörlerin ise yüksek dereceli tümörler olduğu ve belirgin pleomorfizm gösterdiği saptandı, LVI ve yüksek mitotik derece ile ilişkilendirildi [46, 87]. Bizim çalışmamızda da benzer olarak sitokeratin 5/6 pozitifliği, yüksek nükleer derece ile ilişkili bulundu. Ancak sitokeratin 14 ile diğer histomorfolojik parametreler arasında bir anlam görülmedi.

Meme tümörleri için yaygın olarak kullanılan derecelendirme yöntemi MBRD sistemidir ve tümör derecesi önemli prognostik faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Literatürde sadece bir çalışmada ÜNMK grubu içerisinde %10 oranında MBRD 1 tümör görüldü [50]. Diğer yayınlarda ise ÜNMK'ları ve bazal benzeri tümörlerin belirgin olarak yüksek dereceye sahip oldukları belirtilmektedir [83]. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz 82 vakanın %53,7'si derece 3 morfolojiye sahip olup, geri kalan vakaların tamamı derece 2'dir. Çalışma grubumuz içerisinde derece 1 vaka bulunmamaktadır. Bu bulgu literatür ile uyumlu gözükmemektedir.

Alt gruplar içerisinde, bazal benzeri grupta çoğunlukla derece 3 morfoloji (%57,8) görüldü, bazal benzeri olmayan grupta ise %61,1 oranında derece 2 morfoloji izlendi ancak, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Genel tümör derecelendirme sistemi içerisinde yer alan nükleer derecelendirmeye

göre bakıldığında ise, bazal benzeri grupta anlamlı olarak derece 3 nükleer özelliklerin daha fazla görüldüğü saptandı. Bulgularımıza benzer olarak, Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bazal ve bazal olmayan gruplar içerisinde, histolojik derece açısından fark bulunamadı ancak nükleer pleomorfizm bazal benzeri grupta belirgin olarak daha fazla saptandı [89].

Meme karsinomlarında prediktif ve prognostik öneme sahip parametrelerden biri de Ki67 proliferasyon indeksidir [90]. Ki67 proliferasyon indeksi %14'ün üzerinde olan vakalar prognoz beklentisi açısından yüksek riskli hasta grubunu oluşturmaktadır. ÜNMK'ları biyolojisinde barındırdığı gen mutasyonları nedeniyle yüksek proliferatif aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda Ki67 proliferasyon indeksi ortalama %51,6 olarak saptandı. Ayrıca çalışmamızda genel tümör boyutu ortalama 30,6 mm olarak saptandı ve Ki67 proliferasyon indeksi ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği belirlendi. Bu bulgular literatür ile örtüşmekte olup yüksek proliferatif aktiviteye sahip tümörlerin daha büyük boyutlara ulaşabildiğinin göstergesi olarak kabul edildi [91].

İmmün sistemin kanser progresyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TİL'lerin lokal immün yanıtta anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir [92]. Over ve kolon kanserlerinde yapılan çalışmalarda, yoğun tümör infiltrate eden lenfositlerin varlığının daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [92, 93]. Meme kanserlerinde yapılan bazı çalışmalarda da inflamasyon ve sitotoksik lenfosit infiltrasyonunun daha iyi sağkalımla ilişkisi olduğu görüşü mevcutken [94], bazı çalışmalarda da yoğun lenfosit infiltrasyonunun genel sağkalımı kötü etkilediği bildirilmektedir [95]. Lui ve arkadaşlarının yaptığı 4000 meme kanseri olgusuna sahip geniş seride, tedavi öncesi tümör infiltrate eden lenfosit varlığının, ÜNMK'larında sağkalımı arttıran bağımsız prognostik faktör olduğu ve bazal benzeri meme tümörlerinde sağkalımı belirgin olarak arttırdığı saptandı [96]. Ancak bu pozitif etkiyi, bazal belirteçlerin yokluğunda saptayamadıklarını belirttiler.

Bazal benzeri gruptaki bazal sitokeratin ve EGFR gibi protein ekspresyonlarının bu grubu daha immunolojik hale getirdiği ve lenfosit yanıtının oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kötü prognoza sahip olan bu grubun kemoterapiye kısmen iyi yanıt vermesinin hücrelerin yıkımıyla ortaya çıkan bu immunolojik kısıntılarının da etkisi olduğu hipotezi mevcuttur. Çalışmamızda ise; lenfositten fakir grup ve lenfositten zengin grup arasında hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım açısından anlamlı farklılık bulunmadı. Ancak genel sağkalımda, lenfositten fakir grupta daha belirgin olan kötüye gidiş dikkati çekmektedir. Bu farkın anlamlı çıkmamasında etken olarak değerlendirmeye alınan vaka sayısının iki grup içindeki dağılımlarının benzer olmaması ve sağkalım verilerindeki kısmi yetersizlik sayılabilir.

LVI, ana tümöral kitle dışında kalan alandaki (tümör periferinde), damarlar içerisindeki tümör hücre kümeleri olarak tanımlanmaktadır ve nüks/ metastaz varlığı için bağımsız prognostik faktördür. Ayrıca LVI'nun, ÜNMK'ları ve nod negatif, ER negatif meme kanserlerinde kötü klinik gidişle ilişkili bağımsız prognostik faktör olduğu bilinmektedir [97]. Çalışmamızda lenfositten fakir grupta %75,4 oranında saptanan LVI, istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulundu. Literatürde bununla ilgili bir veri bulunmamakla birlikte, yoğun lenfosit infiltrasyonunun metastaz için koruyucu bir faktör olduğunu saptayan çalışmalar mevcuttur [98] ve immunolojik yanıt oluşturmeyen tümör hücrelerinin LVI ve uzak metastaz yapma ihtimalinin daha fazla olduğu bildirilmektedir.

Çalışmamızda, lenfosit zengin grupta Ki67 proliferasyon indeksi ortalama %50,4 ile anlamlı olarak daha fazla bulundu. Bu bulgu, bazal benzeri gruptaki sitokeratin ekspresyonlarının neden olduğu lenfosit yanıtı ve yine aynı grubun sahip olduğu proliferasyon genlerindeki artış nedeniyle saptanan yüksek Ki67 proliferasyon indeksinin birlikteliği şeklinde yorumlandı.

Literatürde yapılan çalışmalarda tüm bazal sitokeratinlerin Ki67, p53, BRCA1 gibi proliferasyon ve hücre siklusu kontrol mekanizmalarıyla ilişkisi olduğu belirtilmektedir [46]. Bizim bulgularımızda sadece sitokeratin 5/6 ile Ki67 arasında anlamlı bir ilişki saptandı ve sitokeratin 5/6 pozitif vakaların

Ki67 proliferasyon indeksi %55,9; negatif olan vakalarda ise ortalama %41,4 olarak bulundu. Ancak sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14 pozitifliği ile p53 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

P53 mutasyonu meme kansinomlarında en sık saptanan genetik değişikliktir [99]. Literatürde bazal benzeri grup içerisindeki p53 pozitifliği %50-60 olarak bildirilmekle birlikte [7, 100], Langerod ve arkadaşları, p53 mutasyonu %83 oranında buldular [101]. Çalışmamızdaki bazal benzeri grup içerisinde bulunan 64 vakanın %92,2'sinde p53 mutasyonu pozitif saptandı. Bu oranın bazal benzeri olmayan vakalar içerisinde %83,3 olduğu görüldü ($p=0,364$). İHK yöntem ile yapılan çalışmalarda elde edilen geniş p53 mutasyon aralığının, pozitiflik için kullanılan ölçütün farklı olmasının neden olduğu düşünüldü. Mevcut çalışmamızda kullanmış olduğumuz kriterler uygulanarak yapılan benzer yayınlardaki oranlar ile elde ettiğimiz sonuçların uyumlu olduğu görüldü [28, 29].

Çalışmamızda nüks/metastaz ve ölümle sonuçlanan olguların tamamını P53 mutasyonu olduğu kabul edilen grup oluşturmaktadır. Literatürde yapılan çalışma sonuçlarında p53 mutasyonu saptanan olguların hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımlarının daha düşük olduğunu gösterdi [102]. Buna neden olarak, p53 mutasyonu olan tümörlerin genelde daha büyük boyutlu, daha kötü diferansiye tümörler olduğu ve bu kötü diferansiyasyon özelliklerine ek olarak bazı kemoterapi ajanlarına karşı olan direncin etkili olduğu düşünülmektedir.

PARP1 bütün ökaryotik hücrelerde bulunmakla birlikte proliferasyonu yüksek tümörlerde daha çok eksprese edilmektedir [103]. Artmış PARP1 aktivitesi, tümör hücrelerini genotoksik streslere daha dayanıklı hale getirmekte ve DNA hasarlayan ajanlara karşı dirence neden olmaktadır [104]. Literatürde PARP1'in artmış ekspresyonunu bir çok kanser tipinde kötü sağkalımla ilişkili olduğu bildirilmektedir [63, 105].

Meme kanserleri, ÜNMK'ları ve bazal benzeri gruplar içinde yapılan araştırma sonuçlarında yüksek PARP1 ekspresyonu sırasıyla; %91,2; %97,3 ve %96,9 saptandı [69]. Yapılan meta-analizler sonucunda, bazal meme

karsinomlarında PARP1 aktivitesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğunu ortaya koydu ve yüksek tümör derecesi, medüller histolojik tip, tümör boyutu, kötü hastaliksız ve genel sağkalım ile ilişkili bulundu [64]. Ayrıca adjuvan kemoterapi verilmeyen hastalarda PARP1'in hastaliksız sağkalım açısından bağımsız prognostik değere sahip olduğu görüldü. Çalışmamızda PARP1 aktivitesi 16 vakada (%19,5) yüksek olarak değerlendirildi, bu oran bazal benzeri grup içerisinde %17,2 olarak saptandı.

Çalışmamızdaki MBRD 3 olan tümörlerde PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru, derece 2 tümörlere göre anlamlı olarak daha fazla bulundu. Benzer şekilde, nükleer derece PARP1 skoru ile ilişkili bulundu. Ayrıca, mitotik derecesi 1 olan olgularda anlamlı olarak PARP1 ekspresyonu düşük seviyede saptandı. Yüksek dereceli ve mitotik aktif tümörlerde PARP1 ekspresyonunun yüksek saptanması literatür ile uyumlu gözükmektedir. Ancak yüksek PARP1 ekspresyon oranı gerek çalışmamızın genel grubunda gerekse alt gruplarında görülme oranı literatüre göre daha düşük bulundu. Bunun da PARP1 değerlendirmesinde kullanılan kriterlerin standardizasyonunun olmamasından kaynaklandığı düşünüldü.

Serimizdeki İDK olgularında PARP1 boyanma şiddeti diğer meme karsinom grubuna göre anlamlı olarak daha fazla bulundu. Bununla ilgili literatürde değişik sonuçlar mevcuttur. Bir çalışmada, en fazla PARP1 ekspresyonunun medüller karsinomda olduğu, lobüler karsinomda ise en düşük seviyede olduğu belirtilmekte iken [64], farklı bir çalışmada ise histolojik tip ile PARP1 ekspresyonu arasında ilişki saptanmadığı görüldü [12].

Literatürde, lenfomalarda PARP1 boyanma şiddeti Ki67 proliferasyon indeksi ile ilişkili bulundu [106]. Meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda, PARP1 ekspresyonunun, proliferatif belirteçler ve p53 ile pozitif korelasyonu bulunduğu belirtilmektedir [12]. Çalışmamızda PARP1 ekspresyonu ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında ilişki saptanmadı. Ancak literatür ile uyumlu olarak PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ile p53 arasında istatistiksel olarak doğru orantı olduğu görüldü. Bu birliktelik, PARP proteinleri ile p53'ün DNA

hasarına yanıtta ve genom stabilizasyonunda sinerjik etki göstermeleriyle ilişkilendirilmektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi, yapılan çalışmalarda yüksek PARP1 ekspresyonu kötü hastaliksız ve genel sağkalımla ilişkilendirilmektedir [64]. Bizim çalışmamızda, yüksek PARP1 ekspresyonu gösteren vakalarda tahmini hastaliksız ve genel sağkalım daha kısa bulunmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Ancak bulgularımızın literatürdeki PARP1-sağkalım eğilimi ile örtüşmekte olduğu görüldü.

Literatürde, meme karsinomlarının %24'ünde mTOR ekspresyonunda artma bulundu [9]. ÜNMK'larının %36'sında p-mTOR ekspresyonundaki artışın, üçlü negatif olmayan gruba göre anlamlı olarak daha fazla bulunduğu belirtilmektedir [11]. Çalışmamızda; ÜNMK'lerinde p-mTOR pozitifliği %58,5 olarak bulundu, bazal benzeri gruptaki oranı ise %57,8 olarak saptandı.

ÜNMK grubumuz içerisinde ve bazal benzeri grup içerisinde tümör derecesi, histolojik tipi, proliferasyon indeksi, mitotik aktivitesi, boyutu ve evresi gibi histolojik parametrelerde anlamlı bir ilişki görülmedi. Bose ve arkadaşları çalışmasında [9], p-mTOR ekspresyonunu yüksek dereceli tümörlerde artmış olarak tespit ederken, Zhou ve arkadaşları yaptığı çalışmada, p-mTOR ve tümör derecesi arasında ilişki bulmadı [67]. Başka bir çalışmada ise p-mTOR pozitifliği ile tümör boyutu, derecesi ve evreyle ilgili ilişki bulunmadı [10]. Vazquez-Martin ve arkadaşları, p-mTOR'un nükleer birikimini proliferasyon kapasitesi ile korele buldu [66].

Literatürde p-mTOR ekspresyonu olan meme karsinomları, lenf nodu metastazı, kötü sağkalım ve hastalık tekrarı ile ilişkili bulundu [9, 10, 67]. Çalışmamızda p-mTOR pozitifliği ile hastaliksız ve genel sağkalımlar açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Ayrıca, literatürden farklı olarak, p-mTOR boyanma yüzdesi fazla saptanan vakalarda, LNM daha az görüldü.

Literatürdeki sonuçların kendi içerisindeki ve çalışmamız ile olan uyumsuzluklarına, p-mTOR ekspresyonunun değerlendirilmesindeki çeşitli farklılıkların neden olduğu düşünüldü. Örnek olarak; Ueng ve arkadaşlarının

[107], nükleer ve sitoplazmik %5'den fazla orta-güçlü boyanmayı pozitif olarak kabul etmesi; Walsh ve arkadaşlarının [11] ise, pozitiflik için %20 oranını kabul etmesi gösterilebilir.

ÜNМК'larının heterojen yapısı içerisinde barındırdığı alt tipler, genomik ve moleküler özellikler nedeniyle farklı tedavi cevabına ve sağkalım değerlerine sahip olmaktadır. Bazal benzeri grubun, ÜNМК'ları içerisinde geniş bir grubu oluşturduğu ve yüksek proliferatif aktivitesi nedeniyle daha kötü hastalıklı sağkalıma sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu olguların tespiti, yakın tedavi ve takibi zorunlu görünmektedir.

Çalışmamızda PARP1 ve sitokeratin 5/6 ekspresyonları, literatür ile uyumlu olarak, proliferasyon kapasitesi yüksek olan ve diferansiyasyon derecesi kötü olan tümörlerde daha fazla saptandı. PARP1 ekspresyonunun, hastalıklı ve genel sağkalımı kötü etkilediği görülmekle birlikte sonuçlar anlamlı bulunmadı. Sitokeratin 5/6 için ise sağkalım analizlerinin literatür ile uyumsuz olduğu görüldü. Bu daha geniş vaka serilerine ve daha nitelikli hasta takip sistemine ihtiyaç duyulması şeklinde yorumlandı.

Çalışmamızda incelenen diğer belirteçler olan sitokeratin 14 ve p-mTOR ekspresyonlarının morfolojik parametreler ile sağkalım analizleri üzerinde anlamlı bir etkisi gösterilemedi. Bunun sebebi olarak, antikörlerin standart kabul edilmiş bir klonunun bulunmaması ve değerlendirmedeki çeşitli yöntemlerin varlığı görülmektedir.

Genel olarak, çalışmamızda kullanılan belirteçler ile ilgili uluslararası kabul gören bir değerlendirme sisteminin bulunmaması, literatürde de farklı sonuçlar elde edilmesine sebep olmaktadır. Literatürde bu analizlerin altın standart olarak moleküler düzeyde yapıldığı belirtilmektedir. Ancak gerek maliyet, gerekse kolay ve hızlı bir şekilde güvenilir sonuca ulaşabilmek adına, hedefe yönelik tedavi şansına sahip hasta grubunun belirlenmesi ve prognostik öngörü açısından immünohistokimyasal olarak her bir parametrenin standardizasyonu gerekli görülmektedir. Aynı zamanda laboratuvarlar arası farkı azaltmak ve gerçeğe en yakın sonuca ulaşabilmek için doku fiksasyonu dahil diğer

aşamaların da, optimum düzeyde tutulması olgular için hayati önem teşkil etmektedir.

PARP1 ve p-mTOR inhibitörleri, güncel tedavi kılavuzlarına yer almaya başladı ve yapılan çalışmalar umut vericidir. PARP1 ve p-mTOR'un moleküler ve immunohistokimyasal tespiti ile tedavi yanıtı arasındaki korelasyonlar dikkat çekmektedir. Daha pratik ve ucuz yöntem olan İHK yöntemin, her iki moleküle de standart bir şekilde uygulanıp değerlendirilebilmesi için, yapılan ve yapılacak olan çalışmalarda farklılıkların net bir şekilde ortaya konulup belirlenmesi, sonuç olarak da uluslararası bir değerlendirme sisteminin benimsenmesi gerekli görülmektedir. Çalışmamızdaki verilerin de bu amaçla literatüre kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

6. Sonuçlar

- Çalışmamız, 2005-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı'nda meme karsinomu tanısı alan ve İHK yöntemle ER, PR, HER2 negatif olarak raporlanmış 82 vaka ile yapıldı.
- Tüm vakaların ortalama takip süresi 50,9 ay (min1, max120) dir.
- Olguların genel yaş ortalaması 51,2±12,2 (min:27, max:81) olarak bulundu. Olguların 42 tanesi (%51,2) 50 yaş üstü, 40 tanesinin de (%48,8) 50 yaş altında olduğu görüldü.
- Çalışma grubu içerisinde MBRD I olgu bulunmamaktadır. MBRD II olan 38 olgu, MBRD III olan 44 olgu bulunmaktadır.
- Diğer meme karsinomu tanılı olgu grubunda anlamlı olarak daha fazla lenf nodu metastazı görüldü (p=0,018), ayrıca pN evresi daha ileri olduğu tespit edildi (p=0,010).
- Tümör boyutu arttıkça Ki67 proliferasyon indeksinin de arttđđı saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (korelasyon katsayısı=289, p=0,009).
- Yüksek pT evresine sahip tümörlerde ve ileri evrelerde nüks/metastaz oranı anlamlı olarak daha fazla bulundu (p=0,036/p=0,009).
- LNM saptanan hastaların %81,8'inde LVİ görüldü. LNM saptanan olgularda LVİ anlamlı olarak daha fazla bulundu (p=0,002). pN evresi yüksek olan (p=0,006) ve ileri evre (p<0,001) vakalarda LVİ anlamlı olarak daha fazla saptandı. Metastatik lenf nodülü sayısı ve metastatik lenf nodülü çapı arasındaki ilişki istatistiksel olarak doğru orantılı bulundu (korelasyon katsayısı=519, p=0,001).
- p53 ile PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru arasında istatistiksel olarak doğru orantı bulundu (korelasyon katsayısı=224, p=0,043) ancak sonuç PARP1 ekspresyonu ile p53 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,095).
- Lenfositten fakir grupta anlamlı olarak daha fazla LVİ saptandı (p=0,029).
- Tümör diferansiasyonu azaldıkça TİL yüzdesi artma eğiliminde olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,094).

- Lenfositten zengin grupta proliferasyon indeksi anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,045$).
- Lenfositten fakir ve lenfositten zengin gruplar arasında hastaliksız ($p=0,696$) ve genel sağkalımlar ($p=0,266$) açısından istatistiksel fark saptanmadı.
- Sitokeratin 5/6 pozitif grupta proliferasyon indeksi ve nükleer derece anlamlı olarak daha fazla saptandı ($p=0,035/p=0,013$). Sitokeratin 14 ekspresyonu ve Ki67 proliferasyon indeksi arasında ilişki bulunmadı ($p=0,765$).
- Bazal benzeri grup ile bazal benzeri olmayan grup arasında hastaliksız sağkalım ($p=0,373$) ve genel sağkalım ($p=0,266$) açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü.
- PARP1 boyanma yüzdesi ve PARP1 skorunun artması ile MBRD artması arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($p=0,033 / p= 0,035$).
- N 3 olguların PARP1 boyanma skoru istatistiksel olarak daha fazla olduğu görüldü ($p=0,043$).
- PARP1 boyanma yüzdesi ve skoru ile mitoz derecesi (M) arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($p<0,001$). M1 grubundaki vakaların ortalamasının diğer gruplardan anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü ($p<0,001$). Yüksek PARP1 ekspresyonu ve artmış mitoz derecesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu ($p=0,044$).
- PARP1 ekspresyonu yüksek grupta sağkalım ortalamaları daha kısa olarak bulundu ancak istatistiksel olarak anlam görülmedi ($p=0,205/ p=0,706$).
- p-mTOR boyanma yüzdesi LVİ bulunmayan olgularda daha yüksek oranlarda saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,058$). Lenf nodu metastazında p-mTOR boyanma yüzdesinin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,015$). P-mTOR sonucu ile lenf nodu metastazı, LVİ ve pN arasında ilişki saptanmadı ($p=0,153/p=0,231/p=0,456$).
- p-mTOR negatif ve pozitif hastaların hastaliksız ve genel sağkalımları arasında da anlamlı ilişki görülmedi ($p=0,575/p=0,871$).

7. Kaynaklar

1. WHO classification of Tumours of the Breast. 4 ed, ed. S.R. Lakhani, et al. 2012; S.8-31.
2. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
3. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
4. Reis-Filho, J.S. and A.N. Tutt, *Triple negative tumours: a critical review*. Histopathology, 2008. **52**(1): p. 108-18.
5. Lehmann, B.D., et al., *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2750-67.
6. Lehmann, B.D., J.A. Pietenpol, and A.R. Tan, *Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2015. **35**: p. e31-9.
7. Leidy, J., A. Khan, and D. Kandil, *Basal-Like Breast Cancer*. Arch Pathol Lab Med., 2014: p. 138:37-43.
8. Maniscalco, L., et al., *Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in triple negative feline mammary carcinomas*. BMC Vet Res, 2013. **9**: p. 80.
9. Bose, S., et al., *The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis*. Mod Pathol, 2006. **19**(2): p. 238-45.
10. Bakarakos, P., et al., *Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas*. Histopathology, 2010. **56**(7): p. 876-82.
11. Walsh, S., et al., *mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors*. Breast, 2012. **21**(2): p. 178-82.
12. Green, A.R., et al., *Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **149**(2): p. 353-62.
13. Ossovskaya, V., et al., *Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types*. Genes Cancer, 2010. **1**(8): p. 812-21.
14. *Histology for Pathologists*. 4 ed, ed. S.E. Mills. Lippincott Williams & Wilkins, p 67-84.
15. Özmen, V., *Dünya'da ve Türkiye'de meme kanseri*. Meme Sağlığı Dergisi, 2008;4: 6-12.
16. Fisher, B., et al., *Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update*. Cancer, 1983. **52**(9): p. 1551-7.
17. Fisher, B., et al., *Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation*. N Engl J Med, 2002. **347**(8): p. 567-75.
18. Carter, D., S.J. Schnitt, and R. Mills, *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. 2010: Lippincott Williams and Wilkins, p 285-350.

19. Seidman, J.D., L.A. Schnaper, and S.C. Aisner, *Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis*. *Cancer*, 1995. **75**(1): p. 65-71.
20. Rosen, P.P., *Rosen's Breast Pathology*. 3. ed. 2009: Wolters Klower/Lippincott Williams&Wilkins,p 286-290.
21. Kumar, V., A.K. Abbas, and J.C. Aster, *Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease*. 8. ed. 2010, p 1066-1090.
22. Soerjomataram, I., et al., *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **107**(3): p. 309-30.
23. Chairat, R., et al., *Differential prognostic indicators for locoregional recurrence, distant recurrence, and death of breast cancer*. *ISRN Oncol*, 2013. **2013**: p. 946-945.
24. Tavassoli, A., *Pathology Of The Breast*. 2 ed. 1999.
25. Galon, J., et al., *The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 11-26.
26. Loi, S., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(7): p. 860-7.
27. Adams, S., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(27): p. 2959-66.
28. Boyle, D.P., et al., *The prognostic significance of the aberrant extremes of p53 immunophenotypes in breast cancer*. *Histopathology*, 2014. **65**(3): p. 340-52.
29. Alsner, J., et al., *A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients*. *Acta Oncologica*, 2008. **47**(4): p. 600-607.
30. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
31. Beresford, M.J., G.D. Wilson, and A. Makris, *Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(6): p. 216.
32. Azambuja, E.d., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. *British Journal of Cancer*, 2007. **96**: p. 1504–1513.
33. Pauletti, G., et al., *Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization*. *Oncogene*, 1996. **13**(1): p. 63-72.
34. Wolff, A.C., et al., *Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical*

- Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.* J Clin Oncol, 2013. **31**(31): p. 3997-4013.
35. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction.* Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 69-125.
 36. Taylor-Papadimitriou, J., et al., *Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium.* journal of cell science, 1989 **Nov**; **94**: p. 403-13.
 37. van de Rijn, M., et al., *Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.* Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 1991-6.
 38. Livasy, C.A., et al., *Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.* Mod Pathol, 2006. **19**(2): p. 264-71.
 39. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.* Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R68.
 40. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10393-8.
 41. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
 42. Stuart-Harris, R., et al., *Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients.* Breast, 2008. **17**(4): p. 323-34.
 43. Eroles, P., et al., *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways.* Cancer Treat Rev, 2012. **38**(6): p. 698-707.
 44. Perou, C.M., *Molecular stratification of triple-negative breast cancers.* Oncologist, 2011. **16 Suppl 1**: p. 61-70.
 45. Nagle, R.B., et al., *Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells.* J Histochem Cytochem, 1986. **34**(7): p. 869-81.
 46. Alshareeda, A.T., et al., *Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2013. **139**(1): p. 23-37.
 47. Lehmann, B.D. and J.A. Pietenpol, *Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes.* J Pathol, 2014. **232**(2): p. 142-50.
 48. Carey, L.A., et al., *The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(8): p. 2329-34.
 49. Haffty, B., et al., *Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(36): p. 5652-5657.
 50. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4429-34.
 51. Bauer, J.A., et al., *Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients*

- receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin Cancer Res.*, 2010. **15**;16(2): p. 681-90.
52. D'Andrea, A.D. and M. Grompe, *The Fanconi anaemia/BRCA pathway*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(1): p. 23-34.
 53. Atchley, D.P., et al., *Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(26): p. 4282-8.
 54. Stefansson, O.A., et al., *Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(4): p. R47.
 55. Bertucci, F., et al., *Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers*. *Cancer Res*, 2006. **1**;66(9): p. 4636-44.
 56. Hu, Z., et al., *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 96.
 57. Liedtke, C., et al., *Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(8): p. 1275-81.
 58. Jones, P., et al., *Discovery of 2-{4-[(3S)-piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): a novel oral poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitor efficacious in BRCA-1 and -2 mutant tumors*. *J Med Chem*, 2009. **52**(22): p. 7170-85.
 59. Evers, B., et al., *Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(12): p. 3916-25.
 60. Kummar, S., et al., *A phase I study of veliparib in combination with metronomic cyclophosphamide in adults with refractory solid tumors and lymphomas*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(6): p. 1726-34.
 61. O'Shaughnessy, J., et al., *Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(3): p. 205-14.
 62. Shaheen, M., et al., *Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair*. *Blood*, 2011. **117**(23): p. 6074-82.
 63. Yelamos, J., et al., *PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development*. *Am J Cancer Res*, 2011. **1**(3): p. 328-346.
 64. Goncalves, A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mRNA expression in human breast cancer: a meta-analysis*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **127**(1): p. 273-81.
 65. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Acts*. *Genes Dev*, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
 66. Vazquez-Martin, A., et al., *The serine 2481-autophosphorylated form of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) is localized to midzone and midbody in dividing cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **3**;380(3): p. 638-43.
 67. Zhou, X., et al., *Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(20): p. 6779-88.

68. Zhai, L., et al., *The nuclear expression of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in invasive primary breast tumors is associated with chemotherapy sensitivity*. *Pathol Res Pract*, 2015. **211**(2): p. 130-7.
69. Domagala, P., et al., *PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **127**(3): p. 861-9.
70. Detre, S., G. Saclani Jotti, and M. Dowsett, *A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas*. *J Clin Pathol*, 1995. **48**(9): p. 876-8.
71. Setsu, N., et al., *The Akt/mammalian target of rapamycin pathway is activated and associated with adverse prognosis in soft tissue leiomyosarcomas*. *Cancer*, 2012. **15**;118(6): p. 1637-48.
72. Dobashi, Y., et al., *EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(10): p. 1328-40.
73. Rao, C., J. Shetty, and K.H. Prasad, *Immunohistochemical profile and morphology in triple - negative breast cancers*. *J Clin Diagn Res*, 2013. **7**(7): p. 1361-5.
74. Sasa, M., et al., *Screening for basal marker expression is necessary for decision of therapeutic strategy for triple-negative breast cancer*. *J Surg Oncol*, 2008. **97**(1): p. 30-4.
75. Aguiar, F.N., et al., *Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma in situ*. *Clinics*, 2013. **68**(5): p. 638-643.
76. Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(2): p. 259-71.
77. Denkert, C., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(9): p. 983-91.
78. KÖSE M.R. Editor, *Sağlık İstatistikleri Yıllığı*, T.C.Sağlık Bakanlığı, 2014, Sentez Matbaacılık ve Yayıncılık: Ankara; s 31.
79. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
80. Bauer, K.R., et al., *Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry*. *Cancer*, 2007. **109**(9): p. 1721-8.
81. Gazinska, P., et al., *Comparison of basal-like triple-negative breast cancer defined by morphology, immunohistochemistry and transcriptional profiles*. *Mod Pathol*, 2013. **26**(7): p. 955-66.
82. Dogu, G.G., et al., *Triple-negative breast cancer: immunohistochemical correlation with basaloid markers and prognostic value of survivin*. *Med Oncol*, 2010. **27**(1): p. 34-9.

83. Rakha, E.A., et al., *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. *Cancer*, 2007. **109**(1): p. 25-32.
84. Bertucci, F., et al., *How basal are triple-negative breast cancers?* *International Journal of Cancer*, 2008. **123**: p. 236-240.
85. Abd El-Rehim, D.M., et al., *Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma*. *J Pathol*, 2004. **203**(2): p. 661-71.
86. Mrklic, I., et al., *Prognostic value of Ki-67 proliferating index in triple negative breast carcinomas*. *Pathol Res Pract*, 2013. **209**(5): p. 296-301.
87. Kim, N.H., et al., *Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers*. *J Comp Pathol*, 2013. **148**(4): p. 298-306.
88. Elesawy, B.H., et al., *Immunohistochemistry-based subtyping of breast carcinoma in Egyptian women: a clinicopathologic study on 125 patients*. *Ann Diagn Pathol*, 2014. **18**(1): p. 21-6.
89. Kim, M.J., et al., *Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes*. *Hum Pathol*, 2006. **37**(9): p. 1217-26.
90. Yerushalmi, R., et al., *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(2): p. 174-83.
91. Li, H., et al., *Ki67 as a predictor of poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer*. *Oncol Lett*, 2015. **9**(1): p. 149-152.
92. Canna, K., et al., *The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer*. *British Journal of Cancer*, 2005. **92**: p. 651 – 654.
93. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(3): p. 203-13.
94. Lee, A.H., et al., *Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast*. *Histopathology*, 2006. **48**(6): p. 692-701.
95. Matkowski, R., et al., *The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(7): p. 2445-51.
96. Liu, S., et al., *CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. **15**;14(2): p. R48.
97. Rakha, E.A., et al., *The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma*. *Cancer*, 2012. **118**(15): p. 3670-80.
98. Kreike, B., et al., *Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(5): p. R65.
99. Bertheau, P., et al., *p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy*. *Breast*, 2013. **22 Suppl 2**: p. S27-9.

100. Rakha, E.A., et al., *Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes*. Clin Cancer Res. , 2009. **1;15(7)**: p. 2302-10.
101. Langerod, A., et al., *TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2007. **9(3)**: p. R30.
102. Yang, P., et al., *The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2246.
103. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacol Rev, 2002. **54(3)**: p. 375-429.
104. Molinete, M., et al., *Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells*. EMBO J, 1993. **12(5)**: p. 2109-17.
105. Davies, J.R., et al., *Inherited variation in the PARP1 gene and survival from melanoma*. Int J Cancer, 2014. **135(7)**: p. 1625-33.
106. Mahe, E., et al., *PARP1 expression in mantle cell lymphoma: the utility of PARP1 immunohistochemistry and its relationship with markers of DNA damage*. Hematol Oncol, 2014, doi: 10.1002/hon.2160.
107. Ueng, S.H., et al., *Phosphorylated mTOR expression correlates with poor outcome in early-stage triple negative breast carcinomas*. Int J Clin Exp Pathol, 2012. **5(8)**: p. 806-13.