

**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
DR. ABDURRAHMAN YURTARSLAN
ANKARA ONKOLOJİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
PATOLOJİ BÖLÜMÜ
Şef: Uzm. Dr. Işın PAK**

**İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK Cerb-B2 SKOR 2 OLAN İNVAZİV
MEME KARSİNOMLARINDA SİLVER İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ
İLE Cerb-B2 (HER-2) GEN AMPLİFİKASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ
VE PATOLOJİK PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Doğuş Özdemir**

Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Işın Pak

ANKARA 2009

ÖNSÖZ

Bana yalnızca patolojiyi kavramak konusunda değil, hayatın her alanında örnek olan, deneyimlerini, azmini, iş disiplinini ve bilgi birikimini aktaran, değerli hocam Dr. Işın Pak'a,

Akılcı düşünmeyi öğreten Dr. Süleyman Demir'e,

Çalışkanlığı, sistematik, yaratıcı ve detaycı tutumuyla bende öğrenme şevki uyandıran şef yardımcımız Dr. Çiğdem Irkkan'a,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan bölümümüz baş asistan ve uzmanlarına,

Mesai arkadaşlığı dışında da pek çok güzel şey paylaştığımız tüm asistan arkadaşlara,

Yardımları nedeniyle teknisyen arkadaşlara,

Hayatımı her zaman kolaylaştıran biricik anneme, sevgili babam ve kardeşlerime,

Beni her konuda destekleyen, sıkıntılarımı paylaşan ve bu tezin hazırlanması sırasında da yardımcı olan dostlarıma,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

TABLoların LİSTESİ

Tablo 1: WHO 2002 Meme tümörleri histolojik klasifikasyonu	13
Tablo 2: Patolojik prognostik parametreler	18
Tablo 3 : Modifiye Bloom-Richardson Histolojik Gradeleme Sistemi	19
Tablo 4: Mitotik figürlerin özellikleri	20
Tablo 5: EGFR reseptör ailesi ve ligandları	27
Tablo 6: Meme kanserlerinde TNM evreleme sistemi	38
Tablo 7: Kullanılan primer antikorların özellikleri	45
Tablo 8: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların ortalama hasta yaşı yönünden karşılaştırılması	55
Tablo 9-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör boyutu yönünden 3 grupta karşılaştırılması	56
Tablo 9-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör boyutu yönünden 2 grupta karşılaştırılması	56
Tablo 10-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör histolojik grade'i açısından 3 grupta karşılaştırılması	57
Tablo 10-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör histolojik grade'i açısından 2 grupta karşılaştırılması	57
Tablo 11-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör nükleer grade'i açısından 3 grupta karşılaştırılması	58
Tablo 11-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör nükleer grade'i açısından 2 grupta karşılaştırılması (modifiye)	58
Tablo 12-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların mitotik skor yönünden 3 grupta karşılaştırılması	59
Tablo 12-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların mitotik skor yönünden 2 grupta karşılaştırılması	59
Tablo 13-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların lenfovasküler invazyon yönünden karşılaştırılması	60
Tablo 14: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların metastatik lenf nodu varlığı ve sayısı yönünden karşılaştırılması	62

Tablo 15-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların ER ve PR ekspresyonu yönünden karşılaştırılması	63
Tablo 15-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların steroid reseptör ekspresyonu yönünden karşılaştırılması	64
Tablo 16: Polizomi Sonuçlarına Göre Olguların Dağılımı	66
Tablo 17: SISH ile HER-2 (-) Olgularda Polizomi Sonuçlarına Göre Olguların Dağılımı	68
Tablo 18: SISH ile Kr-17 Polizomisi Olmaksızın HER-2 Amplifikasyonu Bulunan Grup ile HER Gen Amplifikasyonu Bulunmayan Ve Kr-17 Polizomisi Bulunan Grubun Dağılımı	69

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1: SISH ile HER-2 amplifikasyonu saptanan olgu (Metod 1)
Resim 2: SISH ile HER-2 amplifikasyonu saptanan olgu (Metod 2)
Resim 3: SISH ile HER-2 amplifikasyonu saptanmayan olgu
Resim 4: SISH ile Kr-17 polizomisi saptanan olgu

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1: EGFR Reseptörünün çalışma şeması	26
Şekil 2: SİSH yönteminde, iki ayrı preparatta HER-2 gen ve Kr-17'nin gösterilmesi	
Şekil 3:HER-2 gen amplifikasyonunun SISH ile değerlendirilmesi, kantitatif metod, Metod 2	34
Şekil 4: SİSH Sonuçlarına Göre Mitotik Skor Bulgularının Dağılımı	59
Şekil 5 :SİSH Sonuçlarına Göre LVI Bulgularının Dağılımı	60
Şekil 6 : SİSH Sonuçlarına Göre Metastatik Lenf Nodu Bulgularının Dağılımı	6

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
TABLoların LİSTESİ	ii
RESİMLER LİSTESİ.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
<u>1 GİRİŞ VE AMAÇ</u>	
<u>2 GENEL BİLGİLER</u>	
2.1 MEME EMBRİYOLOJİSİ, ANATOMİSİ, HİSTOLOJİSİ	
2.2 MEME KANSERİ	
2.2.1 İNVAZİV MEME KARSİNOMU (TANIM)	
2.2.2 MEME TÜMÖRLERİNİN WHO SINIFLAMASI	
2.2.3 EPİDEMİYOLOJİ	
2.2.4 ETİYOLOJİ	
2.2.5 PROGNOTİK FAKTÖRLER	
2.2.5.1 TÜMÖR BOYUTU	
2.2.5.2 TÜMÖR HİSTOLOJİK TİPİ	
2.2.5.3 TÜMÖR HİSTOLOJİK GRADE'İ	
2.2.5.4 LENFOVASKÜLER İNVAZYON	
2.2.5.5 ANJİYOGENEZ	
2.2.5.6 AKSİLLER LENF NODU METASTAZI	
2.2.5.7 TÜMÖR NEKROZU	
2.2.5.8 TÜMÖR PROLİFERASYONU	
2.2.5.9 STEROİD RESEPTÖRLER	
2.2.5.10 HER-2/NEU (CERB-B2, ERBB2)	
2.2.5.10.1 İMMÜNOHİSTOKİMYA	
2.2.5.10.2 İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ	
2.2.5.10.2.1 FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON	32
2.2.5.10.2.2 KROMOJEN İN SİTU HİBRİDİZASYON	32
2.2.5.10.2.3 SİLVER İN SİTU HİBRİDİZASYON	35
2.2.5.10.2.4 KR-17 POLİZOMİSİ	
2.2.5.11 TANI ANINDA HASTA YAŞI	36
2.2.5.12 GEBELİK	37
2.2.5.13 BİLATERALİTE	37
2.2.6 MEME KANSERİNDE EVRELEME	37
2.2.7 MEME KANSERİNDE TEDAVİ	39
<u>3 GEREÇ VE YÖNTEM</u>	<u>41</u>
3.1 ARAŞTIRMA GRUBUNUN TANIMLANMASI	41
3.2 HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME	41
3.2.1 TÜMÖR BOYUTU	42
3.2.2 TÜMÖR HİSTOLOJİK GRADE'İ	42
3.2.3 NÜKLEER GRADE	42
3.2.4 MİTOZ SKORU	43
3.2.5 TÜMÖR NEKROZ VARLIĞI	43

3.2.6 LENFOVASKÜLER İNVAZYON	43
3.2.7 LENF NODU METASTAZI	
3.3 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	44
3.4 SİLVER İN SİTU HİBRİDİZASYON (SİSH) YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRME	45
3.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	46
4 BULGULAR	48
4.1 İHK VE SİSH İLE TESPİT EDİLEN BULGULAR	48
4.2 OLGULARIN PROGNOSTİK PARAMETRELER YÖNÜNDEN TANIMLANMASI	53
4.3 SİSH İLE HER-2 AMPLİFİKASYONU BULUNAN VE BULUNMAYAN GRUPLARIN SONUÇLARI	54
4.4 SİSH İLE KR-17 POLİZOMİSİ BULUNAN VE POLİZOMİ BULUNMAYAN GRUPLARIN SONUÇLARI	62
5 TARTIŞMA	68
6 SONUÇLAR	74
7 ÖZET	77
8 KAYNAKLAR	79

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen kanser türlerinden biri olup batıda her sekiz kadından birini etkileyen klinik davranışı, radyolojik ve patolojik özellikleri ile biyolojik potansiyeli farklı olan heterojen bir hastalık grubudur (1). Bu heterojenite, farklı büyüme ve metastaz kapasitelerine sahip, farklı hastalık durumlarının bir spektrumu şeklinde düşünülebilir, şöyle ki; benzer hastalık evrelerine sahip hastalar son derece farklı klinik sonuçlar ile karşımıza çıkabilir. Bu heterojenitenin bilinmesi, her bir olgunun, bu evrimsel spektrum içindeki yerine, ayrı ayrı yerleştirilmesi ihtiyacını doğurur (2, 3). Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik parametreler ile morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler yani moleküler belirteçlerin birlikte değerlendirilmesi ile mümkündür (4). Bu patolojik prognostik parametreler ile klinik bulgular birlikte değerlendirilerek her hasta için gerekli bireysel tedavi planı oluşturulabilir.

1960'lara kadar meme karsinomunun primer tedavisinde en çok kullanılmış olan mastektomi yerini zamanla, kısmi mastektomi, kuadrenektomiye veya primer radyoterapi ve aksiler diseksiyon veya sentinal lenf nodu haritalaması ile kombine edilmiş lumpektomiye bırakmıştır. Tedavi modalitelerine lenf nodu metastazı ve yaygın hastalığı olan olgularda adjuvant hormonoterapi ve kemoterapinin eklenmesi sonucu ise patolojik prognostik parametreler farklı anlamlar kazanmıştır.

Patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olan HER-2/ NEU (CerbB2) gen durumu aynı zamanda tedavi planlanmasını yönlendirecek verilerden biridir. Yaklaşık olarak invaziv meme karsinomlarının %15-25'inde (10-30), HER-2 gen amplifikasyonu görülür (5, 6, 7, 8, 9,10). Meme karsinomunda HER-2 pozitifliği; agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa sağ kalım ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birliktedir (6,7, 8, 10). Meme karsinomu hastasında HER-2 gen amplifikasyonu, kemoterapi ve hormonoterapiye yanıtın tahmininde kullanılır (5, 10, 12). Meme karsinomunda, HER-2 gen amplifikasyon durumunun bilinmesi, HER-2 pozitif olan ileri evre metastatik meme CA tedavisinde, bu reseptörü hedef alan monoklonal antikor (MAb) olan 'trastuzumab'ın (herceptin: Genentech, South San Francisco, CA) geliştirilmesi ile daha da önem kazanmıştır (10, 11, 12). Çünkü monoklonal antikor tedavisinden en çok yarar görecektir hasta grubu, HER-2 pozitifliği yüksek olan hastalardır (11). Bu tedavinin aynı zamanda kardiyotoksik etki gibi yan etkileri de bulunduğundan, tedavi için en uygun hasta grubunun uygun bir yöntemle seçilmesi gerekir (10).

Meme karsinomu hastalarında tümörün HER-2 durumunun hangi yöntemle tespit edilmesi gerektiği ise tartışmalı bir konudur. Onkoprotein miktarı, immünohistokimya, elisa veya western blot ile; gen amplifikasyon miktarı southern blot, in situ hibridizasyon yöntemleri veya PCR ile; m-RNA düzeyi northern blot ile ölçülebilir (12). Aslında henüz, literatürde üstünde görüş birliğine varılmış optimal bir yöntem yoktur. HER-2 gen durumunun tespitindeki en önemli sorunsal ise 'borderline' yani arada kalan; net olarak pozitif veya negatif denemeyen vakalardır (13).

Meme karsinomuda HER-2 gen durumunu değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri immünohistokimyasal (İHK) yöntemidir. İHK, kolay ve ucuz bir test olup en önemli deavantajı değerlendirme kriterlerinin subjektifliği nedeniyle, değerlendiriciler arasındaki uyumsuzluktur. Ayrıca cerrahi materyalin patoloji laboratuvarına gelişinden itibaren, immünohistokimyasal çalışmanın sonuçları fiksasyon ve tüm doku takip sürecinden etkilendiği için laboratuvarlar arası standardizasyonun güç olduğu düşünülür. Aslında immünohistokimya sanılandan daha güvenilir bir yöntem olup, negatif ve pozitif vaka tespitinde farklı laboratuvarlar arası (14) veya diğer standart yöntemler ile korelasyonu yüksektir (15, 16).

İlk olarak frozen kesitlerde çalışılan southern in situ hibridizasyondan sonra, floresan in situ hibridizasyon ve daha sonraları ise kromojen ve silver in situ hibridizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. İn situ hibridizasyon yöntemleri, DNA problemleri kullanarak HER-2 gen kopya sayısının farklı şekillerde görselleştirerek tespit edilmesine dayanır. DNA problemleri, floresan in situ hibridizasyonda floresanla, kromojenik in situ hibridizasyonda kromojenle işaretlenir (12). İHK ile standart bir yöntem olarak kabul edilen FISH yöntemi arasındaki korelasyon %90'lar civarındadır (13, 14, 15).

Silver enhanced in situ hibridizasyon yöntemi (SISH) metalografiye dayalı bir yöntem olup, bir olgunun HER-2 durumunun, invaziv tümöral hücrelerdeki, HER-2 gen kopya sayısının; kromozom 17 kopya (Kr-17, CHR 17) sayısına oranlanması ile tespit edilmesi esasına dayanır. Işık mikroskopunda değerlendirme yapılır ve preparatlar arşivlenebilir. Bu yöntem kantitatif bir yöntem olup değerlendiriciler arasındaki uyum yüksektir. Ayrıca SISH, ASCO/CAP guideline'ın önerdiği; Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ile % 95 uyumlu olma kriterine uygundur (17).

Biz çalışmamızda; ilk aşamada, AOH patoloji bölümünde, ekim 2007 ile şubat 2008 arasında invaziv meme karsinomu tanısı almış, immünohistokimyasal olarak CerbB2 skor 2 olan toplam 83 vakada SISH yöntemi ile HER2 gen amplifikasyonunu araştırdık. Daha sonra ise, metastatik odak niteliğindeki 3 olgu dışlanarak, primer odak niteliğindeki 80

olguyu, SISH yöntemi ile HER-2 amplifikasyonu olan ve olmayan olarak kategorize ederek ve bu grupları hasta yaşı, tümör boyutu, tümör histolojik grade'i, nükleer grade'i, mitoz skoru, nekroz varlığı, lenfovasküler invazyon varlığı, steroid reseptör durumu ve lenf nodu metastaz varlığı ile sayısından oluşan prognostik parametreler yönünden geriye dönük olarak inceledik. Ayrıca SISH yöntemi ile Kr-17 polizomisi tespit edilen olguları da polizomi olmayanlarla yukarıda sayılan patolojik prognostik parametreler bakımından karşılaştırdık.

Çalışmanın amacı: 1-SİSH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen olgularda, amplifikasyonun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisini değerlendirmek
2- HER-2 gen amplifikasyonu olmaksızın İHK ile yaygın boyanmaya neden olabilen ve bu nedenle İHK ile genetik testlerde diskordansa yol açan Kr-17 polizomi oranını tespit etmek ve ayrıca, Kr-17 polizomisi ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisini değerlendirmektir.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Embriyolojisi, Anatomisi ve Histolojisi

Meme dokusunun morfolojik lezyonlarının anlaşılması ve doğru yorumlanması için, normal histolojik yapılarının ve bunların embriyolojik orijinlerinin bilinmesi gerekir. Fetal hayatta gestasyonun 5. haftasında meme bezinin gelişimi başlar. Erken embriyoyu, her iki midsagital plan boyunca, aksiler bölgeden inguinal bölgeye uzanan, ventral, lineer ektodermal kalınlaşma oluşturur. Embriyolojik gelişimin dokuzuncu haftasından itibaren, bu çıkıntılar yalnızca pektoral bölgede kalırlar. Burada ektoderm daha da kalınlaşır ve alttaki mezenkime ilerleyen solid hücre kordonlarını oluşturur. Embriyonik periodun sonuna doğru, bu kordonlar çukurlaşır ve ileride oluşacak meme gland parankimini oluşturur. Bunlar: laktiferöz sinüs, laktiferöz duktuslar ve sekretuar alveoller. Meme glandının stromasını ise lobar glandüler formasyonların etrafındaki doku oluşturur. Gestasyonun 15. haftasından itibaren, testesteron (varlığı veya yokluğu) plasenta kaynaklı prolaktin, östrojen ve progesteron gibi plasente ve anne kaynaklı steroid hormonlar meme bezinin gelişiminde etkili olmaya başlar.

Meme, müskülokonnektif doku yatağına oturmuş, fibroadipöz doku (facia süperfisiyalisin derin ve yüzeysel katları) ile sarılı bir gland sisteminden oluşur. M.pectoralis major, m. serratus anterior ve m.obliquus abdominus externus kaslarının üzerine oturur. Genellikle 2.-6. kostalar arasında ve midaksiller hat ile sternum arasında yer alır.

Santral yerleşimli meme başı (papilla mammae), areola mammae denilen sirküler, pigmente alan ile çevrilidir. Meme başı tepesi, apertura ductuli lactiferi denilen 15-20 delikle delinmiştir. Areolada deri altı dokusu yoktur, yüzeyinde glandula areolares denilen yağlı salgı yapan bezler vardır. Ayrıca bu bölgede sirküler ve longitudinal dizilmiş düz kaslar mevcuttur. Meme başı ve areola duyu sinirleri açısından çok zengindir.

Meme 15-20 tane lobdan oluşur. Bunları makroskopik olarak tespit etmek mümkün değildir. Bu loblar meme başı etrafında radyal olarak dizilmişlerdir. Ayrıca bu loblar lig. Suspensorium mammae (Cooper ligamentleri) tarafından kısmen birbirinden ayırırlar. Her lob bağımsız olarak meme başına açılan, kendine ait toplayıcı kanal sistemine sahip, başlı başına bir bezdir. Yani her bir lob ayrı bir ductus lactiferous ile meme başına açılır. Bunlar meme başına gelmeden önce genişleyerek sinus laktiferousları oluştururlar. Loblar, dens interlobar fibröz septa ile meme parankiminin fonksiyonel üniti temsil eden

lobüllere ayrılır. Lobül ise toplayıcı bir kanal etrafında toplanmış 10 ile 100 arası, terminal duktal lobüler ünitelerden meydana gelir. Terminal duktal lobüler ünite (TDLU) ise en distalde alveoller, alveollerin açıldığı intralobüller duktuslar ve onların açıldığı intralobüller duktuslardan oluşur.

Memenin arterleri, internal ve external mammarian ve interkostal arterlerin dallarıdır. Yüzeyel venleri, v.thoracica interna, v.aksillaris ve v.interkostalis'lere dökülürler. V.interkostalisler vertebral venöz sistemle bağlantıda olduğundan, bu yol meme tümörlerinin kemiklere ve sinir sistemine metastaz yapmasına sebep olur.

Lenfatik sistem yapısının ise tümör yayılımında direkt etkisi vardır. Meme lenfatik sistemi, kütanöz ve parankimal olarak ikiye ayrılır. Kütanöz lenfatik sistemin lateral grubu, nodi lymphatici pectoralis, superior grubu, nodi lymphatici pectoralis, Rotter lenf nodları aracılığıyla da subclavian nodlara, medial grup, nodi lymphatici parasternalise ve karşı memeye, inferior grup ise karın ön duvarı ve karaciğer lenfatiklerine dökülür (3,19, 20, 21, 22).

Dukto-lobüller sistem kolumnar/basıklaşmış şekilli lüminal hücreler ile onları kesintisiz olarak çevreleyen myoepitel (lüminal hücrelere adhezyon molekülleri ve gap junctionlarla bağlı olan) hücreleri ve fibröz proteinlerin hidrate polisakkaritlere gömülmesi ile oluşan bazal membrandan oluşur. Myoepitel terminal duktusta kesintiye uğrayabilir. Bazal membran myoepitelere hemidesmozomlar ve fokal adezyon molekülleri ile bağlanır. . Lobüllerin çevresindeki stroma çevreye göre daha dens- sellüler görünümde olup, kollajenden ve retiküler lifler ile damar yapılarından zengindir. İtralobüller stroma alcian bleu (+) mukoid karakterdedir. Myoepitel hücreleri glikojen içeren, şeffaf sitoplazmalı, dens- bipolar nükleuslu ve sitoplazmalarında abondan kontraktıl fibriler apparatuslar içeren hücrelerdir. İntermediate hücreler ise, kolumnar şekilli, soluk eozinofilik sitoplazmalı hücreler olup, myoepitel ve lüminal hücrelerin prekürsörü oldukları düşünülür. Meme başına açılan toplayıcı duktus dışındaki duktuslar iki sıralı epitelle döşeliyken, toplayıcı duktusun bi kısmı çok katlı yassı epitelle döşeli olabilir (20). Laktifer sinüse girmeden önce döşeyici epitel skuamo- kolumnar bileşke yaparak distalde kolumnar epitelle devam eder. Skuamöz epitelin laktifer sinüs veya daha distale doğru uzanması skuamöz metaplazi olarak kabul edilir ve patolojiktir.

Hem meme stroması hem de TDLU'nun histolojisi duyarlı olduğu steroid hormon değişimleri nedeniyle, menstruel siklus, gebelik, laktasyon ve ekzojen hormon kullanımına göre değişiklikler gösterir. Menstrual hormonal siklus etkilerine göre; östrojenik fazda glandüler sistem hücresel proliferasyona girer, siklusun sonunda ise

belirgin sekretuar aktivite görülür. Bu değişikliklerle bağlantılı olarak, siklusun yaklaşık sonuna doğru, intralobüler konnektif doku sıvı bağlayarak kapasitesini artırır.

Post menstrual fazda, sellüler stromada, iki- üç katlı soluk eozinofilik sitoplazmalı epitelle döşeli dar lümene sahip asiniler izlenir. Folliküler fazda, biraz daha az sellüler bir stromada, bazofilik sitoplazmalı kolumnar şekilli lüminal hücreler, az sayıda soluk eozinofilik sitoplazmalı intermediate hücreler ile küçük nükleuslu şeffaf sitoplazmalı myoepitel hücreleri olmak üzere 3 farklı hücre tipi seçilebilir. Luteal fazda, stroma yoğunluğu azalmış olup, lobüllerin boyutunda ve terminal duktal yapıların sayısında artış izlenir. Sekretuar fazda, nispeten ödemli stromada, açık ve lümenleri sekret ile dolu asinilerin, apokrin sekresyona sahip lüminal hücreler ile döşeli olduğu görülür (3, 20, 23, 24).

Gestasyon sırasında, fetal meme glandı, maternal orijinli hormonal stimulasyona bağlı olarak, doğum sonrası regrese olacak olan sekretuar aktivite işaretleri gösterir. Puberteye kadar inaktif dönemde olan meme bezi pubertede, hormonların etkisi altında, gland duktuslarında uzama ve dallanma ile kısmi bir maturasyonuna kavuşur. Bu dönemde, laktiferöz kanal sisteminin gelişimi ve çevreleyen konnektif ve adipöz doku proliferasyonu ile eşzamanlı oluşan lobülasyon işlemi (tübuloalveoler gelişim) gerçekleşir.

Laktasyon periodu ve gebelik sırasında kadın memesi tam maturasyonua ulaşır. Bu dömenlerde, değişik hormonların etkisi altında, asiner hücreler belirgin sekretuar differansiasyona giderken lobüller genişler ve sayıca artar. İnterlobüler septalar belirgin olarak inceler. Laktasyon dömeninde ortalama büyüklükteki bir memenin ağırlığı 500 gr'ı geçebilir (19, 20). Laktasyon periyodu sonrası bu değişiklikler geri döner.

2.2 Meme Kanseri

2.2.1. İnvaziv Meme Karsinomu (Tanım)

Çevre dokulara invazyon ve uzak organlara belirgin metastaz eğilimi ile karakterize bir grup malign epitelyal tümördür. Büyük çoğunluğu adenokarsinomlardır ve meme parankim epitelinden, özellikle de terminal duktus lobüler ünit (TDLU) ten köken aldıklarına inanılır. Meme karsinomları, belirgin prognostik veya klinik karakterlere sahip, bir dizi morfolojik fenotip ve spesifik histopatolojik tipler sergilerler (18) Memenin en sık infiltratif karsinomu olup (%60-75), herhangi bir spesifik alt tiplendirme yapılamayan grup (not otherwise specified) NOS olarak ifade edilir. *World Health Organisation* (WHO) tarafından meme karsinomu 8 ana gruba ayrılmıştır (18).

2.2.2 Meme Tümörlerinin WHO Sınıflaması (Tablo 1)

Tablo 1: WHO 2002 Meme tümörleri histolojik klasifikasyonu

<u>EPİTELYAL TÜMÖRLER</u> İnvaziv duktal karsinom, NOS Mikst tip karsinom Pleomorfik karsinom Osteoklastik dev hücre içeren karsinom Koryokarsinomatöz özellikler gösteren karsinom Melanositik özellikler gösteren karsinom İnvaziv lobuler karsinom Tübüler karsinom İnvaziv kribriform karsinom Medüller karsinom Müsinöz karsinom ve bol müsinli diğer tümörler Müsinöz karsinom Kistadenokarsinom ve kolumnar hc.'li müsinöz kars. Taşlı yüzük hücreli karsinom Nöroendokrin tümörler Solid nöroendokrin karsinom Atipik karsinoid tümör Küçük hücreli/ "oat cell" karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom İnvaziv papiller karsinom İnvaziv mikropapiller karsinom Apokrin karsinom Metaplastik karsinom "Pure"epitelyal metaplastik karsinomlar Skumöz hücreli karsinom Spindle hücre metaplazili adenokarsinom Adenoskumöz karsinom Mukoepidermoid karsinom Mikst epitelyal/mezenşimal metaplastik karsinomlar "Lipid rich" karsinom Sekretuar karsinom Onkositik karsinom Adenoid kistik karsinom Asinik hücreli karsinom "Glikojen rich" berrak hücreli karsinom Sebasöz karsinom İnflamatuar karsinom	Lobuler neoplazi İntraduktal proliferatif lezyonlar Mikroinvaziv karsinom İntraduktal papiller neoplaziler Benign epitelyal proliferasyonlar <u>MYOEPİTELYAL TÜMÖRLER</u> Myoepitelyozis Adenomyoepitelyal adenozis Adenomyoepitelyoma Malign myoepitelyoma <u>MEZENKİMAL TÜMÖRLER</u> <u>FİBROEPİTELYAL TÜMÖRLER</u> Fibroadenom Filloides tümör Benign Borderline Malign Periduktal stromal sarkom, düşük dereceli Mammary hamartom <u>MEME BAŞININ TÜMÖRLERİ</u> Meme başı adenomu Syngomatöz adenom Meme başının paget hastalığı <u>MALİGN LENFOMA</u> <u>METASTATİK TÜMÖRLER</u> <u>ERKEK MEMESİNİN TÜMÖRLERİ</u>
--	--

2.2.3. Epidemiyoloji

İnvaziv meme kanseri, kadında en sık görülen kanserdir. Meme kanseri insidansı, birçok epitelyal tümör gibi, yaşla birlikte hızla artmaktadır. 25 yaşın altında nadirdir, en sık 45- 74 yaşları arasında görülür (25). Kadınlarda, meme kanseri gelişme riski tüm yaşam boyunca (0-110 yas) % 7-10 arasındadır. Tüm meme kanserleri içinde erkek meme kanseri oranı ise % 1 civarındadır (26). Tüm kadın kanserlerinin % 22'sini, gelişmiş ülkelerde ise % 26'sını oluşturur. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri ile Avustralya

yüksek risk altındaki ülkeler olup bu coğrafi lokalizasyonlarda, 75 yaş altındaki kadınların % 6'sında invaziv meme kanseri görülmektedir. Meme kanseri riski, daha az gelişmiş ülkelere sahip Afrika, Güney ve Doğu Asya'da ise zengin ülkelerdekine göre üçte biri kadardır. Düşük insidansa sahip tek zengin ülkenin Japonya olduğu bildirilmektedir. Göçmenler üzerine yapılan bir çalışmada ise, bir kuşak sonrasında, yerleşilen ülkenin diyet alışkanlıkları ve yaşam tarzına uyum sağladığı ve meme karsinomu görülme oranlarının da benzer şekilde evrildiği, dolayısı ile genetik faktörlerden çok çevresel şartların daha etkili olduğu belirtilmiştir (27).

Erken 1980'lerden itibaren hastalık riski, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yükselmektedir (18).

2.2.4 Etiyoloji

Meme kanseri etiyojisi multifaktoriyel olup, yaş, aile öyküsü, genetik predispozisyon, geçirilmiş meme karsinomu öyküsü, proliferatif meme hastalıkları, ekzojen -endojen endokrin faktörler, diyet- obezite, sedanter hayat tarzı, coğrafi yerleşim, sosyoekonomik durum, radyasyon, alkol kullanımı ve meme dansitesi gibi faktörleri içerir. Reprodüktif ve hormonal faktörler arasında erken menarş, geç menapoz, düzenli ovüler menstrüel sikluslar, oral kontraseptif kullanımı, post menapozal hormon replasman tedavisi, nulliparite ve ilk full-term gebeliğin ileri yaşta olması yer almaktadır (28, 29, 30, 31, 32).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki sex steroidleri (androjenler, östrojenler, progesteronlar) meme tümörü gelişmesinde önemli role sahiptir. Östrojen fazlalığı hipotezi esastır, meme kanseri riskinin direkt olarak meme dokusunun östrojen maruziyetine bağlılığını şart koşar. In vitro çalışmalarda, östrojen fazlalığında, artmış meme hücre proliferasyonu ve apoptozin inhibisyonunu saptanmıştır. Hayvan çalışmaları, östrojen hâkimiyetinde meme tümör gelişimi oranlarında artış olduğunu göstermiştir. Yüksek plazma testosteron, androstenedion, östron, östradiol ve düşük sex hormon bağlayıcı globulin seviyeleri gözlenen postmenapozal kadınlarda meme kanseri riski yüksektir. (30,33).

Diğer bir majör teori, östrojen + progesteron hipotezidir . Bu hipoteze göre tek başına östrojene maruz kalan, ekzojen hormon kullanmayan postmenapozal kadınlara oranla, plazma ve dokularda östrojenle kombine progesteron yüksekliği saptanan kadınlarda risk daha yüksektir. Bu teori, folliküler fazla karşılaştırıldığında menstrüel siklusun luteal fazındaki meme epitel hücrelerindeki proliferasyon artışı ile desteklenmektedir (33).

Ekzojen hormon maruziyeti etyolojide rol oynayan başka bir önemli faktördür. İki

majör tip ekzojen hormon alımı meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur: oral kontraseptifler ve postmenapozal hormon replasman tedavisi (34). Çalışmalar bu ekzojen alımların bitiminden 1-2 yıl sonra, bu hormonlara maruz kalmış olanlardaki riskin azaldığını göstermiştir. Bazı yazarlar ise özellikle puberteye yakın bir dönemden itibaren uzun dönemli oral kontraseptif kullanımının meme bezindeki yüksek proliferatif aktivite nedeniyle genetik hasara yatkın olması nedeni ile daha yüksek riske neden olduğunu ifade etmiştir (35, 36).

İnfertilite de, muhtemelen emzirme işlemi olmamasından dolayı, risk faktörü gibi görünmektedir.

Epidemiyolojik bilgiler, meme kanserinin, hayvansal yağ ve proteinden zengin yüksek kalorili diyetle birlikte fiziksel aktivite yoksunluğu ile karakterize batı tipi yaşam tarzını benimsemiş, zengin toplumların hastalığı olduğunu desteklemektedir. Şişmanlık veya obezitenin farklı kanser türlerinde farklı mekanizmalar ile kanserojen etki yattığı düşünülmektedir. Bu mekanizmaları etkileyen faktörler şeker-yag metabolizması, immün mekanizma, insülin ve östradiolü de içeren pek çok hormon düzeyi, insülin like growth faktör-1 gibi hücre proliferasyonunu ve büyümesini düzenleyen faktörler ve hormonların dokulara etkilerini artıran veya azaltan seks hormon bağlayıcı protein miktarlarıdır. Çocukluk ve adolesan çağda başlayan sağlıksız beslenme alışkanlığı, fiziki aktivite yoksunluğu ve kilo alma; başta kanser olmak üzere erişkin yaşta oluşabilecek pek çok hastalığa zemin hazırlar. Şişmanlık ve obezite postmenapozal meme kanseri riskini artırırken, kilo kaybının meme kanseri riskini azaltığı bildirilmiştir (37). Diyetteki total yağ, özellikle de doymuş hayvansal yağ miktarı da yine muhtemelen riski artırmaktadır. Kırmızı et, diğer bir risk faktörüdür. Fazla miktarda meyve ve sebze tüketimi meme kanseri riskini azaltmaktadır . Meyve ve sebzeler, kompleks yiyecekler olup, çok sayıda koruyucu vitamin, mineral, lif, karetenoid ve indol, sterol, fenol, flavanoid gibi aktif maddeler içerdiğinden kansere karşı koruyucudur (38).

Düzenli fiziki aktivite, kalori alımı ile harcanması arasındaki dengeyi sağlayarak başta meme kanseri olmak üzere, kolon, endometriyum ve prostat kanseri riskinde azalma sağlar. (39). Bu, öncelikle seks hormon düzeyleri olmak üzere, insilün ve prostoglandinler gibi pek çok hormon düzeyinin dengelenmesi ve immün sistemin desteklenmesi sayesinde olur.

Günlük alkol alımı da meme kanseri gelişimi için risk faktörüdür ve alkol alımının azaltılması meme kanseri riskini azaltır (37, 40). Tam olarak hangi mekanizma ile olduğu anlaşılamamasına rağmen; alkolün indüklediği kanda sirküle edilen östrojen ve diğer

hormon düzeylerinde artış, folat düzeyinde azalma ve alkol veya metabolitlerinin meme dokusuna direkt etkileri, bu nedenler arasında olabilir denmektedir.

BRCA1 ve BRCA2, genom bütünlüğünün korunmasında görevli, hücre siklus kontrolünü, apoptozu ve DNA tamirini regüle eden tümör süpresör genlerdir. BRCA1 için daha fazla miktarda ve daha erken yaşta olmak üzere, BRCA-1 ve BRCA-2 genlerindeki mutasyonlar, taşıyıcılar için ömür boyu meme ve over kanseri açısından artmış risk anlamı taşır. Kanser predispozan genetik mutasyonlar tüm meme ve over karsinomlarının % 5 ile 10'dan sorumluyken, bu olguların yarısında BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu vardır. Ayrıca BRCA1 mutasyon taşıyıcısı karsinom olgularında sıklıkla atipik medüller karsinom şeklinde presente olan yüksek gradeli ve az miktarda karsinoma in situ içeren tümörler görülürken, BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında, daha az tübül formasyonu görülür (3,41). Sigara kullanımının, anti -östrojenik etkisi nedeniyle, bu olgularda karsinom riskinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (41). BRCA1 mutasyonu taşıyıcı kadınlarda 35 yaş öncesi meme kanseri görülme riski yüksekken; özellikle 5 yılın üzerinde oral kontraseptif kullananlarda bu risk daha da artar (42). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının genetik penetransları oldukça fazla değişkenlik gösterir, bu da BRCA ilişkili kanser riskinin, yaşam tarzı, beslenme alışkanlıkları ve çevresel faktörlerle modifiye edilebileceğini göstermektedir (3, 43).

Epstein Bar virüs (EBV), human mammary murine virus (MMTV) ve human papilloma virus (HPV) meme kanseri etyolojisinde sorumlu tutulan ajanlardır. (44) Bir çalışmada, meme karsinomu olgularında HPV-DNA araştırılmıştır. Benign meme lezyonları olan, fibroadenom, fibrokistik değişiklikler veya filloides tümörde HPV DNA tespit edilemezken, meme karsinomu olgularında % 29.4'lük (%66.6 HPV 16, % 20 HPV18 ve % 13.4'ü HPV16 ve HPV18 pozitif) pozitivite tespit edilmiştir. Dolayısıyla meme karsinomu ve viral etyoloji hala aydınlatılması gereken bir sahadır (45).

Proliferatif meme hastalıklarından, adenozis, mastit, basit apokrin metaplazi, skuamöz metaplazi, fibrozis, atipisiz fibroadenom ve duktal ektazide meme karsinomu riskinde artış yoktur. Atipisiz orta veya şiddetli epitelyal duktal hiperplazi, atipisiz soliter papillom, kompleks fibroadenom ve sklerozing adenozisde 1.5-2 kat artmış meme karsinomu riski varken; atipili hiperplazide, özellikle ailede meme karsinomu öyküsü varsa, premenopozal dönemde, her iki memede 4-5 kat artmış meme karsinomu riski vardır (1, 3). Meme karsinomu ile ilişkili olan, nulliparite, yüksek kalorili beslenme, iyonize radyasyon, ilk doğumun ileri yaşta olması ve geç menapoz gibi pek çok faktör

proliferatif meme hastalıkları riskini artırırken takip eden meme karsinomu gelişimi ile ilişkiyi de pekiştirir (1, 3).

2.2.5 Prognostik Faktörler

Meme kanseri heterojen bir hastalık grubu olup pek çok klinik ve patolojik parametre ile hastalığın gidişatı belirlenmeye çalışılır. Bu parametreler ile kişiye yönelik yarar görebileceği tedavi planı şekillendirilir. Yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiş olan patolojik prognostik parametreleri; morfolojiye dayalı prognostik parametreler ve morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler yani ‘moleküler belirteçler’ olmak üzere 2 grupta toplamamız mümkündür (4) (Tablo 1).

Prognoz terimi aslında hastalığın doğal seyrini ifade etse de, tedavisiz bir kontrol grubu yaratmak mümkün olmadığından, bu terim modern tıp anlayışında, hastalığın olası gidişatını temsil eder. Ayrıca bu parametrelerin hastalığın olası seyrine olan etkileri zaman bağımlıdır.

Şöyle ki, bu parametrelerden tümör nekrozu, hastalığın gidişatını, kısa takip sürelerinde daha belirgin olarak yansıtırken; tümörün nükleer grade’i, lenf nodu tutulumu ve tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon, uzun zamana bağlı bir şekilde hastalığın olası seyrini yansıtır (3).

Patolojik prognostik parametreler dışında; hastanın tanı anındaki yaşı, gebelik durumu, ırkı, sosyoekonomik durumu, performans durumu, tedaviye uyumu gibi hastayla ilişkili prognostik parametrelerden bahsetmek mümkündür.

Bir patoloji raporunda, tüm bu prognostik parametreler ve tümörün tipi ve grade’i ne olursa olsun Östrojen, Progesteron reseptörlerinin durumu ile HER-2 durumu bildirilmelidir (46).

Tablo 2: Patolojik prognostik parametreler

MORFOLOJİYE DAYALI OLAN	MORFOLOJİYE DAYALI OLMAYAN
• Tümör boyutu • Tümör tipi • Tümör grade(mitotik figür sayısını içeren) • Vasküler invazyon • Rezeksiyon sınırlarının durumu • İnsitu komponentin genişliği • Tümör damar yoğunluğu(ihk gerekir) • Lenf nodu durumu	• Östrojen ve progesteron reseptörleri • Hücre proliferasyon indeksi(ihk) • Flow veya imaj sitometri ile S fazı • Flow veya imaj sitometri ile DNA ploidy • Growth faktörler • Onkogenler (HER-2 /neu, myc, ras) • Tümör süpresör genler(P53) • Proteazlar(catepsin-d) • Hücre siklus regülatörleri (siklinler, siklin bağlı kinazlar) • Plazminojen sistemi (PAI-1, uPAI)

2.2.5.1 Tümör Boyutu:

Bağımsız bir prognostik parametredir ve en önemli parametrelerden biridir (3, 47). Tümör boyutu arttıkça aksiller lenf nodu metastazı artmakta ve sağkalım oranı düşmektedir. Aksiller tutulum gösteren küçük çaplı tümörlerin prognozu, büyük çaplı olanlara göre daha iyidir ve tüm nodal tutulum kategorilerinde tümör boyu arttıkça yaşam süresi kısalmaktadır. (48) Evrelemede patolojik tarafından ölçülen tümör çapı göz önüne alınmalıdır (49).

Patologların da tümör boyutunu değerlendirirken dikkatli olmaları ve doku taze iken yaptıkları ölçümü fiksasyon sonrası tekrarlamaları gereklidir. Yaygın in situ komponent içeren tümörlerde, ayrı olarak seçilebiliyor ise, mikroskopik olarak lam üzerinde yapılacak ölçüm ile invaziv tümör alanının çapının ayrı olarak verilmesi ve evrelemenin invaziv alanın çapına göre yapılması gereklidir.

2.2.5.2 Tümörün Histolojik Tipi:

Dünya sağlık örgütü tarafından 2002’de yapılan sınıflama sisteminde meme tümörleri farklı histolojik tiplere ayrılmıştır. Bu histolojik subtiplerden bazıları daha iyi prognozludur. Tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, sekretuar karsinom ve müsinöz karsinomun prognozu iyidir. (18) Buna karşın metaplastik karsinom, kötü

differentiye taşlı yüzük hücreli karsinom ve karsinosarkomların prognozu daha kötüdür.

(47) Medüller karsinomun prognozu tartışmalı olmakla birlikte, invaziv duktal karsinoma göre daha iyi prognoz gösterdiği birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (50).

2.2.5.3 Tümörün Histolojik Grade'i :

Günümüzde morfolojik tipine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün grade'lenmesi önerilmektedir. Tümörün grade, differentiyanın ölçüsüdür. Önceleri en çok kullanılmış olan gradeleme sistemleri Bloom-Richardson ve Black'tir. Birincisi tübül formasyonun yaygınlığının yani yapısal özellikleri; ikincisi ise nükleer atipiyi dikkate almıştır. Hem tümörün yapısal görünümü hem de sitolojik atipinin prognozla korele olduğu pekiştikçe, bu parametrelerin kombine edilmesi gündeme gelmiştir. Bu parametreleri kombine edip, bir üçüncü parametre olarak mitotik skoru ekleyen Elston tarafından, Nottingham modifikasyonu olarak bilinen; modifiye Bloom-Richardson sistemi oluşturulmuştur. Bu grade'leme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tübül yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak elde edilen toplam skora göre grade belirlenmektedir (3, 18, 51) (Tablo 2).

Tübül formasyonu değerlendirilirken; tümörün tüm alanlarına bakılarak, açık lümen yapılarının oranı hesaplanır (18, 19).

Tablo 3: Modifiye Bloom-Richardson histolojik gradeleme sistemi

<i>Histolojik özellik</i>	<i>Skor</i>
A- Tübül formasyonu	
Tümörün çoğunluğu (>%75)	1
Orta derecede (%10-%75)	2
Çok az veya yok (<%10)	3
B- Nükleer pleomorfizm	
Küçük uniform nükleuslar (normal duktus epitel hücresine benzer)	1
Boyut ve değişkenlikte orta derecede artış (normal duktus epitel hücresinin 1.5-2 katı)	2
Belirgin boyut ve şekil farklılığı (normal duktus epitelyum hücresinin 2 katından büyük)	3
C- Mitoz sayısı (10 BBA'da) (Olympus BX51, x400 görüntü alan çapı 0,55mm)	
≤ 8 mitoz	1
9-17 mitoz	2
≥18 mitoz	3

Toplam skor: 3-5 ; Grade 1 6-7 ; Grade 2 8-9 ; Grade 3

Nükleer atipi, tümör hücrelerinin atipisi en yüksek alanındaki hücrelerin, normal duktus epitel hücreleri ile, boyut, şekil farkı, nükleol varlığı ve sayısının, kıyaslanması ile değerlendirilir. Pleomorfizm açısından 1-3 arası skorlama yapılır. Nükleus küçükse ve normal meme epitelyal hücreleri ile karşılaştırıldığında hafif boyut artışı gösteriyorsa, sınırları düzenli ve nükleer kromatini uniform ise 1 puan verilir. Hücreler normalden büyükse, orta derecede boyut ve şekil farklılığı gösteriyorsa, açık veziküler nükleusa sahipse ve belirgin nükleol içeriyorsa 2 puan, belirgin şekil ve boyut farklılığı gösteriyor, devasa büyük nükleus içeriyorsa 3 puan verilir.

Mitotik figürler sayılarak, kullanılan mikroskopun görüntü alan çapına göre skorlanır. Tümör, mitoz skoru açısından değerlendirilirken, mitotik aktivitenin en yüksek olduğu tümörün periferik, ardışık alanlarına bakılır. Nekroz, yoğun inflamasyon olan veya kalsifikasyon ile damar yapıları içeren alanlar sayılmaz. Değerlendirme için en az 10 büyük büyütme alanında (BBA) (x400) sayım yapılmalıdır. Mitoz sayılırken, sadece kesin mitotik figürler (metafaz, anafaz ve telofazın morfolojik özelliklerini taşıyan figürler) değerlendirmeye alınır, hiperkromatik ve piknotik nükleuslar değerlendirme dışı bırakılır. Van Diest tarafından detaylı mitotik figür tanımı yapılmıştır (52) (Tablo 3). Mitoz, 1-3 arasında skorlanır. Standardize edildiğinde, mitotik aktivite indeksi (MAI) tümör boyutu ve lenf nodu durumu ile birlikte kullanılabilir, prognozu iyi yansıtan, güvenilir ve tekrarlanabilir bir parametredir (3).

Tablo-4 Mitotik Figürlerin Özellikleri

Nükleer membran: yoktur, yani hücreler profaza geçmiş olmalı

Nükleer yapı: toplanmış (metafaz başlangıcı), düzlemsel(metafaz/anafaz) veya ayrı kümelenmeler şeklinde (telofaz), nükleer materyalin açık saçsı uzantıları (kondanse kromozomlar) olmalıdır. Boş bir merkezi alan ve düzenli uzantılar mitoz olmadığını destekler

Mitotik figür: İki tane ayrı paralel sarılı kromatin, tek bir mitozu temsil ettiği halde, iki ayrı mitoz olarak sayılmalıdır.

Pinder ve arkadaşları, 450 olguluk uluslararası bir meme çalışma grubunu incelemişler, tümör gradenin önemli bir prognostik faktör olmanın yanı sıra, kemoterapiye yanıtın da önemli bir belirteci olduğunu söylemişlerdir. (53)

Pek çok araştırmacı prognostik parametreleri kombine ederek, prognostik indeks veya profil oluşturmaya çalışmıştır. Lenf nodu tutulumu olmayan grup içinden, S-faz fraksiyonu, progesteron reseptör durumu ve tümör boyutu kombine ederek, seçilen hastalarda, artmış uzak relaps riski tespit edilmiş, yaş grupları eşitlendiği zaman benzer yaşam süreleri bulunmuştur. (54) Nottingham grubu, tümör boyutu, lenf nodu evresi ve histolojik grade gibi prognostik parametreleri birlikte kullanarak “Nottingham Prognostik İndeksi” (NPI) oluşturmuşlardır. $NPI = 0,2 \times \text{tümör boyutu} + \text{lenf nodu evresi (1-3)} + \text{histolojik grade (1-3)}$ şeklinde hesaplanır. Prognostik indeks arttıkça prognoz kötüleşir (55, 56). Bir vakadaki tüm prognostik faktörlerin etkileri tek yönlü olmadığından, parametrelerin farklı kombinasyonları, muhtemelen benzer sonuçları işaret etmektedir. (3)

2.2.5.4 Lenfovasküler İnvazyon:

İnvaziv karsinomun içinde veya çevresindeki kan damarları ve lenfatik boşluklara tümöral hücreler invaze olabilir. Lenfatikler içinde tümör embolisi bulunması, tümör için artmış rekürrens anlamına gelir. (51) Tümör içindeki değil, çevresindeki lenfatiklerde tümör embolisi bulunması aksiler metastaz ile ilişkilidir. Doku takibi sırasındaki artifisiyel yarıklamalar lenfatik emboli ile karışabilir. Tümör çevresinde yarıklanma artefaktı bulunan, lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda, yarıklanma artefaktı olmayan hastalara kıyasla daha yüksek uzak metastaz oranları, bu artefaktların basit bir doku takibi hatası olmayıp; tümör -stroma arasındaki etkileşim sonucu gelişen muhtemel lenfatik kanal formasyonları olduğunu göstermektedir. (3)

Kan damarı embolisi ise, tümörün boyutu, histolojik grade’i , lenf nodu durumu, uzak metastaz olasılığı ve kötü prognozla koreledir (51).

Bazen rutin Hematoksilen-Eozin (HE) kesitlerde, lenfatik damarların ve kan damarlarının birbirinden ayırımının kesin olarak yapılması mümkün olmayabilir. Küçük kapiller damarlarda düz kas veya elastik duvarı göstermek mümkün olmayabilir veya lenfatikler de eritrosit içerebilir. Bazı immünohistokimyasal belirleyicilerin (CD31, CD34, D2-40, LYVE-1) lenfatik/kan damarı ayırımında yardımcı olabileceği söylene de bu konuda hala tartışmalı noktalar mevcuttur. Dolayısı ile, bazı araştırmacılar tarafından, meme kanserlerinin rutin histolojik incelemesinde, kan damarı veya lenfatikleri birlikte ifade eden, ortak bir kavram olarak “lenfovasküler boşluk” teriminin kullanımının daha uygun olduğu ifade edilmiştir (3, 57).

HER-2 gen amplifikasyonunun, lenfovasküler invazyon içeren high grade tümörlerle birlikte olduğuna ilişkin yayınlar mevcuttur (58).

2.2.5.5 Anjiogenezis:

Neoplastik veya pre-neoplastik dokuların vasküler proliferasyonu indükledikleri zaten biliyoruz (3). Yeni damar oluşumu ile karakterize anjiogenezis, meme kanserinde, perfüzyonun artışı sağlayarak ve endotel hücre kaynaklı parakrin mediyatörler sayesinde, tümör büyümesi ve metastazı için gereklidir. Çevre stromada, daha yoğun vasküler komponenti bulunan meme karsinomu olgularında, daha agresif davranışın izlenmesi; bu damar yoğunluğunun ölçümü ve diğer prognostik parametreler ile karşılaştırılması ihtiyacını doğurmuştur (51). Meme karsinomlarında anjiogenezi saptamak için damar endoteline karşı antikor kullanılıp mikrodamar yoğunluk (MVD) ölçümleri yapılabilir. Yapılan çalışmalarda, MVD'nin bağımsız prognostik parametre olabileceği düşünülmüştür (59). MVD ile yüksek histolojik tümör grade'i ve tümör boyutu, HER-2 pozitifliği, Östrojen reseptör negatifliği ve aksiller lenf nodu tutulumu arasında ilişki kuran araştırmalar mevcuttur (3).

2.2.5.6 Aksiller Lenf Nodu Metastazı:

En önemli prognostik parametrelerden biridir. (1,3) Aksiller lenf nodu tutulumu olan ve olmayan hastalar arasında belirgin yaşam süresi farkı vardır ve lenf nodu tutulum seviyesi (düşük, orta ve yukarı), tutulan lenf nodu sayısı, metastatik tümör boyutu, ektranodal yayılım ve efferent damarda tümör bulunması da surviyi etkiler. (3) Buna ek olarak metastatik lenf nodu sayısı arttıkça, hastalıksız sağ kalım ve toplam sağ kalım oranlarında azalma olduğu çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (18).

Metastatik lenf nodlarında saptanan tümörün çapı da değerlendirmeye dahil edilen parametrelerden biridir. 2002 American Joint Commitee on Cancer (AJCC) evreleme sisteminde, lenf nodlarındaki metastatik tümörün en geniş çapı 0.2 mm'den büyük ve 2 mm'den küçük ise tümör "mikrometastaz" olarak kabul edilir. Eğer tümör hücreleri 0.2 mm'den küçük küme halinde veya tek tek tümör hücreleri halindeyse, bu durum "izole tümör hücreleri" olarak değerlendirilir. İzole tümör hücreleri metastaz olarak kabul edilmez ve bölgesel lenf nodları pN0 olarak kabul edilir (60). Mikrometastaz ve izole tümör hücrelerinin önemi hala araştırılması gereken başlıklardan biridir. Lenf noduna göre yapılabilecek en iyi prognostik sınıflama; lenf nodu tutulumu olmayan grup, 1-3 adet lenf nodu tutulumu olan grup ile 4'ten fazla lenf nodu tutulumu olan grup şeklindeki sınıflamadır (51).

Aksiller evrelemede güvenilirlik bakımından en az 10 adet lenf nodu disseke etmek gerektiği vurgulanmıştır. Ancak sentinal nod biyopsisinin daha yaygınlaşması ile beraber, rutin aksiler diseksiyondan vazgeçilme olasılığı gündeme gelmiştir. Bu görüşe göre meme kanser hücreleri anatomik bir sıra ile aksiler lenf nodlarını tutmakta yani genellikle tümör yatağını drene eden 1-3 lenf noduna yayılım sonrası diğerlerine geçmektedir. Bu nedenle sentinal lenf nodu pozitif olanlarda diğer lenf nodlarının da pozitif olma olasılığı varken; sentinal lenf nodu negatif hastalarda diğerlerinin negatif olacağı varsayımı ile diseksiyon yapılmayabilir (51, 61).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile yapılan bir çalışmada, Cerb-B2 amplifikasyonunun, lenf nodu tutulumundan daha fazla prediktif değeri olduğu vurgulanmıştır (62). Press ve arkadaşları ise yalnızca cerrahi tedavi alan lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda, HER-2 amplifikasyonu ile erken rekürrens, herhangi bir dömende rekürrens veya hastalığa bağlı ölüm arasında kuvvetli ilişki olduğunu belirtmiştir (63). Ayrıca, lenf nodu tutulum durumundan bağımsız olarak, HER-2 amplifikasyonun rekürrens ve survi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (63, 64).

2.2.5.7 Tümör Nekrozu:

Tümör nekroz varlığı, lenf nodu metastazı insidansında artış ve sağ kalım oranlarında azalma ile ilişkili, prognostik değere sahip parametrelerden biridir (18, 51). Tümör nekrozu genelde high grade tümörlerle birlikte ve hızlı büyüyen tümörlerde, tümörü destekleyen angiogenезin yetersiz kalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (3).

HER-2 gen amplifikasyonun, nekroz içeren high grade tümörlerle birlikte olduğuna ilişkin yayınlar mevcuttur (58).

Diffüz inflamasyon ile tümör hayatta kalım ilişkisi üzerine nekrozun varlığının veya yokluğunun belirgin etkisi tespit edilmemiştir. Ancak, orta dereceli veya belirgin diffüz immün yanıtta, inflamasyonun immün etkisi, tümörojen etkisine baskın olduğu için, meme karsinomunda daha iyi prognozu işaret eder (65).

2.2.5.8 Tümör Proliferasyonu:

Elston tarafından modifiye edilen tümör gradeleme sisteminin de en önemli parçası olan mitotik skor, klasik sayma yöntemi, MIB(Ki-67) veya analog immün yöntemlerle veya flow sitometri kullanılan S-fraksiyon fazı ile tespit edilebilir (51). Tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesi, meme karsinomlarında, metastatik potansiyelin ve prognozun önemli göstergelerinden biridir.

Ki-67, hücre siklusunun proliferatif fazlarında (G1, S, G2 ve M) bulunan nükleer bir antijene yönelik, Hodgkin lenfoma hücre kültüründen elde edilen monoklonal fare

antikordur. Dinlenme fazındaki (G0) hücrelerde bulunmaz. İmmünohistokimyasal yöntemlerle Ki-67 antikoru kullanılarak tümörün proliferatif aktivitesi hakkında fikir edinilebilir. Ki-67 ile tespit edilen proliferatif aktivite, S- fraksiyon fazı ile tespit edilenin yaklaşık iki katıdır (3). Ki-67 yüzdesi yüksek olan tümörlerde prognoz daha kötüdür (66).

Heintz ve arkadaşları, southern blot yöntemi ile tespit ettikleri HER-2 gen amplifikasyonunun, mitotik aktivite ve negatif steroid reseptör ekspresyonu ile korelasyon gösterdiğini bildirmiştir (67).

Başka bir çalışmada, lenf nodu tutulumu olmayan, HER-2 ekspresyonu olan, yüksek proliferatif aktivite indeksine sahip hasta grubunun en kötü prognoza sahip hasta grubu olduğu sonucuna varılmıştır (68).

Herhangi bir özellik aranmaksızın oluşturulan 97 vakalık bir meme karsinomu serisinde, immünohistokimyasal çalışma ile tümörlerde, ER, PR, Ki-67, P53 ve CerbB2 boyanmaları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, değişmiş P53 ekspresyonu; artmış Ki-67 ekspresyonu, artmış mitoz sayısı, high histolojik grade'e sahip tümör ve artmış c-erb-B2 ekspresyonu ile ER ve PR negatifliği arasında kuvvetli ilişki tespit edilmiştir (69).

2.2.5.9 Steroid Reseptörler:

Reseptör , bir hormona özel noktalarda bağlanarak, hormon-reseptör kompleksi oluşturan ve onun bilinen fizyolojik etkilerinden sorumlu; onları düzenleyen, intrasellüler ya da membran proteini niteliğindeki molekül ya da moleküllerdir. Östrojen ve progesteron reseptörleri; intrasellüler proteinler olup, konsantrasyon değişimine bağlı olarak, dolaşımdan hücre içine alınan, hormon molekülüne seçici olarak bağlanır ve hormon reseptör kompleksini oluştururlar. Aktive olan hormon–reseptör kompleksi, spesifik olarak, nükleus içindeki hormon yanıt elementleri olarak isimlendirilen kısa DNA sekanslarına bağlanır ve fizyolojik hormon aktivitesini sağlayan transkripsiyonu gerçekleştirirler (70). Meme kanserlerinde, östrojen ve progesteron hormonları mutajenik ve promotor etki yapmaktadır. Östrojen hormonunun mutajenik etkisi reseptörler tarafından düzenlenmektedir. Kültür çalışmalarında da fonksiyonel östrojen reseptörü taşıyan meme kanser hücresinde mutajenik etkisi kanıtlanmıştır (71).

Hem biyokimyasal hem de immünohistokimyasal olarak tespit edilebilen östrojen reseptör pozitif tümöre sahip hastalar, hormonoterapiye yanıt verir ve daha uzun hastalısız sağkalım sürelerine sahiptir. Fakat bu durum, uzun süreli prognoz üzerine etkili değildir ve istatistiki değerini kaybeder. (51) Yani östrojen ve progesteron reseptörlerinin prognostik değeri zayıftır (18).

İmmünohistokimyasal yöntemlerde kullanılan antikorlar yaygın olarak ER-alfa'yı tanımaktadır. Ancak yeni kullanılan reseptör olan ER-beta da meme kanserleriyle yapılan çalışmalarda kullanılmış ve tamoksifenle adjuvan hormonal tedavi alan hastalarda, tedaviye cevapta ER-beta'nın sağkalımı belirlemede önemli bir gösterge olabileceği öngörülmüştür (72).

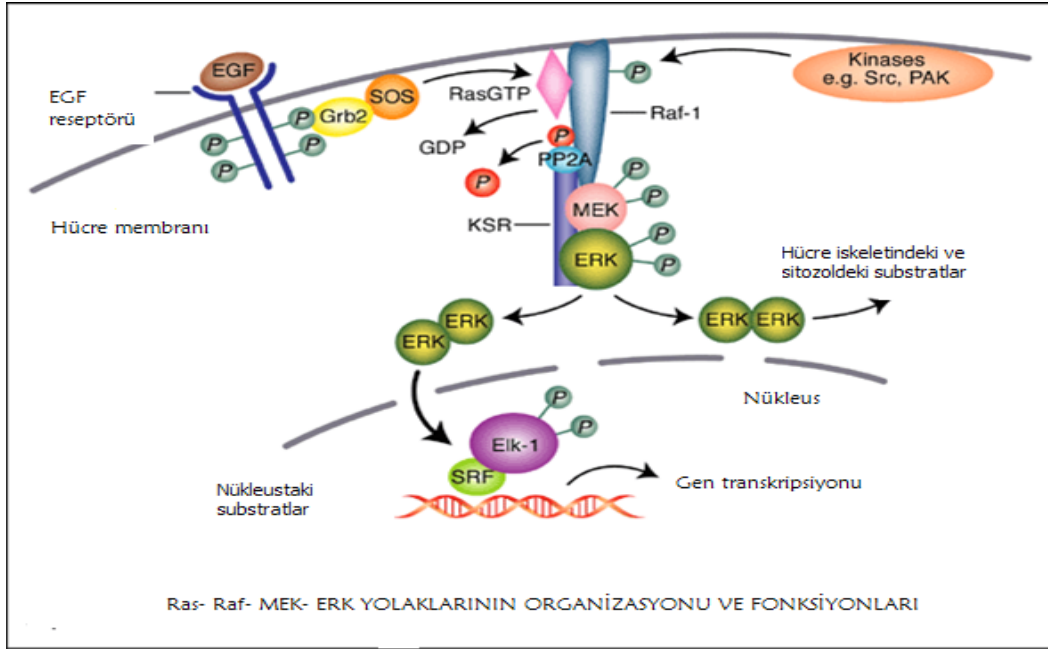
ER, PR ve HER-2 'nin birlikte ekspresyonu nadir olup, bu grup hastalarda hastalıksız sağ kalım ile toplam sağkalım oranları düşüktür (73).

2.2.5.10. HER-2/neu (cerb-B2, ERBB2) :

Tümör promotörleri, Epidermal *growth factor* reseptör (EGFR), İnsülin ve İnsülin *like growt factor* reseptörlerindeki serin ve treonin rezidülerinin fosforilasyonunu artırır. EGFR, Plattelet *devired growt factor* (PDGF) , İnsülin ve insülin *like growt factor* gibi mediyatörler, tirozin kinaz aktivitesi ile hücre çoğalması ve transformasyonunu düzenler. Bu reseptörlerde tirozinin fosforilasyonu, kinaz aktivitesini arttırır (74).

EGFR'nin bağlanması reseptörün dimerizasyonunu ve tirozin rezidüleri üzerindeki otofosforilasyonu indükler. Bu fosfotirozinler, Grb2 ve SOS gibi sinyal molekülleri için bağlanma bölgesi oluşturur. Bu sinyal molekülleri ise Guanosin difosfattan (GDP) , Guanosin trifosfat (GTP) oluşumunu sağlayınca, GTP; G proteinleri-Ras aktivasyonunu sağlar. Bu değişiklik Ras'da konformasyonel bir değişiklik yapar ve Raf-1'e bağlanmasını kolaylaştırır. Böylece Raf-1 sitozolden, aktivitesini gösterdiği hücre membranına taşınır. Raf'in aktivasyonu; protein fosfotaz-A2 ile inhibitör bölgelerin defosforilasyonu, PAK ve Src ailesi ile bilemediğimiz başka kinazların (p-21 aktive kinaz) aktivasyon bölgelerinin fosforilasyonunu ilgilendiren, çok basamaklı bir işleyişi tetikler. Aktive Raf-1, MEK'i (MAP/ERK kinaz) fosforile ederek aktifleştirir. MEK ise ekstrasellüler sinyal regülatör kinaz'ı (ERK) fosforile ederek aktifleştirir. Raf-1 ile MEK arasındaki ilişki RKİP (Raf kinaz inhibitör protein) tarafından inhibe edilebilir. Tüm üç basamaklı kinaz kaskadı KRS (Ras kinaz süpresörü) tarafından denetlenir. Aktive ERK için; hücre iskelet proteinleri, fosfolipaz-a2, tirozin kinaz reseptörleri, östrojen reseptörü, SOS, STAT(sinyal transdüksiyon ve aktivatör proteinleri) gibi, sitozolde pek çok substrat bulunur. ERK ayrıca, nükleusa girerek; Elk-1 ve diğer Ets ailesi proteinleri gibi transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek gen ekspresyonunu kontrol eder (75) (Şekil 1).

Şekil-1: EGFR Reseptörünün çalışma şeması



* Expert Reviews in Molecular Medicine (75)

Tirozin kinaz aktivitesi gösteren, EGFR reseptör ailesi EGFR (ErbB1), ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4 dan oluşur (10).

HER2, meme kansinimleri dışında over, mesane ve gastrik kanserlerde de overekspresyonu olur. Glioblastoma multiformeye sıklıkla Erb-1'in mutant bir formu eşlik eder. Virüsler de EGFR sinyalizasyon kaskadı üzerine etki ederler. Avian erythroblastosis virus, yapısal olarak aktif bir EGFR reseptör formu kodlar. Hepatit B virüs ile EBV virüs invazyonları sırasında EGFR reseptörünün ekspresyonunu arttıırırlar. HPV-E5 ise inaktif reseptörleri tekrar plazma membranına göndererek aktif hale geçirir (10).

HER-2'nin kendisine bağlanan bir ligand bilinmemektedir. Primer rolünün diğer EGFR reseptörlerine ligand bağlanınca, onlarla heterodimer oluşturarak, sinyal transdüksiyonunu artırmak ve sinyalizasyonu değiştirmek olduğu düşünülmektedir. Yani bir çeşit koreseptör gibi davrandığına inanılır (10, 74, 76).

Tablo-2 EGFR reseptör ailesi ve ligandları

GEN	LİGAND
HER-1 (c-erbB1)	Epidermal growth factor Transformig growth factor beta Beta cellulın Heparin-binding growth factor amphiregulın
HER-2 (c-erbB2)	? (Heregulin)
HER-3 (c-erbB3) HER-4 (c-erbB2)	Heregulin Neu differansiyasyon faktör 1+2

* Stem Cells (4)

CerbB2 nin ürünü ise, EGFR aktivitesine sahip transmembranal bir protein gibi davranmaktadır. CerbB2'nin ürünü ile EGFR skansları arasında çok geniş bir homoloji vardır. Ortama EGFR konması direkt olarak değil ama bilmediğimiz bir mekanizma ile, c-c-erbB2nin ürününün fosforilasyonunu artırır. Çünkü direkt olarak bu proteine EGFR'nin bağlandığı kanıtlanamamıştır. Protein kinaz-c tümör promotorüdür ve c-erb-B2'nin aktivitesindeki artış bir şekilde protein kinaz-c, fosfoinositol ve kalsiyum düzeyinin atmasını sağlar. Bu reseptörlere, kendi ligandının, monomerinin veya heterodimerinin bağlanması reseptörü aktive eder (10).

CerbB2 geni, *Human Genom Organisation (HUGO)* gen isimlendirme komitesi tarafından; eritroblastik lösemi viral onkogen homologu 2 şeklinde adlandırılmıştır. Liretatürde; NEU,NGL, TKR1, HER-2, c-erb B2, HER-2/*neu* olarak farklı adlandırmalar mevcuttur (10).

Human epidermal growth faktör reseptör 2 =HER-2 / Neu (CerbB2) geni 17. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. HER-2 geninin ekspresyonu temel olarak iki mekanizma ile olur; a-normal memede transkripsiyonun aktivasyonu b- protein

overekspresyonu olan meme karsinomlarının %90'ında gen amplifikasyonu şeklinde. Tümörlerin %3-15'inde ise protein overekspresyonu ile gen amplifikasyonu arasında diskordans vardır. Bu diskordansın nedenleri ve klinik önemi ise tam olarak bilinmemektedir (77).

Yaklaşık olarak invaziv meme karsinomlarının %15-25'inde(10-30), HER-2 reseptör overekspresyonu görülür (6, 9, 10,).

HER-2, kendisi direkt olarak epidermal growth faktör reseptör gibi davranan transmembranel, 185 kd'luk bir glikoonkoprotein kodlar. Bu glikoprotein; sitoplazmik tirozin kinaz aktivitesi gösteren domain, ekstrasellüler ligand bağlayan domain ve transmembranal domain'den oluşur. Bu protein tümör hücre proliferasyonunda önemli olmanın yanısıra, hücre motilitesinde ve metastaz sırasındaki hücre yayılımında önemli rol oynar.

Meme karsinomunda HER-2 amplifikasyonu, agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa survi ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birliktedir (5, 6,7 ,8, 9, 10).

HER-2 pozitif olan ileri evre metastatik meme CA tedavisinde, bu reseptörü hedef alan huminize monoklonal antikor (MAb) olan 'transtuzumab' (herceptin: Genentech, South San Francisco, CA) geliştirilmiştir (6, 10).

Monoklonal antikor tedavisinden en çok yarar görecektir hasta grubu, HER-2 pozitifliği yüksek olanlardır. Yani HER-2 amplifikasyonu meme karsinomu hastalarında, farklı kemoterapi rejimlerine ve hormonoterapiye yanıtın tahmininde kullanılır.

Patologların test ederek klinisyenlere ilettikleri HER-2 durumuna göre hastanın tedavi planı şekillendirilir. Bu nedenle, doğru, güncellenebilir, tekrarlanabilir, maliyeti çok yüksek olmayan bir yöntemle, tüm meme karsinomlarında, HER-2 durumu, tercihen tanı anında veya rekürrens döneminde tespit edilmelidir (10).

Şu ana kadar patologların üzerinde görüş birliğine vardıkları optimal bir test yöntemi yoktur. Seçilecek test, biraz da materyalin cinsine ve patoloji bölümünün koşullarına bağlıdır. Yeni kullanılacak yöntemin, kullanılmakta olan ve güncel yöntemle %95 uyumlu olması önerilmektedir (10).

Tümörün HER-2 durumu şu yöntemlerle tespit edilebilir (11).

A- Hücre yüzeyindeki protein over- ekspresyonu

İmmünohistokimya (İHK)

Elisa (*Enzym linked immunosorbent assay*)

Western Blot

B- Gen amplifikasyonu

Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)

Silver In Situ Hybridisation (SISH)

Chromogenic In Situ Hybridisation (CISH)

Polimerase Chain Reaction (PCR)

Southern Blot

C- m RNA düzeyi

Northern Blot

2.2.5.10.1 İmmünohistokimya:

American Society of Clinical Oncology (ASCO) /College of American Pathologists (CAP), 2007 Ocak ayında bir makele ile, meme karsinomlarında HER-2 durum tespiti için ortak bir klavuz yayınlamıştır. Bu klavuza göre öncelikle spesmenin invaziv alanında, güncellenmiş bir İHK yöntemi ile, HER-2 protein ekspresyonuna bakılır. İnvaziv tümöral alandaki İHK boyanmalar şu şekilde değerlendirilir.

- HER2 proteini için negatif İHK boyanma, 0 veya 1+ : Boyanma yok veya tümör hücrelerinin herhangi bir oranında zayıf, inkomplet membranöz boyanma.

- HER2 proteini için iki anlamlı İHK boyanma, 2+ : Tümör hücrelerinin en az %10'unda, zayıf veya uniform olmayan yoğunlukta komplet membranöz boyanma.

- HER2 proteini için pozitif İHK boyanma, 3+ : İnvaziv tümöral hücrelerin %30'undan fazlasında, uniform, yoğun komplet membranöz boyanma.

Skor 2 olan olgularda, güncellenmiş bir test ile, HER-2 gen amplifikasyonuna bakılması önerilmiştir. (10)

1998'de *United States Food and Drug Administration (FDA)* tarafından immünohistokimyasal yöntem (HercepTest;DakoA/S, Glostrup, Denmark) transtuzumab tedavisine karar verilebilecek yöntem olarak kabul edilmiştir. (10) İHK evrensel olarak kullanılan ucuz ve kolay bir yöntem olup, en önemli dezavantajı bu yöntemin sonuçlarının, cerrahi materyal labrotuvara ulaştığı andan itibaren fiksasyon ve doku takibi süreçlerindeki farklılıklardan etkilenmesi nedeniyle standardizasyonun güç olmasıdır.

Fiksasyon aşamasında; fiksasyona kadar geçen süre, örnek dilimlerin kalınlığı, fiksatifin türü, fiksasyon süresi standardize edilmelidir. Tüm bunlar, materyalin antijenitesini değiştirdiğinden, İHK sonuçlarını etkiler. Bununla beraber, in situ hibridizasyon protokollerindeki enzimatik sindirim sürelerini etkiler. Fiksasyon süresi uzun olanlarda false negatiflik; kısa olanlarda false pozitiflik artar. (10, 11)

Cerrahi materyalin, tespit solusyonuna en kısa sürede girmesi gerekir. Fiksatif olarak %10 tamponlu formalin önerilmektedir. Optimum tespit için 0.5-1 cm'lik dilimlenmiş materyal, en az 6, en çok 48 saat tespit solusyonunda kalmalıdır. Cerrahi sınırlar incelenip, değerlendirme için gerekli önlemler alındıktan sonra, materyal dilimlenerek, yeteri kadar formaline konmalıdır. Ayrıca, fiksasyon süresi ile fiksasyona kadar geçen sürenin kaydedilmesi gerekir. 1 saatten daha kısa süre tespit edilen iğne biyopsilerde İHK değerlendirilmesi geçersiz sayılmalıdır (10).

İmmünohistokimyasal boyanma sonrası; kenar etkisi, ezilme veya büzülme artefaktı gösteren kor biyopsiler, normal duktuslarda membranöz boyanma gösteren olgular ile kontrolleri doğru çalışmamış örnekler değerlendirilmez. Membranöz boyanmayı kapayacak kadar sitoplazmik boyanma olan olgular ile ilk sonucu borderline olan olgular tekrarlanmalı veya in situ hibridizasyon yapılmalıdır. En önemli ve dikkat edilmesi gereken noktalardan biri ise, değerlendirmenin yalnızca invaziv tümör sahasında yapılmasıdır (10).

Ayrıca, İHK sonuçları, kullanılan antikor farklılıklarından etkilenir ve sonuçların değerlendirilmesi nispeten subjektiftir yani değerlendiriciler arası değişkenlik gösterebilir. (78, 79) Kullanılacak antikorların, duyarlılık - özgüllük dereceleri, kullanılan antikor dilusyonu ile antijen *retrival* yöntemleri, sonuçları etkileyen diğer parametrelerdir. İHK'nın sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında, değerlendiren kişilerin eğitim ve yeterliliği ile otomatize yöntemlerin kullanılıp kullanılmaması, sonucun subjektifliğini belirleyen değişkenlerdir.

Aslında İHK sanıldan daha güvenilir bir yöntem olup, diğer standart yöntemler ile korelasyonu yüksektir. İHK ile skor 3 olarak değerlendirilen vakalarda ve negatif yani skor 0 veya skor 1 olan vakalarda; İHK ile standart bir yöntem olarak kabul edilen FISH yöntemi arasındaki korelasyon %90'lar civarındadır (13, 14, 15).

2.2.5.10.2 İn Situ Hibridizasyon Yöntemleri

İn situ hibridizasyon yöntemleri, floresan, kromojen veya gümüş ile işaretlenmiş DNA problemleri kullanarak HER-2 gen kopya sayısının farklı şekillerde görselleştirerek tespit edilmesine dayanır.

2.2.5.10.2.1 Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

FISH *frozen*'da kullanılan, southern blot tekniğinin analogudur. HER-2 gen durumunu DNA düzeyinde belirleyen en güvenilir testlerden biridir. Floresanla işaretlenmiş DNA problemleri kullanılır. Örnek ile prob arasında melez bir yapı meydana gelmesi sonucu sinyalizasyon oluşur.

Nick translation yönteminde, DNA-polimeraz-1 kullanılarak, DNA'daki bazı nükleotidler, işaretli analogları ile yer değiştirilir ve böylece DNA problemleri etiketlenmiş olur. Etiketli prob ve tümör örneği ayrı ayrı denatüre edildikten sonra birlikte 37 derecede, 4-16 saat hidridizasyon için inkübe edilir. Hibridizasyon sonrası ortama, etiketlenmiş DNA probunu tanıyan, florofor ile işaretli sekonder antikor eklenir ve böylece istenilen DNA parçası, floresanla işaretlenmiş olur. İstenilen DNA sekansını gösteren floresan belirteçler, floresan mikroskopunda sayılır ve gen amplifikasyonu olup, olmadığına karar verilir.

Tek renk FISH yönteminde, tek renk floresan boya ile işaretlenmiş, 1 çeşit DNA probu kullanılır. Bu yöntem, nükleus başına düşen ortalama HER-2 gen kopya sayısını tespit eder. Bu oran büyük 6 ise vaka amplifikasyon açısından pozitif; küçük 4 ise vaka amplifikasyon açısından negatif kabul edilir. Çift renkli FISH de ise iki farklı renkte floresan boya ile işaretlenmiş iki DNA probu kullanılır. Ortalama 60 nükleus sayılır ve HER-2/ CEP17 oranı hesaplanır. Bu oran, büyük 2.2 ise vaka amplifikasyon açısından pozitif; küçük 1.8 olduğu durumda vaka amplifikasyon açısından negatif kabul edilir.

FISH doku hazırlama aşamalarından az etkilenir ve kantitatifdir. FISH ile tespit edilen yüksek amplifikasyon veya İHK ile skor 3(+) olan vakalar, tümörün HER-2 durumunu klinik ve biyolojik olarak optimal ifade eder (80).

FISH ile İHK ile skor (+)3 pozitif olan olguların korelasyonu mükemmel iken; skor (+)2 olan vakalarda FISH ile tespit edilen gen amplifikasyonu oranı %25'tir (13, 80).

FISH'in deavantajları; flöresan mikroskop kullanmak zorunluğu olduğundan, karanlık sahada doku morfolojisini değerlendirme güçlüğü, pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olması ile floresan sinyallerin solması nedeniyle, arşivlenememesi şeklinde sayılabilir (11). FISH kayıtları için yalnız fotoğraf arşivi oluşturulabilir. Floresan mikroskopları tek başlı olduğundan yeni patologların yetiştirilmesinin güç olması veya vakaların mikroskop başında tartışılmaması diğer deavantajlarıdır.

2.2.5.10.2.2 Kromojen İn Situ Hibridizasyon (CISH)

Her-2/neu'ya karşılık komplementer işaretli probe kullanmak suretiyle gen kopya sayısını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. İşaret için digoksinin veya biotin kullanılabilir. İmmünohistokimiyadaki saptama yöntemine benzer bir yöntem kullanılarak sonuç elde edilir. HRP (horse redish peroksidaz) ile H₂O₂ substrat sistemi ve DAB kromojen kullanılır. Düşük amplifikasyonda, tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında, nükleus başına 6-10 intranükleer noktalama; yüksek amplifikasyonda ise nükleus başına 10'dan fazla sinyal izlenmesi gerekir. CISH skorlaması sırasında, 6 değerinin cut off

olmasının nedeni her nükleus başına zaten ortalama 3-5 HER-2 gen kopyasının bulunduğu şeklindeki ampirik gözleme dayanmaktadır. Ama Kromozom 17 (Kr-17) polizomisine bağlı 6 dan fazla kopya olması durumunda yanlış pozitifliğe veya monozomik bir hücrede 4 kopya sayısına bağlı yanlış negatifliğe neden olabilir. FISH ile CISH arasında iyi bir korelasyon mevcuttur (81, 82).

CISH, normal ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilir. Bu nedenle, gen kopya sayısı ve morfolojik değerlendirme arzu edilen hücre gruplarında yapılabilir. Ayrıca sinyaller solmadığından, preparatlar kalıcı bir şekilde saklanabilir. Bazı yazarlar, FISH kadar duyarlı olmadığını belirtmiştir. Bir deavantajı da, arada kalınan vakalar için Kr-17 düzeyi araştırılmak amaçlı ikinci bir preparatın boyanması gerekliliğidir.

2.2.5.10.2.3 Silver Enhanced In Situ Hibridizasyon (SISH)

Metallografiye dayalı yöntemlerden biridir. Otometallografiye dayalı yöntem, yani nanagold ile yapılan gold enhanced in situ hibridisation yöntemine, GOLDFISH; Enzim metallografiye dayalı; silver enhanced in situ hibridisation yöntemi; SISH olarak adlandırılır.

Bir olgudaki HER-2 durumu, invaziv kanserdeki her hücredeki, HER-2 gen kopya sayısının; kromozom 17 kopya (Kr-17, Chr17) sayısına oranlanması ile tespit edilir. Tümöre ait bir kesit üzerinde invaziv tümöral alan HER-2 DNA probu ile; aynı tümör kesitinden hazırlanmış diğer preparat ise Kromozom 17 probu ile Silver enhanced in situ hibridizasyon yöntemi kullanılarak işaretlenir.

Dinitrofenol ile işaretli DNA probları kullanılır. Önce primer antikor olarak dinitrofenole karşı 'rabbit-anti DNP' antikoru ile inkübe edilir. Sonra, horseredish peroksidaz ile işaretli 'goat antirabbit-HRP' olan sekonder antikor ile inkübe edilir. HRP, H₂O₂, hidroquinon ve silver asetat ile reaksiyona girerek; metalik partiküllerin oluşmasını sağlar. Enzim gümüş iyonlarının metalik gümüşe indirgenmesine yolaçar. Hibridizasyon olan hedef bölgede, 1 kopyaya karşı 1 partikül (granül) şeklinde metal nanopartikülleri birikir.

Böylece, HER-2 gen durumu; x20, x40 veya x60'luk objektifler ile ışık mikroskobunda kromozomal düzeyde tespit edilebilir.

Bu sinyallerin sayımı için öncelikle hedef saha seçimi yapılmalıdır. Sayım, invaziv karsinom alanında yapılmalıdır, in situ karsinom alanında yapılmaz.

SISH ile boyanmış camlarda yeterlilik değerlendirilirken, tümör içinde ve/veya komşuluğunda internal pozitif boyanma görülmelidir. Pozitif kontrol için lenfositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, makrofajlar kullanılabilir. Bazı vakalarda HER-2/ Kr17 nin

tek kopyayı temsil eden noktasının büyüklükleri farklı olabilir, bu granül büyüklükleri de pozitif kontrollerle kıyaslamalıdır. Pozitif kontrol tüm hücrelerde trunkasyon artefaktı yüzünden görülmeyebilir. Görülebilen hücrelerde, hücre başına 1-2 kopya şeklinde, normal HER2 ve Kr17 sinyalleri bulunmalıdır. Benzer şekilde, trunkasyon artefaktına bağlı olarak tüm karsinom hücrelerinde de sinyal görülmeyebilir. Dolayısı ile sayım için zayıf veya yeterince sinyalizasyon yoksa, aynı camdaki komşu alanlara geçip sayım yapılır.

Tümörler HER2 açısından heterojen hücrelerden meydana gelir; bu nedenle, genel tümör hücre popülasyonunu temsil eden ve ortalama en yüksek sinyal sayısına sahip nükleuslar sayılmalıdır. Dev- iri nükleuslar, çok küçük nükleuslar, zayıf boyananlar, sıkışmış veya üst üste binmiş olanlar ile nekrotik nükleuslar sayılmaz. Sinyaller sayılırken her noktadan 1 puandır fakat granüllerin kümelenmesi halinde:

- Küçük küme (*cluster*) şeklindeki sinyalizasyon; 6 puan alır
- Büyük küme şeklindeki sinyalizasyon ; 12 puan alır

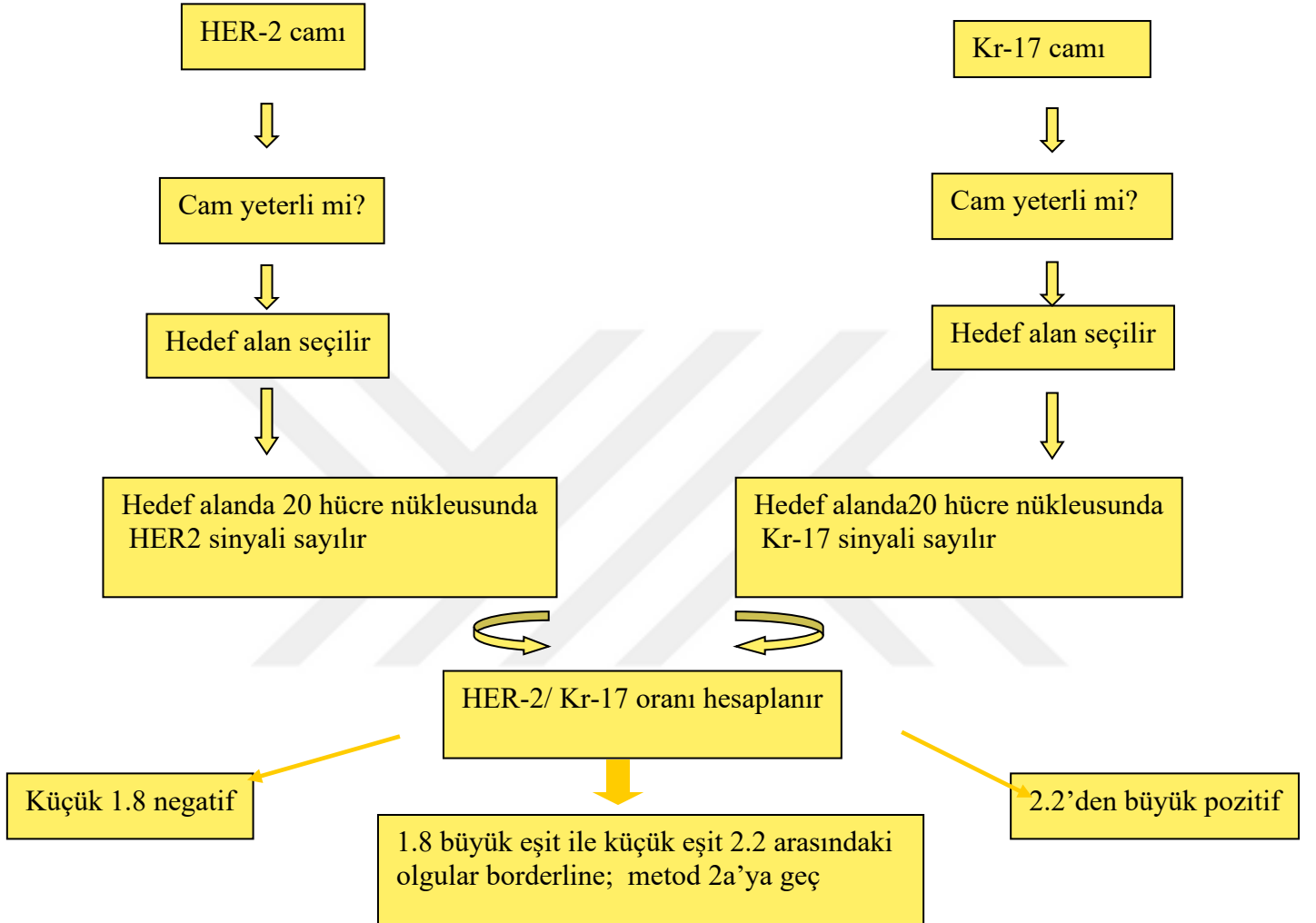
Sinyaller sayılırken öncelikle semikantitatif metod (Metod -1) kullanılır. Bu yöntemde, semikantitatif olarak ortalama HER-2 ve Kr-17 sinyal sayısına karar verilir ve bunlar oranlanır. Bu oranlar şu şekilde yorumlanır:

1. $HER/Chr17 < 1.4$ ise HER2 gen amplifikasyonu için negatiftir.
2. $1.4 \leq HER/Chr17 \leq 4$ ise HER2 gen amplifikasyonu için borderline
3. $HER/Chr17 > 4$ ise HER2 gen amplifikasyonu için pozitifdir.

Metod 1 ile borderline çıkan olgularda, metod 2'ye geçilir. Metod 2 (şekil 3) kantitatif metoddur. Bu metod uygulanmadan önce yine HER-2 ve Kr-17 cam yeterlilikleri değerlendirilir. Camların yeterliliği doğrulandıktan sonra, invaziv tümöral alanda, uygun hedef alanda, 20 hücrede HER-2 sinyalleri sayılır. Sonra aynı alanda 20 hücrede Kr-17 sinyalleri sayılır ve HER-2 sinyallerinin Kr-17 sinyallerine oranı hesaplanır. Bu oran 1.8'den küçük ise olguda gen amplifikasyonu yoktur. Bu oran büyük 2.2 ise olguda gen amplifikasyonu vardır. Oranın, büyük eşit 1.8 ile küçük eşit 2.2 arasında olması halinde metod 2a'ya geçilir.

Metod 2a'da metod 2'deki 20 hücreye ek olarak, uygun komşu bir sahada, 20 hücrede daha (toplam 40 hücrede) HER-2 ve Kr-17 sinyali sayılır. Benzer şekilde, bu oran 1.8'den küçük ise olguda gen amplifikasyonu yoktur. Bu oran büyük 2.2 ise olguda gen amplifikasyonu vardır. Oranın, büyük eşit 1.8 ile küçük eşit 2.2 arasında olması halinde olgu tartışmalı yani borderline'dır (83). Borderline kabul edilen olgulardan oran 2'nin üzerinde olanlarda ilaç tedavisi kullanılabilir (10).

Şekil-2 HER-2 gen amplifikasyonunun SISH ile değerlendirilmesi, kantitatif metod, Metod 2



SISH'in optimizasyonu için cerrahi materyalin, %10'luk tamponlu formalin fikse edilmesi ve örnek kalınlığının 4 mikron olması önerilir. Şu durumlarda test geçersizdir:

- *Xenograft* kontrol camlarında HER2 boyanması yoksa
- HER2 ve/veya Chr 17'de boyanmanın zayıf olması veya boyanma olmaması
- Kontrast boyanmanın olmaması veya zayıf olması
- Kuruma artefaktı
- Nonspesifik boyanma-nükleer dust
- Pozitif kontrolde zayıf/ hiç boyanma

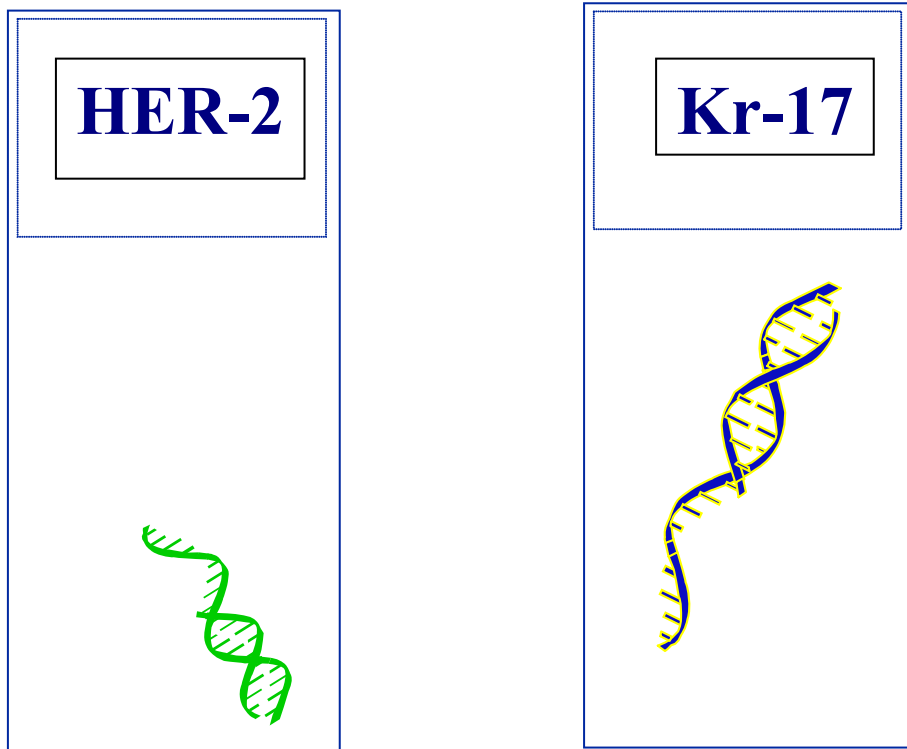
SISH ile rutin takibe girmiş dokularda veya arşivlenmiş parafin bloklarda çalışma yapılabilmesi, ışık mikroskopunda değerlendirildiğinden invaziv tümöral sahanın

seçiminin kolay olması, çok başlı ışık mikroskopları sayesinde, olguların tartışılabilir ve yeni patoloğların yetiştirilebilir olması, gümüşle işaretlenmiş olan preparatların saklanabilmesi ve boyanma süreci otomatize olduğundan güvenli olması, en önemli avantajlarıdır. Ayrıca tek gen kopyalarını yüksek sensitivite ile tespit etmesi, DNA hedeflerini yüksek çözünürlük ile göstermesi ve zemin ile güçlü kontrast sayesinde sinyallerin rahat okunması da bunlar arasında sayılabilir. (84)

Ayrıca SISH, ASCO/CAP guideline'ın önerdiği; Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ile % 95 uyumlu olma kriterine uygundur. (17, 85, 86)

Brightfield Double In Situ Hibridizasyon ise, silver enhanced in situ yönteminin benzeri olup, HER-2 sinyalleri aynı şekilde oluşturulur ve siyah benekler şeklinde preparatta belirlenir. Kr-17 sinyalleri oluşturmak için ise, primer antikor olarak Alkalen Fosfataz işaretli goat anti-rabbit antikor kullanılır ve reaksiyon naftil fosfat + fast red ile gerçekleştirilir. Bu reaksiyon sonucunda Kr-17 sentromeri kırmızı ve daha iri benekler şeklinde görünür hale gelir. SISH'in avantajlarına ek olarak, aynı tümör hücresinde, HER-2 geni ve Kr-17 sentromeri işaretlenmiş olur. (87)

Şekil 3: SISH yönteminde, iki ayrı preparatta HER-2 gen ve Kr-17'nin gösterilmesi



2.2.5.10.3.1 Kromozom 17 polizomisi

Amplifikasyon kromozomun ampikon olarak adlandırılan bir segmentinin tekrarlanması iken; anöploidi kromozomun tümünün sayısındaki değişikliği ifade eder ve genellikle mitoz sırasındaki yanlış ayrılardan kaynaklanır (79).

Kromozom 17 polizomisi, kullanılan yöntem ve çalışılan materyale göre değişmek koşulu ile, meme kanserinde yaklaşık 1/ 3'ünde bulunur ve İHK ile skor 2 boyanan olguların 3/ 4'ünde mevcuttur (79). Bu da, HER-2 durumunu değerlendiren testlerde karışıklığa neden olabilir ve muhtemelen İHK ile genetik amplifikasyonu değerlendiren testler arasındaki diskorelasyonun nedenlerinden biridir (88, 89). Bazı yazarlar Kr-17 polizomisinin HER-2 mRNA veya protein overekspresyonuna neden olmadığını (79) bir kısmı ise ekspresyonda Kr-17 polizomisinin katkısını sınırlı bulmuştur (89).

226 kişilik vaka serisi üzerine yapılan bir çalışmada, FISH ile net HER-2 kopya sayısı değerlendirilerek veya HER-2/ Kr-17 oranı hesaplanarak, borderline olan tüm olgularda Kr-17 polizomisi tespit edilmiştir. Ayrıca polizominin tek başına HER-2 protein overekspresyonuna neden olmadığı veya revers transkriptaz- PCR ile bakılan HER-2 mRNA düzeyinde artışa neden olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, Kr-17 polizomisi ile artmış tümör grade'i, steroid reseptör negatifliği veya azalmış hastalıksız sağkalım arasında ilişki olmadığı belirtilmiştir. Dolayısıyla, Kr-17 polizomisi görülen tümörler, HER-2 negatif tümörlere daha çok benzemektedir. Polizomik olguların HER-2 hedefli tedaviden fayda görüp görmeyeceklerini ise henüz üzerine klinik çalışma yapılması gereken bir alandır (88). İHK ile skor 3 boyanma olan, high polizomi olgularında, Trastuzumab'a yanıt olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (79).

189 vakalık başka bir çalışmada ise; HER-2 protein ekspresyonun en yüksek korelasyonu HER-2 gen kopya sayısı ile gösterdiği tespit edilmiştir. Daha az olarak HER-2/Kr-17 oranı ile korelasyon göstermektedir. HER-2 protein ekspresyonunda Kr-17 polizomisinin katkısı ise sınırlı bulunmuştur (89).

415 serilik bir çalışmada, İHK ile pozitif boyanan hücre miktarına, FISH ile HER-2 amplifikasyonuna ve Kr-17 polizomisi bakılmıştır. 77 olguda polizomi tespit edilmiş olup, polizominin pozitif boyanan hücre miktarı ile korele olduğu fakat HER-2 amplifikasyonu

ile korelasyon göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca amplifikasyon olmayan ve Kr-17 polizomisi izlenen gruptaki olgularda, HER-2 amplifikasyonu olan gruba göre belirgin iyi biyolojik özelliklere sahip tümör varlığı dikkati çekmiştir (90).

2.2.5.11. Tanı Anında Hasta Yaşı:

Tanı anında 50 yaş altında olan kadınlar en iyi prognoza sahip olanlardır. (51) Amerikan ulusal kanser enstitüsü (NCI) *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) programında 1973 ve 1998 yılları arasında tanı almış hastalarda tümör boyutu, grade ve ırkın hastalıksız sağkalım için sabit olarak etkili olduğu ancak tümör evresi ve tanı anında hasta yaşının zamanla değişen etkisi olduğu gösterilmiştir (91). Ayrıca yapılan çalışmalarda bu konuda birbirinden farklı ve hatta birbirine zıt sonuçlar bildirilmiştir. Gençlerde prognoz daha kötü olduğunu (92) veya gençlerde prognoz daha iyi olduğunu (93) ileri süren yayınlar mevcuttur. Bazı yayınlarda ise yaşla prognoz arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (94).

2.2.5.12. Gebelik:

Gebelikte veya laktasyon döneminde gelişen meme kanserleri, genelde düşük steroid reseptör ekspresyonu, yüksek HER-2 ekspresyonu olan, daha kötü prognoza sahip tümörlerdir (51). Gebelik döneminde memenin fizyolojik özellikleri nedeniyle küçük tümörleri saptamak zordur ve genelde gebe hastalar daha ileri evrelerde yakalanabilmektedir (18).

2.2.5.13. Bilateralite:

İnvaziv meme karsinomu tanısı alan bir hastanın, karşı taraf memesinde karsinom görülme olasılığı, normal popülasyona göre 5 kat daha olup, aile öyküsü olanlarda bu oran daha da fazladır. Lobüler karsinomda bu oran, %25- 50 olabilir. (51) Senkron bilateral meme karsinomu görülen hastalar, tek taraflı karsinom görülenlere göre daha yaşlı olma eğilimindedir. (3) Meme kanserlerinin küçük bir grubunu oluşturan, bilateral senkron meme kanserlerinde HER-2 amplifikasyonuna yönelik yapılan 58 vakalık bir çalışmada, bilateral senkron meme karsinomu olgularında %71 oranında HER-2 overekspresyonu izlenirken; tek taraflı invaziv karsinom olgularında HER-2 overekspresyonu %34.7 bulunmuştur. Aradaki fark istatistiki olarak anlamlı olduğundan bu bulgular ile, senkron meme karsinomlarındaki artmış mortalitenin, artmış HER-2 ekspresyon insidansına bağlı olabileceği belirtilmiştir. (95)

2.2.6. Meme Kanserinde Evreleme

Meme karsinomunda, en çok kullanılan evreleme sistemi, *International Union against Cancer* (UICC) ve *American Joint Commission on Cancer* (AJC) ortak oluşturdıkları; tümör boyutu (T), lenf nodu (N) ve metastaz durumu'nu (M) ifade eden 'TNM' sistemidir. (51) Amerika Birleşik Devletlerinde NCI tarafından yürütülen SEER programı 1988- 2001 yılı verilerine göre, 302763 hastanın 5 yıllık takibine dayanan istatistiklerde, relatif sağ kalım oranları; Evre 0 ve Evre 1 hastalarda %100, Evre 2 hastalarda %86, Evre 3 hastalarda, %57 ve Evre 4 hastalarda %19.9 bulunmuştur. (96)



Tablo 6: Meme kanserlerinde TNM evreleme sistemi

<u>Primer tümör (T)</u> TX: Primer tümör değerlendirilemiyor T0: Primer tümöre ait bulgu yok Tis: Tis(DCIS), Tis(LCIS), Tis(Paget) T1: Tümörün en büyük çapı ≤ 2 cm T1mic Mikroinvazyon (en büyük çapı ≤ 0.1 cm) T1a: 0.1 cm $<$ en büyük çapı ≤ 0.5 cm T1b: 0.5 cm $<$ en büyük çapı ≤ 1 cm T1c: 1 cm $<$ en büyük çapı ≤ 2 cm T2: 2 cm $<$ tümörün en büyük çapı ≤ 5 cm T3: Tümörün en büyük çapı > 5 cm T4: Tümörün çapına bakılmaksızın, aşağıda belirtilen şekillerde, göğüs duvarına veya cilde direkt uzanım varsa T4a: Göğüs duvarına ulaşmış T4b: Meme derisinde ödem (peau d'orange dahil) veya ülserasyon veya aynı memede satelit deri nodülleri T4c: T4a ve T4b birlikte T4: İnflamatuvar karsinom <u>Bölgesel lenf nodları (N)</u> NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok N1: Aynı taraf aksillada, hareketli (sabit olmayan, çevreye yapışık olmayan) lenf nodlarında metastaz N2: Aynı taraf aksillada, hareketsiz lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı yokluğunda, klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammary lenf nodlarında metastaz N2a: Birbirine veya çevre yapılara yapışıklık gösteren aksiller lenf nodlarında metastaz N2b: Klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı yokluğunda sadece klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammary lenf nodlarında metastaz N3: İpsilateral infraklavikuler veya supraklavikuler lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin internal mammary lenf nodları ve aksiller lenf nodlarında birlikte metastaz N3a: İnfraklavikuler lenf nodlarında metastaz N3b: Aksiller ve internal mammary lenf nodlarında birlikte metastaz N3c: Supraklavikuler lenf nodlarında metastaz	<u>Uzak metastaz (M)</u> MX: Uzak metastaz değerlendirilemiyor M0: Uzak metastaz yok M1: Uzak metastaz var <u>Bölgesel lenf nodları (pN)</u> pNX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor pN0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok pN1mi: Mikrometastaz (0.2 mm $<$ tümörün en büyük çapı ≤ 2 mm) pN1: 1-3 ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz ve/veya kln.olarak belirgin olmayan fakat sentinal lenf nodu diseksiyonu ile saptanan internal mammary lenf nodlarında metastaz pN1a: 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz (en az birinin en büyük çap >2 mm) pN1b: Sentinal lenf nodu diseksiyonu ile saptanan internal mammary lenf nodlarında metastaz pN1c: pN1a ve pN1b birlikte pN2: 4-9 ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodu metastazı yokluğunda, klinik olarak belirgin internal mammary lenf nodlarında metastaz pN2a: 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (en az birinin en büyük çapı >2 mm) pN2b: Aksiller lenf nodu metastazı yokluğunda, klinik olarak belirgin internal mammary lenf nodlarında metastaz pN3: ≥ 10 ipsilateral aksiller lenf nodunda veya ipsil. infraklavikuler lenf nodlarında veya klinik olarak belirgin internal mammary lenf nodları beraberinde aksiller lenf nodlarında veya kln. olarak belirgin olmayan internal mammary lenf nodları beraberinde 3'ten fazla aksiller lenf nodunda veya ipsilateral supraklavikuler lenf nodlarında metastaz pN3a: ≥ 10 aksiller lenf nodunda (en az 1'inin en büyük çapı >2 mm) veya infraklavikuler lenf nodlarında metastaz pN3b: Klinik olarak belirgin internal mammary lenf nodları beraberinde en az 1 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya klinik olarak belirgin olmayan internal mammary lenf nodları beraberinde 3'ten fazla aksiller lenf nodunda metastaz pN3c: Supraklavikuler lenf nodlarında metastaz
--	---

2.2.7. Meme Kanserinde Tedavi

Meme kanser tedavisi, cerrahi, hormonoterapi, kemoterapi ve radyoterapiyi içerir. Günümüzde cerrahi tedavide, modifiye radikal mastektomi, radikal mastektomi, basit mastektomi ve parsiyel mastektomi (lumpektomi, segmentektomi) gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır (47, 51).

Erken evre meme kanserleri geniş ve mulifokal ise mastektomi, küçük ise meme koruyucu cerrahi yapılır. Tümörün ne kadar zaman boyunca bulunduğunu gösteren tümör boyutu ve agresifliğine işaret eden, lenf nodu tutulumu ile yüksek grade, erken relaps ile birlikte olduğundan, bu hastalara sistemik hormonoterapi veya kemoterapi verilir. HER-2 pozitif olan ileri evre metastatik meme CA tedavisinde, bu reseptörü hedef alan monoklonal antikor (MAb) olan ‘transtuzumab’ (herceptin: Genentech, South San Francisco, CA) geliştirilmiştir. (6) Transtuzumab’ın, 1998’de FDA tarafından, metastatik meme karsinomu tedavisinde kullanımı kabul edilmiştir. (10) Ülkemizde ise, 2005 yılında, Sağlık Bakanlığı tarafından, metastatik hastalığı için bir veya daha çok kez kemoterapi gören hastaların tedavisinde tek ajan olarak veya metastatik hastalığı için kemoterapi görmemiş hastaların tedavisinde taksanlarla kombine olarak kullanımını onaylamıştır.

Yapılan bir çalışmada, 234 hastaya standart kemoterapi verilmiş; 235 HER-2 amplifikasyonu olan hastaya ise standart kemoterapiye ek olarak tedavi protokolüne transtuzumab eklenmiştir. Çalışma sonucunda, transtuzumab eklenen , metastatik meme karsinomlarında, tedaviye yanıt oranlarında, yanıt süresinde, progresyon zamanı ve hayatta kalım oranlarında artış tespit edilmiştir (97). İleri evre metastatik meme tümörüne ek olarak, erken evre meme tümörlerinde de adjuvant kullanımının, 1/2 ile 1/3 oranında mortalite ve rekürrens riskini azalttığı gösterilmiştir (98).

Transtuzumab proteine bağlanarak, her-2 nun güçlendirdiği tümör hücre büyümesini durdurur.

HER-2 pozitifliği ile endokrin tedaviye direnç arasında rölatif bir ilişki vardır. (99) Bunun yanında, HER-2 pozitifliği ile nontaxane ve non antrasiklin tedavilere rölatif direnç varken; HER-2 amplifikasyonu olan hastalarda, tedavinin direk hedefi olan topiizomeraz-2 koamplifikasyonu olduğundan, antrasiklin bazlı kemoterapi rejimlerine yanıt iyidir. Fakat transtuzumabın en önemli yan etkisi, antrasiklinlerle ortak olan kardiyotoksitedir. Sınırlı bir takip süresine rağmen, transtuzumab tedavisi almış olan hastaların %0.5-4.1’inde semptomatik kardiyak yetmezlik görülmüştür (100).

İmmünohistokimya ile skor 0 veya 1 tespit edilen ve/veya gen amplifikasyonu olmayan olgularda tedaviye transtuzumab eklenmesinin önemli istatistiksel yararı yoktur.

Bununla birlikte, sıklıkla triple negatif (ER-negatif, PR-negatif, c-erbB-2-negatif) özellikte olan bazal fenotipteki invaziv meme kanserlerinde, hormonal terapi ve trastuzumab tedavisi efektif değildir (101). Bu tümörlerde sıklıkla EGFR (HER1) ekspresyonu görülür ve bu nedenle HER1'i hedef alan, küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri ve terapötik antikorlar (cetuximab) gibi çeşitli yeni ilaçlar geliştirilmektedir.



3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırma Grubunun Tanımlanması

Bu çalışmada, Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde ekim 2007 ile şubat 2008 arasında, bölümümüzce primer tümörü değerlendirilerek invaziv meme karsinomu tanısı almış veya dış merkezlerden konsülte edilmiş ve tarafımızdan tekrar değerlendirilmiş, immünohistokimyasal olarak HER-2 durumu, Cerb-B2 skor 2 olan, toplam 83 olgu incelenmiştir. Bu grupta, primer tümörü bizim tarafımızdan değerlendirilen 64 tane modifiye radikal mastektomi ve aksiller diseksiyon yapılmış olgu, 6 tane eksizyonel biyopsi materyali, 4 tane insizyonel biyopsi materyali, 3 tane ise metastatik lenf nodu eksizyonu mevcuttur. Primer tümörü bizim tarafımızdan değerlendirilmiş, modifiye radikal mastektomi ve aksiller diseksiyon yapılmış olgulardan 1 tanesi medüller karsinom, 4 tanesi mikst invaziv lobüler ve invaziv duktal karsinom, geri kalanı ise invaziv duktal karsinom -NOS- tanısı almıştır. Eksizyonel biyopsi materyallerinin tamamı invaziv duktal karsinom, insizyonel biyopsi materyallerinden 1 tanesi invaziv lobüler karsinom, 3 tanesi invaziv duktal karsinom tanısı almıştır. Eksize edilmiş olan metastatik lenf nodlarının, 1'ine mikropapiller karsinom metastazı, 2'sine karsinom metastazı tanısı verilmiştir. 6 tane olgu ise dış merkezden konsülte edilmiş ve tekrar değerlendirilmiş eksizyonel biyopsi materyalidir. Bu olgulardan, 1'i invaziv mikropapiller karsinom, 1'i invaziv lobüler karsinom, 4'ü invaziv duktal karsinom tanılıdır.

İlk aşamada, 83 adet, İHK ile CerbB2 skor 2 olarak değerlendirilen olguda hangi oranda SISH yöntemi ile HER-2 amplifikasyonu olduğu araştırılmıştır. Daha sonra ise, lenf nodu metastazı eksizyonu dışındaki 80 olgu, SISH yöntemi ile HER-2 amplifikasyonu olan ve olmayan olarak kategorize edilmiş ve bu gruplar hasta yaşı, tümör boyutu, histolojik grade, nükleer grade, mitoz skoru, nekroz varlığı, lenfovasküler invazyon varlığı, steroid reseptör durumu ve lenf nodu metastaz varlığı ile sayısından oluşan prognostik parametreler yönünden geriye dönük olarak incelenmiştir. Ayrıca SISH yöntemi ile Kr-17 polizomisi tespit edilen olgular da , olmayanlarla benzer olarak yukarıda sayılan prognostik parametreler bakımından karşılaştırılmıştır..

3.2 Histomorfolojik Değerlendirme

Bölümümüzce primer tümörleri değerlendirilmiş olgular, %10'luk tamponlu nötral formalinde, 6-12 saat fikse edilmiş, rutin takip işlemi sonrası parafin bloklara gömülmüş ve 5 mikron kalınlığında kesitler alınıp rutin olarak hematoxilen eozin ve

immünohistokimyasal olarak ER, PR ve CerbB2 ile boyanmıştır. Olgulara ait tüm hemotoksilen eozin (HE) boyalı preparatlar incelenmiş ve belirtilen klinikopatolojik parametreler yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca, CerbB2 çalışılmak üzere seçilmiş en uygun bloktan hazırlanan adhezivli camlara 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak, Ventana BenchMark otomatik preparat boyayıcı ile SİSH boyanmıştır. SİSH protokolü: 1- Kr-17 boyanması sırasınca şu şekildedir; deparafinizasyon, sitrat muamelesi, İSH proteazla inkübasyon, Kr-17 probunun eklenmesi ve hibridizasyon için inkübasyon, Silver C ile inkübasyon, kontrast boya olarak hematoksilen ile inkübasyon ve kontrast boyanma sonrası bluing ile inkübasyon. 2- HER-2 boyanması; deparafinizasyon, sitrat muamelesi, ISH proteaz ile inkübasyon, HER-2 DNA probu ile hibridizasyon için inkübasyon, Silver C ile inkübasyon, hematoksilen ile kontrast boyama ve kontrast boyama sonrası bluing ile inkübasyon basamaklarından oluşur. Proteaz süreleri ve DNA problemleri ile olan inkübasyon süreleri, doku morfolojisi korunarak, sinyallerin görünür kılındığı optimal süre olacak şekilde her materyal için ayarlanmıştır.

Dış merkezden bölümümüze konsülte edilen vakaların raporları, hazır bloklardan elde edilen ve/veya ilgili merkezce gönderilmiş HE boyanmış tüm preparatları incelenmiştir. Bu olgulara İHK çalışılarak c-erbB2 skorları 2 olarak doğrulanmıştır. Hazır gönderilen bloklardan, adhezivli camlara 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak SİSH çalışılmıştır.

Histomorfolojik parametreler aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir:

3.2.1 Tümör Boyutu

Tümörlerin en büyük çapları (cm) alınmış ve ilk olarak aşağıdaki gibi gruplanarak incelenmiştir.

1. ≤ 2 cm
2. 2,1-5 cm
3. 5 cm

Olgular daha sonra, tümör boyutu ≤ 5 cm ve tümör boyutu > 5 cm şeklinde iki grup halinde incelenmiştir.

3.2.2 Tümör Histolojik Grade

Tümörler öncelikle modifiye Bloom-Richardson sistemi kullanılarak üç grupta incelenmiştir.

1. Grade 1

2. Grade 2

3. Grade 3

Daha sonra ise, grade 1 ve grade 2 tümörleri içeren gruplar birleştirilerek düşük grade'li tümör grubu ve Grade 3 tümörler yüksek grade'li tümör grubu şeklinde tekrar kategorize edilmiştir.

3.2.3 Nükleer Grade

Tümörler ilk aşamada modifiye Bloom-Richardson sisteminin bir bileşeni olan nükleer pleomorfizm derecesine göre üç gruba ayrılmıştır.

1. Skor 1: Küçük, regüler, uniform hücreler
2. Skor 2: Boyut ve değişkenlikte orta derecede artış
3. Skor 3: Belirgin boyut ve şekil farklılığı

Daha sonra ise, skor 1 ve skor 2 nükleer grade'e sahip gruplar birleştirilerek düşük nükleer grade'li tümör grubu ve nükleer grade'i 3 olanlar ise yüksek nükleer gradeli tümör grubu şeklinde tekrar kategorize edilmiştir.

3.2.4 Mitoz Skoru

Tümörün periferik kısımlarında ve en fazla mitoz bulunan alandan başlanarak ardışık 10 büyük büyütme sahasında (Olympus BX51, x400, görüntü alan çapı 0,55 mm) mitoz sayılmıştır. Mitoz skoru önce 3 grupta incelenmiştir.

1. Skor 1: ≤ 8 mitoz
2. Skor 2: 9-17 mitoz
3. Skor 3: ≥ 18 mitoz

Daha sonra ise, skor 3 ve skor 2 mitotik skora sahip tümör grupları birleştirilerek yüksek mitotik skora sahip grup oluşturulmuştur. Skor 1 grup ise düşük mitotik skora sahip grup olarak kabul edilerek yeni bir kategorizasyon yapılmıştır.

3.2.5 Tümör Nekroz Varlığı

Tümör nekroz varlığı herhangi bir 'cut off' değeri veya derecelendirme kullanılmadan iki grupta incelenmiştir.

1. Tümör nekrozu var
2. Tümör nekrozu yok

3.2.6 Lenfovasküler İnvazyon

Tümörün lenfovasküler invazyonu HE boyalı kesitlerde incelenmiştir. İnceleme tümör kitlesinin periferinde yapılmıştır. Lenfatik ve kan damarı ayırımı yapılmaksızın endotelle döşeli boşluklarda tümör hücre varlığı değerlendirilmiştir. Şüpheli bazı vakalarda CD31 immünohistokimyasal boyasıyla, damar duvarında boyanma ile lenfovasküler invazyon varlığına karar verilmiştir. Lenfovasküler invazyon varlığı iki grupta incelenmiştir.

1. Lenfovasküler invazyon var
2. Lenfovasküler invazyon yok

3.2.7. Lenf Nodu Metastazı

Lenf nodu metastaz varlığına ve metastaz olan lenf nodlarının sayısına göre dört grupta incelenmiştir.

- Metastaz durumu bilinmiyor
- Metastaz yok
- Metastaz içeren lenf nodu sayısı ≤ 3
- $4 \leq$ Metastaz içeren lenf nodu sayısı ≤ 9
- Metastaz içeren lenf nodu sayısı ≥ 10

3.3 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal çalışma, tümörü primer olarak bizim tarafımızdan değerlendirilmiş, %10'luk tamponlu formalinde fikse edilmiş dokuların parafin bloklarından hazırlanan veya dış merkezden gönderilmiş hazır parafin bloklardan elde kesitlerde yapılmıştır. Bu kesitlerü 1 gecelik 37 C'de etüvde deparafinizasyonu sonrası, Ventana otomatik preparat boyayıcısıyla boyanmıştır.

İnternal pozitif kontrolü olmayan tüm boyanacak perapatlara, boyanacak doku dışında, başka bir adehezivli cama veya aynı adehezivli cama, boyaya özgü pozitif kontrolü temsil eden dokudan örnek alınmıştır .

ER ve PR için invaziv tümöral alandaki nükleer boyanmaların şiddet ve yüzdesi değerlendirilmiş, CerbB2 skorlaması ASCO/CAP 2007 önerileri doğrultusunda, membran boyanmalar değerlendirilerek yapılmıştır (10).

ER için boyanma olmaması veya %10'un altında invaziv tümöral hücrelerde nükleer boyanma olması, PR için boyanma olmaması veya %5'in altında invaziv tümöral hücrelerde nükleer boyanma olması negatif olarak kabul edilmiştir. ER ve PR için kontrol olarak meme tümörü ve ayrıca internal kontrol olarak normal meme asini ve

duktuslarındaki lüminal epitel hücreleri, C-erbB-2 için kontrol olarak meme tümörü kullanılmıştır.

C-erbB-2 için, ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists) tarafından uygulanan HER2 protein ekspresyon klasifikasyonu kullanılarak skora yapılmıştır. Buna göre; tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında ve %30'unun altında, zayıf veya uniform olmayan yoğunlukta komplet membranöz boyanma olan olgular skor 2 kabul olarak değerlendirilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 7: Kullanılan primer antikorların özellikleri

PRİMER ANTİKOR	KLON, TİP	DİLÜSYON	FİRMA	BOYANMA PATERNİ
ER	SP1, RABBİT MONOKLONAL	1/200	NEOMARKERS	NÜKLEER
PR	SP2, RABBİT MONOKLONAL	1/400	THERMO SCIENTIFIC	NÜKLEER
C-ERB-B2	NEU AB 12	1/150	THERMO SCIENTIFIC	MEMBRANÖZ

3.4 Silver İn Situ Hibridizasyon ile HER-2/ Kr-17 ile Boyama ve Değerlendirme

%10'luk tamponlu formalinde fikse edilmiş dokuların parafin bloklarından, hormon reseptörleri ile CerbB2 boyama yapılmış olanlar seçilerek, adezivli camlara alınan kesitler, 1 gecelik 37 C'de etüvde deparafinizasyon sonrası, Ventana BechMark XT otomatik preparat boyayıcısıyla (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona) farklı protokoller ile boyanmıştır.

Boyanma sonuçları, invaziv tümöral sahada, ışık mikroskopunda (20x, 40x objektif), üretici firmanın klavuzuna uygun olarak, semikantitatif yöntem (metod 1) veya kantitatif

yöntemle (metod 2 veya metod 2a) değerlendirilmiştir. Sinyaller sayılırken her noktalanma 1 puan olarak sayılmıştır fakat granüllerin kümelenmesi halinde:

- ✓ Küçük küme (*cluster*) şeklindeki sinyalizasyon; 6 puan
- ✓ Büyük küme şeklindeki sinyalizasyon ; 12 puan verilmiştir

Semikantitatif yöntemde, hedef sahada, 20 hücrede, *ortalama* HER-2 ve Kr-17 sinyal sayılarına karar verilmiş ve bu sayılar oranlanmıştır. Bu oranlar sonucunda olgular şu şekilde kategorize edilmiştir;

- $HER/Chr17 < 1.4$ ise HER2 gen amplifikasyonu için negatif
- $1.4 \leq HER/Chr17 \leq 4$ ise HER2 gen amplifikasyonu için borderline
- $HER/Chr17 > 4$ ise HER2 gen amplifikasyonu için pozitif

Borderline çıkan olgularda, metod 2'ye geçilmiş ve 20 hücrede HER-2 ve Kr-17 sinyalleri sayılmıştır. Daha sonra sinyal sayıları oranlanmıştır. Bu oran 1.8'den küçük ise olguda gen amplifikasyonu yok, büyük 2.2 ise olguda gen amplifikasyonu var olarak kabul edilmiştir. Oranın, büyük eşit 1.8 ile küçük eşit 2.2 arasında olması halinde metod 2a'ya geçilmiştir.

Metod 2a'da metod 2'deki 20 hücreye ek olarak, uygun komşu bir sahada, 20 hücrede daha (toplam 40 hücrede) HER-2 ve Kr-17 sinyali sayılmıştır. Benzer şekilde, bu oran 1.8'den küçük ise olguda gen amplifikasyonu yok, büyük 2.2 ise olguda gen amplifikasyonu var olarak değerlendirilmiştir. Oranın, büyük eşit 1.8 ile küçük eşit 2.2 arasında olması halinde olgu tartışmalı yani borderline kabul edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilmiş olan tüm olgularda, pozitif internal kontrol olarak kullanılan lenfositler, endotel hücreleri, fibroblastlarda 1-2 noktalanma şeklinde boyanma görülmüştür.

Bu değerlendirmelerin ışığında, HER-2 amplifikasyonu açısından 2 grup tanımlanmıştır.

- 1- HER-2 amplifikasyonu olan grup
- 2- HER-2 amplifikasyonu olmayan grup (negatif + borderline olgular)

Tüm olguların Kr-17'ye ait SISH ile boyanmış camları değerlendirilmiş ve hücre başına düşen ortalama Kr-17 sinyal sayısı tespit edilmiştir. Hücre başına düşen ortalama Kr-17 sinyal sayısı, 3 ve 3'ün üstünde sinyal içeren olgular Kr-17 açısından polizomik kabul edilmiştir. Buna göre 2 kategori tanımlanmıştır.

- 1- Kromozom 17 polizomisi olan grup
- 2- Kromozom 17 polizomisi olmayan grup

3.5 İstatiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, United States) for Windows 11.5 paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) şeklinde, kalitatif değişkenler ise gözlem sayısı ve (%) olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında yaş ortalamaları yönünden farkın önemliliği Student's t testi ile metastatik lenf nodu sayısı ve en büyük metastatik lenf nodu çapına ait ortanca değerler yönünden farkın önemliliği ise Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Kalitatif değişkenler Pearson'un Ki-Kare veya Fisher'in Tam Sonuçlu Olasılık testi ile incelenmiştir. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

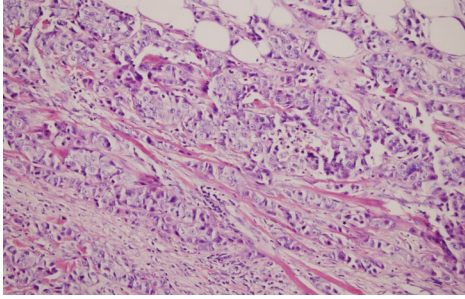
4- BULGULAR

4.1. İmmünohistokimya ve Silver Enhanced In Situ Hibridizasyon (SISH) Yöntemi ile Tespit Edilen Bulgular

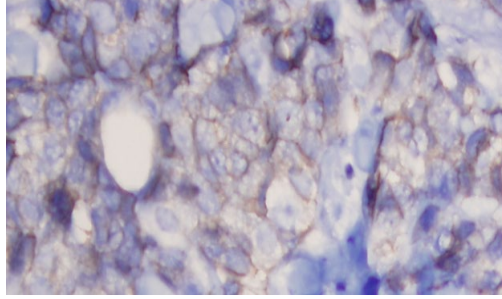
Çalışmanın ilk aşamasına dahil edilen 83 adet immünohistokimya ile Cerb-B2 skor 2 tespit edilen olgudan, 26 olguda (% 31.3) SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olduğu tespit edilmiştir. (Resim1, Resim 2) 57 olguda (% 68.6) SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olmadığı tespit edilmiştir. (Resim 3)

Prognostik parametreler ile ilişkisi araştırılan 80 olgudan, 16 adet olguda (%20) Kr-17 polizomisi tespit edilmiş (Resim 4), 64 (%80) olguda Kr-17 polizomisi olmadığı görülmüştür.

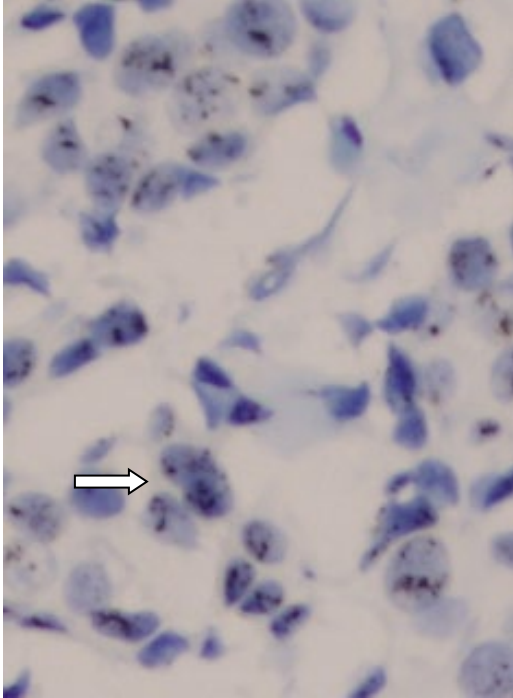
Steroid reseptör durumu araştırılan 80 hastadan 65'inde (%81.2) östrojen reseptörü (ER) pozitif, 15 olguda (%18.7) ER negatiftir. Progesteron reseptörü ise 63 olguda (% 78.7) pozitif, 17 olguda (% 21.2) negatiftir. Steroid reseptörlerinden en az biri pozitif olan (ER ve PR pozitif + ER veya PR pozitif) olgu sayısı ise 70'dir (87.5). ER ve PR'nin her ikisinin de negatif saptandığı olgu sayısı 10'dur (% 12.5).



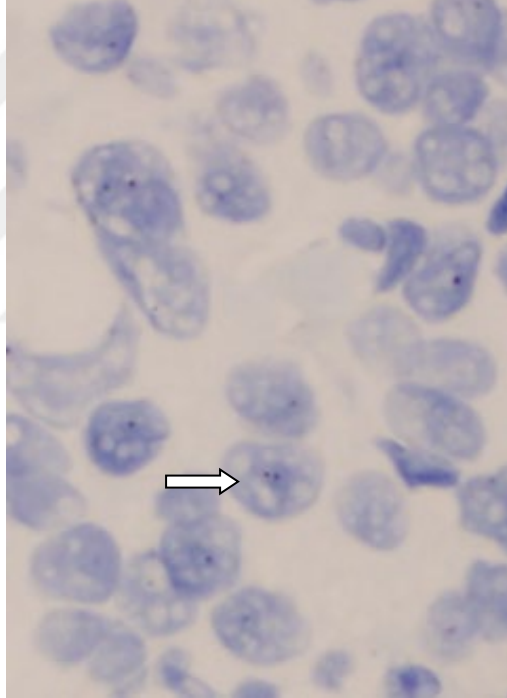
A. HE, X200



B. İHK, CerbB2, X200



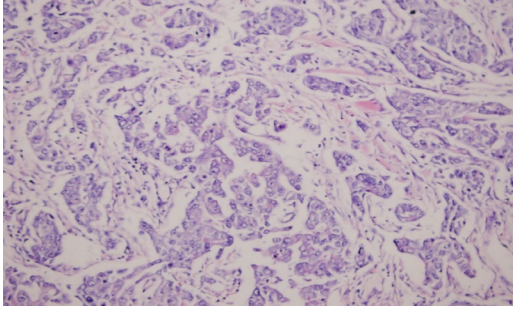
C. SISH, HER-2, X400



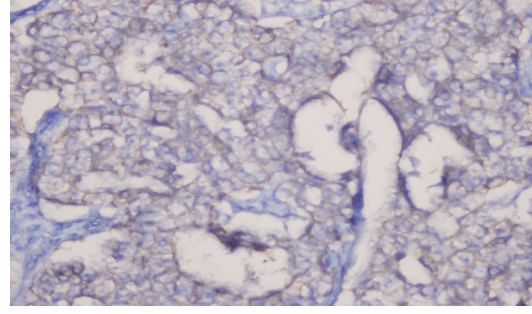
D. SISH, Kr-17, x400

Resim 1: SİSH ile HER-2 amplifikasyonu saptanan olgu (Metod 1)

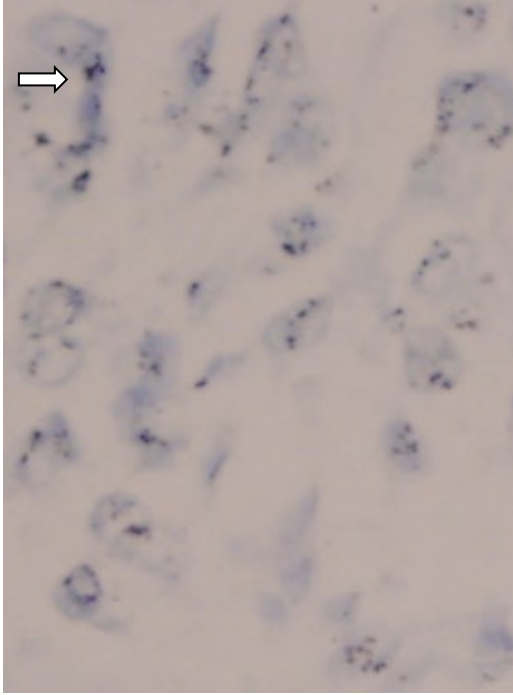
İnvaziv duktal karsinom, grade3, İHK ile CerbB-2 skor 2 olgu. SISH ile HER-2’de küçük büyük kümelenmeler, Kr-17 ile hücrelerde 1-2 granül şeklinde normal paternde boyanma izlenmiştir. Semikantitatif yöntemle, 20 hücrede tespit edilen HER-2 / Kr-17 sinyal sayısı > 4 olduğundan olguda HER-2 amplifikasyonu vardır şeklinde sonuçlandırılmıştır.



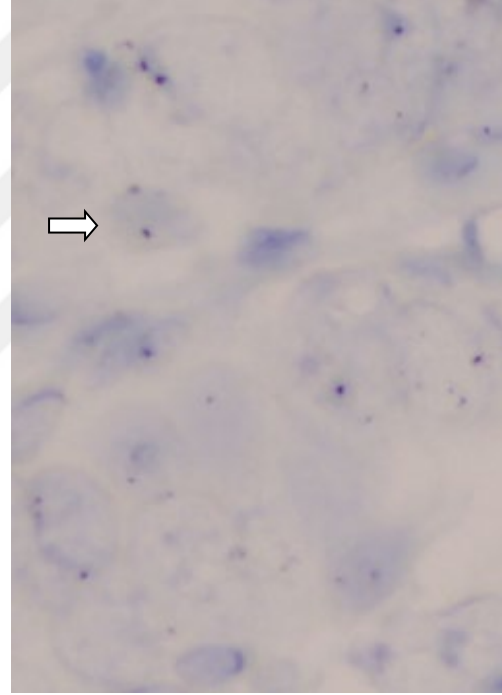
A. HE, X100



B. İHK, CerbB2, X200



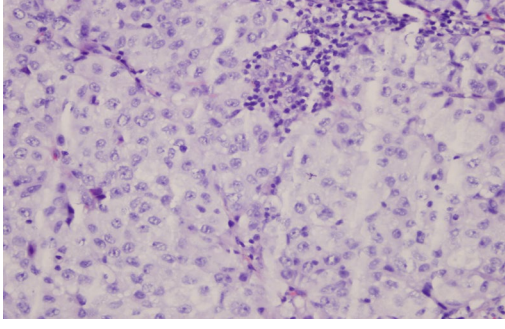
C.SISH, HER-2, X400



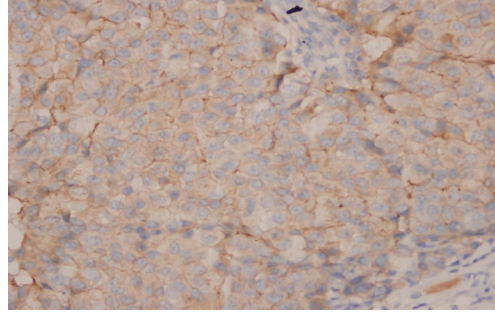
D.SISH, Kr-17, X400

Resim 2: SİSH ile HER-2 amplifikasyonu saptanan olgu (Metod 2)

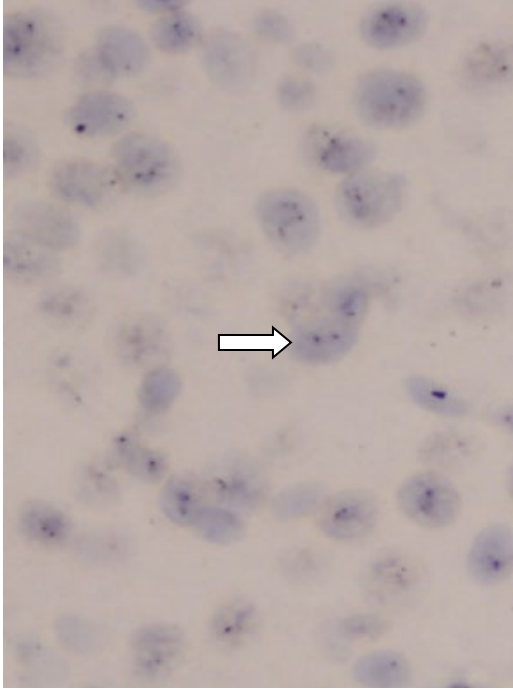
İnvaziv duktal karsinom, grade 3 ve Cerb-B2 skor 2 olgu. SISH ile HER-2’de çok sayıda granül, Kr-17 ile hücrelerde 1-2 granül şeklinde normal paternde boyanma izlenmiştir. Kantitatif yöntemle, 20 hücrede tespit edilen HER-2 / Kr-17 sinyal sayısı > 2.2 olduğundan olguda HER-2 amplifikasyonu vardır şeklinde sonuçlandırılmıştır.



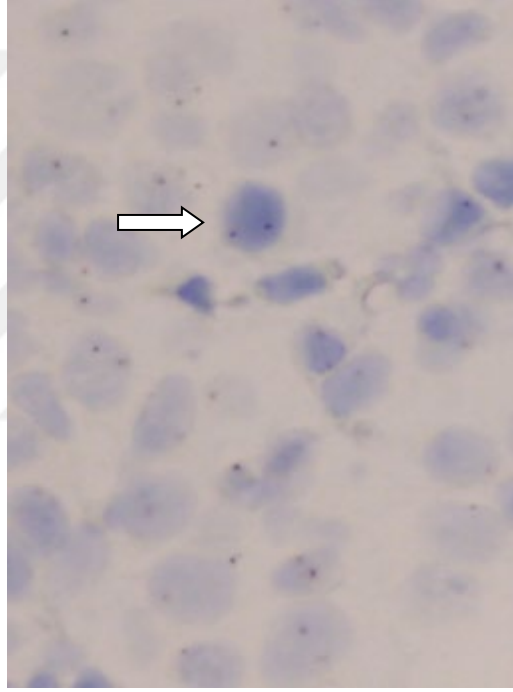
A.HE, X200



B.İHK, CerbB2, X200



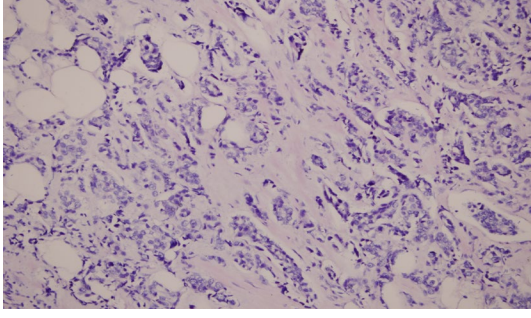
C.SISH, HER-2, X400



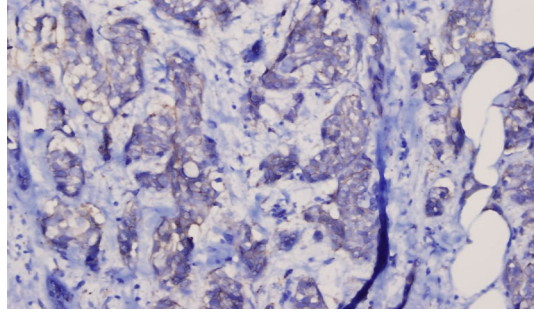
D.SISH, Kr-17, X400

Resim 3: SISH ile HER-2 amplifikasyonu saptanmayan olgu

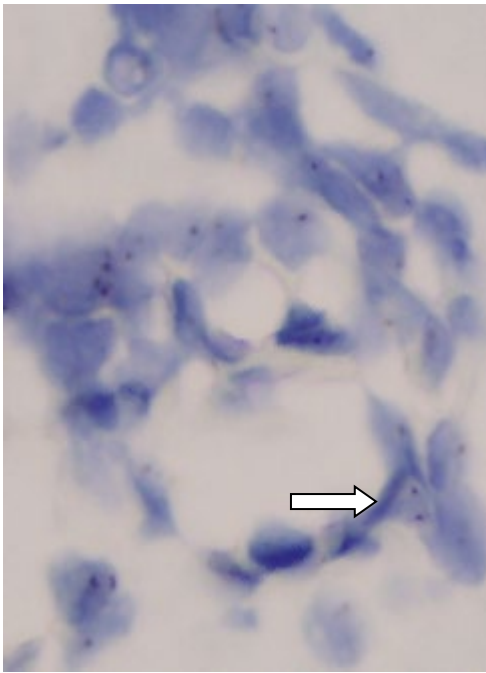
İnvaziv duktal CA, grade2 ve Cerb-B2 skor 2 olgu. SISH ile HER-2 ve Kr-17’de hücre başına 1-2 granül şeklinde boyama mevcut. 20 hücre sayıldığında olgu borderline bulunmuş ve 40 hücre sayılıp HER-2 sinyal sayısı, Kr-17 sinyal sayısına oranlandığında, sonuç < 1.8 çıktığından, olguda HER-2 amplifikasyonu yoktur şeklinde sonuçlandırılmıştır



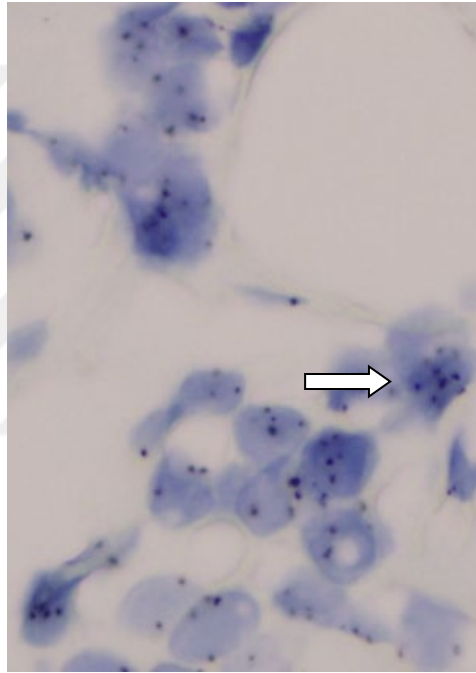
A. HE, X 200



B. İHK CerbB2, X400



C.SISH, HER-2, X400



D.SISH, Kr-17, X400

Resim 4: SİSH ile Kr-17 polizomisi saptanan olgu

İnvaziv duktal grade 2 ve Cerb-B2 skor 2 olgu. SİSH ile HER-2’de 1-2 granül şeklinde normal paternde boyanma, Kr-17’de ise hücre başına ortalama olarak 3’ten fazla granül izlenmiştir. Olgu Kr-17 açısından polizomik kabul edilmiştir.

4.2. Olguların Prognostik Parametreler Yönünden Tanımlanması

Prognostik parametreler ile kıyaslanmaya dahil edilen 80 olgunun 79 tanesi kadın hasta, 1 tanesi erkek hasta olup, en genç hasta 25 yaşında, en yaşlı hasta 88 yaşındadır. Ortalama yaş 54.8 (± 12.8) ortalama yaş ise 53.5 olarak hesaplanmıştır. Tümör çapları incelendiğinde, minimum tümör çapı 1 cm, maksimum tümör çapı ise 9 cm'dir. Ortalama tümör çapı 3.08 (± 1.79) ortalama tümör çapı ise 2.5 cm'dir. 20 olguda tümör boyutu küçük eşit 2cm, 46 olguda 2.1 ile 5 cm arasında, 14 olguda ise 5.1 cm'nin üstündedir. Olguların 66'sında (%78) tümör boyutu küçük eşit 5 cm; 14'ünde (% 22) büyük 5 cm'dir.

Olgular tümörlerin histolojik grade'ine göre incelendiğinde, 7 olgu (% 8.7) grade 1 , 41 olgu (% 51.2) grade 2 ve 32 olgu (% 40) grade 3'tür. Düşük grade'li tümörleri oluşturan gruptaki (grade 1 + grade 2) olgu sayısı 48 (% 60), yüksek grade'li tümörleri oluşturan gruptaki (grade 3) olgu sayısı 32'dir (% 40)

Tümörler nükleer grade'lerine göre incelendiğinde, 8 olgu (%1) grade , 38 olgu (%47.5) grade 2 ve 34 olgu (% 42.5) grade 3'tür. Düşük nükleer grade'li (nükleer grade 1 + nükleer grade 2) olgu sayısı 46 (% 57.5) ve yüksek nükleer grade'li olgu sayısı 34 tür (% 42.5).

Tümörler mitotik skorları yönünden incelendiğinde, mitotik skor olguların 30'unda (% 37.5) skor 1, 32'sinde (% 40) skor 2 ve 18 olguda (% 22.5) skor 3'tür. Mitoz skoru ≤ 8 (skor 1) olan gruptaki olgu sayısı 30 (% 37.5), mitoz skoru ≥ 9 olan (skor 2+ skor 3) gruptaki olgu sayısı 50'dir. (% 62.5)

İncelenen olguların 29'unda (%36.2) lenfovasküler invazyon saptanmıştır. 51 olguda (%63.7) ise lenfovasküler invazyona rastlanmamıştır .

Olguların 19'unda (% 23.7) tümör nekrozu tespit edilmiş; 61'inde (% 76.2) tümör nekrozu görülmemiştir .

Olgular aksiller lenf nodlarında metastaz varlığı yönünden incelendiğinde 16 (% 20) olgu eksizyonel biyopsi materyali olduğundan aksiller lenf nodu durumu bilinmemektedir. (Nx) 25 hastada (%31.2) lenf nodu metastazı izlenmemiştir. (N0) 39 hastada (% 48.7) lenf nodu metastazı vardır. Bunun dağılımı ise şu şekildedir; metastatik lenf nodu sayısı 20 olguda 1 ile 3 arasında (N1), 6 olguda 4 ile 9 arası (N2) ve 13 olguda 10'nun üzerindedir. (N3) Minimum metastatik lenf nodu sayısı 0, maksimum metastatik lenf nodu sayısı 49 olup ortalama metastatik lenf nodu sayısı 3.9 (± 8.1) olarak hesaplanmıştır. En büyük metastatik lenf nodu çapı 4 cm, en küçük metastatik lenf

nodunun çapı ise 0.5 cm'dir. Ortalama metastatik lenf nodu çapı 1.9 (± 0.87) olarak hesaplanmıştır.

4.3 SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu bulunan ve amplifikasyon bulunmayan grupların karşılaştırılması

Çalışmanın ikinci aşamasına dahil edilen 80 adet olgudan, SISH yöntemi ile 24 (%30) olguda, HER-2 gen amplifikasyonu izlenmiş; 56 (%70) olguda gen amplifikasyonu izlenmemiştir. Olgular HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan şeklinde iki gruba ayrılmış ve bu iki grup prognostik parametreler ile olan ilişkileri açısından kıyaslanmıştır.

SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen grupta minimum yaş 25, maksimum yaş 78, ortanca yaş 50.0 ve ortalama hasta yaşı 50.3 (± 11.4) olarak bulunmuştur. SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupta (n= 56), minimum yaş 30, maksimum yaş 88 iken ortanca yaş 54.0 ve ortalama hasta yaşı 56.7 (± 13.0) olarak hesaplanmıştır. HER-2 gen amplifikasyonu açısından, gruplar arası ortalama yaş farkı, istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen (p=0.039) (Tablo 8), klinik olarak her iki grup da postmenapozal hasta grubunu temsil etmektedir.

Tablo 8: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların ortalama hasta yaşı yönünden karşılaştırılması

Değişken	SISH (-) (n=56)	SISH (+) (n=24)	p
Yaş	56.7 $\pm$ 13.0	50.3 $\pm$ 11.4	0.039

Olgular tümör boyutları yönünden incelendiğinde; SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen grupta minimum tümör çapı 1.5 cm, maksimum tümör çapı 7 cm, ortanca tümör çapı 2.5 cm ve ortalama tümör çapı 3.36 cm (± 1.7) olarak saptanmıştır. SISH ile gen amplifikasyonu bulunmayan grupta minimum tümör çapı 1 cm, maksimum tümör çapı 9 cm, ortanca tümör çapı 2.5 cm ve ortalama tümör çapı 2.9 (± 1.6) cm'dir. HER-2 gen amplifikasyonu olan 24 olgudan 3'ünde (%12.5) tümör boyutu 2 cm ve altında, 15'inde (%62.5) 2.1-5 cm arasında, 6'sında (%25.0) 5 cm'den büyüktür. HER-2 gen amplifikasyonu olmayan 17 (%30.4) olguda tümör boyutu 2 cm ve altında ; 31 (%55.4) olguda, 2.1-5 cm arasında; 8 (%14.3) olguda 5 cm'nin üzerindedir. (Tablo 8A) HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen 18 (%75.0) olguda tümör boyutu ≤ 5 cm, 6 (%25.0) olguda tümör boyutu > 5 cm'dir. HER-2 gen amplifikasyonu olmayan 48 (%85.7)

olguda tümör boyutu ≤ 5 cm, 8 (%14.3) olguda tümör boyutu > 5 cm saptanmıştır. (Tablo 9B)

HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında tümör boyutu yönünden istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.183$ ve $p= 0.336$) (Tablo 9A-B).

Tablo 9-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör boyutu yönünden üç grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	P
T Evresi			0.183
<i>T1 (<2cm)</i>	17 (%30.4)	3 (%12.5)	
<i>T2 (2.1-5 cm)</i>	31 (%55.4)	15 (%62.5)	
<i>T3 (>5cm)</i>	8 (%14.3)	6 (%25.0)	

Tablo 9-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör boyutu yönünden iki grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	P
T Evresi			0.336
<i>T1-T2 (≤ 5cm)</i>	48 (%85.7)	18 (%75.0)	
<i>T3 (> 5 cm)</i>	8 (%14.3)	6 (%25.0)	

Olgular tümörlerin histolojik grade'ine göre incelendiğinde, 7 olgu grade 1 , 41 olgu grade 2 ve 32 olgu grade 3'tür. Düşük grade'li tümörleri oluşturan gruptaki (grade 1 + grade 2) olgu sayısı 48, yüksek grade'li tümörleri oluşturan gruptaki (grade 3) olgu sayısı 32'dir.

HER-2 gen amplifikasyonu olan 24 olgudan 1'i (%4.2) grade1, 12'si (%50.0) grade 2 ve 11'i (%45.8) grade 3'tür. HER-2 gen amplifikasyonu olmayan 56 olgudan 6'sı (%10.7) grade 1, 29'u (%51.8) grade 2 ve 21'i (%37.5) grade 3'tür. (Tablo 9A)

Amplifiye olgulardan 13'ü (%54.2) düşük grade'li, 11'i (%45.8) yüksek grade'lidir. (Tablo 9-B). Amplifikasyon görülmeyen olguların 35'i (%62.5) düşük grade'li ve 21'i (%37.5) yüksek grade'lidir. (Tablo 10B)

HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında histolojik grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir . (p=0.538 ve p= 0.336) (Tablo 10A-B)

Tablo 10-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör Histolojik grade’i açısından üç grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Tümör Histolojik Grade’i			0.538
<i>Grade 1</i>	6 (%10.7)	1 (%4.2)	
<i>Grade 2</i>	29 (%51.8)	12 (%50.0)	
<i>Grade 3</i>	21 (%37.5)	11 (%45.8)	

Tablo 10-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör Histolojik grade’i açısından iki grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Tümör Histolojik Grade’i			0.486
<i>Düşük Grade (Grade 1 + Grade 2)</i>	35 (%62.5)	13 (%54.2)	
<i>Yüksek Grade (Grade 3)</i>	21 (%37.5)	11 (%45.8)	

Tümörler nükleer grade’lerine göre incelendiğinde, 8 olgu grade 1, 38 olgu grade 2 ve 34 olgu grade 3 nükleer özellikler göstermektedir. Düşük nükleer grade’li (nükleer grade 1 + nükleer grade 2) olgu sayısı 46 ve yüksek nükleer grade’li olgu sayısı 34 tür. HER-2 gen amplifikasyonu olan 24 olgudan 2’sinin (%8.3) nükleer grade’i 1, 8’inin (%33.3) grade 2 ve 14’nün (%58.3) grade 3’tür. Amplifikasyon tespit edilmeyen 56 olgudan 6’sının (%10.7) nükleer grade’i 1, 30’unun (%53.6) grade 2 ve 20’sinin (%35.7) grade 3’tür. (Tablo 11-A)

Amplifikasyon görülen olgulardan 13’ü(%54.2) düşük nükleer grade’e sahipken, 11’i (%45.8) yüksek nükleer grade’e sahiptir. Amplifikasyon görülmeyen 36 (%64.3) olgunun nükleer grade’i düşük, 20 (%55.6) olgunun nükleer grade’i yüksek tespit edilmiştir. (Tablo 11-B)

HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında tümör nükleer grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (p=0.168 ve p= 0.061) (Tablo 11A-B).

Tablo 11-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör nükleer grade'i açısından üç grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Nükleer Grade			0.168
<i>Grade 1</i>	6 (%10.7)	2 (%8.3)	
<i>Grade 2</i>	30 (%53.6)	8 (%33.3)	
<i>Grade 3</i>	20 (%35.7)	14 (%58.3)	

Tablo 11-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların tümör nükleer grade'i açısından iki grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Nükleer Grade			0.061
<i>Düşük Grade (grade1+ grade2)</i>	36 (%64.3)	10 (%41.7)	
<i>Yüksek Grade (grade 3)</i>	20 (%35.7)	14 (%58.3)	

Olgular ilk aşamada mitoz sayısına göre skor 1 (≤ 8 mitoz), skor 2 (9-17 mitoz) ve skor 3 (≥ 18 mitoz) olarak sınıflanmıştır . Buna göre tümörler mitotik skorları yönünden incelendiğinde, mitotik skor olguların 30'unda skor 1, 32'sinde skor 2 ve 18 olguda skor 3'tür. Düşük mitotik skora sahip, yani mitoz skoru ≤ 8 (skor 1) olan gruptaki olgu sayısı 30'dur. Yüksek mitotik skora sahip, yani mitoz skoru ≥ 9 olan (skor 2+ skor 3) gruptaki olgu sayısı 50'dir.

HER-2 gen amplifikasyonu olan 24 olgudan 5'inde (%20.8) mitotik skor 1, 14'ünde (%58.3) skor 2 ve 5'inde (%20.8) skor 3'tür. Amplifikasyon olmayan grupta ise olguların 25'inde (%44.6) mitotik skor 1, 18'inde (%32.1) mitotik skor 2 ve 13'ünde (%23.2) skor 3'tür. (Tablo 12-A)

Amplifikasyon görülen olgulardan 5'inde (%20.8) düşük mitotik skor (skor 1), 19'unda (%79.2) yüksek mitotik skor (skor 2+skor 3) tespit edilmiştir. Amplifikasyon olmayan grupta ise olguların 25'inde (%44.6) düşük mitotik skor, 31'inde (%55.4) yüksek mitotik skor bulunmuştur. (Tablo12-B)

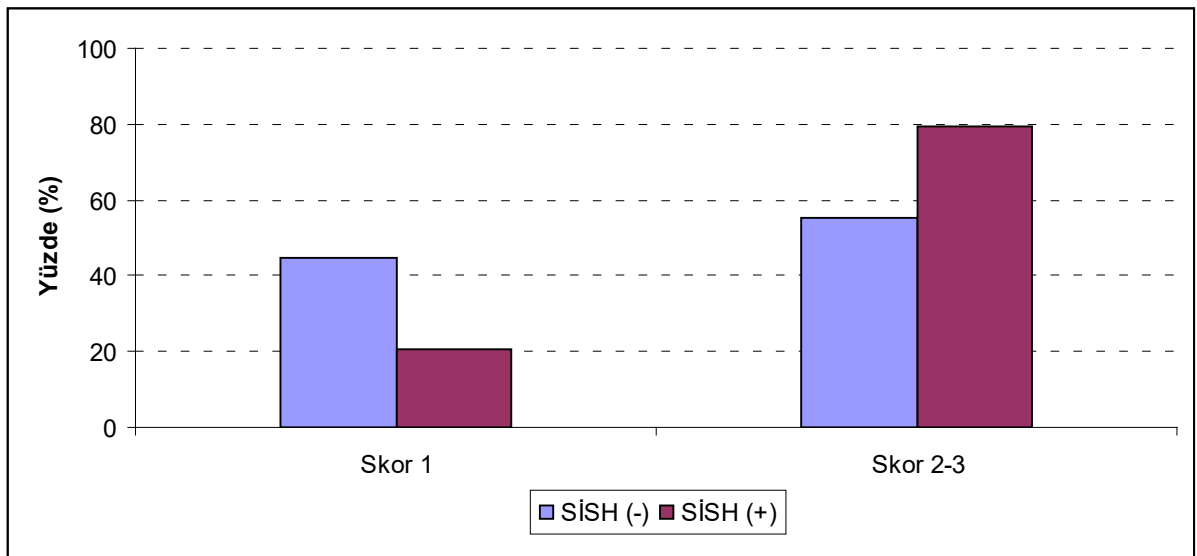
HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında tümör mitotik skoru yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. (p=0.044) (Tablo 12-B, Şekil-4).

Tablo 12-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların mitotik skor yönünden 3 grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Mitoz			0.065
<i>Skor 1</i>	25 (%44.6)	5 (%20.8)	
<i>Skor 2</i>	18 (%32.1)	14 (%58.3)	
<i>Skor 3</i>	13 (%23.2)	5 (%20.8)	

Tablo 12-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların mitotik skor yönünden 2 grupta karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Mitoz			0.044
<i>Düşük mitotik skor (Skor 1)</i>	25 (%44.6)	5 (%20.8)	
<i>Yüksek mitotik skor (Skor2+ 3)</i>	31 (%55.4)	19 (%79.2)	



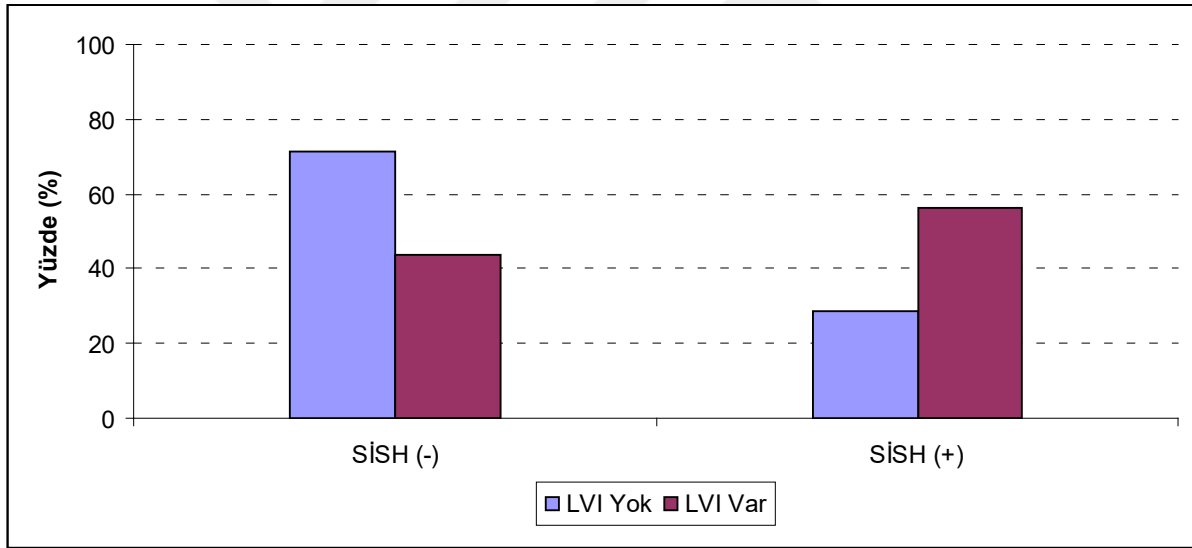
Şekil 4. SİSH Sonuçlarına Göre Mitotik Skor Bulgularının Dağılımı

Olgular lenfovasküler invazyon açısından incelendiğinde, olguların 29’unda lenfovasküler invazyon saptanmıştır. 51 olguda ise lenfovasküler invazyona rastlanmamıştır .

HER-2 gen amplifikasyonu olan 24 olgudan 13’ünde (%56.5), HER-2 gen amplifikasyonu bulunmayan 56 olgudan ise 16’sında (%28.6) lenfovasküler invazyon saptanmıştır. HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında lenfovasküler invazyon bulunması yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p= 0.019$) (Tablo 13, Şekil-5).

Tablo 13: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların lenfovasküler invazyon yönünden karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	p
Lenfovasküler İnvazyon	16 (%28.6)	13 (%56.5)	0.019



Şekil-6: SİSH Sonuçlarına Göre LVI Bulgularının Dağılımı

Olguların 19’unda (% 23.7) tümör nekrozu tespit edilmiş; 61’inde (% 76.2) tümör nekrozu görülmemiştir. HER-2 gen amplifikasyonu görülen olgulardan 5’inde (%20.8), amplifikasyon görülmeyen olguların ise 14’ünde (%25.0) tümör nekrozu mevcuttur. HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında tümör nekrozu bulunması yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.688$).

Olgular aksiller lenf nodlarında metastaz varlığı yönünden Nx (lenf nodu durumu bilinmiyor), N0 (metastatik lenf nodu yok), N1 (1-3), N2 (4-9) ve N3 (≥ 10) şeklinde

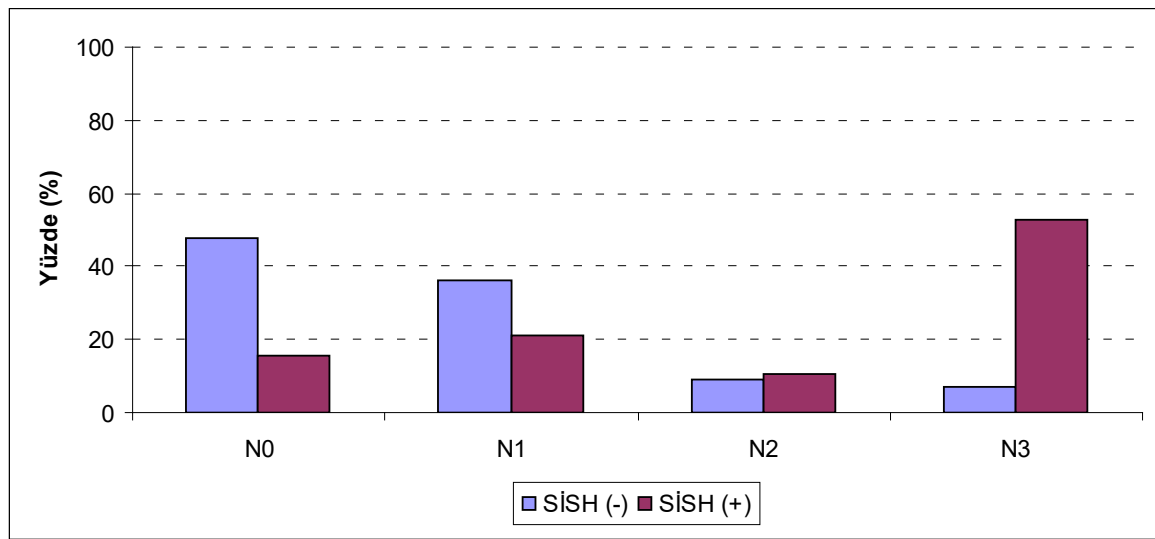
kategorize edilmiştir. 39 hastada lenf nodu metastazı vardır. 25 hastada lenf nodu metastazı izlenmemiştir. 16 olgu ise eksizyonel biyopsi olduğundan lenf nodu durumu bilinmemektedir (Nx).

HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen ve lenf nodu durumu bilinen 19 olgudan 3'ünde (%15.7) lenf nodu metastazı yoktur. Metastatik lenf nodu sayısı 4 olguda (% 21.05) 1-3 arasında, 2 olguda (%10.5) 4-9 arasında ve 10 olguda (%52.6) 10'nun üzerindedir. HER-2 gen amplifikasyonu bulunmayan ve lenf nodu durumu bilinen 45 olgudan 22'sinde (% 48.8) lenf nodu metastazı yoktur. Metastatik lenf nodu sayısı 16 olguda (% 35.5) 1-3 arasında, 4 olguda (% 8.8) 4-9 arasında ve 3 olguda (% 6.6) 10'nun üzerindedir (Tablo 14).

Tablo 14: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların metastatik lenf nodu varlığı ve sayısı yönünden karşılaştırılması

Değişken *	SİSH (-) (n=44)	SİSH (+) (n=19)	P
<i>Ortalama metastatik lenf nodu sayısı</i>	1 (0-18)	10 (0-49)	<0.001
<i>Lenf nodu evrelemesi</i>			
<i>N0 Metastaz Yok</i>	21 (%47.7)	3 (%15.8)	0.017
<i>N1 1-3</i>	16 (%36.4)	4 (%21.1)	0.231
<i>N2 4-9</i>	4 (%9.1)	2 (%10.5)	1.000
<i>N3 10+</i>	3 (%6.8)	10 (%52.6)	<0.001

* Lenf nodu durumu bilinen vakalar kıyaslanmıştır



Şekil -6: SİSH Sonuçlarına Göre Metastatik Lenf Nodu Bulgularının Dağılımı

HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında metastatik lenf nodu varlığı (metastaz varlığı) ve sayısı yönünden (10'nun üzerinde metastatik lenf noduna sahip olmak) istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (p=0.017, p=0.01).

En büyük metastatik lenf nodu çapı 4 cm, en küçük metastatik lenf nodunun çapı ise 0.5 cm'dir. Ortalama metastatik lenf nodu çapı 1.9 ($\pm$ 0.87) olarak hesaplanmıştır. HER-2 gen amplifikasyonu bulunan gruptaki en büyük metastatik lenf nodu çapı 4 cm ve ortalama en büyük metastatik lenf nodu çapı 1.8 (0.5-4.0) cm olarak saptanmıştır. HER-2 gen amplifikasyonu bulunmayan gruptaki en büyük metastatik lenf nodu 3.5 cm ve ortalama en büyük metastatik lenf nodu çapı 1.8 (0.9-3.5) cm olarak saptanmıştır.

HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında en büyük metastatik lenf nodu çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. (p= 0.539) HER-2 gen amplifikasyonu bulunan gruptaki 24 olgudan 17'si (%70.8) ER pozitif, 7'si (%29.2) ER negatiftir. Ayrıca 18 olgu (%75) PR pozitif, 6 olgu (%25) PR negatiftir. HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupta ise, 48 olgu (%80.4) ER pozitif, 8 olgu 11 (%19.6) ER negatiftir.

Steroid reseptörlerinden en az biri pozitif olan (ER ve PR pozitif + ER veya PR pozitif) olgu sayısı ise 70'dir (87.5). ER ve PR'nin her ikisinin de negatif saptandığı olgu sayısı 10'dur. (% 12.5) (Tablo15-A)

Olgulara bu şekilde bakıldığında, HER-2 gen amplifikasyonu bulunan 24 olgudan 21'inde (%87.5) steroid reseptörlerden biri pozitif, 3 olguda (%12.5) her iki reseptör de negatiftir. Gen amplifikasyonu olmayan 54 olgudan 49 olguda (%87.5) steroid reseptörlerden biri pozitif, 7 olguda (%12.5) her iki reseptör de negatiftir. (Tablo 15-B)

Tablo 15-A: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların ER ve PR ekspresyon durumu yönünden karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	P
ER			0.131
<i>Negatif</i>	8 (%14.3)	7 (%29.2)	
<i>Pozitif</i>	48 (%85.7)	17 (%70.8)	
PR			0.591
<i>Negatif</i>	11 (%19.6)	6 (%25.0)	
<i>Pozitif</i>	45 (%80.4)	18 (%75.0)	

Tablo 15-B: HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan olguların steroid reseptör ekspresyonu yönünden karşılaştırılması

Değişken	SİSH (-) (n=56)	SİSH (+) (n=24)	P
Steroid Reseptör			1.000
<i>Negatif</i>	7 (%12.5)	3 (%12.5)	
<i>Pozitif</i>	49 (%87.5)	21 (%87.5)	

HER-2 gen amplifikasyonu pozitif ve negatif gruplar arasında tümör steroid reseptör ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (p= 0.131, 0.591 ve p= 1.000) (Tablo 15A-B).

4.4. SİSH ile Kr-17 polizomisi bulunan ve polizomi bulunmayan grupların karşılaştırılması

Çalışmanın ikinci aşamasına dahil edilen 80 adet olgudan, SISH yöntemi ile 16 (%20) olguda, Kr-17 polizomisi izlenmiş; 64 (%80) olguda Kr-17 polizomisi izlenmemiştir. Polizomi tespit edilmiş olan 16 olgunun 2'sinde aynı zamanda HER-2 gen amplifikasyonu varken; Kr-17 polizomisi bulunmayan 64 olgudan 22'sinde HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Olgular, HER-2 gen amplifikasyonu olup olmamasına bakılmaksızın, Kr-17 polizomisi olan ve olmayan şeklinde iki gruba ayrılmış ve bu iki grup patolojik prognostik parametreler ile olan ilişkileri açısından kıyaslanmıştır.

SISH ile Kr-17 polizomisi tespit edilen grupta minimum yaş 30 , maksimum yaş 88, ve ortalama hasta yaşı 53.1 (± 14.9) olarak bulunmuştur. SISH ile Kr-17 polizomisi bulunmayan grupta, minimum yaş 25, maksimum yaş 82 ve ortalama hasta yaşı 55.2 (± 12.4) olarak hesaplanmıştır. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında, ortalama hasta yaşı yönünden istatistiksel anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0.608) (Tablo 16).

Kr-17 polizomisi bulunan 16 olgunun tamamında ER pozitif olup, 15'inde (%93.8) de PR pozitifdir. 1 olgu (%6.3) PR negatiftir. Kr-17 polizomisi olmayan grupta ise, 49 olgu (%76.6) ER pozitif, 15 olgu (%23.4) ER negatiftir. Bu grupta PR pozitif olgu sayısı 48 (%75.0), PR negatif olgu sayısı 16'dır (%25.0). Polizomi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında ER ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark

varken ($p= 0.033$); PR ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p= 0.170$) (Tablo 16).

Kr-17 polizomisi tespit edilen olgularda en az sıfır, en çok 18 adet metastatik lenf nodu bulunmuştur. Kr-17 polizomisi bulunmayan grupta ise en az sıfır, en çok ise 49 adet metastatik lenf nodu mevcuttur. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında ortalama metastatik lenf nodu sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.300$).

Lenf nodu durumu bilinen ve Kr-17 polizomisi bulunan toplam 52 olgudan, 20'sinde metastatik lenf nodu yoktur (N0). 14 olguda metastatik lenf nodu sayısı 1-3 arasındadır (N1). 6 olguda 4-9 arasındadır (N2). 12 olguda metastatik lenf nodu sayısı 10'dan fazladır. 12 olguda metastatik lenf nodu durumu bilinmemektedir. Kr-17 polizomisi bulunmayan toplam 16 olgudan 4'ünde metastatik lenf nodu yoktur (N0). 6 olguda metastatik lenf nodu 1-3 arasındadır (N1). 1 olguda ise metastatik lenf nodu sayısı 10'dan fazladır (N3). 5 olguda metastatik lenf nodu durumu bilinmemektedir.

Polizomik gruptaki en büyük metastatik lenf nodu çapı 2 cm ve ortalama en büyük metastatik lenf nodu çapı $1.7 (\pm 0.56)$ cm olarak saptanmıştır. Kr-17 polizomisi bulunmayan gruptaki en büyük metastatik lenf nodu 4 cm, ortalama en büyük metastatik lenf nodu çapı $1.9 (\pm 0.90)$ cm olarak saptanmıştır. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında en büyük metastatik lenf nodu çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.268$).

Olgular tümörlerin histolojik grade'ine göre incelendiğinde, 7 olgu grade 1, 41 olgu grade 2 ve 32 olgu grade 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunan olan 16 olgudan 2'si (%12.5) grade 1, 8'i (%50.0) grade 2 ve 6'sı (%37.5) grade 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunmayan 64 olgudan 5'i (%7.8) grade 1, 33'ü (%51.6) grade 2 ve 26'sı (%40.6) grade 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında histolojik grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.836$) (Tablo 16).

Olgular lenfovasküler invazyon açısından incelendiğinde, olguların 29'unda lenfovasküler invazyon saptanmıştır. 51 olguda ise lenfovasküler invazyona rastlanmamıştır. Kr-17 polizomisi bulunan 16 olgudan 3'ünde (%18.8), Kr-17 polizomisi bulunmayan 64 olgudan ise 26'sında (%41.3) lenfovasküler invazyon saptanmıştır. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında lenfovasküler invazyon varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.095$) (Tablo 16).

Olgular tümör boyutları yönünden incelendiğinde; SISH ile Kr-17 polizomisi tespit edilen grupta minimum tümör çapı 1.3 cm, maksimum tümör çapı 5 cm ve ortalama tümör

çapı $2.7 (\pm 1.1)$ olarak saptanmıştır. SISH ile Kr-17 polizomisi bulunmayan grupta minimum tümör çapı 1 cm, maksimum tümör çapı 9 cm ve ortalama tümör çapı $3.1 (\pm 1.8)$ olarak hesaplanmıştır. Kr-17 polizomisi olan 16 olgudan 4'ünde (%25.0) tümör boyutu 2 cm ve altında, 9'unda (%56.3) 2.1-5 cm arasında, 3'ünde (%25.0) ise 5 cm'den büyüktür. Kr-17 polizomisi bulunmayan 16 (%25.0) olguda tümör boyutu 2 cm ve altında ; 37 (%57.8) olguda, 2.1-5 cm arasında; 11 (%17.2) olguda 5 cm'nin üzerindedir. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında, tümör boyutu yönünden istatistiksel anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.989$) (Tablo 16).

Olgular mitoz sayısına göre skor 1 (≤ 8 mitoz), skor 2 (9-17 mitoz) ve skor 3 (≥ 18 mitoz) olarak sınıflanmıştır . Buna göre tümörler mitotik skorları yönünden incelendiğinde, mitotik skor olguların 30'unda skor 1, 32'sinde skor 2 ve 18 olguda skor 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunan 16 olgudan 6'sında (%37.5) mitotik skor 1, 7'sinde (%43.8) skor 2 ve 3'ünde (%18.8) skor 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunmayan grupta ise olguların 24'ünde (%37.5) mitotik skor 1, 25'inde (%39.1) mitotik skor 2 ve 15'inde (%23.4) skor 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında nükleer grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.907$) (Tablo 16).

Olguların 19'unda (% 23.7) tümör nekrozu tespit edilmiş; 61'inde (% 76.2) tümör nekrozu görülmemiştir. Kr-17 polizomisi bulunan olgulardan 4'ünde (%25.0), polizomi bulunmayan olguların ise 15'inde (%23.4) tümör nekrozu mevcuttur. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında tümör nekrozu varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 1.000$) (Tablo 16).

Tümörler nükleer grade'lerine göre incelendiğinde, 8 olgu grade 1, 38 olgu grade 2 ve 34 olgu grade 3 nükleer özellikler göstermektedir. Kr-17 polizomisi bulunan 16 olgudan 1'inin (%6.3) nükleer grade'i 1, 8'inin (%50.0) grade 2 ve 7'sinin (%43.8) grade 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunmayan 64 olgudan 7'sinin (%10.9) nükleer grade'i 1, 30'unun (%46.9) grade 2 ve 27'sinin (%42.2) grade 3'tür. Kr-17 polizomisi bulunan ve bulunmayan gruplar arasında nükleer grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p= 0.854$) (Tablo 16).

Tablo 16: Polizomi Sonuçlarına Göre Histopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

Değişkenler	Polizomi (-) (n=64)	Polizomi (+) (n=16)	P
Yaş	55.2±12.4	53.1±14.9	0.608
ER			0.033
<i>Negatif</i>	15 (%23.4)	-	
<i>Pozitif</i>	49 (%76.6)	16 (%100)	
PR			0.170
<i>Negatif</i>	16 (%25.0)	1 (%6.3)	
<i>Pozitif</i>	48 (%75.0)	15 (%93.8)	
Ortalama Metastatik LN Sayısı	1 (0-49)	0 (0-18)	0.300
En Büyük Metastatik LN Çapı	1.9 (0.8-4.0)	1.7 (0.5-2.0)	0.268
Tümör Histolojik Grade'i			0.836
<i>Grade 1</i>	5 (%7.8)	2 (%12.5)	
<i>Grade 2</i>	33 (%51.6)	8 (%50.0)	
<i>Grade 3</i>	26 (%40.6)	6 (%37.5)	
Lenfovasküler İnvazyon	26 (%41.3)	3 (%18.8)	0.095
T Evresi			0.989
<i>T1</i>	16 (%25.0)	4 (%25.0)	
<i>T2</i>	37 (%57.8)	9 (%56.3)	
<i>T3</i>	11 (%17.2)	3 (%18.8)	
Mitoz Skoru			0.907
<i>Skor 1</i>	24 (%37.5)	6 (%37.5)	
<i>Skor 2</i>	25 (%39.1)	7 (%43.8)	
<i>Skor 3</i>	15 (%23.4)	3 (%18.8)	
Nekroz	15 (%23.4)	4 (%25.0)	1.000
Tümör Nükleer Grade'i			0.854
<i>Grade 1</i>	7 (%10.9)	1 (%6.3)	
<i>Grade 2</i>	30 (%46.9)	8 (%50.0)	
<i>Grade 3</i>	27 (%42.2)	7 (%43.8)	

Bir alt grup olarak, SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu bulunmayan olgulardan; Kr-17 polizomisi bulunan 14 olgu ve Kr-17 polizomisi bulunmayan 42 olgu patolojik prognostik parametreler açısından kıyaslanmıştır (Tablo 17).

Bu iki grup arasında; ortalama hasta yaşı (p=0.508), ER ekspresyonu (p=0.180), PR ekspresyonu (p= 0.258), metastatik lenf nodu sayısı (p=0.710), en büyük metastatik lenf nodu çapı (p= 0.349), tümör histolojik grade'i (p= 0.889), lenfovasküler invazyon varlığı (p= 0.734), tümör çapı (p= 0.695), tümör mitotik skoru (p= 0.946), nekroz varlığı (p=

0.732) ve tümör nükleer grade'i (p= 0.766) açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 17: SISH ile HER-2 (-) Olgularda Polizomi Sonuçlarına Göre Olguların Dağılımı

Değişkenler	Polizomi (-) (n=42)	Polizomi (+) (n=14)	P
Yaş	57.4±12.3	54.7±15.2	0.508
ER			0.180
<i>Negatif</i>	8 (%19.0)	-	
<i>Pozitif</i>	34 (%81.0)	14 (%100)	
PR			0.258
<i>Negatif</i>	10 (%23.8)	1 (%7.1)	
<i>Pozitif</i>	32 (%76.2)	13 (%92.9)	
Ortalama Metastatik LN Sayısı*	0 (0-18)	0 (0-3)	0.710
Lenf Nodu Evresi*	(n= 34)	(n= 10)	0.154
<i>N0 Metastaz Yok</i>	18 (%52.9)	5 (%50)	
<i>N1 1-3</i>	9 (%26.4)	5 (% 50)	
<i>N2 4-9</i>	4 (% 11.7)	-	
<i>N3 10+</i>	3 (% 8.8)	-	
En Büyük Metastatik LN Çapı	1.9 (0.8-4)	1.8 (0.5-2)	0.349
Tümör Histolojik Grade'i			0.889
<i>Grade 1</i>	4 (%9.5)	2 (%14.3)	
<i>Grade 2</i>	22 (%52.4)	7 (%50.0)	
<i>Grade 3</i>	16 (%38.1)	5 (%35.7)	
Lenfovasküler İnvazyon	13 (%31.0)	3 (%21.4)	0.734
T Evresi			0.695
<i>T1</i>	13 (%31.0)	4 (%28.6)	
<i>T2</i>	24 (%57.1)	7 (%50.0)	
<i>T3</i>	5 (%11.9)	3 (%21.4)	
Mitoz Skoru			0.946
<i>Skor 1</i>	19 (%45.2)	6 (%42.9)	
<i>Skor 2</i>	13 (%31.0)	5 (%35.7)	
<i>Skor 3</i>	10 (%23.8)	3 (%21.4)	
Nekroz	10 (%23.8)	4 (%28.6)	0.732
Tümör Nükleer Grade'i			0.766
<i>Grade 1</i>	5 (%11.9)	1 (%7.1)	
<i>Grade 2</i>	23 (%54.8)	7 (%50.0)	
<i>Grade 3</i>	14 (%33.3)	6 (%42.9)	

***Lenf nodu evresi, lenf nodu durumu bilinen olgular üzerinden değerlendirilmiştir.**

HER-2 gen amplifikasyonu olan fakat Kr-17 polizomisi bulunmayan grup ile HER-2 amplifikasyonu olmaksızın Kr-17 polizomisi bulunan grup kıyaslandığında ise, ortalama metastatik lenf nodu sayısı (p= 0.007), 10'nun üzerinde metastatik lenf noduna sahip olmak (N3) (p= 0.010) ve lenfovasküler invazyon yönünden (p= 0.019) iki grup arasında

istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Diğer patolojik prognostik parametreler yönünden istatistiksel anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 18).

Tablo 18: SISH ile Kr-17 Polizomisi Olmaksızın HER-2 Amplifikasyonu Bulunan Grup ile HER Gen Amplifikasyonu Olmaksızın Kr-17 Polizomisi Bulunan Grubun Karşılaştırılması

Değişkenler	HER-2 SİSH (-) Polizomi (+) (n=14)	HER-2 SİSH (+) Polizomi (-) (n=22)	P
Yaş	54.7±15.2	50.9±11.5	0.398
Steroid Reseptör			0.267
<i>Negatif</i>	-	3 (%13.6)	
<i>Pozitif</i>	14 (%100)	19 (%86.4)	
Ortalama Metastatik LN Sayısı *	1 (0-3)	9 (0-49)	0.007
<i>Lenf nodu Evresi*</i>			
<i>N0 Metastaz Yok</i>	4 (%40.0)	3 (%16.7)	0.207
<i>N1 1-3</i>	6 (%60.0)	4 (%22.2)	0.097
<i>N2 4-9</i>	-	2 (%11.1)	0.524
<i>N3 10+</i>	-	9 (%50.0)	0.010
En Büyük Met.LN Çapı	1.8 (0.5-2.0)	2 (0.9-3.5)	0.266
Grade			0.563
<i>Düşük Grade</i>	9 (%64.3)	12 (%54.5)	
<i>Yüksek Grade</i>	5 (%35.7)	10 (%45.5)	
Lenfovasküler İnvazyon	3 (%21.4)	13 (%61.9)	0.019
T Evresi			1.000
<i>T1-T2</i>	11 (%78.6)	16 (%72.7)	
<i>T3</i>	3 (%21.4)	6 (%27.3)	
Mitoz			0.273
<i>Skor 1</i>	6 (%42.9)	5 (%22.7)	
<i>Skor2- 3</i>	8 (%57.1)	17 (%77.3)	
Nekroz	4 (%28.6)	5 (%22.7)	0.712
Nüklüer Grade			0.342
<i>Düşük Grade</i>	8 (%57.1)	9 (%40.9)	
<i>Yüksek Grade</i>	6 (%42.9)	13 (%59.1)	

* HER-2 SİSH (-) Polizomi (+) grup 10, HER-2 SİSH (+) Polizomi (-) grup 18 denek üzerinden değerlendirildi.

5- TARTIŞMA

Meme kanseri farklı biyolojik davranışlara sahip heterojen bir hastalıktır. Benzer hastalık evrelerine sahip hastalar son derece farklı klinik sonuçlar ile karşımıza çıkabilir. Bu heterojenitenin bilinmesi, her bir olgunun, sahip olduğu tüm değişkenlerin göz önüne alınarak değerlendirilmesi ihtiyacını doğurur (2, 3). Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik parametreler ile morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler yani moleküler belirteçlerin birlikte değerlendirilmesi ile mümkündür (4). Bu patolojik prognostik parametreler ile klinik bulgular birlikte değerlendirilerek her hasta için gerekli bireysel tedavi planı oluşturulabilir.

Patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olan HER-2/ NEU (CerbB2) gen durumu aynı zamanda tedavi planlanmasını yönlendirecek verilerden biridir (10). Yapılan çalışmalarda, yaklaşık olarak invaziv meme karsinomlarının %15-25'inde (10-30), HER-2 gen amplifikasyonu olduğu saptanmıştır (6,9,10).

Çalışmamızın ilk aşamasına dahil edilen, immünohistokimyal yöntemle Cerb-B2 skor 2 olarak değerlendirilmiş olan 83 adet olgudan, 26 olguda (% 31.3) SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olduğu tespit edilmiştir. 57 olguda ise (% 68.6) SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç literatürle uyumludur (12). Yani SISH yöntemi HER-2 gen amplifikasyonunu değerlendirmede kullanılabilir güncel bir yöntemdir.

Meme karsinomunda HER-2 pozitifliğinin; agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa survi ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birlikte olduğunu gösteren pek çok klinik çalışma mevcuttur (6,7, 8, 10, 12).

Biz ise çalışmanın 2. aşamasına dahil ettiğimiz 80 adet olguyu HER-2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan veya Kr-17 polizomisi olan ve olmayan şeklinde kategorize ederek bu farklı grupları, hasta yaşı, tümör boyutu, tümör histolojik grade'i, tümör nükleer grade'i, mitotik skor, steroid reseptör ekspresyonu, lenfovasküler invazyon varlığı, nekroz varlığı, metastatik lenf nodu varlığı ve sayısı ve en büyük metastatik lenf nodu çapı gibi patolojik prognostik parametreler ile olan ilişkileri yönünden kıyasladık.

Hasta yaşını değerlendirmek için yapılan çalışmalarda bu konuda birbirinden farklı ve hatta birbirine zıt sonuçlar bildirilmiştir. Gençlerde prognoz daha kötü olduğunu (92) veya gençlerde prognoz daha iyi olduğunu (93) ileri süren yayınlar mevcuttur. Bazı yayınlarda ise yaşla prognoz arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen grupta ortalama hasta yaşı

50.3 (± 11.4); HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupta ise 56.7 (± 13.0) olarak bulunmuştur (Tablo 1). İki grup arasında, ortalama hasta yaşı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen her ikisi de post menapozal hasta grubunu temsil ettiğinden, klinik olarak kullanılabilecek bir veri değildir fakat yine de HER-2 gen amplifikasyonu post menapozal dönemdeki daha genç hasta popülasyonunda beklenebilir.

Tümör boyutu, bağımsız bir prognostik parametredir ve en önemli parametrelerden biridir. (3, 47). Van de Vijver ve arkadaşları 189 kişilik vaka serisinde, İHK ile HER-2 overekspresyonu ile tümör boyutu ilişkisini incelemişler ve Her-2 ekspresyonunun artan tümör boyutu ile ilişkili olduğunu fakat lenf nodu tutulumu ile ilişkili olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca, ortalama 37 aylık takipleri sonrasında toplam hayatta kalım süresinde azalma olduğunu fakat bu azalmanın tümör boyutu eşitlendiğinde önemini yitirdiğini tespit etmişlerdir (102). Bizim çalışmamızda ise, SISH ile tespit ettiğimiz HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör boyutları arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 9A-B).

Cerb-B2 (HER-2) amplifikasyonunun prognostik değerine ilişkin yapılmış ilk çalışmalardan biri Berger ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. 51 olguluk bu çalışmada, Cerb-B2 amplifikasyonu ile tümör nükleer grade'i ve nodal tutulum arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilmiştir. (103) Bizim çalışmamızda ise, HER-2 gen amplifikasyonu olan gruptaki tümörlerin çoğu (%58.3) yüksek nükleer grade'e sahipken; bu durum, HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupla kıyaslandığı zaman, HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör nükleer grade'i arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilmemiştir (Tablo 11A-B). 1990'daki *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) kapsamında yapılan bir çalışmada, immünohistokimyasal yöntemle Cerb-B2 overekspresyonuna bakılmış ve yüksek nükleer grade'e sahip olgularda daha çok overekspresyon olduğu tespit edilmiştir. Fakat, ilginç olarak, Cerb-B2 overekspresyonu ile sağ kalım arasındaki korelasyon yalnızca düşük nükleer grade'e sahip olgularda görülmüştür. Bu alt grupta, Cerb-B2 overekspresyonunun, mortalitede yaklaşık 5 katlık artışa neden olduğu bulunmuştur. Buna dayanılarak, bu iki parametrenin birleştirilmiş prediktif değerinin, lenf nodu durumunun prediktif değerinden daha güçlü olduğu ifade edilmiştir. Böylece, nükleer grade ile Cerb-B2 durumu kombine edilerek düşük ve yüksek riskli hasta grubu tespit edilebilir denmiştir (104).

Çalışmamızda, HER-2 gen amplifikasyonu bulunan olgulardan 13'ü (%54.2) düşük hisyolojik grade'e (grade 1 + grade 2) sahipken; 11 (%45.8) olgu yüksek histolojik grade'e sahip bulunmuştur. HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupla kıyaslandıkları zaman

tümör histolojik grade'i yönünden iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 10A-B). Tsuda ve arkadaşları tarafından ise, tümör histolojik grade'i ve onun bileşenleri olan tübül formasyonu ile mitoz skorunun bağımsız prognostik parametreler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Cerb-B2 amplifikasyonun tümör boyutu ve nodal tutulum ile ilişkisi olmadığını fakat tümör histolojik grade'i, nükleer grade ve mitoz skoru ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Nodal tutulum ve tümör histolojik grade'i sabit tutulduğu zaman ise Cerb-B2'nin prognostik değerinin azaldığını bildirmişlerdir. (105)

Heintz ve arkadaşları ise 50 kişilik bir vaka serisinde DNA düzeyinde HER-2 gen amplifikasyonunu araştırmış ve amplifikasyonu, hayatta kalım, metastaz, rekürrens veya histolojik grade'den bağımsız olduğunu bulmuşlardır. Ancak HER-2 amplifikasyonu ile artmış mitotik skor ve ER –PR negatifliği arasında güçlü korelasyon tespit etmişlerdir (67). Bu çalışmaya benzer şekilde, biz de, SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen gruptaki tümörlerin yüksek mitotik skora sahip olduğunu ve bu sonucun amplifikasyon olmayan gruba kıyaslandığı zaman aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik (Tablo 12A-B) ($p=0.044$). HER-2 geninin epidermal growth faktör ailesinin üyelerinden biri ve hücre proliferasyonunda görevli olduğu düşünülürse bu sonuç beklenen bir sonuçtur.

Österojen (ER) ve progesteron (PR) reseptör ekspresyonuna bakıldığı zaman ise, çalışmamızda, HER-2 amplifikasyonu bulunan grupta ER negatifliği (%29.2), amplifikasyon olmayan gruba göre daha fazla bulunmuştur (%14.3). PR negatiflik oranları ise birbirine yakın bulunmuştur (%25, %19.6) (Tablo 15A). Daha sonra, ER veya PR'den biri ve her ikisi de pozitif grup ile her ikisi de negatif gruplar oluşturarak HER-2 gen amplifikasyon oranlarını kıyaslanmıştır. Bu kıyaslama sonucunda da, ER veya PR ekspresyonu ile HER-2 gen amplifikasyonu arasında pozitif veya negatif istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır (Tablo 15B)

Çalışmamızdaki en önemli bulgulardan biri lenf nodu tutulumu ile HER-2 gen amplifikasyonu arasında tespit ettiğimiz güçlü korelasyondur. Şöyle ki, amplifikasyon olan grupta lenf nodu tutulumu olmayan (N0) hasta oranı %15.8 iken, amplifikasyon izlenmeyen grupta bu oran %47.7'dir. Amplifikasyon olan gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 10'ken, amplifikasyon olmayan gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 1'dir. Ayrıca, amplifikasyon görülen grupta, 10'nun üzerinde metastatik lenf nodu tutulum (N3) oranı %52.6' iken, amplifikasyon görülmeyen grupta bu oran çok düşük düzeyde, %6.7 düzeyindeydi. Amplifikasyon görülen ve görülmeyen gruplar arasında, bu her üç lenf nodu metastazı durumu açısından, istatistiksel fark anlamlıdır (Tablo 14) (

$p<0.001$, $p=0.017$, $p<0.001$). Bu sonuçlar, HER-2 gen ve ürünlerinin tümör yayılımı ve tümör hücre motilitesinde etkili ve görevli olduğu ve dolayısıyla tümör metastaz olasılığında artışa neden olduğu görüşünü destekler. Lenf nodu tutulumu ve HER-2 amplifikasyonu arasındaki ilişkiye yönelik literatürde farklı sonuçlar mevcuttur. Tiwari ve arkadaşları 61 vaka üzerinde yaptıkları çalışmada, HER-2 amplifikasyonunu tespit etmek için southernblot yöntemini kullanmışlar ve bizim çalışmamıza benzer şekilde; yaş, tümör boyutu ve hormon reseptör durumu yönünden amplifiye grup ile amplifiye olmayan grup arasında fark olmadığını fakat lenf nodu tutulumu ve HER-2 amplifikasyonu açısından anlamlı fark olduğunu tespit etmişlerdir. Amplifikasyon görülen grubun % 94'ünde tanı anında metastatik hastalık olduğunu dolayısıyla, HER-2'nin tümörün erken yayılımıyla ilişkili olduğunu ve bu nedenle kötü prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (106).

Lenfovasküler invazyon HER-2 gen amplifikasyonu ile anlamlı ilişki tespit ettiğimiz bir diğer parametredir. Amplifikasyon görülen grupta (%56.5), amplifikasyon görülmeyen gruptakinden (%28.6) 2 kat fazla oranda, lenfovasküler invazyon tespit ettik ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamıydı (Tablo 13) ($p=0.019$). Artmış lenfovasküler invazyon oranı, HER-2 amplifikasyonu olan grupta, bu yöntemin erken tümör yayılım mekanizması olarak kullanıldığını işaret eder.

Tümör nekrozu ve en büyük metastatik lenf nodu çapı ise, HER-2 amplifikasyonu ile arasında önemli bir ilişki tespit etmediğimiz, patolojik prognostik parametrelerdir.

Kromozom 17 polizomisi, kullanılan yöntem ve çalışılan materyale göre değişmek koşulu ile, meme kanserlerinde yaklaşık 1/3'ünde bulunur ve İHK ile skor 2 boyanan olguların yarısından azından bulunur (79). Bu da, HER-2 durumunu değerlendiren testlerde karışıklığa neden olabilir ve muhtemelen İHK ile genetik amplifikasyonu değerlendiren testler arasındaki diskorelasyonun nedenlerinden biridir (88, 89). Bazı yazarlar Kr-17 polizomisinin HER-2 mRNA veya protein overekspresyonuna neden olmadığını (79) bir kısmı ise ekspresyonda Kr-17 polizomisinin katkısının sınırlı olduğunu bulmuştur (89).

Bizim çalışmamızda, 80 olgudan 14'ünde (%17.5) HER-2 gen amplifikasyonu olmadan Kr-17 polizomisi tespit edilmiştir. Dolayısıyla, HER-2 amplifikasyonu olmadan immünohistokimyasal testlerde tespit edilen boyanmadan ve İHK ile genetik testler arasındaki diskorelasyonun bir kısmından bu polizomik grup sorumlu tutulabilir. Başka bir çalışmada, immünohistokimya ile farklı skorlarda boyanmış, 309 olguda, Kr-17 polizomisi araştırılmış ve İHK ile skor 0 veya skor 1 boyanmış vakaların %12.3'ünde, skor 2

boyanmış olguların %42.8'inde ve skor 3 boyanmış olguların ise %66'sında, Kr-17 polizomisi tespit edilmiştir. Ayrıca, FISH ile genetik amplifikasyon tespit edilmeyen, İHK skor 2 ve skor 3 olgularda; skor 0 ve skor 1 olgulardan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla oranda Kr-17 polizomisi olduğunu belirtmişlerdir (107).

Bizim çalışmamızda, Kr-17 polizomisi bulunan grubun patolojik prognostik parametrelerle olan ilişkisine bakıldığında, olguların %100'ünde ER, %98.3'ünde PR ekspresyonu görülmüştür. Metastatik lenf nodu sayısı 0 ile 18 arasında değişirken, olguların çoğunda (%50) tümör grade'i 2 olarak saptanmıştır. Bu grup, Kr-17 polizomisi bulunmayan grupla kıyaslandığında, iki grup arasında, yalnızca ER ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 16). Daha sonra, HER-2 amplifikasyonunun prognostik etkisini dışlayabilmek için, HER-2 amplifikasyonu olmayan olgulardan Kr-17 polizomisi olanlar ve olmayanlar kıyaslanmıştır. Bu iki grup kıyaslandığında, hiçbir patolojik prognostik parametre yönünden fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo Bu tespit, Kr-17 polizomisi bulunmasının, HER-2 amplifikasyonunun tersine kötü prognostik bir belirteç olmadığı görüşünü desteler.

226 kişilik vaka serisi üzerine yapılan bir çalışmada, FISH ile net HER-2 kopya sayısı değerlendirilerek veya HER-2/ Kr-17 oranı hesaplanarak, borderline olan tüm olgularda Kr-17 polizomisi tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Kr-17 polizomisi ile artmış tümör grade'i, steroid reseptör negatifliği veya azalmış hastalıksız sağkalım arasında ilişki olmadığı belirtilmiştir. Dolayısıyla, Kr-17 pozomisi görülen tümörlerin, HER-2 negatif tümörlere daha çok benzediği belirtilmiştir (88).

415 serilik başka bir çalışmada ise, İHK ile pozitif boyanan hücre miktarına, FISH ile HER-2 amplifikasyonuna ve Kr-17 polizomisine bakılmıştır. 77 olguda polizomi tespit edilmiş olup, polizominin pozitif boyanan hücre miktarı ile korele olduğu fakat HER-2 amplifikasyonu ile korelasyon göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca amplifikasyon olmayan ve Kr-17 polizomisi izlenen gruptaki olgularda, HER-2 amplifikasyonu olan gruba göre belirgin iyi biyolojik özelliklere sahip tümör varlığı dikkati çekmiştir (90).

Biz ayrıca, SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olan fakat Kr-17 polizomisi bulunmayan grupla, HER-2 amplifikasyonu bulunmayan ve Kr-17 polizomisi bulunan grupları kıyasladık. Polizomi bulunan grupta ortalama metastatik lenf nodu sayısı 1 (0-3), amplifikasyon bulunan grupta ise 9 (0-49) olarak saptanmıştır. Bunun yanında, polizomi grubunda lenfovasküler invazyon % 21.4, amplifikasyon grubunda ise % 61.9 olarak hesaplanmıştır (Tablo 18). İstatistiksel olarak anlamlı olan bu parametreler de, polizomik grubun, daha iyi biyolojik özelliklere sahip tümör grubunu temsil ettiğini gösterir.

Bu çalışmanın belirli sayıda olgu üzerinden yürütüldüğü göz ardı edilmemelir. Bu durum, bazı prognostik faktörler ile gerek HER-2 amplifikasyonu gerekse Kr-17 polizomisi arasındaki olası negatif / pozitif anlamlı korelasyonu tespit etmemizi engellemiş olabilir. Dolayısıyla, daha geniş vaka serilerinde, HER-2 gen amplifikasyonu ile Kr-17 polizomisinin, prognostik parametreler ile olan ilişkisinin araştırılması faydalı olacaktır. Sonuçların klinik korelasyonu da, patolojiyi kiliniğe daha da yaklaştırmış olan bu yeni prognostik moleküler belirteç başlığında, anlamlı olacaktır. Ayrıca bu araştırmada kullandığımız, standart yöntemlerle korelasyonu yüksek, arşivlenebilir, maliyeti nispeten ucuz, otomatize ve değerlendirmesi ışık mikroskobunda yapıldığından daha pratik bir yöntem olduğunu düşündüğümüz SISH yöntemi, güncel pratikte de güvenle kullanılabilir.



6 -SONUÇLAR

- ✓ Çalışmamızın ilk aşamasına dahil edilen İHK ile Cerb-B2 skor 2 tespit edilen 83 adet olgudan, 26 adet olguda (% 31.3) SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen grupta ortalama hasta yaşı 50.3 (± 11.4) ; HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupta ise 56.7 (± 13.0) olarak bulunmuştur. İki grup arasında, ortalama hasta yaşı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.
- ✓ SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen gruptaki tümörlerin yüksek mitotik skora sahip olduğu ve bu sonucun amplifikasyon olmayan grupla kıyaslandığı zaman farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Çalışmamızdaki amplifikasyon olan grupta lenf nodu tutulumu olmayan (N0) hasta oranı %15.8 iken, amplifikasyon izlenmeyen grupta bu oran %47.7'dir. Amplifikasyon olan gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 10'ken, amplifikasyon olmayan gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 1'dir. Ayrıca, amplifikasyon görülen grupta, 10'nun üzerinde metastatik lenf nodu tutulum (N3) oranı %52.6' iken, amplifikasyon görülmeyen grupta bu oran çok düşük düzeyde, %6.7 düzeyindedir. Amplifikasyon görülen ve görülmeyen gruplar arasında, bu her üç lenf nodu metastaz durumu açısından istatistiksel fark anlamlıydı.
- ✓ Amplifikasyon görülen grupta (%56.5), amplifikasyon görülmeyen gruptakinden (%28.6) 2 kat fazla oranda, lenfovasküler invazyon tespit ettik ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.
- ✓ SISH ile tespit ettiğimiz HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör boyutları, tümör histolojik grade'i, tümör nükleer grade'i, tümör boyutu, en büyük metastatik lenf nodunun çapı ve tümör nekrozu arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır.
- ✓ Çalışmamızda, 80 olgudan 14'ünde (%17. 5) HER-2 gen amplifikasyonu olmadan Kr-17 polizomisi tespit edilmiştir.
- ✓ Kr-17 polizomisi bulunan grupta olguların %100'ünde ER, %98.3'ünde PR ekspresyonu görülmüştür. Metastatik lenf nodu sayısı 0 ile 18 arasında değişirken, olguların çoğunda (%50) tümör grade'i 2 olarak saptanmıştır. Bu grup, Kr-17

polizomisi bulunmayan grupla kıyaslandığında, iki grup arasında, yalnızca ER ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur.

- ✓ HER-2 amplifikasyonunun prognostik etkisini dışlayabilmek için, HER-2 amplifikasyonu olmayan olgulardan Kr-17 polizomisi olanlar ve olmayanlar kıyaslanmıştır. Bu iki grup kıyaslandığında ise, hiçbir patolojik prognostik parametre yönünden fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- ✓ Polizomi bulunup amplifikasyon bulunmayan grupta ortalama metastatik lenf nodu sayısı 1 (0-3), polizomi bulunmayıp amplifikasyon bulunan grupta ise 9 (0-49) olarak saptanmıştır. Bunun yanında, polizomi grubunda lenfovasküler invazyon % 21.4, amplifikasyon grubunda ise % 61.9 olarak hesaplanmıştır.



7-ÖZET

Meme kanseri, biyolojik potansiyeli farklı olan heterojen bir hastalık grubu olup, her bir olgunun, bu evrimsel spektrum içindeki yerine, ayrı ayrı yerleştirilmelidir. Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik parametreler ile morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler yani moleküler belirteçlerin birlikte değerlendirilmesi ile mümkündür. Bu patolojik prognostik parametreler ile klinik bulgular birlikte değerlendirilerek her hasta için gerekli bireysel tedavi planı oluşturulabilir.

Patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olan HER-2/ NEU (Cerb-B2) gen durumu aynı zamanda tedavi planlanmasını yönlendirecek verilerden biridir. HER-2 gen amplifikasyonu, kemoterapi ve hormonoterapiye yanıtın tahmininde kullanılır. İleri evre metastatik meme CA tedavisinde, bu reseptörü hedef alan monoklonal antikor (MAb) olan ‘trastuzumab’ın geliştirilmiştir. Monoklonal antikor tedavisinden en çok yarar görecektir hasta grubu, HER-2 pozitifliği yüksek olan hastalardır. İnvaziv meme kansinonlarının %15-25’inde(10-30), HER-2 gen amplifikasyonu görülür ve bu da; agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa survi, özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birlikte dir.

Meme kansinomu hastalarında tümörün HER-2 durumunun hangi yöntemle tespit edilmesi gerektiği ise tartışmalı bir konudur. HER-2 gen durumunu değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri immünohistokimyasal (İHK) yöntemdir. İHK, kolay ve ucuz bir test olup en önemli deavantajı değerlendirme kriterlerinin subjektifliği nedeniyle, değerlendiriciler arasındaki uyumsuzluktur. Silver enhanced in situ hibridizasyon yönteminde (SİSH) ışık mikroskopunda değerlendirme yapılır ve preparatlar arşivlenebilir. Bu yöntem kantitatif bir yöntem olup değerlendiriciler arasındaki uyum yüksektir.

Biz çalışmamızda; ilk aşamada, AOH patoloji bölümünde, ekim 2007 ile şubat 2008 arasında invaziv meme kansinomu tanısı almış, immünohistokimyasal olarak CerbB2 skor 2 olarak değerlendirilmiş, 83 adet olguda, SİSH yöntemi ile, hangi oranda HER-2 amplifikasyonu olduğu araştırdık. Daha sonra ise, lenf nodu eksizyonu dışındaki 80 olguyu, HER-2 amplifikasyonu olan ve olmayan olarak kategorize ederek ve bu grupları hasta yaşı, tümör boyutu, histolojik grade, nükleer grade, mitoz skoru, nekroz varlığı, lenfovasküler invazyon varlığı, steroid reseptör durumu ve lenf nodu metastaz varlığı ile sayısından oluşan prognostik parametreler yönünden geriye dönük olarak inceledik.

Ayrıca SISH yöntemi ile Kr-17 düzeyine bakılmış ve olgular, polizomi olan ve olmayan şeklinde kategorize edilmiştir. Bu grupları da benzer olarak yukarıda sayılan prognostik parametreler ile olan ilişkileri yönünden inceledik.

Çalışmamızın ilk aşamasına dahil edilen İHK ile Cerb-B2 skor 2 tespit edilen olguların %31.3'ünde SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olduğu tespit edilmiştir. SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen gruptaki tümörlerin yüksek mitotik skora sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmamızdaki en önemli bulgulardan biri lenf nodu tutulumu ile HER-2 gen amplifikasyonu arasında bulunan güçlü korelasyondur. Ayrıca Lenfovasküler invazyon HER-2 gen amplifikasyonu ile anlamlı ilişki tespit ettiğimiz bir diğer parametredir. HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör boyutları, tümör histolojik grade'i, tümör nükleer grade'i, tümör boyutu, en büyük metastatik lenf nodunun çapı ve tümör nekrozu arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Çalışmamızda, olguların %17.5'inde HER-2 gen amplifikasyonu olmadan Kr-17 polizomisi tespit edilmiştir. HER-2 amplifikasyonu bulunmayan olgulardan Kr-17 polizomisi olanlar, olmayanlar ile kıyaslandığında, bu iki grup arasında, hiçbir patolojik prognostik parametre yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olan fakat Kr-17 polizomisi bulunmayan grupta, HER-2 amplifikasyonu bulunmayan ve Kr-17 polizomisi bulunan gruplar kıyaslanmıştır. Polizomik grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az metastatik lenf nodu ve düşük oranda lenfovasküler invazyon saptanmıştır.

Güncel pratikte, standart yöntemlerle korelasyonu yüksek, arşivlenebilir, maliyeti nispeten ucuz, otomatize ve değerlendirmesi ışık mikroskopunda yapıldığından daha pratik bir yöntem olduğunu düşündüğümüz SISH yöntemi, HER-2 gen amplifikasyonunu ve Kr-17 düzeyini tespit etmek için güvenle kullanılabilir.

8-KAYNAKLAR

1. Schnitt SJ, Milis RR, Handy AM, et al. The Breast in: Mills SE, Carter D, Reuter VE (Edt). Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 2004
2. Heimann R, Hellman S. Aging, progression, and phenotype in breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2686–2692.
3. Rosen's Breast Pathology, 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009
4. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/ neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor and Target for Therapy. *Stem Cells* 1998;16: 413-428
5. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimon D. The Predictive Value of HER2 in Breast Cancer. *Oncology* 2001;61:73-82.
6. Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Crafa P, Naldi N and Cascinu S. HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Annals of Oncology* 2002; 13:1398-1403.
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
8. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1993 Oct;11(10):1936-42.
9. Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, Penault-Llorca F, Rüschhoff J, Gutjahr T, Habben K, van de Vijver MJ. Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol.* 2007 May;20(5):584-91. Epub 2007 Mar 30.
10. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hana WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Pres MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SER, Tubbs R, Vance GH, Van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast. *Journal of Clinical Oncology* 2007 Jan ; 25(1) : 118-145.
11. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschhoff J, Tomasic G, Van de Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines *Mod Pathol.* 2003 Feb;16(2):173-182.
12. Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal M, Seth A and Marks A. Defining a Test for HER-2/neu Evaluation in Breast Cancer in the Diagnostic Setting. *Mod Pathol* 2001;14(7):677–685.
13. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol.* 2000 May;53(5):374-81.
14. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol.* 2000 Feb;113(2):251-8

15. Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, Beuzeboc P, Mouret E, Zafrani B and Sastre-Garau X. Strong Correlation between Results of Fluorescent *In Situ* Hybridization and Immunohistochemistry for the Assessment of the ERBB2 (HER-2/*neu*) Gene Status in Breast Carcinoma. *Mod Pathol* 2000;13(11):1238-43
16. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/*neu* Testing in Breast Carcinoma: A Combined Immunohistochemical and Fluorescence In Situ Hybridization Approach. *Mod Pathol* 2000;13(8):866–873
17. Carbone A, Botti G, Gloghini A, Simone G, Truini M, Curcio MP, Gasparini P, Mangia A, Perin T, Salvi S, Testi A, Verderio P. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists *J Mol Diagn.* 2008 Nov;10(6):527-36. Epub 2008 Oct 2
18. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, Lyon, IARC Pres, 2003.
19. Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ, LiVolsi VA, Wick MR. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology. 4th Ed. China, Elsevier Inc, 2006
20. McCarty KS, Narth Jr & Manju. Breast in: Sternberg SS (Edt). *Histology for Pathologist*, 2nd ed. Lippincott- Raven, Philadelphia 1997: 71-82.
21. Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. 5.baskı, Cilt II, İstanbul, Nobel, 1999
22. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi Hareket sistemi (kemikler –eklemler-kaslar)*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara 1993
23. Ramakrishnan R, Khan SA, Badve S, et al. Morphological changes in breast tissue with menstrual cycle. *Mod Pathol.* 2002; 15(12): 1348-1356.
24. Vogel PM, Georgiade NG, Fetter B, et al. The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathol.* 1982; 104: 23-24.
25. Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. *Manuel of Clinical Oncology*. (5 th ed) UICC, Genova 1990, pp 236-248. (Türkçeye çevrilmiş besinci baskı, 1992. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savas Dairesi Başkanlığı ve Türk Kanser Arastırma ve Savas Kurumu işbirliği ile yayınlanmıştır)
26. Ferrero JM, Namer M. Epidemiology of cancer of the breast *Arch Anat Cytol Pathol.* 1994;42(5):198-205.
27. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer istatistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
28. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2001 Mar;2(3):133-40.
29. Fisher B. Malignancies of the Breast. In: Cameron RB (eds), *Practical Oncology*. Appleton& Lange, Connecticut 1994, pp 417-434.
30. Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. *Manuel of Clinical Oncology*. (5 th ed) UICC, Genova 1990, pp 236-248. (Türkçeye çevrilmiş besinci baskı, 1992. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savas Dairesi Başkanlığı ve Türk Kanser Arastırma ve Savas Kurumu işbirliği ile yayınlanmıştır)
31. Vatten LJ. Female sex hormones increase the risk of breast cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1998 Aug 20;118(19):2969-74.
32. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Apr 17;94(8):606-16.

33. Henderson BE. Endogenous and exogenous endocrine factors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1989 Dec;3(4):577-98.
34. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993;15:48-65.
35. White E, Malone KE, Weiss NS, Daling JR. Breast cancer among young U.S. women in relation to oral contraceptive use. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Apr 6;86(7):505-14.
36. Ursin G, Ross RK, Sullivan-Halley J, Hanisch R, Henderson B, Bernstein L. Use of oral contraceptives and risk of breast cancer in young women 1: *Breast Cancer Res Treat.* 1998 Jul;50(2):175-84.
37. World Cancer Research Fund. American Institute for Cancer Research, 1997. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. American Institute for Cancer Research: Washington DC.
38. Fruits and Vegetables, vol. 8. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 2003.
39. McTiernan A, Ulrich C, Slate S, Potter J. Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes Control* 1998; 9:487–509.
40. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA.* 1998 Feb 18;279(7):535-40.
41. Rosalind A Eeles Future possibilities in the prevention of breast cancer: Intervention strategies in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers *Breast Cancer Res.* 2000;2(4):283-90. Epub 2000 May 25.
42. Nkondjock A, Ghadirian P Epidemiology of breast cancer among *BRCA* mutation carriers: an overview. *Cancer Lett.* 2004 Mar 8;205(1):1-8.
43. Nkondjock A, Robidoux A, Paredes Y, Narod SA, Ghadirian P. Diet, lifestyle and *BRCA*-related breast cancer risk among French-Canadians. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Aug;98(3):285-94. Epub 2006 Mar 16.
44. E.M. de Villiers, R.E Sandstrom, H. Zur Hausen and C.E Buck Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast *Breast Cancer Res* 2005,
45. Cantu de Leon D, Perez Montiel D, Nemcova J, Mikyskova I, Turcios E, Villavicencio V, Cetina L, Coronel A, Hes O. Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer.* 2009 Jan 22;9(1):26.
46. F.Moinfar. Essentials of Diagnostic Breast Pathology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
47. Tavassoli FA. Pathology of the Breast. 2nd ed. Norwalk Appleton Lange, Stanford, 1992.
48. Robbins GF, Leis HP Jr, Hutter Rup. A rational approach to and result of women with breast carcinoma. *J Breast* 3:9,1997.
49. Crowe JR, JP Gordon NH, Shenk RR, Zolliger Jr. RM, Brumberg DJ and Shuck JM. Primary tumor size. Relevance to Breast Cancer Survival. *Arch Surg* 127: 910-915, 1992.
50. Rigaud C, Theobald S, Noel P, et al: Medullary carcinoma of the breast: A multicenter study of its diagnostic consistency. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1005-1008.

51. Rosai J. and Ackerman's Surgical Pathology, 9th ed. Vol2, Mosby, 2004: 1763-1876 .
52. Van Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, Wisse-Brekelmans EC, van Galen CM, Kurver PH, Bellot SM, Fijnheer J, van Gorp LH, Kwee WS, Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol* 1992;23:603-607.
53. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, et al. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer* 1998;83:1529–1539.
54. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1045–1053.
55. BBF. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. *Histopathology*. 1991 19: 403-410.
56. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, et al. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22:207–209.
57. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologist Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 July; 124: 966-978.
58. Peiró G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Payá A, Seguí J. Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: Prognostic relevance. *Hum Pathol*. 2007 Jan;38(1):26-34. Epub 2006 Oct 23.
59. Acenero MJ, Gallego MG, Ballesteros PA, Gonzalez JF. Vascular density as a prognostic indicator for invasive ductal breast carcinoma. *Virchow Arch*. 1998 Feb; 432(2): 113-7.
60. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al (Edt). *AJCC cancer staging manual-6th ed.* New York, 2002, Springer.
61. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in breast cancer patient. *JAMA* 276: 1818-1822, 1996.
62. Xing W-R, Gilchrist KW, Haris CP et al. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early on set of breast cancer. *Breast Cancer Res* 1997;39:203-212
63. Pres MJ, Bernstein L, Thomas PA et al. HER-2 gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridisation: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997; 15:2894-2904
64. Depowski PL, Brien TP, Sheehan CE et al. Prognostic significance of p34 cyclin dependent kinase and MIB overexpression, and HER-2/ neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridisation in breast cancer. *Mod Pathol* 1998;11:18A
65. Lee AH, Gillett CE, Ryder K, Fentiman IS, Miles DW, Millis RR. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology*. 2006 May;48(6):692-701.
66. Donegan WL, Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 1997; 47: 28-51.
67. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA et al. Amplification of cerb-B2 oncogene in prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:160-163
68. Volpi A, Nanni O, De Paola F, Granato AM, Mangia A, Monti F, Schittulli F, De Lena M, Scarpi E, Rosetti P, Monti M, Gianni L, Amadori D, Paradiso A.

- HER-2 expression and cell proliferation: prognostic markers in patients with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Jul 15;21(14):2708-12.
69. Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, Serio G, Dalla Palma P. p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas. An immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinical stage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1992 Oct;98(4):408-18.
 70. Green S, Chambon P. The estrogen receptor from perception to mechanism. In: Parker MG (Ed) *Nuclear hormone receptors*. London. Academic Press 1991; 15-38.
 71. King WJ, De Sambre ER, Jensen EV, Greene GL. Comparison of immunocytochemical and steroid binding assays for estrogen receptors in human breast tumors. *Cancer Research*, 1985; 45: 293-299
 72. Mann S, Lauricia R, Carlson N, et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2001 Jan; 32(1): 113-8.
 73. Ciocca DR, Gago FE, Fanelli MA, Calderwood SK. Co-expression of steroid receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her-2/neu: Clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Dec;102(1-5):32-40. Epub 2006 Oct 17.
 74. T Akiyama, T Saito, H Ogawara, K Toyoshima, and T Yamamoto. Tumor promoter and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of the c-erbB-2 gene product in MKN-7 human adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 1988 March; 8(3): 1019-1026.
 75. W. Kolch, A. Kotwaliwale, K. Vass and P. Janosch. The role of Raf kinases in malignant Transformation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 25 April 2002, Cambridge University Press
 76. Thor A D, Liu S, Edgerton S, Moore II D, Kasowitz K M, Benz C C, Stern D F, and DiGiovanna M P. Activation (Tyrosine Phosphorylation) of ErbB-2(HER-2/neu) : A Study of Incidence and Correlation With Outcome in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 200; 18:3230-3239
 77. Kaya H, Ragazzani T, Aribal E, Günay İ, Kotioğlu E. Her-2/neu Gene Amplification Compared with HER-2/neu Protein Overexpression on Ultrasound Guided Core-Needle Biopsy Specimens of Breast Carcinoma. *Pathol . Oncol. Research*, 2001; 4(7) : 279-283
 78. Selvarajan S, Bay BH, Tan PH. The HercepTest Routine CerbB2 immunohistochemistry in breast cancer: Any Difference? *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33:473-6
 79. Rosenberg CL. Polysomy 17 and HER-2 Amplification: True, True, and Unrelated. *Journal of Clinical Oncology*, 2008 October; 26(30): 4856-4858
 80. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer*. 2001;92:2965-74.
 81. Gong Y, Gilcrease M and Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting *HER-2* gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol*. 2005; 18: 1015-1021
 82. Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y and Shi Z. Determination of HER2 Gene Amplification by Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH) in Archival Breast Carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15(6):657-665
 83. Interpretation Guideline Inform HER-2. Ventana Medical Systems, 2007, France.

84. Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, Tubbs RR: Metallographic *in situ* hybridization. Hum Pathol 2007, 38:1145-1159.
85. Dietel M, Ellis I, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölbl K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced *in situ* hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of *HER2* gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists . Virchows Arch. 2007 Jul;451(1):19-25
86. Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. Evaluation of automated silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) for detection of *HER2* gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. Histopathology. 2009 Jan;54(2):248-53.
87. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo A E, Gaire F, Farrell M, Walk E, Penault-Llorca F, Kurosumi M, Dietel M, Wang L , Loftus M, Pettay J, Tubbs R R, Grogan T M. Development of Automated Brightfield Double In Situ Hybridization (BDISH) Application for *HER2* Gene and Chromosome 17 Centromere (CEN 17) for Breast Carcinomas and An Assay Performance Comparison to Manual Dual Color *HER2* Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Diagnostic Pathology 2008, 3:41
88. Bempt IV, Loo PV, Drijkoningen M, Neven P, Smeets A, Christiaens, Robert Paridaens MS, De Wolf-Peeters C. Polysomy 17 in Breast Cancer: Clinicopathologic Significance and Impact on *HER-2* Testing. Journal of Clinical Oncology, October 2008; 26(30) : 4869-4874
89. Wang S, Saboorian M H, Frenkel E P, Haley B B, Siddiqui M T, Gokaslan Ş, Hynan L, Ashfaq R. Aneusomy 17 in Breast Cancer: Its Role in *HER-2/neu* Protein Expression and Implication for Clinical Assessment of *HER-2/neu* Status. Mod Pathol 2002;15(2):137–145
90. Torrisi R, Rotmensz N, Bagnardi V, Viale G, Curto BD, Dell'orto P, Veronesi P, Luini A, D'Alessandro C, Cardillo A, Goldhirsch A, Colleoni M: *HER2* status in early breast cancer: relevance of cell staining patterns, gene amplification and polysomy 17. Eur J Cancer 2007, 43:2339-2344.
91. Rosenberg J, Chia YL, Plevritis S, The effect of age, race, tumor size, tumor grade, and disease stage on invasive ductal breast cancer survival in the U.S.SEER database. Breast Cancer Res Treat. 2005 Jan; 89(1): 47-54.
92. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, et al. Relationship of patient age to pathological features the tumor and prognosis for patient stage I or II breast cancer. J. Clin Oncol. 1994; 12: 888-894.
93. Rutqvist LE, Wallegren A. Influence of age on outcome in breast carcinoma. Acta Radiol Oncol. 1983; 22:289-294.
94. Hibberd AD, Horwood LJ, Wells JE. Long term prognosis of women with breast cancer in New Zeland: study of survival to 30 years. Br. Med J (Clin Res Ed).1983; 286: 1777-1779
95. Safal M, Lower EE, Hsselgren PO, et al. Bilateral synchronous breast cancer and *HER-2/neu* overexpression. Breast Cancer Res Treat. 2002 Apr; 72(3): 195-201.
96. Ries LAG, Eisner MP. Cancer of the Female Breast in: Ries LAG, Young JL, Keel GE (edt). SEER Survival Monograph Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1998-2001, Patient and Tumor Characteristics, National Cancer Institute, SEER program, NIH, Bethesda, 2007.

97. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, and Norton L. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *The New Eng. J. Medicine* 2001 March;11(344):783-792
98. Slamon DJ, Eiermann W, Robert NJ, et al: A phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 94:S5 2005 .
99. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, et al: Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptorpositive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* . 2003; 95:142-153.
100. Mayer EL, Burstein HJ. Weighing a Dose-Dense Option for Adjuvant Chemotherapy and Trastuzumab in Early-Stage Breast Cancer. *J. of Clin. Oncol.* 2008 March 26(8): 1198-1200.
101. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol.* 2008 ; 26(15): 2568-2581.
102. van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. *N Engl J Med* 1988;319:1239-1245.
103. Berger MS, Locher GW, Saurer S et al. Correlation of c-erb B2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988;48:1238-1243.
104. Paik S, Hazan R, Fisher ER et al. Pathologic findings from the nations' surgical adjuvant breast and bowel project: prognostic significance of erb B2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990;8:103-112.
105. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* 1990; 65:1794-1800.
106. Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY et al. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 1992;12:419-426.
107. C L Hyun, H E Lee, K S Kim, S-W Kim, J H Kim, G Choe, and S Y Park The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer *J. Clin. Pathol.* March 1, 2008; 61(3): 317 - 321.