

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
GENEL CERRAHİ SERVİS ŞEFLİĞİ
İSTANBUL

MEME KANSER DOKUSUNDA İSKEMİNİN STEROİD RESEPTÖR VE
cerbB-2 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Mehmet SAYDAM

Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı'nın
Genel Cerrahi Programı İçin Öngördüğü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak hazırlanmıŐtır.

TEZ DANIŞMANI

Bülent GÜLEÇ

Doç. Tbp. Kd. Alb.

İSTANBUL 2009

ONAY SAYFASI

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı'na:

“Meme Kanseri Dokusunda İskeminin Steroid Reseptör ve cerbB-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi” konulu bu çalışma jürimiz Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Tbp. Kd. Alb. Bülent GÜLEÇ

Üye : Prof. Tbp. Tuğ. C. Turgut TUFAN

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Mehmet YILDIZ

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. M. Levhi AKIN

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Güner DAĞLI

Üye : Doç. Tbp. Kd. Alb. Bülent GÜLEÇ

ONAY:

Mehmet SAYDAM'ın 12/10/2009 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M.Zeki BAYRAKTAR

Prof. Tbp. Tümgeneral

Askeri Tıp Fakültesi Dekanı

Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Genel Cerrahi Servis Şefliği tarafından 15.09.2009 gün ve 0530-222-09 sayılı yazı ile verilmiş ve çalışmaya başlanmıştır.

Uzmanlık eğitimim boyunca, bana emeği geçen, bilgi, görgü ve deneyimlerini benimle paylaşan, sıcak ilgi, destek ve yakınlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, gerek cerrahi sanatını öğrenmemde, gerekse bilimsel açıdan yetişmemde çok değerli katkı ve destekleri ile başta Klinik Şefi değerli hocam Prof. Dr. Mehmet YILDIZ olmak üzere saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Tuncay ÇELENK (E), Prof. Dr. M. Levhi AKIN, Doç. Dr. Bülent GÜLEÇ, Doç. Dr. Cengizhan YİĞİTLER, Doç. Dr. Yavuz KURT, Doç. Dr. Sezai DEMİRBAŞ, Doç. Dr. A. Haldun ULUUTKU (E), Yrd. Doç. Dr. İlker SÜCÜLLÜ, Yrd. Doç. Dr. Ali İlker FİLİZ, Op. Dr. Ercan BÜLBÜL (E), Op. Dr. Talip ÖZBAY (V), Op. Dr. Yüksel Aydın, Op. Dr. Ergün Yücel'e teşekkürü bir borç bilirim.

Genel cerrahi uzmanlık eğitimim sırasında birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, servis hemşireleri, teknisyen ve personellerine candan teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında desteğini aldığım, mesleğimle ilgili gelişimime katkıda bulunan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, yoğun emek harcayan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Bülent GÜLEÇ'e, başta Prof. Dr. Hüseyin BALOĞLU olmak üzere tüm Patoloji servisi çalışanlarına ve istatistik bölümlerinde büyük yardımlarından dolayı Özlem KÖKSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca beni büyük özveri ve anlayışla destekleyen aileme, sevgili eşim Çiğdem SAYDAM'a, biricik kızım Deniz SAYDAM'a teşekkür ederim.

ÖZET

Meme Kanseri Dokusunda İskeminin Steroid Reseptör ve cerbB-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Kanserli meme dokusunda formolle tespit edilene kadar oluşacak iskeminin steroid reseptörlerin ekspresyonunu etkileyeceği ile ilgili bilgiler mevcuttu. İskeminin cerbB-2 ekspresyonunu da etkileyebileceği hakkında yapılmış çalışma mevcut değildi. Meme kanseri tedavisinde çok önemli prognostik değeri olan steroid hormon ve cerbB-2 düzeylerinde yanlış yorumlamalara neden olabilecektir. "İskemi zamanının meme kanser dokusunda steroid reseptör ve cerbB-2 ekspresyonu üzerine etkisi" adlı çalışma ile iskeminin kanserli meme dokusundaki bu etkileri araştırılmıştır.

Çalışmaya modifiye radikal mastektomi uygulanan 20 olgu alındı. Mastektomi materyalindeki tümöral dokudan frozen için gerekli örnek alınarak, geri kalan doku normalde uygulandığı şekilde % 10 tamponlu formalin içerisinde 24 saat süreyle fiksasyona tabii tutuldu. Her iki grupta steroid hormonlar ve cerbB-2 düzeyi araştırıldı.

Çalışma sonunda iskeminin, steroid reseptör ve HER-2/ neu gen ekspresyonuna negatif bir etkisinin olduğu ve özellikle HER-2/ neu gendeki bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.002$).

Sonuç olarak, steroid reseptör ve cerbB-2 düzeylerinin, en doğru şekilde tespiti için mastektomi materyalinin en uygun koşulda ve en kısa iskemi zamanıyla değerlendirmeye alınmasının, hedefe yönelik tedaviden yarar görecektir hasta sayısını artırabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Meme kanseri, İskemi, Östrojen reseptörü, Progesteron reseptörü, Her 2 / neu gen,

Yazar Adı : Tbp. Yzb. Mehmet SAYDAM

Danışman : Doç. Tbp. Kd. Alb. Bülent GÜLEÇ

SUMMARY

The Effect of Ischemia on Steroid Receptor and cerbB-2 Expression at Breast Cancer Tissue

There is knowledge about the influence of ischemia on the expression of steroid receptors at breast cancer tissue until it has been fixed with formalin. But there is no study showing that ischemia may also effect the cerbB-2 expression according to our knowledge. This situation may lead misinterpretation about the levels of steroid hormones and cerbB-2, which have high prognostic value at the treatment of breast cancer. These effects of ischemia at breast cancer tissue was investigated at this study named "The Effect of Ischemia on Steroid Receptor and cerbB-2 Expression at Breast Cancer Tissue" .

Twenty patients who have undergone modified radical mastectomy were included into this study. A sample of tumoral tissue at mastectomy material was seperated for frozen investigation, and the rest of the tissue was fixed with 10 % buffered formalin for 24 hours as it was routinely done. The levels of steroid hormones and cerbB-2 were investigated for both groups.

The results of this study showed us that ischemia has a negative effect on the gene expression of steroid receptors and HER-2/ neu gene and especially the variation at HER-2/ neu gene expression was statistically significant ($p<0.002$).

In conclusion, in order to determine the accurate detection of steroid receptor and cerbB-2 levels, evaluation of mastectomy material at the most appropriate conditions with the shortest ischemia time may increase the number of patients who will benefit from targeted therapy, as well.

Key Words : Breast cancer, Ischemia, Estrogen receptor, Progesteron receptor, Her 2/ neu gene

Author : Tbp. Yzb. Mehmet SAYDAM

Counseller : Doç. Tbp. Kd. Alb. Bülent GÜLEÇ

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
İNGİLİZCE ÖZET	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Anatomi	3
2.2 Embriyoloji	4
2.3 Histoloji	5
2.4.Meme Tümörlerinin Epidemiyolojisi	6
2.5.Meme Tümörünün Etyolojisi	7
2.6. Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler	9
2.7. Meme Kanserinde Hormon Reseptör ve <i>cerbB-2</i> Pozitifliğine Göre Tedavi Seçenekleri	24
2.8. Formalin ile Doku Tespiti	29
2.9 İskemi	29
GEREÇ ve YÖNTEM	31
BULGULAR	38
TARTIŞMA	50
SONUÇ ve ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

HER-2 /neu gen	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neural gene
cerbB-2	: Onkogen- Erythroblastosis Virus 2
ER	: Estrojen Receptor
PR	: Progesteron Receptor
EGF	: Epidermal Growth Factor
TGF	: Transforming Growth Factor
IDK	: İnvaziv Duktal Karsinoma
ILK	: İnvaziv Lobuler Karsinoma
IGF	: Insulin Like Growth Factor
EGF	: Epidermal Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
BRCA 1	: Breast Cancer Susceptibility Gene 1
BRCA 2	: Breast Cancer Susceptibility Gene 2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
4.1: Östrojen (%100 pozitif), kuvvetli nükleer boyanma 20x	40
4.2: ER (frozen) ile ER(normal takip) arasındaki ROC analizi	41
4.3: Progesteron (%100 pozitif) kuvvetli nükleer boyanma 20x	43
4.4: PR (frozen) ile PR(normal takip) arasındaki ROC analizi	44
4.5: FISH ile <i>cerbB-2</i> (+3) kuvvetli pozitif boyanması	45
4.6:Membran boyanmasının negatif olduğu <i>cerbB-2</i> (-) 20x	46
4.7: Membran boyanmasının pozitif olduğu <i>cerbB-2</i> (3+) 40x	47
4.8:HER-2/neu (frozen) ile HER-2/neu (normal takip) arasındaki Roc analizi	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1: Meme Tumorlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması	11
2.2: İnvaziv Meme Kanseri Sınıflaması (DSÖ 2003)	12
2.3: Modifiye Bloom - Richardson Derecelemesi	13
2.4: Modifiye Elston ve Ellis Derecelemesi	14
2.5: AJCC (American Joint Comission on Cancer) Sistemi	15-16
2.6: Meme Kanseri ile İlişkisi Gösterilen Tirozin Kinaz Reseptörleri	21
2.7: Hormon Reseptörleri ve Endokrin Tedaviye Cevap	24
3.1: Hercept Testinde Skorlama Sistemi	34
4.1: Olguların Özellikleri	38
4.2: Dokuda Reseptör ve cerbB-2 Değişimi	39
4.3: Östrojen Reseptör (ER) Değişimi	39
4.4: Çalışmaya Alınan Olgu Verileri	42
4.5: Progesteron Reseptör (PR) Değişimi	43
4.6: HER-2/neu gen Değişimi	46
4.7: Frozen ile Normal Takipte Bulgular Arası Anlamlılık Analizi	48
4.8: Korelasyon analizi	49

GİRİŞ

Kanser çağımızın en büyük ve önemli sağlık problemidir. Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre 2009 yılında kadınlarda 192270 yeni meme kanseri olgusuna tanı konulacağı ve aynı dönemde 40170 meme kanserli kadının hastalığı nedeniyle öleceği öngörülmektedir (1). Bu verilerle meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser olup, kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra en ölümcül olanıdır. Her sekiz kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri gelişme riski bulunmaktadır.

Meme kanseri tedavisinde çok sayıda klinik ve patolojik özellikleri temel alan prognostik faktörler tanımlanmıştır. Tümörün çapı, aksiler lenf nodu metastazının varlığı, tümörün derecesi, östrojen ve progesteron reseptör varlığı ve cerbB-2 onkogen varlığı en önemlileri olarak bilinmektedir (1,2).

Meme kanseri hormona bağımlı bir hastalıktır. Kadınlarda ilk menarş ve ilk gebelik yaşı, menapoz yaşı, meme kanseri görülme sıklığı üzerinde etkili görülmektedir. Ekzojen kaynaklı hormon alınması meme kanseri riskini artırabilir. İyonizan radyasyon ve günlük yaşamda fizik aktivite durumu da meme kanseri görülme sıklığı üzerinde etkili bulunmuştur. Ailesinde meme kanseri olanlarda meme kanseri görülme riski daha fazladır (3, 4, 5).

Etkin tarama ve gelişen tedavi yöntemleri ile meme kanserinden ölüm oranlarında belirgin azalma olmuştur (6). Meme kanserinde yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, tümörün özelliklerinin iyi anlaşılması önemli rol oynamaktadır. Meme kanserinin farklı davranışlarını ve farklı tedavi seçeneklerine yanıtlarını belirleyen çok sayıda özellik ortaya konmuştur. Tümör çapı, tümör derecesi, hasta yaşı, aksiler lenf nodlarının tutulması ve hormon reseptörlerinin durumu temel prognostik faktörler olarak saptanmıştır. Son yıllarda lenfovasküler invazyon durumu ve "Human Epidermal Growth Factor Receptor-2" (HER-2 / neu gen) durumu da önemli prognostik faktörler olarak ortaya konmuştur (7). HER-2 / neu gen pozitifliği olumsuz bir prognostik faktördür. Son dönemde östrojen ve progesteron hormon reseptörleri negatif ve HER-2/ neu gen negatif tümörler meme kanserleri arasında en kötü seyirli grup olarak gösterilmektedir. Üçlü negatif "Triple

Negative” meme kanseri olarak tanımlanan bu tümörlerin diğer tüm meme kanserlerinden temel farklılıklar gösterdiğine dair artan veriler vardır (8).

Meme kanserinde uygulanan cerrahi işlem sonrasında çıkartılan doku formolle tespit edilene kadar bir dönem iskemik kalmaktadır. Fiksasyon işleminde ise % 10 ‘luk formol dokunun derinliklerine ancak zaman içerisinde nüfuz edebilmektedir. Bu durumun dokunun iskemik kalma sürecini artırdığı düşünülerek “İskemi zamanının meme kanser dokusunda steroid reseptör ve *cerbB-2* ekspresyonu üzerine etkisi” adlı çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada, hücre düzeyinde biyokimyasal ve nükleer yapılar üzerine etki yapabilecek iskemik sürecinin, en önemli prognostik faktörlerden olan hormon reseptörleri ve HER-2 / neu gene varlığına olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Anatomi:

Esas fonksiyonu yeni doğana süt temini olan meme dokusu, modifiye aksesuar bir ter bezidir (2, 9). Ağırlığı 30 gr.dan az, 500 gr.dan fazla olabilir. Ağırlığı ve şeklini, dokunun çoğunu oluşturan yağ dokusu belirler (2). Göğüs ön duvarında transvers ekseninde sternumun lateral kenarı ile orta aksiller hat arasında, vertikal ekseninde ise 2. ve 6. kostalar arasında yer alır. Santralinde 6. interkostal aralık hizasında meme başı ve bunun çevresinde pigmente bir alan olan areola bulunur. Meme dokusunun yaklaşık 3/4 kadarı pektoralis major, kalan 1/4' lük kısmı ise lateralde serratus anterior kası üzerinde bulunur. Bazen küçük bir kısmı aksillaya doğru uzanarak Spence' in aksiller kuyruğu adını alır. Meme dokusu, üzerini örten deriye "Cooper' ın asıcı bağları" ile tutunur. Meme arteria mammaria interna, arteria mammaria eksterna ve arteria interkostalisler ile beslenir. Venöz drenajı vena mammaria interna ve vena interkostalisler ile aksillaya doğru olur (10). Memenin lenfatiklerinin kutanöz, aksiller, internal torasik ve posterior interkostal lenfatikler olmak üzere dört ana drenaj yolu vardır. Kutanöz lenfatikler, memenin superior, medial ve inferior kutanöz lenfatiklerinin çoğu, subareolar pleksus da dahil, aksillanın lateraline drene olur. Memenin alt sınırından rektus abdominalis kılıfındaki epigastrik pleksusa buradan subdiafragmatik ve subperitoneal lenfatik pleksusa boşalır. Lenfatik akım karın içindeki lenfatiklerle karaciğere ulaşabilir ki bu yolla meme kanserinin karaciğer metastazı oluşabilir (10). Aksiller lenfatikler, memenin lenfatik akımının % 75 - 97 kadarını alır. Aksilladaki lenf nodülleri 6 gruptur ve hepsi kostokorokoid fasianın altında yer alır. İnternal torasik lenfatikler, meme lenf akımının % 3 – 25 'ini taşır. Bu bölgeye ait lenfatik damarlar içe dönerek pektoralis major kasını ve interkostal kasları delip internal meme nodüllerine ulaşırlar (10). Posterior interkostal lenfatikler, toraks içinde, kosta ve vertebraların birleşim yerlerinin önündeki posterior interkostal lenf nodüllerine açılır. Memenin innervasyonu 2. ve 6. interkostal sinirler sağlar (10).

2.2. Embriyoloji

Modifiye ter bezleri olan meme bezleri embriyolojik hayatta, aksiler bölgeden inguinal bölgeye uzanan “süt çizgileri” üzerinde uzanır. Primitif süt çizgisi ilk olarak gestasyonun yaklaşık 6. haftasında, aksiler bölgeden inguinal bölgeye uzanan epidermal bir kalınlaşma olarak belirir. Yaklaşık 9. haftada kaudal bölgedeki kalınlaşma gerilerken, pektoral bölgede yoğun interlober fibröz septa ile birbirinden ayrılan 15 - 20 kadar lob meydana gelir. Laktiferöz duktusların öncülü olan bu yapılar, meme başını oluşturacak olan küçük epitelyal çukıntıya açılırlar. Gebeliğin son iki ayında duktuslar kanalize olur ve meme çıkıntısı oluşur. Doğumla birlikte veya doğumdan hemen sonra mezenkimal dokunun proliferasyonu ile meme başı oluşur. Fetusun yaşamı boyunca, fetal meme, çeşitli hormonların etkisindedir. Fetal yaşamın erken evrelerinde meme gelişimi seks steroid hormonlarından bağımsızdır. Onbeşinci haftada meme dokusu geçici olarak testosterona duyarlı hale gelir. Testosteronun hedefi parankimdir. Testosteron epitelyal sap etrafında yoğunlaşan mezenkimi stimüle ederek meme tomurcuğunun deri altında izole olmasını sağlarken alveolar duktal sistemin gelişimini önler. Belirgin bir testosteron maruziyeti yoksa epitelyal tomurcuklar kanalize olmaya başlar ve 20 - 32. haftada süt duktusları oluşur. Memenin lobuloalveoler gelişimi 32 ile 40. haftalar arasında olur ve bu dönemde özgül hormonal dalgalanmalardan kısmen bağımsızdır. Doğuma yakın dönemde fetal meme dokusu maternal ve plasental steroidlerden ve prolaktinden etkilenir ve kolostrum sekresyonu oluşur. Doğumda maternal seks steroidleri ve prolaktin çekilir ve bu sekretuar aktivite hayatın 1 - 2. ayında sona erer. İnfantın cinsiyeti bu gelişim evresini etkilemez. Maternal steroidler ve prolaktinin geri çekilmesinin devam etmesi ile glandlar basit duktuslar organizasyonlarına dönerler. Bundan sonra meme dokusunun gelişimi ve farklılaşması, steroid ve peptid hormonlara ve büyüme faktörlerine bağlıdır (8). Doğum sonrası dönemde erkekte çok az ek gelişim görülür ve meme bezleri rudimenter kalır. Kadınlarda ise hormonlar tarafından regüle edilen meme gelişimi devam eder. Pubertede testosteronun relatif yokluğu, memenin esas gelişimini sağlar. Meme dokusu tam olarak geliştikten sonra menopoza kadar menstrual siklus sırasında ve gebelikte

çeşitli değişiklikler gösterir. Menopozda ise parankimal lobuloalveoler yapıların regresyonu ile involüsyonel değişiklikler olur (11).

2.3. Histoloji

Meme dokusu tipik olarak 15 - 25 adet düzensiz lob, lobları birleştiren fibröz doku ve lobları saran yağ dokusundan oluşur. Her lob bağ dokusu ile sarılıdır ve pekçok lobule ayrılır. Lobüller de bazal lamina ile çevrili 10 - 100 adet kadar alveole dallanır. Alveollere duktül ya da asinüs de denir. Lobların herbiri meme başındaki laktiferöz sinüse açılır. Laktiferöz sinus, laktiferöz duktusların meme başına açılmadan önce oluşturduğu genişlemedir ve memenin segmental duktal sistemi bu sinüsle başlar. Laktiferöz duktuslar major (segmental) duktuslara, major duktuslar ise terminal (subsegmental) duktuslara dallanır. Terminal duktuslar lobüllerde sonlanır. Her bir lobül ve bu lobun terminal duktusu memenin temel yapısal birimi olan terminal duktal lobül ünitesini oluşturur. Bu tubüler yapıları, içte tek sıra epitelyal hücreler, dışta myoepitelyal hücreler döşer. En dışta ise bazal lamina bulunur. Lobülleri saran stroma yoğun kollajenize fibroz stroma özelliği gösterirken, lobul içi stroma daha gevşek ve mikzomatöz görünümündedir. Asinüslerin bulunduğu intralobüler alanda stroma hormona duyarlıdır (12). Meme başı ektodermden gelişir ve çok sayıda sebace ve apokrin gland içerir. Onbeş, yirmibeş adet laktiferöz duktus, meme başı tabanına ulaştıktan sonra laktiferöz sinüsü oluşturmak üzere dilate olurlar. Bu sinüsler, meme başı yüzeyinin hemen altındaki koni şeklindeki ampullada sonlanır. Laktasyonda olmayan memede ampulla tipik olarak lümende epitelyal döküntüler içerirken, laktasyon sırasında sütle dolar. Meme başının gövdesi sirküler ve longitudinal düz kaslar, kollajenöz ve elastik liflerden oluşur. Bu kas liflerinin kontraksiyonu, bölgesel venöz staz ile meme başı ereksiyonunu ve süt sinüslerinin boşalmasını sağlar. Areolar bölgede, minyatür duktuslar içeren "Montgomery glandları" bulunur. Bunlar gerçekte modifiye ekrin glandlardır ve yüzeydeki "Morgagni tüberküllerine" açılırlar, gebelikte genişleyerek sekresyon yaparken, sebace glandların tersine menopoz sonrası involüsyona uğrarlar (2,12). Meme dokusunu örten deri; kıl follikülleri, sebace glandlar ve ekrin ter bezleri içerir. Buradan süperfisiyel fasianın yüzeysel ve derin

tabakalarına doğru fibröz bantlar uzanır. Fibrozis veya kitle etkisi ile bu fibröz bantların traksiyonu, meme başı ve meme derisinde çekintilere neden olur.

2.4. Meme Tümörlerinin Epidemiyolojisi:

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180 bin yeni olgu saptanmaktadır (13,14). Meme kanseri epidemiyolojik olarak hemen hemen en çok araştırılmış tümör olmakla birlikte, henüz insan meme kanserinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın meydana gelişinde risk oluşturduğu kabul edilen herediter ve çevresel etkenler çok karmaşık ve iç içe geçmişlerdir.

Geçen 40 yıl boyunca meme kanseri sıklığı özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sürekli şekilde artmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde kadınlardaki bütün kanserlerin % 32 'sini meme kanseri oluşturmaktadır. Amerikan Kanser Birliği verilerine göre, 2008 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 182460 yeni meme kanserli hasta varken 2009 yılında bu sayı 192270'e ulaşmıştır (8). Meme kanserindeki artış, tarama yöntemlerinin daha sık ve düzenli kullanılmasına bağlı tanı oranındaki artışa ve toplumların ortalama yaşam sürelerinin uzamasıyla hastalığın ileri yaş grubunda daha sık görülmesi ile açıklanmaktadır (6). Bununla beraber meme kanseri sıklık oranları dünyada coğrafik değişiklikler göstermektedir. Mozambik, Gambiya ve Japonya gibi ülkelerde meme kanseri sıklığı en düşük iken, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Kuzey Avrupa ülkelerinde meme kanseri sıklığı en yüksektir. Bu durum, beslenme alışkanlıkları ile birlikte endüstrileşmiş modern yaşamda kadında mensturasyonun daha erken yaşta başlaması, daha ileri doğum yaşı, oral kontraseptif ve hormon replasman tedavisi, menapoz yaşının gecikmesi, uzamış yaşam beklentisi gibi değişikliklerin etkisinde kalmasına bağlanmaktadır (15). Meme kanserine bağlı mortalite Amerika Birleşik Devletleri'nde 1950 ile 1989 yılları arasında aynı oranda kalmıştır. Meme kanserinden ölüm oranı 1990 ile 1999 yılları arasında belirgin şekilde azalmıştır. Bu azalma eğilimi, günümüzde devam etmektedir ve bu da erken tanı oranında artma ve tedavilerdeki gelişmelere bağlanmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri, akciğer kanserinden sonra kadınlarda kanser ölümlerinden sorumlu ikinci kanser tipidir. Beş yıllık sağ kalım oranı beyaz kadınlarda % 63 'den % 89 'a, siyah kadınlarda % 46 'dan % 79 'a yükselmiştir (15,16). Sağlık Bakanlığının verilerine göre Türkiye'de 1999 yılında toplam 9919 hastaya kanser tanısı konulmuştur ve kanser insidansı yüz binde 30.38 olarak saptanmıştır. Kanser vakalarının 2390'ı meme kanserli hastalardan oluşmuştur. Tüm kanserli hastaların % 24,1 'ini oluşturan meme kanseri kadınlardaki en sık meme kanseri olarak tespit edilmiştir.

2.5. Meme Tümörünün Etiyolojisi:

Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların % 70 80 'ni bu risk faktörlerine sahip değildir. Hayvanlarda ise bazı kimyasal maddeler, iyonizan radyasyon ve virüsler kanser oluşumuna neden olurlar. Tüm bu ajanların mutasyonlara neden olabileceği ve kromozomal mutasyonların da insanda kanser ortaya çıkış ve gelişimi ile yakında ilgili olduğu kabul edilmektedir.

Meme kanseri bir dizi somatik ya da germ hücre mutasyonu sonrasında bir somatik hücrenin malign potansiyel kazanması ile başlar. Uzun süre noninvaziv, ya da invaziv ama metastaz yapmayan bir hastalık olarak kalabildiği için zamanında tanınması ve uygun şekilde tedavi edilmesi önemlidir (17).

Meme kanseri hormona bağımlı bir hastalıktır. Otuz yaştan öncesinde nadir görülür, otuz yaş ile menapoz arasında görülme sıklığı artar ve menapozda hafif azalma görülür. Menapoz sonrası yıllarda sürekli devam eden bir artış olur. Menarş başlama yaşı, ilk gebelik yaşı ve menapoz yaşı meme kanseri insidansı üzerinde etkilidir. Özellikle ilk miyadında gebelikten önce olan menstruel yaşam uzunluğu risk oluşmasında önemli bir etkidir. Ülkeler arasında görülen farklılıkların % 70 – 80 'inden bu farklılığın sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Diyet ve davranış alışkanlıklarının da insidans farklılıklarında rolü olabilmektedir (17, 18).

Meme kanserinin oluşum nedenleri arasında endokrin mekanizmalar, diyet, çevresel etkenler ve genetik değişiklikler üzerinde durulmaktadır. Hormonal karsinogenez konusunda en yararlı veriler ülkeler arasındaki görölme sıklığı farklarının incelenmesiyle elde edilmiştir. Kuzey Amerika'da yaşayan kadınların meme kanserine yakalanma riski dokuzda bir iken, Asyalı kadınlarda ise Batı Avrupa'daki riskin onda biri ya da beşte biri arasında değişmektedir. Asyalı kadınlarda östrojen ve progesteron düzeyleri önemli derecede daha düşüktür. Batı ortamında yaşayan Asyalı kadınlarda risk batılıların düzeyine çıktığı için bu farklar genetik bir temelle açıklanamamaktadır. Ancak menarş yaşının kritik düzenleyicileri olan ve östrojenlerin plazma konsantrasyonları üzerinde önemli etkileri görülen boy ve kilo değerlerinin batılı kadınlar ile Asyalı kadınlar arasında farklılık gösterdiği açıktır (17).

Hipogonadal ya da menapozdaki kadınlarda hormon replasman tedavisi uygulaması da tartışmalı bir konudur. Tek başına östrojen uygulandığında sağlanan östrojen düzeyi premenopozal östrojen düzeyinden daha düşüktür. Östrojen eksikliği semptomlarında, osteoporoz ve ilişkili kalça kırıklarında azalma ile kardiyovasküler hastalığa bağlı ölümlerde üçte bir kadar azalma görülür, ancak endometriyal kanser riski artar. Meta analizler meme kanseri insidansında yüksek doz uygulanan östrojenler ve uzun tedavi süresine bağlı olarak küçük bir artışa işaret etmektedirler. Postmenopozal kadınlarda uzun süreli östrojen tedavisinin meme kanseri riskini artırdığı kısa süreli kullanımın ise risk oluşturmadığı kabul edilmektedir. Ailesinde meme kanseri olan kadınlar konjuge östrojenlerin karsinojenik etkilerine daha duyarlı olabilirler. Hormon replasman tedavisi uygulamalarına progesteron eklenmesinin, kardiyovasküler ya da kemik hastalıkları riskini değiştirip değiştirmedığı tam bilinmemekle beraber endometriyal kanser riskini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (17, 18).

Meme kanserinde ailevi yük gösterilmiştir. Aile öyküsündeki yükün artması ya da erken yaşda görülmesi orantısal olarak riski artırır. Ancak genel olarak tüm meme kanserlerinin % 5 - 10 kadarının BRCA1 ve BRCA2

gibi tümör baskılayıcı genlerde baskın penetrasyon gösteren mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (17,19).

2.6. Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler:

Meme kanserinin klinik davranışı uzun bir doğal seyir ve heterojenite ile karakterizedir. Meme kanseri tanısı konan hastalar uzun süre metastaz riski taşırlar ve iyileşmenin tanımı sorundur. Meme kanserinde büyüme modelleri tanımlanmış olmakla beraber bunlar tartışmalıdır. Meme kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda en yaygın tümördür. Her sekiz kadının birinde hayatlarının herhangi bir döneminde bu kanser gelişimi söz konusudur. İnvaziv meme kanserlerini tedavi etmek için çok çeşitli ve agresif tedavi rejimlerinin kullanılması prognozu doğru bir şekilde belirlemeyi önemli kılmaktadır. Çünkü böylesi tedavilerin çok yaygın toksik etkileri mevcuttur. Üzerinde daha çok çalışılmasına ve yenilerinin bulunmasına açık olan prognostik faktörler aşağıda gösterildiği gibi çeşitli alt gruplar altında sınıflanmıştır (3,13,20).

2.6.1. Fiziksel Etkenler:

a- Yaş: Primer meme kanserli hastada yaş ve menapoz durumunun prognoza etkisi tartışmalıdır. Genç hastalarda klinik seyrin daha iyi (21,22), daha kötü (23, 24) olduğunu veya yaş ile klinik seyir arasında ilişki olmadığını savunan yayınlar mevcuttur (25, 26). Bununla birlikte bazı çalışmalarda çok genç yaştaki kadınlarda (<35 yaş) prognozun yaşlı kadınlarla aynı olduğu ve bunların nüks ve uzak metastaz açısından yüksek riske sahip oldukları gösterilmiştir (27). Bir çalışmada 34 ve daha genç yaştaki meme kanseri hastalarının daha ileri yaştaki hastalarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha kötü bir prognoza sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca yaş ile diğer klinikopatolojik değişkenler arasında hiçbir korelasyon gözlenmemiştir (27-29).

b- Irk: Siyah ve hispanik kadınlarda meme kanserlerinde her evre için daha düşük bir sağ kalım oranı gösterilmiştir. Ayrıca bu kadınlarda kanser daha genç yaşta ortaya çıkmakta ve daha kötü diferansiye olma eğilimi göstermektedir (2, 30).

c- Vücut Ağırlığı (Kilo): Son elde edilen veriler tedavi süresince ağırlık artışının meme kanserinin rekürrens riskini artırdığı ve surviyi azalttığı yönündedir. Ayrıca 30 yaşında artmış vücut ağırlığı ve android vücut yağ dağılımı meme kanserinden ölüm riskini artırmaktadır. Ayrıca vücut yağ dağılımı ve obezitenin meme ve endometrial kanser riskini artırdığı gözlenmiştir (30,31).

2.6.2. Klinik Özellikler: Tümör boyutu, deriye ve kasa invazyon, çevre dokuya fiksasyon, aksiller lenf nodu (ALN) tutulumu gibi özellikler prognoz üzerinde etkili olurlar. Büyük çalışmalarda primer tümörün yerleştiği alanla prognoz arasında ilişki bulunmamakla birlikte bazı çalışmalarda medikal yerleşimli olanların daha kötü prognoza sahip oldukları bildirilmiştir (6, 18).

2.6.3. Patolojik Özellikler: Tümör boyutu ve büyüme şekli, tümörün yerleşimi, histopatolojisi, tümörün derece'si, aksiller lenf nodu tutulumu, damar invazyonu olması, yaygın intraduktal komponent bulunması, cerrahi sınırların tümörle ilişkisi ve nihayet deri tutulumu ile aksiller lenf nodu değişiklikleri, dokuda elastosis bulunması, lenfosit infiltrasyonu, tümör nekrozu bulunması değerlendirmeye alınmalıdır.

a- Tümör Boyutu ve Büyüme Şekli:

Primer tümörün boyutu ile nodal metastaz insidansı ve prognoz arasında iyi bir korelasyon vardır (2,27,32,33). Atıcı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre 2 cm' den küçük, 2-5 cm ve 5 cm 'den büyük tümürlü hastalar için 3 yıllık takipler sonucu sırası ile % 100, % 83, % 77 hastalısız yaşam ve % 100, % 93, % 84 sağ kalım oranları belirlenmiştir (34). Genelde rekürrens riski tümör boyutunun artışı ile koreledir ve kanserin boyutu 1 cm 'den büyük olduğunda adjuvan sistemik tedavi için potansiyel bir adaydır (2).

Aynı memede iki tümörün sınırları arasındaki uzaklık 5 cm'den fazla olduğu "multisentrik" tümörlerde nüks daha sık ve prognoz daha kötüdür (2, 33). Egan ve arkadaşları 286 adet total mastektomi üzerinde yaptıkları çalışmada olgularının % 28 'inde multisentrisite görmüşler ve multisentrik olmayan tümörlerde prognozun daha iyi olduğunu tesbit etmişlerdir. Buna göre multisentrik olmayan tümörlerde 5 yıllık mortalite % 25, multisentrik olanlarda ise % 15 olarak belirlenmiştir (33). Düzgün sınırlı tümörler invaziv

sınırlı tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir (27). Bazı çalışmalarda bilateral tutulumlu kanserlerde, unilateral tutulumlulara oranla yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir (3).

b- Meme Tümörlerinin Histopatolojisi:

Tümörler kadın memesinin en önemli lezyonlarıdır. Memeyi oluşturan doku bileşenlerinin (bağ dokusu, epitelyum) herhangi birinden köken alabilirler. Ancak en sık epitelyumdan köken alırlar. Hastaların % 4 kadarında primer tümör iki taraflıdır ya da % 10 oranında ikinci primer tümör olarak gelişir. Tümör en sık üst dış kadranda görülür (% 50), bunu santral (% 20), alt dış (% 10), üst iç (% 10) ve alt iç kadranda izler (% 10) (19). Epitel kökenli tümörlerin çoğu duktus epitelinden (%90), diğerleri lobul epitelinden köken alır. Karsinogenezin bu iki formda farklı şekillerde geliştiği düşünülmektedir. Her iki grup kanser bazal membran infiltrasyonu yapıp yapmamalarına göre iki gruba ayrılırlar (19). Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflaması Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması

İnvazyon yapanlar		İnvazyon yapmayanlar
1 İnvaziv duktal	1	İntraduktal karsinom (komedokarsinom)
1a Başka bir özelliği olmayan skiro karsinom(NOS)	2	Paget hastalığında intraduktal karsinom
1b Paget hastalığını içeren invaziv duktal karsinom	3	Lobuler karsinoma in situ
2 İnvaziv lobuler karsinom		
3 Medüller karsinom		
4 Kolloid(müsinöz) karsinom		
5 Tubuller karsinom		
6 Diğer nadir tipler		

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) invaziv meme kanserlerini 2003 yılında (20) aşağıdaki gibi sınıflamıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: İnvaziv Meme Kanseri Sınıflaması (DSÖ 2003) (20)

İnvaziv duktal karsinoma, başka türlü sınıflandırılmayan
Tübüler Karsinoma
Medüller Karsinoma
Müsin oluşturan karsinomlar
İnvaziv papiller karsinom
İnvaziv mikropapiller karsinom
Apokrin karsinom
Lipitten zengin karsinom
Sekretuar karsinom
Adenokistik karsinom
Glikojenden zengin berrak hücreli karsinom
Asinik karsinom
Sebase karsinom
Metaplastik karsinom
İnvaziv lobuler Karsinoma
Nöroendokrin karsinomlar

c- Tümör Derecesi (Grade):

Yaşam süresi üzerine olan etkisi en iyi araştırılmış olan parametre tümörün histolojik derecesidir. Meme kanserinin histolojik derecelendirilmesi için Greenough ve Franz, tümör hücrelerinde tubülüs oluşturma eğilimi, pleomorfizm ve mitoz sayısı gibi temel özelliklere dayalı sistemler önermişlerdir. Bloom ve Richardson 1957 'de 1544 vakalık bir seride yine daha önceki derecelendirme sistemlerindeki kullanılan özellikleri ele alan bir puanlama sistemi ile derecelendirme önermiştir. Bu sistem DSÖ tarafından da benimsenmiş, bazı ufak değişikliklerle günümüzde de geçerliliğini korumaktadır (6) (Tablo 2.3). Clayton ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Bloom - Richardson derecelemesi ve Modifiye Scaff – Bloom - Richardson

(SBR) derecelemesinin yaşam süresi ile iyi korelasyon gösteren dereceleme şemaları olduğunu bildirmişlerdir. Modifiye SBR 'da tümör diferansiasyon derecesi gözardı edilmiştir. Black 'in nükleer dereceleme yöntemi ise nükleer ve nukleolar verileri dikkate alır (28). Yapılan bir çalışmada 5 yıllık yaşam oranları Grade I, II ve III tümörler için sırası ile % 81.9, % 63.4, % 49.5 olarak belirlenmiştir (35). Meme kanserlerinde dereceleme için birçok sistem ortaya konulmuştur. Buna karşılık en sık kullanılan Bloom - Richardson ve Fisher 'in ortaya attığı sistemler olmuştur. Bunlar histolojik 15 parametre ile birlikte nükleer görünümü de gözönüne aldığından değerlidir. Bloom - Richardson yönteminin birçok modifikasyonu olduğu bilinmektedir. Bu modifikasyonlardan Elston ve Ellis 'in ortaya koyduğu yöntem Tablo 2.4 'te gösterilmiştir. Bu yöntemde, duktal ya da tubüler yapı oluşumu, hücresel pleomorfizm ve her 10 büyük büyütme alanındaki toplam mitoz sayısı skorlanmakta ve genel diferansiasyon için skorların toplamı değerlendirilmektedir (3).

Elde edilen skor toplamları derecelendirme için kullanılır. Buna göre toplam skoru 3 – 5 olanlar 1. Derece, 6 – 7 olanlar 2. Derece ve 8 – 9 olanlar 3. Derece olarak değerlendirilir.

Tablo 2.3: Modifiye Bloom - Richardson Derecelemesi

SKOR	TUBÜLER FORMASYON	NÜKLEER PLEOMORFİZM	MİTOZ*
1	Belirgin	Hafif	10'dan az
2	orta derecede	Orta	10 ila 19 arası
3	çok az veya yok	Belirgin	20'den fazla

Tablo 2.4: Modifiye Elston ve Ellis Derecelemesi

SKOR	TUBÜLER YAPI	NÜKLEER PLEOMORFİZM	MİTOZ SAYISI(X400)
1	% 75'den fazla	küçük ,düzenli ve uniform	0 ila 5 arası
2	%10-75 arası	şekil ve büyüklük bakımından orta derece pleomorfizm	6 ila 10 arası
3	% 10'dan az	şekil ve büyüklük bakımından belirgin derece pleomorfizm	11'den fazla

Aksiler lenf nodu tutulumu, damar invazyonu, yaygın intraduktal komponent (YİDK), cerrahi sınırlar, deri tutulumu, elastozis, lenfosit infiltrasyonu ve tümör nekrozu meme kanserinde prognozu belirleyen diğer önemli patolojik faktörlerdir.

2.6.4 Meme Tümörlerinde Evreleme:

Evreleme sisteminde tümörleri sınıflamak için tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına (N) ve uzak bölgelere yayılımdır (M) değerlendirilir. Tümör evresi meme kanserli hastalarda tedaviye yön veren önemli bir faktördür (27).

The American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından meme kanseri tümörün özellikleri, lenf nodu tutulumu ile sayısı ve metastaz durumlarına göre değerlendirilmektedir (Tablo 2.5).

The American Joint Committee on Cancer, 2003 yılında aşağıdaki sınıflamayı önermiştir (27),

Evre 0 : Tis N0 M0

Evre I : T1 N0 M0

Evre IIA : T0 N1 M0, T1 N1 M0, T2 N0M0

Evre IIB : T2 N1M0, T3 N0 M0

Evre IIIA : T0 N2 M0, T1 N2 M0, T2 N2 M0, T3 N1 M0, T3 N 2M0

Evre IIIB : T4, herhangi N M0. Herhangi T N3 M0

Evre IV : T ve N ne olursa olsun M1 içeren tüm hastalar

Tablo 2.5: AJCC (American Joint Commission on Cancer) Sistemi:

T: Primer Tümör Boyutu	
Tx	Primer tümör boyutu değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
Tis (DCIS)	Duktal karsinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobüler karsinoma in situ
Tis (Paget)	Tümörsüz meme başının Paget hastalığı
T1	Tümör 2 cm ya da daha küçük
T1mic	Mikroinvazyon, tümör 0,1 cm'den küçük
T1a	Tümör 0,1-0,5 cm arasında
T1b	Tümör 0,5-1 cm arasında
T1c	Tümör 1-2 cm arasında
T2	Tümör 2-5 cm arasında
T3	Tümör 5 cm'den büyük
T4	Herhangi boyuttaki tümörde
T4a	Göğüs duvarına yayılım
T4b	Meme derisinde ödem ya da ülserasyon ya da satellite deri nodülleri
T4c	4a+4b
T4d	İnflamatuvar meme kanseri
N: Bölgesel Lenf Nodları	
Nx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor
N0	Lenf düğümü metastazı yok
N1	Mobil ipsilateral aksiller lenf düğümlerine metastaz
N2	Birbirine ya da diğer yapılara fikse ipsilateral aksiller lenf düğümlerine metastaz ya da klinik olarak belirgin internal mammaia lenf düğümlerine metastaz
N2a	N2a: Birbirine ya da diğer dokulara fikse aksiller lenf düğümlerine metastaz
N2b	Yalnızca internal mammaia lenf düğümlerine metastaz ve aksiller lenf düğümü metastazı yok
N3	İpsilateral infraklavikuler, internal mammaia ve supraklavikuler lenf düğümlerine metastaz
N3a	İpsilateral lenf düğümlerine metastaz, aksiller lenf düğümlerine metastaz var ya da yok
N3b	İpsilateral lenf düğümlerine ve aksiller lenf düğümlerine metastaz
N3c	İpsilateral supraklavikuler lenf düğümlerine metastaz
pN: Patolojik Lenf Nodları	
PNx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor
PN0	Bölgesel lenf düğümlerinde histolojik olarak metastaz yok, izole tümör hücreleri yok
pN0(i-)	Histolojik ve immunohistokimyasal (İHK) lenf düğümü metastazı yok
pN0(i+)	Histolojik olarak metastaz yok, İHK pozitif ancak 0,2 mm'den küçük
pN0(mlo-)	Histolojik ve RT-PCR (reserve transcriptase/polymerase chain reaction) metastaz yok
pN0(mol+)	Histolojik incelemede metastaz yok, RT-PCR pozitif
PN1	1-3 aksiller lenf düğümü metastazı ve/veya internal mammaia lenf düğümlerine metastaz
pN1mi	Mikrometastaz (0,2- 2 mm)
pN1a	1-3 aksiller lenf düğümü metastazı
pN1b	İnternal mammaia lenf düğümlerine metastaz (sentinel lenf düğümü diseksiyonu)
pN1c	1-3 aksiller lenf düğümü ve İnternal mammaia lenf düğümlerine metastaz (sentinel lenf düğümü diseksiyonu)

PN2	4-9 aksiller lenf düğümü metastazı ya da aksiller lenf düğümü metastazı bulunmadan klinik olarak saptanabilen internal mamaria lenf düğümlerine metastaz
pN2a	4-9 aksiller lenf düğümü metastazı (en az birinde tümör 2 mm'den büyük)
pN2b	Aksiller lenf düğümü metastazı bulunmadan klinik olarak saptanabilen internal mamaria lenf düğümlerine metastaz
PN3	10 ya da daha fazla aksiller lenf düğümüne metastaz, bir ya da daha fazla aksiller lenf düğümü metastazı ile birlikte infraklavikuler lenf düğümlerine metastaz, üçten fazla aksiller lenf düğümüne metastazla birlikte internal mamaria lenf düğümlerine mikrometastaz, ipsilateral supraklavikuler lenf düğümlerine metastaz
pN3a	10 ya da daha fazla aksiller lenf düğümüne metastaz, ya da infraklavikuler lenf düğümlerine metastaz
pN3b	Bir ya da daha fazla aksiller lenf düğümü metastazı ile birlikte klinik olarak saptanabilen internal mamaria lenf düğümlerine metastaz ya da üçten fazla aksiller lenf düğümüne metastazla birlikte internal mamaria lenf düğümlerine mikrometastaz
pN3c	İpsilateral supraklavikuler lenf düğümlerine metastaz
M: Uzak Metastaz	
Mx	Değerlendirilemeyen uzak metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Evre II ve Evre III kanserler tutulan aksiller lenf nodlarının sayısına göre alt gruplara ayrılabilir. Bu işlem tedaviyi yönlendirme amacı ile yapılır. Şayet aksiler metastaz yok ise, bazı hastalar tümörün diğer karakteristiklerine bağlı olarak sistemik tedaviyi almayabilirler. Pozitif lenf nodu 1 - 3 olan tüm kadınlarda, hormonal tedavi ya da kemoterapi biçimindeki standart sistemik tedavi şeması uygulanmalıdır. Pozitif lenf nodu 4 - 9 olan hastalar yüksek doz kemoterapi kullanımının klinik denemeleri için uygun adaylardır. Şayet 10 ya da daha çok lenf nodu pozitif ise bu kadınlarda otolog kemik iliği transplantasyonu gibi diğer deneysel tedaviler düşünülebilir.

2.6.5. Kemik İliği Mikrometastazları:

Kemik iliği mikrometastazları metastatik meme kanserli hastalar için gelecekteki tedavi stratejilerini etkileyebilen bağımsız bir prognostik faktördür (33,36). 5 yıl sonra meme kanseri nüksleri % 50 sıklıkta olmakta ve bunların %57 'si kemiklerde görülmektedir (6).

2.6.6. Meme Kanserinde Prognozun Biyolojik Belirleyicileri

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan çok heterojenik özellikler gösterir. Meme kanserine bağlı denetimsiz hücre çoğalması genellikle;

mutasyon, amplifikasyon, delesyon, kromozal düzenlemeler gibi, genomik instabilite belirtileri ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikler gösterir. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastada tümörün özelliklerinin bilinmesi ve buna en uygun tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önemlidir. Kanser gelişmesine, ilerlemesine ve yayılmasına neden olan değişiklikler anlaşıldıkça daha etkin tarama ve tedavi yöntemleri de uygulanabilmektedir. Meme kanseri araştırmalarının temel amacı kanser hücrenin davranışı hakkında yol gösteren, kanser gelişiminin erken aşamasında ortaya çıkan ve uygun tedavi şeklinin seçilmesi için yardımcı olabilecek değişkenleri belirlemektir. Diğer yandan bu araştırmalar, sağlıklı fakat riskli bireylerde tarama açısından yararlı bilgiler sağlar.

2.6.6.a Hormonal Kontrol:

Steroid hormon reseptörleri, HRE (Hormon Responsive Element) olarak bilinen DNA dizilerine bağlanarak ilgili genin transkripsiyonunu başlatırlar.

Östrojen Reseptörü (ER):

Östrojenler 18 karbonlu fenolik steroidlerdir ve aromatik bir halka ile karakterizedirler. Östrojenler premenapozal dönemde overlerden (foliküllerin granuloza hücrelerinden) salgılanan ve ayrıca, bu dönemde ve daha sonra dokularda adrenal korteks androjen steroidlerinin aromataz tarafından dönüştürülmesi ile oluşurlar. Gebelikte plasentadan bol miktarda salgılanır. Organizmada iki yönlü bir reaksiyonla daha zayıf etkili estron'a dönüşür. O da kandinden daha zayıf etkili estriol'e dönüşür. Tüm steroid hormonlar kolesterolden sentezlenirler. Östrojenler hedef hücrede sitosolün bir reseptörüne bağlanırlar ve onunla bir kompleks oluştururlar. Daha sonra bu kompleks aktive olur ve hücre çekirdeğine taşınarak değişik tip RNA'ların sentezini ve dolayısıyla proteinlerin sentezini uyarırlar. Reseptöre en fazla affinite gösteren ve potent östrojen, östradiol'dür. Dolaşımda ovaryen hormonlar seks steroid bağlayıcı globülin ve albumine bağlı olarak dolaşırlar. Normal kadınlarda östron ve östradiol plazma seviyeleri 20-500 pg/ml'dir (37). Östrojenler puberte sırasında dişiye özgü sekonder seks karakterlerinin

gelişmesini ve daha sonra menapoza kadar idamesini sağlar. Östrojenler memede, duktal ve konnektif dokuda büyümeyi, vasküler dokuda büyüme ve çoğalmayı uyarırlar. Östrojen/progesteron oranının östrojenler lehine değişmesi, dokuda su ve elektrolit tutulmasını artırarak intertisyel ödem oluşturur. Premenstruel devrede görülen değişiklikler bu etkiden kaynaklanmaktadır. Steroid hormonlar esas olarak karaciğerde, suda çözünebilen glukuronid ve sülfat türevlerine dönüştürülmek suretiyle inaktive edilirler.

Östrojen reseptörü ilk olarak 1977 yılında prognostik bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Prognostik açıdan yol gösterici olmamakla birlikte, östrojen reseptörü tayini 25 yılı aşkın süreden beri hormonal tedaviye cevap yeteneğini değerlendirmek amacıyla uygulanmaktadır. Östrojen reseptörü 66 kilo dalton (kd) 'luk bir proteindir. Reseptör üzerinde DNA'ya bağlanma, hormon bağlama, çekirdek içindeki konumu belirleme, transkripsiyonun aktivasyonu ve baskılanması gibi görevlerden sorumlu A - F olarak adlandırılan 6 ayrı bölge mevcuttur (38).

Meme tümörlerinin % 60 – 70 'i östrojen reseptörü pozitif olduğu halde, vakaların ancak yarısı ile üçte ikisi kadarı hormonal tedaviye cevap verir. Buna karşılık ER negatif hastaların bir bölümü de hormon tedavisinden yararlanırlar. Sebebi henüz açıklanamayan bu durumun yanısıra normal ve malign hücrelerdeki reseptörlerin yapısal ve işlevsel açıdan aynı özellikleri taşıyıp taşımadığı da henüz bilinmemektedir (38).

Meme kanserlerinde ER ekspresyonu her aşaması östrojen tarafından kontrol edilen, çok aşamalı ve kompleks bir işlemdir. Östrojen etkisiyle ER ekspresyonu ve dolayısıyla östrojen bağlama bölgelerinin sayısı azalır. Östrojen bu etkisini translasyon, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamaların hepsinde gösterir (39).

ER negatif hücrelerin invazyon yeteneğinin ER pozitif hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu ve ER pozitif hücrelerde bu yeteneğin östrojen etkisiyle arttığı gösterilmiştir. Meme kanseri hücre soylarında tamoksifenin de östrojen benzeri etki gösteren aktif metabolitlerine bağlı olarak invazyonu

arttırıcı etkisi ilgi çekmektedir (3). Bu nedenle steroid olmayan antiöstrejen preparatların kullanılmasının daha yararlı olacağı bildirilmektedir.

Progesteron Reseptörü (PR):

Progesteron 21 karbon atomu içeren steroid bir hormondur. Progesteron overler, testisler ve adrenal korteks dahil tüm Steroid yapan glandlarda üretilirler. Diğer steroid hormonlar için hem prekürsör, hem de ara basamak yapısı şeklinde görev yaparlar. Endokrin tedaviye cevap açısından önemli rol oynayan progesteron reseptörünün ekspresyonu östrojen - östrojen reseptörü etkileşimi ile regüle edilir. Normal insan meme epitelinde progesteron reseptörünün östrojen reseptörüne bağımlı olup olmadığı ve luminal hücrelerde bu iki reseptörün birlikte bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Meme kanserinde progesteron reseptörü saptanmaması östrojen reseptörünün işlevindeki bir bozukluktan veya molekülün kendisinde gerçekleşen bir kusurdan kaynaklanabilir. Progesteron normal insan meme dokusunda, lobuler ve alveolar büyümeden primer sorumlu hormondur. Hormonal tedaviye cevap ile PR arasındaki ilişki ideal olmaktan uzaktır. Teorik olarak PR, östrojen uyarılması ile oluştuğu için PR, ER işleme yolunun sağlam olduğunun bir göstergesidir. Çok değişkenli analizlerde ER veya PR varlığı klinik seyirle ilişkili bulunmaktadır. Hem ER, hem de PR düzeyleri proliferasyon ölçümleri ile ters ilişkilidir. ER düzeyleri yaş ile doğrusal olarak artar; PR düzeyleri ise daha çok menopoz durumu ile ilişkilidir (40).

PR pozitif kanserlerin % 70 'i hormonal tedaviye cevap verirken PR negatif kanserlerinde % 25 - 30 kadarı hormonal tedaviden yararlanır. Reseptör düzeyi ile cevap farklılıkları arasındaki uyumsuzluk ölçüm yöntemlerinin yetersizliği, mutasyon taşıyan östrojen reseptörünün gen ekspresyonu ligand bağlamadan da uyarabilmesi, tamoksifen metabolizmasındaki farklılık veya östrojene bağımlı proteinlerin östrojen reseptöründen bağımsız bir yol üzerinden sentezlenmesi gibi nedenlerden kaynaklanabilir (41).

Meme kanseri hücrelerinin progesteron ile etkileşiminde östrojen etkileşimine benzer sonuçlar doğurur. Transkripsiyon hızı düşer, mRNA düzeyi ve progesteron reseptörü sayısı azalır. Östrojene bağlı değişikliklerin

aksine, mRNA'nın yarı ömründe değişiklik olmaz, buna karşılık progesteron reseptörünün yarı ömrü kısalır. Östrojen etkisinden bir başka farklılıkta etkinin sadece transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamaları kapsamasıdır (39, 41).

2.6.6.b Nükleer Onkogenler:

Hemen tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de birçok onkogene değişiklikler belirtilmiştir. Ancak bunların sadece bir bölümü bugün klinik ya da gelişme açısından önem taşımaktadır.

Nükleer onkogenler ya doğrudan steroidleri etkileyerek, ya da kinaz sinyal yolları üzerinden çoğalmayı uyarırlar. Mitojen uyarısına hedef olan birçok hücrede bu sinyal yollarının sonunda c-myc, c-fos, c-jun gibi protoonkogenlerin ürünleri yol alır. Protoonkogenlerden bazıları c-myc, ras, src ve siklinler örnek olarak verilebilirler.

2.6.6.c Büyüme Faktörleri:

Hücrede kansere yol açan değişimlerin büyüme faktörü sentezinde artış ya da büyümeyi inhibe edici faktörlerin sayısında azalmaya bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bir başka görüşte hücrede büyüme faktörü uyarısına cevap veren mekanizmalarda ortaya çıkan değişiklerdir. Bu hipotezlerin doğruluğunu araştırmak için neoplastik hücrede çoğalmayı uyaran sinyal yollarının bilinmesi gerekir.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF):

Meme epitelinin gelişmesi, meme hücresinin çoğalması ve farklılaşması açısından önem taşıyan bir moleküldür. Faktör membran üzerinde yer alan reseptöre bağlanarak etki gösterir. Kültür ortamında hücrelerin tutunma yeteneğini korumalarını sağlayan en önemli faktörlerden biridir.

Transforme Edici Büyüme Faktörleri(TGF):

İki grupta toplanırlar. TGF- α ailesi tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler ile etkileşirler. TGF- β ise reseptörleri ile etkileşimi sonucu meme kanseri açısından önem taşıyan 3 değişik molekül ortaya çıkar. Çalışmalarda TGF- α , IGF ve FGF ailesinin epitel hücrelerinde proliferasyonu uyarıcı, TGF- β ve benzeri faktörlerin ise hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Yeni

çalışmalar TGF- α ekspresyonunun meme kanserinin erken safhasında önem taşıdığına işaret etmektedir (42).

TGF- β ailesi gerek yapısal, gerekse işlevsel açıdan EGF ve FGF ailelerinden farklıdır. TGF progesteron etkisiyle baskılanır. Meme hücresinin malign transformasyonu sırasında TGF- β sentezinin arttığı görülür (42).

2.6.6.d Büyüme Faktörü Reseptörleri:

Meme kanseri açısından önem taşıyan reseptörlerin çoğunluğunu HER ya da EGFR ailesi olarak bilinen reseptörler oluşturur. Büyüme faktörü reseptörlerinin hepsi hücre dışında yer alan amino ucu, membran içi bölge ve sitoplazmik bölge olmak üzere temelde benzer yapıya sahiptir. Membran içindeki bölge eskiden sanıldığı gibi aradaki bağlantıyı sağlayan pasif bir uzantı değil, reseptörlerin birbirleriyle temasından ve dimerleşmesinden sorumludur. Meme kanserinde etkili olduğu gösterilen bir dizi tirozin kinaz reseptörleri bildirilmiştir (Tablo 2.6).

Tablo 2.6: Meme Kanseri ile İlişkisi Gösterilen Tirozin Kinaz Reseptörleri

Epitelyal	Stromal
EGFR(HER-1)	EGFR
FGFR 1	FGFR 1
FGFR 2	FGFR 2
HER-2	IGF-1R
HER-3	PDGFR
HER-4	
INSULIN R	
c-MET	
IGF-1R	

HER -2 / neu gen (cerbB-2):

Bulduğumuz son dekat içerisinde meme kanserinde prognostik faktör olarak östrojen reseptöründen sonra üzerinde en çok araştırma yapılan onkojenlerden bir tanesi de HER-2/ neu genidir. Bu onkojen 1984 yılında Schechter ve arkadaşları tarafından, sıçanlardaki nöral tümörlerden elde edilmiş ve NEU(nöral) adı verilmiştir, DNA üzerinde 17q21 kromozom

lokusunda yer alır. Görevi tirozin kinaz aktivitesine sahip 185 kd ağırlığında bir transmembran glikoproteini kodlamaktır (4).

HER-2/ neu gen, insan solid tümörlerinde ortak özellik olarak gözlenen ve sonuçları bilinen moleküler anormalliklerin prototipidir. Bu gendeki değişikliklerin bilinen kötü prognostik özellikler ile ilişkisi ve bu moleküler değişikliğe karşı hedefe yönelik tedavi geliştirilme olanağı genin yeni bir tedavi hedefi olarak önemini vurgulamaktadır.

Meme kanserlerinde HER-2/ neu genin prognostik ve prediktif önemi bulunmaktadır. Meme kanserli hastalarda % 25 - 30 oranında HER-2/ neu gen amplifikasyon ve overekspresyonu bildirilmiştir. Birçok çalışmada özellikle lenfnodu pozitif olan hastalarda HER-2/ neu gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonunun hastalısız yaşam ve sağ kalım süresi üzerine olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir. Yani HER-2/ neu gen pozitifliği tümörün agresif davranışı ve kötü prognoz ile yakından ilişkilidir. Aynı zamanda çalımsalar HER-2/ neu genin bazı tedavi rejimlerinin belirlenmesine katkısı ve bu tedavi rejimlerine cevapta prediktif rolünden bahsetmektedir.

Meme kanserli hastaların üçte birinde HER-2/ neu gen amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu görüldüğü bildirilmiştir (42, 43). Daha sonra over kanserinde aynı özellikler saptanmıştır (44). HER-2/ neu gen aşırı ekspresyonu görülen hastalarda erken nüks görülmesi ve genel sağkalımın kısa olması yüzünden bu gende ekspresyon artışı kötü prognoz olarak yorumlanmıştır. HER-2/ neu gen aşırı ekspresyonunun ayrıca invazyon yeteneğini, gelatinaz 4 aktivitesini ve hücre migrasyon hızını arttırarak metastazı da uyardığı ve metastaz kapasitesini de arttırdığı gösterilmiştir (45, 46). Meme kanserlerinin oldukça önemli bir bölümünde HER-2/neu geninde ekspresyon artışı görülür. Östrojenlerin HER-2/ neu gene bağlanarak kinaz aktivitesini uyarması meme karsinogenezinde önemli bir sinyal yolu oluşturur (47). HER-2/ neu gen pozitif meme kanserinin *karsinoma in situ*' dan başlayarak geliştiği, buna karşılık meme kanserinin diğer türlerinin in situ fazından geçmeden ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (40, 47). Yine başka bir çalışmada HER-2/ neu gen pozitifliğinin duktal karsinoma insitu da % 50 - 60, invaziv duktal karsinomada ise % 25 - 30 civarlarında olduğu ifade

edilmektedir (47). Bu nedenlerle HER-2/ neu gen kısa zaman içerisinde meme kanserinde prognostik bir marker özelliği kazanmış ve HER-2/ neu gen düzeyinin belirlenmesine yönelik değişik yaklaşımlar geliştirilmiştir.

HER-2/ neu gen amplifikasyonu görülen meme kanserlerinin oral kontraseptif kullanan ve doğum yapmamış kadınlarda daha sık görüldüğü bildirilmektedir (40). HER-2/ neu gen pozitifliği erken meme kanserinde prognozun kötü olacağını göstermektedir. HER-2/ neu gene karşı oluşturulan monoklonal antikolarla yapılan Faz 1 çalışmalar anti HER-2/ neu genin kemoterapotik ilaçların sitotoksik etkisini artırdığı görülmüştür. Gelecekte anti HER-2/ neu gen tedavisinin diğer kanser türlerinde de önemli bir role sahip olacağı söylenmektedir. ER (-) tümörlerde EGFR ve HER-2/ neu gen daha yüksek düzeylerde eksprese olurlar. Bu durum meme kanserlerinde prognoz açısından önemlidir.

Tüm veriler ışığında, HER-2/ neu genin amplifikasyonu ve protein aşırı salınımı; yüksek tümör derecesi, DNA anöplöidisi, yüksek hücre proliferasyon hızı, p53 mutasyonu, Topoizomeraz II- α amplifikasyonu, meme kanserinde invazivlik ve metastaz riskini artırır. Diğer moleküler biyomarkerlarda varyasyonlar ve östrojen - progesteron nükleer reseptör sayısının azaltılması ile de çok yakından ilişkili bulunmuştur.

2.6.6.e Tümör Süpresör Genler:

Meme kanseri gelişiminde sadece genetik değil, epigenetik olaylar da önem taşır. Tümör baskılayıcı genlerde görülen işlev kayıpları malignitenin başlamasına neden olur. Bu genler genellikle hücre adezyonu ya da proteaz aktivitesi gibi invaziv ve metastatik potansiyeli etkiler, büyüme ve diğer işlevler üzerinde olumsuz düzenleyici rol oynarlar. Tümör baskılayıcı genler olan BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ailevi meme kanseri olgularının yaklaşık % 60 'ından sorumludurlar.

Son yıllarda meme kanserinde üzerinde çok çalışılan biyolojik markerlardan telomeraz aktivitesi ve mikrosatellit instabilitesinin değerlendirilmesi de önemli bulunmaktadır.

2.7. Meme Kanserinde Hormon Reseptör ve cerbB-2 Pozitifliğine Göre Tedavi Seçenekleri

İlk kez 1896 yılında Beatson, ileri evre meme kanserinde ooferektominin etkili olduğunu gösterdi (48). Sonraki yıllarda cerrahi yöntemle hormonal ablasyon tedavisinin yerini androjenler, östrojenler ve progesterinler gibi yan etkileri nispeten daha fazla tıbbi tedaviler aldı. Tedavi seçenekleri östrojen ve progesteron reseptörü tayin metodlarının gelişimi ile daha uygun hale geldi. Meme kanserinin tedavisindeki en önemli gelişme tamoksifenin 1970'lerde klinik kullanıma girmesiyle olmuştur.

Meme kanseri için endokrin tedavi kararı bazı faktörlere bağlıdır. Endokrin tedaviye cevap alınabileceğinin en önemli göstergesi, tümörde östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığıdır. İleri evre hastalıkta endokrin tedaviye cevap oranı, bir hormon reseptörü pozitif olan hastalarda % 33, her iki reseptörü de pozitif olan hastalarda % 50 – 70 'dir (49) (Tablo 2. 7). Endokrin tedavi alan hastaların % 20 – 30 'unda da hastalığın ilerlemesi durdurulur.

Tablo 2.7: Hormon Reseptörleri ve Endokrin Tedaviye Cevap

ER	PR	Cevap oranı (%)
negatif (-)	negatif (-)	10
negatif (-)	pozitif (+)	45
pozitif (+)	negatif (-)	34
pozitif (+)	pozitif (+)	78

Hormon reseptör pozitifliği, postmenopozal hastalarda premenopozal hastalardan daha fazladır (50). Endokrin tedaviye cevabı belirleyen diğer faktörler; endokrin tedaviye önceden alınan cevap durumu, yumuşak doku ve kemik metastazı varlığı, uzun hastalısız sağkalım süresi, ileri yaş, iyi differansiye tümör ve HER-2/ neu gen negatifliğidir (51). Endokrin ilaçların

seçimi hastaların menopozal durumuna bağlıdır. Çünkü bu faktör östrojenin kaynağını belirler. Premenopozal kadınlarda östrojenin ana kaynağı overlerdir. Premenopozal kadınlarda tedavi seçenekleri antiöstrojenler ve over ablasyonu. Over ablasyonu cerrahi, radyoterapi veya LHRH agonistleri ile sağlanabilir. Cerrahi tekniklerle yapılan over ablasyonu ileri evre premenopozal kadınlarda hala kullanılabilir. Cerrahi tekniklerle yapılan over ablasyonu ileri evre premenopozal kadınlarda hala kullanılabilir.

Malignite oluşumuna neden olan hücre içi biyolojik süreçler aydınlanmaya başladıkça bu süreçlere tedavi amaçlı müdahale söz konusu olabilmektedir. Günümüzde, büyüme faktör ve reseptörleri, hücre içi sinyal yolları, anjiyogenez ve metastaz süreçleri bu amaçla hedeflenmektedirler. HER-2/ neu gen (trastuzumab), Ras (farnesil transferaz inhibitörleri) PI3K (rapamisin analogları), cyclin D1 (flavopiridol), cyc-6 (Ro31-7453), c-myc (antisens) ve p53'e (peptid ası ve gen tedavisi) karşı hedefe yönelik tedavilerin bir kısmı deneme aşamasında olmakla birlikte uygulanmaktadır. Bu ilaçların sitotoksikler, hormonlar ya da diğer hedefe yönelik tedaviler ile beraber kullanıldığında daha fazla yararlı olacağı düşünülmektedir (18, 53).

Hedefe yönelik tedaviler içinde epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) ailesi önemli yere sahiptir. HER-2/neu gen reseptörünü hedefleyen IgG1 sınıfı bir monoklonal humanize fare antikoru olan trastuzumab Genentech (South San Francisco, CA) tarafından rekombinant teknikler ile geliştirilmiştir. Trastuzumab HER-2/ neu gen reseptörü ekstraselüler kısmına spesifik olarak bağlanan bir antikordur (54). Trastuzumabın HER-2/ neu gen aşırı ekspresyonu uygulanan tümörlerde gerilemeye neden olma mekanizması tam olarak tanımlanmamış olsa da, *in vitro* moleküler ve hücresel etkiler gözlenmiştir (55). Trastuzumab aşırı HER-2/ neu gen ekspresyonu yapan Bt474 ve SKBR3 gibi HER-2/ neu gen hücre dizilerinde doza bağımlı şekilde reseptör internalizasyon ve degradasyonuna neden olur (55, 56). Reseptör sayısında gerçekleşen azalma nedeniyle reseptör dimerizasyonu ve fosfatidilinozitol 3'-kinaz kaskadı aracılığıyla oluşan sinyalleşme bozulur (54, 57). Hücre döngüsünde G1 fazında p27kip1 indüksiyonu ve p27kip1-cdk2 kompleks oluşumunda artışın eşlik ettiği bir duraklama ve proliferasyonda azalma görülür (56, 58). Trastuzumabın

etkisine aracılık eden diğer mekanizmalar antianjiyojenik faktörlerin indüklenmesi, proanjiyojenik faktörlerin baskılanması ile anjiyogenezin baskılanması, antikor bağımlı hücrel toksisite reaksiyonunun aktiflenmesi ve HER-2/ neu gen ekstraselüler bölgesinin proteolitik parçalanmasının inhibe edilmesidir (55). Trastuzumab sitotoksik kemoterapi gibi apoptozu indükleyerek tümör regresyonuna neden olabilir. Anti- HER-2/ neu gen tedavisi hücre döngüsünde progresyonu ve hücre büyümesi - idamesi için gerekli genleri özellikle PI3K-AKT sinyal yolağını etkiler (58, 60).

HER-2/ neu gen pozitif metastatik meme kanserinde ilk tedavi olarak trastuzumab kullanılan prospektif, randomize bir çalışmanın sonuçları ile trastuzumab FDA tarafından meme kanseri tedavisinde onaylanmıştır. Bu çalışmada yalnız kemoterapi ile % 32, ve kemoterapi + trastuzumab ile % 50 yanıt elde edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (59).

Hastalığın ilerlemesine kadar geçen süre, yanıt süresi, tedavi başarısızlığı ve genel sağ kalım kemoterapiye trastuzumab eklenmesi ile iyileşmiştir (43). İlk önceleri relaps gösteren ve HER-2/ neu gene aşırı ekspresyonu olan ileri meme kanserli hastalara hedeflenmiş olan bu tedavi artık ileri metastatik hastalıkta ikinci basamak tedavide yaygın olarak kullanılmakta ve aynı zamanda daha erken evre hastalıkta adjuvan ve neoadjuvan protokollerde etkinliği araştırılmaktadır (18). Trastuzumab başka kemoterapötiklerle sinerjistik olarak da kullanılmaktadır. Trastuzumabın kemoterapiye eklenmesi (antrasiklin artı siklofosfamid ya da taksan) hastalığın ilerlemesine kadar geçen sürenin uzaması, objektif yanıt oranının artması, yanıt süresinin uzaması ve bir yıl içindeki ölüm oranlarında azalma, daha uzun sağ kalım ve ölüm riskinde % 20 azalma gibi olumlu gelişmelerle ilişkili bulunmuştur (43, 54). Trastuzumab kullanımında en önemli sınırlayıcı faktör kardiyak toksisiteye neden olmasıdır. Yapılan çalışmalarda kardiyak disfonksiyonun antrasiklin ve siklofosfamid ile beraber trastuzumab ile tedavi edilen grupta % 27, sadece antrasiklin ve siklofosfamid alan grupta % 8 oranında gerçekleştiği gözlenmiştir (43, 54). HER-2/ neu gen ve HER-4 /neu gen ile ligandı heregulin kalbin normal gelişimi için gereklidirler. Kalp

miyositlerinde HER-2/ neu gen ekspresyonu olmayan farelerde progresif dilate kardiyomyopati görülmüştür (54, 61). Kalp üzerine toksik etkisi bulunan antrasiklinler ile beraber kullanıldığında kardiyak toksisitenin artması nedeni ile trastuzumabın taksanlar ve platininler ile beraber kullanıldığı antrasiklin içermeyen tedaviler geliştirilmiştir (55). Trastuzumab ve antrasiklinler ile görülen ve birlikte kullanımlarında artan kardiyak toksisite nedeniyle, bu ilaçlardan yarar görebilecek hastaların belirlenmesi ve diğer hastaların gereksiz yere yan etkilere maruz kalmaması için tedavi yanıtını ön görebilecek parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır.

HER-2/ neu genin farklı kemoterapi uygulamalarında olası bir prediktif faktör olarak yeri değerlendirilmiştir (62). Yamauchi tarafından yapılan bir meta analiz sonucundan HER-2/ neu gen aşırı ekspresyon / amplifikasyonu ile meme kanserini tedavi etmek için kullanılan kemoterapi formlarına klinik yanıt arasındaki ilişkinin çok karmaşık olduğu anlaşılmaktadır (62, 63).

HER-2/ neu gen ile trastuzumab dışı tedaviler arasında en belirgin korelasyon HER-2/neu gen pozitifliği ile hormon tedavisine direnç arasında gösterilmiştir (54). HER-2/ neu gen ekspresyonu ER ve PR ekspresyonu ile ters ilişkilidir (68). HER-2/ neu gen ekspresyonu görülen meme kanserinde hormon reseptörlerinin ekspresyonu HER-2/ neu gen amplifikasyon / ekspresyon düzeyine bağımlı bir şekilde azalır. HER-2/ neu gen amplifikasyon düzeyi ne kadar yüksek ise hormon reseptör ekspresyonunun inhibisyonu o kadar belirgindir (62, 68).

İn vitro çalışmalar HER-2/ neu gen ve ER sinyal yolları arasında fizyolojik bir ilişki olduğunu göstermektedir (63, 64). ER pozitif HER-2/ neu gen aşırı ekspresyonu olan tümörlerde adjuvan endokrin tedaviye direnç bildirilmiştir. Fakat yeni çalışmalar bu ilişkiyi doğrulamadığı için son meta-analize göre HER-2/ neu gen ve ER pozitif meme kanseri hastalarının, endokrin tedaviye yanıtını tahmin etmekte güvenilir bir faktör olarak kabul edilmemektedir (63, 65). HER-2/ neu gen protein aşırı ekspresyonu siklofosamid, metotreksat ve 5 fluorourasil adjuvan tedavisi almış hastalarda direnç ile ilişkilendirilmiştir (62). Järvinen ve ark. yaptığı bir meta-analizde

HER-2/ neu gen amplifikasyonu görülen tümörlerin CMF tedavisine mutlak olmasa da nisbi direnç gösterdiği sonucuna varılmıştır (62). HER-2/ neu gen durumu ile meme kanserinde antrasiklinlere yanıt arasındaki ilişki HER-2/ neu gen ile diğer sitotoksik tedavi formları arasındaki ilişkiye göre daha yoğun olarak araştırılmıştır (62, 66). Meme kanseri hastalarına adjuvan CAF (siklofosamid, doksorubisin, ve 5-fluorourasil) uygulanan iki büyük çalışma HER-2/ neu gen aşırı ekspresyonu görülen hastaların antrasiklin içeren kemoterapiden daha fazla yarar görebileceğini göstermektedir (66, 67). Bu sonuçlar FDA'nın HER-2/ neu gen testlerini meme kanserinin antrasiklinlere yanıtını belirlemede klinik tanı aracı olarak onaylamasını sağlamıştır (58, 61).

Güncel yayınlar değerlendirildiğinde, HER-2/ neu genin meme kanser tedavisinde antrasiklin yanıtını öngörmedeki yerinin net olmadığı anlaşılmaktadır. Özellikle metastatik meme kanseri hastaları hakkındaki çalışmalarda adjuvan uygulamada HER-2/ neu gen amplifikasyonu ile antrasiklinlere iyi yanıt arasında gözlenen ilişki doğrulanmadığı gibi HER-2/ neu gen amplifikasyonu ile antrasikline yanıt arasında ya hiç ilişki bulunmamış ya da standart antrasiklin dozlarına direnç artışı tanımlanmıştır (62). HER-2/ neu gen amplifikasyon ve aşırı ekspresyonu hakkındaki *in vitro* çalışmalar da kemoterapötik ilaçlar ile HER-2/ neu gen amplifikasyonu arasındaki ilişkiyi henüz tanımlayamamıştır (66).

HER-2/ neu gen ile transfekte edilmiş ve daha sonra *in vitro* kemoterapötiklere maruz bırakılmış hücre dizilerinde, kemoterapi duyarlılığında artış görülmemiştir (62, 67). Normal insan meme epitel hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada da aşırı HER-2/ neu gen ekspresyonunun sitotoksik ilaçlara (adriyamisin / doksorubisin / antrasiklin / topo II izomeraz inhibitörü / sisplatin / 5-fluorourasil / paklitaksel (taksan) / metotreksat / flavopiridol) karşı olan duyarlılık ya da dirençle ilişkisi olmadığı yönünde kanıt elde edilmiştir. Bu sonuçlar üzerine hücrelerde görülen başka genetik değişikliklerin HER-2/ neu gen ile beraber etki ederek kemo duyarlılığa ya da kemorezistansa neden olabileceği fikri ortaya atılmıştır (62). Bu nedenle HER-2/ neu gen amplifikasyonu olan tümörlerde bulunan 29 değişikliğe uğramış diğer genlerin de değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu

sayede yalnızca HER-2/ neu genin olası prognostik ve prediktif değerleri aydınlanmış olmayacak aynı zamanda bu güne kadar yalnızca HER-2/ neu gen amplifikasyonundan kaynaklandığı düşünülen diğer biyolojik değişikliklerin açıklanmasına da olanak sağlanabilecektir (62).

2.8. Formalin ile Doku Tespiti

Doku tespiti, alınan örnek dokudaki otolizi ve bozulmayı engelleyecek özellikte olmalı ki, bu sayede ilerideki değerlendirmeler için iyi korunmuş doku saklanabilsin. Tespit solüsyonunun kalitesi alınan örneğin değerlendirilmesini doğrudan etkilemektedir (69). Oda sıcaklığı, kullanılacak tespit solüsyonunun alınan doku volümüne göre oranı, alınan dokunun kalınlığı ya da büyüklüğü, tespit solüsyonunda kalma süresi, tespit solüsyonunun cinsi, pH değeri, osmolaritesi gibi faktörler alınan dokunun değerlendirilmesi için ayrıca önemlidir. Genel kabul görmüş, standart doku tespit yöntemi yoktur. Bu nedenle laboratuvarlar arası farklılıklar oluşabilmektedir. Ancak meme kanserinde doku tespiti ve tespit edilen dokuda immunohistokimyasal çalışmalar için kılavuzlar oluşturulmaya çalışılmaktadır (68, 69, 70).

Fosfatla tamponlanmış % 10 'luk formol solüsyonun oda sıcaklığında, pH 7.0 – 7.4 aralığında olması halinde dokunun iç kısımlarına ulaşması ilk bir saat için 3 mm olmakla birlikte sonrasında bu hız 0,5 mm / saat değerine kadar düşmektedir. Formolle tespit yapılırken doku en az 8 en fazla 72 saat süreyle solüsyon içerisinde tutulmalıdır. En küçük boyutlu dokuların dahi tespiti 8 saat sürmelidir. Ancak böylece dokudaki kimyasal olaylar durdurulabilir.

Dokunun büyük olması halinde iç kısımlara tespit solüsyonun etki etmesi gecikeceğinden göreceli bir soğuk iskemi hali oluşacaktır. Özellikle meme dokusu gönderilen patoloji laboratuvarlarında iskemi zamanı ile ilgili kayıtların tutulması immünohistokimyasal çalışmalarla değerlendirilen ER ve PR düzeylerinin yanlış yorumlanmasını önleyebilecektir (70) .

2.9 İskemi:

Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi ve aerobik hücre metabolizmasının düzgün şekilde çalışabilmesi için gerekli temel unsur

oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Dokulara oksijen sağlayan kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (71, 72).

Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. Kritik iskemi zamanı olarak adlandırılan bu süre, dolaşım tekrar sağlandığında dokunun sağlam kalabildiği maksimum total iskemi süresini ifade etmektedir. Örnek olarak iskelet kasları için oda sıcaklığında kritik iskemi süresi 2 saatten fazla iken jejunum epitelinde yaklaşık 30 dakika içerisinde geri dönüşümsüz histolojik değişiklikler oluşmaya başlamaktadır (71, 72, 73). Hücrel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP 'nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na^+ ve Ca^{++} iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (71, 73). İskeminin süresi doku hasarının ağırlığını belirlemektedir. İskemiye bağlı oluşan yapısal ve metabolik değişiklikler kapiller damarlarda daralma, lökosit birikimi, endotelial hücrelerde metabolik disfonksiyon, hücre membranı disfonksiyonu ve inflamatuvar mediatörleri üreten enzim sistemlerinin aktivasyonudur (72). Doku oksijen seviyelerindeki azalma laktik asit birikimine neden olarak doku pH 'sını düşürür. Düşük pH nedeniyle membran transport fonksiyonları bozulduğunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artış başlar. Hücre içi artmış kalsiyum miktarı çeşitli enzimlerin aktivasyonunu ve inflamatuvar mediatörlerin birikimini tetikler (73).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Başhekimliği İlaç Araştırmaları Etik Kurulunun 30.06.2009 tarih ve 09-65 nolu etik kurulu onayı alınmıştır. Mart 2008 – Temmuz 2009 döneminde meme kanseri nedeniyle opere edilmiş 42 olgu değerlendirilmiştir. Apokrin tümör olarak raporlanan 5, lumpektomi operasyonu uygulanıp aksiller diseksiyon uygulanmayan 8, taze doku incelemesi başarılı olmayan 9 olgu çalışmadan çıkarılmıştır. Sonuçta toplam 20 olgu bu çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen invaziv duktal karsinom, invaziv lobuler karsinom ve invaziv duktal+invaziv lobuler karsinoma tanısı almış 20 olguya modifiye radikal mastektomi operasyonu uygulandı. GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Genel Cerrahi servisinde ameliyatla çıkarılan mastektomi ve aksiller diseksiyon materyali GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Patoloji servisinde görevli patoloji uzmanı ile birlikte incelendi. Materyal içerisindeki tümöral dokudan frozen için gerekli miktarda doku alındı. Geri kalan doku normalde uygulandığı şekilde % 10 tamponlu formalin içerisinde 24 saat süreyle fiksasyona tabii tutuldu. Olguların yaşı, tümörün histopatolojik derecesi, varsa lenf nodu metastazı, tümör boyutu, tümörün şekli ve tümörün sağlam dokuya olan uzaklığı değerlendirildi. Mastektomi materyalinden alınan taze doku örneğinde frozen yöntemi ile ve rutin doku takibinde olmak üzere iki yöntemle östrojen, progesteron reseptörleri ve cerbB-2 ekspresyonu araştırıldı. Herbir reseptör grubu ve cerbB-2 grubu için frozen ve normal takip neticesinde elde edilen pozitif ve negatif değerler yüzde olarak kaydedildi. Gruplar arasındaki değişim oranları karşılaştırıldı.

İlk değerlendirme ve frozen ile işleme başlama süresi ortalama 10 ± 5 dakika içerisinde (5 - 15 dakika) gerçekleştirildi. Mastektomi materyalinden alınan malign taze dokudaki tümörden herhangi bir fiksatif madde tatbik etmeden, 1 cm² yüzey ve 0.4 cm kalınlığında 3 'er adet (ER, PR ve cerB-2 için) olacak şekilde taze doku örnekleri alındı. Crytome (Thermo Electron Corporation, USA) cihazı ile her bir boyama için birer adet 5 mikron kalınlığında kesilerek, pozitif şarjlı lamlara alınıp, alkol ile fikse edildi.

Ardından parafinden arındırma ve antijen kurtarma basamağı atlanarak immünohistokimyasal yöntemler tatbik edildi.

Normal takipte en az 24 saat formol içerisinde bekletilerek fikse edilmiş doku daha sonra makroskopik tümör boyutu, tümörün şekli, tümörün sağlam dokuya mesafesi gibi parametreler açısından 24 saat sonra incelendi ve kayıt altına alındı. Daha sonra 14 saatlik takip işleminin ardından parafine gömüldü. Parafine gömme işleminden sonra derin dondurucuda soğutulan bloklardan mikrotom (Leica, Germany) ile 4 micronluk kesitler alınarak 40 °C su banyosuna bırakılıp polizin kaplı (Menzer-Glaser, Germany) lamlara aktarıldıktan sonra oda ısısında kurutuldu.

Frozen yöntemiyle ve 24 saatlik % 10'luk formalin fiksasyonu ve rutin doku takibi sonucu hazırlanmış parafin blokları incelendi.

Patoloji Değerlendirme Yöntemi

Çalışma süresince dokuların parafinden arındırılması için Parafin Pretreatment Reagent Kit (Vysis, Abbott, USA) kullanılmış ve aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

Parafinden Arındırma Yöntemi:

Lam üzerine aktarılmış olan doku örneği 56°C etüvde bir gece bekletilir. Etüvden çıkarılan lamlar 10 dakika ksilolde bekletilir. Bu işlem 2 defa daha tekrarlanır. Her parafinden arındırma işlemi için ksilol solüsyonun yeni olması önemlidir.

Ön İşlem:

Lamlar % 100 etanolde 5 dakika tutularak dehidrate edilir. Bu işlem iki kez uygulanır. Oda ısısında ya da 45 - 50 °C ayarlı lam ısıtma plakasında kurutulur. Plakadan alınan lamlar 20 dakika 0.2 N HCl'de bekletilir. Distile suda 3 dakika yıkanır. Parafinden arındırma takımına dahil olan yıkama tamponunda 3 dakika bekletilir. Ön işlem solusyonunda 80 ± 1 °C 'de 30 dakika bekletilir. Sonra distile suda 1 dakika süreyle daha bekletilip, yıkama tampon solüsyonunda 5 dakika tutulur. Bu işlem bir kez tekrarlanır.

Proteaz Uygulaması:

Lamlar yıkama tamponundan çıkarıldıktan sonra 10 dakika 37 °C proteaz solusyonunda bekletilir. Tekrar yıkama tamponundan geçirilir. Bu

işlem bir kere daha tekrarlanır. Lam ısıtma plakasında 45 - 50 °C 'de 2 - 5 dakika süreyle kurutulur.

Örneğin Fiksasyonu:

Lamlar 10 dakika oda ısısında %10 tamponlu formalinde bekletilir. Yıkama tamponunda 5 dakika bekletilir. Bu işlem bir defa daha tekrarlanır. Lam ısıtma plakasında 45 - 50 °C 'de 2 - 5 dakika süreyle kurutulur.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Olguların tümüne; *cerbB-2* tayini için, *cerbB-2/neu* Ab-17 (Clone 2-4001+3B5), östrojen reseptörü tayini için, Estrogen Receptor (Clone S2) Rabbit Monoklonal Antibody, progesteron reseptör tayini için, Mouse anti-Progesterone Receptor clone PR-2C5 onkoprotein antikoru uygulanmıştır. Bunun için doku bloklarından 4 mikron kalınlığında kesitler yapıp, Surgipath (SMI, USA) marka double adhezivli lamlara alınmıştır. Parafinden arındırma işlemi sonrası *cerbB-2*, ER, PR için immünohistokimyasal boyama işlemi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Ön Hazırlık

Antijenin yeniden kazanılması için antikorun uygulanacağı kesitler, bir litrelik sitrat solüsyonu içinde, buharlı ısıtıcıda 35 dakika süreyle kaynatılmış ve sonrasında 20 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Distile suda bekletilerek rehidratasyonu sağlanan dokunun kenarları kalem ile çizildikten sonra 3 değişik Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonları ile 5 dakika yıkanmıştır. Endojen peroksit aktivitesinin ortadan kaldırılması için, % 3 'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Değişik 3 Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonları ile 5 dakika yıkanmıştır. Protein blocking solüsyonu ile 5 dakika inkübasyon sonrası yeniden 3 değişik Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonları ile 5 dakika süreyle yıkama yapılmıştır.

Primer Antikor Uygulanması

ER için 1 / 100 dilüsyonda hazırlanan primer antikorda 10 dakika inkübasyon uygulanmıştır. PR için ise 1 / 75 dilüsyonda hazırlanan primer antikorda, 60 dakika inkübasyon uygulanmıştır. HER-2/ neu gen için 1 / 600 dilüsyonda hazırlanan primer antikorda 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır. Üç değişik Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonları ile beş dakika

yıkamayı takiben biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır. Üç değişik Phosphate buffered saline (PBS) solusyonları ile yeniden beş dakika süreyle yıkama sonrası Streptavidin - Horseradish peroksidaz ile 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır. Bir kez daha üç değişik Phosphate buffered saline (PBS) solusyonları ile 5 dakika süreli yıkama sonrası tamponlanmış substrat - Diaminobenzidin (DAB) kromojen ile beş dakika süren inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında distile su ile yıkanarak zemin boyaması için Mayer's hemotoksilende bir dakika süreyle bekletilen slaytlar musluk suyu ile bir dakika süreyle yıkanmıştır. Havada kurutma işleminden sonra ksilen banyosu yaptırılmış ve balzam ile kapatılarak değerlendirme aşamasına hazır hale getirilmiştir.

İmmunhistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi:

Östrojen, Progesteron ve cerbB-2 'nin boyanmaları sadece tümörlü dokuda değerlendirildi. İn situ ve normal boyanmalar değerlendirme dışı bırakıldı. cerbB-2 antikor Hercept Test™ için geliştirilmiş 4 aşamalı skorlama sistemine göre değerlendirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Hercept Testinde Skorlama Sistemi

Skor	cerbB-2	Boyama paterni
0	Negatif	Membran boyanması yok / %10'dan az membran boyanması
(+1)	Negatif	%10'dan fazla hafif/parsiyel membran boyanması
(+2)	Pozitif	%10'dan fazla komplet/hafif-orta şiddette membran boyanması
(+3)	Pozitif	%10'dan fazla komplet/kuvvetli membran boyanması

İnvaziv karsinom alanlarındaki tümör hücreleri % 10 'luk membranöz boyanma; boyanmanın komplet olup olmadığı, boyanma şiddeti temel alınarak 0, +1, +2, +3 olarak skorlandı. Skor 0 ve +1 negatif olarak, skor +2 ve +3 pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 7). Daha sonra cerbB-2 için Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) testiyle tekrar kontrol edildi.

Parafin bloklar immünohistokimyasal olarak *cerbB-2* için skor 0 ve +1 olarak değerlendirilenler bir grup, skor +2 ve +3 olarak değerlendirilenler diğer grup olmak üzere 2 grup halinde ek olarak FISH çalışılmıştır.

ER ve PR boyanmasının değerlendirilmesinde nükleer boyanma dikkate alındı. On büyük büyütme alanında toplam 100 hücre sayılır. Hücreler kromojen yoğunluğuna göre 0, 1, 2, 3 olarak derecelendirilir ve boyanma şiddeti endeksi kullanılır.

Boyama şiddeti endeksi, [(Boyanmamış hücrelerinin sayısı x 0) + (Zayıf boyanmış hücrelerin sayısı x 1) + (orta şiddette boyanmış hücrelerin sayısı x 2) + (şiddetli boyanmış hücrelerinin sayısı x 3)] formülüyle hesaplanır.

Formülde en düşük 0 en yüksek 300 değeri elde edilir. ER için 20'den fazla, PR için 5'ten fazla değer pozitif sayılır.

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Bloklardan 4 mikron kalınlığında pozitif şarjlı lama kesit alındıktan sonra öncelikle parafinden arındırma işlemi uygulanmıştır. Bu işlem immünohistokimyada uygulanan işlemin aynısıdır.

Hibridizasyon öncesinde distile suda 5 dakika süreyle yıkamayı takiben 0.2 M HCl içinde 25 dakika bekletilen salytlar sonra yeniden distile su içine batırılıp çıkarılarak durulama işlemine tabii tutulurlar. Sonra 2X SSC / %0.05 Tween 20 içinde 5 dakika süreyle yıkanıp 80 derecede 2X SSC içinde 20 dakika süreyle bekletilir. Distile su içinde bir dakika süreyle durulamayı takiben 2X SSC / % 0.05 Tween 20 içinde 5 dakika süreyle yeniden yıkama yapılır. İçerisinde 0.05 mg/ml Proteinaz K bulunduran TEN solüsyonu ile 15 dakika süreyle 37 derecede bekletilir ve sonra 2X SSC / %0.05 Tween 20 içinde yeniden 5 dakika süreyle yıkanır. Sonra % 4 Formaldehid bulunan PBS solüsyonunda 10 dakika bekletilir ve 2X SSC / % 0.05 Tween 20 içinde 5 dakika süreyle yeniden yıkanır. Denatürasyon solüsyonu içinde 74 derecede 5 dakika bekletilir. Yeniden 2X SSC / % 0.05 Tween 20 içinde 5 dakika süreyle yıkamayı takiben sırası ile % 70, % 85 , % 100 etanollerde ikişer dakika bekletilerek dehidrate edilir.

Hibridizasyon işlemi için Apollo (GX Design Engineers, UK) marka PCR cihazının hibridizasyon plate'i kullanılmıştır. Bunun için ON ERBB', Her-2 / neu (17q / 2) SE 17 (Poseidon)TM FISH probu kesit üzerine eklenmiştir. Bu aşamada 22 x 22 mm lamel kullanılarak kapatılan kesitler için 10 mikrolitre probe solüsyonu kullanılması yeterli olmuştur. Lamel kenarları plastik çimento (r.cement) ile kapatıldıktan sonra kesitler in situ hibridizasyon sistemi içerisine konmuştur. İn situ hibridizasyon sistemi içerisinde sırasıyla 5 -10 dakika 42 derecede kurutma, 90 derecede 6 dakika probe ve hedef DNA denatürasyonu; son olarak 37 °C 'de gece boyu hibridizasyon için inkübasyon uygulanmıştır.

Hibridizasyon sonrası plastik çimentonun kaldırılması için 42 °C 'de 2X SSC içinde 10 - 20 dakika süreyle bekletilir. Bu işlem sırasında doku kesitlerinin zarar görmemesi için özen gösterilmelidir. Lamı solüsyon içine sokup çıkartarak çimentonun kendiliğinden erimesi ve lamelin kendiliğinden düşmesi beklenir. Sonra 42 °C 'de 2X SSC / % 50 formamid yıkama solüsyonu içerisinde 10 dakika süreyle takiben 42 °C 'de 2 X SSC içinde 5 dakika süreyle yıkamalar yapılır. Zemin boyaması 2 X SSC / 0.03 mikrogram / ml DAPI (6 – diamidin 2 fenilindol dihidroklorid antifade) solüsyonu ile gerçekleştirilir. Renk solmasını engelleyen gliserol ile lamel kapatılarak ve lamel çevresine renksiz oje sürülüp lamelin sabit hale getirilmesi sağlanarak değerlendirme aşamasına hazırlanır.

FISH Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

Leica DM 2500 (Germany) mikroskopta FITCH, Teksas Red, DAPI sinyalleri için sensitif uygun filtreler kullanılarak Zeiss KS 400 3,0 adlı program ile değerlendirme yapılmıştır. Her silindir yukarıda belirtilen filtreler kullanılarak HER-2, CEP-17 ve DAPI açısından değerlendirilmiştir. Tümörü temsil eden alanlarda toplam 40 adet hücreyi değerlendirmeye izin verecek şekilde 3 - 5 (ortalama 4) alandan her 3 filtre ile ayrı ayrı fotoğraf çekilmiş ve bu fotoğraflar her alan bir slayt olacak şekilde Microsoft Powerpoint Programı içerisinde kaydedilmiştir. Değerlendirme bu fotoğraflar üzerinden yapılmıştır. Her silindirde 40 adet hücrede önce HER2/neu gen sinyalleri (kırmızı sinyal) sayılmış, daha sonra aynı hücrelerdeki CEP17 sinyalleri (yeşil sinyal)

sayılmış ve HER2/CEP17 oranları belirlenmiştir. Oranın 2 'nin üzerinde olduğu silindirlerde amplifikasyon olduğu kabul edilmiştir. Açık gen amplifikasyonu var ise (HER-2/ neu gen sinyal/ CEP-17 sinyal > 10) sayılan 40 hücrenin % 50 'sinden fazlasında nukleus başına 4 - 10 sinyal veya belirgin kümeler var ise amplifikasyon var olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5). İkinci bir yöntem olarak da 40 adet hücrede HER2/ neu gen (kırmızı sinyal) sinyalleri sayılarak sinyal sayısı tümör hücresi sayısına (40 hücre) bölünerek her bir doku için bir tümör hücresi başına düşen HER-2 sinyali sayısı belirlenmiştir ve bu oranın 4 'ün üzerinde olduğu dokularda amplifikasyonun olduğu kabul edilmiştir.

İstatistiksel Yöntem

Tüm istatistiksel işlemler "*SPSS for Windows 11.0*" (Statistical Package for the Social Sciences, USA) programı ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlık değeri $p < 0.05$ kabul edildi. Kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanarak Receiver Operating Curve (ROC) eğrileri hazırlandı. Hastalardan elde edilen veriler arasındaki karşılaştırmalar ki-kare testi ile incelendi. Veriler arasındaki korelasyonların değerlendirilmesinde Spearman ilişki katsayısı, tanı testi uyumu kappa katsayısı ile araştırıldı.

BULGULAR:

Çalışmaya alınan olguların yaş, tümör tipi, tümör yerleşim yeri, tümör gradı ve aksiller lenf nodunda metastaz varlığı ile ilgili özellikleri Tablo 4.1 'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Olguların Özellikleri

Özellik	Olgu Sayısı	Oran (%)
Yaş		
<60	8	40
>60	12	60
Toplam	20	100
Tümör Tipi		
İnvaziv Duktal	15	75
İnvaziv Lobüler	3	15
Mikst	2	10
Toplam	20	100
Tümör Gradı		
Grad 1	1	5
Grad 2	16	80
Grad 3	3	15
Toplam	20	100
Tümör boyutu		
T1	6	30
T2	14	70
Toplam	20	100
Lenf nodu		
Metastaz yok	9	45
Metastaz var	11	55
Toplam	20	100

Olguların hepsi kadın olup, yaş ortalaması 59 ± 3 ve yaş aralığı 28 - 82 arasında değişmekteydi. Olguların 8 'i (% 40) 60 yaşın altında, 12 'si (% 60) 60 yaşın üzerindekiydi. Histolojik tanı olarak 15 olguda invaziv duktal (% 75), üç olguda invaziv lobuler (% 15) ve iki olguda (% 10) mikst tip (invaziv lobuler + invaziv duktal) karsinom saptandı. Tümör derecesi sadece bir olguda (% 5) grade1, 16 olguda (% 80) grade2 ve 3 olguda (% 15) grade 3 olarak bulundu. Tümör büyüklüğü 6 olguda (% 30) T1, 14 olguda (% 70) T2 idi. Olguların 9 'unda (% 45) lenf nodlarına metastaz saptanmamışken, 11 'inde (% 55) lenf nodu metastazı vardı (Tablo 9).

Olguların tümöral dokusunda frozen yöntemi ve normal rutin takip sonucu yapılan östrojen ve progesteron reseptör durumu ile cerbB-2 ekspresyon durumu değerlendirildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Dokuda Reseptör ve cerbB-2 Değişimi

Özellik	Frozen	Oran (%)	Normal Takip	Oran (%)	Oranlar arası değişim (%)
ER Durumu					
Pozitif	11	55	10	50	5
Negatif	9	45	10	50	5
Toplam	20	100	20	100	10
PR Durumu					
Pozitif	14	70	13	65	5
Negatif	6	30	7	35	5
Toplam	20	100	20	100	10
HER2/neu Durumu					
Pozitif	7	35	4	20	15
Negatif	13	65	16	80	15
Toplam	20	100	20	100	30

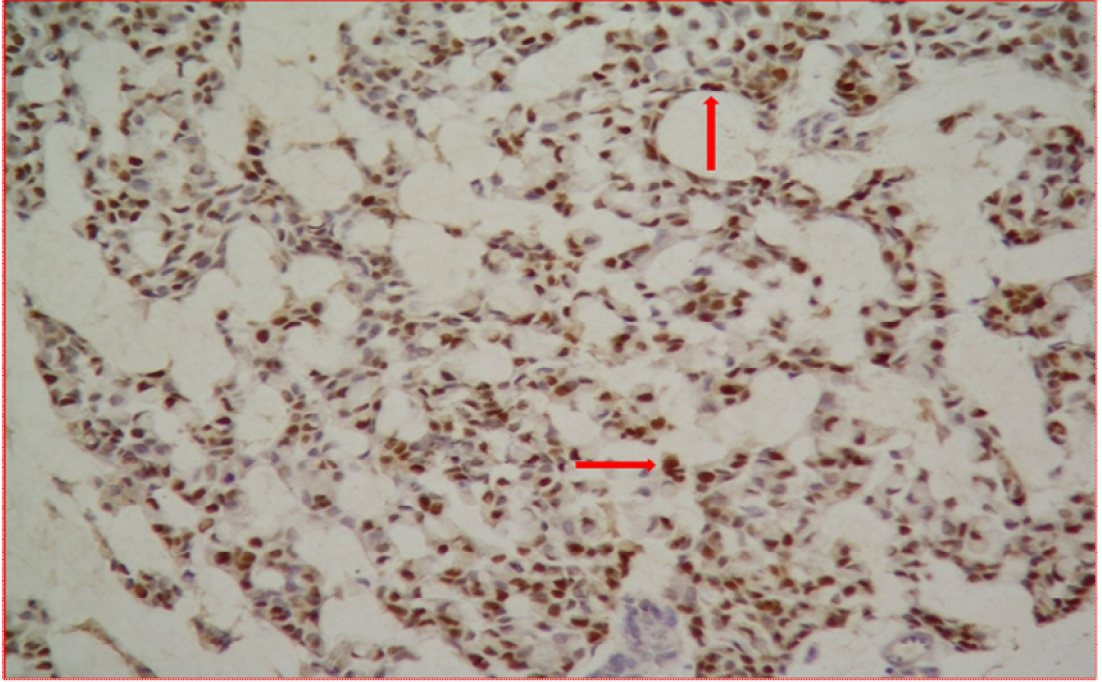
Östrojen reseptör değişimi yönüyle değerlendirildiğinde iskemi süresinin en az olduğu kabul edilen frozen ile yapılan değerlendirmede 11 olguda (% 55) ER pozitif (Şekil 4.1) iken, normal takip ile inceleme sonucu 10 olguda (% 50) ER pozitif bulundu. Yine 9 olgu frozen yöntemiyle (% 45) negatif iken normal takipte 10 olguda (% 50) negatif olarak bulundu. ER için incelemede kümülatif değişim yüzdesi % 10 olarak değerlendirildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Östrojen Reseptör (ER) Değişimi

ER(fresh)	N	Yüzde (%)	ER (normal takip)	n	Yüzde (%)	Kümülatif değişim yüzdesi (%)
Negatif	9	45	Negatif	10	50	10
Pozitif	11	55	Pozitif	10	50	
Total	20	100	Total	20	100	

Çalışmada frozen yöntemiyle bakılıp ER'si pozitif çıkan ve daha sonra normal takipte negatif çıkan hasta; 67 yaşında, tümör büyüklüğü T1

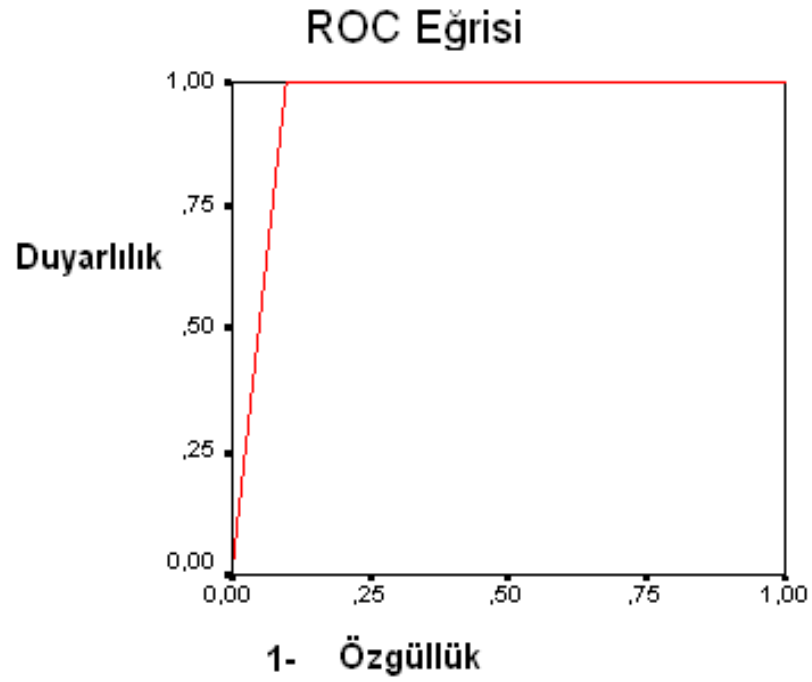
düzeyinde, aksiller lenf nodu (-), histolojik tanısı invaziv duktal karsinom olan 10 numaralı olgudur. Aynı olguda frozen yöntemiyle PR(-), normal takipte PR (-), frozen yöntemiyle HER-2/neu gen (-), normal takiple HER-2/neu gen (-) olarak saptanmış olması dikkat çekmiştir. Normal takip sonucu ile değerlendirilseydi bu olgu “Üçlü Negatif” “Triple Negative” kanser olarak prognozu kötü hasta olarak değerlendirilecekti (Tablo 4.4).



Şekil 4.1: Östrojen (%100 pozitif), kuvvetli nükleer boyanma 20x

Östrojen reseptörü için elde edilen değerlerden yola çıkılarak oluşturulan Receiver Operating Curve analizi eğri altında kalan alan 0.95 [0.83-1] olarak bulunmuştur (Şekil 4.2). Eğri altında kalan alana ait güven aralığının 0.50 değerini içermemesi tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistik olarak önemli olduğunu göstermektedir ($p=0,001$). Testlere ait duyarlılık (sensivite) % 100 ve özgüllük (spesifite) % 90 olarak bulundu. Bu da normal takip yöntemiyle pozitif bulunan ER sonuçları ile frozen yöntemi ile pozitif bulunan ER sonuçlarının birebir aynı olduğunu göstermektedir. Normal takip yönteminin sonuçları ile frozen yönteminin sonuçları, tanı uyumunu denetleyen yöntemlerden biri olan *kappa* katsayısı kullanıldığında sonuç

istatistiksel olarak anlamlı ve 0.90 olarak bulunmuştur. Bu sonuç iki testin istatistiksel olarak anlamlı çok güçlü düzeyde bir uyuma sahip olduğunu göstermektedir ($p=0,001$). İki test arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,31$) (Tablo 4.7).



Şekil 4.2: ER (frozen) ile ER(normal takip) arasındaki ROC analizi

Duyarlılık: 1 (%100)

Özgüllük: 0,9 (%90)

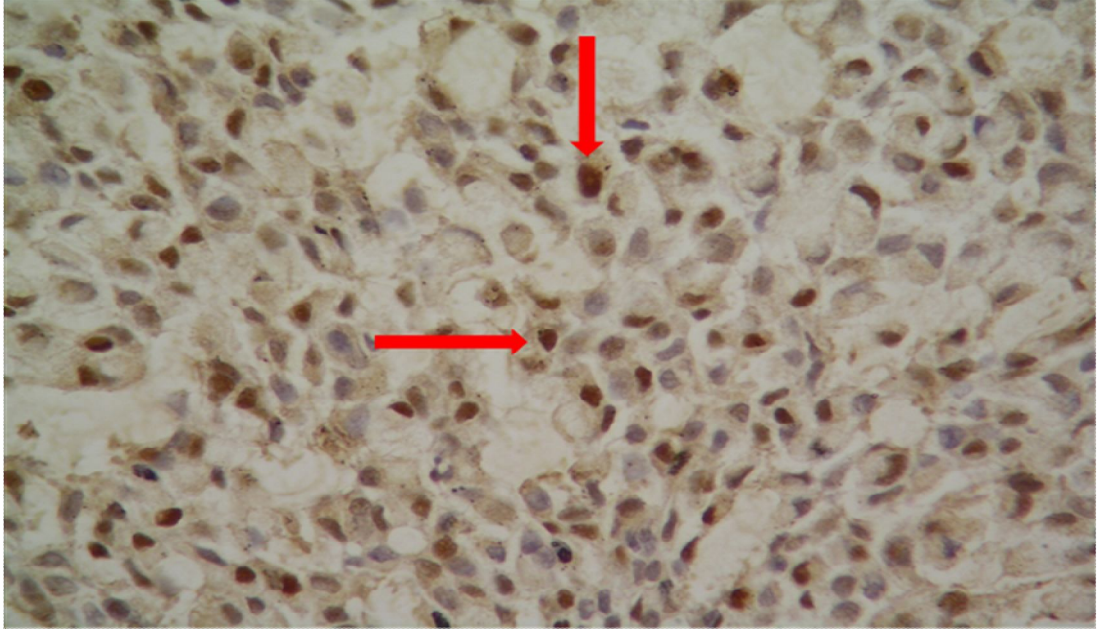
Pkd (Pozitif Öngörü Değeri): 0,91

Nkd (Negatif Öngörü Değeri): 1

Tablo 4.4: Çalışmaya Alınan Olgu Verileri

Olgu No	Yaş	Tip	Grad	Boyut (T)	LN	ER Frozen	PR Frozen	cerbB-2 Frozen	ER (Takip)	PR (Takip)	CerbB-2 (Takip)	FISH CerbB-2
1	69	Lobuler	III	t2	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	58	Duktal	II	t2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	78	Duktal	II	t1	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	74	Duktal	II	t2	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
5	34	Duktal	II	t1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
6	62	Duktal	II	t2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
7	39	Duktal	II	t2	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
8	63	Duktal	II	t2	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
9	68	Duktal+ Lobuler	II	t2	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	67	Duktal	II	t1	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	53	Duktal	II	t2	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
12	82	Duktal	II	t2	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
13	46	Duktal	II	t1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
14	28	Lobuler	III	t2	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	63	Duktal	II	t1	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
16	35	Lobuler	III	t2	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
17	72	Duktal	II	t2	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
18	65	Duktal+ Lobuler	II	t2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
19	50	Duktal	II	t1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
20	80	Duktal	I	t2	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

PR değişimi yönüyle değerlendirildiğinde iskemi süresinin en az olduğu kabul edilen frozen ile yapılan 14 olguda (% 70) PR pozitif iken (Şekil 4.3), normal takip ile inceleme sonucu 13 olguda (% 65) PR pozitif bulundu. Yine frozen yöntemiyle yapılan incelemede olguların 6 tanesi PR negatif (% 30) iken normal takip ile 7 tanesi PR negatif olarak bulundu. PR için incelemede kümülatif değişim yüzdesi %10 olarak değerlendirildi (Tablo 4.5).



Şekil 4.3: Progesteron (%100 pozitif) kuvvetli nükleer boyanma 20x

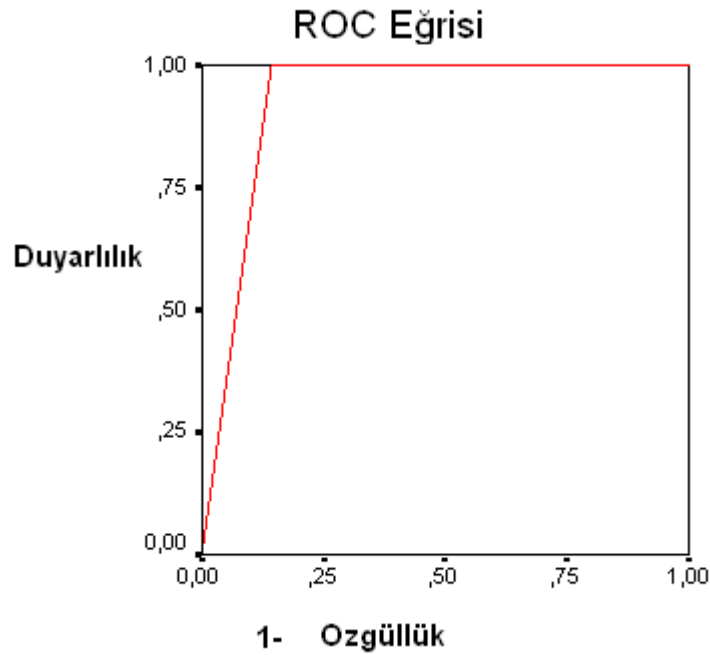
Tablo 4.5: Progesteron Reseptör (PR) Değişimi

PR (fresh)	N	Yüzde (%)	PR (normal takip)	Frekans	Yüzde (%)	Kümülatif değişim yüzdesi (%)
Negatif	6	30	negatif	7	35	10
Pozitif	14	70	pozitif	13	65	
Total	20	100	Total	20	100	

Çalışmada frozen yöntemiyle bakılıp PR'si pozitif çıkıp daha sonra normal takipte negatif çıkan hastanın özellikleri; 63 yaşında, tümör büyüklüğü T2 düzeyinde, aksiller lenf nodu (+), frozen yöntemiyle ER (+), normal takip ER (+), frozen yöntemiyle HER-2/neu gen (-), normal takiple HER-2/neu gen (-) olarak dikkat çekmiştir. Progesteron reseptör pozitifliği östrojen yolağının normal çalıştığını gösteren bir kriterdir. Frozen yöntemiyle ile bu olguda progesteron reseptörünün pozitif olduğu gösterilmeseydi östrojen yolağında problemi olabileceği düşünülecekti.

Progesteron reseptörü için elde edilen değerlerden yola çıkılarak oluşturulan Receiver Operating Curve analizi (Şekil 4.4) ile eğri altında kalan

alan 0.93 [0.77-1] olarak bulunmuştur. Eğri altında kalan alana ait güven aralığının 0.50 değerini içermemesi tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistik olarak önemli ve anlamlı olduğu göstermektedir ($p=0,002$). Testlere ait duyarlılık (sensivite) % 100 ve özgüllük (spesivite) % 86 olarak bulundu. Bu da normal takip yöntemiyle çalışılan olguların pozitif sonuçları ile frozen yöntemi ile bulunan pozitif PR sonuçlarının birebir aynı olduğunu göstermektedir. Normal takip yöntemi sonuçları ile frozen yöntemi sonuçları tanı uyumunu denetleyen yöntemlerden biri olan *kappa* katsayısı kullanıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamlı ve 0.88 olarak bulunmuştur. Bu sonuç iki testin istatistiksel olarak anlamlı güçlü düzeyde bir uyuma sahip olduğunu göstermektedir ($p=0,0001$). İki test arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,31$) (Tablo 4.7).



Şekil 4.4: PR (frozen) ile PR(normal takip) arasındaki ROC analizi

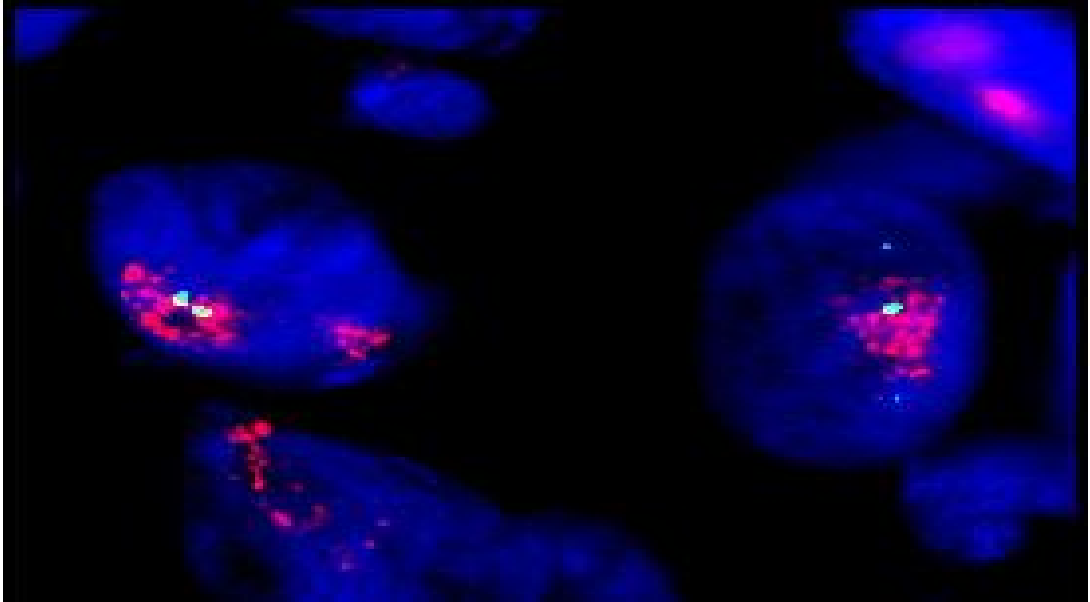
Duyarlılık : 1 (%100)

Özgüllük : 0,86 (%86)

Pozitif Öngörü Değeri: 0.93

Negatif Öngörü Değeri: 1

Normal takipte değerlendirilen olguların tümüne *cerbB-2* için FISH yöntemiyle kontrol gerçekleştirildi (Şekil 4.5). HER-2/ neu gen değişimi yönüyle değerlendirildiğinde iskemi süresinin en az olduğu kabul edilen frozen ile yapılan 13 olguda (% 65) HER-2/ neu gen negatif iken (Şekil 4.6), normal takip ile inceleme sonucu 16 olguda (% 80) HER-2/ neu gen negatif bulundu. Yine frozen yöntemiyle yapılan incelemede olguların 7 tanesi (% 30) HER-2/neu gen pozitif (Şekil 4.7) iken, normal takip ile 4 tanesi (%20) HER-2/ neu gen pozitif olarak bulundu. HER-2/neu gen için incelemede kümülatif değişim yüzdesi % 30 olarak değerlendirildi (Tablo 4.6).



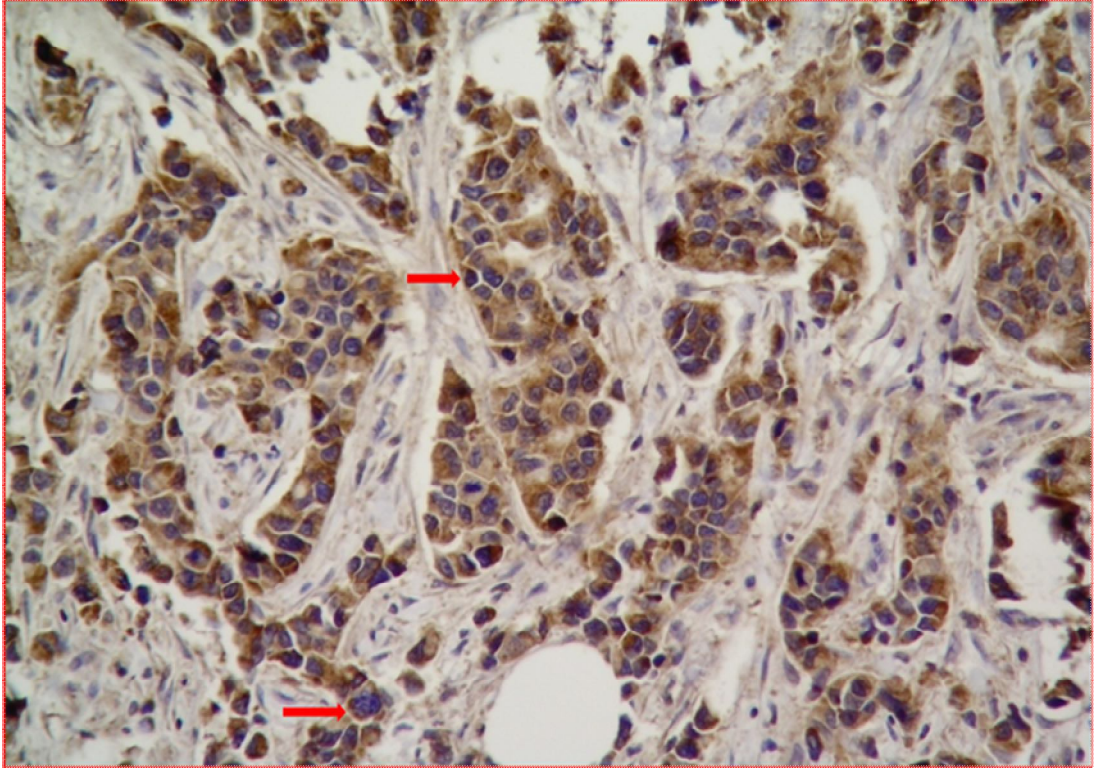
Şekil 4.5: FISH ile *cerbB-2* (+3) kuvvetli pozitif boyanması

Çalışmada frozen yöntemiyle bakılıp HER-2/ neu geni pozitif çıkıp daha sonra normal takipte negatif çıkan 3 adet hastanın özellikleri; 1.nci olguda; yaş 63, tümör büyüklüğü T1 düzeyinde, aksiller lenf nodu tutulumu (-), frozen yöntemiyle ER ve PR (+), normal takip yöntemiyle ER ve PR (+) iken, 2.nci olguda; yaş 72, tümör büyüklüğü T2 düzeyinde, aksiller lenf nodu tutulumu (-) , frozen yöntemiyle ER ve PR (+), normal takip yöntemiyle ER ve PR (+) iken, 3.nci olguda; yaş 50, tümör büyüklüğü T1 düzeyinde, aksiller lenf nodu tutulumu (+), frozen yöntemiyle ER ve PR (+), normal takip yöntemiyle ER ve PR (+) olarak dikkati çekti. Bu üç olguda sadece normal

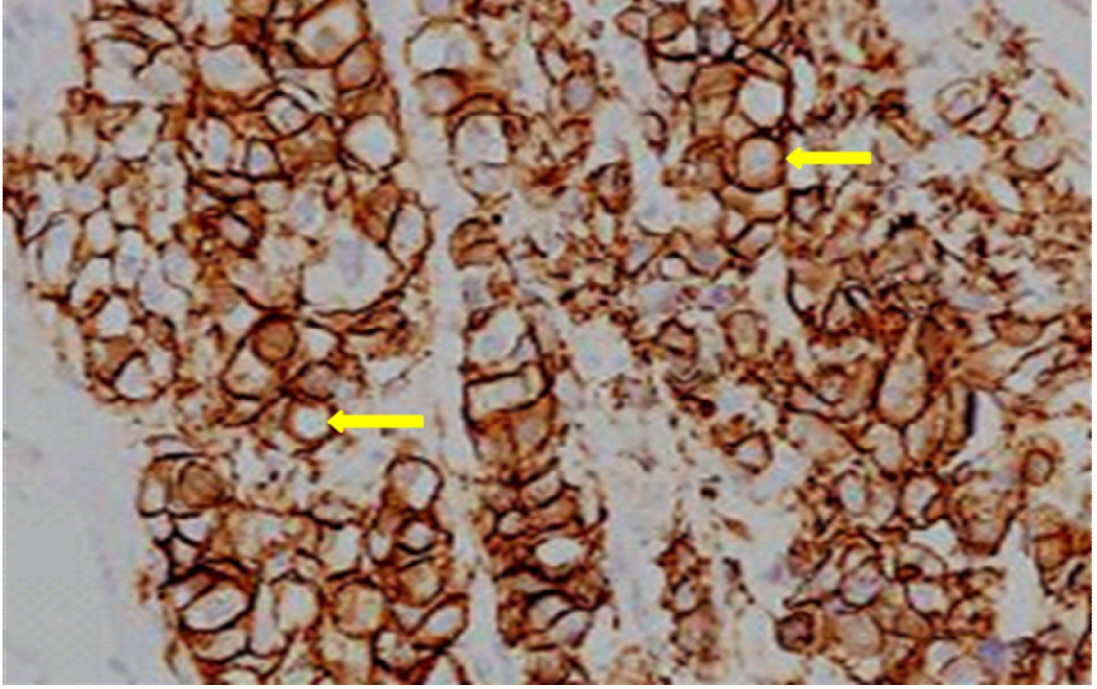
takip sonucu dikkate alınarak tedavi düzenlense cerbB-2 negatif olarak değerlendirildiğinden Trastuzumab tedavisi yapılmayacaktı.

Tablo 4.6:HER-2/neu gen Değişimi

HER-2 (fresh)	N	Yüzde (%)	HER-2 (normal takip)	Frekans	Yüzde (%)	Kümülatif değişim yüzdesi (%)
Negatif	13	65	negatif	16	80	30
Pozitif	7	35	pozitif	4	20	
Total	20	100	Total	20	100	

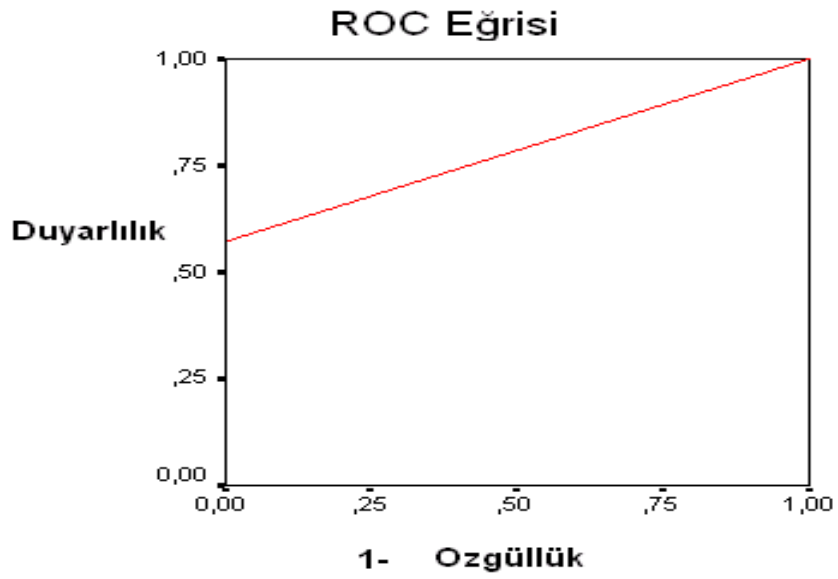


Şekil 4.6:Membran boyanmasının negatif olduğu *cerbB-2* (-)örneği 20x



Şekil 4.7: Membran boyanmasının pozitif olduğu *cerbB-2* (3+) örneği 40x

HER-2/ neu gen reseptörü için elde edilen değerlerden yola çıkılarak oluşturulan Receiver Operating Curve analizi (Şekil 4.8) ile eğri altında kalan alan 0.78 [0.54-1] olarak bulunmuştur. Eğri altında kalan alana ait güven aralığının 0.50 değerini içermemesi tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistik olarak önemli ve anlamlı olduğu göstermektedir ($p=0,04$). Testlere ait duyarlılık (sensivite) % 57 ve özgüllük (spesivite) % 100 olarak bulundu. Bu da normal takip yöntemiyle çalışılan olguların pozitif sonuçları ile frozen yöntemi ile bulunan negatif HER-2/ neu gen sonuçlarının birebir aynı olduğunu göstermektedir. Normal takip yöntemiyle bulunan sonuçlar ile frozen yönteminin sonuçları tanı uyumunu denetleyen yöntemlerden biri olan *kappa* katsayısı kullanıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamlı ve 0.63 olarak bulunmuştur. Bu sonuç iki testin istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir uyuma sahip olduğunu göstermektedir ($p=0,002$). İki test arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$) (Tablo 4.7).



Şekil 4.8:HER-2 /neu (frozen) ile HER-2/neu (normal takip) arasındaki Roc analizi

Duyarlılık	:0,57 (%57)
Özgüllük	: 1 (%100)
Pozitif Öngörü Değeri	: 1
Negatif Öngörü Değeri	: 0,81

Tablo 4.7: Frozen ile Normal Takipte Bulgular Arası Anlamlılık Analizi.

Özellik	Pozitif Olgu Sayısı	Oran (%)	p
HER 2 (frozen)	7	35	0.002*
HER 2 (n.takip)	4	20	
ER(frozen)	11	55	0.317
ER(n.takip)	10	50	
PR(frozen)	14	70	0.317
PR(n.takip)	13	65	

*Ki Kare testi

Çalışma verileri arasında ilişkiler araştırıldı (Tablo 4.8). Lenf nodu ile tümör boyu arasında istatistiksel olarak orta düzeyde anlamlı pozitif ilişki bulundu ($r=0,50$; $p=0,023$). Ayrıca yaş ile ER pozitifliği arasında da, istatistiksel olarak orta düzeyde anlamlı pozitif ilişki bulundu ($r=0,49$; $p=0,027$). PR

(frozen) ile PR (normal takip) arasında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı pozitif ilişki bulundu ($r=0,89;p=0,0001$). ER (frozen) ile ER (normal takip) arasında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı pozitif ilişki bulundu ($r=0,90;p=0,0001$). HER-2(frozen) ile HER-2(normal takip) arasında istatistiksel olarak orta düzeyde anlamlı pozitif ilişki bulundu ($r=0,68;p=0,001$). Grade ile ER pozitifliği arasında istatistiksel olarak orta düzeyde anlamlı negatif ilişki bulundu ($r=0,48;p=0,03$). PR pozitifliği ile lenf nodu arasında istatistiksel olarak orta düzeyde anlamlı negatif ilişki bulundu ($r=0,45;p=0,04$). HER-2 (normal takip) ile ER pozitifliği arasında istatistiksel olarak orta düzeyde anlamlı negatif ilişki bulundu ($r=0,55;p=0,01$).

Tablo 4.8: Korelasyon analizi.

Korelasyonlar		yaş grup	Hücre Tipi	Grade	Tümör Boyutu	Lenf Nodu	ER (frozen)	PR (frozen)	HER-2 (frozen)	ER (takip)	PR (takip)	HER-2 (takip)
Hücre Tipi	r	0,125										
	p	0,600										
Grade	r	-0,281	0,404									
	p	0,230	0,078									
Tümör Boyutu	r	0,134	0,350	0,150								
	p	0,574	0,130	0,527								
Lenf Nodu	r	0,082	0,023	-0,023	0,504*							
	p	0,731	0,923	0,923	0,023							
ER (frozen)	r	0,492*	0,023	-0,484*	-0,154	-0,212						
	p	0,027	0,923	0,031	0,518	0,369						
PR (frozen)	r	-0,089	-0,317	-0,350	-0,190	-0,373	0,285					
	p	0,709	0,173	0,130	0,421	0,105	0,223					
HER-2(frozen)	r	-0,257	-0,232	0,072	-0,206	-0,179	-0,179	0,023				
	p	0,274	0,324	0,762	0,384	0,450	0,450	0,924				
ER (takip)	r	0,408	0,076	-0,459*	0,000	-0,101	0,905**	0,436	-0,105			
	p	0,074	0,749	0,042	1,000	0,673	0,000	0,054	0,660			
PR (takip)	r	-0,171	-0,249	-0,313	-0,252	;-0,453*	0,179	0,892**	0,099	0,314		
	p	0,471	0,291	0,180	0,285	0,045	0,450	0,000	0,678	0,177		
HER-2 (takip)	r	-0,357	-0,076	0,172	0,055	-0,050	;-0,553*	-0,218	0,681**	;-0,500*	-0,157	
	p	0,122	0,749	0,468	0,819	0,833	0,011	0,355	0,001	0,025	0,508	
Fish	r	-0,357	-0,076	0,172	0,055	-0,050	;-0,553*	-0,218	0,681**	;-0,500*	-0,157	1.00**
	p	0,122	0,749	0,468	0,819	0,833	0,011	0,355	0,001	0,025	0,508	-

TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle meme kanseriyle ilgili çalışmalar önem kazanmaktadır. Sağkalım süresi prognoz açısından önemlidir. Sağkalım süresini etkileyen birçok etken bulunmakla birlikte en önemlisi tanı anında kanserin evresidir. Gelişmiş ülkelerde, tarama programlarının düzenli uygulanmasıyla meme kanserinin erken evrede teşhis edilmesi ve hedefe yönelik tedavilerde sağlanan gelişmelere bağlı olarak son 3 dekattır meme kanserine bağlı ölüm oranı azalmaktadır (1).

Benign hücre ile malign tümör hücrelerini ayırabilen, kanserin büyüme ve progresyonunda önemli moleküllere yönelik tedavi stratejileri (tamoksifen, trastuzumab gibi) hücre yüzey ve nükleer reseptörlerini hedef almaktadır. Hedefe yönelik tedaviler içerisinde hormon reseptör düzeyleri ile ilişkili olarak “hormonal tedavi” ve cerbB-2 varlığına göre “monoklonal antikor” grubundan tirozin kinaz inhibitörlerinin verilebilmesi belli başlı tedavi seçeneklerini oluşturmaktadır. Tümör dokusunda östrojen ve progesteron gibi steroid hormon reseptörünün saptanması hastaya anti-östrojen hormonal tedavi verebilme olanağını sağlar (28). Tirozin kinaz inhibitörleri verilebilmesi için ise tümöral dokuda cerbB-2 düzeyinin IHC ile +3 pozitif olması gerekmektedir.

ER, PR ve cerB-2 aktivitelerini çok çabuk kaybeden proteinlerdir. Reseptörler pH 7.4 'de stabil kalabilirler, bu nedenle iskemi ile ortam pH değeri kısa sürede asidoza kayar. Bu yüzden, ortam sıcaklığı, kullanılacak tespit solüsyonunun alınan doku volümüne göre oranı, alınan dokunun kalınlığı ya da büyüklüğü, tespit solüsyonunda kalma süresi, tespit solüsyonunun cinsi, pH değeri, osmolaritesi ve tespit solüsyonunun kalitesi gibi faktörler alınan dokunun değerlendirilmesi için çok önemlidirler.

Günümüzde meme tümörü dokusunda ER, PR ve cerbB-2 düzeyinin tespiti için Southern blot, Western blot, “immunohistochemistry” IHC, slot blot, “enzyme linked immunosorbent assay” ELİSA, “reverse transcription-polymerase chain reaction” RT-PCR, “fluorescence in situ hybridization” FİSH ve “chromogenic in situ hybridization” CISH teknikleri kullanılmaktadır.

Her yerde kolaylıkla bulunup uygulanabilmesi, FISH ve CISH yöntemlerine göre daha ucuz olması, boyalı preparatların kolaylıkla saklanabilmesi yanında değerlendirme için tüm patologların alışkın olduğu normal mikroskopun kullanılması nedeniyle IHC avantajlı bir yöntemdir. Diğer yandan IHC yönteminin slayt skorlama sisteminin kısmen subjektif olması yanı sıra, kullanılan antikorların mono ya da poliklonal olması, dokunun tespit, saklanma ve işleme hazırlanma basamaklarında olabilecek aksaklıklardan olumsuz etkilenmesi ve kendi içinde kontrol yapamama gibi dezavantajları da vardır. Son dönemde HER-2/neu gen cerbB-2 düzeyinin FISH ile tespiti altın standart olarak kabul edilse de IHC ile standart uygulama yapıldığında % 98 FISH ile uyumlu sonuç elde edilebildiği belirtilmektedir (77). Çalışmamızda reseptör ve cerbB-2 tayininde IHC yöntemi kullanılırken, özellikle cerbB-2 için immünohistokimyasal olarak pozitif ve negatif olarak tespit ettiğimiz tüm olgularda FISH ile kontrol sağlanmıştır. Her iki yöntem tam uyumlu bulunmuştur.

IHC ile 20 000 'den daha az reseptör bulunan hücreler boyanmaz skor 0 olarak raporlanır, yaklaşık 100000 civarında reseptör bulunan ve hücrelerin % 10 'undan daha az kadarı kısmen boyanan olgular +1 olarak raporlanır. Yaklaşık 500000 civarında reseptör taşıyan hücreler % 10 'dan daha fazla hafif orta derecede tam boyanma gösterir ve skor +2 olarak raporlanırken yaklaşık 2 300 000 reseptör taşıyan hücreler % 10 dan daha fazla kuvvetli boyanma gösterirse +3 olarak değerlendirilmektedir. Dikkatlice fikse edilmiş, düzgün olarak muamele edilmiş dokularda standart immünohistokimyasal yöntem uygulanırsa gen kopya durumu ile protein ekspresyonu arasında mükemmel korelasyon ortaya konulabileceği bildirilmektedir (78).

Meme kanserinde HER-2/ neu gen amplifikasyonu veya protein aşırı salınımı invaziv meme kanseri olgularının % 10 – 34 kadarında pozitif bulunur (77). Çalışmamızda HER-2/neu gen pozitifliği normal takip grubunda %20, frozen grubunda % 35 oranında pozitif bulunmuştur. HER-2/neu gen pozitif meme kanserlerinin yarısından fazlası aynı zamanda hormon reseptör pozitifdir (76). Bizim çalışmamızda bu oran % 70 'ler civarındaydı.

Meme kanseri olgularında hormon reseptör pozitifliği % 75 – 80 oranında saptanmaktadır (39). Çalışmamızda bu oran östrojen reseptör yönünden normal takip grubunda % 50, frozen grubunda % 55 iken progesteron yönünden normal takip grubunda % 65, frozen grubunda % 70 olarak bulundu. Bu değerler literatür bulguları ile uyumludur.

Meme kanserli hastaların % 10 – 15 'i hem hormon hem de HER-2/neu gen negatif hasta grubunu oluştur (8). Hormon reseptör pozitif meme kanserinin aksine olarak bu grupta daha az tedavi seçeneği vardır ve prognozu kötüdür. "Triple negatif" olarak adlandırılan bu grup hormonal ve trastuzumablı hedefe yönelik tedavilerden fayda görmezler. 'Triple negatif' meme kanserinde tümör derecesi yüksektir (8). Bizim çalışmamızda 2 hastada (% 10) "Triple negatif" meme kanseri mevcuttu. Bu iki hastada da aksiller lenf nodu pozitif, grade 3 invaziv lobuler meme kanseri saptanmıştır.

Çalışmamızdaki asıl amaç, iskeminin cerbB-2 ve steroid reseptör üzerine olan etkisini incelemek olduğu için ilk olarak steroid reseptörler ve cerbB-2'nin kendi içerisinde (frozen ile normal takip grubu) duyarlılık-özellik ROC (Receiver Operating Curve) analizini daha sonrasında ise diğer değişkenlerle birlikte korelasyon ve anlamlılık analizi yaptık.

ER (frozen) ile ER (normal takip) arasındaki ROC analizinde; ER (frozen) 11 olgu pozitif iken, ER (normal takip) 10 olgu pozitif bulunmuştu. Bu yöntemlerin yapılan ROC analizinde duyarlılık (gerçek pozitiflik) 1 (%100), özelliklik 0.9 (%90) olarak sonuçlandı. Bu istatistiki değer, ER (normal takip) grubunda bulunan pozitif olguların kesinlikle östrojen reseptörü taşıdıklarını göstermektedir. Fakat ER (normal takip) grubunda bulunan negatif değer bu olgulardan % 10 kadarının yanlışlıkla negatif saptandığını göstermektedir.

PR (frozen) ile PR (normal takip) arasındaki ROC analizinde; PR (frozen) grubunda 14 olgu pozitif iken, PR (normal takip) grubunda 13 olgu pozitif bulunmuştu. Yapılan duyarlılık-özellik testinde, duyarlılık:1 (%100), özelliklik: 0.86 (%86) olarak sonuçlandı. Bu istatistiki değer, PR (normal takip) grubunda bulunan pozitif olguların kesinlikle progesteron reseptörü taşıdıklarına güvenebileceğimizi göstermektedir. Fakat PR (normal takip) grubunda bulunan negatif bulunan olguların % 14 olasılıkla yalancı negatiflik

olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak ER ve PR yönüyle sadece normal takip değerleriyle tedavi kararı vermiş olsaydık ER için % 10, PR için % 14 hastada hormon tedavisi vermeyerek eksik tedavi uygulamış olabilecektik.

HER-2/ neu gen (frozen) ile HER-2/ neu gen (normal takip) arasındaki ROC analizinde; HER-2/ neu gen (frozen) 7 olgu pozitif iken, HER-2/ neu gen (normal takip) 4 olgu pozitif olarak bulunmuştu. Diğer iki parametrenin aksine bu yöntem de yapılan her iki analizde istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi. Yapılan duyarlılık-özgüllük testinde, duyarlılık:0.57 (% 57), özgüllük:1 (% 100) olarak sonuçlandı. HER-2/ neu gen için yalancı negatiflik oranı:% 43 gibi çok yüksek bir oran, yalancı pozitiflik oranı ise % 0 olarak sonuçlandı. Her iki değişken arasında yapılan anlamlılık analizinde ise $p=0.002$ gibi çok anlamlı bir değer çıktı. Bu istatistiksel çalışma, HER-2/ neu gen (normal takip) pozitif bulunduğunda % 100 duyarlılıkla buna güvenebileceğini fakat HER-2/ neu gen (normal takip) negatif sonuçlandığında % 43 gibi çok yüksek olasılıkla yalancı negatifliğin olduğunu göstermektedir.

Diğer iki değişkene kıyasla, HER-2/ neu genin immünohistokimyasal olarak tetkikinde, frozen ve normal takip yöntemleri arasında istatistiksel olarak çok anlamlı bir sonuç ortaya çıktı. HER-2/ neu gene'nin aktivitesini çok çabuk kaybeden protein özelliği göstermesi sebebiyle iskemiden çok çabuk etkilendiği, bu yüzden verimli ölçüm yapılması için dokunun uygun şartlarda alınmasının ve kısa zamanda testin yapılmasının ne kadar önemli olabileceği düşünülmektedir.

Oda sıcaklığı, kullanılacak tespit solüsyonunun alınan doku volümüne göre oranı, alınan dokunun kalınlığı ya da büyüklüğü, tespit solüsyonunda kalma süresi, tespit solüsyonunun cinsi, pH değeri, osmolaritesi gibi faktörler alınan dokunun değerlendirilmesi için ayrıca önemlidir.

Çalışmamızda ayrıca; hücre tipi, grade, tümör boyutu, lenf nodu, ER (frozen), PR (frozen), cerbB-2 (frozen), ER (normal takip), PR (normal takip), cerbB-2 (normal takip) ve FISH değişkenleri arasında korelasyon analizi yaptık. Lenf nodu pozitifliği ile tümör boyutu arasında pozitif korelasyon mevcuttu. Primer tümörün boyutu ile nodal metastaz insidansı ve prognoz

arasında pozitif korelasyon vardır (2,27,33,74). Atıcı ve arkadaşlarının Çukurova Üniversitesi'nde yaptıkları bir çalışmaya göre 2 cm 'den küçük, 2 - 5 cm ve 5 cm 'den büyük tümörlü hastalar için 3 yıllık takipler sonucu sırası ile % 100, % 83, % 77 hastaliksız yaşam ve % 100, % 93, % 84 sağ kalım oranları belirlenmiştir (34). Genelde rekürrens riski tümör boyutunun artışı ile koreledir ve kanserin boyutu 1 cm 'den büyük olduğunda adjuvan sistemik tedavi için potansiyel bir adaydır (2).

Çalışmamızda ER pozitifliği ile yaş arasında pozitif korelasyon mevcuttu. Hormon reseptör pozitifliği, postmenapozal hastalarda premenopozal hastalardan daha fazla olmaktadır (50). ER düzeyleri yaş ile doğrusal olarak artar; PR düzeyleri ise daha çok menopoz durumu ile ilişkilidir (75). Çoğu araştırmada yaşla birlikte prognozun iyileştiği ve steroid reseptör pozitifliğinin arttığına ilişkin bilgiler verilmektedir (22,23,27). Yine çalışmamızda 60 yaşından büyük olan 12 hastanın 9 'unda (% 75) ER pozitifliği mevcuttu. 60 yaşında küçük 8 hastanın ise 2 'sinde (% 25) ER pozitif idi. Başka bir retrospektif çalışmada ER'si pozitif 263 hastanın 151'i (% 57) 56 yaşın üstünde bildirilmektedir (39).

Korelasyon analizinde; ER (frozen) ile ER (normal takip) arasında, PR (frozen) ile PR (normal takip) arasında ve HER-2/ neu gen (frozen) ile HER-2/ neu gen (normal takip) arasında pozitif korelasyon mevcuttu. Korelasyon analizinde; ER ile tümör grade'i arasında negatif ilişki mevcuttu. Grade 3 olan üç olgunun üçü de (%100) ER negatif idi. Grade 2 ve Grade 1 olan 17 olgunun 6 'sı (% 35) ER negatif idi. Furmanski ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada toplam 190 olgunun 113 'ü (% 59) ER yüksek pozitif, 77 'si (% 41) düşük pozitif olarak bildirilmiştir. ER' si yüksek pozitif 113 hastanın 105' i (% 93) grade 1 ve grade 2, 8' i (% 7) grade 3 iken, ER' si düşük pozitif olan 77 hastanın 53' ü (% 69) grade 1 ve grade 2, 24' ü (% 31) grade 3 idi. Bu çalışmaya göre, tümör dokusundaki ER yokluğu, artmış hücre replikasyon, tümör dediferansiasyonu ve sonuç olarak tümör anaplastisi ile direkt ilişkili gibi görünmektedir. Doğal olarak da bu faktörler tümör derecesinin ana belirleyicileridir (39).

Korelasyon analizinde; PR ile lenf nodu arasında negatif ilişki mevcuttu. PR'si pozitif olan 14 olgunun 10 'nun (% 72) lenf nodu negatif idi. PR 'si negatif olan 6 olgunun dördünün (% 67) lenf nodu pozitif idi. Her iki sonuçta anlamlı bir ilişki göstermedi.

Korelasyon analizindeki son negatif parametre; HER-2/ neu gen ile ER arasındaydı. HER-2/ neu gene pozitif olan 7 hastanın 4 'ü (% 57) ER negatif idi. Bu analizi destekleyen Hindistan'da Kumar ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada da HER-2/ neu gen salınımı ER ve PR hormon yokluğuyla pozitif ilişkili olarak sonuçlanmıştır (76).

Steroid reseptör ve cerbB-2 düzeylerinin doku iskemisi ile etkişebileceği gösterilmiştir. Mastektomi materyalinin en uygun koşulda ve en kısa iskemi zamanıyla değerlendirmeye alınması son derece önemli olarak değerlendirilmiştir. Hedefe yönelik tedaviden yarar görebilecek hasta sayısının bu özen gösterildiğinde artabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇ

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Genel Cerrahi Servisi ve Patoloji Servislerinde yapılan çalışmamızın amacı, meme kanseri dokusundaki iskemi sürecinin steroid reseptör ve cerbB-2 ekspresyonu üzerine olan etkilerini ve klinik özelliklerini karşılaştırmalı değerlendirerek, belirlenecek farklılıklara göre stratejiler geliştirmektir. Her ne kadar hasta sayısı az olsa da iskeminin steroid reseptörleri ve cerbB-2 üzerine olumsuz etkili olabileceği gözlemlenmiştir.

Çalışmamız ile şu sonuçlara ulaştık;

1. Steroid hormon reseptörleri ve cerbB-2 düzeyinin frozen materyali üzerinden tespit edilmesi de güvenli bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.
2. İskemi sürecinin, steroid reseptör ve HER-2/ neu gene ekspresyonuna negatif bir etkisinin olduğu ve özellikle HER-2/ neu gene'nin iskemiden çok daha fazla etkilendiği görülmüştür.
3. ER pozitifliği ile yaş arasında pozitif ilişki bulunmuştur.
4. ER ile tümör grade'i arasında negatif bir ilişki saptanmıştır.
5. HER-2/neu gene ile ER arasında negatif bir ilişki gösterilmiştir.
6. Lenf nodu pozitifliği ile tümör boyutu arasında pozitif ilişki mevcuttur.

Bu bulgular ışığında, steroid reseptör ve cerbB-2 düzeylerinin en doğru şekilde tespiti için mastektomi materyalinin en uygun koşulda ve en kısa iskemi zamanıyla değerlendirmeye alınmasının hedefe yönelik tedaviden yarar görecektir hasta sayısını artırabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun MJ. Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin*, 59:225 – 249, 2009.
2. Tavassoli FA., *Pathology of the breast*. 2.nd. Ed. Hong Kong: Mc Graw-Hill Company, 25-52,1999.
3. Darendeliler E., Agaoglu F., Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. *İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri*, 13-34, 2003.
4. Haskell CM., Casciato DA., *Breast Cancer*, 4th ed, Philadelphia PA, USA, Lippincott Williams Wilkins, 218-238, 2000.
5. Lindsley JE., Wang JC., Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10485-10489, 1991.
6. Ravdin PM., Cronin KA., Howlader N., Berg CD., Chlebowski RT., Feuer EJ., et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N. Engl. J. Med*; 356 (16): 1670-4, 2007.
7. Cinieri S., Orlando L., Fedele P., Cusmai A., D'Amico M., Rizzo P., et al: Adjuvant strategies in breast cancer, new prospectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gailen International Expert Consensus Conference. *Ann Oncol*,18 (6): 63-65, 2007.
8. Cleator S., Heller W., Coombes RC., Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*, 8 (3): 235-244, 2007.
9. Silverberg SG., Masood S., The Breast, In: Silverberg SG, De Lellis RA, Frable W.J ed. *Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology* ed.Churchill Livingston: New York, 575-673, 1997.
10. Williams PL., Bannister LH., Berry MM., Collins R., Dyson M. In: *Gray's Anatomy*. 8th ed. Great Britain, 4217-4240,1995.
11. Şeftalioğlu Aysel, *Genel İnsan Ebriyolojisi* 2.th ed Ankara, 15-53, 1991.
12. Mccarty KS., Tucker JA., Breast. In: Sternberg SS ed. *Histology for Pathologists*. 1st ed. Raven Press. New York, 893-902, 1992.

13. Greenlee RT., Murray T., Bolden S. et al. Cancer statistics 2000, CA Cancer Clin, 50: 7-33, 2000.
14. Boring CC., Squires TS., Tong T. Cancer statistics 1993 .CA. Cancer J Clin., 43, 4-26, 1993.
15. Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz TA. Neoplasm of the breast. In: Holland JF, Frei E (Eds.). Cancer medicine. 7th ed. London: BC Decker Inc, 1584-1643, 2006.
16. Sağlık Bakanlığı Türkiye Sağlık İstatistikleri, [http://www.saglik.gov.tr/TR/Belge Göster](http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster), 05. 09. 2009.
17. Gori S., Rimondini S., De Angelis V., Colozza M., Bisagni G., Moretti G., et al: Central nervous system metastases in HER-2 positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab: incidence, survival, and risk factors. Oncologist, 12: 766-73, 2007.
18. Margolese G., Hortobagyi N., Buchholz T A., "Breast Cancer Medicine" 6thed. Hamilton Canada: BCDecker Inc. www.ncbi.nlm.nih.gov/books, 05. 09. 2009.
19. Crum CP., Lester SC., Cotran RS., Pathologic basis of disease 7th ed. Philadelphia Pennsylvania, Saunders, 679-719, 2002.
20. Tavasolli FA., Devilee P. et al: Pathology an genetics tumours of the breast and female genital organs WHO Classification of tumours IARC Pres Lyon, 2003.
21. Wu AH Pike MC., Stram DO., Meta-analysis, Dietary fat intake, serum estrogen levels and risk of breast cancer, J. Natl. Cancer Inst. 91: 529-534, 1999.
22. Romieu I., Berlin J.A., Coldits G., Oral contraceptives and breast cancer. Cancer 1; 2253-2263, 1990.
23. Topuz E., Meme Kanseri, Birinci Baskı, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, İstanbul, 22-38, 1997.
24. Leitner SP., Swern AS., Weinberger D., Duncan LJ: Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1 a, b NO MO). Cancer, 76 (11): 2266-2273, 1995.
25. Egan R L., Multicentric Breast Carcinomas. Cancer 49: 1123-1130, 1982.

26. Key TJ., Pike MC., The role of estrogen and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 24: 29-43, 1988.
27. Rosai J. Breast. In: Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed. New York, 1565-1639, 1996.
28. Atıcı V., Tunalı C., Genç V., Kayaşelçuk F., Tuncer EM., Burgut R: Meme kanserlerinde prognostik faktörler, *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 23 (I): 35-43, 1998.
29. Bagga D., Ashley JM., Geffrey et al: Effects of a very low fat, high fiber diet on serum hormones and menstrual function, *Cancer* 76:2491-2496, 1995.
30. Bernstein I., Anderson BE., Hanisch R et al: Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 1403-1408, 1994.
31. Zheng W., Gustafson DR., Sinha R. et al: Well done meat intake and the risk of breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1724-1729, 1998.
32. Tsuchiya A., Abe R., Kanno M., Ohtake T., Fukushima T., Nomizu T., Kimijima I: Role of age as a prognostic factor in breast cancer. *Surg. Today* 27 (3): 213-6, 1997.
33. Harris JR., Lippman ME., Morrow M., Osborne CK., *Diseases of the Breast*. 2. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 489-627, 1999.
34. Kumar B., Lyman GH., Allen K., Cox CE., Schapira DV: Timing of weight gain and breast cancer risk. *Cancer* 76 (2): 243-48, 1995.
35. Lohrisch C., Jackson J., Jones A., Mates D., Olivetto IA: Relationship between tumor location and relapse in 6781 women with early invasive breast cancer. *J Clin Oncol*, 18 (15): 2828-35, 2000.
36. Demark - Wahnefried W, Rimer BK, Winer EP: Weight gain in women diagnosed with breast cancer. *J. Am. Diet. Assoc.* May; 97 (5): 519-26, 1997.
37. Frisch RE., Wyhak G., Albright NL., et al: Lower prevalence of breast cancers of the reproductive systems among former college athletes compared to non athletes, *Brit. J. Cancer* 52: 885-891, 1985.

38. Thompson EW., Kats D., Shima TB. et al: ICI, a pure antagonist of estrogen stimulated MCF-7 cell proliferation and invasiveness, *Cancer Res.*, 49: 6929-6934, 1990.
39. Furmanski P., Dwight E., Saunders BS. et al: The prognostic Value of Estrogen Receptor Determinations in Patients With Primary Breast Cancer, *Cancer*, 46: 2794-2796, 1980.
40. Gammon MD., Hibshosh H., Terry MB., et al: Oral contraceptive use and other risk factors in relations to HER-2 overexpressions in Breast cancer among young women, *Cancer Epidemiol Biomark Prev.*, 8: 413-419, 1999.
41. Slamon DJ., Clark GM., Wong SG. et al: Human breast cancer Correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* 235: 177-182, 1987.
42. Gusterson BA., Gelber RD., Goldhirsch A., et al: Prognostic importance of c-erb-2 expression in breast cancer International Breast Cancer Study Group, *J. Clin. Oncol.*, 10: 1049-1056, 1992.
43. Slamon DJ., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2, *N. Engl. J. Med*, 344: 783–792, 2001.
44. Berchuk A., Camel A., Whitaker R. et al: Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer research*, 50: 4087-4091, 1990.
45. Yu D., Wang SS., Dulski K. et al: c-erb B2/neu overexpressions enhanced intrinsic metastatic potential of lung breast cancer cells by induction of metastasis-associated properties, *Cancer Res* 54: 3260-3266, 1994.
46. Tan M., Yao Yu D: Overexpression of the c-erb B2 gene enhanced intrinsic metastatic potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities, *Cancer Res*, 57: 1199-1205, 1997.

47. Treurniet HF., Rookus MA., Peterse HL. et al: Differences in breast cancer risk factors to neu (c-erb B2) protein overexpression of breast tumor, *Cancer Res.*, 52: 2344-2345, 1992.
48. Beatson GT: On the treatment of inoperabl cases of carsinoma of the mama, Sugestions for a new method of treatment, with illustrative cases, *Lancet*, 2: 104-107, 1986.
49. Sedlacek SM., Horowitz KB: The role of progestins and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Steroids* 44: 467-484, 1984.
50. BeckW: *Obstetricsand gynaecology*, pp.126. Baltimore, MD: Williams&Wilkins, 1989.
51. Goldhirsch A., Gelber RD: Endocrine therapies of breast cancer. *Semin oncol*; 23: 494-505, 1996.
52. Margolese RG., Hortobagyi GN., Buchholz TA., *Breast Cancer Medicine* 6th. ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc. www.ncbi.nlm.nih.gov/books, 05.09.2009.
53. Osborn C., Wilson P., Tripathy D., Oncogenes and tumor supressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications, *The Oncologist*, 9: 361-377, 2004.
54. Ross JS., Fletcher JA., Bloom KJ., Linette GP., Stec J., Symmans WS., Puzstai L., Hortobagyi GN., Targeted Therapy in Breast Cancer The HER-2/ neu gene and protein, *Mol Cell Proteomics*, 3: 379–398, 2004.
55. Nahta R., Esteva FJ., HER-2-Targeted Therapy: Lessons Learned and Future Directions, *Clin. Cancer Res.*, 9: 5078-5084, 2003.
56. Sliwkowski MX., Lofgren JA., Lewis GD., Hotaling TE., Fendly BM., Fox JA., Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)., *Semin Oncol.* 26 (Suppl. 12): 60-70, 1999.
57. Yakes FM., Chinratanalab W., Ritter CA., King W., Seelig S., Arteaga CL., Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action., *Cancer Res.* 62: 4132–4141, 2002.

58. Lane HA., Motoyama AB., Beuvink I., Hynes NE., Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling., *Ann Oncol.*, 12 Suppl 1: 21-2. 2001.
59. Mohsin SK., Weiss HL., Gutierrez MC., Chamness GC., Schiff R., Digiovanna MP., Wang CX., Hilsenbeck SG., Osborne CK., Allred DC., Elledge R., Chang JC. 97 Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol.*, 23 (11): 2460-8, 2005.
60. Le XF., LAmmayot A., Gold D., Lu Y., Mao W., Chang T., Patel A., Mills GB., Bast RC Jr., Genes affecting cell cycle, growth, maintenance and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling, *J Biol Chem* 280 (3): 2092-104, 2005.
61. Özcelik C., Erdmann B., Pilz B., Wettschureck N., Britsch S., Hubner N., Chien KR., Birchmeier C., Garratt AN., Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci., USA*, 99: 8880–8885, 2002.
62. Järvinen TAH., Liu ET., HER-2/neu and Topoisomerase II Simultaneous Drug Targets in Cancer, *Comb Chem High Throughput Screen*, 6: 79-99, 2003.
63. Yamauchi H., Stearns V., Hayes DF., When is a tumor marker ready for prime time?, A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer, *J Clin Oncol.*, 19 (8): 2334-56, 2001.
64. Schiff R., Massarweh S., Shou J., Osborne CK., Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response., *Clin. Cancer Res.*, 9 (1, 2): 447-54, 2003.
65. Knoop AS., Bentzen SM., Nielsen MM., Rasmussen BB., Rose C., Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol.*, 19 (14): 3376-84, 2001.
66. Järvinen TAH., Liu ET., Effects of HER-2/neu on chemosensitivity of tumor cells. *Drug Resist Updat.*, 3: 319–324, 2000.

67. Pergram MD., Finn RS., Arzoo K., Beryt M., Pietras RJ., Slamon DJ., The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells., *Oncogene*, 15 (5): 537-47, 1997.
68. Kerstin CH., "Kinetic Studies of Formaldehyde Binding in Tissue" Laboratory of Membrane Biology, Center for Ulcer Research and Education, University of California, Los Angeles, California 90073, 69 (3): 177-179, 1994.
69. Hadii Y., et. al: "Consensus Recommendations on Estrogen Receptor Testing in Breast Cancer By Immunohistochemistry" *Appl. Immun. Mol. Morfol.*, 16 (6): 513-520, 2008.
70. Carson L., "Histotechnology A. Self Instructional" 2.nd Text Thermo Shandon Company Pittsburgh PA. Pub: ASCP, 11-14, 1997.
71. Grace PA., Ischaemia-reperfusion injury, *British J. of Surgery*, 81: 637, 1994.
72. Semenza GL., Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without, *Circ. Res.*, 86: 117, 2000.
73. Girotti AW., Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.*, 39:1529, 2000.
74. Seidman JD, Schnaper LA, Aisner SC: Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis, *Cancer* 75 (1): 65-71, Jan 1, 1995.
75. Cianfrocca M., Goldstein LJ., Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer, *Oncologist*, 9 (6): 606-16, 2004.
76. Vikash K., Mallika T., Significance of HER-2/neu protein over expression in Indian breast cancer patients, *Indian J. Surg.*, 69: 122-128, August, 2007.
77. Ross JS., Fletcher JA., Linette GP., Stec J., Clark E., Ayers M., Symmans WF., Pustzai L., Bloom KJ., The HER2/neu gene and protein in breast cancer 2003: Biomarker and target of therapy, *The Oncologist*, 8: 307 – 325, 2003.

78. Yakes FM., Chinratanalab W., Ritter CA., King W., Seelig S., Arteaga CL., Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action, *Cancer Res.*, 62: 4132–4141, 2002.