

T.C  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof.Dr. OSMAN YILMAZ  
ANABİLİM DALI BAŞKANI

**TEZİN ADI**

**MEME KANSERİ OLGULARINDA HER2/neu TESPİTİNDE İMMUNHİSTOKİMYA  
VE FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. SİDDİKA FİNDİK**

**TEZ DANIŞMANI**

**Yrd. Doç. Dr. HATİCE TOY**

**KONYA 2007**

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**FISH:** Floresan In Situ Hibridizasyon

**IHK:** İmmünohistokimya

**CISH:** Kromojen In Situ Hibridizasyon

**HER-2:** Human epidermal reseptör 2

**TDLU:** Terminal duktal lobül ünitesi

**İDK:** İnfiltratif duktal karsinom

**İLK:** İnfiltratif lobüler karsinom

**YIDK:** Yaygın intraduktal karsinom

**ER:** Östrojen reseptörü

**PR:** Progesteron reseptörü

**AR:** Androjen reseptörü

**EGFR:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü

**MRM:** Modifiye radikal mastektomi

**mm:** milimetre

**cm:** santimetre

## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 3.1:** İnvaziv meme kanserinde Skor 0 HER2/neu boyanması.

**Resim 3.2:** İnvaziv meme kanserinde Skor +1 HER2/neu boyanması

**Resim 3.3:** İnvaziv meme kanserinde Skor +2 HER2/neu boyanması

**Resim 3.4:** İnvaziv meme kanserinde Skor +3 HER2/neu boyanması

**Resim 3.5:** HER2/neu amplifikasyonu göstermeyen meme karsinomu

**Resim 3.6:** HER2/neu amplifikasyonu gösteren meme karsinomu

**Resim 3.7:** HER2/neu ile zayıf amplifikasyon gösteren meme karsinomu

**Resim 3.8:** HER2/neu ile yüksek düzeyde amplifikasyon gösteren  
meme karsinomu

## TABLolar DİZİNİ

**Tablo 2.1.** Meme kanserlerinde Modifiye Elston ve Ellis Grade'leme şeması.

**Tablo 3.1:** Hercept Test Skorlama Sistemi

**Tablo 4.1:** Çalışma grubumuzdaki olgular.

**Tablo 4.2:** Prognozun; menopoz, ortalama yaş, grade ve aksiller tutulum ile ilişkisi

**Tablo 4.3:** Prognozun; östrojen, progesteron, Cerb-B2 ve FISH ile ilişkisi

**Tablo 4.4:** Menopozun; Cerb-B2, FISH ve grade ile ilişkisi.

**Tablo 4.5:** Grade' in Cerb-B2, FISH, östrojen, progesteron ve aksiller tutulum ile ilişkisi.

**Tablo 4.6:** FISH in; Cerb-B2, menopoz, östrojen, progesteron ve aksiller tutulum ile ilişkisi.

**Tablo 4.7:** Cerb-B2 in; Prognoz, menopoz, FISH, grade, aksiller tutulum ile ilişkisi

**Tablo 4.8:** Aksilla metastazı ve prognoz ile tümör çapı ilişkisi.

**Tablo 4.9:** Cerb-B2, FISH, ER, PR ve grade ile tümör çapı ilişkisi

## İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	i
Resimler Dizini.....	ii
Tablolar Dizini.....	iii
İçindekiler.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Anatomi.....	3
2.2. Embriyoloji.....	4
2.3. Histoloji.....	5
2.4. Meme Bezinin İmmunhistokimyasal Özellikleri.....	6
2.5. Memenin Yapı ve Fonksiyonunu Etkileyen Hormonlar.....	6
2.6. Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	6
2.7. Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler.....	11
3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1. Olgu Seçimi.....	26
3.2. İmmunhistokimyasal İnceleme.....	26
3.3. Floresan İn Situ Hibridizasyon ( FISH ) Yöntemi.....	29
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR.....	45
7. ÖZET.....	46
8. SUMMARY.....	47
9. KAYNAKLAR.....	48
10. TEŞEKKÜR.....	56

## 1. GİRİŞ

%34' lük görülme oranı ile meme kanserleri akciğer kanserlerinden sonra kadınlarda en sık ölüme neden olan malignitelerdir (1). Son 80 yıldır insidansının artması, yeni tanı ve tedavi yöntemleri geliştirmek amacı ile yoğun çalışmalar yapılmasına neden olmuştur.

Bir çok organ neoplazilerinde malign transformasyon, tümorogenezis ve hastalık progresyonlarından sorumlu tutulan Human epidermal reseptör 2' nin (HER2/neu) meme kanserlerinde prognostik ve prediktif önemi bulunmaktadır. Meme kanserli hastalarda %25-30 oranında HER2/neu amplifikasyon ve overekspresyonu bildirilmiştir. Bir çok çalışmada özellikle lenf nodu pozitif olan hastalarda HER2/neu amplifikasyon / overekspresyonunun hastaliksız yaşam ve sağ kalım süresi üzerine negatif etkisi olduğu bildirilmiştir (2).

HER2/neu'yu hedef alan tedavi yaklaşımlarının olumlu sonuçlar ortaya koyması, bu gen üzerinde daha fazla çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. HER2/neu reseptörünün ilettiği sinyallerin bloke edilmesi için çeşitli ilaçlar ortaya konmuştur. Proteinin ekstraselüler bölümüne karşı geliştirilmiş ilk insan monoklonal anti-HER2 antikoru olan transtuzumab'ın (*Herceptin®*) HER2 pozitifliği olan özellikle de metastatik meme karsinomu bulunan hastalarda klinik olarak yarar sağladığı gösterilmiştir (2).

HER2/neu onkogen ve onkoproteininin, meme kanserli hastalarda klinik olarak tedavideki yerinin artmış olmasından dolayı HER2/neu durumunun tutarlılığı ve doğruluğu önemlidir. Literatürlerde HER2/neu overekspresyon ve amplifikasyonu, primer olarak immunhistokimya (IHK) ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile saptandığı ve bu iki yöntemin karşılaştırıldığı çalışmalar izlenmektedir. Ancak hangi yöntemin tedaviye yardımcı olacak en değerli ve en bilgi verici yöntem olduğu netlik kazanmamıştır. Özellikle prognoz ve tedavi yaklaşımı ile tam korelasyon gösteren, en kolay uygulanabilir yöntemin bulunması hastanın yetersiz tedavi olasılığını ortadan kaldıracak veya gereksiz pahalı tedavi yöntemlerinin uygulanmasını engelleyecektir. Lenf nodu tutulumu olmayan meme kanserlerinde rekürrens riskini ortaya koyabilecek güvenilir metodlar mevcut değildir. Genellikle rekürrens gösteren hastayı tedavi etmek daha güç olduğu için adjuvan kemoterapi hastaların

çoğunda uygulanmaktadır. Ancak adjuvan kemoterapinin de mortalite ve morbidite riski bulunmaktadır. HER2/neu durumunun tespiti hem prognozda hem de tedavi yöntemini belirlemede kritik öneme sahiptir. Yaptığımız çalışmada HER2/neu durumunu saptamada laboratuvarımızda yaygın kullanılan İHK'sal metod ile altın standart olan FISH yönteminin tutarlılık tesbiti amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Anatomi

Esas fonksiyonu yeni doğana süt temini olan meme dokusu, modifiye aksesuar bir ter bezidir (3, 4). Ağırlığı 30 gr'dan az, 500 gr'dan fazla olabilir. Ağırlığı ve şeklini, dokunun çoğunu oluşturan yağ dokusu belirler (1). Göğüs ön duvarında transvers ekseninde sternumun lateral kenarı ile orta aksiller hat arasında, vertikal ekseninde ise 2. ve 6. kostalar arasında yer alır (5). Santralinde 6. interkostal aralık hizasında meme başı ve bunun çevresinde pigmente bir alan olan areola bulunur (3). 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' in asıcı bağları" ile tutunur (5).

Meme arteria mammaria interna, arteria mammaria eksterna ve arteria interkostalisler ile beslenir. Venöz drenajı vena mammaria interna ve vena interkostalisler ile aksillaya doğru olur (5,6).

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 laterale drene olur. Memenin alt sınırından rektus abdominalis kılıfındaki epigastrik pleksusa buradan subdiafragmatik ve subperitoneal lenfatik pleksusa boşalır. Akım daha sonra karaciğere ve karın içindeki lenfatiklerle devam edebilir ve bu yolla meme kanseri metastazı karaciğere ulaşabilir (5).

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 (5) .

Posterior interkostal lenfatikler, toraks içinde, kosta ve vertebraların birleşim yerlerinin önündeki posterior interkostal lenf nodüllerine açılır. Memenin innervasyonu 2. ve 6. interkostal sinirler ile sağlanır (5).

## 2.2. Embriyoloji

Primitif süt çizgisi ilk olarak gestasyonun yaklaşık 6. haftasında, aksiller bölgeden inguinal bölgeye uzanan epidermal bir kalınlaşma olarak belirir (7). Yaklaşık 9. haftada kaudal bölgedeki kalınlaşma gerilerken, pektoral bölgede yoğun interlober fibröz septa ile birbirinden ayrılan 15-20 kadar lob meydana gelir (3). Laktiferöz duktusların öncülü olan bu yapılar, meme başını oluşturacak olan küçük epitelyal çıkıntıya 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 (5).

Fetusun yaşamı boyunca, fetal meme, çeşitli hormonların etkisindedir . Fetal yaşamın erken evrelerinde meme gelişimi seks steroid hormonlarından bağımsızdır. 15. 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 spesifik hormonal dalgalanmalardan kısmen bağımsızdır. Terme yakın dönemde fetal meme dokusu maternal ve plasental steroidlerden ve prolaktinden etkilenir ve kolostrum sekresyonu oluşur. Doğumda maternal seks steroidleri ve prolaktinin çekilmesi ile ve bu sekretuar aktivite hayatın 1. ayı veya 2. ayında sona erer. İnfantın cinsiyeti bu gelişim evresini etkilemez. Maternal steroidler ve prolaktin eksikliğinin devam etmesi ile glandlar basit duktular organizasyonlarına dönerler. Bundan sonra meme dokusunun gelişimi ve diferansiasyonu, steroid ve peptit hormonlara ve büyüme faktörlerine bağlıdır (8).

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 karakterli involsyonel değişiklikler olur (7, 9-11).

### 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 (TDLU) 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 (1,3,4).

Meme başı ektodermden gelişir ve çok sayıda sebace ve apokrin gland içerir. 15-25 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, lokal 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 menapoz sonrası involüsyona uğrarlar (1,3,8).

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 (1,3).

## **2.4.Meme bezindeki hücresel elemanların immunhistokimyasal özellikleri:**

Epitelyal hücreler; çeşitli sitokeratinlerle özellikle de sitokeratin-7 ile kuvvetli immun boyanma gösterirken, S-100 protein için sporadik bir dağılımda immunoreaktivite gözlenir. Sekretuar aktivite boyunca alfa-laktalbumin pozitifliği söz konusudur. Ayrıca östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörü, bcl-2 için de immunoreaktivite mevcuttur. Myoepitelyal hücreler; aktin ile kuvvetli boyanma gösterirler. S-100 protein ve sitokeratinler ise değişen derecelerde pozitifdir. Bazal lamina; laminin ve tip IV kollojen için immun boyanma gösterir (3).

## **2.5. Memenin yapı ve fonksiyonunu etkileyen hormonlar:**

Östrojenler duktal sistemin gelişmesini ve dallanmasını sağlarken progesteron lobuler gelişmeyi uyarır. Ayrıca duktal sistemin gelişmesinde büyüme hormonu, prolaktin, adrenal glikokortikoidler ve insülinin rolü de bulunmaktadır. Ayrıca gebe hipofizinden 5. haftadan itibaren giderek artan oranlarda salgılanan doğum sırasında kanda normalin 10 katına yükselen prolaktin hormonu doğumda östrojen ve progesteronun baskılayıcı etkilerinden kurtularak süt sekresyonunu sağlar. Sütün ejeksiyonu birtakım nörojenik ve hormonal refleksler ile arka hipofizden salgılanan oksitosin hormonunun etkileri ile gerçekleşir (3,12).

## **2.6. Meme Tümörlerinin Sınıflaması:**

Çok çeşitli olan meme tümörlerinin sınıflamalarından Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nun önerdiği sınıflama aşağıda verilmiştir.

### **A- Epitelyal Tümörler**

- |                             |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 1- İnvaziv Duktal Karsinom  | 4- İnvaziv Kribriform Karsinom |
| 2- İnvaziv Lobuler Karsinom | 5- Medüller Karsinom           |
| 3- Tubuler Karsinom         | 6- Müsinöz Karsinom            |

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 7- Nöroendokrin Tümörler          | 16- Asinik Hücreli Karsinom                    |
| 8- İnvaziv Papiller Karsinom      | 17- Glikojenden zengin berrak hücreli Karsinom |
| 9- İnvaziv Mikropapiller Karsinom | 18- Sebace Karsinom                            |
| 10- Apokrin Karsinom              | 19- İnflamatuvar Karsinom                      |
| 11- Metaplastik Karsinom          | 20- Lobüler Neoplazi                           |
| 12- Lipid-rich Karsinom           | 21- İntraduktal Proliferatif Lezyonlar         |
| 13 - Sekretuar Karsinom           | 22- Mikroinvaziv Karsinoma                     |
| 14- Onkositik Karsinom            | 23- İntraduktal Papiller Neoplaziler           |
| 15- Adenoid Kistik Karsinom       | 24- Benign Epitelyal Proliferasyonlar          |

#### **B- Myoepitelyal Lezyonlar**

#### **C- Mezenşimal Tümörler**

#### **D- Fibroepitelyal Tümörler**

#### **E- Meme başı Tümörleri**

#### **F- Lenfomalar**

#### **G- Metastatik Tümörler**

#### **H- Erkek Meme Tümörleri**

#### **İnfiltratif Duktal Karsinom:**

İnfiltratif duktal karsinom (İDK) meme kanserlerinin en büyük sınıfını oluşturur. Bu tümör aynı zamanda başka türlü spesifiye edilmeyen (Not otherwise specified = NOS) veya spesifik tipi olmayan İDK ( infiltrating Ductal Carcinoma of no special type = NST ) olarak da adlandırılır. İDK bütün infiltratif meme kanserlerinin % 47-75' ini oluşturur (3,13).

İDK genellikle 50 yaş üzeri kadınlarda palpasyon ve mamografi ile tesbit edilen bir kitle şeklinde kendini gösterir. Palpe edilen kitle genellikle 2-3 cm çapındadır. Deri fiksasyonu, ödem, "portakal kabuğu görüntüsü", meme başı çekilmesi ve akıntısı Paget hastalığı ve üzeri ülserle büyük tümörler gibi ağır tablolar 1980'li yıllardan önce sık görülüyordu. İDK diğer infiltratif karsinoma göre daha kötü bir prognoza sahiptir. Makroskobik olarak İDK, iyi sınırlı veya yıldız şeklinde infiltratif ve dışarıya doğru itilmiş kitle şekillerinin kombinasyonu şeklinde görülebilir. Yaygın fibrozis olursa "skiröz karsinom" (Yıldız karsinom - stellate carcinoma) olarak adlandırılır. Skiröz karsinom merkezde bir kitle ve bu kitleden meme dokusuna doğru uzanan uzantılar gösterir. Rengi genellikle sarımsı olup tebeşirimsi beyaz çizgilere sahiptir. İyi sınırlı veya nodüler tümörler, yuvarlakça veya lobüle görünümündedirler. Nekroz yaygın değildir. Sarıdan beyaza kaçan renkler elastozisi yansıtır. Kistik değişiklikler diğer tiplere nazaran daha nadirdir. Tümörün büyüklüğü birkaç milimetreden 14 cm'yi aşan boyutlara ulaşabilir. Bilindiği üzere tümör boyutu önemli bir prognostik parametredir. Mikroskobik olarak tümör, duktusları döşeyen ve içini dolduran solit hücre yuvaları, tubuluslar, bez yapıları, birbirleri ile birleşen kitleler ve tüm bunların karışımları şeklinde yapılar oluşturan malign hücrelerden meydana gelir. Tümör hücreleri; küçük, kromatinden orta derecede zengin ve nükleusları düzenli hücrelerden; iri, düzensiz ve hiperkromatik nükleuslu hücrelere kadar değişen diferansiyasyon dereceleri gösterebilir. Sıklıkla perivasküler ve perinöral invazyonlar görülür ve % 20 olguda yoğun bir lenfoplazmositer iltihabi infiltrasyon mevcuttur. Tubuller ve hücre yuvaları myoepitelyal hücrelerle çevrelenmez ve bazal membran içermezler (3,13).

### **İnfiltratif Lobuler Karsinom :**

Tüm invaziv meme karsinomlarının % 0,7-15' ini oluştururlar. Görülme yaşı ortalama olarak 45-57 yaşlar arasındadır. Diğer kanserlerde olduğu gibi palpe edilebilen bir kitle olarak kendini gösterir. Büyük tümörler üstteki deriye fikse hale gelebilir ya da meme başı akıntısı oluşturabilir. Paget hastalığı infiltratif lobüler karsinom (İLK) ile birlikte görülmez. İLK' lerin vakaların % 14-31'inde multisentrik, % 4-28' inde ise bilateral olduğu bildirilmiştir. Makroskobik olarak ya düzensiz, infiltratif ya da iyi sınırlı, sertleşmiş kitleler olarak karşımıza çıkabileceği gibi bazen lezyon gözle

görülemeyebilir. İLK' ler birkaç milimetre boyutlardan sınırları belli olmayan yoğun geniş alanlar oluşturabilir ya da tüm memeyi tutacak şekilde masif bir tümör haline gelebilir. Mikroskopik olarak ise klasik İLK kısa, tek sıra, düz ("Indian file") ya da damarlar, duktuslar ve lobüller etrafını çevreler şekilde dizilimler yapan yer yer de lobüler bir yapılanma oluşturan uniform, küçük, yuvarlak, düşük grade nükleer özelliklere sahip hücreler tarafından karakterize edilir. Ayrıca İLK solit, alveoler, miks ve pleomorfik varyantları da bulunmaktadır (3,13).

### **Tubuler Karsinom :**

Tüm meme kanserlerinin % 0,4-8 'ini oluşturur. Sıklıkla 23-87 yaşlar arasında görülür. Ortalama yaş 50'dir. Bu tümörler % 28 multisentrik, % 12-38 oranında da bilateral olarak karşımıza çıkmaktadır. Makroskopik olarak tubuler karsinomlar 0,2 cm' den 12 cm' ye varan değişik boyutlarda olabilir. Tipik olarak sert, beyaz, yıldızvari bir görünüme sahiptir. Mikroskopik olarak yuvarlak, oval ya da angule şekilli küçük gland ya da tubullerden meydana gelir. Glandlar belirgin elastosis gösteren, merkezde daha yoğun olan fibröz bir stroma içerisinde uniform olarak dağılmıştır. Tümörün periferine gidildikçe stromanın yoğunluğu azalır. Malign gland ya da tubulleri, tek sıra, düşük grade'li sitolojik ve nükleer özelliklere sahip, küboidal ya da silindirik hücreler döşer. Vakaların % 65 kadarında kribriform ya da mikropapiller duktal karsinoma in situ mevcut olabilir. Tubuler karsinomların diğer invaziv meme karsinomlarından daha iyi bir prognoza sahip oldukları bilinmektedir. Tubuler karsinomlar fokal sklerozan adenozis ve radial skarlarla karıştırılabilir bu yönden dikkat edilmelidir (3,13).

### **Müsinöz Karsinom :**

Kolloid karsinom olarak da bilinen bu tümörler, tüm meme karsinomlarının % 2-3' ünü oluştururlar. Neoplastik hücreler, ya tamamen boş ya da çok az miktarda intraselüler müsin içerirler. Birkaç taşlı yüzük hücresinin oluşturduğu yuvalar görülebilir. Daha çok 60 yaş üzeri kadınlarda görülür. Makroskopik olarak tümör, parlak jelatinöz görümlü ve yumuşak kıvamlıdır. Tümörün boyutları 0,5 cm ile 20 cm arasında değişir. Mikroskopik olarak ise tipik kolloid karsinom geniş müsin gölcükleri içerisinde yüzen, dar, eozinofilik sitoplazmalı, uniform, yuvarlak hücrelerin

küçük gruplarından meydana gelir. Geleneksel olarak müsinöz karsinomun pür ve miks varyantları tanımlanmıştır. İnfiltratif duktal karsinom miks tümörlerde kolloid paternle birlikte bulunan en yaygın tümördür (3,13).

### **Medüller Karsinom :**

Tüm meme karsinomlarının % 5-7' sini oluşturur. Sıklıkla 50 yaş civarı kadınlarda görülür. Genellikle 2-3 cm büyüklüğünde, mobil, yuvarlak, palpe edilebilen bir kitle olarak tesbit edilir. Makroskopik olarak lezyonlar, fibroadenomlara benzeyen iyi sınırlı, lobüle, grimsi-beyaz renkte, yumuşak ve homojen kıvamda kitlelerdir. Mikroskopik olarak ise tümör hücreleri önemsenecek miktarlardaki gevşek fibroblastik konnektif doku ile ayrılan, anastomozlaşan kordonlar ve tabakalar oluşturan bir sınırsız proliferasyon olarak büyür. Gland formasyonu yoktur. Diffüz lenfoplazmositik infiltrat ve gevşek bir stroma vardır. Komşu meme dokusunda bir in situ karsinom mevcut olabilir. Tümörü oluşturan hücreler bir veya daha fazla nükleol içeren, yuvarlak veziküle nükleuslu ve geniş sitoplazmalıdır. Skuamöz metaplazi vakaların % 10-16' sında mevcut olabilir. Bundan başka % 10 oranında da atipik tümör dev hücreleri gözlemlenebilen diğer bir mikroskopik özelliktir (3,13).

### **Paget Hastalığı**

Sir. James Paget tarafından 1874' te tanımlanmış olan bu lezyon bütün meme karsinomlarının % 1-5' ini oluşturur ve meme başının yüzey epitelyumu içinde belirgin nükleoluslu, büyük nükleuslu, geniş ve soluk sitoplazmalı, büyük hücrelerin mevcudiyeti ile karakterizedir. Başlangıçta meme başında kızarıklık ve areolayı da içine alan kaşıntı vardır. Daha sonra pullanma, ülserasyon ve erezyonla karakterize sulantılı egzamatoid değişiklikler göze çarpar. Vakaların % 50' sinde altta ağırlı bir kitle mevcuttur. Genellikle tek taraflıdır fakat bilateral vakalar da bildirilmiştir. Vakaların % 95' inde altta bir karsinom vardır ve sıklıkla bu bir intraduktal karsinomdur. İkinci sıklıkta infiltratif duktal karsinom ve daha az oranda da medüller ve papiller karsinomlar Paget hastalığı ile birlikte görülür (3).

## 2.7. Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler:

Meme kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda en yaygın tümördür. Her 8 kadının birinde hayatlarının herhangi bir döneminde bu kanser gelişimi söz konusudur. 1998'de 178.700 yeni vaka bildirilmiştir. İnfiltratif meme karsinomlarını 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 (3,14,15).

2.7.1. Fiziksel etkenler

2.7.2. Klinik özellikler

2.7.3. Patolojik özellikler

2.7.4. Evre

2.7.5. Kemik iliği metastazları

2.7.6. Biyolojik belirleyiciler

2.7.7. HER2/neu

### 2.7.1. Fiziksel etkenler:

**a- Yaş:** Teşhis esnasında 50 yaştan küçük olanlarda prognoz iyidir. 50 yaşından sonraki, özellikle çok yaşlı kadınlarda yaşama oranı düşmüştür. 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 (6). 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 (16,17).

**b- Irk:** Siyah kadınlarda meme kanserlerinde her stage için daha düşük bir sağ kalım oranı gösterilmiştir. Ayrıca bu kadınlarda kanser daha genç yaşta ortaya çıkmakta ve daha kötü diferansiye olma eğilimi göstermektedir (3,18).

**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 (19-21).

### **2.7.2. Klinik Özellikler:** Şu alt başlıkları içermektedir :

- a- Tümör boyutu
- b- Deriye, kasa invazyon
- c- Çevre dokuya fiksasyon
- d- Aksiller lenf nodu (ALN) tutulumu

**Yerleşim:** Büyük çalışmalarda primer tümörün yerleştiği alanla prognoz arasında ilişki bulunmamakla birlikte bazı çalışmalarda medial yerleşimli olanların daha kötü prognoza sahip oldukları bildirilmiştir (6,22).

**Oral Kontraseptif:** 45 yaş altındaki genç kadınlarda uzun süreli oral kontraseptif kullanımının meme kanseri riskinde artışa sebep olduğu gösterilmiş ve oral kontraseptif kullanılan her yıl için meme kanseri riskinin %3.1 arttığı hesaplanmıştır. Buna göre 10 yıl boyunca oral kontraseptif kullanan genç bir kadında hiç oral kontraseptif kullanmayan bir kadına göre meme kanseri oluşma riski % 36 artmaktadır (23,24).

### **2.7.3. Patolojik Özellikler:**

Patolojik özellikler çerçevesinde başlıca şu konular tartışılacaktır:

- a- Tümör boyutu ve büyüme şekli
- b- Tümörün yerleşimi
- c- Histolojik tür
- d- Tümörün grade'i
- e- Aksiller lenf nodu tutulumu
- f- Damar invazyonu
- g- Yaygın intraduktal komponent
- h- Cerrahi sınırlar
- i- Deri tutulumu

- j- Aksiller lenf nodu değişiklikleri
- k- Elastozis
- l- Lenfosit infiltrasyonu
- m- Tümör nekrozu

#### **a- Tümör Boyutu ve Büyüme Şekli:**

Primer tümörün boyutu ile nodal metastaz insidansı ve prognoz arasında iyi bir korelasyon vardır (3,6,25). Atıcı ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada meme kanserlerinde tümör büyüklüğü ile hastalısız yaşam ve sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki buldular. Buna göre 2 cm' den küçük, 2-5 cm ve 5 cm' den büyük tümörlü hastalar için 3 yıllık takipler sonucu sırası ile % 100, % 77, % 83 hastalısız yaşam ve % 100, % 84, % 93 sağ kalım oranları belirlemiştir (26). Genelde rekürrens riski tümör boyutunun artışı ile koreledir ve kanserin boyutu 1 cm' den büyük olduğunda adjuvan sistemik tedavi için potansiyel bir adaydır (14).

Bir çalışmada aksiller lenf nodu negatif olgularda ortalama tümör boyutu 13.7 mm, aksiller lenf nodu pozitif olanlarda ise 17.6 mm ve ortalama intraduktal komponent yüzdesi % 52 ve % 26 olarak bulundu (27).

Multisentrik ( aynı memede iki tümörün sınırları arasındaki uzaklık 5 cm'den fazla ise multisentriktir ) gelişen tümörlerde nüks daha sık ve prognoz daha kötüdür (3,25). Lagios ve arkadaşları 286 adet total mastektomi üzerinde yaptıkları çalışmada olgularının % 28' inde multisentrisite görmüşlerdir (3). Egan yaptığı çalışmada multisentrik olmayan tümörlerde prognoz daha iyi olduğunu tesbit etti. Buna göre multisentrik olmayan tümörlerde 5 yıllık mortalite % 25 , multisentrik olanlarda ise % 15 olarak belirlendi (25).

Düzgün sınırlı tümörler infiltran sınırlı tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir (6). Bazı çalışmalarda bilateral tutulumlu karsinomlarda, unilateral tutulumlulara oranla yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir (3).

### **b- Histolojik Türler:**

Meme karsinomunun tubuler, papiller, müsinöz ( kolloid ), adenoid kistik karsinom, medüller karsinom gibi belirli tipleri esas olarak düşük grade' li kanserlerdir ve aksiller lenf nodu metastazlarının yokluğu ya da düşük sıklığı ile relatif olarak iyi prognoz ve düşük rekürrens oranları gösterirler. Bunlarda hastalısız yaşam oranları % 100' dür. Duktal ve lobuler karsinomlarda ise bu oran % 92 civarındadır (3,14). Taşlı yüzük hücreli karsinom, inflamatuvar karsinom ve karsinosarkom kötü diferansiye agresif neoplazmlar olarak bilinmektedir. En agresif tümörlerden biri olan inflamatuvar karsinom için 5 yıllık sağ kalım oranı % 11' dir. Medüller karsinomda 10 yıllık survi % 51, infiltratif duktal karsinomda % 46, infiltratif lobuler karsinomda % 53 olarak belirlenmiştir (3).

### **c- Tümör Derecesi ( Grade ):**

Yaşam süresi üzerine olan etkisi en iyi araştırılmış olan parametre tümörün histolojik grade' idir. Meme kanserinin histolojik grade' lendirilmesinde Greenough ve Franz tümör hücrelerinde tubulus oluşturma eğilimi, pleomorfizm ve mitoz sayısı gibi temel özelliklere dayalı sistemler önermişlerdir. Bloom ve Richardson 1957'de 1544 vakalık bir seride yine daha önceki grade' lendirme sistemlerindeki kullanılan özellikleri ele alan bir puanlama sistemi ile grade' lendirme önermiştir. Bu sistem WHO tarafından da benimsenmiş, bazı ufak değişikliklerle günümüzde de geçerliliğini korumaktadır (6).

Clayton ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Bloom-Richardson grade'lemesi ve Modifiye Scaff-Bloom-Richardson (SBR) grade' lemesinin yaşam stresi ile iyi korelasyon gösteren grade' leme şemaları olduğunu bildirmişlerdir. Modifiye SBR' da diferansiyasyon derecesi gözardı edilmiştir. Black' in nükleer grade' leme yöntemi ise nükleer ve nukleolar verileri dikkate alır (15).

Yapılan bir çalışmada 5 yıllık yaşam oranları Grade I, II ve III tümörler için sırası ile % 81.9, % 63.4, % 49.5 olarak belirlenmiştir (28). Meme kanserlerinde grade' leme için birçok sistem ortaya konulmuştur. Buna karşılık en sık kullanılan Bloom-Richardson ve Fisher' in ortaya attığı sistemler olmuştur. Bunlar histolojik

görünümle birlikte nükleer görünümü de gözönüne aldığından değerlidir. Bloom-Richardson yönteminin birçok modifikasyonu olduğu bilinmektedir. Bu modifikasyonlardan Elston ve Ellis' in ortaya koyduğu yöntem aşağıdaki gibidir. Bu yöntemde, duktal ya da tubüler yapı oluşumu, hücrel pleomorfizm ve her 10 büyük büyütme alanındaki toplam mitoz sayısı skorlanmakta ve genel diferansiyasyon için skorların toplamı değerlendirilmektedir (3).

PUAN	TUBULER YAPI	NÜKLEER PLEOMORFİZM	MİTOZ SAYISI ( X400 )
1 PUAN	%75'den fazla	Küçük, düzenli ve uniform	0-5
2 PUAN	% 10-75 arası	Şekil ve büyüklük bakımından orta derecede pleomorfizm	6-10
3 PUAN	% 10'dan az	Şekil ve büyüklük bakımından belirgin şekilde pleomorfizm	> 11
SKOR	1-3	1-3	1-3

**Sonuç olarak:**

Toplam Skor	Grade
3-5	I
6-7	II
8-9	III

**Tablo 2.1.** Meme kanserlerinde Modifiye Elston ve Ellis Grade leme şeması.

#### **e- Aksiler Lenf Nodu Tutulumu:**

En önemli prognostik parametrelerden biridir. Survey oranları aksiler lenf nodu tutulum oranları ile ilişkilidir. Prognostik değerler en iyiden kötüye doğru aksiller tutulum negatif, 1-3 adet lenf nodu tutulumu ve 4'ten fazla lenf nodu tutulumu şeklinde sıralanabilir. Ekstrakapsüler metastaz kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Bazı çalışmalar ekstrakapsüler metastazın bağımsız bir prognostik faktör olmadığını, fakat metastatik lenf nodu sayısı ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (6).

### **f- Damar İnvazyonu:**

İnvaziv karsinomlar etrafında vasküler invazyonun gösterilmesi erken lokal nüks ve uzak metastazlar açısından önemlidir. Aksiller lenf nodu (+) olan 33 hastanın % 69' unda ve Aksiller lenf nodu (-) olan 30 hastanın sadece % 26' sında vasküler invazyon görülmüştür. Başka bir çalışmada lenfatik invazyon gösteren hastaların % 32' sinde, aynı invazyonu göstermeyen hastaların da % 10,3' ünde nüks görülmüştür (3). Lenfatik vasküler invazyon gösteren meme kanserli hastalarda hastalıksız yaşam % 83, lenfatik vasküler invazyon göstermeyen hastalarda ise % 98' dir (14).

### **g- Yaygın İntraduktal Komponent (YIDK):**

Silwerberg ve Chitale tümör içinde YIDK bulunan olgularda lenf nodu metastazlarının daha az, prognoz ise daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir (3). Özellikle meme koruyucu yaklaşımlarda eksizyon ve radyoterapiden sonra nüks, YIDK bulunmayan olgularda % 6, YIDK bulunan olgularda % 24' tür. Bu nedenle de YIDK varlığı meme koruyucu cerrahide risk oluşturur (3,17).

### **h- Cerrahi sınırlar:**

Bazıları cerrahi sınır ile tümör arasındaki 5 mm' lik bazıları da birkaç yağ hücresi ya da ince fibröz bağ dokusunun bulunmasını negatif kabul etmektedir. Cerrahi sınırda tümörün (+) bulunması, tedaviye etkileri ve lokal nüks açısından önemlidir (3).

### **i- Deri Tutulumu:**

Meme karsinomlarında deri invazyonunun varlığı azalmış sağ kalım oranları ile birliktedir. Özellikle inflamatuvar karsinom olarak tanımlanan dermal lenf damarlarının tümöral invazyonu özellikle kötü bir prognostik işarettir. Ayrıca meme başı tutulumu da aksiller metastazlarının yüksek insidansı ile ilişkilidir (6). Meme başı ve areola tutulumu; tümör büyüklüğü, tümör-areola uzaklığı ve histolojik türle ilişkili bulunmuştur. En çok intraduktal karsinomda ( % 80 ), daha sonra YIDK

içeren invaziv duktal karsinomda ( % 30 ) izlenmiştir (3).

#### **j- Aksiller Lenf Nodu Değişiklikleri:**

Lenfosit hakimiyeti, stimülasyon yokluğu ve sinüs histiositozis düşük rekürrens oranı ile birlikte (% 9). Buna karşın lenfosit azlığı, germinal merkez belirginliği ve mikrometastazların varlığı orta derecede ( %23 ) ve makrometastazların varlığı yüksek bir rekürrens oranı ile ilişkilidir ( % 58 ) (29).

#### **k- Elastozis**

Meme kanserlerinde elastozis, mikroskopik olarak fokal ve diffüz olmak üzere ikiye ayrılır. Tümörün histolojik grade' i ile elastozis derecesi arasında birçok çalışmada pozitif ilişki saptanmıştır. İyi diferansiyel tümörlerde daha belirgin elastozis görülmesinde bu tümörlerin uzun sürede geliştiği ve bu sürede elastik fibrillerin biriktiği fikri ileri sürülmüştür (30).

#### **l- Lenfosit İnfiltrasyonu:**

Tümör stromasında ve çevresinde lenfositler bazen invaziv duktal karsinomlarda da izlenir. Bu durumda atipik medüller karsinom olarak adlandırılır ( medüller karsinomlarda plazmositler daha çoktur ) ve prognozları invaziv duktal karsinomdan biraz daha iyi olmakla birlikte istatistiksel bir anlamı yoktur (3).

#### **m- Tümör Nekrozu:**

Tümör nekrozunun varlığı lenf nodu metastazı oranında artış ve yaşam süresinde azalış durumlarına eşlik eder (14). Nekroz tümör boyutu ve grade' i ile ilişkilidir. Ayrıca tümör nekrozu kötü prognozla birlikte (3). Nekroz yokluğu 20 yıllık survi oranlarında % 10' luk bir farkla önemli ölçüde daha iyi bir prognoz sağlar (15).

#### **2.7.4. Evre:**

Tümörün evresi tek başına sağ kalımın önemli bir belirleyicisidir. Evre ile survi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Amerika Birleşik Komitesi klinik evrelemede aşağıdaki şemayı uygulamaktadır (3) :

Evre 0 : Duktal karsinoma in situ yada lobüler karsinoma in situ ( beş yıllık sağ kalım oranı %92 ) .

Evre I : Nodal tutulumsuz yada uzak metastazsız 2 cm ya da daha küçük çaptaki invaziv karsinomlarda ( mikroinvazyonlu karsinoma in situ dahil ) ( beş yıllık sağ kalım oranı %87 ) .

Evre II : 5 cm ya da daha küçük hacimli hareketli, tutulmuş lenf nodülü ve uzak metastaz göstermeyen yahutta nodal tutulum ya da uzak metastazsız 5 cm' den büyük bir tümör ( beş yıllık sağ kalım oranı %75 )

Evre III : 5 cm' den büyük çapta nodal tutulumlu meme kanseri; ya da fiks aksiller nodüllü herhangi bir meme kanseri; aynı taraf internal meme lenf nodülü tutulumu ile birlikte olan herhangi bir meme kanseri; deri tutulumu, pektoral ve göğüs duvarı fiksasyonlu, ödemli ya da uzak metastazsız klinik iltihabi meme kanseri ( beş yıllık sağ kalım oranı %46 )

Evre IV :Uzak metastazlı herhangi bir meme kanseri ( aynı taraf supraklavikuler lenf nodülleri dahil ) (beş yıllık sağ kalım oranı %13 )

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

#### **2.7.5. Kemik İliği Mikrometastazları:**

5 yıl sonra meme kanseri nüksleri % 50 sıklıkta olmakta ve bunların % 57' si kemiklerde görülmektedir (17). Evre I, II veya III meme kanserli hastalarda kemik iliğinde okült, sitokeratin pozitif metastatik hücrelerin varlığı hastalığın

tekrarlama riskini arttırır (31). Ayrıca kemik iliği mikrometastazları metastatik meme kanserli hastalar için gelecekteki tedavi stratejilerini etkileyebilen bağımsız bir prognostik faktördür (32).

### **2.7.6. Meme Kanserlerinde Prognozun Biyolojik Belirleyicileri**

Bazı meme tümörleri beklenenden farklı agresif seyir gösterebilirler. Bu vakalarda klinik veriler prognozun tahmininde yetersiz kaldığından, immunhistokimyasal ve moleküler tekniklerle yeni prognostik faktörlerin tespitine çalışılmaktadır. Steroid reseptörleri gibi bazı faktörler yaygın olarak rutin uygulama içerisine girmiştir. Üzerinde çalışmaların devam ettiği bazı moleküler ve immunhistokimyasal belirleyiciler şunlardır:

**A- Proliferasyon belirleyicileri:** Proliferasyon belirleyicileri olan PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) ve Ki-67 proteinleri malign meme tümörlerinde yaygındır ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir.

**B- DNA içeriği:** İnvaziv meme kanserleri % 60-70 oranında anöplid özellik göstermektedir ve anöplid özellik kısa sağ kalım süresi ile ilişkilidir.

**C- Litik enzimler:** Stromal ve epitelyal hücreler tarafından sekrete edilen proteolitik enzimlerin meme kanserlerinin invazyon ve metastazında önemli rolleri vardır. Bunlar arasında en önemlileri katepsin D ve tip IV kollejenazdır.

#### **D- Steroid hormon reseptörleri**

**a- Östrojen ve Progesteron reseptörü (ER-PR):** İnvaziv kanserlerde % 37-80 oranında ER, %45-69 oranında PR pozitifliği bildirilmiştir. ER pozitif hücrelerin oranı, tümörün diferansiyasyon derecesi ve hormonal tedaviye vereceği yanıt ile ilişkilidir. Tedaviye en yüksek cevap oranı hem ER, hem PR pozitif tümörlerde (33,34). Genel olarak ER düzeyi yüksek olan tümörler iyi prognoza sahiptir (35).

**b- Androjen Reseptörü (AR):** Meme kanserlerinde AR ekspresyonu % 20-85 arasındadır. AR primer ve metastatik meme kanserlerinde en sık eksprese edilen steroid hormon reseptörüdür. Genel olarak ER ve PR ile belirgin korelasyon gösterir (36,37).

**E- Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler:** Malign transformasyondan direkt olarak yapısal değişikliğe uğramış onkogenler veya proto-onkogenlerin artmış ekspresyonu sorumludur (1). Yapısal değişiklikler, nokta mutasyonu, translokasyon, inversiyon, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve gen amplifikasyonu şeklinde olabilir. Bunlar arasında meme kanserinde özel bir yeri olan ve bu çalışmanın konusunu oluşturan HER2/neu' dan bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak söz edilecektir. Klinik olarak önemi olan diğer bazı onkogenler şunlardır:

**a- BRCA1 geni,** 17q 12-q21' de lokalizedir. Bir tümör süpresor gen olduğu kabul edilir. BRCA1' in allellerinden biri gen dizisi mutasyonu ile kaybolur ve geriye kalan allelin sonraki kaybı somatik meme dokusunda ortaya çıkar. 70 yaş civarında BRCA1' e bağlı meme kanseri gelişim riski %85' dir. BRCA1 ile ilgili meme kanserleri daha erken evrede ve daha genç yaş gruplarında görülmektedir ( ortalama 42,3 ). Bu tümörler yüksek proliferasyon oranlarına sahiptir ve yüksek derecelidirler. BRCA1 mutasyonlu kadınlarda medüller ve atipik medüller karsinomlara kontrol gruplarına oranla daha sık rastlanır ( %2' ye göre %13 ) (38).

**b- BRCA2 geni,** 13q 12-q13' de lokalizedir. Herditer kanserlerin %35-40' ından sorumludur. 70 yaş civarında meme kanseri riski % 60-70, 80' li yaşlarda ise %83-97 dir. Tubulo-lobüler kanserlerin büyük bir bölümünün BRCA2' ye bağlı kanserli hastalar arasında geliştiği bilinmektedir (38).

**c- H-ras protoonkogeni,** meme kanserinde hem amplifikasyon, hem yeniden düzenlenmeler tespit edilmiştir (35). Ras proto-onkogeninde mutasyon, meme kanserinde %10-30 oranında bildirilmiştir. Prognozla ilişkili tutarsız sonuçlar mevcuttur.

**d- c-myc,** meme kanserlerinde % 17-32 oranında saptanır. Değişmiş c-myc, tümör derecesi, aksiller lenf nodu durumu, yaş ve hormon reseptör düzeyleri ile belirgin bir ilişki göstermez (38).

**e- Int-2, hst-1 geni,** fibroblast büyüme faktörünü kodlar (38).

**f- p53 geni,** hücre siklusunda G1 fazından S fazına ilerlemeyi inhibe eden tümör baskılayıcı gendir. Bu gende mutasyon ve delesyonlar sonucu olan değişiklikler

malign transformasyona neden olur. Agresif biyolojik davranış, büyük tümör boyutu, sık aksiller lenf nodu metastazı ile ilişkilidir.

### **2.7.7. HER2/neu ( CerbB-2 veya HER 2 )**

Hücre bölünmesi ve çoğalmasını pozitif yönde kontrol eden genler onkogenlerdir. Onkogenler dört gruptur;

- a- büyüme faktörleri,
- b- büyüme faktörü reseptörleri,
- c- sitoplazmik sinyal iletili proteinler,
- d- nükleer düzenleyici proteinler.

İnsan kanser modelinde CerbB-2 reseptör overekspresyonu ve gen amplifikasyonu onkojenik transformasyon ve tümörögenizde rol oynar. C-erbB-2 geni, ErbB-2, ErbB2, Erb-B2, c-erbB2/neu, HER2/neu, p185 olarak da adlandırılan 17. kromozomun uzun kolunda lokalize bir protoonkogendir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesi veya HER ailesinin [HER-1 (c-erbB-1,EGFR), HER-2 (c-erbB-2), HER-3 (c-erbB-3), HER-4 (c-erbB-4)] dört üyesinden biri olan HER2/neu 185 kDa ağırlığında tirozin kinaz aktivitesi olan transmembran glikoproteini kodlar. Bu transmembran glikoprotein 119 bölümden oluşur, ekstraselüler ligand bağlayan alan transmembran alan ve intraselüler tirozin kinaz aktivitesi olan alan C-erbB-2 için tanımlanmış ligand proteini yoktur. Ancak ayrı aileden diğer 119 büyüme faktörü reseptörü için, EGF, nörogulin (heregulin), TGF-alfa, amfiregulin, heparin bağlayan EGF, beta-selülin, epiregulin, kripto-1 içeren ligand proteinleri tanımlanmıştır (39).

Reseptör aktivasyonu için ligand, reseptör, dimer oluşumu gibi üç değişkene ihtiyaç vardır (39). Ligand reseptöre bağlandıktan sonra, bu reseptör HER-1, HER-2, HER-3 ve HER-4 reseptörlerinden biri ile bağlanarak dimer oluşturur. Dimer oluşumu iki aynı reseptör ( homodimer ) ile veya iki farklı reseptör ( heterodimer ) ile olabilir. Daha sonra intraselüler bölgede yer alan tirozin kinaz fosforile olur ve sinyal iletim yolları ligand ve dimer tipine bağlı olarak aktive olur. Nükleusda bazı genler aktive olarak hücre bölünmesi gerçekleşir. HER2' nin belli bir ligandı olmamasına karşın, HER2 heterodimerleri uzun süreli ve potent etkiye sahip olduklarından HER2 ailenin diğer üyeleri

tarafından dimerleşme için tercih edilir (40). Bu durum HER2' nin tümörogenezisdeki önemini açıklamaktadır çünkü ortamda HER2 ne kadar fazla ise oluşan heterodimer sayısı, iletilen sinyalin süresi ve gücü o oranda artmaktadır.

**HER2'nun Meme Kanserlerinde Önemi:** Meme kanserlerinde HER2'nin prognostik ve prediktif önemi bulunmaktadır. Meme kanserli hastalarda % 25-30 oranında HER2 amplifikasyon ve overekspresyonu bildirilmiştir. Bir çok çalışmada özellikle lenf nodu pozitif olan hastalarda HER2 amplifikasyon/overekspresyonunun hastalıksız yaşam ve sağ kalım süresi üzerine negatif etkisi olduğu bildirilmiştir (2). Yani HER2 pozitifliği tümörün agresif davranışı ve kötü prognoz ile yakından ilişkilidir. Aynı zamanda çalışmalar HER2' nin bazı tedavi rejimlerinin belirlenmesine katkısı ve bu tedavi rejimlerine cevapta prediktif rolünden bahsetmektedir (2).

HER2 reseptörünün ilettiği sinyallerin bloke edilmesi için çeşitli ilaçlar ortaya konmuştur. Proteinin ekstraselüler bölümüne karşı geliştirilmiş ilk insan monoklonal anti-HER2 antikoru olan transtuzumabın (*Herceptin®*) HER2 pozitifliği olan, özellikle de metastatik meme karsinomu bulunan hastalarda klinik olarak yarar sağladığı gösterilmiştir. HER2 amplifikasyon/over ekspresyon oranı *Herceptin®* tedavisi uygulanacak hastanın seçilmesine yardımcı olmaktadır (2). *Herceptin®*'in kardiyotoksikite gibi yan etkileri bulunduğu için HER2 durumunun doğru olarak belirlenmesi çok önemlidir (41). *Herceptin®* tümör hücresi gelişimini inhibe ettiği ve aynı zamanda bu ilacın tümöre karşı hastanın immün cevabını stimüle ettiği düşünülmektedir (42).

Lenf nodu tutulumu olmayan meme kanserlerinde rekürrens riskini tespit edebilecek güvenilir metodlar mevcut değildir. Sadece %20-30 hastada rekürrens riski olmasına karşılık adjuvant kemoterapi hastaların çoğuna uygulanmaktadır. Çünkü rekürrens gösteren hastayı tedavi etmek daha güçtür. Ancak adjuvan kemoterapinin de mortalite ve morbidite riski bulunmaktadır. Lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda HER2 amplifikasyon/overekspresyonu mevcut ise rekürrens ve metastaz riskinin yüksek olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yani HER2 durumu adjuvan kemoterapi uygulanacak hastanın seçimine yardımcı olabilmektedir (43).

**HER2/neu Tespit Yöntemleri:** Normal hücrelerde HER2' nin iki gen kopyası bulunmaktadır. Kanserli hücrelerde gen kopya sayısı bu rakamın çok üzerindedir. HER2 tespitinde en sık kullanılan iki yöntem; İmmünohistokimya ve Floresan in situ hibridizasyon dir (40)

**1- İmmünohistokimya,** büyüme faktörü reseptörü olarak görev yapan ve hücre yüzeyinde yer alan sayıca artmış gen ürünü olan proteinleri HER2 için geliştirilmiş antikorlar kullanarak tespit eden bir yöntemdir. Formalinde tespit edilmiş dokulara ait parafin bloklar kullanılarak protein düzeyinde inceleme sağlanması, patoloji laboratuvarları açısından pratik, hızlı ve ucuz olması avantajlarıdır. HER2/neu' ya karşı geliştirilmiş 30' dan fazla monoklonal fare ve poliklonal tavşan antikorları mevcuttur. Bu antikorlar oldukça farklı sensitivite ve spesifite gösterirler. Kullanılan antikora bağlı olarak sensitivitesi %6-82 arasında değişir (2). Meme kanserinde tümör hücrelerinde sadece hücre membran boyanması HER2 overekspresyonu ile ilişkilidir. Nükleer ve sitoplazmik boyanmalar anlamlı değildir (2). Boyanma paternine göre belirlenmiş ve asıl olarak Hercep Test™ için geliştirilmiş dört aşamalı skorum sistemi başka antikorlar ile yapılan değerlendirmelerde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tümör hücrelerinde membran boyanması yok veya hücrelerin %10' undan azında membran boyanması varsa sıfır (0),

Hücrelerin %10' undan fazlasında hafif ve parsiyel membran boyanması varsa +1,

Hücrelerin %10' undan fazlasında hafif ve orta şiddette komplet membran boyanması varsa +2,

Hücrelerin %10' undan fazlasında kuvvetli komplet membran boyanması varsa +3 olarak skorlanır.

Amplifikasyon açısından;

Skor 0 ve +1 negatif,

Skor +2 ve +3 pozitif olarak kabul edilir.

**İHK değerlendirilmesinde farklılığa neden olan faktörler;** Spesmenin türü, fiksasyon süresi, fiksasyondan önce dokunun dilimlenmesi, fiksatif tipi, blokların saklanması, kesitlerin hazırlanışı, kullanılan antikorların duyarlılığı, teknik problemler ve yorum farklılıklarıdır (44). Bu nedenle kullanılacak yöntemin kalite kontrolünün ve optimizasyonunun sağlanmış olması gerekmektedir. Klinik kullanım için FDA (*Food and Drug Administration*) onayı bulunan Hercep Test™'te (DAKO) tespit süresi, antijen retrieval işlemi de dahil olmak üzere immünohistokimya da önemli tüm parametreler standardize edilmeye çalışılmıştır. Kontrol lamalarının bulunması, yaygın olarak kullanılan skorlama sisteminin bu kit için geliştirilmiş olması Hercep Test™' in diğer avantajlarıdır (2).

**2- Floresan in situ hibridizasyon (FISH),** hücre nükleusunda kromozom 17 üzerinde bulunan HER2 geninin artmış kopya sayısını bu gene karşı özgül proplar kullanarak belirler. HER2 tespiti için ikinci sıklıkta kullanılan bir yöntemdir. Sensitivitesi %96.5, spesifitesi %100'dür. Floresan mikroskop kullanma zorunluluğu olduğu için doku morfolojisini değerlendirme güçlüğü, pahalı ve zaman alıcı olması dezavantajlarıdır. İHK ile karşılaştırıldığında FISH değerlendirmesi daha objektiftir ve İHK' nin etkilendiği doku preparasyon faktörlerinden daha az etkilenmektedir. İki adet FDA onayı bulunan kit mevcuttur. İnform HER2™ kit (ONCOR/ Ventana), HER2 gen kopya sayısını belirlemek için tek prop kullanır. Daha popüler olan PathVysion™ kiti ( Vysis ) ise biri HER2 geni için spesifik, diğeri kromozom 17 sentromeri için spesifik olan iki DNA probu kullanır. HER2 ve kromozom 17 sentromeri için spesifik sinyali olan proplar kromozom 17 polizomi durumlarının belirlenmesinde önemlidir.

FISH değerlendirilmesinde gen ve sentromer sinyal sayısı 60 nükleusda belirlenir ve HER2 gen/kromozom 17 sentromer (CEP 17) oranı hesaplanır. Bu oranın 2' nin üzerinde olması HER amplifikasyonunu gösterir (2). Açık gen amplifikasyonunun bulunduğu durumlarda ( sinyal / nukleus > 10 ) 40 hücre sayılmasının yeterli olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Sayılan hücrelerin %10' undan fazlası nükleus başına 4-10 sinyal içeriyorsa düşük amplifikasyon, 10' un üzerinde sinyal içeriyorsa yüksek amplifikasyondan söz edilmektedir (45). Altmış nükleus saymak amplifikasyon değerlendirmede genel

eğilim olarak ortaya çıkmakla birlikte, sayılan nükleus sayısı çalışmalar arasında ve kullanılan problara göre farklılık göstermektedir. 20 hücre saymayı yeterli bulan çalışmalar olduğu gibi, olgu başına 200 hücrede sayım yapan çalışmalar da bulunmaktadır (46,47). Gen amplifikasyonu kümeler oluşturuyorsa sinyal sayımı net olarak yapılamaz. Bu durumda kanser hücrelerinden %50' den fazlası nükleus başına en az 6 sinyal veya sinyal kümeleri içeriyorsa HER2 amplifikasyonu var olarak değerlendirilir (48). Üst üste binen nükleuslar, lökositlerle infiltre tümör hücreleri değerlendirmeye alınmaz (49). Değerlendirilecek hücreler en az 1 HER2 sinyali ve en az 1 kromozom 17 sentromer sinyali içermelidir.

HER2 gen kopya sayısını belirlemek için internal kontrol olarak kromozom 17 alfa satellite probunun bulunmadığı tek HER2/neu' ya karşı prop içeren kitlerde değerlendirmede iki farklı alandan toplam 40 hücrede HER2 sinyalleri sayılmaktadır. Hücre başına düşen ortalama sinyal sayısı 4' den büyük ise amplifikasyon var, 4 ve 4' ün altında sinyal var ise amplifikasyon yok kabul edilmektedir (50).

HER2 değerlendirmesi için yukarıda tanımlananlar dışında kullanılan diğer yöntemler şunlardır:

**3- Kromojenik in situ hibridizasyon (CISH),** HER2 genine komplementer işaretli proplar kullanılmak sureti ile gen kopya sayısını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. FISH' a benzer ancak bundan farklı olarak nonfloresan sinyaller elde edilir. Normal ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirme yapıldığı için morfolojik oryantasyon kolayca sağlanabilir. Preparatların kalıcı bir şekilde saklanabilmesi diğer avantajıdır. Dezavantajı ise FISH kadar duyarlı olmamasıdır.

**4- Southern Blot,** HER2 gen kopya sayısının ( DNA ) boyut ve yoğunluk olarak bir jel üzerinde değerlendirilmesidir.

**5- Northern Blot,** Southern Blot' a benzer ancak bunda HER2 m-RNA' sı ölçülür.

**6- ELISA,** taze doku, serum, vücut sıvılarındaki çözünebilir HER2 ölçülür (39).

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Olgu Seçimi**

Bu çalışmada 2004-2006 yılları arasında 50 adet invaziv meme karsinomlu hastaya ait Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anabilim Dalı arşivinden elde edilen parafin bloklar incelenmiştir. Bu bloklar modifiye radikal mastektomi (MRM) materyallerinin %10'luk formalin fiksasyonu ve rutin doku takibi sonucu hazırlanmış parafin bloklardır.

Çalışma grubunu oluşturan hastaların yaş ortalaması 57 'dir ( yaş aralığı : 26-82 ). Hastaların tamamında histolojik tip infiltratif duktal karsinomdur.

Arşivden elde edilen parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınıp Hemotoksilen&Eosin (H&E) ile boyanmıştır. H&E' li preparatların tümü modifiye Elston-Ellis dereceleme sistemine göre Grade I-II-III olarak derecelenmiştir (3).

Hastalar aksilla metastazı açısından ; negatif, 1-3 adet lenf nodülü metastazı ( low grade ) ve 4 ve üzerindeki lenf nodülü metastazı ( high grade ) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

#### **3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme**

Olguların tümüne DAKO poliklonal rabbit anti-human C-erbB-2 onkoprotein antikorunu uygulanmıştır. Bunun için doku bloklarından 4 mikron kalınlığında kesitler yapıp Surgipath marka double adhezivli lamlara alınmıştır.

Kesitlerde rutin deparafinizasyon işlemi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. Bir gece boyunca 37 derecelik etüvde ve sabah 1,5-2 saat 56 derecelik etüvde inkübasyon.

2. Üç kez altışar dakika ksilen banyosu.

3. Üç kez altışar dakika sırası ile 96, 80, 70 derecelik etil alkol banyosu.

4. Distile su banyosu.

Deparafinizasyon işlemi sonrası C-erbB-2 immünohistokimyasal boyama işlemi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. Antijenin yeniden kazanılması için antikorun uygulanacağı kesitlerin bir litrelik sitrat solüsyonu içinde düdüklü tencerede 1,5 dakika kaynatılması

2. 5 dakika distile suda bekletilerek rehidratasyon

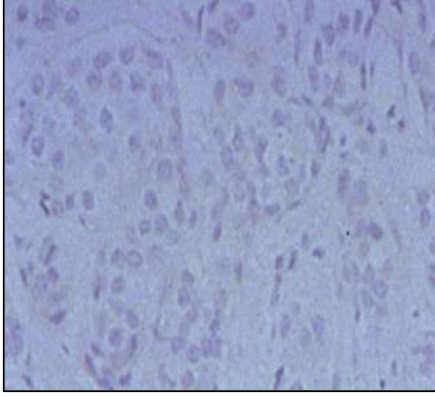
3. Dokunun kenarları kalem ile çizildikten sonra Phosphate buffered saline (PBS) ile 5 dakika yıkama
4. %3' lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübasyon ile endojen peroksit aktivitesinin ortadan kaldırılması
5. Distile su ile yıkama ve 5 dakika PBS banyosu
6. Primer antikor uygulanması; 1/300 dilüsyonda hazırlanan primer antikorda 20 dakika inkübasyon
7. PBS ile 5 dakika yıkama
8. Biotinlenmiş sekonder antikor ile 10 dakika inkübasyon
9. PBS ile 5 dakika yıkama
10. Streptavidin-Horseradish peroksidaz ile 10 dakika inkübasyon
11. PBS ile 5 dakika yıkama
12. Buffer substrat-Diaminobenzidin (DAB) kromojen ile 8 dakika süren inkübasyon
13. Distile su ile yıkama ve 5 dakika PBS banyosu
14. Zemin boyaması için hemotoksilende 5 dakika bekletme
15. Musluk suyu ile 5 dakika yıkama
16. Havada kurutma işleminden sonra ksilen banyosu ve balzam ile kapatma.

### İmmunhistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi

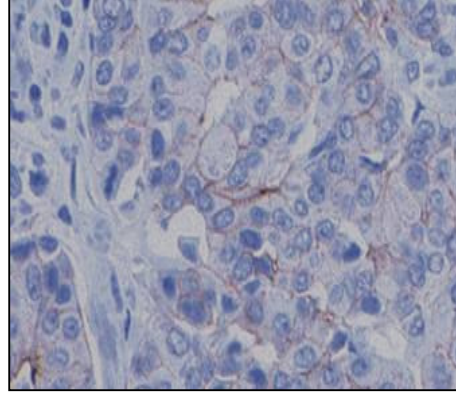
C-erbB-2 Antikoru Hercept Test™ için geliştirilmiş 4 aşamalı skora göre değerlendirilmiştir. İnvaziv karsinom alanlarındaki tümör hücreleri %10' luk membranöz boyanma ; boyanmanın komplet olup olmadığı, boyanma şiddeti baz alınarak 0, +1, +2, +3 olarak skorlanmıştır. Skor 0, +1 negatif , Skor +2 , +3 pozitif olarak değerlendirilmiştir. ( Tablo 3-1) ( Resim 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 )

Skor	C-erbB-2 Değerlendirmesi	Boyanma paterni
0	Negatif	Membran boyanması yok / %10'dan az membran boyanması
+1	Negatif	%10'dan fazla hafif/parsiyel membran boyanması
+2	<b>Pozitif</b>	%10'dan fazla komplet/hafif-orta şiddette membran boyanması
+3	<b>Pozitif</b>	%10'dan fazla komplet/kuvvetli membran boyanması

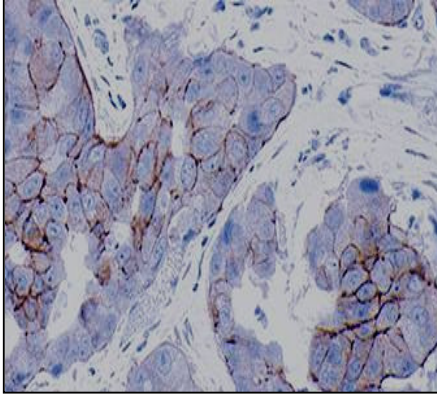
**Tablo 3.1:** Hercept test skora sistemi



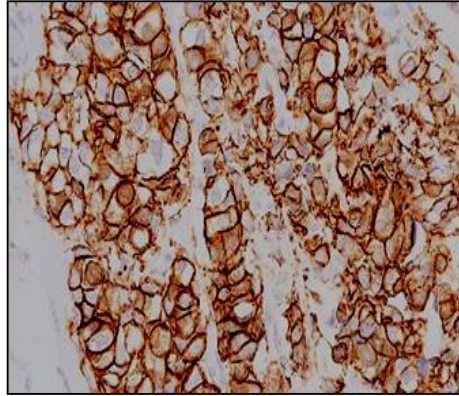
**Resim 3.1:** İnvaziv meme kanserinde Skor 0 HER2/neu boyanması



**Resim 3.2:** İnvaziv meme kanserinde Skor +1 HER2/neu boyanması



**Resim 3.3:** İnvaziv meme kanserinde Skor +2 HER2/neu boyanması



**Resim 3.4:** İnvaziv meme kanserinde Skor +3 HER2/neu boyanması

Parafin bloklar immünohistokimyasal olarak C-erbB-2 ; 0 ve +1 olarak değerlendirilenler bir grup, +2 ve +3 olarak değerlendirilenler birer grup olmak üzere 3 grup halinde FISH çalışılmak üzere İstanbul Alman Hastanesi ( Deutsches Krankenhaus Universal Hospitals Group ) 'ne gönderilmiştir. Alman Hastanesinin bize gönderdiği FISH çalışma metodu aşağıda belirtilmiştir.

### 3.3. Floresan İn Situ Hibridizasyon ( FISH ) Yöntemi

Bloklara öncelikle deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem immünohistokimya da uygulanan işlemin aynısıdır.

Hibridizasyon öncesi aşamalar aşağıdaki gibi yapılmıştır :

1. Distile suda 5 dakika yıkama
2. 0.2 M HCL içinde 25 dakika bekletme
3. Distile su içine batırılıp çıkarılarak durulama
4. 2X SSC / %0.05 Tween 20 içinde 5 dakika yıkama
5. 80 derecede 2X SSC içinde 20 dakika bekletme
6. Distile su içinde 1 dakika durulama
7. 2X SSC / % 0.05 Tween 20 içinde 5 dakika yıkama
8. İçinde 0.05 mg/ml Proteinaz K bulunduran TEN solüsyonu ile 15 dakika 37 derecede bekletme
9. 2X SSC / %0.05 Tween 20 içinde 5 dakika yıkama
10. % 4 Formaldehid bulunan PBS solüsyonunda 10 dakika bekletme
11. 2X SSC / % 0.05 Tween 20 içinde 5 dakika yıkama
12. 74 derecede denatürasyon solüsyonu içinde 5 dakika bekletme
13. 2X SSC / % 0.05 Tween 20 içinde 5 dakika yıkama
14. Sırası ile % 70, % 85 , % 100 etanollerde ikişer dakika bekletilerek dehidrate etme.

Hibridizasyon işlemi için Thermo Electron Corporation marka in situ hibridizasyon sistemi kullanılmıştır. Bunun için Q – BIOgene Chromosome 17p12 (HER2/NEU) /Alphasatellite 17 Coctail (dual colour)<sup>TM</sup> FISH probu kesit üzerine eklenmiştir. Bu aşamada 22X22 mm lamel kullanılarak kapatılan kesitler için 10 mikrolitre probe solüsyonu kullanılması yeterli olmuştur. Lamel kenarları plastik çimento ( rubber cement ) ile kapatıldıktan sonra kesitler in situ hibridizasyon sistemi içersine konmuştur. İn situ hibridizasyon sistemi içersinde sırasıyla 5-10 dakika 42 derecede kurutma , 90 derecede 10 dakika probe ve hedef DNA denatürasyonu ve son olarak 45 derecede gece boyu hibridizasyon için inkübasyon uygulanmıştır.

Hibridizasyon sonrası yıkamalar aşağıdaki gibi uygulanmıştır :

1. Plastik çimentonun kaldırılması için 42 derecede 2X SSC içinde 10 20 dakika bekletme ( Bu işlem sırasında doku kesitlerinin zarar görmemesi için

maksimum itina gösterilmelidir. Lamı solüsyon içine sokup çıkartarak çimentonun kendiliğinden erimesi ve lamelin kendiliğinden düşmesi beklenir )

2. 42 derecede 2X SSC / % 50 formamid yıkama solüsyonu içinde 10 dakika yıkama

3. 42 derecede 2 X SSC içinde 5 dakika yıkama

4. 2 X SSC / 0.03 mikrogram / ml DAPI ( 6 – diamidin 2 fenilindol dihidroklorid antifade solüsyon ) ile zemin boyaması

5. Antifade içeren gliserol ile lamelin kapatılması

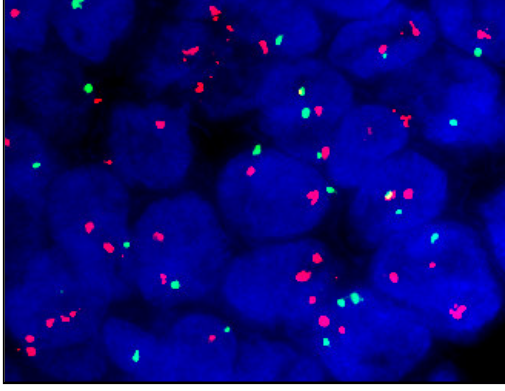
6. Lamel çevresine renksiz oje sürülerek lamelin sabit hale getirilmesi

### **FISH Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

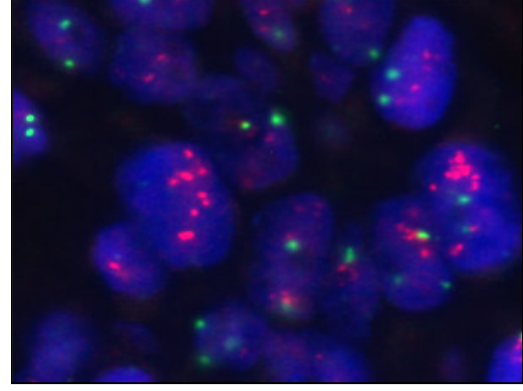
Zeiss Axiskop mikroskopta FITCH , Teksas Red , DAPI sinyalleri için sensitif uygun filtreler kullanılarak Zeiss KS 400 3.0 adlı program ile değerlendirme yapılmıştır. Her silindir yukarıda belirtilen filtreler kullanılarak HER2 , CEP17 ve DAPI açısından değerlendirilmiştir. Tümörü temsil eden alanlarda 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 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 ( HER2 sinyal / CEP17 sinyal > 10 ) sayılan 40 hücrenin %50 'undan fazlasında nukleus başına 4-10 sinyal veya belirgin kümeler var ise amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir. ( Resim 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 )

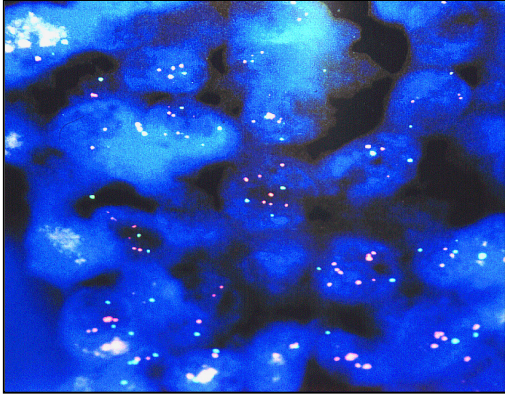
İkinci bir yöntem olarak da 40 adet hücrede HER2/neu ( kırmızı sinyal ) sinyalleri sayılarak sinyal sayısı tümör hücresi sayısına ( 40 hücre ) bölünerek her bir doku için bir tümör hücresi başına düşen HER2 sinyali sayısı belirlenmiştir ve bu oranın 4 'ün üzerinde olduğu dokularda amplifikasyonun olduğu kabul edilmiştir.



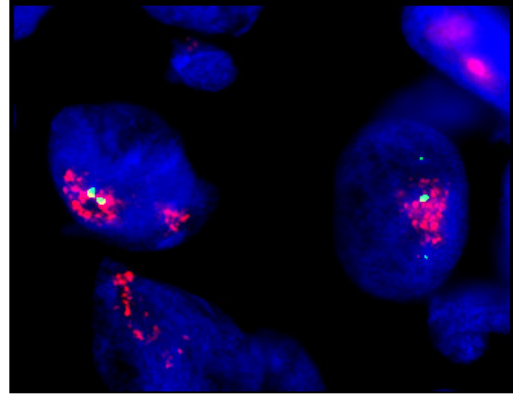
**Resim 3.5** :HER2/neu amplifikasyonu göstermeyen meme karsinomu



**Resim 3.6** : HER2/neu amplifikasyonu gösteren meme karsinomu



**Resim 3.7** : HER2/neu ile zayıf amplifikasyon gösteren meme karsinomu



**Resim 3.8** : HER2/neu ile yüksek düzeyde amplifikasyon gösteren meme karsinomu

### 3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 Windows Software Paketi kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin değerlendirilmesinde kıkare, t-testi , Kuruskal Wallis ve Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR

50 invaziv meme kanseri olgusunun yaşları 26-82 ( ortalama 57 ) arasında değişmektedir. Tanı konulduğunda hastaların 32' i (%64) postmenopozal, 18' i (%36) premenopozal durumda olduğu tespit edilmiştir. Ameliyat materyallerinin tamamı Modifiye radikal mastektomi (MRM) materyallerinden oluşmaktadır.

Çalışma grubumuzu oluşturan olgularda makroskopik tümör çapları en küçüğü 2 cm, en büyüğü 5 cm, ortalama 3,39 cm idi.

Çalışmamızda 14 (%28) olguda aksilla metastazı negatif, 13 (%26) olguda low grade ( 1-3 adet lenf nodülü metastazı ) metastaz ve 23 (%46) olguda high grade ( 4 ve üzeri lenf nodülü metastazı ) metastaz mevcut idi.

Çalışmaya alınan hastalar en az 22 ay, en fazla 46 ay klinik olarak takip edilmiştir. Ortalama takip süresi 34 aydır. Takip süresince 18 (%36) hastada uzak organ metastazı, 6 (%12) hastada nüks tespit edilmiştir. Takip periyodu boyunca 3 (%6) hasta ölmüştür (Tablo 4.1).

Takip süresi içerisinde uzak organ metastazı ve/veya nüks bulunduran hastalar istatistik değerlendirme amacıyla kötü , diğerleri iyi prognostik grup olarak tanımlanmıştır.

Çalışma grubumuzdaki olguların 14 ' ü aksilla metastazı açısından negatif, 13' ünde low grade ( 1-3 adet lenf nodülü metastazı ) , 23' ünde high grade ( 4 ve üzeri lenf nodülü metastazı ) mevcuttur. Prognoz ve aksilla metastazı arasında istatistiki anlam mevcuttur (  $p < 0,05$  ). Aksilla metastazı bulunan olgular kötü prognoz göstermektedirler. İstatistiksel anlamlılığı oluşturan ise high grade metastaz bulunan gruptur ( Tablo 4.2 ).

Çalışma grubumuzdaki 50 olgunun 27' inde IHK' sal olarak ER pozitif, 24' ünde PR pozitif bulunmuştur. ER pozitifliği gösteren olguların 14' ü ( % 51.9 ), PR pozitifliği gösteren olguların 15' i ( % 62.5 ) iyi prognoz göstermektedirler. Bu oranlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.3 )

Çalışma grubumuzdaki olguların 15' inde Cerb-B2 0 ve +1, 17' inde +2, 18' inde +3 olarak değerlendirilmiştir. Prognoz ile Cerb-B2 arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.3 ).

NO	YAŞ	MENOPOZ	ÇAP (cm)	GRADE	AKSILLA METASTAZI	ER	PR	Cerb-B2	FISH	NÜKS	UZAK METASTAZ	EX
1	70	Post	3,5	III	Negatif	-	-	++	-	-	-	-
2	39	Pre	2,5	II	Negatif	+	+	+++	+	-	+	-
3	56	Post	3,5	II	Highgrade	+	-	++	-	+	+	-
4	50	Pre	3	III	Highgrade	-	-	++	-	-	-	-
5	43	Pre	3	II	Negatif	-	+	+++	+	-	-	-
6	77	Post	4	III	Lowgrade	+	-	++	-	-	+	-
7	70	Post	4	III	Lowgrade	-	-	++	-	-	-	-
8	72	Post	3,5	II	Highgrade	-	-	+++	+	-	-	-
9	61	Post	3,5	II	Highgrade	+	+	+++	+	-	-	-
10	42	Pre	4,5	II	Highgrade	-	-	+++	+	+	+	-
11	73	Post	4,2	II	Negatif	+	-	++	-	+	-	-
12	75	Post	4,5	II	Highgrade	+	-	++	+	-	-	-
13	46	Pre	2	III	Negatif	-	-	0-1+	+	-	-	-
14	43	Pre	2,5	II	Negatif	+	-	+++	+	-	-	-
15	78	Post	4	II	Negatif	+	+	++	-	-	-	-
16	63	Post	3,5	II	Lowgrade	+	-	0-1+	-	-	+	-
17	42	Pre	3	III	Highgrade	-	+	+++	-	-	-	-
18	61	Post	3	II	Highgrade	+	-	++	-	-	+	+
19	57	Post	3	II	Highgrade	+	+	0-1+	-	+	-	-
20	37	Pre	3,5	II	Lowgrade	+	+	+++	+	-	-	-
21	66	Post	4,3	II	Lowgrade	-	-	+++	+	-	-	-
22	42	Pre	2,8	II	Negatif	+	-	0-1+	-	-	-	-
23	82	Post	3	III	Highgrade	-	-	+++	+	-	-	-
24	58	Post	2,5	II	Highgrade	+	+	+++	-	-	-	+
25	64	Post	4,8	II	Negatif	-	-	++	+	-	-	-
26	56	Post	4,5	III	Highgrade	-	-	++	+	+	-	-
27	60	Post	2,5	II	Lowgrade	+	+	0-1+	-	-	-	-
28	65	Post	3	II	Negatif	+	+	0-1+	+	-	-	-
29	58	Post	2	II	Lowgrade	+	+	++	+	-	-	-
30	26	Pre	3	II	Negatif	+	+	++	-	-	-	-
31	35	Pre	4	III	Highgrade	-	+	+++	+	+	+	-
32	70	Post	4,1	II	Highgrade	-	-	0-1+	-	-	+	-
33	71	Post	4,5	II	Highgrade	+	-	+++	+	-	+	-
34	48	Pre	4,5	II	Highgrade	+	+	0-1+	-	-	+	-
35	61	Post	2,5	III	Negatif	+	+	0-1+	-	-	-	-
36	67	Post	5	II	Highgrade	+	+	++	+	-	+	-
37	39	Post	3,5	II	Highgrade	+	+	0-1+	-	-	+	-
38	37	Pre	2	II	Lowgrade	-	+	0-1+	-	-	-	-
39	53	Post	4	III	Highgrade	-	-	0-1+	+	-	+	-
40	67	Post	2	II	Lowgrade	+	+	+++	-	-	-	-
41	60	Post	3,5	II	Highgrade	-	-	0-1+	-	-	-	-
42	49	Post	2,5	II	Lowgrade	-	+	0-1+	-	-	-	-
43	42	Pre	3,5	III	Highgrade	-	-	0-1+	-	-	+	-
44	51	Post	3,7	III	Lowgrade	+	+	+++	+	-	-	-
45	43	Pre	2	II	Negatif	-	+	++	-	-	+	-
46	64	Post	4,5	II	Highgrade	+	+	+++	+	-	+	+
47	60	Post	4	III	Lowgrade	-	-	++	-	-	+	-
48	38	Pre	3,5	III	Highgrade	-	-	++	-	-	+	-
49	39	Pre	2,5	II	Negatif	+	+	+++	+	-	-	-
50	65	Pre	3,5	II	Lowgrade	-	-	+++	+	-	-	-

**Tablo 4.1:** Çalışma grubumuzdaki olgular.

PROGNOZ	MENOPOZ		ORTALAMA YAŞ	GRADE		AKSİLLER TUTULUM		
	PRE	POST		II	III	NEGATİF	LOW	HİGH
İYİ	11	17	56.39	20	8	11	10	7
KÖTÜ	7	15	55.09	15	7	3	3	16
TOPLAM	18	32	-	35	15	14	13	23

**Tablo 4.2:** Prognozun; menopoz, ortalama yaş, grade ve aksiller tutulum ile ilişkisi.

Çalışma grubumuzdaki olguların 27' inde ( % 54 ) FISH ile HER2/neu amplifikasyonu negatif, 23' ünde ( % 46 ) pozitif bulunmuştur. Prognoz ile FISH sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.3 ).

PROGNOZ	ÖSTROJEN RESEPTÖR		PROGESTERON RESEPTÖR		Cerb-B2			FISH	
	-	+	-	+	0-1	2	3	-	+
İYİ	14	14	13	15	8	8	12	13	15
KÖTÜ	9	13	13	9	7	9	6	14	8
TOPLAM	23	27	26	24	15	17	18	17	23

**Tablo 4.3:** Prognozun; östrojen, progesteron, Cerb-B2 ve FISH ile ilişkisi.

Çalışma grubumuzdaki olguların 32' i postmenopozal , 18' i premenopozal dönemdedir. Premenopozal dönemdeki olguların 9' unu ( % 50 ) Cerb-B2 +3 olarak değerlendirilen olgular oluşturmaktadır. Postmenopozal dönemdeki olguların 13' ünü ( % 40.6 ) Cerb-B2 +2 olarak değerlendirilen olgular oluşturmaktadır. Bu oranlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.4 ).

Menopozal durum ile FISH sonuçları karşılaştırıldığında; premenopozal dönemde FISH negatif ve pozitif olguların oranı eşit bulunmuştur ( % 50 ). Postmenopozal dönemdeki olguların 18' i ( % 56.3 ) FISH negatif, 14' ü ( % 43.7 ) FISH pozitif bulunmuştur. Bu oranlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.4 ).

Menopozal durum ile grade ilişkisi değerlendirildiğinde; premenopozal olguların 12' i ( % 66.7 ) Grade II, 6' ı ( % 33.3 ) Grade III, postmenopozal olguların 23' ü Grade II ( % 71.9 ) , 9' u ( % 28.1 ) Grade III olarak bulunmuştur. Bu oranlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.4 ).

MENOPOZ	Cerb-B2			FISH		GRADE	
	0-1	2	3	-	+	II	III
PRE	5	4	9	9	9	12	6
POST	10	13	9	14	18	23	9
TOPLAM	15	17	18	23	27	35	15

**Tablo 4.4:** Menopozun; Cerb-B2, FISH ve grade ile ilişkisi.

Grade ile ER karşılaştırıldığında; ER ile pozitif 27 olgunun 24' ü ( % 88.9 ) grade II, 3' ü ( % 11,1 ) grade III bulunmuştur. Bu oran istatistiki olarak anlamlı bulundu (  $p < 0.05$  ). ER pozitifliğinin düşük grade ile ilişkili olduğu tespit edildi. Grade ile Cerb-B2 ve FISH arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.5).

Grade ile PR karşılaştırıldığında; PR ile pozitif 24 olgunun 20' i ( % 83,3 ) grade II, 4' ü ( % 16,7 ) grade III bulunmuştur. Bu oranlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.5).

Grade ile aksilla metastazı arasında da anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.5).

GRADE	Cerb-B2			FISH		ÖSTROJEN RESEPTÖR		PROGESTERON RESEPTÖR		AKSİLLER TUTULUM		
	0-1	2	3	-	+	-	+	-	+	NEGATİF	LOW	HIGH
II	11	10	14	18	17	11	24	15	20	11	9	15
III	4	7	4	9	6	12	3	11	4	3	4	8
TOPLAM	15	17	18	27	23	23	27	26	24	14	13	23

**Tablo 4.5:** Grade' in Cerb-B2, FISH, östrojen, progesteron ve aksiller tutulum ile ilişkisi.

FISH ile IHK' sal Cerb-B2 sonuçlarının karşılaştırılmasında istatistiki olarak fark tespit edilmiştir (  $p < 0,05$  ). IHK' sal Cerb-B2 0 ve +1 olarak değerlendirilen 15 olgunun 12' inde ( % 80 ) FISH pozitif, 3' ünde ( % 20 ) FISH negatif bulunmuştur. IHK' sal Cerb-B2 +2 olarak değerlendirilen 17 olgunun 5' i ( % 29,4 ) FISH pozitif, 12' i ( % 70.6 ) FISH negatif bulunmuştur. IHK' sal Cerb-B2 +3 olarak değerlendirilen 18 olgunun 15' i ( % 83,3 ) FISH pozitif, 3' ü ( % 16,7 ) FISH negatif

bulunmuştur (Tablo 4.6 ). Ayrıca IHK' sal Cerb-B2 negatif ( 0 ve +1 ) , FISH pozitif olarak değerlendirilen 3 olgunun 1' inde kötü prognoz olarak değerlendirdiğimiz uzak metastaz tespit edilmiştir.

FISH ile hormon reseptörleri, aksilla metastazı ve prognoz arasında istatistiki anlam tespit edilmemiştir (Tablo 4.6 ).

FISH	Cerb-B2			MENOPOZ		ÖSTROJEN RESEPTÖR		PROGESTERON RESEPTÖR		AKSİLLER TUTULUM		
	0-1	2	3	PRE	POST	-	+	-	+	NEGATİF	LOW	HİGH
+	3	5	15	9	14	11	12	12	11	7	5	11
-	12	12	3	9	18	12	15	14	13	7	8	12
<b>TOPLAM</b>	15	17	18	18	32	23	27	26	24	14	13	23

**Tablo 4.6:** FISH in; Cerb-B2, menopoz, östrojen, progesteron ve aksiller tutulum ile ilişkisi.

Cerb-B2 in, prognoz, menopoz, FISH, grade ve aksiller tutulum ile ilişkileri ayrı olarak tablo 4.7 ' de özetlenmiştir. Cerb-B2 ile prognoz, menopoz, grade ve aksiller tutulum arasında ilişki bulunmamıştır. Cerb-B2 ile FISH karşılaştırıldığında tablo 4.6 'da bahsedildiği üzere anlam bulunmuştur (  $p < 0,05$  ).

Cerb-B2	PROGNOZ		MENOPOZ		FISH		GRADE		AKSİLLER TUTULUM		
	İYİ	KÖTÜ	PRE	POST	-	+	II	III	NEGATİF	LOW	HİGH
0-1	8	7	5	10	12	3	11	4	4	4	7
2	8	9	4	13	12	5	10	7	6	4	7
3	12	6	9	9	3	15	14	4	4	5	9
<b>TOPLAM</b>	28	22	18	32	27	23	5	15	14	13	23

**Tablo 4.7:** Cerb-B2 in; Prognoz, menopoz, FISH, grade, aksiller tutulum ile ilişkisi

Çalışma grubumuzdaki olgularda minimum tümör çapı 2 cm, maksimum tümör çapı 5 cm, ortalama tümör çapı 3,39 cm' dir. Aksilla metastazına göre

tümör çapı değerlendirildiğinde metastaz olmayan grup ile high grade metastazı olan grup arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı (  $p < 0,05$  ). Metastaz olmayan grupta ortalama tümör çapı 3,02 cm, low grade metastaz olan grupta 3,19 cm high grade metastaz olan grupta ise 3,74 cm bulundu. Bu bulgular eşliğinde çap arttıkça high grade aksilla metastazının arttığı sonucuna varıldı.

Prognoza göre tümör çapının değerlendirilmesinde iyi prognozlu grupta ortalama tümör çapı 3,12 cm kötü prognozlu grupta 3,74 cm idi. Bu iki grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı (  $p < 0,05$  ). Tümör çapı arttıkça kötü prognoz oranının arttığı sonucuna varıldı ( Tablo 4.8 ).

ÇAP ( ortalama cm)	AKSİLLER TUTULUM			PROGNOZ	
	NEGATİF	LOW	HIGH	İYİ	KÖTÜ
	3,02	3,19	<b>3,74</b>	3,12	<b>3,74</b>

**Tablo 4.8:** Aksilla metastazı ve prognoz ile tümör çapı ilişkisi.

FISH, Cerb-B2, grade ve ER reseptör pozitifliği açısından tümör çapı değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. PR reseptör pozitifliğine göre tümör çapı değerlendirildiğinde ise PR reseptörü negatif olgularda ortalama tümör çapı 3,68 cm pozitif olgularda 3,09 cm idi. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (  $p < 0,05$  ) Tümör çapının büyüklüğü ile PR reseptör pozitifliği arasında negatif yönde ilişki olduğu tespit edildi (Tablo 4.9 ).

ÇAP ( ort )	Cerb-B2			FISH		ER		PR		GRADE	
	0-1	2	3	-	+	-	+	-	+	II	III
	3,09	3,67	3,38	3,20	3,62	3,46	3,34	<b>3,68</b>	3,09	3,37	3,44

**Tablo 4.9:** Cerb-B2, FISH, ER, PR ve grade ile tümör çapı ilişkisi.

## 5. TARTIŞMA

HER2/neu geni hücre proliferasyonu ve gelişimi için gereklidir. HER2/neu reseptör overekspresyonu ve gen amplifikasyonu onkojenik transformasyon ve tümörögenezisde rol oynar. Genel olarak HER2/neu amplifikasyonunun ( normal genin artmış kopya sayısı ) HER2/neu protein overekspresyonuna ( hücre membranında artmış HER2/ neu reseptörleri ) eşlik ettiği kabul edilir. HER2/neu amplifikasyonu ve overekspresyonu meme kanserinde % 25-30 oranında görülür (2).

Meme kanserli hastalarda HER2/neu'nun prognostik ve prediktif önemi giderek önem kazanmaktadır. Yeni tanı almış meme kanserlerine uygulanan cerrahi ve radyoterapi gibi lokal tedavilerden hastalar % 80 oranında yarar görmekte-dirler. Kalan % 20' lik kesimde ise uzak organlara metastaz ile ortaya çıkan nerede ise % 100' e varan mortalite gözlenmektedir. Klinik olarak hastaların kemoterapi, hormon tedavisi ve transtuzumab (Herceptin®-monoklonal anti-HER2/neu antikoru) tedavisine vereceği yanıtın tahmin edilmesinde HER2/neu' nun belirlenmesi önemlidir (2, 41, 43 ).

Yapılan bir çok çalışmada meme kanserlerinde HER2/neu' nun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Slamon ve arkadaşlarının bu konu ile ilgili 1987 yılında yaptığı ilk çalışmada lenf nodülü metastazı olan hastalarda HER2/neu amplifikasyonunun kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (51). Aynı çalışma grubunun HER2/neu' nun prognostik önemini belirlemek için lenf nodülü metastazı olan ve lenf nodülü metastazı olmayan hastalarda değişik yöntem ve doku tipleri kullanarak yaptıkları ikinci bir çalışmada da lenf nodülü metastazı olan hastalar için benzer sonuçlar elde edilmiştir (52). Yapılan çok sayıda çalışma doğrultusunda artık lenf nodu metastazı olan hastalarda HER2/neu' nun bağımsız bir prognostik faktör olduğu kabul edilmektedir (53, 54).

Halen lenf nodülü metastazı olmayan hastalarda HER2/neu' nun prognostik önemi tartışmalıdır. Genellikle lenf nodülü negatif olgularda prognoz üzerine anlamlı etki bulunamamıştır (55, 56). Ancak literatürde aksilla negatif hastalarda HER2/neu' nun bağımsız prognostik faktör olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur (53, 57, 58). HER2/neu' nun aksilla negatif hastalarda tedavi sonuçları açısından bağımsız prediktif faktör olduğu ileri sürülmektedir. Takip süresi 39 ay olan, lenf nodülü pozitif ve negatif, 1056 hastadan oluşan, büyük prospektif bir

çalışmada lenf nodülü metastazı olan hastalar kadar lenf nodülü metastazı olmayan hastalarda da HER2/neu' nun kısa hastaliksız yaşam ile ilişkili olduğu belirtilmiş ve lenf nodülü durumuna bakmaksızın HER2neu' nun kötü prognozla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (55,56). Kakar ve arkadaşlarının aksilla metastazı açısından karışık olgulardan oluşan 117 olguluk bir seride yaptığı çalışmada HER2/neu overekspresyonu +3 olan tümörlerin kısa yaşam ile ilişkili olduğu belirtilmiş ancak FISH ile saptanan amplifikasyon ile yaşam arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Yapılan klinik çalışmalarda şiddetli HER2/neu overekspresyonu (+3) ve amplifikasyonu içeren hastaların herceptin® tedavisinden daha çok fayda gördükleri gözlemlenmiştir (44).

Bizim çalışmamızda da HER2/neu amplifikasyon ve overekspresyonunun aksilla pozitif olgularda prognoz üzerine anlamlı etkisi bulunmamıştır. Ancak aksilla metastazı ile prognoz arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Aksilla metastazının kötü prognoz göstergesi olduğu bulunmuştur. Özellikle de bu ilişki high grade olarak sınıflandırılan 4 ve üzeri lenf nodu metastazı olan hastalarda daha da kuvvetlidir. Prognoz üzerine etkili olabilecek hasta yaşı, menopozal durum, hormon reseptörü ve tümör derecesi gibi diğer klinikopatolojik parametreler de bu seride prognoz ile ilişkili bulunmadı. Bu durum hasta grubunun küçük olmasına bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir.

Bizim çalışmamızda tümör çapı ile prognoz arasında ilişki tespit edilmiş olup , tümör çapı arttıkça kötü prognoz gösteren olgu sayısı artmaktadır. Yine tümör çapı ile aksilla metastaz durumu arasında da anlamlı ilişki saptanmış olup, tümör çapı arttıkça high grade metastaz yapan olgu sayısında artma tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda tümör boyutu ile nodal metastaz insidansı ve prognoz arasında iyi bir korelasyon mevcuttur (3, 6, 25). Yapılan çalışmalarda tümör çapı ile FISH arasında ilişki saptanmamıştır (59, 60, 61). Bizim çalışmamızda da tümör çapı ile FISH arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Yine çalışmamızda tümör çapı ile tümör grade' i ve Cerb-B2 durumu arasında ilişki saptanmamıştır.

Yaptığımız çalışmada hormon reseptörleri ile tümör çapını karşılaştırdığımızda tümör çapı ve progesteron reseptör durumu arasında negatif yönde ilişki bulunurken östrojen reseptör durumu ile ilişki saptanmadı. Yapılan bir çalışmada ise hem östrojen hem progesteron reseptör pozitifliği ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (62). Başka bir çalışmada ise tümör çapı attıkça östrojen reseptör pozitiflik oranında azalma tespit edilmiştir (63).

Çalışma grubumuzda hormon reseptörleri ve prognoz arasında ilişki saptanmamış olup, östrojen reseptörü ile grade arasında istatistiksel ilişki bulunmuştur. Bizim sonuçlarımıza göre östrojen reseptörü ile pozitif bulunan olgular düşük grade ile ilişkilidir.

Yapılan çalışmalarda HER2/neu overekspresyonu ve amplifikasyonunun hasta yaşı ve menopozal durum ile ilişkisinin olmadığı belirtilmektedir (64, 65). Tümör derecesi ile HER2/neu durumu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda ilişkinin bulunmadığı (50, 66) ve bulunduğu (64) yönünde farklı sonuçlar bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada kötü diferansiye infiltratif duktal karsinomda orta yada iyi diferansiye tümörlere göre HER2/neu amplifikasyonu daha yüksek oranda tespit edilmiştir (61). Başka bir çalışmada modifiye Bloom Richardson' a göre gradelenen 176 vakada HER2/neu ekspresyonu ile grade arasında kuvvetli korelasyon saptanmıştır. Kötü diferansiye tümörde HER2/neu ekspresyonu iyi diferansiye tümörden daha yüksek oranda pozitif bulunmuştur. Yine aynı çalışmada HER2/neu ekspresyonunun yüksek nükleer grade ile korele iken stage ile korelasyon göstermediği tespit edilmiştir (69).

Bizim çalışmamızda tümör derecesi ile HER2/neu arasında ilişki tespit edilmedi. HER2 /neu ile östrojen reseptörü arasında ters bir etkileşim bulunduğunu ve HER2/neu overekspresyonunun antiöstrojen terapiye rezistanstan sorumlu olduğunu ileri süren çalışmalar vardır. Diğer birçok çalışmada ise bu iki parametrenin birbirinden bağımsız iki faktör olduğu, ancak HER2 /neu pozitif , ER negatif olguların kötü prognoz ile ilişkisi bulunduğu belirtilmektedir (67, 68).

Yapılan bir çalışmada östrojen ve progesteron pozitif tümör grubunda HER2 amplifikasyonu % 9,6 oranında tespit edilirken, negatif tümörlerde bu oran %31,2 olarak bulunmuş (69). Bizim çalışmamızda HER2/neu overekspresyonu ve amplifikasyonu ile hormon reseptörü, hasta yaşı ve tümör derecesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Amplifikasyon ile menopoz durumu arasında ise yine anlamlı ilişki saptanmadı.

HER2/neu durumunu değerlendirmek amacıyla ilk yapılan çalışmalarda Southern , Nouthern veya Western blot yöntemleri kullanılmıştır (51, 52, 57 ). Bu yöntemlerde çalışılan materyal tümör dokusu yanısıra normal dokuları da içerdiğinden sonuçlar sadece tümör dokusunu yansıtmamaktadır. Bu nedenle tümör dokusu ile materyalde bulunan non-tümöral dokuları birbirinden ayırabilen in-situ tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. IHK ve FISH parafin bloklarda tümör

hücreleri üzerinde in-situ çalışılabilmesi ve patoloji laboratuvarlarında kolay uygulanabilmesi nedeni ile en yaygın kullanılanlarıdır (40, 43, 49, 70). İmmünohistokimyanın hızlı ve FISH' e göre daha ucuz bir yöntem olması, rutin patoloji laboratuvarlarında kolayca kullanılabilmesi, ek bir donanıma ihtiyaç duyulmaması avantajlarıdır. Ancak işlemin , materyalin fiksasyon süresi ve türü, uygulanan antikorun spesifitesi ve sensitivitesi, antijen retrieval tekniklerindeki farklılıklar gibi bir çok faktörden etkilenmesi güvenli olmayan sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (71). İmmünohistokimya da %50' lere varan yanlış pozitif sonuçların olması FISH' in IHK'nın yerini almasına veya pozitif olarak değerlendirilen olguların FISH ile doğrulanması gereksiniminin doğmasına neden olmuştur. FISH için de suboptimal fiksasyon önemli olmakla birlikte DNA IHK' nın etkilendiği bir çok faktöre karşı daha stabildir. Buna karşın floresan mikroskop kullanma zorunluluğu olduğu için doku morfolojisini değerlendirme güçlüğü , pahalı, zaman alıcı olması ve tüm patoloji laboratuvarlarında uygulanamaması FISH' in dezavantajlarıdır. Ancak bir çok çalışmada FISH' in IHK' dan daha güvenilir olduğu bildirilmektedir (72, 73).

Sauer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IHK ve FISH pozitif olguların , yalnızca FISH pozitif olan olgularla aynı prognozu , IHK pozitif FISH negatif olguların ise FISH ve IHK negatif olgularla aynı prognozu gösterdikleri belirtilmiştir. Bu çalışmada prognoz açısından amplifikasyonun daha önemli olduğu sonucuna varılarak FISH' in ilk yöntem olması gerektiği vurgulanmıştır (73). FISH 'in ilk test olması gerektiğini belirten çalışmalar olmakla birlikte tüm laboratuvarlarda uygulanamaması ve pahalı olması nedeni ile bir çok çalışmada IHK' nın ilk yöntem olması , özellikle +2 olgularda FISH 'in ilave edilmesi gerekliliği belirtilmiştir ( 43, 49, 66, 74, 75).

Bizim çalışmamızda immünohistokimya ile 0 ve +1 olarak değerlendirilen olguların % 20' inde ( 3/15 ) FISH ile amplifikasyon gözlenirken, +2 olarak değerlendirilen olguların % 29' unda ( 5/17 ) , +3 olarak değerlendirilen olguların % 83,3' ünde ( 15/18 ) FISH ile amplifikasyon tespit edilmiştir. Literatürlerde elde edilen sonuçlarla paralel olarak bizim bulgularımız da +2 olgularda FISH ile gen amplifikasyonunun değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ancak literatürde pek çok çalışmada IHK ile 0 ve +1 olguların FISH yöntemi ile doğrulanmasına gerek olmadığı belirtilirken bizim çalışmamızda bu grupta 3 vaka FISH ile amplifikasyon göstermiştir. Bu nedenle 0 ve +1 olguların da FISH ile teyid

edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yapılan bir çalışmada İHK' sal olarak 0, +1, +2 ve +3 olarak skorlanan olgularda FISH pozitiflik oranları sırası ile % 3.5, % 6.4, % 25.7, % 81.5 olarak bulunmuş. Bu sonuçlara göre transtuzumab tedavisi göz önünde bulundurulduğunda; 0 ve +1 olguların da FISH ile teyid edilebileceği sonucuna varılmış. +3 olgularda tespit ettikleri amplifikasyon oranının % 81.5 olması, bu grup olgularda FISH yönteminin daha fazla bilgi sağlamadığını göstermiştir (61).

Yapılan başka bir çalışmada (79) immünohistokimyasal olarak 0 ve +1 olarak değerlendirilen ve FISH ile amplifikasyon tespit edilen 11 vakanın 10' u klinik olarak takip edildiğinde +1 olarak tespit edilen 10 vakanın 3' ünde metastaz geliştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle FISH yönteminin daha üstün prognostik faktör olduğu sonucuna varılmış. Bizim olgularımızdan İHK' sal olarak 0 ve +1 grubunda olup FISH ile amplifikasyon tespit edilen 3 vakanın 1' inde metastaz gelişmiştir. Bu sonuç da FISH' in daha iyi bir prognostik gösterge olduğunu ve bu grubun da FISH ile teyid edilmesi gerektiği sonucunu desteklemektedir.

Başka bir çalışmada da 0 ve +1 vakalarda % 12 oranında FISH ile amplifikasyon tespit edilmiştir. Bu olguların transtuzumab tedavisinden fayda görebileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada HER2 /neu durumunu belirlemede FISH yönteminin İHK'dan çok daha güvenilir metod olduğu ve daha doğru immünohistokimyasal sonuçlar için daha ileri kalite kontrol ölçümlere ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır ( 83, 84 ).

HER2/neu overekspresyonu çoğunlukla gen amplifikasyonuna bağlı olduğu için İHK ve FISH benzer sonuçlar vermektedir. Amplifikasyon ve overekspresyon arasında direkt korelasyon olduğunu gösteren bir çok çalışmada İHK ve FISH arasındaki uyum %76 ve %98 arasında değişen oranlarda bulunmuştur (43, 49, 64, 75).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada İHK ve FISH uyumu %95,4 olarak belirlenmiş ve uyumsuzluğa neden olan grubun +2 olarak değerlendirilenler olduğu bildirilmiştir (76).

Diğer çalışmalarda İHK'nın pozitif, FISH'in negatif bulunduğu durumlarda uyumsuzluğun büyük oranını +2 pozitif olgular oluşturmaktadır (42, 74, 75, 77).

Çalışmalarda +2 olgularda uyum %6-36 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir (41, 42, 50). Özellikle antijen retrieval işlemlerine bağlı olarak yanlış pozitif İHK sal sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. İHK da kullanılan antikorun

spesifitesi ile doğru orantılı olarak da yanlış pozitif sonuçlar olabilmektedir (66, 78). Bu konuyu değerlendirmek için 7 poliklonal ve 21 monoklonal olmak üzere 28 değişik antikör kullanılarak yapılan bir çalışmada IHK pozitifliği aynı seri içerisinde %2-30 oranında değişen oranlarda tespit edilmiştir. Bazı antikörler nonspesifik boyanmalar ile yanlış skorlamaya neden olabilmektedir (79).

Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada overekspresyonu belirlemek için 3 farklı antikör kullanılmış HER2/neu overekspresyon oranları %19-%36 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Buna göre amplifikasyon ve overekspresyon arasındaki uyum % 84-97 arasında değişmiştir (48).

Gen amplifikasyonu olmadan yüzey reseptör overekspresyonu olması transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel aktivasyonlar ile açıklanmaktadır. Bu durum tek kopya HER2/neu'nun m-RNA transkripsiyon düzeyinde overekspresyonu ve FISH ile belirlenebilecek seviyenin altında gen amplifikasyonu gibi durumlarda ortaya çıkabilmektedir. Kullanılan antikörün yüksek sensitivitesine bağlı yanlış pozitif sonuçlar ve değerlendirmeler arasında yorum farklılığı olması da bu durumu açıklayan diğer nedenler olarak ileri sürülmektedir (80, 81). Ayrıca bu durumun kromozom 17 polizomileri ile açıklanabileceği öne sürülmektedir. Yapılan bir çalışmada IHK pozitif olgulardaki polizomi insidansının %20' nin üzerinde olduğu belirlenmiştir (49). Başka bir çalışmada ise kromozom 17 polizomisi kuvvetli protein overekspresyonu (+3) gösteren olgularda daha büyük oranda bildirilmiştir ve özellikle +3 IHK pozitif , FISH negatif olma durumu kromozom 17 polizomisi ile açıklanmıştır (80).

IHK' nın negatif FISH' in pozitif olduğu durumlar literatürlerde %1-5,5 oranında bildirilmektedir (80-82). Bu nedenle bu grupta FISH yöntemine gereksinim olmadığı ileri sürülmektedir. Bizim olgularımız içerisinde bu duruma örnek olabilecek 3 (%20) olgu bulunmaktadır. Bu durumun kullanılan antikörlerin bağlanacakları hedef epitoplara doku takibi yada saklanması esnasında harab olmasına bağlı ortaya çıkabileceği belirtilmektedir. Ayrıca gende amplifikasyon bulunmasına karşılık translasyon ve daha sonraki aşamalarda hücre yüzeyinde tespit edilebilir uygun protein ürününün ortaya çıkmaması da negatif IHK ve pozitif FISH ile sonuçlanabilecek bir diğer durum olarak gösterilebilir. Bir çalışmada yüksek seviye amplifikasyonun her zaman protein overekspresyonuna eşlik ettiği , düşük seviye amplifikasyonun her zaman protein overekspresyonuna eşlik etmediği bildirilmiştir. HER2/neu genindeki rölatif artışın sebebi kromozom 17 de

sentromerik bölgede kayıp ve HER2/neu lokusu içeren 17q' nun bir bölümünün çoğalması olarak açıklanmaktadır (77).

Literatürde FISH ile İHK arasındaki uyumsuzluğun en önemli nedenini +2 olgular meydana getirmektedir. Bizim çalışmamızda İHK ile +2 olarak değerlendirilen 17 olgudan 5' inde amplifikasyon tespit edilmiştir ( %29 ). +2 olgularda İHK ile FISH arasındaki uyum literatürde %20-30 oranında bildirilmiştir. Bizim +2 olgularda bulduğumuz bu oran literatürle uyumlu olup bu gruptaki olguların FISH yöntemi ile teyid edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. +3 şiddetinde boyanma tespit edilen 18 olgunun 15' i amplifiye bulunmuştur ( %83,3 ). Üç olguda İHK sal olarak +3 olarak boyanmaya karşın amplifikasyon saptanmamıştır. Literatürlerde +3 olgularda FISH ile amplifikasyon %79-100 oranında bildirilmektedir ve bu grupta ortaya çıkan uyumsuzluğun nedeninin transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel aktivitelere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamızdaki +3 olgularda İHK ve FISH yöntemleri arasındaki uyumluluk literatürle uyumlu bulunmuştur. Buna göre +3 olguların FISH yöntemi ile teyid edilmesine gerek yoktur.

İmmünohistokimyasal olarak 0 ve +1 ile +2 olguların FISH ile teyid edilmesi gerektiği , +3 olgularda ise buna gereksinim olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yaygın olarak kullanılan İHK' sal yöntemin FISH metodu ile kontrol edilmesi ve her laboratuvarın kendi güvenilirlik oranlarını belirlemesi bir gerekliliktir.

## 6. SONUÇLAR

1. Prognoz ile HER-2/neu ekspresyonu , HER-2/neu amplifikasyonu , menopozal durum, yaş , grade ve hormon reseptör durumu arasında ilişki izlenmemiştir.

2. Aksilla metastazı ve prognoz arasında istatistiksel ilişki saptanmıştır (  $p < 0.05$  ) Aksilla metastazı bulunan olgular kötü prognoz göstermektedirler.

3. İmmünohistokimyasal olarak östrojen reseptör pozitifliği ile düşük grade arasında istatistiksel ilişki saptanmıştır (  $p < 0.05$  ). Östrojen reseptörü açısından pozitif olgular iyi prognoz göstermektedirler.

4. Tümör çapı ve aksilla metastazı arasında istatistiksel ilişki saptanmıştır (  $p < 0,05$  ). Çap arttıkça high grade aksilla metastazı oranı artmaktadır.

5. Tümör çapı ile prognoz arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır (  $p < 0,05$  ). Tümör çapı arttıkça kötü prognoz oranı artmıştır.

6. Tümör çapı ile Cerb-B2 , FISH , Grade ve Östrojen reseptör pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki mevcut değildir. Tümör çapı ile progesteron reseptör pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır (  $p < 0,05$  ). Tümör çapı büyüklüğü ile progesteron reseptör pozitifliği arasında negatif yönde ilişki mevcuttur.

7. İmmünohistokimya ile HER-2/neu ekspresyonu; olguların 15' inde ( %30 ) skor 0 ve +1 , 17' sinde ( %34 ) skor +2 ve 18' inde ( %36 ) skor +3 olarak değerlendirilmiştir.

8. FISH ile HER-2/neu amplifikasyonu % 46 olarak belirlenmiştir.

9. HER-2 /neu overekspresyonu ve amplifikasyonu ile hormon reseptörü, hasta yaşı, menopoz ve tümör derecesi arasında fark bulunamamıştır.

10. HER-2/neu ekspresyonu ve HER-2/neu amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır (  $p < 0,05$  ). İmmünohistokimya ile 0 ve +1 olarak değerlendirilen olguların % 20' si ( 3/15 ), +2 olarak değerlendirilen olguların % 29' u ( 5/17 ) ve +3 olarak değerlendirilen olguların % 83.3' ünde ( 15/18 ) FISH ile amplifikasyon tesbit edilmiştir. Özellikle +2 olgularda gen amplifikasyonunun FISH ile teyid edilmesi önemli iken bizim sonuçlarımıza göre 0 ve +1 olguların da FISH yöntemi ile teyid edilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

## 7. ÖZET

HER-2/neu (c-erbB2 ) , son yıllarda meme kanserlerinin prognozunun belirlenmesinde ve tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak ortaya çıkmıştır. HER-2/neu değerlendirilmesi için çeşitli yöntemler mevcut ise de ilk basamak yöntem olarak immunhistokimya ( IHK ) , altın standart olarak da floresan in situ hibridizasyon ( FISH ) en çok üzerinde durulan yöntemlerdir.

Bu çalışmada aksilla metastazı açısından karışık olan 50 meme kanseri olgusunda IHK ve FISH ile HER-2/neu araştırılmıştır.

50 meme kanserli olgunun parafin bloklarından Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D' da İmmunhistokimyasal çalışma yapıp, aynı olgularda İstanbul Alman Hastanesi'nde FISH yöntemi çalışılmıştır.

Olguların sırasıyla % 30 , % 34 ve % 36' sı IHK' sal olarak 0 ve +1, +2, +3 olarak değerlendirilmiştir. FISH ile olguların % 46 'ı amplifikasyon açısından pozitif bulunmuştur. IHK ile 0 ve +1 olarak değerlendirilen olguların % 20' sinde , +2 olarak değerlendirilen olguların % 29' unda ve +3 olarak değerlendirilen olguların %83.3' ünde amplifikasyon saptanmıştır.

IHK ile değerlendirmede, +2 olguların büyük kısmı ve +3 olarak değerlendirilen olguların bir bölümü gerçekte amplifikasyon olmaksızın pozitif olarak değerlendirilmektedir. 0 ve +1 olguların bir kısmında ise protein ekspresyonu olmaksızın amplifikasyon mevcuttur. Buna göre özellikle 0 ve +1 ile +2 olguların FISH yöntemi ile teyid edilmesi gereklidir.

**Anahtar Sözcükler:** Meme karsinomu, HER-2/neu, immunhistokimya, FISH, prognoz.

## 8. SUMMARY

HER-2/neu (c-erbB 2) is an important prognostic parameter in node positive breast carcinoma patients and it also helpful in the selection of therapeutic regimen. Although there are various methods for evaluation of HER2/neu , screening method is immunohistochemistry ( IHC ) and the gold standart is fluorescence in situ hybridization ( FISH ).

The aim of this study is to determine HER2/neu status by IHC and FISH at 50 tumors from axillary lymph node negative and positive breast carcinoma patients and to correlate the results with clinicopathological parameters.

We analysed HER2 /neu status of 50 invasive breast carcinomas by IHC and FISH.

Immunohistochemically ; % 30 , % 34 and % 36 cases were scored as 0 and +1 , +2 , +3 respectively. Amplification was obtained at % 46 of the cases. 3/15 ( % 20 ) IHC 0 and +1 tumors , 5/17 ( % 29 ) IHC +2 tumors and 15/18 ( % 83,3 ) +3 tumors was FISH positive. However 3 cases that were scored as +3 by IHC , were found to be negative by FISH. And 3 cases that were scored negative ( 0 and +1 ) by IHC, were found to be positive by FISH.

Our study showed that most of +2 cases and a small percentage of +3 cases are evaluated immunohistochemically positive without amplification. And some of the 0 and +1 cases are avaluated immunohistochemically negative but amplification positive. These cases must be confirmed by FISH in 0 and +1, +2 groups.

**Key words:** Breast carcinoma, HER2/neu, fluorescence in situ hybridization, prognosis.

## **9. KAYNAKLAR**

- 1.** Lester SC, Cotran RS, The Breast In: Cotran RS, Kumar V, Collins T ed. Pathologic Basis of Disease. 6<sup>th</sup> ed. WB Saunders Company: Philadelphia 1999; 1093-1119.
- 2.** Hanna W. Testing for HER2 status. Oncology. 2001; 61:22-30.
- 3.** Tavassoli FA. Normal development and anomalies. In: Tavassoli FA ed. Pathology of the Breast 1<sup>st</sup> ed. Appleton&Lange. 1992; 1-24.
- 4.** Silverberg SG, Masood S. The Breast. In: Silverberg SG, De Lellis RA, Frable W.J ed. Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology 3.ed.Churchill Livingston:New york.1997;575-673.
- 5.** Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins R, Dyson M. In: Gray's Anatomy. 8<sup>th</sup> ed. Great Britain. 1995: 4217-4240.
- 6.** Rosai J. Breast. In: Ackerman's Surgical Pathology. 8<sup>th</sup> ed. New York. 1996; 1565-1639.
- 7.** Monaghan P, Perusinghe NP, Cowen P, Gusterson BA. Peripubertal human breast development. Anat Rec. 1990; 226:501-508.
- 8.** Mccarty KS, Tucker JA, Breast. In: Sternberg SS ed. Histology for Pathologists. 1<sup>st</sup> ed. Raven Press. New York. 1992; 893-902.
- 9.** Viacava P, Naccarato AG. Bevilacqua G. Apocrine epithelium of the breast: does it result from metaplasia. Virchows Arch. 1997; 205-20.
- 10.** Longacre TA, Bartow SA. A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. Am J Surg Pathol. 1986; 10(6):382-393.
- 11.** Battersby S, Anderson TJ. Histological changes in the breast tissue that characterize recent pregnancy. Histopathol. 1989; 15:415-433.
- 12.** Guyton AC, Hall JE: Textbook of Medical Physiology. 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1996; 1044-46.
- 13.** Damjanov I, Linder J: Anderson's Pathology. 10. ed. St.Louis: Mosby 1996;2369-81.
- 14.** Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ : Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b NO MO). Cancer 1995;76(11):2266-2273.
- 15.** Clayton F, Hopkins CL : Pathologic correlates of prognosis in lymph node -positive breast carcinomas. Cancer 1993;71(5):1780-89.

16. 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* 1997;27(3):213-6.
17. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Disseases of the Breast*. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins 1999; 489-627
18. Rose DP, Royak- Schaler R: Tumor biology and prognosis in black breast cancer patients: a review. *Cancer Detect Prev* 2001;25(1): 16-31
19. Demark - Wahnefried W, Rimer BK, Winer EP : Weight gain in women diagnosed with breast cancer. *J Am Diet Assoc* 1997 May;97(5): 519-26
20. Kumar NB, Cantor A, Allen K, Cox CE : Android obesity at diagnosis and breast carcinoma survival: evaluation of the effects of anthropometric variables at diagnosis, including body composition and body fat distribution and weight gain during life span and survival from breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88 (12): 2751-7
21. Kumar NB, Lyman GH, Allen K, Cox CE, Schapira DV: Timing of weight gain and breast cancer risk. *Cancer* 1995;76 (2): 243-48
22. Lohrisch C, Jackson J, Jones A, Mates D, Olivotto IA : Relationship between tumor location and relapse in 6781 women with early invasive breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(15):2828-35
23. Romieu, I., Berlin,J.A., Coldits G.;Oral contraceptives and breast cancer. *Cancer*,1;2253-2263,1990.
24. Topuz, E.; Meme Kanseri,Birinci Baskı,İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, İstanbul,1997.
25. Egan RL: Multicentric Breast Carcinomas. *Cancer* 1982; 49: 1123-1130
26. Atıcı V, Tunalı C, Genç V, Kayaselçuk F, Tuncer İ Erkişi M, Burgut R: Meme kanserlerinde prognostik faktörler.Çukurova Üniversitesi Tıp Fakultesi Dergisi 1998;23(l):35-43
27. 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* 1995 Jan 1;75(1):65-71
28. Zhang T, Tu X, Xu W : A study of prognostic factors in breast cancer: histological grading. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1998 Dec; 27(6): 405-8.

- 29.** Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC, Habib FA: Lymph node micrometastases from breast carcinoma: *Cancer* 7;80: 1188-97
- 30.** Koral HS: Meme kanserlerinde histolojik grade ve elastozis ilişkisi. Uzmanlık Tezi Konya 1993.
- 31.** Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastrop S, Wischnic A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G: Cytokeratin positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, III breast cancer. *N Engl J Med* 2000 Feb 24;342(8):525-33
- 32.** Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kantenich CR, Rjosk D, Schindlbeck C, Dimpfl T, Sommer H, Braun S: Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. *Cancer* 2000 May 15;88(10):2252-9
- 33.** Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, Westin EH, Bandyopadhyay D, Kumar R, Masamura S, Santen RJ. Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology* 1998;139(10):4164-4174.
- 34.** Walker RA. Estrogen receptor and its potential role in breast cancer development. *J Pathol.* 1999; 188:229-230.
- 35.** Rosen PP. Biological markers of prognosis, In: Rosen PP ed. *Breast Pathology*. 1<sup>st</sup> ed. Lippincott - Raven Publishers New York. 1997; 295-321.
- 36.** Boumeester VK, Van Der Kwast TH, Van Putten WLJ, Claassen C, VanOoijen B, Henzen-Logman SC. Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to estrogen and progesterone receptors in female breast cancer. *Int J Cancer.* 1992; 52:581-584.
- 37.** Bryan RM, Mercer RC, Bennett RC, Rennie GC, Lie TH, Morgan FJ. Androgen receptors in breast cancer. *Cancer.* 1984; 54:2436-2440.
- 38.** Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T, Defrenne A, Lafontaine JS, Sertour J, Pujol H, Jeanteur P, Rochefort H. Cathepsin D assay in primary breast cancer and lymph nodes: Relationship with c-myc, c-erb B-2 and int-2 oncogene amplification and node invasiveness. *Eur J Cancer.* 1990; 26(4):437-441.
- 39.** Daniel F, Hayes and Ann D. Thor. C-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful markers. *Seminars in Oncology.* 2002; 29:231-245.

- 40.** Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puzstai L, Bloom KJ. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003. *The Oncologist*. 2003; 8:307-325.
- 41.** Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Human Pathol*. 2003;34(10):1043-1047.
- 42.** Perez E.A, Roche P.C, Jenkins R.B, Reynolds C.A, Hailing K.C, Ingle J.N, Wold L.E. HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc*. 2002; 77:148-154.
- 43.** Kakar S, Puangsuwan N, Stevens J, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML. HER-2/neu assesment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridizasyon: Comparison of results and correlation with survival. *Molecular Diagnosis*. 2000; 5(3):199-207.
- 44.** Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Liorca F, Rüschoff J, Tomasic G, Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Modern Pathol*. 2003;16(2): 173-182.
- 45.** Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Löhns U. HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol*. 2001; 19(2):354-363.
- 46.** Kobayashi M, Ooi A, Oda Y, Nakanishi I. Protein overexpression and gene amplication of c-erb B-2 in breast carcinomas study of immunochemistry and fluorescence in situ hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Human Pathol*. 2002; 33(1):21-28.
- 47.** Espinosa AB, Tabernore MD, Garcia-macias MC, Primo D, Bernal AG, Cruz JJ, Ramos M, Font de Mora J, Alonso AG, Orfao A. Her-2/neu gene amplification in familial vs sporadic breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:917-927.
- 48.** Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yshi Z. Determination of HER2 gene amplication by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2002; 15(6):657-665.

- 49.** Cianciulli AM, Botti C, Coletta AM, Buglioni S, Marzona R, Benevolo M, Cione A, Mottolese M. Contribution of fluorescence in situ hybridization to immunochemistry for the evaluation of HER-2 in breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2002; 133:66-71.
- 50.** Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol*. 2000; 13(8): 866-873.
- 51.** Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Lewin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235:177-182.
- 52.** Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Stuart SG, Udove J, Ulrich A, Press M. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244:707-712.
- 53.** Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1993; 11:1936-1942.
- 54.** Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli V, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, Della Porta G, Menard S, Pierotti MA, Testori A. Prognostic Significance of HER2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer*. 1991; 49:44.
- 55.** Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu expression in patients with axillary lymph node-negative breast carcinoma: a study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *Cancer*. 1995; 75:1320-1326.
- 56.** Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(3):312-319.
- 57.** Andrulish IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KPH, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D. Neu/erb B-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16:1340-1349.

- 58.** Peterson MC, Dietrich KD, Danyluck J, Paterson AH, Les AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA. Correlation between c-erb B2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.*1991;51:556-567.
- 59.** Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/ neu amplification in breast cancer.
- 60.** Ariga R, Zarif A, Korasick J, Reddy V, Siziopikou K, Gattuso P. Correlation of HER2/ neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. (*Cancer* 2001 )
- 61.** Raquel Prati, MD, Sophia K. Apple, MD, Jianbo He, MD, Jeffrey A. Gornbein, DrPH, and Helena R, Chang, MD, PhD. Histopathologic Characteristics Predicting HER-2/neu Amplification in Breast Cancer. (2005)
- 62.** Anim JT, John B, Abdulsathar S SA, Prasad A, Saji T, Akhtar N, Ali V, Al-Saleh M. Relationship between the expression of various markers and prognostic factors in breast cancer.
- 63.** Fatima S, Faridi N, Gill S. Breast cancer: steroid receptors and other prognostic indicators.
- 64.** Erdoğan S, Ergin M, Tuncer İ. Comparison of differential PCR and immunohistochemistry for the evaluation of c-erbB-2 in breast carcinoma and relationship to other prognostic factors. *Neoplasma.*2003;50(5):326-330.
- 65.** Gasparini G, Gullick WJ, Bevilacqua P, Sainsburg RC, Meli S, Borrachi P, Testolin A, La Malfa G, Pozza F. Human breast cancer. prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor. DNA ploidy and conventional pathologic features. *J Clin Oncol.*1992;10:686-695.
- 66.** Field AS, Chamberlain NL, Tran D, Morey AL. Suggestion for HER2/neu testing in breast carcinoma, based on a comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Pathology.*2001;33(8):278-282.
- 67.** Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.*1988;48:1238-1243.
- 68.** Collet K, Hatrveit F, Skjaerven R, Maehle BO. Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer: relation to age and lymph node status. *J Clin Pathol.*1996;49:920-925.

- 69.** Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. *Cancer* 1990;8:1794-800
- 70.** Zhang D, Salto-Telez M, Putti TC, Do E, Koay ES. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast. *Mod Pathol.*2003;16(1):79-85.
- 71.** Wisecarver JL. HER2/neu testing comes of age. *Am J Clin Pathol.*1999;111:299-301.
- 72.** Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon D, Assessment of methods for tissue based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer : a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2000 ;18 : 3651-3664.
- 73.** Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karsen R. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas:should in situ hybridization be the method of choice? *APMIS* . 2003; 111 : 444- 450.
- 74.** McCormick SR, Lilemoe TJ, Beneke J, Schrauth J, Reinartz J, Her2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization *Am J Clin Pathol.* 2002 ; 117: 935-943.
- 75.** Couturier J, Salomon AV, Nicolas A, Beuzebec P, Mouret E, Zafrani B, Garau XS. Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 ( HER-2/neu ) gene status in breast carcinoma . *Mod Pathol.*2000;13 (11):1238-1243.
- 76.** Zhang D, Salto-Telez M, Putti TC, Do E, Koay ESC. Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Human Pathol.*2003;34(4):362-368.
- 77.** Tsuda H, Akiyama F, Hasegawa T, Kurusumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G. Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. *Cancer* .001;92(12):2965-2974.
- 78.** Larsimont D, Leo AD, Rouas G, Paesmans M, Filho FF, Bernard C, Cardoso F, Verhest A, Piccart MJ, Gancberg D. HER-2/neu evaluation by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast cancer : implication for daily laboratory practice. *Anticancer Res.*2002;22:2485-2490.
- 79.** Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples : potential source of error in immunohistochemical

studies of oncogene expression. *Cancer Res.*1994;54(10):2771-2777.

**80.** Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing hercep test and pathvysion FISH assay. *Am J Clin Pathol.*2004;121:70-77.

**81.** Dowsett M, Barlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters Ad, Cooke T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE. Correlation between immunochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol.*2003;199:418-423.

**82.** Onody P, Bertrand F, Muzeau F, Bieche I, Lidereau R. Fluorescence in situ hybridization and immunochemical assays for HER-2/neu status determination. *Arch Pathol Lab Med.*2001;125:746-750.

**83.** Paik, S., Bryant, J., Tan-Chiu, E., Romond, E., Hiller, W., Park, K., et al. (2002). Real - world performance of HER2 testing - National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Journal of the National Cancer Institute*, 94,852-854.

**84.** Press, M.F., Sauter, G., Bernstein, L., Villalobos, I.E., Mirlacher, M., Zhou, J.Y., et al. (2005). Diagnostic evaluation of HER-2/neu as a molecular target: An assesment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clinical Cancer Research*, 11, 6598-6607.

## 10. TEŞEKKÜR

İhtisas sürem boyunca bilgi ve anlayışını esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Osman Yılmaz hocama ve diğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Salim Güngör, Sayın Prof. Dr.Lema Tavlı, Sayın Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk, tez hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice Toy ' a ve tezimi hazırlamamda yardım ve katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. H. Hasan Esen' e teşekkür ederim. Tüm asistan arkadaşlarıma ve klinik çalışanlarına da teşekkür ederim.

Klinik verilerin toplanmasında yardım ve anlayışından dolayı Uzm. Dr. Önder Eren' e, istatistik çalışmalarında katkılarından dolayı Prof. Dr. Said Bodur' a teşekkür ederim.

Spesmenlerin İstanbul Alman Hastanesinde çalışılmasını finanse eden Roche firmasına teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelmemde en büyük emeği olan anne ve babama ; yardım ve anlayışını benden esirgemeyen eşim Serkan Fındık' a teşekkürü borç bilirim.

Dr.Sıddıka FINDIK