

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

**MEMENİN İNVAZİV DUKTAL KARSİNOMUNDA  
TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE APOPTOZİSİN  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE WESTERN BLOT  
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Bilge AYDIN TÜRK**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Bengü ÇOBANOĞLU ŞİMŞEK**

**ELAZIĞ  
2010**

## DEKANLIK ONAYI

**Prof. Dr. İrfan ORHAN**

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

**Prof. Dr. İ. Hanifi ÖZERCAN**

**Patoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Doç. Dr. Bengü ÇOBANOĞLU ŞİMŞEK**

**Danışman**

**Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri**

..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_

*Aileme.....*

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. İ. Hanifi ÖZERCAN ve hiçbir zaman destek ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Bengü ÇOBANOĞLU ŞİMŞEK olmak üzere asistanlığımın tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran, her konuda destek olarak, yol gösteren Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine, birlikte çalıştığım tüm asistan ve uzman olmuş arkadaşlarıma, tüm laboratuvar ve büro çalışanlarına, ayrıca tezimin hazırlanmasında emeği geçen Veterinerlik Fakóltesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları öğretim üyesi Prof. Dr. Kazım ŐAHİN ve ekibi ile Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU ve ekibine teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini biran bile eksik etmeyen ve bana sabırlarını sunan sevgili annem, babam ve kardeşlerime, bu zorlu süreçte benden desteğini hiç esirgemeyen eşim Dr. Ali Ekber TÜRK'e ve bazen oyun zamanlarını çalışmalarıma ayırdığım biricik oğlum Melih TÜRK'e teşekkür ederim.

## ÖZET

Meme kanserleri kadınlarda en sık görülen kanserdir. İnvaziv duktal karsinom meme kanserlerinin en geniş grubunu oluşturur. Bu çalışmada invaziv duktal karsinomlarda telomeraz aktivitesi ve apoptozisin immunohistokimya ve western blot yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

2005 ve 2010 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda invaziv duktal karsinom tanısı alan 75 olgu ve frozen incelemesi yapılan 6 olgu çalışmaya dahil edildi. Elde edilen kesitler Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3 ile boyandı. Söz konusu antikörlerin boyanma özellikleri yanı sıra, yaş, tümör boyutu, derecesi, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve c-erbB2 durumları değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal çalışmalarda tümör derecesi arttıkça Bcl-2 pozitifliğinde azalma ve Bax pozitifliğinde artış bulundu. Bu durum, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, western blot yöntemiyle elde edilen bulgularda da Bcl-2'nin derece 1 tümörde en yüksek değerde olduğu saptandı. Bcl-2 ile östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü pozitifliği arasındaki ilişki, apoptozisde hormonal kontrolü düşündürecek şekilde, istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca derece arttıkça, hipoksik hücre ölümünde etkili olan BNIP3'ün azaldığı belirlendi. Benzer şekilde western blot yöntemi ile de BNIP3'ün derece 3 tümörde en düşük değere sahip olduğu saptandı. Tümör derecesi arttıkça, telomeraz aktivitesini düzenleyen ve hücre proliferasyonunun devamını sağlayan hTERT'in de arttığı tesbit edildi. Western blot yönteminde ise hTERT'in derece 1 tümörde, kontrole göre yaklaşık dört kat arttığı bulundu.

Tümörde oldukça yüksek olan hTERT, tanıya yardımcı bir kanser belirleyicisi olabilir. hTERT ve BNIP3, prognoz hakkında bilgi verebilecek değerli belirleyicilerdir. Her ikisinde de duktal karsinoma insitu alanlarının pozitif boyanmış olması, tümör gelişiminin ilk basamaklarında, telomeraz ve apoptozisin etkin olduğunu göstermektedir. Telomeraz artışı ve hipoksik hücre ölümünün durdurulmasına yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ile birlikte, tümör progresyonunun durdurulması konusunda önemli bir aşama kaydedilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Meme, karsinom, apoptozis, telomeraz.

## ABSTRACT

### ANALYSES OF TELOMERASE ACTIVITY AND APOPTOSIS IN INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF THE BREAST BY USING IMMUNOHISTOCHEMICAL AND WESTERN BLOT METHODS.

Invasive breast cancer is the most common carcinoma in women. Invasive ductal carcinoma comprises the largest group of invasive breast cancers. In this study, it is aimed to investigate telomerase activity and apoptosis by using immunohistochemical and western blot methods.

Seventy five cases which diagnosed as invasive ductal carcinoma and six cases which underwent frozen procedure in Pathology Department of Medical School of Firat University are included in our study. The acquired sections are stained with Bax, Bcl-2, hTERT and BNIP3. Age of patient, tumor size and grade, estrogen, progesteron and c-erbB2 status are evaluated as well as the staining characteristics of the antibodies in question.

A decrease of Bcl-2 positivity and an increase of Bax positivity were found with increasing tumor grade in immunohistochemical method. Although, these results were not statistically significant, the data obtained by western blot method showed that Bcl-2 was highest in grade 1 tumor. The relationship between the Bcl-2 and estrogen receptor positivity and progesteron receptor positivity was statistically significant, suggesting that there is hormonal control in the apoptosis. Also BNIP3 which effects hypoxic cell death, was found to be decreased with increasing tumor grade. Similarly, BNIP3 was found to have the lowest value in grade 3 tumors by western blot method. hTERT, which regulates telomerase activity and provide continuance of cell proliferation was found to be increased with increasing tumor grade. In western blot method, hTERT increased nearly four-fold compared to control.

hTERT, which has very high levels in tumor, may be a helpful cancer marker. Both hTERT and BNIP3 are important markers which can provide information about the prognosis. Positive staining in the DCIS areas with these markers shows that telomerase and apoptosis have an effect on the first stages of tumor development. There will be a big improvement in tumor progression control with the new treatment modalities that stop telomerase activity and hypoxic cell death.

**Key words:** Breast, carcinoma, apoptosis, telomerase.

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>İTHAF</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. MEMENİN NORMAL YAPISI VE GELİŞİMİ	3
1.1.1. EMBRİYOLOJİ	3
1.1.2. ANATOMİ	3
1.1.3. HİSTOLOJİ	4
1.2. MEME TÜMÖRLERİ	5
1.2.1. Meme Tümörlerinde Histopatolojik Sınıflandırma	5
1.3. MEME KANSERLERİ	5
1.3.1. MEME KANSERLERİNDE İNSİDANS VE EPİDEMİYOLOJİ	5
1.3.2. RİSK FAKTÖRLERİ	5
1.3.3. GENETİK YATKINLIK	7
1.3.4. MEME KANSERLERİNİN SINIFLANDIRILMASI	8
1.3.4.1. İnsitu Karsinomlar	9
1.3.4.1.1. Duktal Karsinoma İnsitu	9
1.3.4.1.2. Lobüler Karsinoma İnsitu	11
1.3.4.2. İnvaziv (İnfiltratif) Karsinomlar	13
1.3.4.2.1. İnvaziv Lobüler Karsinom	13
1.3.4.2.2. Tübüler Karsinom	14
1.3.4.2.3. İnvaziv Kribriiform Karsinom	14
1.3.4.2.4. Medüller Karsinom	14
1.3.4.2.5. Müsinöz Karsinom	15

1.3.4.2.6. İnvaziv Papiller Karsinom	16
1.3.4.2.7. Metaplastik Karsinom	16
1.3.5. İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM (SPESİFİK OLMAYAN TİP)	16
1.3.5.1. Klinik Bulgular	16
1.3.5.2. Lokalizasyon	16
1.3.5.3. Tümörün Tesbiti	17
1.3.5.4. Bilateralite	17
1.3.5.5. Multisentrisite	17
1.3.5.6. Morfolojik Prognostik Belirleyiciler	18
1.3.5.6.1. Aksiller Lenf Düğümü Durumu	18
1.3.5.6.2. Histolojik Tip	18
1.3.5.6.3 Makroskopik Patoloji	18
1.3.5.6.4. Tümör Boyutu	19
1.3.5.7. Mikroskopik Histopatolojik Prognostik Faktörler	20
1.3.5.7.1. Derecelendirme	20
1.3.5.7.2. Histolojik Derece	21
1.3.5.7.3. İnce İğne Biyopsi Materyalinin Histolojik Derecelendirilmesi	22
1.3.5.7.4. Derece ve Prognoz	23
1.3.5.7.5. Tümör Hücre Proliferasyonu	23
1.3.5.7.6. Nekroz	23
1.3.5.7.7. İnflamatuar Hücre İnfiltrasyonu	24
1.3.5.7.8. Lenfatik Tümör Embolisi	24
1.3.5.7.9. Kan Damarı İnvazyonu	25
1.3.5.7.10. Anjiogenezis	25
1.3.5.7.11. Perinöral İnvazyon	26
1.3.5.7.12. Stromal Özellikler	26
1.3.5.7.13. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri	26
1.3.5.7.14. Human Epidermal Growth Factor Receptör 2/Neu (Her2/Neu, c-erbB2) Onkogeni	26
1.4. APOPTOZİS	27
1.4.1. MORFOLOJİ	29
1.4.2. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER	29

1.4.3. MEKANİZMALAR	30
1.4.4. APOPTOZİSTE P53'ÜN ROLÜ	31
1.5. BAX VE BCL-2	31
1.6. BNIP3	32
1.7. TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE hTERT	33
1.8. WESTERN BLOT	35
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>38</b>
2.1. İMMUNOHİSTOKİMYA	38
2.1.1. İMMUNREAKTİVİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ	38
2.2. WESTERN BLOT YÖNTEMİ	39
2.3. İSTATİSTİKSEL İNCELEME	41
<b>3. BULGULAR</b>	<b>42</b>
3.1. İMMUNOHİSTOKİMYA	42
3.2. WESTERN BLOT	58
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>61</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>70</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>77</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Meme tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü histolojik klasifikasyonu	<b>5</b>
<b>Tablo 2.</b> Van Nuys DKİS sınıflama sistemi	<b>10</b>
<b>Tablo 3.</b> Meme kanserinde TNM sınıflaması	<b>20</b>
<b>Tablo 4.</b> Meme kanserlerinde histolojik derecelendirme sistemi	<b>22</b>
<b>Tablo 5.</b> Hasta yaşı, tümörün çapı ve derecesi, ÖR, PR ve c-erbB2 durumuna göre olgu sayıları ve yüzdeleri	<b>43</b>
<b>Tablo 6.</b> Hasta yaşı, tümör çapı ve derecesine göre ÖR, PR ve c-erbB2'nin pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri	<b>43</b>
<b>Tablo 7.</b> Bax'ın olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri	<b>48</b>
<b>Tablo 8.</b> Bcl-2'nin olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri	<b>50</b>
<b>Tablo 9.</b> hTERT'in olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri	<b>53</b>
<b>Tablo 10.</b> BNIP3'ün olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri	<b>55</b>
<b>Tablo 11.</b> Boyanma özelliklerine göre olgu sayısı ve yüzdeleri	<b>57</b>
<b>Tablo 12.</b> Western blot çalışılan olguların özellikleri	<b>58</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Jeldeki proteinlerin destek membrana transferi	<b>37</b>
<b>Şekil 2.</b> Derece 1 Tümör Histolojik Görünümü (HE X 200)	<b>44</b>
<b>Şekil 3.</b> Derece 2 Tümör Histolojik Görünümü (HE X 100)	<b>45</b>
<b>Şekil 4.</b> Derece 3 Tümör Histolojik Görünümü (HE X 400)	<b>45</b>
<b>Şekil 5.</b> Derece 1 Tümörde Östrojen Pozitifliği (X 100)	<b>46</b>
<b>Şekil 6.</b> Derece 1 Tümör Progesteron Pozitifliği (X 200)	<b>46</b>
<b>Şekil 7.</b> Derece 3 Tümör c-erbB2 Pozitifliği (X 400)	<b>47</b>
<b>Şekil 8.</b> Derece 1 Tümör, Bax pozitifliği (X 1000)	<b>48</b>
<b>Şekil 9.</b> Derece 2 Tümör, Bax pozitifliği (X 1000)	<b>49</b>
<b>Şekil 10.</b> Derece 1 Tümör, Bcl-2 pozitifliği (X 1000)	<b>50</b>
<b>Şekil 11.</b> Derece 2 Tümör, Bcl-2 pozitifliği (X 400)	<b>51</b>
<b>Şekil 12.</b> Derece 3 Tümör, Bcl-2 pozitifliği (X 400)	<b>51</b>
<b>Şekil 13.</b> Derece 1 Tümör, hTERT pozitifliği (X 400)	<b>53</b>
<b>Şekil 14.</b> Derece 1 Tümör ve DKİS, hTERT pozitifliği (X 100)	<b>54</b>
<b>Şekil 15.</b> Derece 2 Tümör, hTERT pozitifliği (X 1000)	<b>54</b>
<b>Şekil 16.</b> Derece 2 tümör, BNIP3 pozitifliği (X 400)	<b>56</b>
<b>Şekil 17.</b> Derece 3 Tümör, BNIP3 pozitifliği (X 1000)	<b>56</b>
<b>Şekil 18.</b> Derece 1 Tümör, BNIP3 pozitifliği (X 200)	<b>57</b>
<b>Şekil 19.</b> Bax'a ait Western Blot örneği	<b>58</b>
<b>Şekil 20.</b> Bcl-2'ye ait Western Blot örneği	<b>59</b>
<b>Şekil 21.</b> BNIP3'e ait Western Blot örneği	<b>59</b>
<b>Şekil 22.</b> hTERT'e ait Western Blot örneği	<b>60</b>

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ALD</b>	: Aksiller lenf düğümü
<b>DKİS</b>	: Duktal karsinoma insitu
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ÖR</b>	: Östrojen reseptörü
<b>FİSH</b>	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>HER 2</b>	: Human epidermal growth factor receptör
<b>İDK</b>	: İnvaziv Duktal Karsinom
<b>İHK</b>	: İmmunohistokimya
<b>İLK</b>	: İnvaziv lobüler karsinom
<b>LKİS</b>	: Lobüler karsinoma insitu
<b>MAİ</b>	: Mitotik Aktivite İndeksi
<b>Mak</b>	: Monoklonal antikor
<b>PR</b>	: Progesteron reseptörü
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
<b>TDLU</b>	: Terminal Ductular Lobüler Unit
<b>hTERT</b>	: Telomeraz revers transkriptaz
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Growth Factor

## 1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kadınlardaki tüm kanserlerin % 22'sini oluşturur (1). Ayrıca meme kanserleri kadınlarda ölümün önde gelen sebeplerindendir. Bu nedenle meme kanserlerinde etyolojik ve prognostik çalışmalar önem taşımaktadır.

Somatik hücreler çoğaldığı zaman, her telomer kopyalanamaz ve telomer ilerleyici bir şekilde kısalır. Hücre bölünmesi sonucu ileri derecede kısalan telomerlerin hücre yaşlanma sürecinin sinyali olduğu düşünülür. Sürekli çoğalan germ hücrelerinde ve kök hücrelerinde telomer uzunluğu her bölünmeden sonra telomeraz enzimi ile tamir edilir. Telomeraz neoplastik hücrelerde de aktiftir ve tümör oluşumunda önemli bir adımdır (2, 3).

Telomeraz RNA bağımlı DNA polimerazdır, kromozomun uç kısmındaki telomerleri oluşturan tekrarlayan nükleotid sekanslarını (insanda TTAGGG) sentezler. Bu telomerler kromozomun uç kısmında bir başlık şeklindedir ve hücre bölünmesi sırasında kromozomal uçların yapışmasını önler. DNA polimeraz DNA'nın uç kısımlarını tam olarak kopyalayamaz ve genetik materyalde kayıplar oluşur. Bu da kromozomal dengesizlik ve hücre yaşlanma ile sonuçlanır. Telomeraz aktivitesi olmadan nükleer bölünmenin her döngüsünde telomerlerde kısalma olur ve hücre yaşlanma sürecini tetikleyen kritik bir boyuta ulaşır. Bundan dolayı telomeraz aktivitesi ökaryotik kromozomal uçlarda telomerleri sabit bir boyutta tutar. Böylece hücre yaşlanma sürecini kontrol eder ve bu yüzden de karsinogenezin kritik bir basamağı olabilir (4).

Tümör hücrelerinin apoptozisten kaçma mekanizmalarından biri de telomeraz aktivitesinin devam etmesidir. Telomeraz holoenziminin katalitik alt ünitesi olan hTERT'in (telomeraz revers transkriptaz) salınımı insan hücrelerinin sonsuz sayıda çoğalması ile ilgilidir. Telomeraz aktivasyonunun, immortalizasyonda ve tümöral hücrelerin kontrolsüz çoğalmasında rol oynayan önemli mekanizmalardan biri olduğu ve telomeraz aktivitesinin kanser tanısında belirleyici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Telomeraz enziminin aktivitesini düzenleyen genlerin keşfedilmesiyle kanser tedavisinde sürpriz gelişmelerin olması beklenmektedir (3, 5, 6). Yapılan çalışmalarda hTERT'in malign tümörlerde ve kanser hücre serilerinde normal dokulara göre daha yüksek olduğu, ayrıca meme

kanserlerinde hTERT salınımı ve telomeraz aktivitesi arasında güçlü bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir (4, 7).

Bax (proapoptotik) ve Bcl-2 (antiapoptotik) genleri apoptotik hücre ölümü yolunun son basamağını düzenler. Bcl-2 hücre proliferasyonu oluşturmadan programlanmış hücre ölümünü inhibe eden tek onkojendir. Her iki genin durumunun bilinmesi hücrenin apoptotik yeterliliği hakkında bilgi verir (8). Yapılan bir çalışmada meme kanserlerinde Bcl-2'nin sıklıkla salındığı ve lenf düğümü tutulumu olsun olmasın meme kanserlerinde daha iyi klinik gidiş ve prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (8).

BNIP3, Bcl-2 ailesinin bir üyesidir ve hipoksik durumlarda artış gösterir. Mitokondri membranına girer, reaktif oksijen ürünlerini tetikler ve membran depolarizasyonu sağlayarak membranda geçirgenliği artırır. Bu hızlı ve şiddetli mitokondrial disfonksiyona plazma membranında geçirgenlik artışı, yaygın sitoplazmik vakuolizasyon ve DNA bant kırıkları da eşlik eder. Bu da hücre ölümü ile sonuçlanır (6). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, normal meme dokuları ile karşılaştırıldığında duktal karsinoma insitu (DKİS) ve invaziv meme karsinomlarında neoplastik hücrelerin sitoplazma ve nükleuslarında BNIP3 anlamlı olarak yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bu da BNIP3'ün meme kanserinin neoplastik ilerleyişinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Nükleer BNIP3 salınımı DKİS'de artmış rekürrens ve kısa hastalısız yaşam süresi ile ilişkili, invaziv meme karsinomlarında daha az agresif fenotiple ilişkilidir. Bu da otofaji, hücre ölümü ve yaşam süresinde rolü olan BNIP3'ün asıl işlevinin insitu karsinomdan invaziv karsinoma geçiş sırasında olduğunu düşündürmektedir (6).

Bu çalışma invaziv duktal karsinomlarda (İDK) telomeraz aktivitesini belirlemek, telomeraz aktivitesindeki artışla tümör hücrelerinde apoptozisin azalıp azalmadığının belirlemek, apoptoziste rol alan BNIP3, Bax ve Bcl-2 gibi belirleyicilerin immunohistokimyasal ve moleküler olarak salınımını araştırmak ve bu belirleyicileri bazı patolojik prognostik faktörlerle karşılaştırmak amacıyla planlanmıştır.

## 1.1. MEMENİN NORMAL YAPISI VE GELİŞİMİ

### 1.1.1. EMBRİYOLOJİ

Süt çizgileri intrauterin hayatın 5. haftasında belirginleşir ve her iki yanda aksilladan inguinal bölgeye doğru uzanır. Fetus büyüdükçe pektoral bölgedeki küçük bir alan hariç süt çizgileri geriler. Gestasyonun 10-12. haftalarında pektoral bölgede epitelyal tomurcuklar belirginleşip 2. ve 3. trimesterde giderek büyür. Gebeliğin son birkaç haftasında fetal meme bezleri maternal ve plasental steroidlere duyarlıdır ve asiner yapılardaki epitelyal hücreler sekretuar aktivite gösterir. Doğumda hem kız hem erkek bebeklerde meme dokusunda palpe edilebilir bir büyüme mevcuttur. Yaşamın birinci ayında anne ve plasenta kaynaklı seks steroid hormonları ve prolaktin azalır, sekretuar aktivite sona erer, meme bezleri geriler ve inaktif hale gelir. Bu zamandan puberteye kadar meme, progresif alveoler diferansiyasyon olmaksızın bazı dallanmalar gösteren başlıca laktiferöz duktuslardan oluşur (9, 10).

### 1.1.2. ANATOMİ

Meme göğüs ön duvarında 2-6. kostalar arasında, sternumun yan kenarı ile ön ya da orta aksiller çizgi arasında bulunur. Meme bezinin önünde yüzeysel fasya, arkasında derin fasya bulunur. Meme derisinden derin fasyaya doğru uzanan ligamentlere "Cooper" ligamentleri denir. Bu ligamentler memeyi yerine tespit ederler. Kanserin gerek yayılma gerekse ilk belirtilerini ortaya koymada önem taşırlar. Memenin tam ortasında bulunan areola denilen koyu renkli bölgede meme başı bulunur. Her bir meme, meme başından geçen çapraz çizgilere göre üst dış kadran, alt dış kadran, üst iç kadran, alt iç kadran ve areola olmak üzere bölümlere ayrılarak değerlendirilir. Üst dış kadran daha geniştir ve bez yapıları en fazla burada bulunur.

**Arterleri ve venleri:** Meme dokusu zengin bir damar yapısına sahiptir. İnterkostal arter, internal ve lateral torasik arterlerden beslenir. Yüzeysel venler internal torasik ven, aksiller ven ve interkostal venlere dökülür. İnterkostal venler vertebral venöz sistemle bağlantılı olduğundan bu yol meme tümörlerinin kemiklere ve sinir sistemine metastaz yapmasına yardımcı olur.

**Sinirleri:** 4-5. ve 6. interkostal sinirlerin kutanöz anterior ve lateral dalları ile innerve olur.

**Lenf yolları:** Meme lenfatik akımının % 75 - 97'si aksiller lenf düğümlerine, % 3–25'i internal mammaryan düğümlere, çok az bir kısmı ise kostovertebral ekleme yakın alandaki posterior interkostal lenf düğümlerine akar (11-13).

Lenf düğümlerine yayılım tipi tümörün memedeki lokalizasyonundan büyük ölçüde etkilenir. Dış kadranlardan gelişen tümörlerin yaklaşık % 50'si sadece aksiller lenf düğümlerine yayılırken % 15'inde hem aksiller hem internal mammaryan lenf düğümlerine yayılım vardır. İç kadranlarda ve memenin santralinde gelişen tümörler ise vakaların % 25'inde sadece aksillayı tutar. Buna ek olarak % 40 vakada aksiller tutulumla birlikte internal mammaryan lenfatikler de tutulmuştur. Supraklavikuler lenfatikler tutulum görülen üçüncü en sık yerdir (11).

Lenf yolları pektoralis minör kası ile olan ilişkilerine göre üç anatomik bölgede incelenir.

**Düzyey I (level I):** Pektoralis minör kasının lateral kenarının yanında, alt kenarının altında, aksiller ven boyunca uzanan lenf düğümleridir. Eksternal mammaryan, aksiller ven ve skapular lenf düğümleri gruplarını içerir.

**Düzyey II (level II):** Pektoralis minör kasının arkasında, medial ve lateral sınırları arasında uzanır. Santral bölge lenf düğümlerini içerir.

**Düzyey III (level III):** Pektoralis minör kasının medial sınırının medialinde ve süperiorunda sıralanır. Subklaviküler, intraklaviküler ve apikal lenf düğümlerini içerir (11-14).

### 1.1.3. HİSTOLOJİ

Meme dokusu, 12-20 ana duktus sisteminin dallanması ve bunların her birinin lobüllere ayrılmasından oluşan tubuloalveoler bez yapısındadır. Meme lobüller ve duktuslar olmak üzere iki kısımdan oluşur. Meme lobülü, her bir terminal duktusun küçük bir bölümü ve onun tomurcuklanması ile oluşan asinüslerden oluşur ve bu bölüm terminal duktal lobül ünitesi (TDLU) adını alır. Burası patolojik lezyonların çoğunluğunun geliştiği bölgedir. Asinüsler içte, lümene bakan tarafta, süt üretimini sağlayan, tek katlı, küboidal hücrelerle döşelidir. Dışta ise myofilament içeren kontraktil, yassılaştırmış myoepitelyal hücreler bulunur. Myoepitelyal hücreler laktasyon esnasında sütün boşalmasına yardımcı olurlar. En dışta ise bazal membran bulunur (9, 10, 15). Lobüller ve duktuslar arası boşluğu bağ ve yağ dokusu doldurmaktadır. Memede süt salgılayan bölüm olan lobüller, duktuslar ile meme

başına açılırlar. Lobüllerin birleşmesiyle loblar (matür memede 15-25 adet) oluşur. Meme başı çevresinde bulunan areola; dairesel görünümde pigmente bir alan olup, epitelinde küçük tüyler, yağ ve ter bezleri ile aksesuar meme bezleri bulunur. Ayrıca areola çevresinde çok sayıda sebace bez (Montgomery bezleri) bulunmaktadır. Bu bezler gebelikte daha belirgin olup meme başının yağlı olmasını sağlar (9, 10).

## **1.2. MEME TÜMÖRLERİ**

### **1.2.1. Meme Tümörlerinde Histopatolojik Sınıflandırma**

Meme tümörlerinin histolojik sınıflaması 1982 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılmıştır. 2003'te DSÖ yeni bir histolojik sınıflandırma yayınlamıştır ve bu sınıflandırma Tablo 1'de görülmektedir (1).

## **1.3. MEME KANSERLERİ**

### **1.3.1. MEME KANSERLERİNDE İNSİDANS VE EPİDEMİYOLOJİ**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. İnsidansı Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da en yüksek, güney Avrupa ve Latin Amerika'da orta, Asya ve Afrika ülkelerinde ise en düşüktür (1, 15). Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikincidir. Meme kanseri çocukluk dönemi hariç, herhangi bir yaş grubunda görülse de, bazı familial olgular dışında 25 yaşın altında nadiren ortaya çıkar. İnsidans, yaş ile birlikte artış gösterir (11). Mammografi gibi tarama yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla meme karsinomlarının teşhisi kolaylaşmıştır. Ayrıca bu vakaların çoğunda tümör 2 cm'den küçük veya insitu karakterdedir (15).

İnsanlarda meme kanserinin nedeni net olarak bilinmemektedir. Son yıllarda meme kanserinin tanı ve tedavisinde önemli aşamalar kaydedilmiş, kanser gelişme riski yüksek kadınları belirlemeye yönelik risk faktörleri, moleküler biyoloji ve genetik biliminin katkılarıyla belirlenmeye çalışılmıştır. En belirgin risk faktörleri cinsiyet (kadın) ve yaştır (50 yaş üstü) (16).

### **1.3.2. RİSK FAKTÖRLERİ**

**Coğrafik etki:** Asya ve diğer ülkelere kıyasla Birleşik Devletler ve Avrupa ülkelerinde meme kanseri görülme insidansı 4-7 kat daha fazladır. Birleşik Devletler'e göç edenlerde de meme kanseri görülme riskinin arttığı saptanmıştır (10, 11, 15).

**Tablo 1.** Meme tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü histolojik klasifikasyonu (1)

**I- EPİTELYAL TÜRÖRLER**

- a- İnvaziv duktal karsinom (İDK)  
Mikst tip karsinom  
Pleomorfik karsinom  
Osteoklastik dev hücreler içeren İDK  
Koryokarsinomatöz özellikler içeren İDK  
Melanotik özellikler içeren İDK
- b- İnvaziv Lobüler Karsinom
- c- Tubuler Karsinom
- d- İnvaziv Kribriform Karsinom
- e- Medüller Karsinom
- f- Musinöz Karsinom ve Bol Musin İçeren Diğer Tümörler  
Musinöz karsinom  
Kistadenokarsinom ve kolumnar hücreli musinöz karsinom  
Taşlı yüzük hücreli karsinom
- g- Nöroendokrin Tümörler  
Solid nöroendokrin karsinom  
Atipik karsinoid tümör  
Küçük hücreli karsinom  
Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
- h- İnvaziv Papiller karsinom
- i- İnvaziv Mikropapiller Karsinom
- j- Apokrin karsinom
- k- Metaplastik karsinom  
Pür epitelyal metaplastik karsinom  
Skvamöz hücreli karsinom  
Adenokarsinom ile beraber işi hücreli metaplazi  
Adenoskuamöz karsinom  
Mukoepidermoid karsinom  
Mikst epitelyal / mezenşimal metaplastik karsinom
- l- Lipidden zengin karsinom
- m- Sekretuar karsinom
- n- Onkositik karsinom
- o- Adenoid kistik karsinom
- p- Asinik hücreli karsinom
- q- Glikojenden zengin şeffaf hücreli karsinom
- r- Sebace karsinom
- s- İnflamatuar karsinom
- t- Lobüler neoplazi  
Lobüler karsinoma in situ
- u- Duktal karsinoma in situ
- v- Mikroinvaziv karsinom
- w- İntraduktal papiller karsinom  
Santral papillom  
Periferik papillom  
Atipik papillom  
İntraduktal papiller karsinom  
İntrakistik papiller karsinom
- x- Adenomlar  
Tubuler adenom  
Laktasyon adenomu  
Apokrin adenom  
Pleomorfik adenom  
Duktal adenom

**II - MEZENKİMAL TÜRÖRLER**

- a- Hemanjiyom
- b- Anjiyomatozis
- c- Hemanjiyoperisitom
- d- Psödoanjiyomatöz stromal hiperplazi
- e- Myofibroblastom
- f- Fibromatozis (agresif)
- g- İnflamatuar myofibroblastik tümör
- h- Lipom  
Anjiyolipom
- i- Granüler hücreli tümör
- j- Nörofibrom
- k- Schwannom
- l- Anjiyosarkom
- m- Liposarkom
- n- Rabdomiyosarkom
- o- Osteosarkom
- p- Leiomyom
- q- Leiomyosarkom

**III - FİBROEPİTELYAL TÜRÖRLER**

- a- Fibroadenom
- b - Filloides tümör  
Benign  
Borderline  
Malign
- c - Periduktal stromal sarkom, düşük dereceli

**IV - MYOEPİTELYAL LEZYONLAR**

- a - Adenomyoepitelyoma
- b - Malign myoepitelyoma

**V - MEME BAŞI TÜRÖRLERİ**

- a - Meme başı adenomu
- b - Syringomatöz adenom
- c - Meme başı Paget hastalığı

**VI - MALİGN LENFOMA**

- a - Diffüz büyük B hücreli lenfoma
- b - Burkitt lenfoma
- c- Ekstradüğümal marjinal zon B hücreli lenfoma, MALT tip
- d - Folliküler lenfoma

**VII - METASTATİK TÜRÖRLER**

**VIII - ERKEK MEMESİ TÜRÖRLERİ**

- Karsinom  
İnvaziv  
İnsitu

**Aile öyküsü:** Birinci derece akrabasında meme karsinomu olanlarda, meme karsinomu gelişme riski 2-3 kat daha fazladır. Akraba, erken yaşta tümöre yakalanmışsa veya bilateral tümörü varsa bu risk daha yüksektir (11, 15). Ancak, kanserlerin çoğu aile öyküsü olmayan kadınlarda görülür, meme kanserli kadınların sadece % 13'ünde bir tane etkilenen birinci derece akraba ve sadece % 1'inde iki veya daha fazla akraba vardır (10).

**Yaş:** Meme kanseri 25 yaşın altında nadirdir. Bu yaştan sonra menapozla kadar devamlı artar ve daha sonraki dönemde bunu yavaş bir yükselme izler. Ortalama tanı yaşı 64'dür (10, 11).

**Menstrüal ve Reprodüktif Öykü:** Erken menarş ve geç menapozla (55 yaştan sonra) risk artar (11). On bir yaşından önce menarş olan kadınlar 14 yaşından sonra olanlara göre % 20 daha yüksek riske sahiptir (10). Ayrıca nulliparite ve ilk doğumun ileri yaşta olması da riski artırmaktadır (15).

**Proliferatif Meme Hastalığı:** Proliferatif meme hastalığı artan risk ile birlikte. Özellikle atipik hiperplazi önemli bir risk faktörüdür. Meme kanseri olmayan kadınlarda riski 5 kat artırır, ailesel öykü varlığında risk 11 kat artış gösterir (11).

**Eksojen Östrojen Alımı:** Postmenopozal hormon replasman tedavisi meme kanseri gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Bu risk östrojene maruz kalma süresi ile ilgilidir (11, 15). Östrojen ve progesteron birlikte riski tek başına östrojenden daha fazla artırır (10).

**Kontraseptif Ajanlar:** Bazı çalışmalarda kontraseptif ajanların meme karsinomu riskini artırmadığı, bazılarında ise az miktarda risk artışı olduğu gösterilmiştir (15).

**Radyasyon Maruziyeti:** Radyasyon DNA hasarına yol açarak karsinogenezin erken evrelerinde etkili olur. Radyasyona maruz kalma sonucu ortaya çıkan meme kanserlerinde 10-15 yıl gibi uzun bir latent süre vardır. Yaşın genç olması ve daha yüksek radyasyon varlığı meme kanseri riskini artırır (10, 11).

### 1.3.3. GENETİK YATKINLIK

Meme kanserine yatkınlığı artıran 6 gen ve gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar; meme kanseri geni (BRCA1, BRCA2), p53, Cowden, Androjen reseptör geni, Ataksi-Telenjiyektazi geni'dir (11).

**Meme Kanseri Geni (BRCA1, BRCA2):** BRCA1 ve BRCA2 ailesel meme kanserlerinin üçte ikisinden ve tüm vakaların % 5'inden sorumludur. BRCA1; kromozom 17q'da, BRCA2 ise kromozom 13q'da lokalizedir (15). BRCA ilişkili meme kansinimleri, BRCA ilişkisiz olanlara göre daha kötü diferansiye histolojik dereceye sahiptir, östrojen ve progesteron reseptör yokluğu, HER2/Neu negatifliği ve yüksek Ki-67 seviyesi yani yüksek proliferatif oran gösterir (13).

BRCA1'in bir tümör süpressör gen olduğu kabul edilir. Over, kolon ve prostat kansinomu gelişiminde de etkilidir. Bazı etnik gruplarda örneğin Askenazi Yahudi kadınlarında daha sık görüldüğü saptanmıştır (11). BRCA1 ilişkili kansinimlerin çoğu medüller kansinimdir, kötü diferansiye histolojik derece, yüksek mitotik oran, belirgin lenfositik infiltrat ve nekroz içerir (13, 15). BRCA1 taşıyıcılarının % 70'i ile BRCA2 taşıyıcılarının % 40'ının 1. ve 2. derece akrabalarında meme kansinomu aile öyküsü yoktur (13).

**Cowden Hastalığı Geni:** Üç germ yaprağından gelişen multipl hamartomlarla karakterize, otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur. İntestinal hamartomatöz polip, fasial trikilemmomlar, akral keratoz ve oral papillom görülür. Memede de fibrokistik değişiklikler ve meme kanseri ile karakterizedir. Bu hastalarda 50 yaş civarında meme kanseri insidansı % 30 - 50'dir (11).

**Androjen Reseptör Geni:** Xq11.2q12'de lokalizedir. Erkek meme kanseri risk faktörleri arasında yer alır. Bu vakaların bir bölümünde androjen sensitivitesi ya da yetmezliği vardır (11).

**Ataksi Telenjektazi Geni:** 11q23.1'de lokalizedir. Otozomal resesif bir multisistem bozukluğudur. İlerleyici nörolojik bozukluklar, özellikle malign lenfoproliferatif hastalıklar ve meme kanseri riskinde artmaya yol açan immünolojik problemlerle birliktelik gösterir (11).

#### **1.3.4. MEME KANSERLERİNİN SINIFLANDIRILMASI**

Hemen hemen tüm meme maligniteleri adenokarsinomdur. Diğer tipler ise tüm meme kanserlerinin % 5'inden daha azını oluşturur (10). Karsinimler, insitu kansinimler ve invaziv kansinimler olarak ayrılırlar. Karsinoma insitu; lobül ve duktuslarda bazal membranla sınırlı neoplastik hücre popülasyonunun bulunmasıdır. Bazı olgularda hücreler bazal membranı aşmaksızın deride geniş bir alana yayılır ve klinikte Paget hastalığı olarak saptanır. Karsinoma insitu lenfatiklere ve kan

damarlarına invazyon ve metastaz yapmaz. Karsinoma insitu ilk olarak etkilenen doku elemanlarının duktus ve lobüle benzerliği temeline dayanarak duktal ve lobüler olarak sınıflandırılmıştır (10).

İnvaziv karsinomlar bazal membranı aşarak stromayı invaze ederler. Tümör hücreleri kan damarlarını da invaze edebilir ve böylece bölgesel lenf düğümlerine ve uzak bölgelere ulaşırlar. En küçük invaziv meme karsinomları dahi metastaz yapma kapasitesine sahiptir (10).

### **1.3.4.1. İnsitu Karsinomlar**

#### **1.3.4.1.1. Duktal Karsinoma İnsitu**

Duktal karsinoma insitu olgularının sayısı son iki dekada hızla artış göstermiştir. Mammografik incelemelerden önce tüm karsinomların % 5'inden daha azını oluştururken, mammografik incelemelerin rutin uygulanması ile bu oran % 15-30'a ulaşmıştır. Sıklıkla mammografik kalsifikasyon olarak görülür. Daha az tipik olarak, DKİS'da mammografik dansite, belli belirsiz ele gelen kitle, meme başı akıntısı vardır veya bir başka lezyon için yapılan biyopsi sırasında tesadüfen bulunur (10).

Duktal karsinoma insitu, duktus ve lobüllerde bazal membranla sınırlandırılmış malign hücre popülasyonundan ibarettir. Sayıca azalmalarına karşın myoepitelyal hücreler korunur. DKİS klonal bir proliferasyondur ve genellikle yalnızca bir tek duktus sistemini içerir. Yine de, hücreler lobül veya duktusun tamamına baştanbaşa yayılır ve memenin bir bölümünü tutar. DKİS, lobülü tuttuğu zaman, sıklıkla asinüslerin yapıları bozulur, genişler ve küçük duktuslar görünümünü alır (10).

Duktal karsinoma insitunun beş yapısal alt tipi vardır. Komedokarsinom, solid, kribriform, papiller ve mikropapiller (10). Bu sayılan tipler dışında, nadir olarak nöroendokrin, apokrin, berrak hücreli, sekretuar, taşlı yüzük hücreli ve musinöz tip DKİS da görülebilir (17, 18). DKİS, uzun yıllar boyunca bu yapısal paternlere göre isimlendirilmiştir. Ancak DKİS, her zaman tek bir yapısal patern sergilememekte, genelde bir ya da birkaç patern aynı lezyon içinde görülebilmektedir. Bu da yapısal paterne göre sınıflamayı güçleştirmektedir. Bugün üzerinde herkesin anlaştığı bir dereceleme şeması mevcut değildir. Ancak

patologların yapısal özellikler yerine sitonükleer özellikleri dikkate alan sınıflama sistemlerini kullanmaları önerilmektedir (17).

Bu sınıflama sistemlerinden nükleer derece ve nekroz temel alınarak yapılan Van Nuys sınıflama sistemi, uygulanması kolay ve prognostik korelasyonu iyi olduğundan geniş kullanım alanı bulmuştur. Van Nuys DKİS sınıflama sisteminin özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir (17, 18).

**Tablo 2.** Van Nuys DKİS sınıflama sistemi (18)

<b>Parametre</b>	<b>Yüksek derece</b>	<b>Orta derece</b>	<b>Düşükderece</b>
Nükleer derece	İki eritrositten büyük nükleus, veziküler kromatin, belirgin nükleol	Düşük dereceli (1-1,5 eritrosit boyutunda, diffüz kromatin, belirsiz nükleol) ya da orta dereceli nükleus (1-2 eritrosit boyutunda, kaba kromatin, seyrek nükleol)	Düşük ya da orta derece nükleus
Nekroz	Komedonekroz (duktusları dolduran büyük, pleomorfik tümör hücreleri, ortada genis, bazen kalsifiye santral nekroz, mitoz sık)	Komedonekroz	Nekroz yok

Komedokarsinom, solid gruplar oluşturan pleomorfik görünümde, nükleer derecesi yüksek hücreler ve bu solid grupların ortasında nekroz ile karakterizedir. Nekrotik hücre membranları genellikle kalsifiedir ve mammografide gruplar veya çizgisel ve dallanmış mikrokalsifikasyonlar olarak izlenir. Periduktal konsantrik fibrozis ve kronik inflamasyon siktir ve yaygın lezyonlar bazen şüpheli nodüler bir alan gibi palpe edilir (10).

Nonkomedo DKİS, düşükten yükseğe farklı nükleer dereceli hücrelerin monomorfik popülasyonundan oluşur. Kribriform DKİS’da duktus lümenlerinin tümü veya büyük bir kısmı köprüleşen neoplastik epitel ile doludur ve mikrolümenler içerir. Solid DKİS’da tümör hücreleri tutulan duktusların lümenlerini tamamen doldurmuştur. Papiller DKİS, duktusların lümenine doğru büyür ve tipik olarak normal myoepitelyal hücre tabakası yoktur. Neoplastik hücreler fibrovasküler bir stromayı çevreleyerek papiller çıkıntılar oluşturur. Mikropapiller DKİS, duktus lümenine doğru fibrovasküler kor olmaksızın neoplastik epitle döşeli papiller çıkıntılar oluşturur ve sıklıkla kompleks intraduktal paternler izlenir. Kalsifikasyonlar merkezdeki lezyonla ilişkili olabilir, fakat genellikle intraluminal sekresyonlar içinde görülür. Mikroinvazyonlu DKİS, stromada tümör hücre odaklarının 0,1 cm’den daha az olması şeklinde tanımlanır. Mikroinvazyon genellikle komedokarsinomla ilişkili olarak görülür (10, 13).

Duktal karsinoma insitu olgularının büyük çoğunluğu palpasyon ve tutulan dokunun görsel olarak incelenmesi ile bulunamaz. Bazı komedokarsinom olgularında dokuyu kalınlaştıracak derecede periduktal fibrozis bulunur ve noktasal nekroz alanları makroskobik olarak görülebilir (10).

Duktal karsinoma insitunun doğal öyküsünü tanımlamak zordur, çünkü geçmişte, tüm kadınlar mastektomi ile tedavi edilmiştir ve bugünkü uygulamada cerrahi eksizyonu izleyen radyasyon büyük oranda tedavi edici yöntemdir. Meme koruyucu cerrahi DKİS’lu birçok kadın için uygundur fakat rekürrens riski biraz yüksektir. Tümörün derecesi, boyutu ve cerrahi sınırların durumu rekürrens için başlıca risk faktörleridir (10).

Tedavi edilen DKİS’li kadınlarda meme kanserinden ölümler, meme koruyucu cerrahi uygulandığı zaman bile çok enderdir (DKİS’li kadınların % 2’sinden az) (10).

#### **1.3.4.1.2. Lobüler Karsinoma İnsitu**

Lobüler neoplazi olarak da isimlendirilir. Yoğunluk oluşturabilecek kalsifikasyonlar veya stromal reaksiyonlar ile ilişkili olmadığı için hemen her zaman başka nedenlerle yapılan meme biyopsilerinde rastlantısal olarak ortaya çıkar (10, 15). Tüm meme kanserlerinin % 1 - 3,8’ini oluşturur. Yaş aralığı 15-90 arasındadır

ancak genellikle premenopozal dönemde görülür (1). Hastaların % 70'inde multisentrik ve % 30-40'ında ise bilateraldir (15).

Sıklıkla multisentrik ve bilateral olma özellikleri yanı sıra, bunu izleyen karsinomların her iki memede eşit sıklıkta görülmesi nedeniyle, lobüler karsinoma insitunun (LKİS) gerçek bir neoplazm olmadığı ancak meme kanseri riskini arttırdığı öne sürülmüştür. Buna karşın LKİS ve lobüler karsinomun hücreleri görünüşte benzerdir ve her ikisinde de epitelin hücre adezyonundan sorumlu transmembran protein olan e-kadherin salınımı yoktur. Salınımın kaybı tek tek ayrılmış hücreler olarak görülen lobüler karsinomun histolojik görünümü ile ilişkilidir. LKİS'in komşu alanlardaki invaziv karsinomla aynı genetik değişikliklere (e-kadherin için gen bölgesi olan 16q üzerindeki LOH gibi) sahip olması, bazı olgularda invaziv karsinomun gerçek prekürsörü olarak rol oynadığını desteklemektedir (10).

Atipik lobüler hiperplazi, LKİS ve invaziv lobüler karsinomun (İLK) anormal görünümlü hücreleri birbirine benzerdir ve biri diğerine tutunmayan, küçük nükleoluslu, yuvarlak-oval nükleuslu küçük hücrelerden oluşmuştur. Müsin içeren taşlı yüzük hücreleri genellikle bulunur. LKİS ender olarak köken aldığı yapıyı bozar ve tutulan asinüsler tanınabilen lobüller şeklinde kalır. LKİS hemen her zaman östrojen ve progesteron reseptör salınımı gösterir ve HER2/Neu aşırı salınımı görülmez (10).

Lobüler karsinoma insitulu kadınlarda tedavi edilmemiş DKİS'lu kadınlara benzer sıklıkta invaziv karsinom gelişir. Hastalar 20 yıldan daha uzun süre izlendiklerinde % 25-35'inde veya her yıl için hemen hemen % 1 oranında invaziv karsinom gelişmektedir. Eski çalışmalar, her iki memede eşit risk olduğunu göstermekteydi, fakat yeni yayımlar ipsilateral memenin lobüler neoplazili kadınlarda daha büyük risk taşıyabileceğini ileri sürmektedir. LKİS tanısından sonra invaziv karsinom gelişen kadınlarda, tüm karsinomlar ile karşılaştırıldığında lobüler tip üç kat daha fazla görülme eğilimindedir. Fakat büyük çoğunluğu spesifik lobüler morfoloji göstermez. Tedavi seçenekleri arasında bilateral proflaktik mastektomi, tamoksifen veya daha tipik olarak klinik yakın izlem ve mammografik tarama yer alır (10).

### **1.3.4.2. İnvaziv (İnfiltratif) Karsinomlar**

#### **1.3.4.2.1. İnvaziv Lobüler Karsinom**

Genellikle LKİS ile ilişkili olan, fibröz bir stroma içerisinde dağılmış veya tek sıralı (single file) dizilim gösteren hücrelerden oluşan bir tümördür. İnvaziv meme tümörlerinin % 5-15'ini oluşturur. Son 20 yıllık çalışmalarda 50 yaşın üzerindeki kadınlarda insidansın arttığı ve bunun da artmış hormon replasman tedavisine bağlı olabileceği saptanmıştır. Ortalama yaş invaziv duktal karsinoma göre 1-3 yaş daha büyüktür. Hastalar kitle bulgusu ile başvurur. İDK'ya göre İLK santralde biraz daha fazla görülür. Yine multisentrite ve karşı tarafta tümör varlığı invaziv lobüler karsinomda daha sıktır, mikrokalsifikasyon ise daha azdır. Makroskopik olarak düzensiz sınırlı kitle şeklindedir, İDK'dan biraz daha büyük olma eğilimindedir (1).

Mikroskopik olarak, fibröz doku içerisinde tek tek veya tek sıralı kordonlar şeklinde dağılmış küçük hücrelerden oluşur. Bu kordonlar normal duktusların çevrelerinde olabilir. Hücreler oval nükleuslu, dar sitoplazmalıdır. Nadiren sitoplazma içerisinde intrasitoplazmik lümen içerebilir. Mitoz nadirdir. Bu klasik görüntü ile birlikte solid, alveolar, pleomorfik ve tübüler lobüler karsinom paternleri de olabilir. Aksiller lenf düğümü metastazı invaziv lobüler karsinomda İDK'ya göre daha azdır (1).

İyi diferansiye ve orta derecede diferansiye İLK'lar genellikle diploiddir, hormon reseptörlerine sahiptir ve olguların büyük bir kısmı LKİS ile birlikte dir. HER2/neu aşırı salınımı çok enderdir. Buna karşın kötü diferansiye İLK'lar genellikle anöploiddir, sıklıkla hormon reseptörleri yoktur ve HER2/neu aşırı salınımı yapabilirler. Eğer aynı evre ve derece ile karşılaştırılırsa lobüler karsinom spesifik olmayan tipteki karsinomlar ile aynı prognoza sahiptir (10).

Birçok lobüler karsinomda beta-katenin ve e-kaderin içeren hücre adezyonundan sorumlu olan en az 8 gen grubunu taşıyan kromozom 16 (16q22.1) bölgesinin kaybı görülür. Diğer kromozomda e-kadherin geni; mutasyonlar, promoterin metilasyonu veya transkripsiyon faktörlerinin salınımının azalması ile inaktive olur. Bu değişiklikler LKİS'de de bulunur (10).

İnvaziv lobüler karsinomlar diğer meme karsinomları ile karşılaştırıldığında farklı metastaz paternine sahiptir. Metastazlar daha sık olarak periton, retroperiton,

leptomeninksler (karsinomatöz menenjitis), gastrointestinal sistem, overler ve uterusda ortaya çıkar. Bu karsinomlar akciğer ve plevraya daha az metastaz yaparlar (10).

#### **1.3.4.2.2. Tübüler Karsinom**

Saf tübüler karsinom invaziv meme karsinomlarının % 2'sini oluşturur. İDK'ya göre daha yaşlı hastalarda görülür, daha küçük olma eğilimindedir, lenf düğümü tutulumu daha azdır. Makroskopik olarak 1 cm'den küçüktür (1).

Mikroskopik olarak karakteristik özelliği açık tübül yapılarının olmasıdır. Bunlar tek sıralı epitelle döşelidir. Epitel hücreleri küçük, düzenlidir. Hafif nükleer pleomorfizm ve az miktarda mitoz içerir. Hücrel desmoplastik bir stroma mevcuttur (1).

Tüm tübüler karsinomların % 95'inden fazlası diploiddir ve hormon reseptörlerine sahiptirler. Tümör iyi diferansiyedir. Multipl invazyon odakları olmadıkça aksiller metastazlar olguların % 10'undan daha azında görülür. Bu alt tipin çok iyi prognoz göstermesi nedeniyle tanınması önemlidir (10).

#### **1.3.4.2.3. İnvaziv Kribriform Karsinom**

İnvaziv meme karsinomlarının % 0,8 - 3,5'ünü oluşturur. Ortalama yaş 53-58'dir. Tümör kribriform paternde invaziv adalar şeklindedir. Hücreler küçüktür, hafif-orta derecede pleomorfizm içerir. Mitoz nadirdir, çoğunda stroma belirgin reaktif görünümündedir. Prognoz oldukça iyidir. 10 yıllık sağ kalım % 90-100 arasındadır (1).

#### **1.3.4.2.4. Medüller Karsinom**

Tüm meme kanserlerinin % 1-7'sini oluşturur. Yaş aralığı 45-52 arasındadır. Makroskopik olarak düzgün sınırlı, yuvarlak, yumuşak kıvamlı, gri-ten renkli olup, sıklıkla nekroz ve kanama odakları içerir. Ortalama çapı 2-2,9 cm'dir (10).

Mikroskopik olarak 5 ana özelliği vardır (1, 10):

1. Sinsitsiyal yapı, tümörün % 75'inden fazlasında vardır. Tümör hücreleri 4-5 hücrelik gruplar, tabakalar halindedir.
1. Glandüler ve tübüler yapı bulunmaz.
2. Stromada belirgin lenfoplazmositer infiltrasyon vardır.

3. Karsinom hücreleri genellikle yuvarlak, bol sitoplazmalı, veziküler nükleusludur. Bir veya daha fazla nükleol içerebilir. Orta derecede veya belirgin nükleer pleomorfizm görülür. Atipik dev hücreler olabilir.
4. Tümör düzgün kenarlıdır, itici tarzda büyür.

İnvaziv duktal karsinoma göre daha iyi prognoza sahiptir. Çalışmalarda 10 yıllık yaşam oranı % 50-90 arasında değişmektedir (1). Buna rağmen yüksek nükleer derece, anöploid, hormon reseptörlerinin yokluğu ve yüksek proliferasyon hızı gibi hemen hemen her zaman kötü prognostik faktörler taşırlar. Bununla birlikte HER2/Neu aşırı salınımı gözlenmez. Lenf düğümü metastazı sık değildir ve ender olarak multipl lenf düğümleri tutulur. Sinsityal büyüme paterni ve itici tarzdaki kenarlar sınırlı metastatik potansiyele sahip adezyon moleküllerinin aşırı salınımını veya birikimini yansıtabilir (10).

BRCA1 geni taşıyan kadınlar arasında kanserlerin % 13'ünün bu tip olduğu bildirilmektedir. Buna karşın medüller karsinomların büyük bir kısmı (veya medüllere benzer karsinomlar) “germ line” BRCA1 mutasyonu ile ilişkili değildir. İlginç olarak “BRCA1 promoter”inin hipermetilasyonu medüller karsinomun % 67'sinde gözlenir ve bu durum altta yatan gen salınımı ile bu morfolojinin ilişkisi olduğunu düşündürmektedir (10).

#### **1.3.4.2.5. Müsinöz Karsinom**

Nadir görülen bu tip (tüm meme karsinomlarının % 1-6'sı) genellikle sınırlı bir kitle şeklinde ortaya çıkar. Yaşlı kadınlarda daha siktir ve uzun yıllar içindeki seyri sırasında çok yavaş büyüeyebilir. Tümör aşırı derecede yumuşak ve soluk, grimsi jelatinöz görünümündedir ve jelatin kıvamındadır. Tümör hücreleri çevre stromayı iten büyük müsin gölcükleri içinde küçük hücre adaları ve yığınları şeklinde görülür (10).

Müsinöz tümörler genellikle diploiddir ve çoğunluğu hormon reseptörlerine sahiptir. Genel olarak prognoz İDK'dan biraz daha iyidir. Müsinöz karsinomların insidansı BRCA1 mutasyonlu kadınlarda biraz daha yüksektir. Medüller karsinomdakine benzer olarak, BRCA1 promoter'in metilasyonu BRCA1 “germ line” mutasyonu ile ilişkili olmaksızın müsinöz karsinomların % 55'inde gözlenmiştir (10).

#### **1.3.4.2.6. İnvaziv Papiller Karsinom**

Papiller yapılı invaziv karsinomlar enderdir ve tüm invaziv kanserlerin çok azını veya % 1'ini oluştururlar. Papiller yapı genellikle DKİS'de görülür. Klinik özellikleri spesifik olmayan tipteki karsinomlara benzer, fakat genel olarak prognoz iyidir (10).

#### **1.3.4.2.7. Metaplastik Karsinom**

Metaplastik karsinom meme kanserlerinin ender tiplerinin geniş bir grubunu oluşturur (tüm olguların % 1'inden az), kondroid stroma ile konvansiyonel adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve sarkomdan zorlukla ayrılan, belirgin işsi hücreli komponenti bulunan karsinomu içerir. Bu karsinomların bazıları myoepitelyal hücreler ile ortak genleri salarlar ve büyük olasılıkla bu hücre tipinden gelişmektedirler. Tümör tiplerinin heterojenitesi ve ender olmaları nedeniyle prognoz ve klinik özelliklerle ilgili bilgiler azdır (10).

#### **1.3.5. İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM (SPESİFİK OLMAYAN TİP)**

Herhangi bir alt tip olarak sınıflandırılmayan karsinomlar yani İDK meme kanserlerinin % 70-80'ini oluşturur (1, 10). Bu nedenle de meme kanseri dendiğinde ilk akla gelen tiptir (15).

##### **1.3.5.1. Klinik Bulgular**

En sık görülen klinik bulgu memede ele gelen, ağrılı veya ağrısız kitle olmasıdır (1, 10). Kanser ele gelen bir kitle olduğu anda, hastaların yarısından çoğunda aksiller lenf düğümü metastazı vardır. Büyük tümörler göğüs duvarına fiske olabilir ve deride çökme oluşturabilir. Lenfatik drenajın engellenmesi lenfödem ve deride kalınlaşmaya neden olur ve buna “portakal kabuğu” görünümü denir. Tümör santralde yerleşmişse meme başında çekilme olabilir (10).

##### **1.3.5.2. Lokalizasyon**

Meme kanserleri en sık meme epitelindeki epitelial hücrelerin TDLU'sundan kaynaklanır. Sol memede sağa göre biraz daha sık görülür (yaklaşık olarak 1,07/1). Tümörlerin % 40-50'si üst dış kadranda yerleşir (1, 15). Azalan sıklıkla da santral, alt dış kadranda, üst iç kadranda ve alt iç kadranda görülür (10, 15). Tümörün lokalizasyon yerini saptamak son derece önemlidir. Çünkü tümör lokalizasyon yeri lenf düğümü metastazlarının ortaya çıkma şeklini önemli derecede etkilemektedir (11).

### **1.3.5.3. Tümörün Tesbiti**

Özellikle 35 yaşın üstünde, klinik olarak şüpheli vakalarda mammografi yapılmalıdır (1). Fizik muayene yapılsın veya yapılmıyın mammografi kullanılarak yapılan görüntüleme yöntemleri ile mortalitenin azaldığı görülmüştür. Görüntüleme yapılmayan kontrol vakaları ile karşılaştırıldığında yıllık meme muayenesi ve mammografi yapılan kadınlarda ölüm oranı % 30 daha azdır. Klinik olarak karşılaştırıldığında görüntüleme ile bulunan karsinomlar daha küçüktür, daha düşük dereceli olup, daha az lenf düğümü metastazı yapar (13).

Pozisyon Emisyon Tomografi (PET), 2-deoksi 2-floro D-glukoz (FDG) kullanılarak, glukoz metabolizması yoluyla meme karsinomunda önemli biyolojik prognostik yapıları gösterebilen noninvaziv diagnostik prosedürdür. Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha fazla glukozis gösterir ve immunohistokimyasal olarak daha fazla GLUT1 bulunur (bu glukoz birikimi sağlar). Çeşitli çalışmalarda meme karsinomlarını saptamada PET, benign ve malign ayırımını yapmada etkilidir, sensitivitesi % 68-94, spesifitesi % 84-97'dir. Preoperatif kemoterapiye yanıt PET ile değerlendirilir (13).

### **1.3.5.4. Bilateralite**

İnvaziv meme karsinomu olan bir hastada karşı tarafta karsinom gelişme riski normal populasyona göre 5 kat artar ve bu risk aile öyküsü olanlarda daha fazladır (15). BRCA1 gen mutasyonu olan kadınlarda özellikle diğer memede karsinom olma riski 50 yaşında % 50, 70 yaşında % 64'tür. BRCA2 mutasyonu taşıyıcıları arasında kontralateral karsinom gelişme riski 50 ve 70 yaş için sırasıyla % 37 ve % 52'dir. İpsilateral karsinom tanısı sırasındaki yaşın da etkisi vardır, 50 yaşından önce ipsilateral karsinom tanısı almışsa, kontralateral karsinom gelişme riski sonraki 10 yılda % 40'tır. Yapılan bir çalışmaya göre unilateral tümörü olanlarda pozitif aile öyküsü oranı % 28, bilateral karsinomu olanlarda % 40'dır ve bu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıktır. Kontralateral meme karsinomu riski ise ilk karsinom tanısı 50 yaşında veya daha sonra tanı konularına göre (% 10,1) 50 yaşından önce konularında oldukça yüksektir (% 41,6) (13).

### **1.3.5.5. Multisentrisite**

Multisentrisite duktal karsinomlardan çok lobüler karsinomlarda görülür. Teorik olarak multipl meme karsinomları intramammarial yayılımla olabileceği gibi,

birbirinden bağımsız da olabilir. Toplam çapları karşılaştırıldığında unifokal ve multifokal karsinomlarda lenf düğümü tutulum sıklığı benzerdir. Ancak yaşam süresi multisentrik tümörlerde unisentrik tümörlere göre daha düşüktür (15).

### **1.3.5.6. Morfolojik Prognostik Belirleyiciler**

#### **1.3.5.6.1. Aksiller Lenf Düğümü Durumu**

Aksiller lenf düğümü (ALD) metastazı, uzak metastaz görülmeyen meme kanserli hastalarda en önemli prognostik faktördür (1, 19). Metastatik ALD'nin sayısı önemlidir. Dört ve dördün üzeri lenf düğümü tutulumunda prognoz kötüdür (20). On yıllık hastalısız yaşam, lenf düğümü tutulumu olmayan hastalarda % 70-80, 1-3 lenf düğümü tutulumunda % 35-40, 10'dan fazla lenf düğümü tutulumunda % 10-15' tir (19).

#### **1.3.5.6.2. Histolojik Tip**

Meme kanserlerinde bazı histolojik tipler daha iyi prognoza sahiptir. Bunlar tübüler karsinom, invaziv kribriform karsinom, müsinöz karsinom, medüller karsinom, papiller karsinom ve adenoid kistik karsinomdur (1, 11, 15, 19, 21). Otuz yıllık sağkalım oranı bu tümörlerde % 60'ın üzerinde iken, invaziv duktal karsinomlarda % 20'nin altındadır (19).

#### **1.3.5.6.3 Makroskopik Patoloji**

İnvaziv duktal karsinomun makroskopik özellikleri spesifik değildir. Solid bir tümördür ve sınırları düzensizdir (1). Kesit yüzeyinin sertliği ve görüntüsü tümör yapısına göre değişir. Kistik değişiklikler bu grup lezyonlar için nadirdir ama nekrozun göstergesi olabilir. Dejenere alanlarda kanama eşlik edebilir. Kistik olmayan nekroz alanları yumuşak, tebeşir beyazı veya kanamalı olabilir. Yoğun skiröz veya fibrotik stroma içeren karsinomlar oldukça sert, gri-beyaz renktedir. Stromada belirgin elastoz varsa açık sarı renkte görülebilir. Tümör içerisindeki tebeşir beyazı çizgilenmeler nekroz, kalsifikasyon veya elastozisin göstergesidir. Daha az stroma, daha çok neoplastik hücre ve lenfosit içeren karsinomlar daha yumuşak ve ten renklidir. Hücreden zengin neoplazmların kesit yüzeyi hafif şişkin görülür (13). İDK'ların çoğunda makroskopik yapı yıldızsı, dairesel veya mikst kontürlü olabilir. Tümörlerin yaklaşık 1/3'i yuvarlak sınırlıdır. Az bir kısmında sınırlar belirsizdir. Makroskopik ve mammografik olarak dairesel görülen tümör mikroskopta invaziv patern gösterebilir. İnfiltratif tümörler tanı aldıklarında daha

büyük olabilir ve aksiller lenf düğümü metastazı dairesel olanlara göre daha fazladır. Yıldızsı yapıda ve içerisinde fokal nekroz içeren tümörler kötü prognozudur (13).

#### **1.3.5.6.4. Tümör Boyutu**

İnvaziv duktal karsinomda tümör boyutları oldukça değişkendir (10-100 mm) (1). Tümör boyutu olarak karsinomun en büyük çapı alınır ve prognostik olarak oldukça önemlidir. Çok sayıda çalışmada artan tümör boyutu ile yaşam süresinin azaldığı ve aksiller lenf düğümü metastazı sıklığının arttığı bulunmuştur (10, 11, 13, 22). Bu durum sadece primer tümör boyutu ile ilgili değil, TNM evrelemesi ile de ilgilidir. Örneğin T1 meme karsinomlarında (2cm ve daha küçük) tümör boyutu, lenf düğümü metastazı sıklığı ve prognoz arasında anlamlı ilişki vardır (13). Meme kanserinde TNM sınıflaması Tablo 3’de verilmiştir (1).

Tümörlerin çoğu asimetrik olduğu için genellikle en büyük çap olarak ifade edilir. Eksize edilen tümörün patologa sağlam olarak gönderilmesi gerekir. Böylece tümörün palpe edilerek en uzun eksenini boyunca kesilebilmesi mümkün olur. Ölçüm frozen için veya herhangi bir prosedür için örnek alınmadan önce yapılmalıdır. Frozen yapılırsa intraoperatif tanı sırasında makroskopik olarak ölçülen çap verilmeli ve kaydedilmelidir (13).

Makroskopik ölçüm; var olan invaziv tümör için yaklaşık bir değer olur. Hiperplastik veya reaktif değişiklikler gibi benign dokular da lezyona dahil edilebilir. Bazı tümörlerde kitlenin önemli bir kısmı invaziv duktal karsinomdur, bazılarında ise görülebilen büyük çapın çoğu intraduktal karsinom olabilir. Bu ayırım ancak histolojik kesitlerde yapılabilir. Bazı vakalarda invaziv komponent tümörün makroskopik boyutu ile aynıdır. Özellikle 2 cm’den küçük olan tümörlerde periferik invaziv elemanlar tümöre dâhil edilmelidir. İnvaziv karsinomun histolojik kesitinde arada serpilmiş, benign veya intraduktal karsinom alanları olsa da iki en uç nokta arası ölçülür (13).

Hastaların az bir kısmında klinik ve makroskopik olarak multifokal tümör aynı meme kadranında görülebilir veya bir kadran dışında multisentrik invaziv tümör olabilir. Klinik olarak varsa farklı odaklardan iğne biyopsisi alınabilir. Çok sayıda tümör varsa en büyüğünün çapının alınması önerilir (13).

**Tablo 3.** Meme kanserinde TNM Sınıflaması (1)

**T-Primer tümör**

TX: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör yok

Tis: İnsitu karsinom

Tis (DKIS)

Tis (LKIS)

Tis (Paget) Meme başının Paget hastalığı tümör eşlik etmiyorsa (Paget tümöre eşlik ediyorsa tümör boyutuna göre değerlendirilir)

T1: Tümör boyutu 2 cm veya daha küçük

T1mic: Mikroinvazyon 0.1 cm veya daha küçük

T1a: 0,1-0,5 cm

T1b: 0,5-1 cm

T1c: 1-2 cm

T2: 2-5 cm

T3: 5 cm den büyük

T4: Tümör hangi boyutta olursa olsun göğüs duvarı ya da meme derisine yayılım (pektoral kas tutulumu hariç)

T4a: Göğüs duvarına yayılım

T4b: Meme derisinde ülser, ödem, meme derisinde satellit lenf düğümleri

T4c: T4a+T4b

T4d: İnflamatuvar karsinom

**N-Bölgesel Lenf Düğümü (Patolojik)**

NX: Bölgesel lenf düğümü değerlendirilemiyor

N0: Lenf düğümü metastazı yok

N1: İpsilateral aksiller 1-3 adet lenf düğümünde tümör metastazı

N2: İpsilateral aksiller 4-9 adet lenf düğümünde tümör metastazı ya da internal mammaryan lenf düğümü metastazı

N2a: Aksiler lenf düğümünde fiks tümör metastazı

N2b: İpsilateral internal mammaryan lenf düğümünde tümör metastazı

N3: İpsilateral infraklavikuler lenf düğümü metastazı ve beraberinde 10'dan fazla aksiller ya da internal mammaryan lenf düğümü tutulumu

N3a: Sadece infraklavikuler lenf düğümüne metastaz

N3b: İnternal mammaryan lenf düğümü ve aksiller lenf düğümü metastazı

N3c: Supraklavikuler lenf düğümü metastazı

**M-Metastaz**

MX: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

**1.3.5.7. Mikroskopik Histopatolojik Prognostik Faktörler**

**1.3.5.7.1. Derecelendirme**

Duktal karsinomda derecelendirme ile diferansiyasyon değerlendirilir. Derecelendirme tümörün sadece invaziv kısmı ile sınırlıdır. Nükleer derecelendirme, tümör nükleuslarının normal meme duktus epitelinin nükleusları ile karşılaştırılarak yapılan sitolojik değerlendirmedir. Çünkü nükleer derece büyüme paterninden ayrıdır ve diğer meme karsinomları için de yapılır. En geniş değerlendirme Black, Speer,

Cutler ve arkadaşları tarafından yapılmış ve üç kategoriye ayrılmıştır. (İyi diferansiye - Derece I, orta derecede diferansiye - Derece II, az diferansiye - Derece III) (13).

#### **1.3.5.7.2. Histolojik Derece**

İnvaziv duktal karsinomlarda ve diğer invaziv tümörlerde derecelendirme tübül/gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısı temel alınarak yapılır (1). Yapılan çok sayıda çalışmada histolojik derece ile invaziv meme karsinomları arasında belirgin bir ilişki saptanmıştır (1). İlk olarak Bloom ve Richardson tarafından derecelendirme sistemi önerilmiştir (1, 15). Son olarak bu sistem Elston ve Ellis tarafından “Bloom Richardson Sisteminin Nottingham Modifikasyonu” şeklinde düzenlenmiştir (1, 15). Meme kanserleri histolojik derecelendirme sistemi Tablo 4’de verilmiştir (1).

**Tübül formasyonu:** Tümörün tüm alanları gözden geçirildikten sonra; eğer % 75’ten fazlasını belirgin lümen içeren tübül yapıları oluşturuyorsa; 1 puan verilir. Tümörde tübül yapıları daha az oranda olup bunun yanı sıra solid patern de izleniyorsa; 2 puan ile değerlendirilir. Tümörün büyük bir bölümünü yuvalar ve kordonlar şeklinde solid hücre gruplarının oluşturduğu, tübül yapılarının çok az oranda (% 10’dan az) izlendiği olgularda ise; 3 puan verilir (1, 13).

**Nükleer pleomorfizm:** Nükleer derecelendirme tümör nükleuslarının normal meme duktus epitelinin nükleusları ile karşılaştırılarak yapılan sitolojik değerlendirmedir. Çünkü nükleer derece büyüme paterninden ayrıdır ve diğer meme karsinomları için de yapılır (13). Burada nükleusların boyut ve şekilleri değerlendirilir. Nükleusları düzenli olan ancak şekil ve boyutta minimal değişiklik gösteren tümörlere; 1 puan, orta derecede nükleer değişiklik gösteren, ancak aşırı şekil ve büyüklük farklılığı taşımayan tümörlere ise; 2 puan verilir. Nükleuslarda belirgin şekil ve boyut farklılığı gösteren, çok büyük nükleusların izlendiği, nükleol belirginliği olan tümörler; 3 puan ile değerlendirilir (13).

**Mitoz sayısı:** Bazı yazarlar mitotik oranın Bloom Richardson derecelendirme sisteminin en önemli kriteri olduğunu ve derecelendirmenin mitotik orana, nekroz varlığına ya da yokluğuna göre yapılmasının Bloom Richardson derecelendirme metodundan daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Bazı yazarlar da mitotik aktiviteyi prognozun belirleyicisi kabul eder. Mitotik aktivite indeksi (MAİ) kısa

zamanda kolay değerlendirilebilir bir metoddur. MAİ'nin değerlendirilmesi 0,5x0,5 cm'lik bir alanda, tümörün periferinde, en hücresel kısımda, nekroz, inflamasyon, kalsifikasyon ve geniş damarların olmadığı yerlerde yapılır. 400'lük büyütmede invaziv tümöre ait ardışık 10 alanda mitoz sayılır. MAİ standart bir yöntem ile değerlendirilirse güvenilir ve tekrarlanabilir bir metoddur (13).

**Tablo 4.** Meme kanserlerinde histolojik derecelendirme sistemi (1)

Özellik	Skor		
<b>1. Tübül ve gland formasyonu*</b>			
Tümörün büyük kısmında (> % 75)	1		
Orta dereceli (% 10-75)	2		
Az veya yok (< % 10)	3		
<b>2. Nükleer pleomorfizm*</b>			
Küçük, düzgün, uniform hücreler	1		
Orta dereceli boyut ve pleomorfizm	2		
Belirgin pleomorfizm	3		
<b>3. Mitoz (mikroskop alanına göre) *</b>			
3 farklı mikroskopik alanda mitoz sayısının değerlendirilmesi			
Alan çapı (mm)	0,44	0,59	0,63
	(Nikon Labophot)	(Leitz Ortholux)	(Leitz Diaplan)
Alan büyüklüğü (mm <sup>2</sup> )	0,152	0,274	0,312
Mitoz sayısı (10BBA)**			
1 puan	0-5	0-9	0-11
2 puan	6-10	10-19	12-22
3 puan	>11	>20	>23

\*3 ayrı değer toplanıp 3-9 arasında skorlanır.

**Derece 1** – İyi derecede diferansiye (3-5 puan)

**Derece 2** – Orta derecede diferansiye (6-7 puan)

**Derece 3** – Az derecede diferansiye (8-9 puan) olarak gruplanır.

\*\*BBA: Büyük büyütme alanı

### 1.3.5.7.3. İnce İğne Biyopsi Materyalinin Histolojik Derecelendirilmesi

İnce iğne biyopsi materyalinde yapılan histolojik derecelendirme ile eksize edilen tümörde yapılan derecelendirmenin uyumuna bakılmış ve % 59-75 arasında bulunmuştur. Aynı vakalarda tümör tipi ile ilgili uyum % 66,6-81 arasında saptanmıştır. Bu bilgilere göre ince iğne biyopsisi ile yapılan sınıflandırma ve derecelendirme yardımcı olabilir. Ancak tümör heterojenitesi ve gözlemciler arası farklılıklar uyumsuzluğa yol açabilir (13).

#### **1.3.5.7.4. Derece ve Prognoz**

Histolojik derece prognostik bir faktördür ve kemoterapiye yanıtta oldukça önemlidir. Düşük dereceli hastalarda daha iyi sonuçlar bildirilmiştir. Yüksek dereceli veya kötü diferansiyonlu tümörü olan hastalarda aksiller lenf düğümü metastazı riski artmıştır. Nükleer ve histolojik derece özellikle aksiller lenf düğümü metastazı olmayanlarda prognoz için kullanışlı bir belirleyicidir. Tübül formasyonunun yokluğu kötü diferansiye nükleer sitoloji ile birlikte ise prognoz oldukça kötüdür (13).

Histolojik derece, klinik evreden bağımsız olarak, mastektomi yapılmış hastalarda sadece İDK'ya bağlı rekürrens ve ölüm sıklığını değil aynı zamanda hastalıksız ve tüm yaşam süresini de etkiler. Radikal mastektomi yapılmış derece 1 tümöre sahip olan hastaların çoğu yüksek dereceli tümörü olanlara göre daha uzun yaşam süresine sahiptir. Derecenin yüksek olması; artmış rekürrens riski, büyük tümör boyutu, erken tanı yaşı ve östrojen reseptör yokluğu ile ilişkilidir (13).

#### **1.3.5.7.5. Tümör Hücre Proliferasyonu**

Proliferasyon belirleyicileri, prognoz değerlendirilmesinde geniş yer tutar (1). Proliferasyon, flow sitometri, timidin bağlama indeksi, mitoz oranı ya da hücre siklusu sırasında açığa çıkan sellüler proteinlerin (örneğin siklinler, Ki-67 gibi) immunohistokimyasal olarak saptanması ile ölçülebilir. Yüksek proliferasyon oranlı tümörler kötü prognoza sahiptir (19).

#### **1.3.5.7.6. Nekroz**

İnvaziv bir kanserde, herhangi bir çapta birleşen nekroz olması 10 yıllık takiplerde, rekürrens zamanı ve tüm yaşam süresi için önemli bir faktördür. Bu etki özellikle ilk iki yılda görülür. 10 yıl boyunca hastalıksız olan vakalarda artık nekrozun bir anlamı yoktur (13).

Nadiren yaygın nekroz olabilir ve tümör hücreleri görülmeyebilir. Histolojik incelemede nekrozun çevresinde yüksek dereceli kötü diferansiye bir karsinom, bazen bunu sınırlayan lenfosit infiltrasyonu ve fokal duktal karsinoma insitu alanları görülebilir (13, 20). Yaygın nekroz içeren tümörlerde daha hızlı büyüme oranı vardır, belirgin anjiogenezis görülür (13).

### **1.3.5.7.7. İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu**

İnvaziv duktal karsinom içinde ve çevresindeki stromal infiltrasyon hücrelerinin prognostik önemi ciddi bir tartışma konusudur. Reaksiyon matür lenfositler, plazma hücreleri, histiyositler, nötrofiller ve mast hücrelerinden oluşur. Nadiren plazma hücreleri veya eozinofiller baskın olabilir. Plazma hücrelerinin baskın olduğu tümörler genellikle medüller karsinomlar veya medüller yapı içeren karsinomlardır. Belirgin lenfoplazmositik reaksiyon medüller karsinomda olduğu gibi İDK'ların da az bir kısmında görülebilir. Medüller karsinomun bir takım özelliklerini gösteren ama tam karşılamayan bazı olgular medüller yapı içeren infiltratif duktal karsinom olarak isimlendirilir ve İDK'ya göre daha iyi prognozludur. Belirgin lenfositik reaksiyon içeren nonmedüller duktal karsinomlar daha kötü prognozlu olma eğilimindedir ve daha düzgün sınırlıdır (infiltratif değil). Medüller karsinomlar ve belirgin lenfositik infiltrasyon içeren İDK'lar genellikle östrojen-progesteron reseptörü için negatiftir (13).

Bununla birlikte medüller karsinomun prognozunun iyi olması lenfoplazmositik reaksiyona bağlıdır. Bu durumun nonmedüller invaziv duktal karsinom için de geçerli olup olmadığı açık değildir (13).

İnfiltratif meme karsinomlarında lenfosit alt tiplerinin çoğunun T lenfosit olduğu, bunların da çoğunun CD4 pozitif T lenfosit olduğu bulunmuştur. Genellikle benign veya malign meme dokusunda bir miktar B hücresi bulunur ancak karsinomlarda kısmen daha fazladır. Tümörde plazma hücresi varlığı daha kötü prognoz ile ilişkilidir (13). Stromal mast hücrelerinin varlığı ALD negatif hastalarda anlamlı olarak daha iyi prognoz ile ilişkili iken, aksiller lenf düğümü metastazı olanlarda ilişki bulunamamıştır (13).

### **1.3.5.7.8. Lenfatik Tümör Embolisi**

Lenfatikler endotel ile döşeli, düz kas veya elastik tabakası olmayan vasküler kanallardır. Lenfatiklerin çoğunda eritrosit yoktur ama bazı kan kapillerlerinin bu tanıma dâhil olduğu kuşkusuzdur. İnvaziv karsinomlarda tümör hücre adaları çevresinde “kırılma” veya “çekilme” artefaktı şeklinde boşluklar görülebilir. Kırılma artefaktı duktal karsinomda daha sıktır. Kırılma artefaktı olan lenf düğümü negatif hastalar, artefaktı olmayanlara göre daha yüksek uzak metastaz sıklığı gösterir. Bu durum kırılma artefaktının tümör–stroma etkileşiminin bir sonucu olduğunu

düşündürmektedir. Lenfatik kanalların yapısıyla ilişkilidir ve tam olmayan doku fiksasyonuna bağlı pasif bir fenomen değildir. İmmunohistokimya artefakt ve lenfatik invazyonu ayırmada kullanışlıdır (13).

#### **1.3.5.7.9. Kan Damarı İnvazyonu**

Kan damarı invazyonu, tümör hücrelerinin bir arter veya venin lümeni içine penetre olması şeklinde tanımlanır. Bu vasküler yapı elastik liflerle desteklenmiş düz kas içerir, bu nedenle elastik lifleri boyayan yöntemler kullanılabilir. Elastik lifler sıklıkla duktuslar çevresinde birikir (invaziv tümör içerisinde intraduktal karsinom içeren duktuslar) ve bunu vasküler invazyondan ayırmak zor olabilir. Aktin bu ayırmada yardımcı olabilir (13).

Hemotoksilen eozin kesitlerde, lenfatik tümör embolisi ve kan damarı invazyonunu ayırmak gerekebilir. Küçük kapillerlerde belirgin düz kas duvarı veya elastik tabaka yoktur ve kırmızı kan hücreleri lenfatik lümenlerde de bulunabilir. Faktör 8 gibi bazı endotelyal hücre belirleyicileri bazen gerçek damarları boyamadığı için değeri sınırlıdır. Bu nedenle bazı araştırmacılar endotelle döşeli tüm kanalları ayırım yapmadan lenfovasküler invazyon olarak değerlendirir. Çeşitli çalışmalarda kan damarı invazyonu yaşam süresi ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (13).

#### **1.3.5.7.10. Anjiogenezis**

Tümör vaskülaritesi meme karsinomunda prognoz ile ilişkilidir. Parafin kesitlerde endotelyal hücre belirleyicisi olarak Faktör 8, CD34 ve CD31 kullanılmıştır (13).

Anjiogenik fenotipin kazanılması ‘vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular permeability factor (VPF) ve basic fibroblast growth factor (bFGF)’ gibi anjiogenik faktörlerin aşırı salınımına bağlıdır. Anjiogenik faktörlerin çeşitli kaynakları tanımlanmıştır. VEGF’ün meme stromal fibroblastları tarafından üretildiği ve hipoksik durumlarda salınımının arttığı bulunmuştur. VEGF meme karsinomu hücrelerinin sitoplazmalarında immunohistokimya ile tespit edilebilir. Anjiogenik proteinler stromada bulunabilir ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerden üretilebilir. Stroma hücrelerinin katepsin-D reaktivitesi ve stromal vasküler dansite arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur, bu da matriks proteinlerinin artışının invazyon ve anjiogenezi uyardığını düşündürmektedir (13).

#### **1.3.5.7.11. Perinöral İnvazyon**

Perinöral invazyon meme karsinomlarında sık değildir, muhtemelen görülebilir boyuttaki sinir sayısının meme dokusunda az olmasından kaynaklanmaktadır. Perinöral invazyon invaziv karsinomların yaklaşık % 10'unda görülür. Daha çok yüksek dereceli tümörlerde mevcuttur ve sıklıkla lenfatik tümör embolisi ile ilişkilidir. Ancak henüz bağımsız bir prognostik faktör olduğu ispatlanmamıştır (13).

#### **1.3.5.7.12. Stromal Özellikler**

İnvaziv duktal karsinomda stromal özelliklerin bağımsız prognostik özellik olup olmadığı net değildir. Çünkü diğer prognostik özelliklerle arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Örneğin az miktarda stromal reaksiyonu olan tümörler şu özelliklere sahiptir; daha daireseldir, kötü diferansiye nükleer ve histolojik derece ve belirgin lenfoplazmositik reaksiyon gösterir, östrojen reseptörü negatif olma eğilimindedir. Diğer açıdan yoğun fibrotik ve skirröz karsinomlar daha çok yıldızlı biçimdedir, orta derecede diferansiyedir, daha az lenfositik reaksiyon içerir ve büyük bir kısmı östrojen pozitifdir (13).

#### **1.3.5.7.13. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri**

Günümüzde invaziv meme karsinomuna ait biyopsi örneklerinde östrojen reseptörleri (ÖR) ve progesteron reseptörlerinin (PR) varlığının araştırılması, meme kanserli hastaların tedavilerinin yönlendirilmesinde standart bir uygulama haline gelmiştir (11). Karsinomların % 50,85'i ÖR salgılar ve böyle tümörler genellikle postmenopozal kadınlarda daha sıktır. Hormon reseptör pozitif kanserli kadınlar hormon reseptör negatif kanserli kadınlardan biraz daha iyi prognoz gösterir. Hormon reseptörlerinin değerlendirilmesi, tedaviye yanıtı belirlemede çok değerlidir. PR ve ÖR pozitif tümörlerin % 80'i hormonal tedaviye yanıt verir, hâlbuki bunlardan yalnızca bir reseptörü pozitif olanlarda yanıt yaklaşık % 40'dır. Her ikisi negatif olan tümörler % 10'dan daha az yanıt verme eğilimindedir (19).

#### **1.3.5.7.14. Human Epidermal Growth Factor Receptör 2/Neu (Her2/Neu, c-erbB2) Onkogeni**

Bu gen 17. kromozomda lokalizedir (11). c-erbB2 hücre büyümesinin kontrolünde yer alan bir transmembran glikoproteindir. Spesifik bir liganda sahip olmamakla beraber çok sayıda büyüme faktörü için koreseptör olarak çalışır. c-erbB2

meme kansinolarının % 20-30'unda aşırı salınır. Olguların % 90'ından çoğunda aşırı salınım 17q21'deki genin amplifikasyonu ile ilişkilidir ve bu, ya kullanılan İHK'sal yöntemle proteinin değerlendirilmesi ya da FISH yöntemi ile elde edilen gen kopya sayısı ile belirlenir. Her ne kadar çalışmaların tamamı aynı sonuca sahip değilse de birçoğu c-erbB2'nin kötü prognozla bağlantılı olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak bazı çalışmalarda aşırı c-erbB2 salgılayan tümörlerin hormon veya antrasiklin içeren kemoterapi rejimlerine yanıtlarının farklı olduğu bulunmuştur. c-erbB2'nin değerlendirilmesi bu proteini hedef almış tedaviye yanıtı belirlemede çok önemlidir. Trastuzumab (Herceptin) özellikle tümör hücrelerini hedef alması için geliştirilmiş, c-erbB2'ye karşı monoklonal bir antikordur ve normal hücreleri öldürmediği düşünülmektedir. Klinik deneyimde, kemoterapi ile Trastuzumab'ın kombinasyonu c-erbB2 aşırı salınımı olan hastalarda tedaviye yanıtı artırır. Maalesef bilinmeyen bir mekanizma ile oluşan kardiyak toksisite, Trastuzumab'ın yararlılığını sınırlayabilir. Buna karşın solid tümör için gen-hedefli ilk terapötik ajan olduğundan sonuçlar çok umut vericidir (19).

#### **1.4. APOPTOZİS**

Yunanca "Dökülen Yaprak" anlamına gelen apoptoz patolojide "Programlı Hücre Ölümü"nü ifade etmektedir. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından apoptoz terimi kullanılmıştır (23, 24).

Apoptozis, ölüm için programlanmış hücrelerin kendi nükleer DNA'larını, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini parçalayacak enzimleri aktive eden, kontrollü bir şekilde düzenlenen intrasellüler programla yürütülen bir hücre ölümü yolağıdır (19, 25, 26). Hücrenin plazma membranı sağlam kalır, ancak yapısı değişir. Böylece fagositoz için hedef haline gelir. Ölü hücre, içeriği dışarı sızmadan hızlıca temizlenir ve bu nedenle konakta inflamatuvar reaksiyona yol açmaz (19). Normalde birçok durumda meydana gelmektedir ve istenmeyen ya da potansiyel olarak zararlı hücreleri ve kullanılır olma süresini aşmış hücreleri ortadan kaldırır. Aynı zamanda, hücreler onarılamayacak ölçüde zarar gördüklerinde, hasar özellikle hücrenin DNA'sını etkilediğinde ise apoptozis patolojik bir olaydır; bu durumlarda, onarılamayacak derecede hasar görmüş hücreler elimine edilir (19). Sonuçta apoptozis pek çok patolojik ve fizyolojik süreçte rol alır (26-29).

### **Fizyolojik Nedenlere Bağlı Apoptozis:**

1. Embriyogenezde (implantasyon, organogenez, gelişimsel involüsyon ve metamorfoz) hücrelerin programlı ölümü.
2. Hormona bağlı doku involüsyonu (Menstürel siklusta, menopozda ovaryan atrezide, laktasyon gösteren memenin regresyonunda, kastrasyon sonrası prostat atrofisinde).
3. Çoğalma gösteren hücre gruplarında hücre sayısının devamlılığının(homeostazis) sağlanması (kemik iliği ve timustaki immatür lenfositler, germinal merkezdeki B hücreleri ve intestinal kriptlerdeki epitel hücreleri).
4. Olgunlaşmalarını tamamladıktan sonra ya da önce potansiyel olarak zararlı self-reaktif lenfositlerin elimine edilmesi.
5. Akut inflamatuvar yanıtta nötrofiller, veya immün bir yanıtta görev alıp kullanılmış konak hücrelerinin ölümü.
6. Sitotoksik T hücreleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümü (virüsle enfekte hücreler, neoplastik hücreler ve transplant reaksiyonu) (19).

### **Patolojik Nedenlere Bağlı Apoptozis**

1. Çeşitli etkenler (radyasyon, sitotoksik kanser ilaçları, hafif derecede hipoksi ve ısı... gibi) ile oluşan DNA hasarı. DNA hasarı ve tümör supresör gen p53'ü de kapsayan mekanizma ile apoptozis indüklenir. DNA hasara uğrayınca hücrede p53 birikir ve tamir işlemi için zaman kazanmak üzere hücre siklusunu G1 fazında durdurur. DNA onarım süreci başarısız olduğu takdirde p53 apoptozisi tetikler. Ayrıca p53 mutasyona uğradığında veya yok olduğunda apoptozisi uyarmada yetersiz kalır. Ve bu durum bazı kanserlerde olduğu gibi hücrenin sağ kalımını sağlar.
2. Katlanmış proteinlerin birikimi (Santral sinir sistemi ve diğer organlarda endoplazmik retikulumda stres oluşturan protein birikimi).
3. Bilinen bazı enfeksiyonlara bağlı hücre ölümü (adenovirüs, HIV enfeksiyonu ya da doku immün yanıtı oluşturan viral hepatitler).
4. Duktus obstrüksiyonundan sonra organ parankiminde patolojik atrofi (pankreas, parotis ve böbrek).

5. Tümörlerde hücre ölümü (çoğunlukla gerileyen tümörlerde olmakla birlikte bazen de aktif büyüyen tümörlerde) (19).

#### 1.4.1. MORFOLOJİ

Apoptozisde morfolojik bulgular şunlardır:

**Çevre Hücrelerden Ayrılma:** Apoptozisde ilk olarak hücreler birbirleriyle olan temas bölgelerini ve mikrovillusları içeren yüzey oluşumlarını kaybederek komşu hücrelerden ayrılmaya başlarlar (28).

**Hücre Büzüşmesi:** Hücre boyutları küçülür. Sitoplazma yoğun olup organeller nispeten normal görünmekle birlikte sıkı paketlenmeler gösterir (19). Organel bütünlüğü korunur ancak bu organeller küçülerek hücre zarına bağlı cisimler oluştururlar (28).

**Kromatin Yoğunlaşması:** Apoptozisin en karakteristik görüntüsünü oluşturur (19, 27). Değişik boyut ve şekillerde kromatin birikimleri periferde hücre membranının altında bulunur (19, 28, 29). Nükleus iki ya da daha fazla parçaya bölünür (19, 29).

**Sitoplazmik Kabarcıklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşumu:** Apoptotik hücre ilk önce yaygın yüzeyel tomurcuklanma gösterir (19, 29). Daha sonra membranla çevrili sitoplazmada nükleer parçalarla birlikte veya onlar olmadan sıkı paketlenmiş organellerden oluşan apoptotik cisimlere parçalanırlar (19, 28, 29).

**Apoptotik Hücre veya Cisimciklerin Makrofajlar Tarafından Fagositozu:** Apoptotik cisimcikler hızla fagositlerin lizozomal enzimleri tarafından sindirilir (19, 28).

Hematoksilen-eozin ile boyanmış dokularda, apoptoz tek hücreyi veya hücre kümelerini tutar. Apoptotik hücreler oval veya yuvarlak, yoğun eozinofilik sitoplazmalı, dens nükleer kromatin parçaları ile birlikte görülür. Hücre küçülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşması hızlıdır ve parçalar hızla fagosite edilir, parçalanır veya lümene dökülür. Histolojik kesitlerde görünür olmadan önce dokuda anlamlı apoptoz meydana gelebilir. Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmaz ve bu da histolojik olarak saptanmasını güçleştirir (19, 30).

#### 1.4.2. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER

Apoptotik hücreler genellikle daha önce tanımlanmış patolojik değişikliklerin altında yatan farklı biyokimyasal modifikasyonlar gösterirler. Bu

özelliklerin bazıları nekrotik hücrelerde de görülebilir. Apoptozun spesifik bir özelliği kaspaz adlı bir enzim grubu ile protein hidrolizidir. Transglutaminaz aktivitesi ile aşırı protein çapraz bağlanması sitoplazmik proteinleri kovalent bağlı büzülmüş tabakalara çevirir, bu tabakalar apoptotik cisimler haline parçalanabilir. Apoptotik hücreler 50-300 kilobazlık büyük parçalar halinde, karakteristik DNA yıkımı gösterirler. Sonradan, DNA'nın  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  bağımlı endonükleazlar ile internükleozomal parçalanması sonucunda 180-200 bazlı oligonükleozom parçalarına dönüşür. Apoptotik hücreler, plazma membranlarının dışında fosfatidil serin ve trombospondin bağları bulundurlar (19, 23). Bu değişiklikler proinflatuar hücresel içerik salınmaksızın, ölü hücrenin, makrofajlar ve diğer komşu hücreler tarafından fagositoz için erken tanınmasına olanak verir (30).

### 1.4.3. MEKANİZMALAR

Apoptoz belli olaylar ile başlatılan, dört komponentten oluşan, enerji bağımlı bir süreçtir.

**Sinyal yolu:** Apoptotik uyarın ilk olarak bir sinyal yaratır. Transmembran sinyaller apoptozun pozitif veya negatif belirleyicileri olabilir.

**Kontrol ve integrasyon fazı:** İntrasellüler pozitif veya negatif düzenleyici moleküller apoptozu başlatır, uyarır ya da inhibe eder. Bunlar spesifik proteinlerle gerçekleştirilir. Bu proteinlerin önemi, aksiyonlarının potansiyel olarak letal (hücre ölümü) sonuçlanabilmesindedir. Büyük ölçüde mitokondrial fonksiyonu düzenleyerek apoptotik süreçte yer alırlar. Apoptoz mitokondriyi iki yolla etkiler;

1. Mitokondrial şişme: Apoptotik sinyal mitokondrial permeabilite değişimi ile sonuçlanır.
2. Sitokrom C sitozol içine salınır ve proteolitik olayların gelişimi hazırlanır (19, 23).

**Uygulama (infaz) fazı:** Büyük ölçüde proteazların kaspaz ailesi sorumludur. Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluşturur. İnaktif prekürsörler olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir. Biyolojik fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılırlar:

1. Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 14
2. Apoptozu başlatanlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10

### 3. Apoptozu yürütenler (efektör grup): Kaspaz 3, 6, 7

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara nakledeleler. Efektör kaspazlar ise proteolitik etkiyle apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (31-33). Apoptozun uygulama fazı son yoldur, proteolitik bir kaskattır. Kaspazlar hücre iskeleti ve nükleer matriks proteinlerini parçalayarak hücre iskeletini yıkarlar.

**Ölü hücrelerin fagositozla eliminasyonu;** Apoptotik hücre ve parçalarının yüzeylerinde bulunan işaretleyici moleküller, komşu hücreleri ve fagositleri uyarır (19, 23).

#### 1.4.4. APOPTOZİSTE P53'ÜN ROLÜ

Apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (34).

#### 1.5. BAX VE BCL-2

Tümörün büyümesi hücreyel çoğalma ve hücreyel ölüm ile kontrol edilir. Hücre ölümünün en sık görülen mekanizması ise programlanmış hücre ölümüdür. Birçok apoptotik uyarı hücre ölümünü Bcl-2 gen ailesini etkileyerek gerçekleştirir (35). Bcl-2 gen ailesi apoptozisin düzenlenmesinde anahtar bir role sahiptir, meme kanserleri dahil tümörlerin çoğunda işleyişi bozulmuştur (36, 37). Bu gen ailesinde apoptozisi hem baskılayıcı hemde uyarıcı üyeler vardır (35). Bcl-2 ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır (38). Bu üyelerden Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 ve A1/Bfl-1 apoptozisi baskılayan, Bax, Bak, Bok/Mtd, Bad, Bik, Bid, Bim/Bod ve Hrk apoptozisi indükler (36, 39).

Apoptozisin miktarı premalign ve malign meme lezyonlarında Bcl-2 salınımı ile ters ilişkilidir. Bcl-2 salınımı daha iyi klinikopatolojik özelliklerle uyumludur. Bununla birlikte artmış Bcl-2 seviyesi olan hastalar endokrin tedavilere daha iyi yanıt verirler. Antiapoptotik olan Bcl-2'nin azalmış seviyeleri ile artmış tümör derecesi

arasındaki paradoks şu şekilde açıklanabilir; Bcl-2, hücreleri letal mutasyondan korumak için tümörde erken bir role sahiptir. Erken ve düşük dereceli tümörlerde Bcl-2 salınımı yüksektir ve düşük apoptotik indeks ile karakterizedir, ilerlemiş ve yüksek dereceli tümörlerde Bcl-2 salınımı düşüktür ve yüksek apoptotik indeks ile karakterizedir (36).

Meme kanserlerinde yüksek Bcl-2 seviyelerinin; düşük tümör derecesi, östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği, düşük proliferatif oran, daha iyi prognoz ve adjuvan terapiye daha iyi yanıt ile ilişki olduğu bulunmuştur (8, 40).

Yapılan bir çalışmada meme kanserlerinde Bcl-2'nin sıklıkla salındığı ve lenf düğümü tutulumu olsun olmasın meme kanserlerinde daha iyi klinik ve prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (8).

### **1.6. BNIP3**

Solid tümörlerde hipoksik bir mikroçevre oluşur ve hipoksik alandaki hücreler daha kolay kanserleşebilme eğilimindedir. p53 gibi gen mutasyonları bu alanlarda olur. Bundan dolayı hipoksik hücre ölümüyle ilişkili olan BNIP3'ün kanser tedavisinde rolü olabilir (41).

Bcl-2/E1B 19 kD interacting protein (BNIP-3), Bcl-2 ailesinin bir üyesidir ve hipoksik durumlarda artış gösterir (6, 41, 42). Mitokondride lokalizedir ve artmış salınımı hücre ölümünü indükler (41). Mitokondri membranına girer, reaktif oksijen ürünlerini tetikler ve membran depolarizasyonu sağlayarak membranda geçirgenliği artırır. Bu hızlı ve şiddetli mitokondrial disfonksiyona plazma membran geçirgenlik artışı, yaygın sitoplazmik vakuolizasyon ve DNA bant kırıkları da eşlik eder. Bu da hücre ölümü ile sonuçlanır (6, 41). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, normal meme dokuları ile karşılaştırıldığında DKİS ve invaziv meme karsinomlarında neoplastik hücrelerin sitoplazma ve nükleuslarında BNIP3 anlamlı olarak yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bu da BNIP3'ün meme kanserinin neoplastik ilerleyişinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca nükleer BNIP3 salınımı DKİS'da artmış rekürrens riski ve kısa hastaliksız dönem ile, invaziv meme karsinomunda ise daha az agresif fenotiple ilişkilidir. Bu da otofaji, hücre ölümü ve yaşam süresinde rolü olan BNIP3'ün asıl işlevinin insitu karsinomdan invaziv karsinoma geçiş sırasında olduğunu düşündürmektedir (6, 42).

## 1.7. TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE hTERT

Telomerler ökaryotik organizmalarda lineer kromozomların uçlarında bulunan özelleşmiş DNA tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelerdir. Telomerik DNA dizileri diğer DNA dizilerinden yapı ve işlev olarak farklıdır, ayrıca temel biyolojik bir işleve de sahiptir. Replikasyon sırasında lineer kromozomal DNA molekülünün son kısmının tamamlanmasında rol oynar (43). Telomerler hücre bölünmesi sırasında kromozom uçlarının yapışmasını önleyen bir kepe oluşturur (4). Kromozomun son kısmını rekombinasyon, yıkım ve füzyon gibi anormal durumlara karşı korur. Kromozomların bütünlüğünü ve stabilitesini sağlar. Kromozomların nükleus zarına tutunarak belirli bir pozisyonu korumasını sağlar (43).

İnsanda telomeraz aktivitesine, ilk kez servikal kanser hücre hattı olan HeLa'da rastlanmıştır. Fetal, yeni doğmuş ve yetişkin testis ve overlerinde rastlanmıştır. Fakat yaşlıların spermatozoa ve oositlerinde görülmemiştir. Telomeraz aktivitesi, birçok insan somatik dokusunda görülmez. Genellikle yüksek replikatif kapasitesi olan dokularda ve birçok insan kanser türünde görülür (43).

İnsanlarda kanser belirleyicilerinden biri de telomerazdır. Telomeraz normal dokuların çoğunda negatiftir (44). Telomeraz kromozom uçlarındaki telomerleri oluşturan tekrarlayan nükleotid sekansını (TTAGGG) uzatabilen bir revers transkriptaz enzimidir (2, 4, 45). Telomeraz veya telomer tamiri ile ilgili diğer mekanizmalar hücrelerin proliferasyonunun devamı için şarttır ve kanser gelişiminde kritik bir basamaktır (46). Meme, prostat, akciğer, karaciğer, pankreas ve kolon kanserlerinin yaklaşık % 85'inde telomeraz aktivitesi bulunmuştur (2, 44, 46).

Telomeraz geniş bir ribonükleoprotein kompleksidir, ökaryotik kromozomların telomerlerini uzatır ve dolayısıyla hücrenin replikatif potansiyelini ve yaşam süresini düzenler (47, 48). Telomer DNA'nın uzunluğu insanlarda 5-15 kbp arasında değişmektedir (48). Telomeraz aktivitesi olmazsa, telomerler DNA replikasyonunun her siklusunda biraz daha kısılır (4, 48). Hücrenin çok sayıda bölünmesi ile telomerler kritik bir uzunluğa gelir, DNA hasarı ve hücre ölümüyle sonuçlanır (4, 48). Sonuç olarak hücre yaşlılık denen geri dönüşümsüz nonproliferatif bir sürece girer. Net olmamakla birlikte telomer uzunluğunun telomeraz ile tamiri yaşlanmayı geciktirebilir (48). Telomerazın bu moleküler ve hücre fonksiyonları, insan dokusunun, organların ve tüm vücudun genetiği,

gelişimi, dejenerasyon ve rejenerasyonunda asıl rolü oynar. Telomeraz aktivasyonu gelişim sırasındaki embriyonik hücrelerin proliferasyonu, immun hücrelerin aktivasyonu, kemik iliğindeki kan hücre progenitörlerinin olgunlaşması ve neoplastik hücrelerin immortalizasyonu ile ilişkilidir. Telomeraz inhibisyonu ise hücre yaşlanması, apoptozis, premature yaş ve dejeneratif hastalıkları kapsar (47).

Human telomeraz; RNA subüniti ve çeşitli proteinlerden oluşur. RNA subüniti (hTR) telomerik DNA'nın şablonunu içerir ve telomeraz aktivitesi için esastır (47). Protein içerikleri ise katalizör telomeraz revers transkriptaz (hTERT) ve telomeraz ilişkili protein 1 (hTEP1)'i kapsar (4, 45, 47). hTR ve hTEP1 normal insan dokusunda yaygın olarak salınır ancak hTERT meme dokusu dahil normal dokularda bulunmaz (45, 47). Ayrıca hTERT'in ektopik salınımı ölümlü insan hücrelerinde telomeraz aktivasyonu, telomer uzaması ve hücre proliferasyonunun devamlılığını indükler, böylece hTERT telomeraz aktivitesini düzenler ve telomerazın hücre fonksiyonunda anahtar rol oynar. hTR'yi hedefleyerek yapılan telomeraz aktivitesinin inhibisyonu, telomerlerde erozyon ile sonuçlanır, yüksek proliferatif özelliğe sahip hücrelerde apoptozis ve büyüme kapasitesini ayarlar. hTERT'i hedefleyerek yapılan telomeraz aktivitesinin inhibisyonu, artmış anormal mitoz ve apoptoz ile birlikte telomerlerin kademeli olarak kaybı, genomik instabilite, telomer-telomer füzyonu ve anöploidiyi indükler. Çalışmalara göre telomeraz enzim aktivitesi her zaman telomerlerin onarımı ve uzunluğu ile korele değildir. Örneğin, telomeraz aktivitesi değişmeden hTERT'in karboksil ucundaki değişim, enzim fonksiyonunu bozabilir ve enzimatik aktivitesi olan telomeraz transforme hücrede telomeri uzatmadan yaşam süresini uzatabilir (47).

hTERT salınımı DKİS gibi preinvaziv meme lezyonlarında artmıştır ve bu telomeraz aktivitesinin meme karsinogenezinin erken döneminde etkili olduğunu düşündürmektedir. Meme kanserlerinde lenf düğümü tutulumu ile telomeraz aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu durum hTERT'in hem karsinogenezde hem de metastazlarda etkili olduğunu düşündürmektedir. hTERT kromozom 5p15.33'de lokalizedir ve 16 ekson içerir (45)

Malign meme tümörlerinden yapılan ince iğne aspirasyonların %81'inde, ileri evre meme kanserlerinin %95'inde telomeraz salınımı bulunmuştur (2).

Telomeraz reaktivasyonu meme kanserinde ileri evre, histolojik derece ve lenf düğümü metastazı ile anlamlı ilişkilidir ancak menopozal durum ve tümör boyutu ile ilişkili değildir (4). Ayrıca hTERT salınımı ile hastanın yaşı, tümör boyutu, derece, lenf düğümü metastazı, ÖR pozitifliği ve lenfovasküler invazyon arasında ilişki bulunamamıştır (4).

### **1.8. WESTERN BLOT**

Blotlama metodu; protein ve nükleik asitlerin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan birçok farklı metodun genel ismidir. Bu metodlardan ilki 1975 yılında geliştirilen DNA'nın tesbitinde kullanılan Southern blotlamadır. İlk birkaç yıl jel transferi olarak isimlendirilen bu metot, diğerlerinin de bulunması ile birlikte, metodu geliştiren E. M. Southern'e atfen Southern Blotlama olarak anılmaya başlamıştır. Daha sonraki yıllarda geliştirilen ve RNA'nın tesbitinde kullanılan metot, ilkinin ismine gönderme yapılarak Northern Blotlama olarak isimlendirilmiştir (J. Alwin ve G. Stark, 1979). Aynı yaklaşımla en son olarak geliştirilen proteinlerin belirleme metodu, Western Blotlama olarak adlandırılmıştır (H. T. Towbin, 1979- W.N. Burnette, 1981). Ayrıca, bunlara ek olarak Dot/Slot Blotlama ve İn situ Hibridizasyon da benzer yaklaşımların kullanıldığı diğer blotlama ve hibridizasyon metotlarıdır (49).

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metotlarla gösterilmesidir. Western blot tekniği, denatüre edilen DNA'nın nitrosellülöz membrana transfer edildikten sonra hibridizasyonla tesbit edildiği Southern blot tekniğinin modifikasyonudur. Bahsedilen teknik ile Western blot tekniğinin farkı, transferi gerçekleşen moleküllerin belirlenmesinde kullanılan işaretli problemlerin yapısıdır. Western blotta işaretli antikolar kullanılırken, diğer metotta işaretli oligonükleotitler kullanılmaktadır (49).

Blotlamadan önce, çalışılan numunedeki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezi sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. SDS-PAGE, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden birisidir (49).

Çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jelle yüklenip, elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinin molekül ağırlıklarıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç etmekte ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedir. Yapılan bu işleme elektroforez denilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden dört adımda gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselülöz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselülöz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır (49).

Destek tabakaya (nitroselülöz/naylon membran) transfer sırasında jel ile destek tabaka karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kâğıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır (Şekil 1). Proteinlerin destek tabakaya transferi için iki yöntem kullanılmaktadır. Bu metotlardan ilkinde (ıslak kapillar metot), transfer işlemi jel elektroforezine benzer bir şekilde tampon çözeltisi içinde gerçekleşmektedir. Yarı kuru (semi-dry) yöntemde ise proteinlerin jelden destek tabakaya geçişi tampon çözeltisi ile doyurulmuş filtre kâğıtları ile sarılmış bir şekilde, yine elektroforez ile sağlanmaktadır. Destek tabakanın özgül olmayan proteinle bloklanmasında ucuz, temini kolay ve etkin olması nedeniyle, yağsız süt tozu tercih edilmektedir (49).

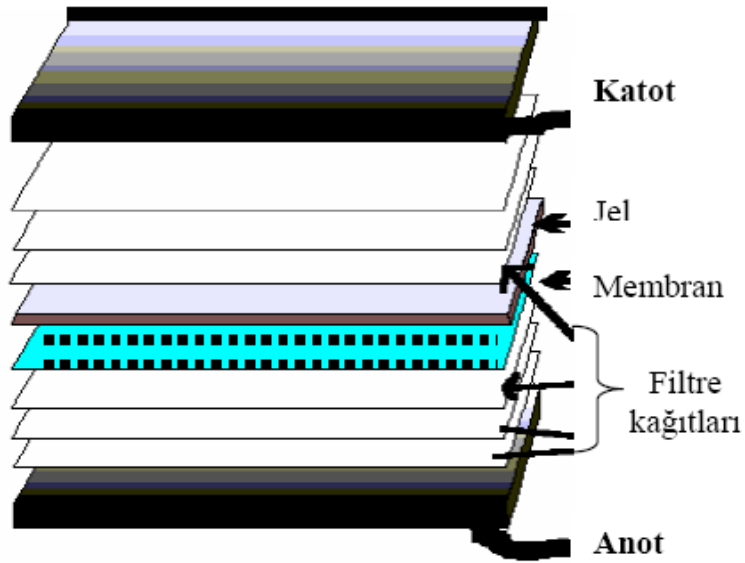
Spesifik antikorlar olarak poliklonal ya da monoklonal antikorlar (Mak) kullanılabilir. Mak'ların kullanımının avantajı, bunların yalnızca tek bir epitopa (antijenik determinant) oluşturmalarından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple Mak'lar antijene spesifik bir bağlanım gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitopik yapılar mevcut ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler belirlenebilmektedir. Poliklonal antikorlar kullanılması durumunda aynı sebeple şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir (49).

Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptit yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise

Mak-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenle, Mak kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır (49).

Özgül antikorlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalin fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda, enzimle işaretlemeye testin duyarlılığını artırmak amacıyla peroksidaz ile işaretli avidin-biotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen (insoluble) renkli ürünler oluşturmalarıdır (49).

Western blot tekniği çalışılırken karşılaşılabilecek en önemli problem proteinlerin antijenik yapılarında SDS-PAGE ve transvers işlemleri sırasında şekillenebilecek bozulmalardır. Böyle bir durumda antijen-antikor bağlanması olmayacağından yalancı negatif sonuç alınmaktadır (49).



**Şekil 1.** Jeldeki proteinlerin destek membrana transferi

## 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Fırat Üniversitesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına 2005-2010 yılları arasında gönderilmiş meme biyopsi ve mastektomi materyallerinden İDK tanısı alan 75 olgu çalışma kapsamına alındı. Olgulara ait hematoksilen eozin boyalı preparatlar ve bloklar arşivden çıkarılarak yeniden gözden geçirildi. Kesitler ışık mikroskop ile incelenerek tanılar doğrulandı, histolojik derece, tümör boyutu, tümör diferansiasyonu, histolojik ve nükleer dereceleri modifiye Bloom Richardson'a göre ayrı ayrı değerlendirildi (1). Tümör boyutu olarak  $\leq 2$ cm, 2-5cm,  $>5$ cm (1), yaş için ise 50 yaş ve altı ile 50 yaş üstü şeklinde gruplama yapıldı (40).

### 2.1. İMMUNOHİSTOKİMYA

Yetmiş beş olguya ait örneklerde tümör içeren bloklardan 4 mikron kalınlığında elde edilen kesitler poly-l-lysine kaplı lamlar üzerine alındı. İlk olarak 37°C'de 15 dakika etüde bekletilen lamlar daha sonra Bax (Thermo scientific, monoclonal mouse antibody to human Bax Ab-1, 1 ml, clone 2D2, 1/100 Fremont CA USA), Bcl-2 (Thermo scientific, BCL-2alpha Ab-1, 1/100, Fremont CA USA) hTERT (Abcam, rabbit monoclonal [Y182] to telomerase, 1/75, Cambridge, England) ve BNIP3 (Abcam, rabbit polyclonal to BNIP3L, 1/100, Cambridge, England) boyamaları için otomatik boyama cihazında (Ventana Medical System, SN: 712299, REF: 750-700, Arizona, USA) işleme alındı. Primer antikor ile işlemden sonra lamlar musluk suyunda yıkanarak Ultramount ile kapatıldı. Kontrol olarak Bax için hodgkin lenfoma, Bcl-2 için tonsil dokusu, hTERT için akciğer adenokarsinomu kullanıldı.

ÖR, PR ve c-erbB2 reseptör boyamaları tekrar değerlendirilerek önceki raporları ile korele edilip, doğrulandı.

#### 2.1.1. İMMUNREAKTİVİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3:** İmmunhistokimyasal yöntemle boyanan Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3'ün değerlendirilmesi, Olympus marka BX51 ışık mikroskopunda, tümör hücrelerinde boyanma yoğunluğu açısından incelenerek yapıldı.

Boyanma yoğunluğu zayıf, orta ve güçlü boyanma şeklinde değerlendirildi. Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3 için zayıf boyanmalar negatif olarak kabul edildi (50-52). % 10'dan daha az yaygınlık gösteren vakalar da negatif olarak değerlendirildi.

Bax ve Bcl-2 için; sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. İnternal kontrol olarak lenfositler değerlendirildi.

hTERT ve BNIP3 için; hem sitoplazmik hem nükleer boyanma pozitif kabul edildi (42, 51).

**ÖR, PR, c-erbB2:** ÖR ve PR immunohistokimyasal boyamaları için herhangi bir skora yapılmadı, tümör dokusunda %10 ve daha fazla nükleer boyanma pozitif, %10'un altındaki boyamalar negatif kabul edildi. c-erbB2 ekspresyonu değerlendirilirken 4 ayrı grupta skorlandı (53).

Skor 0: Tümör hücrelerinde boyanma yok ya da %10'dan az hücrede membranöz boyanma var.

Skor 1: % 10'dan fazla tümör hücrelerinin hücre membranlarının bir kısmında soluk boyanma var.

Skor 2: % 10'dan fazla tümör hücrelerinin hücre membranlarının tamamında zayıf orta dereceli boyanma var.

Skor 3: % 10'dan fazla tümör hücrelerinin hücre membranlarının tamamında güçlü boyanma var.

Skor 2 ve 3 pozitif, skor 0 ve 1 negatif boyanma olarak kabul edildi.

## **2.2. WESTERN BLOT YÖNTEMİ**

Western blot için bölümümüze frozen amacıyla gelen ve İDK tanısı alan altı adet dokudan örnekler alındı. Bu örnekler -80 derece buzdolabında muhafaza edildi. Ayrıca bir adet normal meme dokusu kontrol olarak alındı ve yine -80 derecede korundu. Western blot yöntemi çalışmamızın temelini oluşturan İHK sonuçlarını moleküler düzeyde desteklemek amacıyla yapıldı.

Dokuların homojenizasyonu yapıldıktan sonra SDS-PAGE ile proteinlerin elektroforezi tamamlandı. Elektroforez işlemini takiben aşağıdaki dört aşama gerçekleştirildi.

**Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama):** SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş

tampon solüsyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

**Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama):** Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solüsyonla [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,025 M),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,075 M), NaCl (1,45 M)], çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7,2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini (BSA) ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

**Özgül antikolarla tepkime:** Primer antikor olarak Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3 antikoları kullanıldı. Primer antikolar % 0,05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3 antikoları ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0,05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immüno globulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı.

**Bantların görüntülenmesi:** Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0,03–0,05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

### **2.3. İSTATİSTİKSEL İNCELEME**

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 12.0 programı kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher Exact Ki-Kare testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup,  $p \leq 0,05$  ise anlamlı olduğu,  $p > 0,05$  olması durumunda ise anlamlı farklılık olmadığı şeklinde değerlendirildi.

### 3. BULGULAR

Çalışmaya invaziv duktal karsinom tanısı alan 75 olgu dahil edildi. İnvaziv duktal karsinom olgularının tamamı (% 100,00) kadın hastaydı. Olgulardan 17'si derece 1 (% 22,67), 48 tanesi derece 2 (% 64,00) ve 10'u derece 3 (% 13,33) olarak değerlendirildi (Şekil 2-4). Yaş aralığı 29 ile 80 arasında değişmekte olup genel yaş ortalaması 52,80 olarak hesaplandı. Otuz yedi olgu 50 yaş ve altında, 38 olgu ise 50 yaş üstündeydi. Tümör çapı 0.7 ile 14 cm arasında değişmekte olup, ortalama 3,51 cm olarak hesaplandı. Olguların 14'ünde (% 18,67) tümör çapı 2 cm'den küçük (T1), 55'inde (% 73,33) 2-5 cm arası (T2), 6'sında (% 8,00) ise 5 cm'den büyüktü (T3).

Hasta yaşı, tümörün çapı ve derecesi, ÖR, PR ve c-erbB2 durumuna göre olgu sayıları ve yüzdeleri Tablo 5'te verilmiştir.

#### 3.1. İMMUNOHİSTOKİMYA

**Östrojen reseptörü:** Kırk altı olgu (% 61,33) ÖR pozitif (Şekil 5), 29 olgu (% 38,67) ise ÖR negatif olarak değerlendirildi. Elli yaşın üzerinde ÖR pozitifliği % 57,90 iken 50 yaş ve altında % 64,90 olup istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,535$ ). Aynı şekilde tümör çapı ile karşılaştırıldığında; T1, T2 ve T3 tümörlerde ÖR pozitifliği sırasıyla % 78,6, % 58,2 ve % 50 olup istatistiksel olarak anlamlılık mevcut değildi ( $p=0,315$ ). Derece 1, derece 2 ve derece 3 tümörlerde ÖR pozitifliği sırasıyla % 88,20, % 58,30 ve % 50,00 bulundu ve ÖR pozitifliği ile tümörün derecesi arasında anlamlı bir ilişki saptandı ( $p=0,05$ ) (Tablo 6).

**Progesteron reseptörü:** Kırk üç olgu (% 57,33) PR pozitif (Şekil 6), 32 olgu (% 42,67) ise PR negatif olarak değerlendirildi. Elli yaşın üzerinde PR pozitifliği % 55,30, 50 yaş ve altında ise % 59,50 olarak bulundu. PR pozitifliği ile yaş arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,713$ ). T1, T2 ve T3 tümörlerde PR pozitifliği sırasıyla % 71,40, % 56,40 ve % 33,30 olup yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p=0,277$ ). PR pozitifliği ile tümör derecesi arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,040$ ) olup, derece 1, derece 2 ve derece 3 tümörlerde sırasıyla % 82,40, % 52,10 ve % 40,00 bulundu (Tablo 6).

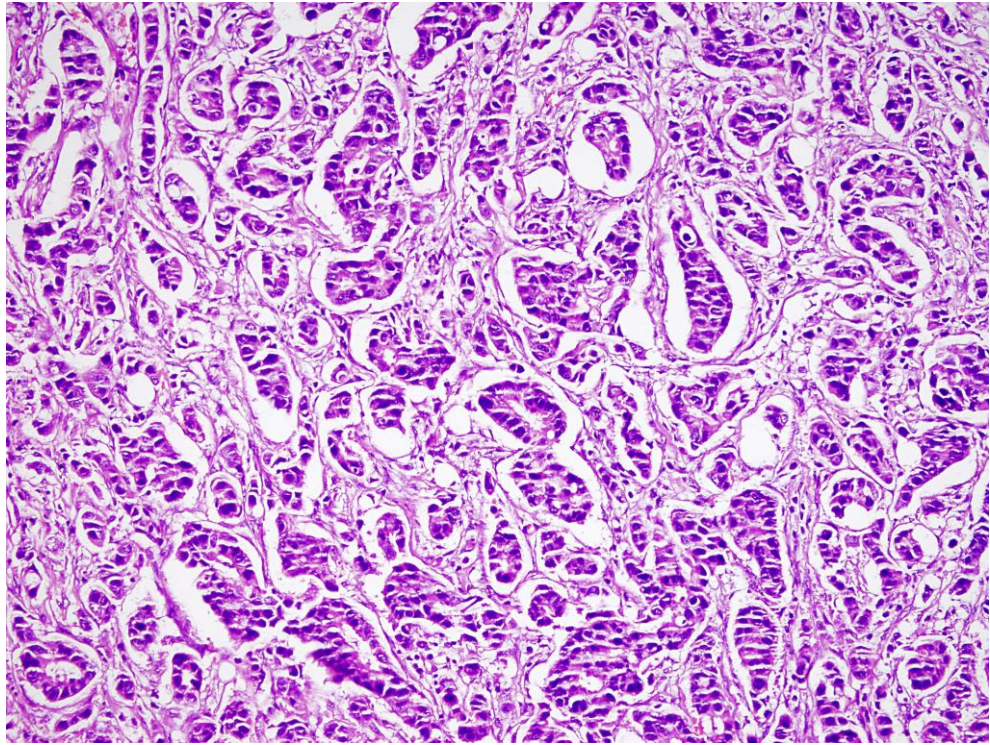
**Tablo 5.** Hasta yaşı, tümörün çapı ve derecesi, ÖR, PR ve c-erbB2 durumuna göre olgu sayıları ve yüzdeleri

Özellik		Olgu sayısı	%
Yaş	≤ 50	37	49,33
	>50	38	50,67
Tümör Çapı(cm)	≤2	14	18,67
	2.1-5	55	73,33
	>5	6	8,00
Derece	1	17	22,67
	2	48	64,00
	3	10	13,33
ÖR Durumu	Negatif	29	38,67
	Pozitif	46	61,33
PR Durumu	Negatif	32	42,67
	Pozitif	43	57,33
c-erbB2 Durumu	Negatif	25	33,33
	Pozitif	50	66,67

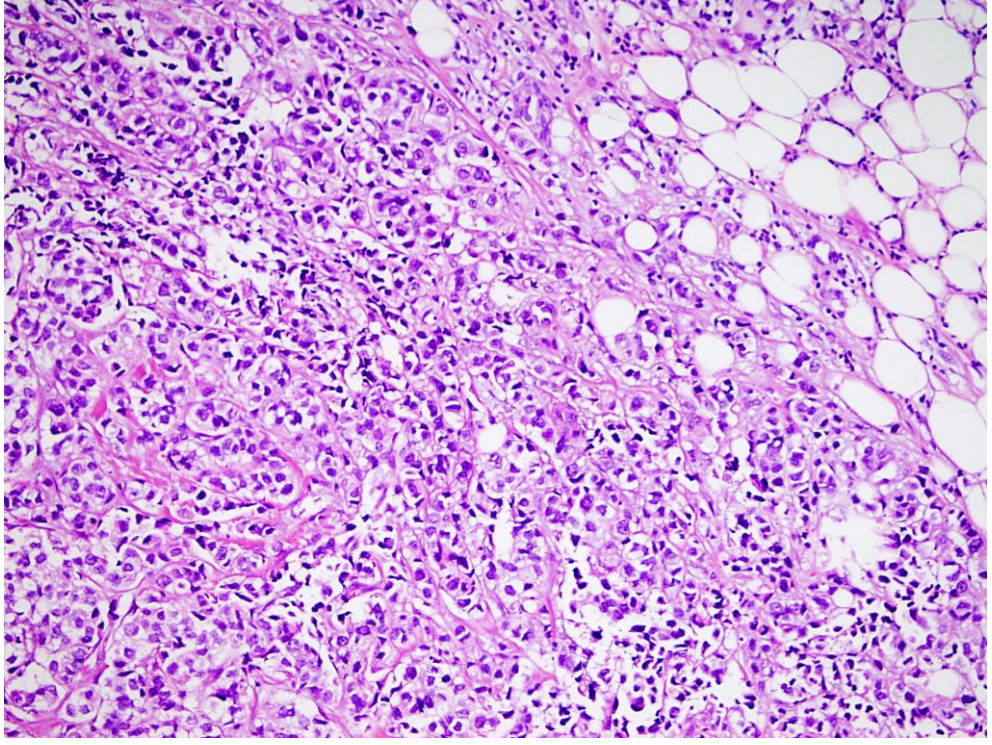
**c-erbB2:** Elli olgu (% 66,67) c-erbB2 pozitif (Şekil 7), 25 vaka (% 33,33) ise c-erbB2 negatif olarak değerlendirildi. Elli yaşın üzerindeki olgularda c-erbB2 pozitifliği % 60,50 iken, 50 yaş ve altındaki olgularda % 73,00 olup istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,253$ ). T1, T2 ve T3 tümörlerde c-erbB2 pozitifliği sırasıyla % 71,40, % 56,40 ve % 33,30 olarak bulundu. c-erbB2 pozitifliği ile tümör çapı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,092$ ). Ayrıca derece 1, derece 2 ve derece 3 tümörlerde c-erbB2 pozitifliği sırasıyla % 70,60, % 64,60 ve % 70,00 olup istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu ( $p=0,877$ ) (Tablo 6).

**Tablo 6.** Hasta yaşı, tümör çapı ve derecesine göre ÖR, PR ve c-erbB2'nin pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri

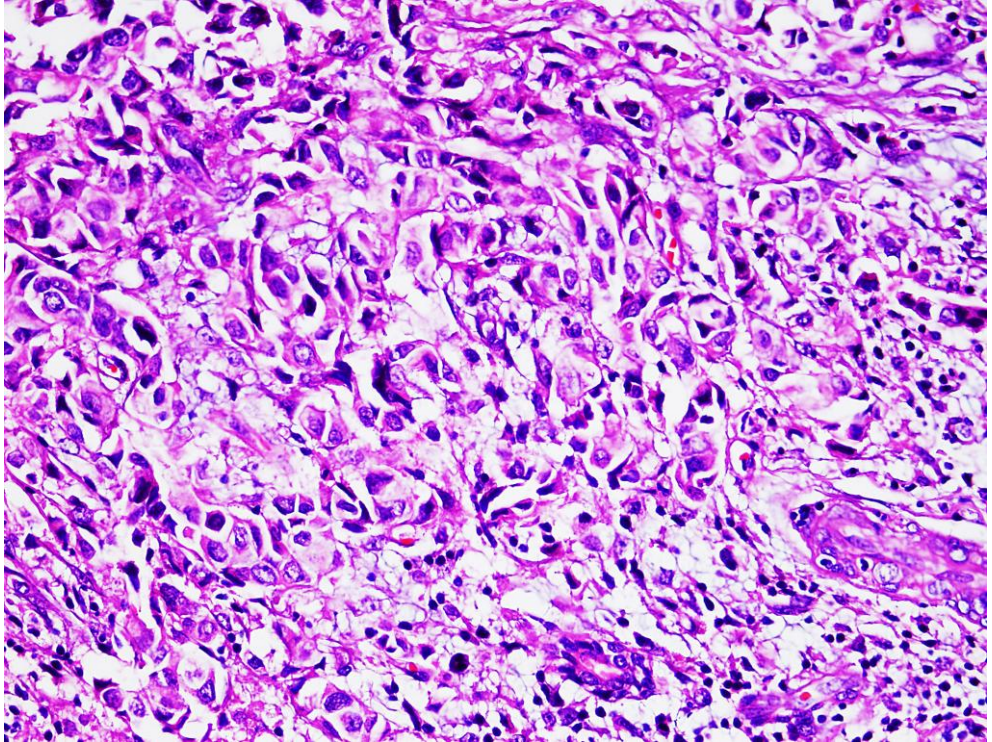
Özellik		% ÖR	P değeri	% PR	P değeri	% cerbB2	P değeri
Yaş	>50	57,9	0,535	55,3	0,713	60,5	0,253
	≤ 50	64,9		59,5		73	
Tümör	≤2	78,6	0,315	71,4	0,277	42,9	0,092
Çapı (cm)	2.1-5	58,2		56,4		70,9	
	>5	50		33,3		83,3	
Derece	1	88,2	0,054	82,4	0,047	70,6	0,877
	2	58,3		52,1		64,6	
	3	50		40		70	



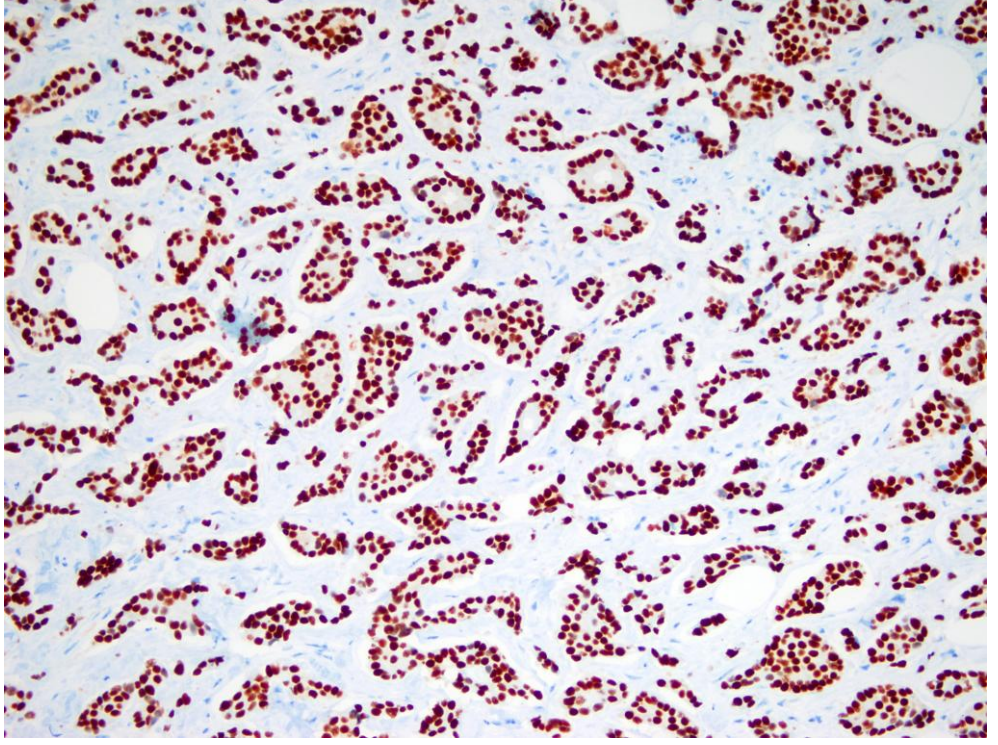
**Şekil 2.** Derece 1 İDK, Histolojik Görünümü (HE X 200).



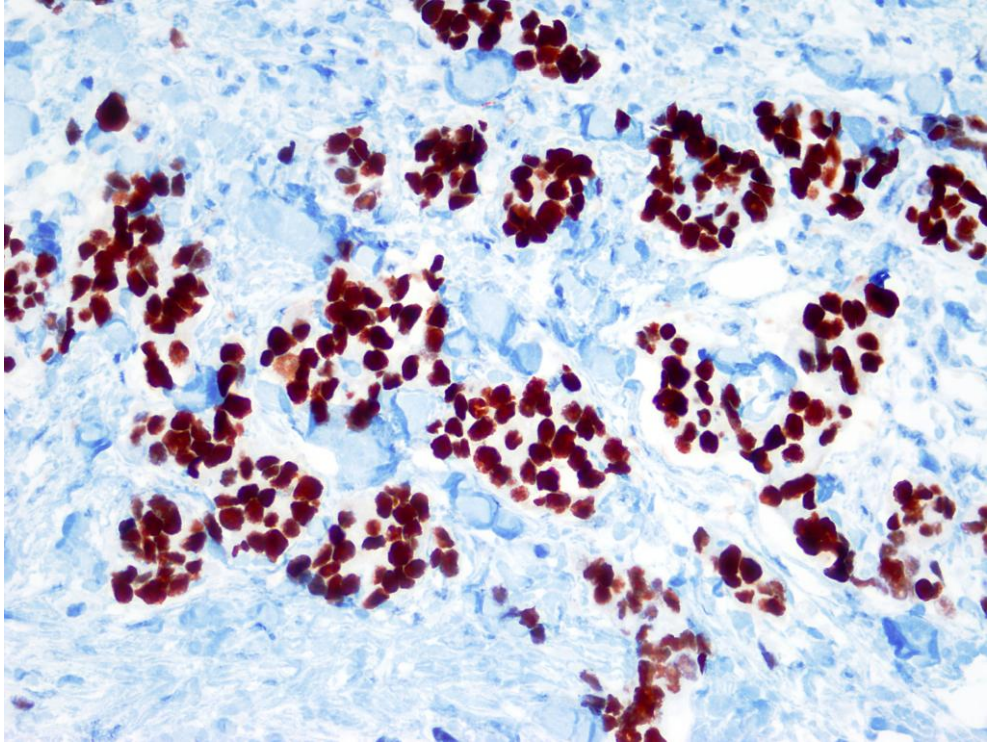
**Şekil 3.** Derece 2 İDK, Histolojik Görünümü (HE X 100).



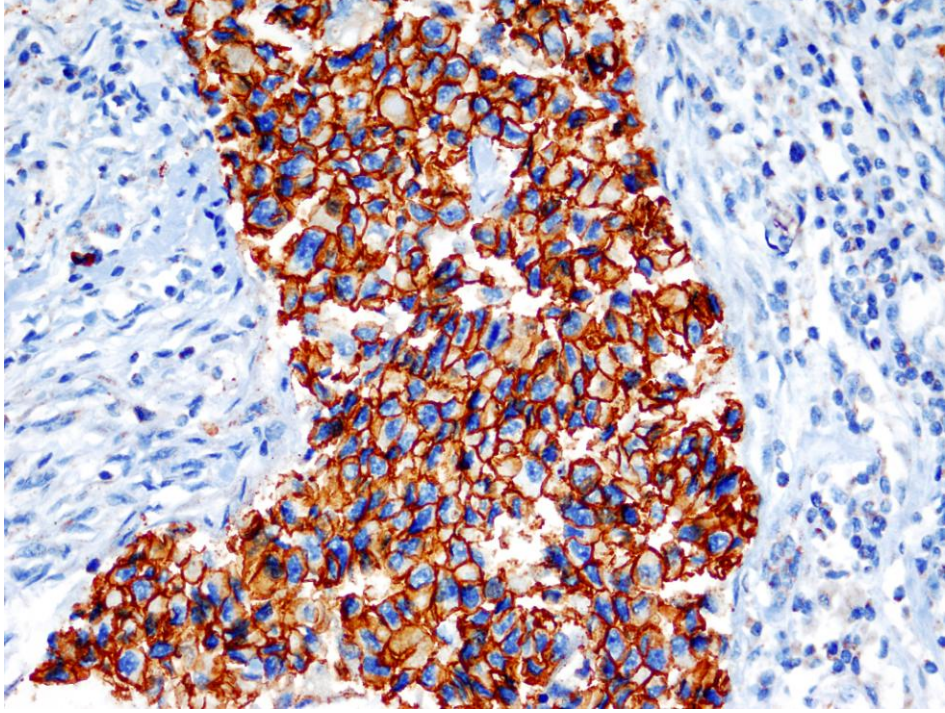
**Şekil 4.** Derece 3 İDK, Histolojik Görünümü (HE X 400).



Şekil 5. Derece 1 İDK, Östrojen Pozitifliği (X 100).



Şekil 6. Derece 1 İDK, Progesteron Pozitifliği (X 200).

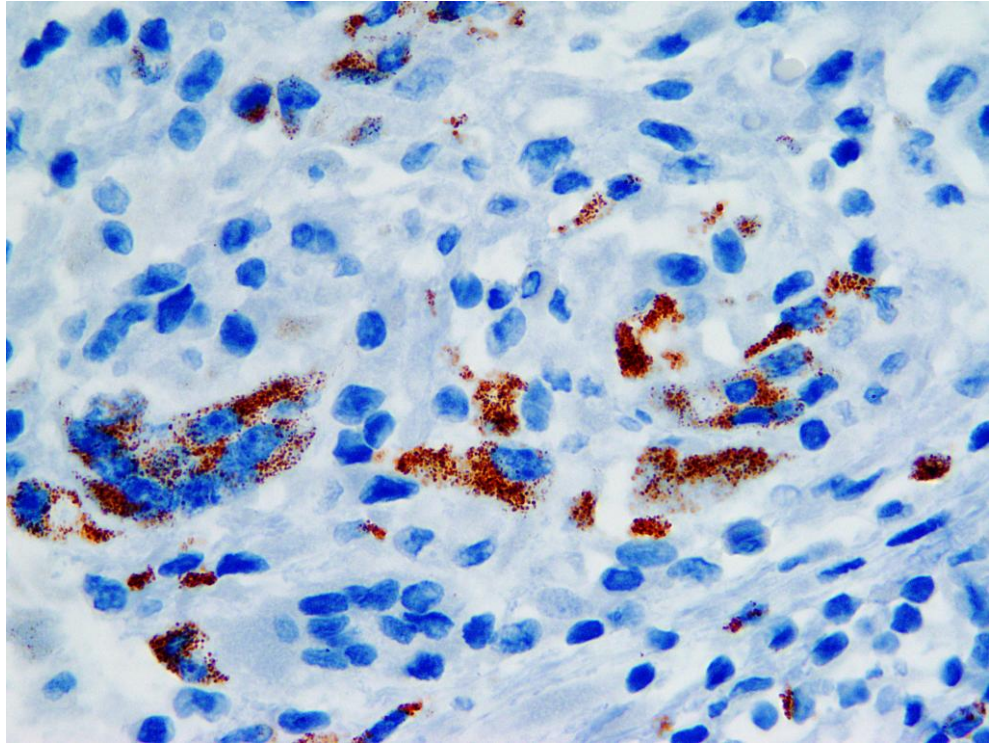


**Şekil 7.** Derece 3 İDK, c-erbB2 Pozitifliği (X 400).

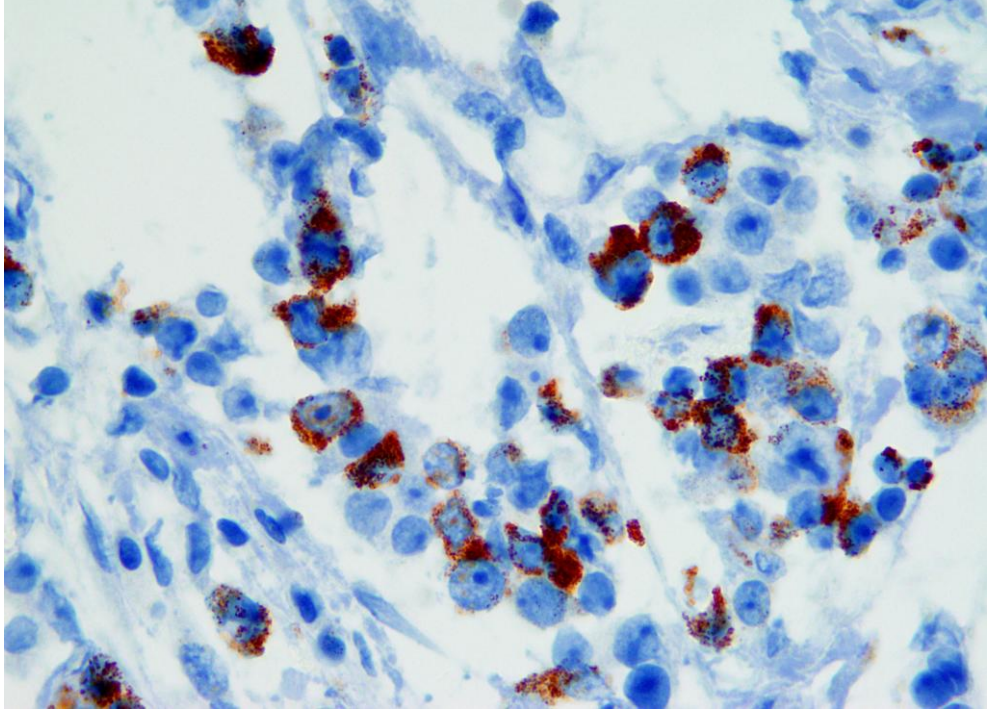
**Bax:** İnvaziv duktal karsinomlu 75 olgunun 59'unda (% 78,70) Bax ile boyanma gözlenmezken, 16 olguda (% 21,30) pozitif sitoplazmik boyanma izlendi (Şekil 8, 9). Bax ile hasta yaşı, tümör çapı ve tümör derecesi arasında anlamlı ilişki bulunamadı. Elli yaşın üstündeki hastaların % 28,90'ında (11/38 olgu) 50 yaş ve altındakilerde ise % 13,50 (5/37 olgu) Bax pozitif boyandı. T1 tümörlerin % 28,60'ı (4/14 olgu), T2 tümörlerin % 18,20'si (10/55 olgu) ve T3 tümörlerin % 33,30'unda (2/6 olgu) pozitif Bax boyanması mevcuttu. Derece 1 tümörlerin % 5,90'ında (1/17 olgu), derece 2 tümörlerin % 25,00'inde (12/48 olgu) ve derece 3 tümörlerin % 30,00'unda (3/10 olgu) Bax pozitif. Ayrıca ÖR, PR ve c-erbB2 ile de istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcut değildi (Tablo 7).

**Tablo 7.** Bax'ın olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri

Özellik		% Bax	P değeri
Yaş	>50	28,9	0,103
	≤ 50	13,5	
Tümör Çapı(cm)	≤2	28,6	0,528
	2.1-5	18,2	
	>5	33,3	
Derece	1	05,9	0,197
	2	25,0	
	3	30,0	
ÖR Durumu	Negatif	31,0	0,103
	Pozitif	15,2	
PR Durumu	Negatif	21,9	0,921
	Pozitif	20,9	
c-erbB2 Durumu	Negatif	24,0	0,690
	Pozitif	20,0	



**Şekil 8.** Derece 1 İDK, Bax pozitifliği (X 1000).

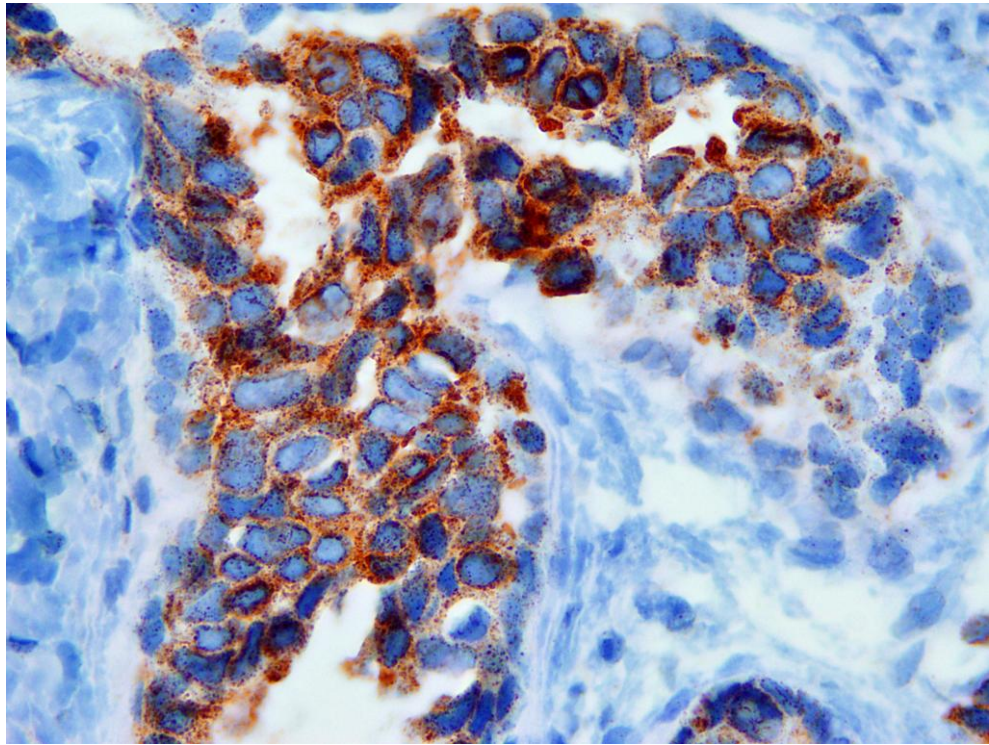


**Şekil 9.** Derece 2 İDK, Bax pozitifliği (X 1000).

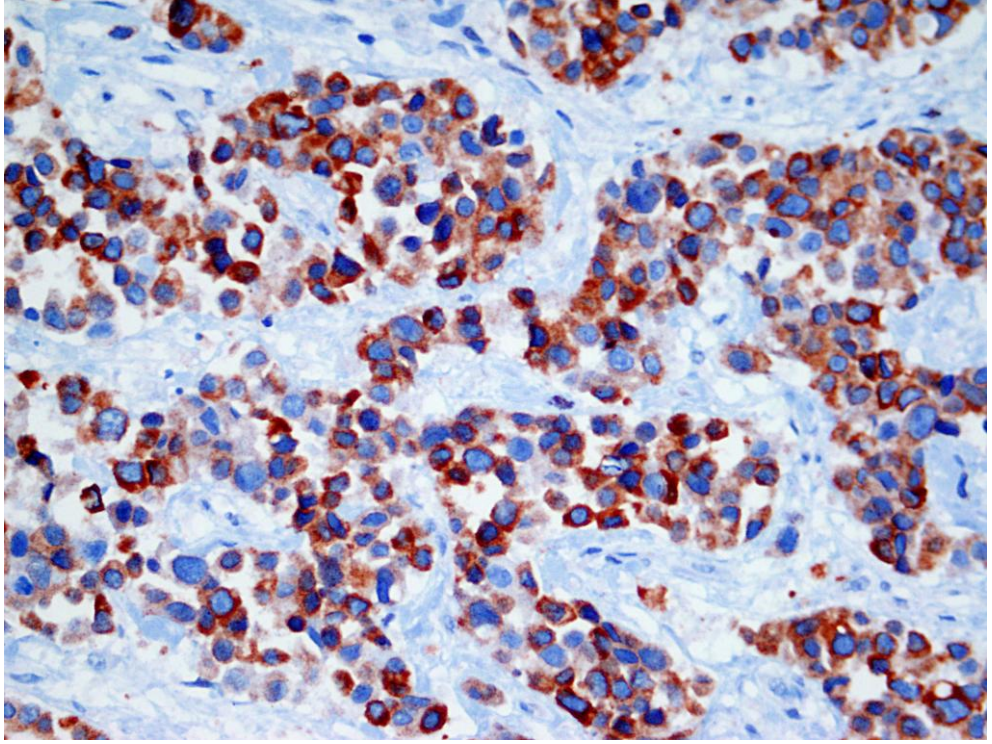
**Bcl-2:** Yetmiş beş adet olgunun % 32,00'si (24 olgu) Bcl-2 negatif, % 68,00'i (51 olgu) pozitif olarak değerlendirildi. Boyanma sitoplazmada lokalizeydi (Şekil 10-12). 50 yaşın üstündekilerde Bcl-2 27/38 olguda (% 71,10), 50 yaş ve altındakilerde ise 24/37 olguda (% 64,90) pozitif bulundu. Bcl-2 ile hasta yaşı ve tümör çapı arasında anlamlı ilişki bulunamadı. Bcl-2 pozitifliği T1 tümörlerde % 71,40 (10/14 olgu), T2 tümörlerde % 67,30 (37/55 olgu), T3 tümörlerde ise % 66,70 (4/6 olgu) olarak değerlendirildi. Derece 1 tümörlerde % 88,20 (15/17 olgu), derece 2 tümörlerde % 64,60 (31/48 olgu), derece 3 tümörlerde ise % 50,00 (5/10 olgu) Bcl-2 pozitifliği bulundu. Bcl-2 ve tümör derecesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ( $p=0,080$ ) derece arttıkça pozitiflik azalmaktaydı. ÖR pozitif 46 olgunun % 80,40'ında (37 olgu) Bcl-2 de pozitif bulundu. ÖR ve Bcl-2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttu ( $p=0,004$ ). Ayrıca PR pozitif olan 43 olgunun % 88,40'ında (38 olgu) Bcl-2 de pozitif boyandı. Bu iki belirleyici de istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,000$ ). Ancak Bcl-2 ile c-erbB2 arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildi (Tablo 8).

**Tablo 8.** Bcl-2'nin olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri

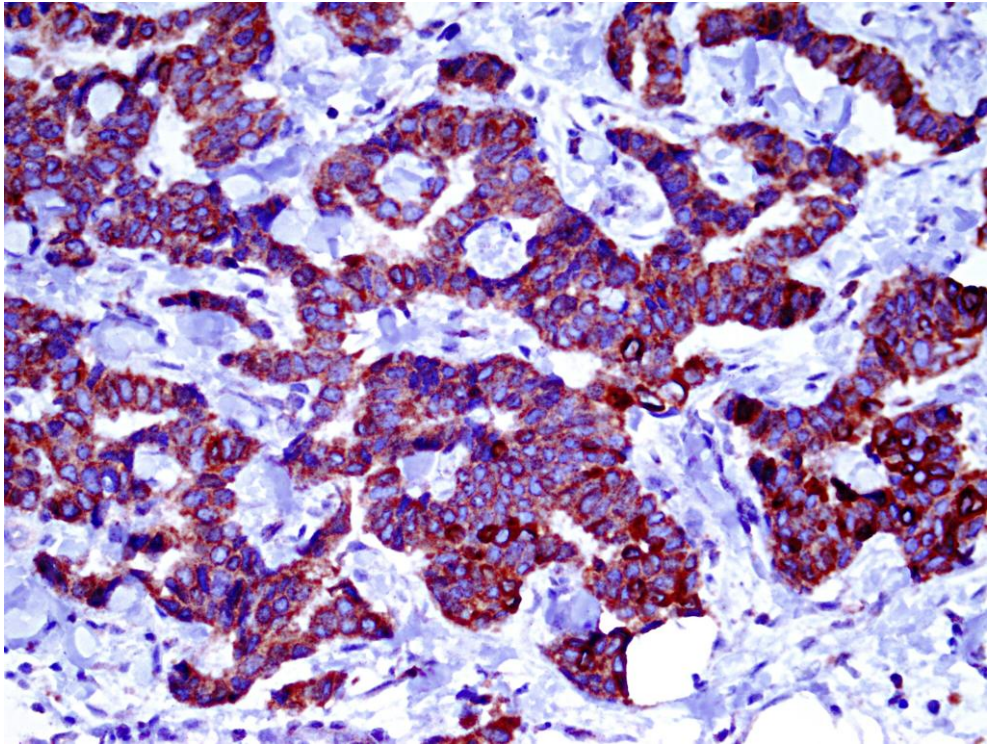
Özellik		%Bcl-2	P değeri
Yaş	>50	71,1	0,566
	≤ 50	64,9	
Tümör Çapı(cm)	≤2	71,4	0,954
	>5	66,7	
Derece	1	88,2	0,084
	2	64,6	
	3	50,0	
ÖR Durumu	Negatif	48,3	0,004
	Pozitif	80,4	
PR Durumu	Negatif	40,6	0,000
	Pozitif	88,4	
c-ErbB2 Durumu	Negatif	72,0	0,600
	Pozitif	66,0	



**Şekil 10.** Derece 1 İDK, Bcl-2 pozitifliği (X 1000).



Şekil 11. Derece 2 İDK, Bcl-2 pozitifliği (X 400).

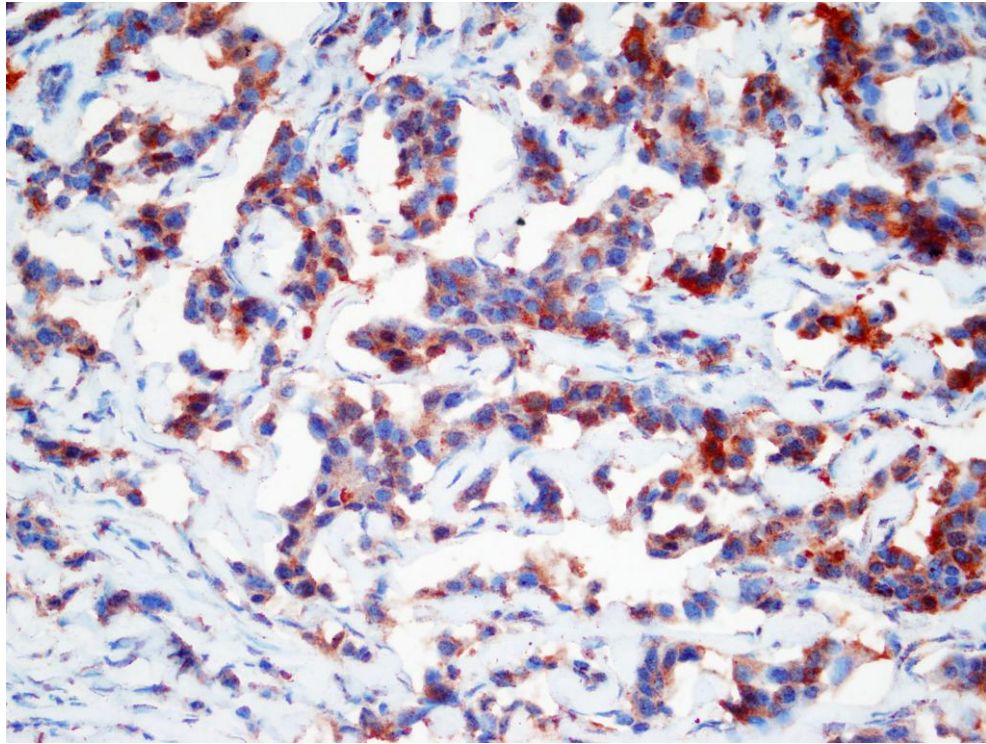


Şekil 12. Derece 3 İDK, Bcl-2 pozitifliği (X 400).

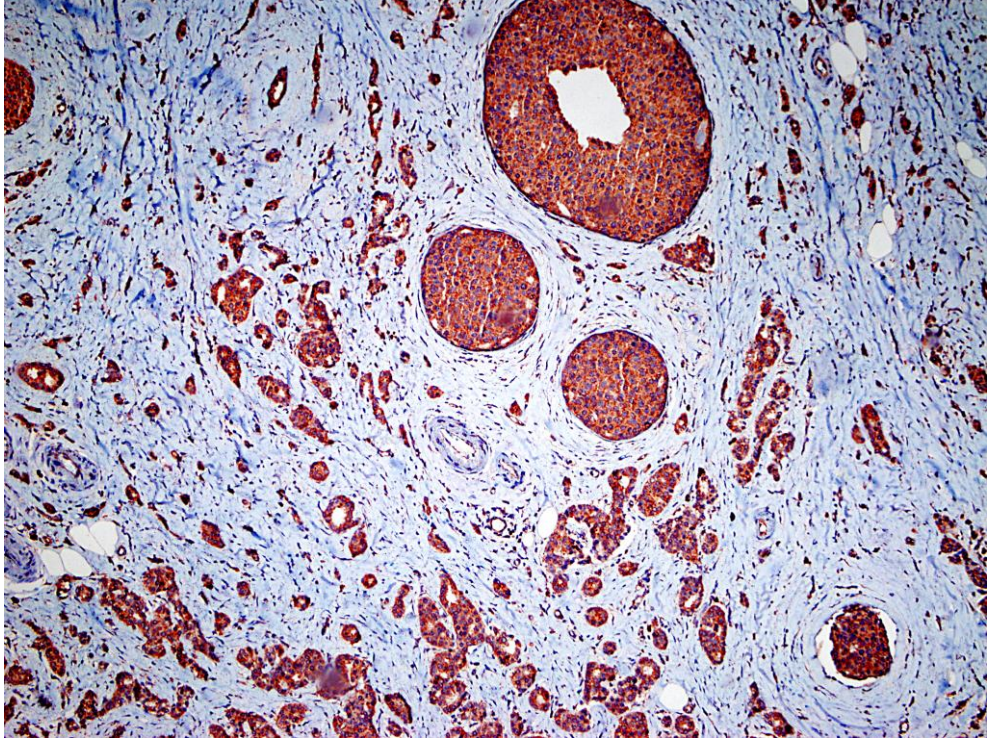
**hTERT:** Yetmiş beş olgunun % 41,30'u (31 olgu) hTERT ile negatif boyanma ve % 58,70'i (44 olgu) pozitif boyanma gösterdi (Şekil 13-15). Elli yaşın üstündekilerde hTERT pozitifliği % 60,50 (23/38 olgu), 50 yaş ve altındakilerde ise % 59,50 (22/37 olgu) bulundu ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,925$ ). T1 tümörlerin % 57,10'u, T2 tümörlerin % 60,00'ı ve T3 tümörlerin ise % 66,70'i hTERT pozitifliği. Ancak hTERT ile tümör çapı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,924$ ). Derece 1 tümörlerde % 29,40 (5/17 olgu), derece 2 tümörlerde % 66,70 (32/48 olgu) ve derece 3 tümörlerde % 70,00 (7/10 olgu) hTERT pozitifliği bulundu. hTERT ile derece arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,020$ ) bir ilişki mevcuttu. hTERT ile ÖR, PR ve c-erbB2 arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı değildi. ÖR pozitif 46 vakanın 40'ında (% 87,00), ÖR negatif 29 olgunun 21'inde (% 72,40) hTERT pozitifliği. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da ÖR pozitif vakalarda hTERT pozitifliğinin daha fazla olduğu saptandı. PR pozitif 43 vakanın 37'sinde (% 86,00), PR negatif 32 vakanın 24'ünde (% 75,00) hTERT pozitifliği vardı. ÖR'de olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte PR pozitif vakalarda hTERT pozitifliği PR negatif vakalara göre daha fazlaydı. c-erbB2 pozitif olan olgularda hTERT pozitifliği % 84,00 (42/50 olgu), c-erbB2 negatif vakalarda ise % 76,00 (19/25 olgu) olarak değerlendirildi. Her ne kadar c-erbB2 pozitif olan vakalarda hTERT pozitifliği c-erbB2 negatif vakalara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 9).

**Tablo 9.** hTERT'in olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri

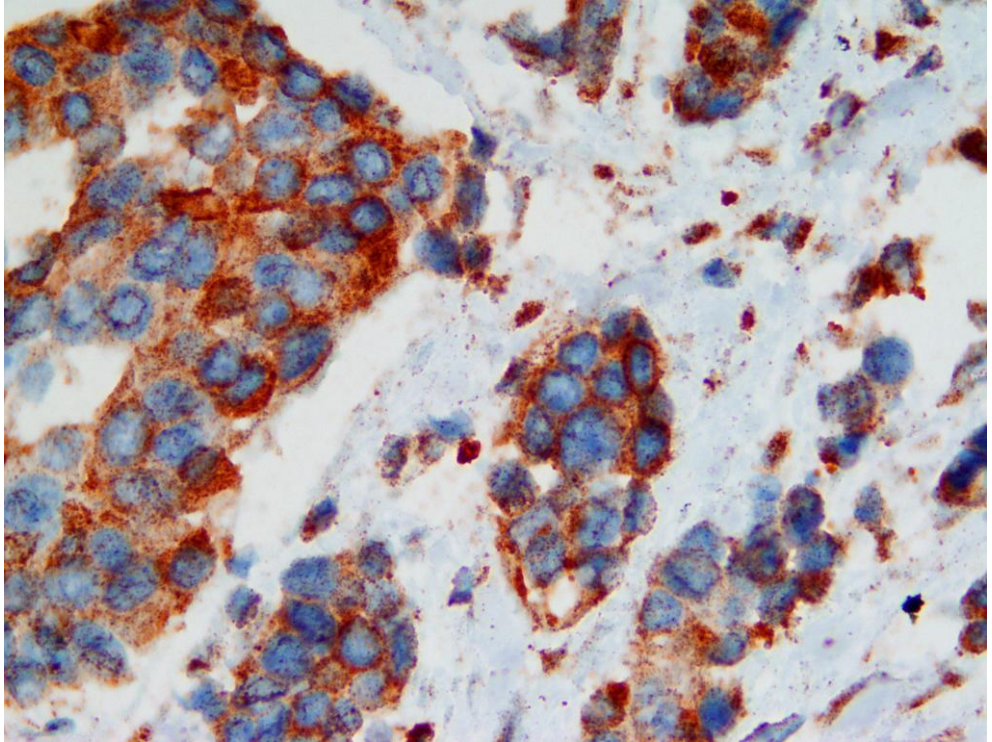
	Özellik	% hTERT	P değeri
<b>Yaş</b>	>50	60,5	0,925
	≤ 50	59,5	
<b>Tümör Çapı(cm)</b>	≤2	57,1	0,924
	2.1-5	60,0	
	>5	66,7	
<b>Derece</b>	1	29,4	0,020
	2	66,7	
	3	70,0	
<b>ÖR Durumu</b>	Negatif	72,4	0,115
	Pozitif	87,0	
<b>PR Durumu</b>	Negatif	75,0	0,225
	Pozitif	86,0	
<b>c-ErbB2 Durumu</b>	Negatif	76,0	0,402
	Pozitif	84,0	



**Şekil 13.** Derece 1 İDK, hTERT pozitifliği (X 400).



Şekil 14. Derece 1 İDK ve DKİS, hTERT pozitifliği (X 100).

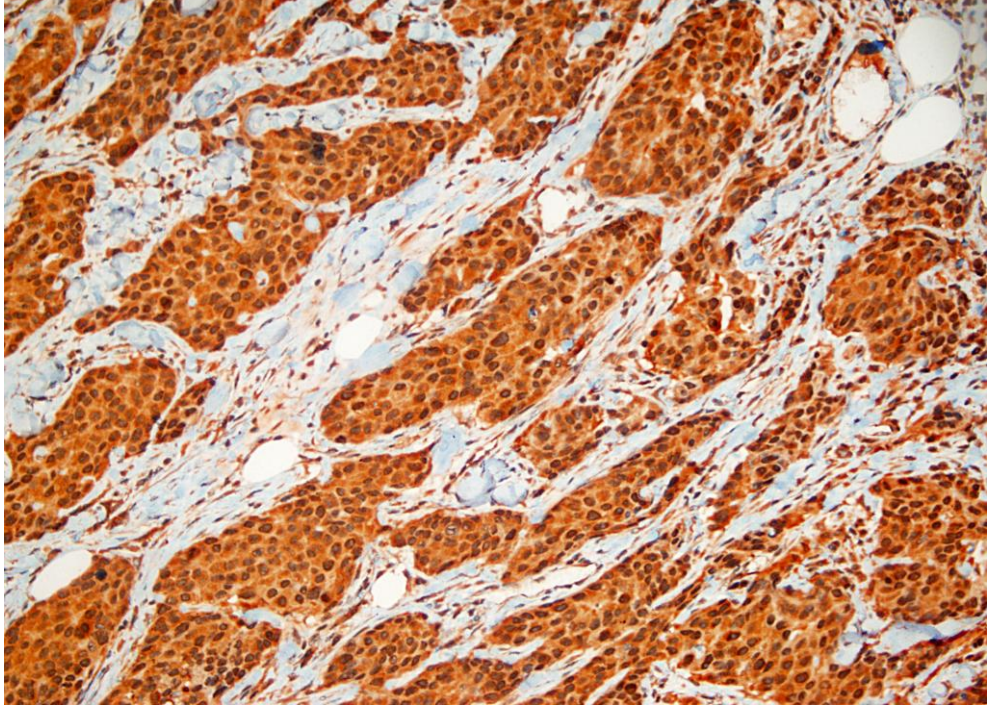


Şekil 15. Derece 2 İDK, hTERT pozitifliği (X 1000).

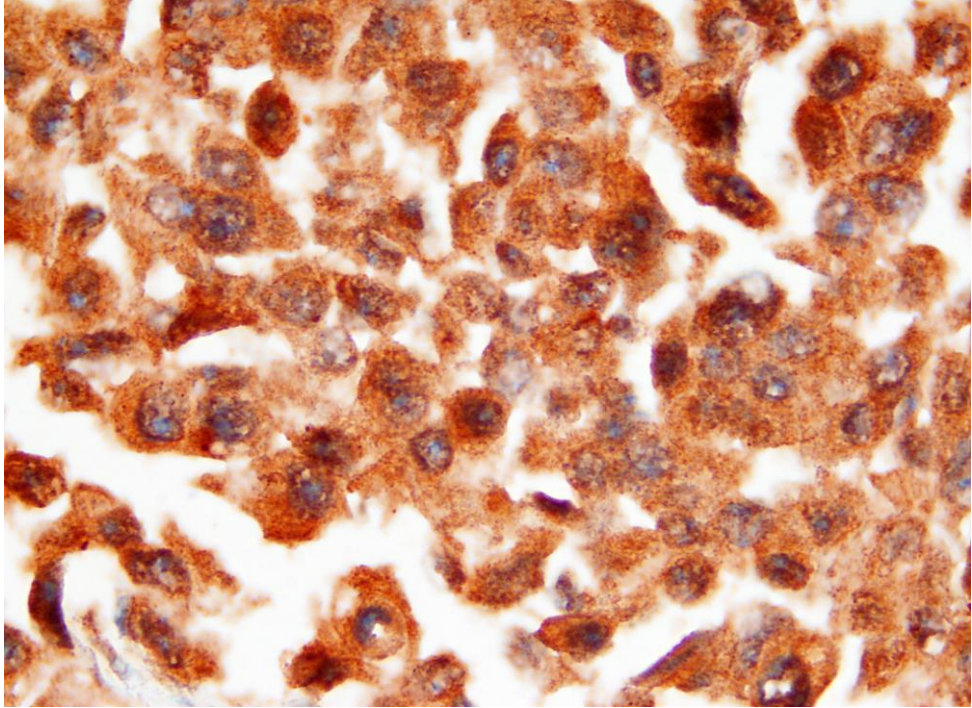
**BNIP3:** Yetmiş beş olgunun % 53,30'unda BNIP3 ile boyanma izlenmezken % 46,70'inde sitoplazmada lokalize pozitif boyanma görüldü (Şekil 16-18). Elli yaşın üstündeki hastalarda BNIP3 pozitifliği % 44,70, 50 yaş ve altında ise % 48,60 olarak bulundu. T1, T2 ve T3 tümörlerde BNIP3 pozitifliğini sırasıyla % 57,10, % 47,30 ve % 16,70 olarak tesbit edildi. BNIP3 pozitifliği derece 1 tümörlerde % 76,50 (13/17 olgu), derece 2 tümörlerde % 41,70 (20/48 olgu) ve derece 3 tümörlerde ise % 20,00 (2/10 olgu) olarak değerlendirildi. BNIP3 ile derece arasında istatistiksel olarak anlamlı (p=0,009) bir ilişki vardı. Ancak yaş ve çap ile ilişki mevcut değildi. ÖR, PR, c-erbB2 ve BNIP3 ile de istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (Tablo 10, Tablo 11).

**Tablo 10.** BNIP3'ün olgu özelliklerine göre pozitif boyanma yüzdeleri ve p değerleri

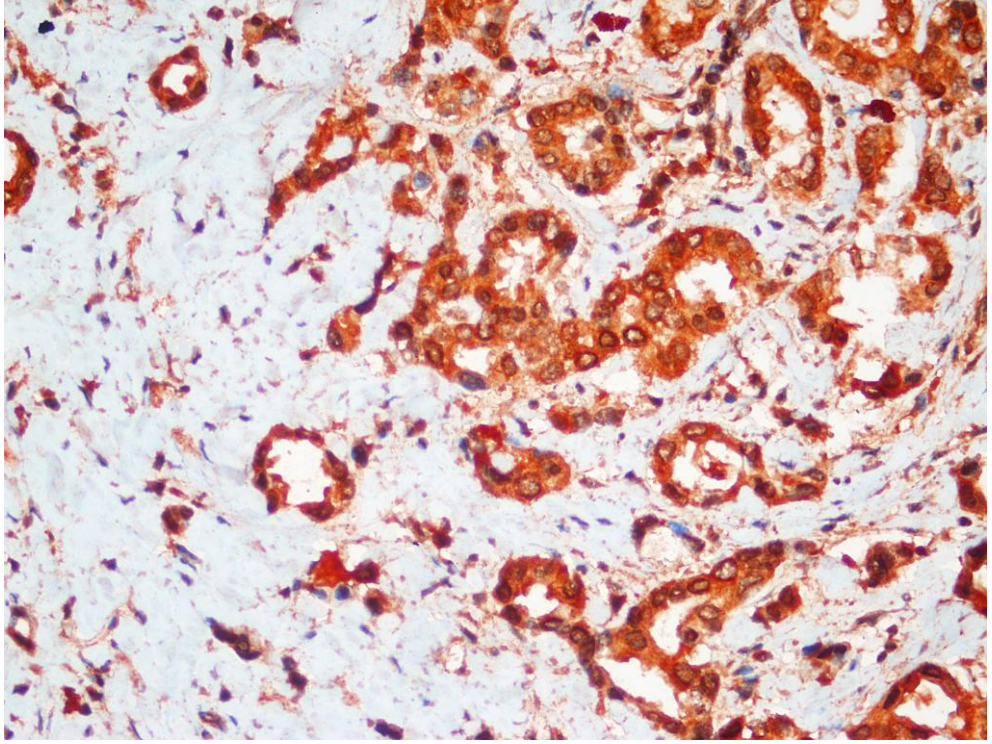
	<b>Özellik</b>	<b>% BNIP3</b>	<b>P değeri</b>
<b>Yaş</b>	>50	44,7	0,317
	≤ 50	48,6	
<b>Tümör Çapı(cm)</b>	≤2	57,1	0,464
	>5	16,7	
<b>Derece</b>	1	76,5	0,009
	2	41,7	
	3	20,0	
<b>ÖR Durumu</b>	Negatif	96,6	0,564
	Pozitif	93,5	
<b>PR Durumu</b>	Negatif	93,8	0,761
	Pozitif	95,3	
<b>c-erbB2 Durumu</b>	Negatif	92,0	0,467
	Pozitif	96,0	



Şekil 16. Derece 2 İDK, BNIP3 pozitifliği (X 400).



Şekil 17. Derece 3 İDK, BNIP3 pozitifliği (X 1000).



Şekil 18. Derece 1 İDK, BNIP3 pozitifliği (X 200).

**Tablo 11.** Boyanma özelliklerine göre olgu sayısı ve yüzdeleri

Özellik	Olgu sayısı	%
<b>Bax durumu</b>		
Negatif	59	78,67
Pozitif	16	21,33
<b>Bcl-2 durumu</b>		
Negatif	24	32,00
Pozitif	51	68,00
<b>hTERT durumu</b>		
Negatif	30	40,00
Pozitif	45	60,00
<b>BNIP3 durumu</b>		
Negatif	40	53,33
Pozitif	35	46,67

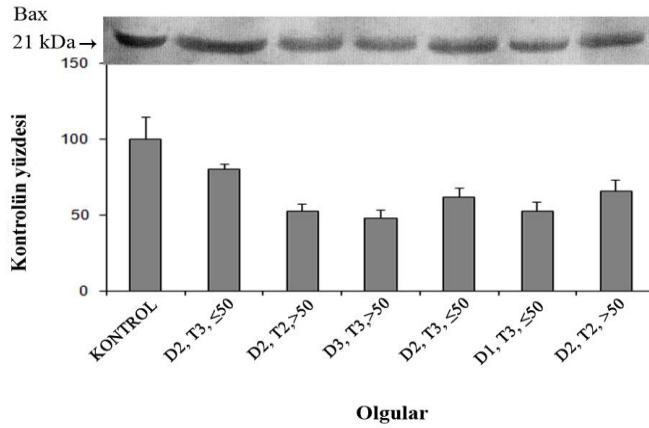
### 3.2. WESTERN BLOT

Western blot çalışmasına dahil edilen altı olgunun yaş ortalaması 52,16 olarak hesaplandı. Tümör çapları 2,5 ile 7,3 cm arasında değişmekte olup ortalama çap 5,15 cm olarak tesbit edildi. Bu değer İHK uygulanan olguların çap ortalamasından (3,51 cm) yüksekti. Olgulardan 1 tanesi derece 3, 4 tanesi derece 2, 1 tanesi derece 1 olarak değerlendirildi (Tablo 12).

**Tablo 12.** Western blot çalışılan olguların özellikleri

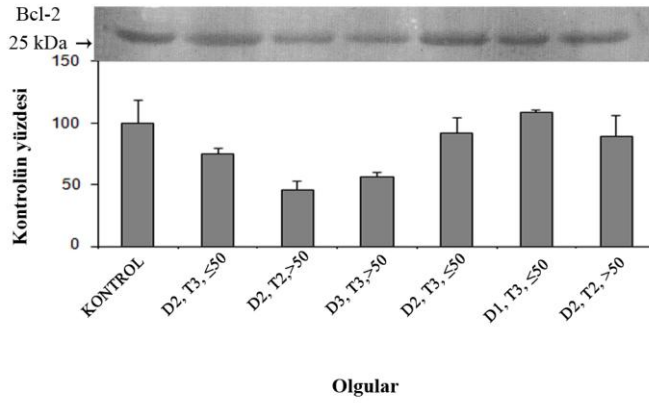
Olgular	Derece	Çap	Yaş
2	D2	5,3 (T3)	37 ( $\leq 50$ )
3	D2	2,5 (T2)	57 ( $>50$ )
4	D3	5,7 (T3)	63 ( $>50$ )
5	D2	5,5 (T3)	50 ( $\leq 50$ )
6	D1	7,3 (T3)	47 ( $\leq 50$ )
7	D2	4,6 (T2)	59 ( $>50$ )
1	Normal meme dokusu (kontrol)		

Bax tüm tümör olgularında kontrole göre düşük bulunmakla birlikte derece 3 olan tek olgumuzda en düşük olduğu görüldü. Derece 1 ve 2 arasında belirgin fark izlenmedi (Şekil 19).



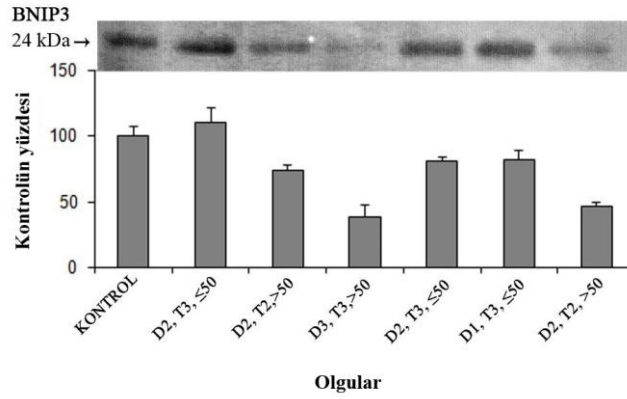
**Şekil 19.** Bax'a ait Western Blot örneği. (Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.)

Derece 1 olan tek olgumuzda Bcl-2, kontrole göre yüksek, derece 2 ve 3 olan tüm olgularda ise kontrole göre düşük bulundu (Şekil 20).



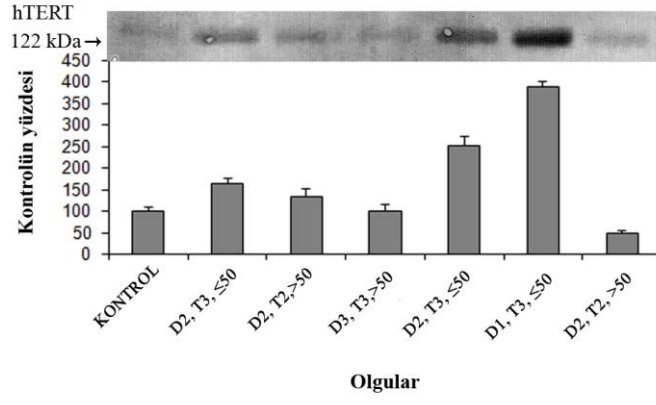
**Şekil 20.** Bcl-2'ye ait Western Blot örneği. (Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.)

BNIP3, derece 3 tümörde kontrole göre belirgin olarak azalmış olup, en düşük düzeye sahipti. Derece 2 ve 1 arasında belirgin fark izlenmedi. Derece 2 tümörlerin sadece 1 tanesi kontrolden yüksek bulundu (Şekil 21).



**Şekil 21.** BNIP3'e ait Western Blot örneği. (Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.)

hTERT için derece 1 tümörde kontrolün yaklaşık dört katı kadar artış görüldü. Derece 3 tümörde kontrolden daha düşüktü. Derece 2 tümörlerin sadece 1 tanesi kontrolden düşük bulundu (Şekil 22).



**Şekil 22.** hTERT'e ait Western Blot örneği. (Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir.)

#### 4. TARTIŞMA

Memenin invaziv karsinomları kadınlarda en sık görülen kanserler olup kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer alır. İnvaziv duktal karsinom ise bu gruptaki en yaygın histopatolojik alt tipi oluşturur (1).

Meme kanserleri çocukluk yaş dönemi hariç herhangi bir yaş grubunda görülebilir. Ailesel olgular hariç 25 yaşın altında nadiren ortaya çıkar. İnsidansı yaşla birlikte artar (11). Genetik yatkınlıkla birlikte doğum yeri, yaş, radyasyon maruziyeti, kontraseptif ajanlar, eksojen östrojen alımı gibi risk faktörleri tanımlanmıştır (1, 10, 11, 15). Prognozu oldukça değişken olup; bazı olgular için meme kanseri olmayan kadınlarla aynı yaşam süresi beklenirken, bazı olgularda ise 5 yıllık yaşama şansı ancak % 13'tür (10).

Tümörün derecesi prognoz açısından oldukça önemlidir. İnvaziv duktal karsinomlarda ve diğer invaziv tümörlerde derecelendirme tübül/gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısı temel alınarak yapılır (1). Yüksek dereceli tümörlerde, lenf düğümü tutulumu ve tümör boyutundan bağımsız olarak, yaşam süresi daha kısa ve uzak metastaz riski daha fazladır (1). Ayrıca histolojik derece kemoterapiye yanıtta oldukça önemlidir. Düşük dereceli hastalarda daha iyi sonuçlar bildirilmiştir (13). Dolayısıyla dereceyi etkileyen faktörlerin de hasta prognozu ve tedavisi açısından önemli olduğu düşünülmekte ve çalışmamızda da olduğu gibi derece ile ilişkili faktörler araştırılmaya devam edilmektedir.

Prognoz açısından önemli faktörlerden birisi de hastanın yaşıdır. Yaş ve menopozal durumun prognoza etkileri tartışmalıdır ancak tanı sırasında 50 yaşından daha küçük olan hastalarda prognozun daha iyi olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (15). Meme tümörlerinde ortalama tanı yaşı 64'dür (10, 11). Çalışmamıza dahil edilen olgularda ise yaş aralığı 29 ile 80 yıl arasında değişmekte olup yaş ortalaması 52,8'dir. Olgularımızın yaş ortalamasının beklenilenden daha küçük olması gelişmiş görüntüleme yöntemleri sayesinde erken tanı oranının artması ile ilişkili olabilir.

Bilindiği gibi tümör çapı evreleme sistemlerinde önemli bir temel dayanağı oluşturmaktadır ve prognoz açısından oldukça değerlidir. Yapılan çalışmalarda artan tümör boyutu ile yaşam süresinin azaldığı ve aksiller lenf düğümü metastazı sıklığının arttığı bulunmuştur (10, 11, 13, 22). Çalışmamıza dahil edilen olgularda

tümör çapı 0,7 ile 14 cm arasında değişmekte olup ortalama çap 3,51 cm'dir. TNM evreleme sistemine göre olguların 14'ünde (% 18,67) tümör çapı 2 cm'den küçük (T1), 55'inde (% 73,33) 2-5 cm arası (T2), 6'sında (% 8,00) ise 5 cm'den büyüktü (T3). Görüldüğü üzere T2 olan olgu sayısı oldukça fazla olup olgularda tümör çapı açısından homojen bir dağılım yoktur.

İnvaziv duktal karsinomda tedaviye yanıtı belirlemede ÖR ve PR durumu oldukça önemlidir (10). Çalışmamızda ÖR ve PR pozitifliği ile hasta yaşı ve tümör çapı arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken, derece ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlendi ( $p=0,050$ ). Derece arttıkça ÖR ve PR pozitifliği azalmakta olup, ÖR ve PR pozitifliğinin daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu söylenebilir.

Tümör hücrelerinin net populasyonu hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Kanser tedavisinde amaç hücre proliferasyonunu azaltmak veya apoptozisi artırmaktır (54). Bcl-2 gen ailesi apoptozisin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Meme kanserleri dahil pek çok tümörde Bcl-2 gen ailesinin işlevinde bozulma olduğu bildirilmiştir (36, 37). Bcl-2 gen ailesinde apoptozisi hem baskılayıcı hem de uyarıcı üyeler mevcuttur (35). Bunlardan Bcl-2, apoptozisi baskılayan, grubun diğer bir üyesi olan Bax ise apoptozisi indükler (36, 39).

Çeşitli yayınlarda meme kanserinde Bcl-2 pozitifliğinin % 40 ile % 65 arasında olduğu bildirilmiştir (8, 35, 52, 54, 55). Çalışmamızda bu oranlara benzer şekilde 75 olgunun 51'inde olmak üzere olguların % 68,00'inde Bcl-2 ile pozitif boyanma tespit edildi. Bcl-2 pozitifliği hastalıksız yaşam süresi ve tüm yaşam süresi gibi iyi prognostik faktörlerle ilişkilidir (8, 36, 40, 56). Prognostik faktörlerden birisi olan hasta yaşı ile Bcl-2 pozitifliği arasındaki ilişkiyi gösteren az sayıda çalışma mevcuttur. Ancak Baccouche ve ark.'nın (55) çalışmasında Bcl-2 salınımı ile olguların yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda da Bcl-2 salınımı ile olguların yaşı arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildi ( $p=0,566$ ).

Kymionis ve ark.'nın (8) çalışmasında Bcl-2 pozitifliğinin küçük tümör boyutu ile ilişkili olduğu bildirilirken, Trere ve ark.'nın (40) çalışmasında Bcl-2 pozitifliği ile tümör boyutu arasında zayıf bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda T1, T2 ve T3 tümörlerde Bcl-2 pozitifliği sırasıyla % 71,40, % 67,30 ve % 66,70 oranlarındaydı ve Bcl-2 pozitifliği ile tümör çapı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,954$ ). Ancak tümör çapı arttıkça Bcl-2 pozitifliğinin bir miktar azaldığı belirlendi. Bu oranların istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması muhtemelen çalışmamızda özellikle T1 (14 olgu) ve T3 (6 olgu) tümöre sahip olgu sayısının az olmasına bağlı olabilir. Bu nedenle tümör boyutları açısından homojen dağılım gösteren daha geniş serilerde yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Navarro ve ark.'nın (36) çalışmasında tümörde derece arttıkça antiapoptotik olan Bcl-2 salınımının azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca düşük dereceli tümörlerde apoptotik indeksin düşük olduğu, yüksek dereceli tümörlerde ise yüksek olduğu yani tümör derecesi ile apoptotik indeksin doğru orantılı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde pek çok çalışmada da Bcl-2 ile tümör derecesinin ilişkili olduğu saptanmıştır (8, 35, 40, 52, 54). Mevcut çalışmamızda Derece 1, 2 ve 3 tümörlerde Bcl-2 pozitifliği sırasıyla % 88,2, % 64,6 ve % 50 olarak belirlendi. Bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,084$ ). Ancak derece arttıkça Bcl-2 pozitifliğinin literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde azaldığı görüldü. Yüksek dereceli tümörlerde apoptozisin artmış olması ve derece arttıkça Bcl-2 pozitifliğinin azalması, apoptozis kontrolünde Bcl-2'nin önemini göstermektedir.

Çeşitli yayınlarda ÖR ve PR pozitifliği ile Bcl-2 salınımı arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (8, 35, 40, 52, 54, 55). Çalışmamızda ÖR pozitif vakaların % 80,40'ında Bcl-2 de pozitif bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,004$ ) olduğu belirlendi. Ayrıca PR pozitif olan vakaların % 88,4'ünde Bcl-2 de pozitif boyanma gösterdi ve PR ile Bcl-2 arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,00$ ). ÖR ve PR pozitif tümörlerde Bcl-2 salınımının da yüksek olması, Bcl-2 salınımının ortamdaki steroid hormonların artışı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Kötü prognoz ile ilişkili olduğu ileri sürülen c-erbB2 meme tümörlerinin %20-30'unda pozitifdir. Rehman ve ark.'nın (52) Bcl -2 ile c-erbB2 arasında anlamlı bir ilişki bulamadıklarını belirtmekle birlikte Bcl-2 ile c-erbB2'nin ilişkili olduğunu belirten yayınlar da bulunmaktadır (35, 40). Ancak çalışmamızda da Bcl-2 ile c-erbB2 arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildi ( $p=0,600$ ).

Meme tümörlerinde Bax pozitifliği için literatürde % 12 ile % 75 arasında değişen oranlar bildirilmiştir (8, 52, 54, 55). Çalışmamızda Bax pozitifliği % 21,3 olarak belirlenmiştir. Bcl-2 için olduğu gibi hasta yaşı ile Bax pozitifliğinin ilişkisini gösteren yeterli sayıda yayın mevcut değildir. Baccouche ve ark. (55) Bax ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunamamışlardır. Çalışmamızda 50 yaş üstündeki olguların % 28,90'ında 50 yaş altındaki olguların ise % 13,50'sinde Bax ile pozitiflik belirlenmiş olup bu oran istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,103$ ). Bax pozitifliği ile tümör boyutu arasında bir ilişkinin olup olmadığı da araştırma konusu olmuştur. Kymionis ve ark. (8) ile Krajevski ve ark.'nın (35) çalışmalarında, Bax pozitifliği ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığı belirtilmiştir. Çalışmamızda da T1, T2 ve T3 tümörlerde Bax pozitifliği sırasıyla % 28,60, % 18,20 ve % 33,30 olarak bulunmuş olup istatistiksel anlamlılık yoktu ( $p=0,528$ ).

Benzer şekilde Bax pozitifliği ile tümörün derecesi arasındaki ilişkiyi araştıran çeşitli çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (8, 35, 52, 54). Nitekim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edildi ( $p=0,197$ ).

Kymionis ve ark.'nın (8) çalışmasında ÖR ve PR pozitifliği ile Bax salınımı arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir. ÖR ile Bax arasında anlamlı ilişki olmadığını belirten başka çalışmalar da mevcuttur (35, 52, 54). Çalışmamızda da benzer şekilde Bax ile ÖR ve PR pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulunamadı ( $p=0,103$ ,  $p=0,921$ ). Yine çalışmamızda Bax ile c-erbB2 salınımı arasında da anlamlı bir ilişki belirlenemedi ( $p=0,690$ ). Rehman ve ark.'na (52) göre de Bax ve c-erbB2 uyumlu değildir ancak Krajevski ve ark. (35) Bax pozitifliği ile c-erbB2 pozitifliği arasındaki ilişkiyi anlamlı bulduklarını bildirmektedirler.

Bax ile yapılan çalışmalarda, İDK'da birçok parametre ile birçok farklı sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlara göre ise Bax salınımı ile yaş, derece, çap ve hormonal durum arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildir. Bu durum Bax'ın regülasyon mekanizmalarının oldukça kompleks olduğunu göstermektedir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması için ileri moleküler çalışmalara gerek olduğunu düşünüyoruz.

Antiapoptotik olan Bcl-2'nin daha iyi prognostik faktörlerle ilişkili olması aslında anlaşılması zor bir durumdur. Bunun nedenlerinden birisi Bcl-2 ailesindeki, Bax gibi proapoptotik üyelerin, Bcl-2 etkisine ters etki yapması ile açıklanabilir (56).

Nitekim hücre proliferasyonunun anormal derecede artması, başta Bax olmak üzere apoptozu uyaran genlerin aşırı aktivasyonuna neden olarak Bcl-2'nin etkisini inhibe etmesi önemli bir etken olarak görülmektedir. Bu çalışmada derece arttıkça Bcl-2 azalırken, Bax istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmaktaydı.

BNIP3, Bcl-2 ailesinin bir üyesidir ve hipoksik durumlarda artış gösterir (6, 41, 42). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, normal meme dokuları ile karşılaştırıldığında DKİS ve invaziv meme karsinomlarında neoplastik hücrelerin sitoplazma ve nükleuslarında BNIP3 anlamlı olarak yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bu da otofaji, hücre ölümü ve yaşam süresinde rolü olan BNIP3'ün asıl işlevinin insitu karsinomdan invaziv karsinoma geçiş sırasında, meme kanserinin neoplastik ilerleyişinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (6, 42). DKİS'de BNIP3 salınımı yüksek derece, nekrotik fenotip ve invaziv hastalığın varlığı ile ilişkilidir (57).

Çalışmamızda 50 yaşın üstündeki olgularda BNIP3 pozitifliği % 44,70, 50 yaş ve altındaki olgularda ise % 48,60'dır. BNIP3 salınımı ile hasta yaşı arasında anlamlı bir ilişki yoktu ( $p=0,317$ ). Yine çalışmamızda T1, T2 ve T3 tümörlerde BNIP3 pozitifliği sırasıyla % 57,10, % 47,30 ve % 16,70 olarak değerlendirilmiş olup, BNIP3 salınımı ile çap arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,464$ ). Derece 1, derece 2 ve derece 3 tümörlerde BNIP3 pozitifliği sırasıyla % 76,50, % 41,70 ve % 20,00 olup BNIP3 salınımı ile tümör derecesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,009$ ). İDK'da prognozun belirlenmesinde çok önemli olan derecenin, BNIP3 ile olan anlamlı ilişkisi, BNIP3'ün de prognoz hakkında bilgi verebilecek değerli bir belirleyici olduğunu göstermektedir. BNIP3 ile hormonal durumu karşılaştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda BNIP3 ile ÖR ve PR pozitiflikleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,564$ ,  $p=0,761$ ). c-erbB2, Bcl-2 gen ailesi üyelerinin salınımını antiapoptotik fenotip yönünde etkilemektedir, dolayısıyla antiapoptotik olan BNIP3'ün de salınımını artırır (58). Ancak çalışmamızda BNIP3 salınımı ile c-erbB2 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir ( $p=0,467$ ).

Hücrenin her bölünmesinde kısalan telomerlerin onarımı telomeraz ile sağlanır (50). Telomeraz artışı zamanla hücreyi ölümsüz hale getirir. Telomeraz aktivitesi için bir belirleyici olan hTERT, normal somatik hücrelerde yoktur ancak

memenin DKİS gibi preinvaziv lezyonları ve meme kanserlerinde salınımı artmıştır (45, 59). Çeşitli çalışmalarda İDK'da hTERT pozitifliği için % 50 ile % 90 arasında değerler bulunmuştur (60-66). Çalışmamızda ise hTERT pozitifliği % 58,7 olarak değerlendirildi. Az sayıda çalışmada hTERT ile hasta yaşı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (7, 63). Çalışmamızda da hTERT ile hasta yaşı arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p=0,925$ ). T1, T2 ve T3 tümörlerde hTERT pozitifliği sırasıyla % 57,10, % 60,00 ve % 66,70 olup çap arttıkça hTERT pozitifliği artmaktaydı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,924$ ). Telomeraz aktivitesi ile tümör boyutu arasında ilişki olmadığını belirten yayınlar olduğu gibi telomeraz pozitif tümörlerin daha çok  $\geq 2$  cm olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur (60, 66, 67). Ayrıca Mokbel ve ark. (60) telomeraz pozitif tümörlerin daha çok derece 3 olduğunu, dolayısıyla hTERT pozitifliği ile derece arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu bildirmiştir (62, 67). Çalışmamızda derece 1, derece 2 ve derece 3 tümörlerde hTERT pozitifliği sırasıyla % 29,40, % 66,70 ve % 70,00 olarak değerlendirildi. Derece arttıkça hTERT pozitifliği de belirgin olarak artmaktaydı. Çalışmamızda hTERT ile derece arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptandı ( $p=0,020$ ). hTERT salınımı DKİS gibi preinvaziv meme lezyonlarında artmıştır ve bu telomeraz aktivitesinin meme karsinogenezinin erken döneminde etkili olduğunu düşündürmektedir (64). Meme kanserlerinde lenf düğümü tutulumu ile telomeraz aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu durum hTERT'in hem karsinogenezde hem de metastazlarda etkili olduğunu düşündürmektedir (45).

Telomeraz aktivitesi hormon bağımlı mekanizmalarla kontrol edilir. Endometriumda telomeraz aktivitesi menstrual fazlara göre değişiklik gösterir. Bu da seks steroidlerinin hücrel yaşlanma ve kanserde rolü olduğunu düşündürmektedir (59). Daha önce yayınlanan birçok yayında telomeraz aktivitesi ile ÖR ve PR pozitifliği arasında anlamlı ilişki olduğu belirtilmiştir (59, 68, 69). Ancak bunun tersini, yani hTERT pozitifliği ile ÖR ve PR pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını bildiren çalışmalar da vardır (7, 67). Yaptığımız çalışmada da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,115$ ,  $p=0,225$ ). ÖR pozitif 46 vakanın 40'ında (% 87), ÖR negatif 29 vakanın 21'inde (% 72,4) hTERT pozitifliği mevcuttu. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da ÖR pozitif vakalarda hTERT pozitifliği daha fazladır. PR pozitif 43 vakanın 37'sinde (% 86), PR negatif

32 vakanın 24'ünde (% 75,00) hTERT pozitifdir. ÖR'de olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da PR pozitif vakalarda hTERT pozitifliği PR negatif vakalara göre daha fazladır. Bu duruma rağmen sonuçlarımızın istatistiksel olarak anlamlı olmaması vaka sayımızın az olmasına bağlı olabilir. Divella ve ark. (69) yüksek hTERT seviyeleri ile yüksek HER2/Neu seviyesi arasında, Kalogeraki ve ark. (62) da telomeraz aktivitesi ile HER2 salınımı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda ise c-erbB2 pozitif olan vakalarda hTERT pozitifliği % 84,00, c-erbB2 negatif olgularda ise % 76,00'dır. Her ne kadar c-erbB2 pozitif olan vakalarda hTERT pozitifliği, c-erbB2 negatif vakalara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,402).

İmmünohistokimya yöntemine göre derece 1 tümörlerde Bcl-2 pozitifliği için % 88,2 gibi yüksek bir değer elde edilmiş olup derece arttıkça Bcl-2 pozitifliği azalmaktadır. Western blot çalışmamızda da derece 1 olan tek olgumuzda Bcl-2 kontrole göre yüksek, derece 2 ve 3 olan tüm olgular kontrole göre düşük bulunmuştur. Böylece İHK ile elde edilen Bcl-2'nin apoptozisteki rolünün önemi western blot yöntemi ile de doğrulanmıştır.

İmmünohistokimya sonuçlarına göre tümör derecesi ile Bax pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ancak derece ile birlikte Bax pozitifliğinde hafif bir artış mevcuttur. Western blot yönteminde ise Bax tüm tümör olgularında kontrole göre düşük bulunmakla birlikte derece 3 olan tek olgumuzda en düşük değerdedir. Diğer tümörlerde ise birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bax için İHK ve western blot yöntemlerinde farklı sonuçların elde edilmesi Bax'ın tek başına değil birçok gen ya da proteinin kontrolünde proapoptotik etki gösterdiğini düşündürmektedir.

BNIP3'ün western blot yöntemi ile derece 3 tümörde kontrole göre belirgin olarak azalmış ve en düşük düzeyde olması, İHK yönteminde elde edilen istatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlarımızla uyumlu olarak bulunmuştur. Böylece western blot yöntemi ile derece arttıkça belirgin olarak azalan BNIP3'ün, tümörün erken evresinde etkin olduğu ve prognoz hakkında da bilgi verebilecek değerli bir belirleyici olduğunu desteklemektedir.

Western blot yönteminde; hTERT için derece 1 tümörde kontrolün yaklaşık dört katı kadar artış görüldü. Kontrole göre belirgin olan bu artış İHK sonuçlarımızla

da uyumlu olup İDK'da hTERT'in kanser belirleyicisi olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Tümör derecesi yükseldikçe İHK sonuçlarımıza göre hTERT artmaktadır ancak bu sonuçlar western blot ile desteklenememiştir.

Sonuç olarak İDK'da yaş, tümör çapı, tümör derecesi ve reseptör durumları ile Bax, Bcl-2, hTERT ve BNIP3 immunohistokimyasal belirleyicilerini kullanarak telomeraz ve apoptozis arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimiz bu çalışmada:

1. İDK'da telomeraz aktivitesini göstermek amacıyla araştırılan hTERT pozitifliğinin, tümör derecesine bağlı olarak artması, bu tümörlerde telomeraz aktivitesinin tümör gelişimi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir. DKİS alanlarının hTERT pozitif boyanmış olması, tümör gelişiminin erken döneminde telomeraz aktivitesinin etkili olduğunu göstermektedir. hTERT'in normal meme dokusunda negatif olması, bunun önemli bir tümör belirleyicisi olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. hTERT'in tümörün erken dönemindeki etkileri western blot yöntemi ile de doğrulanmıştır.
2. Telomeraz aktivitesi tümör derecesi ile ilişkili olarak artarken, apoptozla ilişkili olan BNIP3 pozitifliğinde bir azalma söz konusudur. Her ikisinin de DKİS alanlarında pozitif olması, tümör gelişiminin erken dönemlerinde telomeraz aktivitesi yanı sıra apoptozun da etkili olduğunu düşündürmektedir.
3. Tümör derecesi arttıkça Bcl-2 ve BNIP3'te azalma, Bax'ta ise artış belirlenmiştir. Bcl-2 ve Bax için elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı değilken, BNIP3 için bulunan değerler anlamlıydı. Bu durum BNIP3'ün İDK'da Bcl-2'ye göre prognoz ya da tedavinin belirlenmesinde daha değerli bir belirleyici olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca BNIP3'ün prognoz hakkında bilgi verebilecek değerli bir belirleyici olması western blot yöntemi ile de doğrulanmıştır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek dereceli tümörlerde apoptozisin artmış olması ve derece arttıkça Bcl-2 pozitifliğinin azalması, apoptozisin kontrolünde Bcl-2'nin önemini göstermekte olup western blot yöntemi ile elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir.

4. ÖR ve PR pozitifliği derece arttıkça, Bcl-2’de olduğu gibi anlamlı bir şekilde azalmakta olup İDK’da hormonal durumun apoptozisin kontrolünde rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca ÖR ve PR pozitif tümörlerde Bcl-2 salınımının da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olması, Bcl-2 salınımının ortamdaki steroid hormonların artışı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.
5. Telomeraz artışının durdurulmasına ve hipoksik hücre ölümünün engellenmesine yönelik tedavi seçenekleri geliştirilebilirse belki de tümörün ilerlemesine engel olunabilecektir. Yine moleküler düzeyde bireydeki bu değişiklikler saptanırsa erken dönem karsinomlarda daha yüz güldürücü sonuçlar elde edilebilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Tavassoli FA, Devilee P. Tumors of the Breast. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours. IARC press: 2003; 1: 10-23.
2. Elliott KA, Rickords LF, Labrum JM. Transduction of E2F-1 TAT fusion proteins represses expression of hTERT in primary ductal breast carcinoma cell lines. *Mol Cancer* 2008; 7: 28-38.
3. Yan P, Benhattar J, Seelentag W, Stehle JC, Bosman FT. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 391-397.
4. Hosseini-Asl S, Atri M, Modarressi MH, Salhab M, Mokbel K, Mehdipour P. The expression of hTR and hTERT in human breast cancer: correlation with clinicopathological parameters. *Int Semin Surg Oncol* 2006; 3: 20-25
5. Keefe DL, Liu L. Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 10-14.
6. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition. *Mol Biotechnol* 2009; 41: 194-199.
7. Kirkpatrick KL, Ogunkolade W, Elkak AE, Bustin S, Jenkins P, Ghilchick M, Newbold RF, Mokbel K. hTERT expression in human breast cancer and non-cancerous breast tissue: correlation with tumour stage and c-Myc expression. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 277-284.
8. Kymionis GD, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, Arzimanoglou I, Leandros E, Chalkiadakis G, Keramopoulos A, Michalas S. Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients? *J Surg Res* 2001; 99: 161-168.
9. Collins LC, Schnitt SJ. Breast: Stacey EM (editor). *Histology for Pathologists*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007: 57-68.

10. Lester SC. The Breast. Kumar V, Abbas A, Fausto N (editors). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Philadelphia, 2005: 1120-1149.
11. Erhan Y, Canda T. Meme Hastalıkları Patolojisi ve Meme Kanseri. Mocan Kuzey G (editor). Temel Patoloji. Ankara: Günes Kitabevi, 2007; 22: 705-739.
12. Dere F. Meme Topografik Anatomisinin Kavranması. Anatomi. 4.Baskı. Adana, 1996; 1: 60-64.
13. Rosen PP. Rosen's Breast Pathology, Chapter 1, 12, 14, 34, Lippincott Williams and Wilkins, 2nd ed; 2001: 1-22, 253-256, 325-364, 627-652.
14. Brunicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE. Meme. Schwartz's Cerrahinin İlkeleri, 8. Baskı. 2008: 479.
15. Rosai J. Breast. Rosai J (editor). Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Mosby Edinburg, 2004; 20: 1763-1877.
16. Özdamar SO, Zergeroglu S. Temel patoloji. Kuzey GM (editör). Meme kanseri. Ankara-Istanbul: Güneş kitabevi; 2007; 22: 723-742.
17. Zerrin Calay. Intraduktal Karsinom ve Lobüler Neoplazi. İ. Ü. Cerrahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2006; 54: 73-78.
18. Shoker BS, Sloane JP. DCIS grading schemes and clinical implications. Histopathology 1999; 35: 393-400.
19. Lester SC. Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (editors). Pathologic Basis of Disease. 8 th edition. Philadelphia, PA. Elsevier Saunders 2010; 1: 3-42.
20. Sivridis E, Giatromanolaki A, Galazios G, Koukourakis MI. Node-related factors and survival in node-positive breast carcinomas. Breast 2006; 15: 382-389.
21. Schnitt SJ, Mills S. The Breast. Mills SE, Carter D, Reuter V, Greenson JK, Stoler MH, Oberman H (editors). Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4th ed. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 9: 355-358.

22. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
23. Turgut B, Demir T, Çeliker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi* 2006; 11: 6-11.
24. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 2002; 326: 27-45.
25. Preethi TR, Chacko P, Kesari AL, Praseeda I, Chellam VG, Pillai MR. Apoptosis in epithelial ovarian tumors. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 273-280.
26. Carr NJ. M30 Expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1768-1772.
27. Kang HJ, Sol ME, Park DY, Lee SH, Shin DH, Kim JY, et al. Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the relationship with the MSI status and the clinicopathological characteristic of colorectal carcinomas. *Korean J Pathol* 2006; 40: 319-325.
28. Abbasoğlu ÖE, Hoşal BM. Apoptosis: It's place in eye diseases. *T Klin J Ophthalmol* 2001; 10: 115-120.
29. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 2: 73-78.
30. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9: 142-148.
31. Zhang JH, Zhang Y, Herman B. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 357-366.
32. Schultz DR, Harrington WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 32: 345-369.
33. Petak I, Houghton JA, Kopper L. Molecular targeting of cell death signal transduction pathways in cancer. *Current Signal Transduction Therapy* 2006; 1: 113-131.

34. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
35. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH, Krajewska M, Reed JC. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 199-208.
36. Gomez-Navarro J, Arafat W, Xiang J. Gene therapy for carcinoma of the breast: Pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 32-44.
37. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536-1538.
38. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-290.
39. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
40. Trere D, Montanaro L, Ceccarelli C, Barbieri S, Cavrini G, Santini D, Taffurelli M, Derenzini M. Prognostic relevance of a novel semiquantitative classification of Bcl2 immunohistochemical expression in human infiltrating ductal carcinomas of the breast. *Ann Oncol* 2007; 18: 1004-1014.
41. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, Kirshenbaum LA, Gibson SB. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* 2003; 22: 4734-4744.
42. Tan EY, Campo L, Han C, Turley H, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL, Fox SB. BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer; opposing functions in in situ versus invasive cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 467-474.
43. Keith WN, Bilisland A, Evans TR, Glasspool RM. Telomerase-directed molecular therapeutics. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4: 1-25.
44. Szutorisz H, Lingner J, Cuthbert AP, Trott DA, Newbold RF, Nabholz M. A chromosome 3-encoded repressor of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene controls the state of hTERT chromatin. *Cancer Res* 2003; 63: 689-695.

45. Wang Y, Hu Z, Liang J, Wang Z, Tang J, Wang S, Wang X, Qin J, Shen H. A tandem repeat of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and risk of breast cancer development and metastasis in Chinese women. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1197-1201.
46. Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 2002; 21: 643-649.
47. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 2002; 21: 3130-3138.
48. Sealey DC, Zheng L, Taboski MA, Cruickshank J, Ikura M, Harrington LA. The N-terminus of hTERT contains a DNA-binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 2019-2035.
49. Bulut H, Doymaz MZ, Durmaz R (Editör). *Blotlama Teknikleri ve Mikrobiyolojide Kullanımı. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. baskı. 2001: 123-137.*
50. Ikeda S, Shibata T, Eishi Y, Takizawa T, Koike M. Correlation between the expression of telomerase reverse transcriptase and proliferative activity in breast cancer cells using an immunocytochemical restaining method. *Pathol Int* 2003; 53: 762-768.
51. Koop EA, van Laar T, van Wichen DF, de Weger RA, Wall E, van Diest PJ. Expression of BNIP3 in invasive breast cancer: correlations with the hypoxic response and clinicopathological features. *BMC Cancer* 2009; 9: 175-182.
52. Rehman S, Crow J, Revell PA. Bax protein expression in DCIS of the breast in relation to invasive ductal carcinoma and other molecular markers. *Pathol Oncol Res* 2000; 6: 256-263.
53. Patoloji Dernekleri Federasyonu Meme Çalışma Grubu. *Meme Patolojisi Rehberi* 2010; 12-13.
54. Rochaix P, Krajewski S, Reed JC, Bonnet F, Voigt JJ, Brousset P. In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 410-415.

55. Baccouche S, Daoud J, Frikha M, Mokdad-Gargouri R, Gargouri A, Jlidi R. Immunohistochemical status of p53, MDM2, bcl2, bax, and ER in invasive ductal breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 752-763.
56. Linjawi A, Kontogianna M, Halwani F, Edwardes M, Meterissian S. Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 83-90.
57. Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C, Harris AL. Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *J Pathol* 2003; 20: 573-580.
58. Petry IB, Fieber E, Schmidt M, Gehrman M, Gebhard S, Hermes M, Schormann W, Selinski S, et al. ERBB2 induces an antiapoptotic expression pattern of Bcl-2 family members in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 451-460.
59. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res* 1999; 59(23): 5917-5921.
60. Mokbel K, Parris CN, Ghilchik M, Williams G, Newbold RF. The association between telomerase, histopathological parameters, and KI-67 expression in breast cancer. *Am J Surg* 1999; 178: 69-72.
61. Mokbell K, Parris CN, Ghilchik M, Newbold RF. Telomerase activity in the human breast. *Breast* 1999; 8: 208-211.
62. Kalogeraki A, Kafousi M, Ieromonachou P, Giannikaki E, Vrekoussis T, Zoras O, Tsiftsis D, Stathopoulos E. Telomerase activity as a marker of invasive ductal breast carcinomas on FNABs and relationship to other prognostic variables. *Anticancer Res* 2005; 25: 1927-1930.
63. He GP, Shui QL, Huang Y, Zhang SZ, Yu H. [Quantitative detection of telomerase activity and its association with clinicopathological characteristics in breast cancer]. *Ai Zheng* 2004; 23: 1041-1046.
64. Poremba C, Bocker W, Willenbring H, Schafer KL, Otterbach F, Burger H, Diallo R, Dockhorn-Dworniczak B. Telomerase activity in human proliferative breast lesions. *Int J Oncol* 1998; 12: 641-648.

65. Elkak AE, Kirkpatrick K, Mears L, Wells C, Ghilchik M, Newbold R, Mokbel K. Telomerase activity and Bcl-2 expression in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 14-18.
66. Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J, Tahara H, Buley I, Manek S, Wells C, Goodison S, Ide T, Suzuki T, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int J Cancer* 1996; 69: 301-306.
67. Wu S, Liu Z, Sun H. [Telomerase activity in infiltration ductal carcinoma of breast]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1998; 78: 515-516.
68. Murillo-Ortiz B, Astudillo-De la Vega H, Castillo-Medina S, Malacara JM, Benitez-Bribiesca L. Telomerase activity, estrogen receptors (alpha, beta), Bcl-2 expression in human breast cancer and treatment response. *BMC Cancer* 2006; 6: 206-214.
69. Divella R, Tommasi S, Lacalamita R, Daniele A, Abbate I, Garrisi VM, Savino E, Coviello M, Rubini V, Simone G, Paradiso A, Quaranta M. Circulating hTERT DNA in early breast cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 2845-2849.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1978 Yılında Elazığ'da doğdum. 1996 yılında Elazığ Anadolu Lisesi'nden mezun olup aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesine başladım ve 2002 yılında mezun oldum. Pratisyen hekim olarak Ardahan Tunçoluk Sağlık Ocağı, Ardahan Sulakyurt Sağlık Ocağı ve Elazığ Fevziçakmak Sağlık Ocağında toplam 4 yıl görev yaptıktan sonra Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak 2006 yılı Ağustos ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitimime devam etmekteyim. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.