T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERLERİNDE TÜMÖR PROGRESYONU İLE İLİŞKİLİ SİTOKERATİN 5/6, SİTOKERATİN 14, HMWK, P27, CXCR-4 VE SDF-1 GEN EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. GONCA ÖZGÜN

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. GÜLEN AKYOL

ANKARA
ARALIK 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERLERİNDE TÜMÖR PROGRESYONU İLE İLİŞKİLİ SİTOKERATİN 5/6, SİTOKERATİN 14, HMWK, P27, CXCR-4 VE SDF-1 GEN EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. GONCA ÖZGÜN

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. GÜLEN AKYOL

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tararafından 01/2007-104 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
ARALIK 2008

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi, deneyim ve destekleri ile eğitimimde büyük katkıları olan tez danışmanım ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülen Akyol ve değerli hocalarım Prof. Dr.Ömer Uluoğlu, Prof. Dr. Leyla Memiş, Prof. Dr. Ömür Ataoğlu, Prof. Dr. Ayşe Dursun, Doç. Dr. Aylar Poyraz, Doç. Dr. Nalan Akyürek, Doç. Dr. Özlem Erdem, Yrd. Doç. Dr. İpek Işık Gönül, Yrd. Doç. Dr. Özgür Ekinci, Yrd. Doç. Dr. Pınar Uyar Göçün ve Yrd. Doç. Dr. Güldal Yılmaz'a, tezimin hazırlanmasında emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı teknisyenlerinden Fatma Özbek, Ülker Kaplan ve tüm laboratuar personeline ve bu süre boyunca kendileri ile birlikte çalışmaktan gurur duyduğum sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Dr. Pelin Börcek ve Dr. Dt. Burcu Sengüven'e ve her konuda bana destek olan Dr.Yiğit Mehmet Özgün ve Ayten-Şahin Barıt'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gonca Özgün

Ankara, 2008

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **2**

2.1. MEMENİN BENİGN PROLİFERATİF LEZYONLARI **4**

2.1.1 Atipisiz (Usual) Duktal Epitel Hiperplazisi **5**

2.1.2 Atipili Duktal Epitel Hiperplazisi **6**

2.2. MEMENİN MALİGN EPİTELYAL LEZYONLARI **7**
2.2.1. İn Situ Karsinom 7
2.2.2. İnvaziv Karsinom 11

2.3. KULLANILAN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER **23**
2.3.1. CXCR-4 ve SDF-1(CXCL-12) 23
2.3.2. p27 24
2.3.3. Sitokeratinler 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM **26**
3.1. OLGULARIN SEÇİLMESİ 26

3.2. DOKU MİKROARRAY YONTEMİ **26**
3.2.1. Doku Mikroarray Aleti Kullanılarak Blokların Hazırlanması 27

3.3. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA: **28**
3.3.1. İmmünhistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi 31

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ **31**

4. BULGULAR **32**

5. TARTIŞMA **58**

6. SONUÇ **77**

7. ÖZET **79**

8.SUMMARY **80**

9.KAYNAKLAR **81**

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve kanserden ölümlerde kadın cinsiyette ilk sırada yer alan kanser türüdür. İnvaziv duktal karsinom memenin malign tümörleri arasında en büyük grubu oluşturmaktadır. İnvaziv duktal karsinomun öncü lezyonları, mastektomi materyallerinde ana tümör kitlesi çevresinde bulunabildiği gibi memede kitle şikayeti ile başvuran hastalara ait biyopsilerde de karşımıza çıkmaktadır. Bu lezyonların birbiri ile devamlılık gösteren ve zaman zaman iç içe geçen bir progresyon sürecinin parçaları olduğu bilinmektedir. Klinik gidişin yavaş veya hızlı seyirli olabildiği, biyolojik olarak heterojenite gösteren bir hastalık olan meme tümörlerinde ayırıcı tanı problemlerini ortadan kaldıracak, prognoz ve metastatik hastalık konusunda öngörü sağlayacak immünhistokimyasal belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, memenin benign proliferatif hastalıklarından hafif derecede epitel hiperplazisi, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi, duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinomlar arasında, immünhistokimyasal olarak HMWK, Sitokeratin 5/6, Sitokeratin 14, p27, CXCR-4 ve SDF-1 belirteçlerinin, ayırıcı tanı problemlerini ortadan kaldırmadaki yararları ve prognostik değerleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Meme karsinomu, kadınlarda görülen en sık kanser türüdür. Kadınlar arasındaki kanser ölümlerinde, her yıl 1 milyondan fazla ölüm ile ilk sırada yer almaktadır. Her yıl görülen olgu sayıları göz önüne alındığında kuzey Amerika ve kuzey Avrupa ülkeleri ön sıralarda yer alırken, bu sırayı güney Avrupa ve Latin Amerika ülkeleri takip etmektedir. Asya ve Avrupa ülkeleri ise bu sıralamada en son sıralarda yer almaktadır. Meme kanseri olgularının insidansının giderek artması, gelişen görüntüleme ve tarama yöntemlerine bağlıdır. Çoğu olgu, tarama yöntemleri sayesinde erken evrelerde tanı alabilmektedir ancak erken dönemde tanı almak yaşam beklentisinde artış ile sonuçlanmamaktadır. Meme kanserinden ölüm oranları 1930lar ile 1990lar arasında farklılık göstermemekle birlikte kuzey Amerika, batı Avrupa ve Avustralya gibi dünyanın bazı bölgelerinde erken tanı ve kombine ve geliştirilen tedaviler sayesinde meme kanserlerinden ölümlerde düşüşler görülmeye başlamıştır (1, 2).

Meme kanseri gelişimde çok sayıda risk faktörü tanımlanmıştır (1):

1. Doğum yeri ve çevresel faktörler

2. Aile hikayesi: Birinci derece yakınlarında meme kanseri varlığı, genel populasyona oranla 2-3 kat fazla meme kanseri riskini beraberinde getirmektedir.

3. Menstrüel ve reprodüktif dönem: Erken menarş, nullipar olmak, ilk gebelik yaşının geç olması ve geç menopoz meme kanseri riskini arttırmaktadır.

4. Memede fibrokistik değişiklikler ve epitel hiperplazisi

5. Eksojen östrojen kullanımı

6. Kontraseptif ajanların kullanımı

7. İonize radyasyon maruziyeti

8. Meme redüksiyon ameliyatı geçirmiş olmak

9. Genetik yatkınlık: Meme kanserine yönelik çalışmalarda, meme kanseri gelişiminden sorumlu 2 gen bulunmuştur. BRCA-1 ve BRCA-2 adı verilen bu iki gen, sırasıyla kromozom 17q ve kromozom 13q-12-13 lokuslarında yer alırlar. Ailesel meme kanseri olgularının 2/3'ünden ve sporadik meme kanseri olgularının yaklaşık %5'inden bu iki gen sorumlu tutulmaktadır (2).

BRCA-1 geninin ürünü, hücre siklusunu düzenleyen ve immünhistokimyasal yöntemler ile de gösterilebilen bir fosfoproteindir. BRCA-1 mutasyonu saptanan meme kanseri olgularında, tümörlerin daha yüksek dereceli olma eğilimi gösterdikleri, medüller özellikler bulundurdukları, mitotik olarak oldukça aktif oldukları, sinsityal büyüme patternine sahip oldukları, konfluent nekroz içerdikleri ve östrojen reseptörlerinin negatif olduğu saptanmıştır (1, 3).

Meme kanserlerinin yaklaşık %50'si üst dış kadranda yerleşirler. %15'i üst iç kadranda, %10'u alt dış kadranda ve yaklaşık %5'i alt iç kadranda yerleşirler. Yaklaşık %17'si santral bölgede yerleşim gösterirken, %3'ü diffüz tutulum gösterirler (1, 4).

Memenin lobüler kanserlerinde multisentrik olma eğilimi, duktal karsinomlara göre daha yüksektir. Teorik olarak bir meme içinde multisentrik tümör varlığında; varolan bir tümörün meme içi yayılımı veya bağımsız 2 tümörün birlikteliği akla gelir. Çok sayıda çalışma göstermiştir ki, bir tümörde her iki mekanizma da rol oynayabilir (1, 2).

Bir memede invaziv meme kanseri varlığında, diğer memede meme kanseri görülme olasılığı, normal populasyona oranla 5 kat daha fazladır. Aile hikayesi de mevcut ise bu oran daha da yükselmektedir. Lobüler karsinom olgularında bu oran %25 ila %50 düzeylerine kadar yükselebilmektedir (1).

2.1. MEMENİN BENİGN PROLİFERATİF LEZYONLARI

Duktal hiperplazi meme duktus epitelindeki proliferatif durumu tanımlar. Normal meme duktusları 2 tabakadan oluşur: içte yerleşen luminal epitel tabakası ve dışta yerleşen myoepitel tabakası. Döşeyici duktus epitelinin 2 veya daha çok sıralı hale gelmesi ile ortaya çıkan durum epitel hiperplazisi olarak tanımlanmıştır (2).

Epitel hiperplazisi ile meme karsinomu arasındaki ilişki ilk defa 1985 yılında Page ve Dupont tarafından tanımlanmıştır (5, 6). Histolojik olarak duktal

epitel hiperplazisi atipisiz (Usual tip) ve atipili (atipik) olmak üzere 2 gruba ayrılarak incelenmektedir (6).

Memede benign lezyonlar için yapılan biyopsilerin %25'ini atipisiz duktal epitel hiperplazisi, %2'sini atipili duktal epitel hiperplazisi oluşturmaktadır. Biyopsi tanısı atipisiz epitel hiperplazisi olan ve atipili duktal epitel hiperplazisi olan hastaların 15 yıllık takip periodunda meme karsinomu gelişimi görülme oranları sırasıyla %4 ve %10dur (6). Proliferatif meme hastalıkları, memenin fibrokistik hastalığı, papillom ve sklerozan lezyonlar gibi memenin diğer benign hastalıkları ile birliktelik göstermektedir (2, 6).

2.1.1 Atipisiz (Usual) Duktal Epitel Hiperplazisi

Atipisiz duktal epitel hiperplazisi, hafif ve orta derecede duktus epitel hiperplazisi olarak ikiye ayrılır (1, 7).

Hafif epitel hiperplazisinde, duktusu döşeyen epitel hücrelerinde 4 sırayı geçmeyecek şekilde olan sayıca artış izlenir (2, 7). Hafif epitel hiperplazisinde epitel hücreleri duktus lümenini doldurmazlar. Bu grupta yer alan hastaların meme karsinomu açısından artmış risk taşımadıkları düşünülmektedir (7).

Orta derecede epitel hiperplazisi florid veya atipisiz duktus epitel hiperplazisi olarak da isimlendirilir. Bu grupta yer alan hastaların, normal populasyona göre 1,5-2 kat artmış meme kanseri riski taşıdıkları kabul edilmektedir (1, 7). Duktusu döşeyen epitel tabakasında 4 epitel sırasının üzerindeki proliferasyon olarak tanımlanır. Proliferasyon solid, boşluklar

oluşturacak şekilde veya papiller yapıda olabilir. Köprüler oluşturma ve tutulan duktusu genişletme eğilimindedir. Prolifere olan hücrelerin arasında izlenebilen luminal boşluklar, yarık şeklinde, düzensiz şekilli olup duktusun periferinde yerleşirler. Prolifere olan hücreler girdapsı bir paternde yerleşirler. Epitelyal hücreler pleomorfik olup, oval şekillidirler. Hücrelerin nükleusları bazal tabakaya, papiller yapılara ve köprüleşmelere paralel yerleşir. Bu görüntü hücrelerin akar gibi yerleşmesi olarak da tanımlanır. Nükleer atipi mevcut değildir (1, 2, 4).

2.1.2 Atipili Duktal Epitel Hiperplazisi

Atipili duktal epitel hiperplazisi, duktal karsinoma in-situ ile nükleer monomorfizm, hücrelerin yerleşimi ve düzgün yuvarlak lüminal boşluklar bulundurması gibi ortak bazı yapısal ve sitolojik bulgulara sahiptir. Hücreler kümeler, mikropapillalar, köprüler oluştururlar, solid ve kribriform yapılanma gösterirler (6, 7). Page ve arkadaşlarının 1985 yılında tanımladıkları kriterler (5) şunlardır;

1) Uniform hücresel populasyon

2) Hücreler arasında düzgün geometrik boşluklar veya duktuslar içerisinde mikropapiller yapılar

3) Hiperkromatik görünümde nükleuslar.

Duktal karsinoma in-situ tanısı için lezyonların bu kriterleri tam olarak doldurması ve en az 2 duktal boşlukta izlenmesi gereklidir. Bu sınıflamayı doldurmayan lezyonlar atipili duktal hiperplazi olarak adlandırılmalıdır (6, 7).

Diğer bir meme grubu olan Tavassoli ve arkadaşları bu kriterleri dolduran alanların çapına göre bir sınıflama yapmaktadır. Kriterleri dolduran lezyon 2 mm'nin altında olduğunda atipili duktal hiperplazi olarak adlandırılan lezyon 2 mm'nin üzerinde olduğunda duktal karsinoma in situ olarak adlandırılmaktadır (6).

Atipili duktal epitel hiperplazisi ve duktal karsinoma in situ klonal proliferatif süreçlerdir. Ayırıcı tanıda immünhistokimyasal çalışmalar çok yardımcı olmamakla birlikte atipili duktal epitel hiperplazisi ve duktal karsinoma in situ lezyonlarında, epitel hücrelerinde luminal belirteçlerden Sitokeratin 19 ile homojen pozitiflik izlenirken, Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14 gibi bazal belirteçlerin uniform ve homojen olarak kaybı görülür.

Düşük dereceli duktal karsinoma in situ ve atipili duktal epitel hiperplazisinin sitogenetik bulguları oldukça benzerdir. İkisinin ayrımı, değişikliklerin bir duktus içindeki yaygınlığı ve tutulan duktusların yaygınlığı esas alınarak yapılmalıdır (6).

2.2. MEMENİN MALİGN EPİTELYAL LEZYONLARI

2.2.1. İn Situ Karsinom

***Duktal karsinoma in situ*:** Duktal karsinoma in situ meme duktusları içerisinde, duktus bazal membranını aşmayan malign epitelyal hücre proliferasyonu olarak tanımlanabilir.

Duktal karsinoma in situ büyüme paternine göre 5 ana alt gruba ayrılır (1, 7):

1) Kribriform: Uniform görünümde, küçük-orta büyüklükte hücrelerin elek gibi boşluklar oluşturacak şekilde dizilim göstermesi ile oluşur. İzlenen boşluklar düzgün sınırlıdır. Boşlukların duvarları Roma su kemerlerine benzetilir. Tümöral hücreler bu duvarların uzun eksenlerine dik bir şekilde yerleşim gösterir.

2) Mikropapiller: Duktus içerisine küçük epitelyal kümeler şeklinde uzanım gösteren küçük-orta büyüklükteki tümöral hücrelerden oluşur. Küçük papiller uzantılar gerçek fibrovasküler stromal desteğe sahip değildir.

3) Papiller: Duktus içerisinde gerçek fibrovasküler çatısı olan papiller yapılanma görülür ve bu fibrovasküler yapı üzerinde orta büyüklükte ve fibrovasküler stromal yapıya dik yerleşim gösteren tümöral hücreler izlenir.

4) Solid: Tümör hücreleri duktal boşlukları doldurur ve küçük boşluklar, nekroz veya papiller yapılanmalar içermezler. Hücreler küçük veya büyük boyutta olabilirler.

5) Komedo: Solid tipe benzer şekilde duktusları dolduran tümöral hücrelerin merkezinde belirgin nekroz alanları izlenir. Sentral yerleşimli kalsifikasyon nekroza eşlik edebilir. Nekroz çevresindeki tümöral hücresel komponentin nükleer derecesi yüksektir ve sık mitoz görülür. Tutulan duktusların etrafındaki meme parankiminde karakteristik olarak konsantrik fibrozis izlenir.

Bu ana tiplere ek olarak clinging karsinom ve kistik hipersekretuar tipleri de tanımlanmıştır.

6) Clinging karsinom: Genişlemiş, içi boş duktusu döşeyen bir veya iki sıralı tümöral hücreler görülür. Tümöral hücresel komponent yüksek ve düşük dereceli değişiklikler gösterebilir. Yüksek dereceli formda, tümör hücreleri büyük, oldukça atipili ve yer yer tek hücre nekrozları gösteren hücrelerdir. Bu formun komedo duktal karsinoma in situnun bir varyantı olduğu düşünülmektedir. Düşük dereceli formda ise, hücreler daha küçük boyutlarda ve daha benign görünümlü hücrelerdir. Bu formun mikropapiller duktal karsinoma in situnun flat varyantı olduğu da düşünülmektedir.

7) Kistik hipersekretuar duktal karsinoma in situ: İçleri sekretuar materyal ile dolu kistik dilatasyon gösteren duktuslar ile karakterlidir. Memenin benign kistik hastalıkları ile karışabilir (1).

Seyrek görülen varyantlar olarak taşlı yüzük hücreli duktal karsinoma in situ, apokrin tip sitolojik özellikler gösteren duktal karsinoma in situ, endokrin özellikler gösteren duktal karsinoma in situ ve küçük hücreli solid duktal karsinoma in situnun varlığı akılda tutulmalıdır (1, 6).

Duktal karsinoma in situ nükleer özellikleri göz önünde bulundurularak 3 grupta derecelenir (3, 6).

Düşük nükleer derece (Grade I) : Tümörü oluşturan hücrelerin nükleusları küçük düzgün nükleuslardır. Nükleol seyrek olarak görülebilir ancak belirgin

değildir. Sık mitoz görülmez ve nekroz beklenmeyen bir bulgudur. Lüminal boşluklarda laminer kalsifiasyon görülebilir. Kribriform ve mikropapiller duktal karsinoma in situ tiplerinde görülen nükleer derece genelde düşük nükleer derecedir.

Orta nükleer derece (Grade II) : Yüksek dereceden daha az pleomorfizm içeren ancak düşük derecede izlenen uniformitenin olmadığı ara nükleer derecedir. Nükleol izlenebilir ancak çok büyük boyutlara ulaşmaz. Çok yaygın olmayan nekroz görülebilir. Yapısal olarak solid, kribriform veya mikropapiller olabilir.

Yüksek nükleer derece (Grade III) : Nükleus-sitoplazma oranı artmış, büyük, pleomorfik hücreler görülür. Bu hücreler kaba kromatin paternine sahip olup, sık olarak nükleol içerirler. Atipili formları da içeren artmış mitoz dikat çekicidir. Sık olarak nekroz görülür ve nekrotik alanlar distrofik kalsifikasyon gösterebilirler. Periduktal fibrozis ve komşu vasküler yapılar çevresinde belirgin mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu izlenir. Yapısal olarak solid, komedo, kribriform veya mikropapiller tipte olabilir (6).

Memenin benign hiperproliferatif lezyonlarının meme kanseri gelişiminde artmış risk oluşturdukları, duktal karsinoma in situnun da artmış lokal kanser riski ile birlikte meme kanseri gelişiminde gerçek bir öncül olduğu bilinmektedir (8).

***Lobüler karsinoma in situ*:** Lobüler karsinoma in situ makroskopik olarak fark edilebilir bir lezyon değildir ve başka bir sebeple alınmış meme

biyopsilerinde rastlantısal olarak karşımıza çıkar. Histolojik bulgular duktal karsinoma in situ lezyonlarından farklı olarak, çok fazla varyasyon göstermez (1, 7).

Lobüler karsinoma in situ, küçük boyutta tümöral hücrelerden oluşan solid bir proliferasyondur. Tümöral hücreler küçük, uniform, yuvarlak-oval nükleuslu, soluk eosinofilik sitoplazmalıdır. Tümöral hücreler intrasitoplazmik vakuoller içerebilirler. Bu vakuoller büyük boyutlara ulaştıklarında hücrelerin taşlı yüzük hücresine benzer görünüm almasına sebep olur. Tümöral hücrelerin en önemli özelliği birbirleri ile olan bağlantılarını kaybetmiş olmalarıdır (1, 7). Hücreler arasındaki sıkı bağlantıların kaybı sonucu olan bu bulgu immünhistokimyasal olarak E-cadherin ekspresyonunun azalması ile sonuçlanır. Lobüler karsinoma in situ tipik olarak terminal duktal-lobüler ünitede izlenir ve tuttuğu yapıyı genişletir (7).

2.2.2. İnvaziv Karsinom

Komşu dokulara invazyon ve uzak metastazlar invaziv meme karsinomlarının karakteristik özelliklerindendir. İnvaziv tümörlerin çoğu adenokarsinomlar olup, memenin parankimal epitelinden ve en sık olarak terminal duktal lobüler unitenin epitel hücrelerinden gelişir. İnvaziv meme kanserleri sol memede sağ memeden 1,07 kat daha fazla görülür. Tümörlerin %40-50'si üst dış kadranda yerleşir (3, 7).

İnvaziv meme karsinomlarının tipleri şunlardır:

1. İnvaziv Duktal Karsinom, NOS

İnvaziv duktal karsinom grubu, invaziv meme karsinomları içerisinde en sık görülen grubu oluşturur. Büyük çoğunluğu saf duktal karsinom olmakla birlikte, düşük oranda diğer invaziv karsinom tipleri ile birliktelik gösterebilir (7). İnvaziv duktal karsinom erkeklerde de en sık görülen invaziv meme karsinom tipidir (6).

Makroskopik olarak 0,5 cm ile 10 cm arasında değişen, çoğunlukla sert, striasyonlar ile karakterli, sınırları çok net olmayan, sarı-gri renkli kitle lezyonu olarak görülmektedir. Nekroz, hemoraji ve kistik dejenerasyon alanları görülebilir (1, 6).

Mikroskopik olarak tümör hücreleri, birbirleri ile devamlılık gösteren difüz hücre kümeleri, adalar, kordonlar veya tek hücre infiltrasyonu şeklinde görülür. Tübül formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitotik figürler tümörün derecesini belirlerken kullanılan kriterler olup, değişkenlik göstermektedir (1, 3, 6). Stromal desmoplazi değişen oranlarda görülür ve yaygınlığı ile makroskopik olarak sert kitle görünümü korelasyon göstermektedir (7). Çoğu olguda tümör çevresinde eşlik eden duktal karsinoma in situ görülür (6, 7). Skumaöz metaplazi, nöroendokrin diferansiyasyon izlenebilir.

İnvaziv duktal karsinom tanısı için tümör alanının %90'ından fazlasının duktal tipte olması gereklidir. Duktal komponent %50-90 arasında ise, eşlik eden diğer tümöral tip belirtilerek mikst karsinom olarak isimlendirilir (6). Mikst tip

karsinom dışında invaziv duktal karsinom tipleri pleomorfik karsinom, osteoklastik dev hücreler ile karakterli karsinom, koryokarsinomatöz özellikler ile karakterli karsinom ve melanotik özellikler gösteren karsinomdur.

2. İnvaziv Lobüler Karsinom

İnvaziv lobüler karsinomlar, tüm meme kanserlerinin %10-15'ini oluştururlar. İnvaziv lobüler karsinom tanısı alan hastaların ortalama yaşları invaziv duktal karsinom görülme yaşında 1-3 yaş daha ileri olup, 58-60'tır (3).

Makroskopik olarak irregüler ve sınırları net olarak seçilemeyen ve her meme kadranında ortaya çıkabilen tümöral kitleler olarak ortaya çıkarlar (3).

İnvaziv lobüler karsinomun klasik varyantında, küçük, göreceli olarak üniform görünümde, kohezyon kaybı olan tümöral hücrelerin, fibröz bağ doku içerisinde tek tek infiltrasyon gösterdiği, tek sıralı hücre dizileri şeklinde büyüdüğü ve in situ lobüler neoplazi ile tutulmuş lobüllerin etrafında konsantrik bir görünüm oluşturduğu izlenir (1-3). Tümöral hücrelerin nükleusları yuvarlak-oval olup bazı hücrelerde sitoplazmalarda lümen formasyonu görülebilir (2). Tipik olarak mitozdan zengin değildir. Yoğun fibröz özellikler gösteren invaziv lobüler karsinomlarda bol stroma izlenir. Bazı olgularda invaziv lobüler karsinomu maskeleyecek düzeyde lenfositik infiltrasyon izlenebilir (2, 3).

İnvaziv lobüler karsinomun solid, alveoler ve pleomorfik varyantları mevcuttur. Solid varyantında lobüler morfolojide ve uniform görünümdeki tümör hücrelerinin tabakalar halinde gelişimi izlenir. Alveoler varyantta en az 20

tümöral hücreden oluşan globüler kümeler şeklinde tümöral infiltrasyon izlenir. Pleomorfik lobüler karsinom, klasik invaziv lobüler karsinom ile benzerdir ancak belirgin nükleer pleomorfizm ve selüler atipi mevcuttur. Sıklıkla tümör çevresinde taşlı yüzük hücreleri ve pleomorfik hücreler ile infiltre intralobüler lezyonlar izlenir. Pleomorfik lobüler karsinom, apokrin ve histiositoid diferansiyasyon gösterebilir ve fokal olarak taşlı yüzük hücresi morfolojisinde olabilir (1, 3).

Tübülolobüler karsinom, lineer büyüme paterni gösteren uniform görünümdeki hücreler ile küçük tübül yapıları oluşturan tümöral hücrelerden oluşan mikst bir karsinomdur. Tübülolobüler karsinom olgularının 1/3'ünde lobüler karsinoma in situ izlenir (3, 4). Saf tübüler karsinomlarda aksiller metastaz olguların %12'sinde görülürken, tübülolobüler karsinomlarda aksiller metastaz %43 oranlarına yükselmektedir (3).

İnvaziv duktal karsinom-İnvaziv lobüler karsinom ayırıcı tanısı

İnvaziv lobüler karsinom ayırıcı tanısında en büyük grubu invaziv duktal karsinom oluşturur. Tümör hücrelerinin küçük ve uniform olması ve hücrelerin kohezyon kaybı göstermeleri yardımcı bulgulardır. Bazı olgularda ise morfolojik ve histopatolojik kriterler ayırıcı tanı yapmak için yeterli olmaz. Bu aşamada immünhistokimyasal yöntemler ön plana geçmektedir. İnvaziv lobüler karsinomlarda tümör hücreleri E-kadherin ekspresyonlarını kaybetmekte olup HMWK (34βE12) ile pozitif boyanma özelliği gösterirler (1). İnvaziv lobüler karsinom olgularının %70-95'inde immünhistokimyasal olarak östrojen reseptör

pozitifliği, %60-70'inde progesteron reseptör pozitifliği saptanır (3). Klasik varyant invaziv lobüler karsinomlar nadiren Her2/neu protein over ekspresyonu gösterirler (4).

3. Tübüler Karsinom

Açık bir lümeni döşeyen tek sıralı epitelyal hücrelerin oluşturduğu tübül benzeri yapılar tümörün karakteristik görünümüdür. Tübüler glandların iyi diferansiye doğası, nekroz veya mitoz görülmemesi ve hücresel pleomorfizmin düşük olması nedeniyle radyal skar veya mikroglandüler adenozis gibi benign lezyonları ayırıcı tanıda akılda tutmak gereklidir. Saf tübüler karsinom, invaziv meme kanserleri içinde %2den daha az oranda görülen bir karsinomdur. İyi prognoza sahip olması ile invaziv meme kanserleri arasında özel bir yeri vardır. Diğer invaziv meme kanserleri ile karşılaştırıldığında daha yaşlı hasta grubunda görülmesi, boyutlarının daha küçük olması (çoğu olguda tümör çapı 1 cm'nin altındadır) ve daha az oranda lenf nodu metastazı yapması ile dikkat çeker (3).

Sellüler ancak aynı zamanda elastik liflerden zengin bir stroma içerisinde dağınık yerleşim gösteren ve herhangi bir organoid yapılanma göstermeyen, irregüler ve köşeli glandüler yapılar izlenir. Glandüler yapılar etrafında myoepitel tabakası yoktur ancak bazı tübüller etrafında bazal membran komponentlerinin inkomplet olarak varlığı görülebilir (1, 3).Çoğu olguda duktal karsinoma in situ ile tübüler karsinom birlikteliği görülür (3).

Tübüler karsinom, diğer invaziv meme karsinomları ile birlikte mikst tipte karsinomların bir komponenti olarak da görülebilir. Mikst karsinomların prognozu tübüler karsinom ile invaziv duktal karsinom arasındadır (1). Saf tübüler karsinom tanısı için, tek bir sayısal değer tüm yazarlar tarafından kabul edilmemekle birlikte, tümöral komponentin en az %75 ile %100'ünün tübüler yapılardan oluşması şartı mevcuttur (3)

4. İnvaziv Kribriform Karsinom

İnvaziv kribriform karsinom, malign meme tümörleri arasında %0,8-3,5 oranında görülen bir tümördür. Prognozu ve görülme sıklığı açısından tübüler karsinoma benzer (1, 3).

Histolojik olarak tümörün tümüne yakınında invaziv kribriform yapılanma mevcuttur. Tümör, köprüler oluşturan hücrelerin doldurduğu, köşelenmeler gösteren invaziv adalardan oluşur. Tümör hücreleri az-orta derecede pleomofizm gösterirler ve az sayıda mitoz içerirler (1, 3, 4). Tümör çevresinde kribriform tipte intraduktal karsinom alanları izlenir (3). İnvaziv kribriform karsinomda invaziv tümör hücre kümeleri etrafında myoepitelyal hücre tabakası bulunmaz ve tümör hücre kümeleri irregüler yapılar şeklinde gelişigüzel dağılım gösterirler (3).

İnvaziv kribriform karsinoma eşlik eden diğer bir invaziv karsinom varlığında tanı mikst tipte karsinom olmalıdır. Ancak eşlik eden invaziv karsinom tübüler karsinom olduğunda, tübüler karsinom komponenti tümöral kitlenin %50'den daha azını oluşturuyor ise tanı klasik invaziv kribriform karsinom olarak

kalmaya devam eder (3, 6). İnvaziv kribriform karsinomun prognozu tübüler karsinom ile benzer olup, oldukça iyidir. Mikst olanların prognozu ise klasik duktal karsinom ile invaziv kribriform karsinom arasındadır (3, 6).

5. Medüller Karsinom

Medüller karsinomun görülme oranı %1-7 arasında değişmekte olup, ortalama görülme yaşı 45'tir (1, 3).

Medüller karsinomlar görüntüleme yöntemleri ile de doğrulanan, iyi sınırlı, yumuşak kıvamda kitlelerdir. Makroskopik ayırıcı tanıda benign lezyonları özellikle fibroadenomu düşündürebilir (1-3).

Mikroskopik olarak da tümör iyi sınırlı olarak tanımlanabilir. Adalar halinde, sinsityal dizilim gösteren, büyük, yuvarlak, pleomorfik nükleuslu, bol sitoplazmalı, belirgin nükleollü tümöral hücreler medüller karsinomun karakteristik bulgusudur. Bu görünümün tümörün en az %75'inde görülmesi gereklidir. Tümör çevresi stromada, arada germinal merkez oluşumları gösteren belirgin lenfoplazmasitik yanıt görülür. Sınırlı görülse de nekroz sık rastlanan bir bulgudur. Tipik/atipik sık mitoz varlığı dikkat çekicidir (2-4).

Bu kriterleri tam olarak doldurmayan tümörler "Atipik Medüller Karsinom" olarak adlandırılır. Tümör alanının en az %75'ini dolduran belirgin sinsityal büyüme medüller karsinom tanısı için patognomoniktir. Tümör etrafında in situ karsinom varlığı, cerrahi sınırlarda fokal girişler görülmesi, tümör hücre nükleuslarının üniform oluşu, fokal tübül formasyonu bulunması,

lenfoplazmasitik reaksiyonun olmaması veya sadece tümöral lezyonun sınırlarında olması gibi atipi kriterlerinden en fazla ikisini sağlayabilen tümörler atipik kategorisinde yer alırlar (2, 4). Kriterlerin tam olarak karşılanmadığı tartışmalı durumları ortadan kaldırmak adına atipili medüller karsinom tanımı yerine "Medüller özellikler gösteren invaziv duktal karsinom" teriminin kullanımı önerilmektedir (2, 3, 6).

6. Müsinöz Karsinom

Mukoid veya kolloid karsinom olarak adlandırılan müsinöz karsinomun meme karsinomları arasında görülme oranı %1-4'tür. Sıklıkla postmenopozal dönemde görülür (1, 6).

Makroskopik olarak parlak jelatinöz veya müsinöz görünümde, yaklaşık 1-4 cm arasında değişen boyutta, iyi sınırlı bir lezyon olarak izlenmektedir. Mikroskopik olarak, geniş müsin gölcükleri içerisinde küçük adalar ve kümeler şeklinde düşmüş, 10-20 hücrelik epitelyal hücre grupları izlenir. Bu hücre grupları kribriform veya papiller yapılanma gösterebilmektedirler (1, 6). Tümör hücreleri küçük, hiperkromatik nükleuslu olup hafif derecede pleomorfizm göstermektedirler. Sık mitoz görülmez. Nekroz ve vasküler invazyon nadirdir. Genel kural olarak, tümör alanının %90'ından fazlasını müsinöz karsinom oluşturuyor ise saf müsinöz karsinom tanısı verilmektedir. Müsinöz karsinom komponenti %10-50 arasında olduğunda eşlik eden diğer karsinom ile mikst karsinom tanısı uygun olacaktır (1, 6).

7. Bazal Tip Meme Kanseri

Meme karsinomunun, genel olarak memenin terminal duktal-lobüler ünitesinin luminal epitel hücrelerinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Son dönemde yapılan doku mikroarray çalışmalarında, bazal epitel hücresi benzeri gen ekspresyonuna sahip küçük fakat önemli bir alt grup tanımlanmıştır. Bazal veya myoepitelyal fenotip gösteren bu tümörlerde immünhistokimyasal olarak Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14 pozitifliği gösterilmektedir. Bu grup içerisinde tanımlanan tümörler morfolojik olarak yüksek dereceli olan tümörlerdir (6).

Bryan ve ark. (9) ile Rakha ve ark.'nın çalışmalarında (10) bazal tümörleri 2 gruba ayırmışlardır.

- Bazal fenotip gösteren tümörler (Sitokeratin 5/6 ve/veya Sitokeratin 14 ekspresyonu)
    - Baskın bazal karakter (hücrelerin %50sinden çoğunda Sitokeratin 5/6 ve/veya Sitokeratin 14 pozitifliği)
    - Bazal karakter (hücrelerin %10-50sinde Sitokeratin 5/6 ve/veya Sitokeratin 14 pozitifliği)
- Myoepitelyal fenotip gösteren tümörler (SMA ve/veya p63 ekspresyonu)

Bazal fenotip gösteren tümörlerin hastalıksız sağ kalımlarının ve prognozlarının oldukça düşük olduğu, tümör çapının daha büyük olduğu, komedo

tipte nekrozlar içerdiği, daha çok rekürrens gösterdiği ve bazal fenotipin, myoepitelyal fenotipten bağımsız olarak kötü prognostik bir belirteç olduğu gösterilmiştir (9, 10)

Sekretuar karsinom, Skuamöz hücreli karsinom, Metaplastik karsinom ve düşük dereceli adenoskuamöz karsinom da memenin nadir görülen tümörlerindendir (6).

İnvaziv duktal karsinomlar ve tüm diğer meme karsinomları, modifiye Scarff-Bloom-Richardson yöntemine göre, tübül/gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz kriterleri değerlendirilerek derecelendirilir.

Meme kanserlerinde histolojik derecelendirme kriterleri Tablo 1'de verilmiştir (1).

Tablo 1: Meme kanserlerinde histolojik derecelendirme

	Skor 1	Skor 2	Skor 3
Tübül formasyonu	%75 ↑	%10-75	%10 ↓
Nükleer pleomorfizm	Nükleus boyut ve şeklinde minimal farklılık	Nükleus boyut ve şeklinde orta derecede farklılık	Nükleus boyut ve şeklinde belirgin farklılık
Mitoz	0-8 mitoz / 10 bba	8-15 mitoz / 10 bba	16↑ mitoz / 10 bba

Bu 3 kritere göre elde edilen değerler toplanır ve elde edilen skora göre derecelendirme yapılır.

Grade 1: iyi differansiye (3-5 puan)

Grade 2: orta derede differansiye (6-7 puan)

Grade 3: az differansiye (8-9 puan)

Meme kanserlerinin prognozunun belirlenmesinde kullanılan parametreler şunlardır:

I. Tümör boyutu: Tümör boyutu primer olarak lenf nodu tutulumu ile ilişkilidir. Tümörün evrelenmesinde tümör boyutu en önemli belirteçlerden birisidir.

II. Aksiler lenf nodu tutulumu: Aksiler lenf nodu tutulumu hastalıksız sağ kalımda ve toplam yaşam beklentisinde en önemli belirteçtir. Prognoz tutulmuş olan lenf nodu sayısı ve hangi lenf nodu bölgesinin tutulduğu ile de ilişkilidir (6, 7).

III. Histolojik tip: Memenin tübüler, invaziv kribriform, müsinöz ve adenoid kistik karsinomları spesifik tip tümörleri olup, prognozları oldukça iyidir. Ancak bir lezyonun spesifik bir tümör kategorisinde olması için, tümörün %90'ından fazlasını oluşturması yani baskın morfolojide olması gerekmektedir.

IV. Histolojik derece: Histolojik derece, tümör boyutu ve lenf nodu durumundan bağımsız olarak prognostik bir belirteçtir.

V. Anjiolenfatik invazyon: Sıklıkla invaziv tümör alanlarının periferinde bulunmaktadır. Anjiolenfatik invazyon, tümör boyutu, histolojik derece, tümör tipi ve lenf nodu durumu ile direk olarak ilişkili olup, varlığı kötü prognostik bir bulgu olarak değerlendirilir (1, 6, 7).

VI. Hormon reseptörleri: İmmünhistokimyasal olarak gösterilebilen östrojen ve progesteron reseptörlerini eksprese eden tümörlerde, hastaların hastalıksız sağ kalımlarının daha yüksek olduğu bilinmektedir (1).

VII. Hücre proliferasyonu: MIB-1 (Ki-67) değerleri ile belirlenen proliferatif aktivite oldukça önemli bir prognostik belirteçtir (1).

VIII. Siklin D1: Çoğu kanser olgusunda Siklin D1 belirtecinin ekspresyonunda artış görülmekle beraber bağımsız prognostik bir belirteç olarak değerlendrilmemektedir (1).

2.3. KULLANILAN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER

2.3.1. CXCR-4 ve SDF-1(CXCL-12)

Kemokinler, kemoatraktif sitokin ailesinden küçük moleküllerdir. Bulundurduğu karakteristik rezidü sistein komponentine göre α (C-X-C), β (C-C), γ (C) ve δ (C-X-X-X-C) olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar (11). Kemokinler hedef hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları, G-protein ilişkili reseptörlerini kullanarak başlatırlar. G-protein ilişkili reseptörler yapısal olarak yedi transmembran proteinin kombinasyonundan oluşurlar ve mononükleer/polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonunda görev alırlar (12). CXC kemokin ailesinin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini İnterlokin-8 araciliği ile gösterdikleri bulunmuştur. Pek çok çalışmada tümör hücrelerindeki IL-8 ve onun reseptörünün, tümörün içindeki yeni damar oluşumu alanlarında ve vasküler endotel hücre proliferasyonu olan alanlarda varolduğu gösterilmiştir.

Kemokinler hematopoezin düzenlenmesinde, lökosit matürasyonunda ve göçünde, lenfoid dokuların gelişiminde, T ve B lenfositlerin hedeflerini bulmalarında, anjiogenezde, hücre iskeletinin düzenlenmesinde, hücreler arası sıkı

bağlantılarda ve hematopoetik hücrelerin spesifik anatomik bölgelere yerleşmesinde rol alan proteinlerdir.

SDF-1 (CXCL-12), kemokin α alt grubunun bir üyesi olup, CXCR-4 adlı G-protein ilişkili kemokin reseptörünün bilinen tek ligandıdır (13, 14). CXCR-4 reseptörü SDF-1'in seleftif olarak bu reseptöre bağlanması ile aktive olur. SDF-1 ve CXCR-4 organ vaskularizasyonu, immun sistem ve hematopoetik sistem fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. (15). SDF-1 T lenfositler ve monositler icin kemotaktik faktör, B hücre öncüleri için büyüme faktörü olarak etki eder ve B hücre ve kemik iliği gelişiminde rol oynar (16). SDF-1 kanser hücrelerinde lenfositler üzerindeki etkilerine benzer etkiler oluşturur (17). Kucia ve ark'na ait bir çalışmada da SDF-1 /CXCR-4 ikilisinin önemli bir kemokin/kemokin reseptörü ikilisi olduğu belirtilmiş ve tümör gelişimi ve metastaz süreçlerinde rol oynadıkları gösterilmiştir (18). Embriyolojik olarak SDF-1 oluşumunun bozulması normal gelişimin bozulmasına yol açmaktadır. (15).

2.3.2. p27

p27 geninin ürünü, tümör süpresör olarak görev yapan siklin bağımlı kinazların inhibitörüdür. Hücre siklusunda p27 anahtar role sahiptir. Apopitoz regülatörü Bcl-2'nin, p27 seviyelerini arttırarak hücre siklusuna ve progresyonuna etki ettiği bilinmektedir (19).

2.3.3. Sitokeratinler

Hemen hemen tüm epitelyal dokularda bulunan hücre içi fibröz proteinlerdir. Molekül ağırlıklarına göre tanımlanmış en az 20 alt gruba sahiptirler.

a. Bazal sitokeratinler

Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14

Bazal sitokeratinler olarak adlandırılan Sitokeratin 5/6, Sitokeratin 14 ve Sitokeratin 17, normal meme duktus hücrelerinin bazal tabakasında bulunan intermediate filamanlardır. Genellikle bazal terimi kullanılmakla beraber, bu sitokeratinlerin meme duktus hücresinde kökeni tam olarak bilinmemektedir (20).

b. Yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin (HMWK)

34βE12 adı ile de bilinen HMWK bazal hücrelerdeki keratin için spesifiktir (20). Ayırıcı tanıda kullanılırken, atipisiz ve atipili epitel hiperplazisi gibi bazal diferansiyasyonlarını kaybetmeyen benign lezyonlarda ekspresyonu yardımcı olmaktadır.

Bazı araştırıcılar, atipisiz duktal epitel hiperplazisi, atipili duktal epitel hiperplazisi ve duktal karsinoma in situ lezyonlarında HMWKnın giderek azalan oranlarda ekspresyonunu izlemişler, bu belirtecin memenin intraduktal proliferatif lezyonlarının ayırıcı tanısında kullanışlı olduğunu savunmuşlardır (21).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. OLGULARIN SEÇİLMESİ

2006-2008 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirilmiş olan modifiye radikal mastektomi materyalleri, eksizyonel meme biyopsileri ve meme iğne biyopsilerinin tümü incelendi. Bu meme biyopsileri içinden tanıları duktal epitel hiperplazisi, duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinom olanlar seçildi.

Çalışmaya katılan toplam olgu sayısı 365 idi. Bu olgulardan tanısı invaziv duktal karsinom olan olgu sayısı 277, duktal karsinoma in situ olan olgu sayısı 21, duktal epitel hiperplazisi olan olgu sayısı 67 idi.

3.2. DOKU MİKROARRAY YONTEMİ

Doku mikarray yontemi, dokularin klasik parafin bloklardan alinip, farkli hastalara veya farkli bloklara ait dokularin ayni lam uzerinde degerlendirilebilmesine olanak veren bir yontemdir. Bu yontem ilk olarak 1987'de Wan, Fortuna ve Furmanski tarafindan tanimlanmistir (22).

Konenen ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir alet yardımı ile array adı verilen doku silindirleri, parafine gömülü doku bloklarının spesifik lokalizasyonundan özel bir iğne yardımı ile çıkarılır. Bu silindirler, özel olarak hazırlanmış, doku içermeyen parafin bloklara, özel iğneler kullanılarak, alet yardımı ile yerleştirilir. Bu yöntem ile, iğne çaplarına göre değişen sayıda farklı doku örneği bir parafin blokta toplanmiş olur. Böylece tanısal amaçlı veya

araştırmalarda kullanılacak malzemenin maliyeti oldukça düşük seviyelere çekilebilmektedir. (23).

3.2.1. Doku Mikroarray Aleti Kullanılarak Blokların Hazırlanması

Meme biyopsilerinin incelenmesi sırasında, mevcut lezyonu en iyi temsil eden 4 mikroskopik alan işaretlendi. Bu preperatlara ait parafin bloklarda aynı alanlar işaret kalemi ile işaretlendi. İşaretlenmiş alanların toplanacağı parafin bloklar alıcı blok, lezyonları bulunduran parafin bloklar verici blok olarak isimlendirildi. Alıcı bloklar, BDH marka parafin ile içerisine herhangi bir doku yerleştirilmeden, boş parafin döküm olarak hazırlandı.

Alıcı bloklarda, doku mikroarray aleti kullanılarak, satır ve sütunlar şeklinde 0,1 cm çapta delikler açıldı. Bu delikler verici bloklardan çıkarılan lezyon alanlarını içerecekleri için her bir delik satır ve sütunların keşisim noktaları olarak isimlendirildi (1A, 2A gibi). Böylece bu deliklere yerleştirilecek dokuların karışması engellenmiş oldu.

Doku mikroarray aletinde 0,1 cm çaplı özel iğneler kullanılarak, verici bloklarda işaretlenmiş alanlardan lezyonu içeren parafin kolonu çıkarıldı. Alıcı bloklarda oluşturulan deliğe, verici blokta işaretlenmiş lezyon alanını içeren doku kolonu, doku mikroarray aleti kullanılarak yerleştirildi.

Bu şekilde her birinde ortalama 20 farklı olgu bulunan 22 adet parafin blok elde edildi. Bu parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı.

3.3. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA:

HMWK, Sitokeratin 14, Sitokeratin 5/6, p27, CXCR-4 ve SDF-1 ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak boyama yapıldı. Kullanılan HMWK (Thermo Scientific, Mouse monoklonal IgG1), Sitokeratin 14 (Thermo Scientific, Rabbit monoklonal IgG), Sitokeratin 5/6 (Thermo Scientific, D5/16 B4, Mouse IgG1/Kappa), p27 (Thermo Scientific p27 Kip1), CXCR-4 (Santa Cruz, Fusin H-118) ve SDF-1 (Santa Cruz, P-159X) antikorları sırası ile 1/50, 1/500, 1/10, 1/50, 1/50, 1/50 oranlarında PBS ile dilue edildi. Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ve 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklinde idi.

HMWK antikorunun pozitif kontrolü olarak normal deri, Sitokeratin 14 antikorunun pozitif kontrolü olarak derinin skuamöz hücreli karsinomu, Sitokeratin 5/6 antikorunun pozitif kontrolü olarak malign mezotelyoma, p27 antikorunun pozitif kontrolü olarak normal prostat dokusu ve prostat karsinomu, CXCR-4 antikorunun pozitif kontrolü olarak normal dalak dokusu, SDF-1 antikorunun pozitif kontrolü olarak normal safra duktus epiteli içeren karaciğer dokusu kullanıldı.

Alıcı parafin bloklardan hazırlanan kesitler HMWK, Sitokeratin 5/6, Sitokeratin 14, p27, CXCR-4 ve SDF-1 antikorları ile aşağıdaki prosedüre göre boyandı:

1. Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 56ºC'lik etüvde gece boyunca deparafinize edildi.

2. Kesitler ksilolde 30 dakika bekletildi.

3. Fiksasyon için %96'lık alkolde 15 dakika tutuldu.

4. Kesitler önce çeşme suyuyla, ardından distile su ile yıkandı.

5. Antijen retrival için HMWK antikoru boyanacak kesitler proteaz enziminde 37ºC'de 10 dakika bekletildi. Sitokeratin 14 ve p27 antikoru boyanacak kesitler sitrat tampon (pH: 6) ile, Sitokeratin 5/6, SDF-1 ve CXCR-4 boyanacak kesitler Tris-Edta (pH:9) ile mikrodalga fırında 15 dakika yüksek ısıda kaynatıldı.

6. Endojen peroksidazı bloke etmek için oda sıcaklığında %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika bekletildi.

7. Kesitler distile su ile, ardından PBS ile yıkandı.

8. Protein bloklama için non-immün protein bloklama serumunda 20 dakika tutuldu ve ardından kurulandı.

9. Primer antikor olan HMWK, Sitokeratin 14, Sitokeratin 5/6, p27, CXCR-4 ve SDF-1 lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

10. Kesitler PBS ile yıkandı.

11. Bağlayıcı (sekonder) antikor (HMWK, Sitokeratin 14, Sitokeratin 5/6, p27 için HRP Kit; Lab-Vision, Neomarkers, Fremont, California, USA, CXCR-4 ve SDF-1 için Zymed Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP; Zymed, Massachusetts, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.

12. PBS ile yıkandı.

13. Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 20 dakika bekletildi (HMWK, Sitokeratin 14, Sitokeratin 5/6, p27 için HRP Kit; Lab-Vision, Neomarkers, Fremont, California, USA, CXCR-4 ve SDF-1 için Zymed Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP; Zymed, Massachusetts, USA).

14. PBS ile yıkandı.

15. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla HMWK, Sitokeratin 14, Sitokeratin 5/6 antikorları için DAB (3,3'-diaminobenzidin; Lab-Vision, Neomarkers, USA) , CXCR-4, SDF-1 ve p27 antikorları için AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole; Zymed, USA) ile 10 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.

16. Distile su ile yıkandı.

17. DAB kullanılan kesitlere Harri's hematoksilen ile, AEC kullanılan kesitlere Mayer's hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı.

18. Harri's hematoksilen kullanılan kesitler, çeşme suyu ile yıkandı ve 2 dakika süreyle alkolde, 2 dakika süreyle ksilolde tutuldu.

19. Mayer's hematoksilen kullanılan kesitler PBS ile yıkandı, havada kurutuldu.

20. DAB ile boyanan doku kesitleri entellan kullanılarak, AEC ile boyanan doku kesitleri su bazlı kapatıcı ile kapatıldı.

3.3.1. İmmünhistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi

İmmünhistokimyasal boyanmanın değerlendirmesinde HMWK, Sitokeratin 14, Sitokeratin 5/6, CXCR-4 ve SDF-1 için sitoplazmik boyanma, p27 için nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Boyanma değerlendirilirken her bir olguda pozitif boyanan hücrelerin yaygınlığı dikkate alındı. Sonuçlar % oranlar olarak belirtildi.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

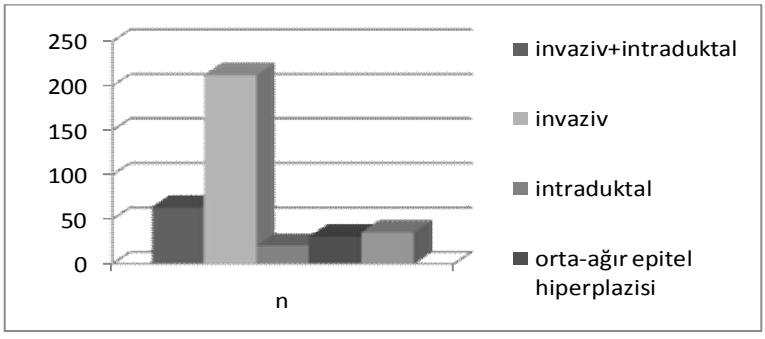
Çoklu gruplar arasındaki karşılaştırmalar için; normal dağılım gösteren sayısal değişkenlerde ANOVA, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde Kruskal Wallis testi kullanıldi. Çoklu grup alt analizlerinde; normal dağılım gösteren sayısal değişkenlerin iki grup arasındaki karşılaştırmaları Student T testi ile normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenlerin iki grup arasındaki karşılaştırmalar ise Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldi. Genel anlamlılık düzeyi (P) 0.05 olarak belirlenmiştir. Alt grup analizlerinde P anlamlılık düzeyi

Bonferroni düzeltmesi yapılarak değerlendirildi. Analizlerin yapılmasında SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago USA) programı kullanıldi.

4. BULGULAR

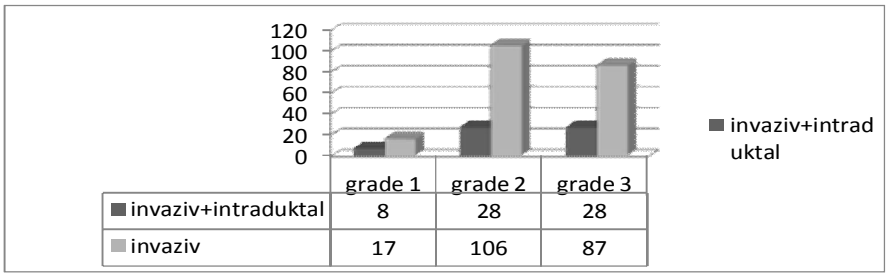
Çalışmaya katılan 365 olgunun, 277'si invaziv duktal karsinom idi. Bu olguların 213'ü invaziv duktal karsinom komşuluğunda duktal karsinoma in situ alanı içermeyen, 64'ü ise invaziv tümör komşuluğunda duktal karsinoma in situ komponentine sahip olan tümörlerdi. 21 olgu duktal karsinoma in situ olup, invaziv tümör alanı içermiyordu. Epitel hiperplazisi olgusu 67 adet olup, bu olguların 31'i ağır-orta derecede epitel hiperplazisi, 36'sı ise hafif derecede epitel hiperplazisi idi. Kanser varlığına göre ikiye ayrılan olgu grubunda, 298 olgu kanser (invaziv duktal karsinom ve duktal karsinoma in situ lezyonlarinin toplamı) ve 67 olgu ise kanser içermeyen (hafif derecede epitel hiperplazisi ve orta-ağır derecede epitel hiperplazisi) grup olarak değerlendirildi (Tablo 2).

Tablo 2: Tanılara göre olguların dağılımı



İnvaziv duktal karsinom olgularından 115'i grade 3, 134'ü grade 2, 25'i grade 1 idi. 3 olgu yeterli tümör alanı içermeyen biyopsi örnekleri olup, grade verilmemiş olgular idi (Tablo 3).

Tablo 3: İnvaziv duktal karsinom olgularının derecelerine göre dağılımı

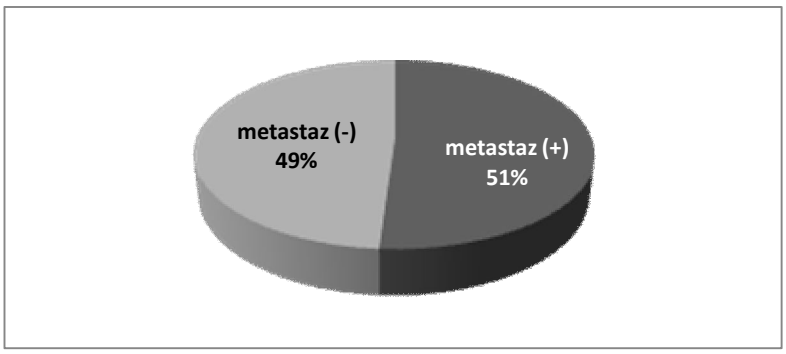


	grade 1	grade 2	grade 3
invaziv+intraduktal	8	28	28
invaziv	17	106	87

Tümör boyutu bilgisi invaziv duktal karsinom olgu grubunda mevcuttu, en büyük tümör çapı 7 cm, en küçük tümör çapı 0,4 cm, tümör çapı ortalaması 2,58 cm idi. İnvaziv duktal karsinom ve duktal karsinoma in situ tanısı alan 298 olgunun 157 tanesi mastektomi ve eksizyonel biyopsi materyali, 141 tanesi iğne biyopsisi idi. Bu nedenle tümör çapı bilgisine ancak mastektomi ve eksizyonel biyopsilerde ulaşıldı. 157 olgudan tümör çapı 2 cm ve altında olan olgu sayısı 80, 2 cm'den büyük olan olgu sayısı 77 idi.

İnvaziv duktal karsinom olguları içerisinde lenf nodu eksizyonu bulunan olgu sayısı 143 idi. Bu olguların 73'ünde 1 veya daha fazla lenf nodunda metastaz bulunurken, 70 olguda metastatik hastalık mevcut değildi (Tablo 4).

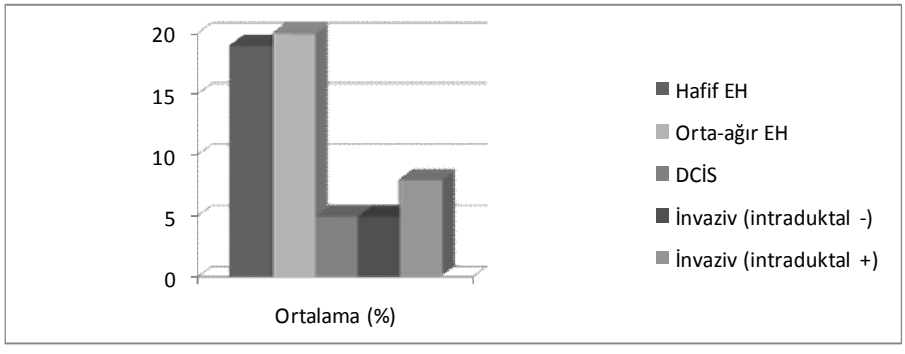
Tablo 4: İnvaziv duktal karsinom olgularının metastaz varlığına göre dağılımı.



İmmünhistokimyasal boyanma değerlendirilirken lezyona ait hücrelerin boyanma yaygınlığı % değer olarak belirtildi.

HMWK belirteci ile boyanma oranları hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda ortalama %14, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda %20, duktal karsinoma in situ grubunda %5, intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom grubunda %5 ve intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom grubunda %8 olarak bulundu (Tablo 5).

Tablo 5: HMWK ekspresyonunun olgulara göre dağılımı (ortalama)



Hafif derecede epitel hiperplazisi grubu ile orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubu arasında HMWK ekspresyonu açısından anlamlı fark saptanmazken, hem hafif derecede epitel hiperplazisi grubunun hem de orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunun HMWK ekspresyonları intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom olgu grubundan fazla olup istatistiksel olarak anlamlılık göstermekte idi ($p<0,005$). Hafif derecede epitel hiperplazisi ve orta-ağır derecede epitel hiperplazisi olguları duktal karsinoma in situ ve intraduktal karsinom komponenti içeren invaziv duktal karsinom olguları ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranlarda HMWK ekspresyonuna sahipti ($p<0,05$). Olgular kanser varlığına göre değerlendirildiğinde kanser olgu gruplarının toplamında HMWK ile boyanma tüm epitel hiperplazileri gruplarından anlamlı olarak daha az bulundu ($p<0,0001$) (Tablo 6).

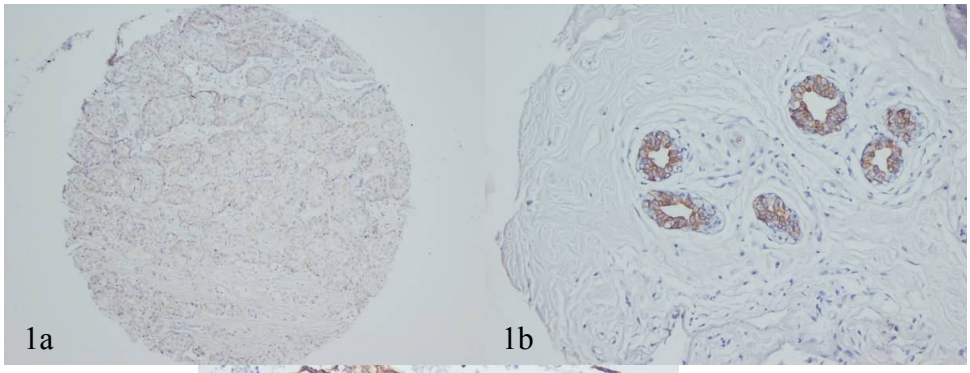
Tablo 6: HMWK ekspresyonunun olgulara göre dağılımı

	Olgu sayısı	Boyanma yaygınlığı ort. (%)		p (<0,005)
Hafif duktal epitel hiperplazisi	36	14±19	OAEH	0,55
			DKİS	0,03
			İnv(int-)	0,0007
			İnv(int+)	0,02
Orta-ağır duktal epitel hiperplazisi	31	20±28	DKİS	0,01
			İnv(int-)	0,0001
			İnv(int+)	0,006
Duktal karsinoma in situ	21	5±11	İnv(int-)	0,91
			İnv(int+)	0,66
İnv. duktal kars. (intraduktal -)	213	5±15	İnv(int+)	0,56
İnv. duktal kars. (intraduktal+)	64	8±21	İnv(int-)	

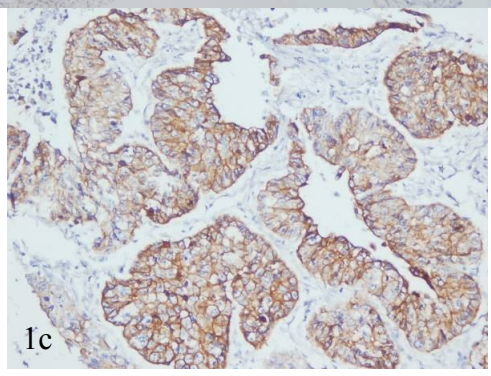
Kanser grubunu oluşturan komponentler arasında HMWK ekspresyonu açısından farklılık saptanmadı. HMWK ekspresyonu lenf nodu metastaz durumu ve tümör çapı değişkenleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 7).

Tablo 7: HMWK ekspresyonunun diğer değişkenlere göre dağılımı

Kanser varlığı			
Var	298	6±16	p <0,0001
Yok	67	17±24	
Tümör boyutu			
2 cm ↓	80	7±18	p 0,14
2 cm ↑	77	6±18	
Metastaz varlığı			
Var	73	6±16	p 0,93
Yok	70	8±20	


1a

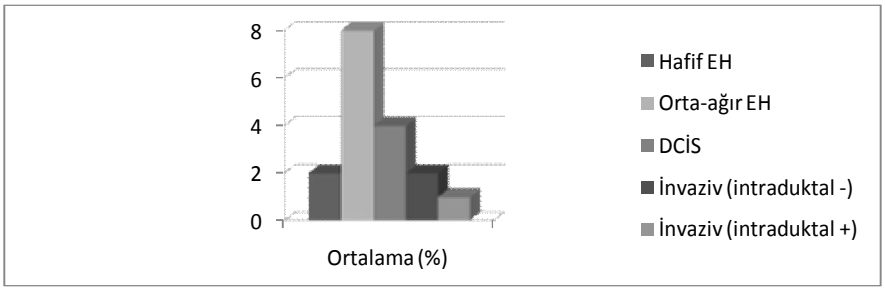
1b


1c

Resim 1a: Invaziv duktal karsinom olgusunda HMWK ekspresyon kaybi (DAB x100). Resim 1b: Hafif derecede epitel hiperplazisi olgusunda %30 oraninda HMWK ekspresyonu (DAB x200). Resim 1c: Orta-agir derecede epitel hiperplazisi olgusunda %100 oraninda HMWK ekspresyonu (DAB x200)

Sitokeratin 14 belirteci ile boyanma oranları hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda ortalama %2, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda %8, duktal karsinoma in situ grubunda %4, intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom grubunda %2 ve intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom grubunda %1 olarak bulundu (Tablo 8).

Tablo 8: Sitokeratin 14 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı (ortalama)



Hafif derecede epitel hiperplazisi grubu ile orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grupları arasında Sitokeratin 14 ekspresyonları arasında anlamlı farklılık saptanmamakla beraber orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda bu belirtecin ekspresyonu hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda daha yüksek bulundu (Tablo 9).

Tablo 9: Sitokeratin 14 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı

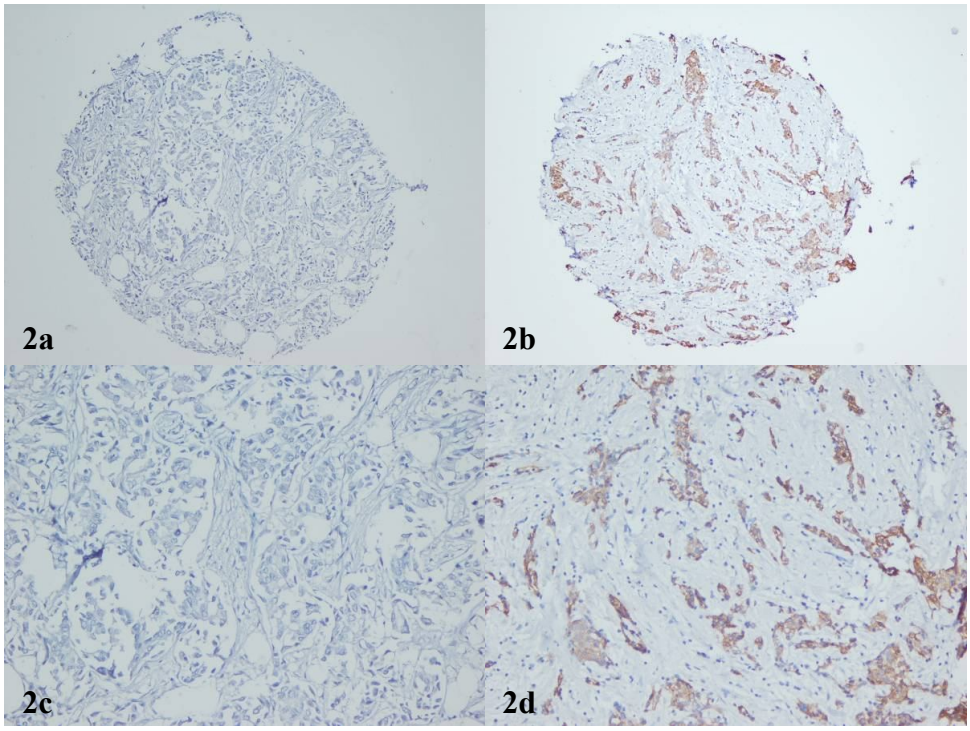
	Olgu sayısı	Boyanma yaygınlığı ort. (%)		p (0,005)
Hafif duktal epitel hiperplazisi	36	2±8	OAEH	0,16
			DKİS	0,70
			İnv(int-)	0,40
			İnv(int+)	0,74
Orta-ağır duktal epitel hiperplazisi	31	8±18	DKİS	0,40
			İnv(int-)	0,004
			İnv(int+)	0,05
Duktal karsinoma in situ	21	4±11	İnv(int-)	0,23
			İnv(int+)	0,48
İnv. duktal kars. (intraduktal -)	213	2±10	İnv(int+)	0,57
İnv. duktal kars. (intraduktal+)	64	1±3	İnv(int-)	

Kanser grubu ile epitel hiperplazisi grubu arasında ve kanser grubunun komponentleri arasında Sitokeratin 14 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı olabilecek bir ekspresyon izlenmedi. Metastatik lenf nodu bulunduran olgularda Sitokeratin 14 ekspresyonu, metastatik hastalığı olmayan olgulara göre daha yüksekti. Tümör çapı 2 cm'nin üzerinde olan olgularda ortalama Sitokeratin

14 ekspresyon yüzdesi, tümör çapı 2 cm ve altında olan olgulardan daha yüksekti (Tablo 10)

Tablo 10: Sitokeratin 14 ekspresyonunun diğer değişkenlere göre dağılımı

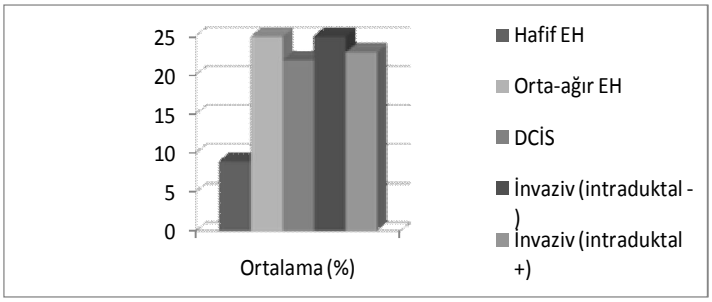
Kanser varlığı			
Var	298	2±9	p 0,03
Yok	67	5±13	
Tümör boyutu			
2 cm ↓	80	2±11	p 0,38
2 cm ↑	77	2±10	
Metastaz varlığı			
Var	73	3±14	p 0,24
Yok	70	1±7	



Resim 2a: Invaziv duktal karsinom olgusunda Sitokeratin 14 ekspresyonu kaybi (DAB x100). Resim 2b: Invaziv duktal karsinom olgusunda %100 oraninda Sitokeratin 14 ekspresyonu (DAB x100). Resim 2c: Duktal karsinoma in situ komponenti iceren invaziv duktal karsinom olgusunda Sitokeratin 14 ekspresyonu kaybi (DAB x200). Resim 2d: Invaziv karsinom alanlarinda %100 oraninda Sitokeratin 14 ekspresyonu (DAB x200)

Sitokeratin 5/6 belirteci ile boyanma oranları hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda ortalama %9, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda %25, duktal karsinoma in situ grubunda %22, intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom grubunda %25 ve intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom grubunda %23 olarak bulundu (Tablo 11).

Tablo 11: Sitokeratin 5/6 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı (ortalama)



Hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda Sitokeratin 5/6 ekspresyonu orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubundan belirgin olarak daha az saptandı ($p<0,05$). Kanser grubu ile hafif derecede epitel hiperplazileri karşılaştırıldığında Sitokeratin 5/6 ekspresyonun kanser olgularında belirgin artışı mevcuttu. İnvaziv duktal karsinom olgularında istatistiksel olarak anlamlı yüksek boyanma oranları saptandı ($p<0,05$) (Tablo 12).

Tablo 12: Sitokeratin 5/6 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı

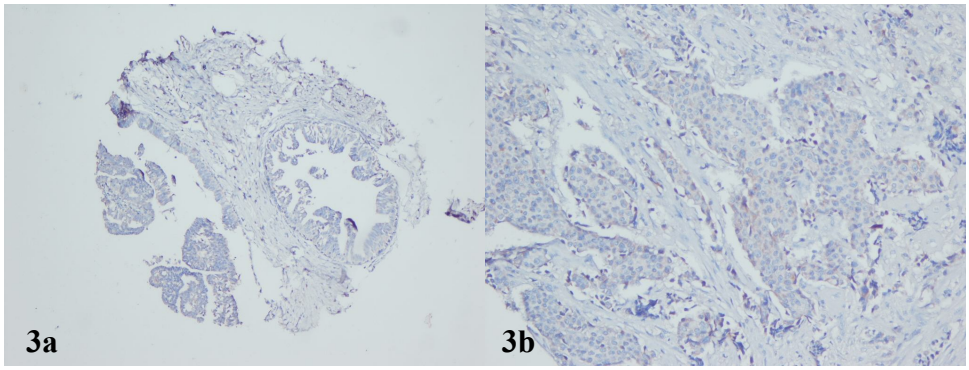
	Olgu sayısı	**Boyanma yaygınlığı ort. (%)**		**p (0,005)**
Hafif duktal epitel hiperplazisi	36	9±19	OAEH	0,06
			DKİS	0,07
			İnv(int-)	0,001
			İnv(int+)	0,01
Orta-ağır duktal epitel hiperplazisi	31	25±26	DKİS	0,56
			İnv(int-)	0,79
			İnv(int+)	0,49
Duktal karsinoma in situ	21	22±31	İnv(int-)	0,53
			İnv(int+)	0,83
İnv. duktal kars. (intraduktal -)	213	25±33	İnv(int+)	0,63
İnv. duktal kars. (intraduktal+)	64	23±31	İnv(int-)	

Kanser grubu elemanlarının arasında Sitokeratin 5/6 eksprese eden tümöral hücrelerin oranı intraduktal komponenti olan ve olmayan invaziv duktal karsinomlar grubunda duktal karsinoma in situ grubundan yüksek bulundu. Sitokeratin 5/6 ekspresyonu kanser grubunda daha yüksekti (p=0,05). Metastatik lenf nodu olan olgularda, metastaz içermeyen olgulara göre ve tümör çapı 2

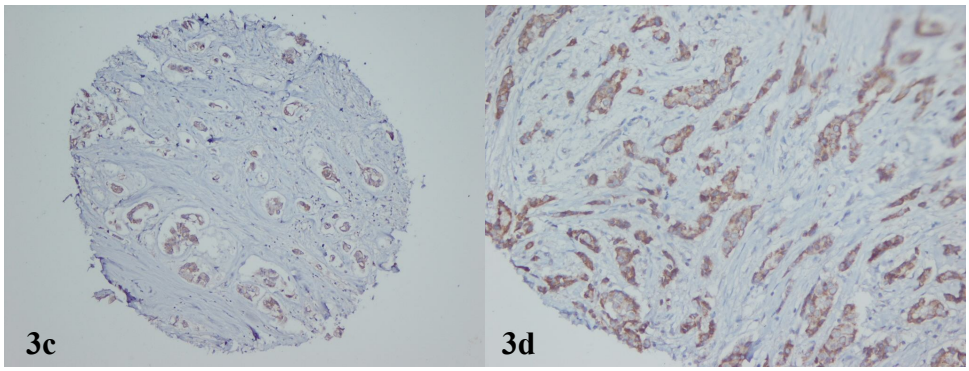
cm'den büyük olan olgularda tümör çapı 2 cm'den küçük olan olgulara göre daha yüksek Sitokeratin 5/6 ekspresyonu izlendi (Tablo 13).

Tablo 13: Sitokeratin 5/6 ekspresyonunun diğer değişkenlere göre dağılımı

Kanser varlığı			
Var	298	24±32	p 0,05
Yok	67	16±24	
Tümör boyutu			
2 cm ↓	80	23±30	p 0,14
2 cm ↑	77	31±35	
Metastaz varlığı			
Var	73	29±34	p 0,36
Yok	70	26±33	



Resim 3a: Epitel hiperplazisi olgusunda negatif Sitokeratin 5/6 ekspresyonu (DAB x100). Resim 3b: Duktal karsinoma in situ olgusunda %40 oraninda Sitokeratin 5/6 ekspresyonu (DAB x200).

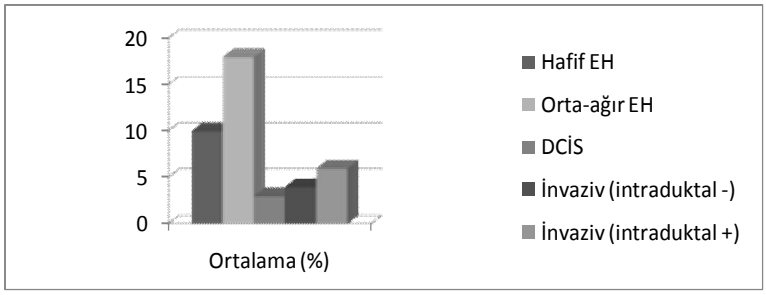


Resim 3c: Invaziv duktal karsinom olgusunda %100 oraninda Sitokeratin 5/6 ekspresyonu (DAB x100). Resim 3d: Invaziv duktal karsinom olgusunda %100 oraninda Sitokeratin 5/6 ekspresyonu (DAB x200).

p27 ile boyanma oranları hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda ortalama %10, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda %18, duktal karsinoma in situ grubunda %3, intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal

karsinom grubunda %4 ve intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom grubunda %6 olarak bulundu (Tablo 14).

Tablo 14: p27 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı (ortalama)



Orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda p27'nin nükleer ekspresyonu hafif derecede epitel hiperplazisi grubundan daha fazla saptandı ($p<0,005$). Hafif derecede epitel hiperplazisi grubu (ort: 10) ile kanser olgu grubunun üyeleri karşılaştırıldığında (sırasıyla ort: 3, 4, 6) p27nin hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda daha yüksek oranlarda eksprese olduğu izlendi. İntraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom olgu grubu ile hafif derecede epitel hiperplazisi grubu arasında boyanma oranları arasında anlamlı fark mevcuttu ($p=0,005$). Orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda p27 ekspresyonu kanser grubunun tüm elemanlarından (duktal karsinoma in situ, intraduktal komponenti olan invaziv duktal karsinom, intraduktal komponenti bulunmayan invaziv duktal karsinom) daha yüksek saptandı ($p<0,0001$). Kanser grubu içerisinde duktal karsinoma in situ grubu ile invaziv duktal karsinom grupları arasında farklılık mevcut değildi (Tablo 15).

Tablo 15: p27 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı

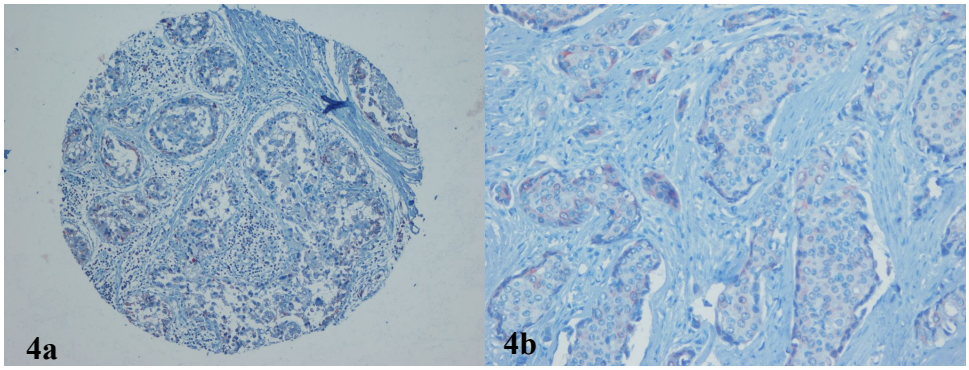
	Olgu sayısı	Boyanma yaygınlığı ort. (%)		p (0,005)
Hafif duktal epitel hiperplazisi	36	10±17	OAEH	0,001
			DKİS	0,29
			İnv(int-)	0,005
			İnv(int+)	0,48
Orta-ağır duktal epitel hiperplazisi	31	18±14	DKİS	<0,0001
			İnv(int-)	<0,0001
			İnv(int+)	<0,0001
Duktal karsinoma in situ	21	3±4	İnv(int-)	0,13
			İnv(int+)	0,66
İnv. duktal kars. (intraduktal -)	213	4±10	İnv(int+)	0,004
İnv. duktal kars. (intraduktal+)	64	6±11	İnv(int-)	

Kanser içeren grup (duktal karsinoma in situ, intraduktal komponenti olan invaziv duktal karsinom, intraduktal komponenti bulunmayan invaziv duktal karsinom) ile kanser içermeyen grup (hafif derecede epitel hiperplazisi , orta-ağır derecede epitel hiperplazisi) karşılaştırıldığında, kanser içeren olgu grubunda p27 ekspresyonunda belirgin kayıp izlendi (p<0,0001). Tümör çapı 2 cm'in altında olan olgu grubunda p27 ekspresyonu (ort: 5), tümör çapı 2 cm'in üzerinde olan

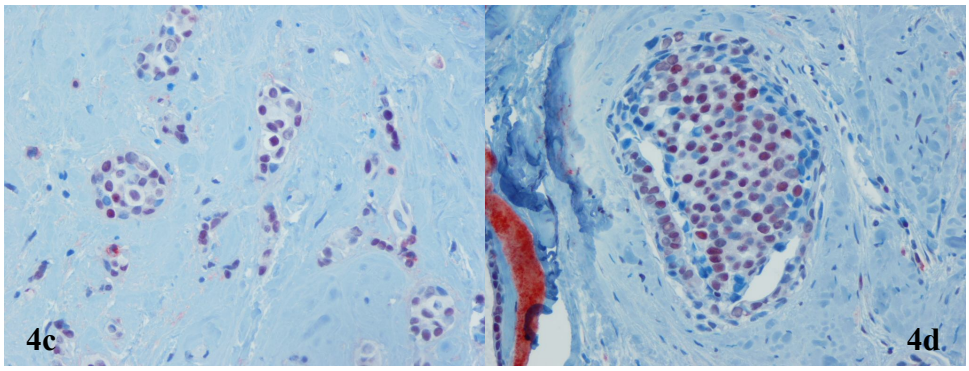
olgu grubundan (ort: 2) istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha yüksek bulundu. Metastatik lenf nodu varlığı ile p27 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 16).

Tablo 16: p27 ekspresyonunun diğer değişkenlere göre dağılımı

Kanser varlığı			
Var	298	4±10	p <0,0001
Yok	67	14±16	
Tümör boyutu			
2 cm ↓	80	5±11	p 0,16
2 cm ↑	77	2±7	
Metastaz varlığı			
Var	73	4±11	p 0,07
Yok	70	4±8	



Resim 4a: Duktal karsinoma in situ komponenti bulunan invaziv duktal karsinom olgusunda p27 ekspresyon kaybi (AEC x100). Resim 4b: Duktal karsinoma in situ komponenti bulunan invaziv duktal karsinom olgusunda %25 oraninda nukleer p27 ekspresyonu (AEC x200).

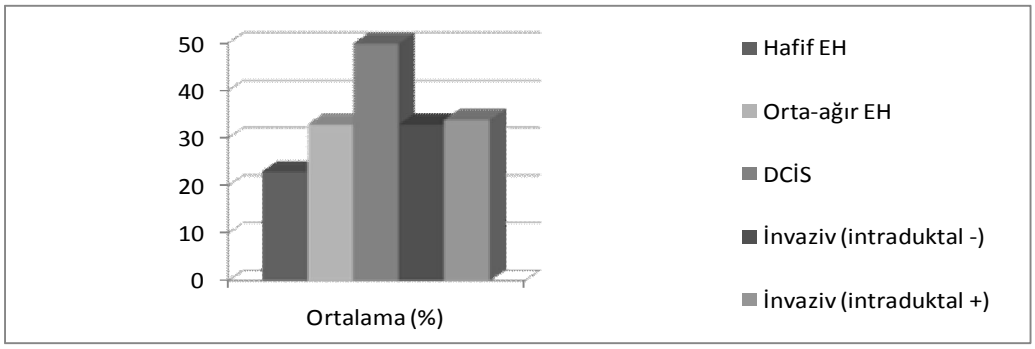


Resim 4c: Invaziv karsinom alaninda %50 oraninda p27 ekspresyonu (AEC x400). Resim 4d: Epitel hiperplazisi olgusunda %60 oraninda p27 ekspresyonu (AEC x400).

SDF-1 ile boyanma oranları hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda ortalama %23, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda %33, duktal karsinoma in situ grubunda %50, intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal

karsinom grubunda %33 ve intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom grubunda %34 olarak bulundu (Tablo 17).

Tablo 17: SDF-1 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı (ortalama)



SDF-1 ekspresyonu kanser olgu grubunda kanser olmayan olgu grubuna göre anlamlı olarak daha fazla idi ($p<0,03$). Kanser olmayan olgu grubu kendi içinde değerlendirildiğinde orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda (ort: 33) hafif derecede epitel hiperplazisi grubuna (ort: 23) göre yüksek SDF-1 ekspresyonu izlendi. Duktal karsinoma in situ grubunda SDF-1 ekspresyonu (ort: 50) her iki epitel hiperplazisi grubundan fazla ekspresyon göstermekte olup, bu fark hafif derecede epitel hiperplazisi grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklı idi ($p<0,005$). Duktal karsinoma in situ olgu grubunda (ort: 50) SDF-1 belirteci istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber invaziv duktal karsinom olgu grubundan (ort: 33,5) daha yüksek ekspresyon göstermekteydi. İnvaziv duktal karsinom olgularında SDF-1 ekspresyonu gruplar arası fark göstermemekte idi (Tablo 18).

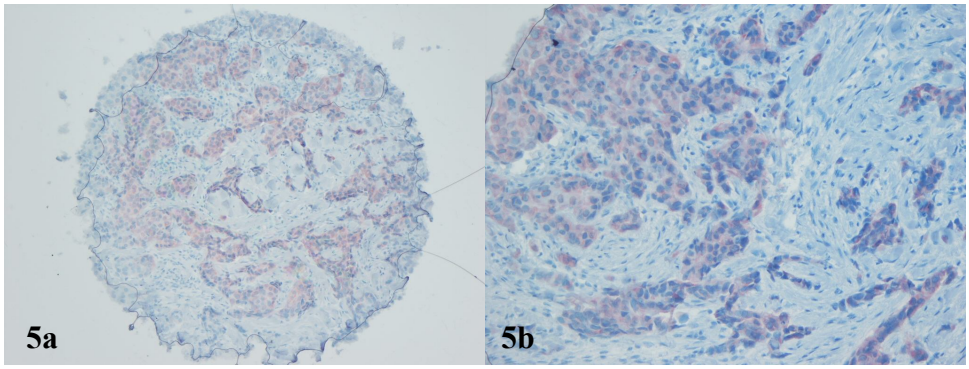
Tablo 18: SDF-1 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı

	Olgu sayısı	Boyanma yaygınlığı ort. (%)		p (0,005)
Hafif duktal epitel hiperplazisi	36	23±28	OAEH	0,21
			DKİS	0,004
			İnv(int-)	0,01
			İnv(int+)	0,07
Orta-ağır duktal epitel hiperplazisi	31	33±32	DKİS	0,06
			İnv(int-)	0,65
			İnv(int+)	0,75
Duktal karsinoma in situ	21	50±38	İnv(int-)	0,06
			İnv(int+)	0,12
İnv. duktal kars. (intraduktal -)	213	33±28	İnv(int+)	0,98
İnv. duktal kars. (intraduktal+)	64	34±32	İnv(int-)	

Metastatik hastalık varlığında tümör hücrelerinde SDF-1 ekspresyonu artış göstermekle birlikte tümör çapı ile SDF-1 belirtecinin ekspresyonu arasında bir ilişki saptanamadı (Tablo 19).

Tablo 19: SDF-1 ekspresyonunun diğer değişkenlere göre dağılımı

Kanser varlığı			
Var	298	34±30	0,03
Yok	67	27±30	
Tümör boyutu			
2 cm ↓	80	34±28	0,45
2 cm ↑	77	29±25	
Metastaz varlığı			
Var	73	34±27	0,23
Yok	70	30±28	

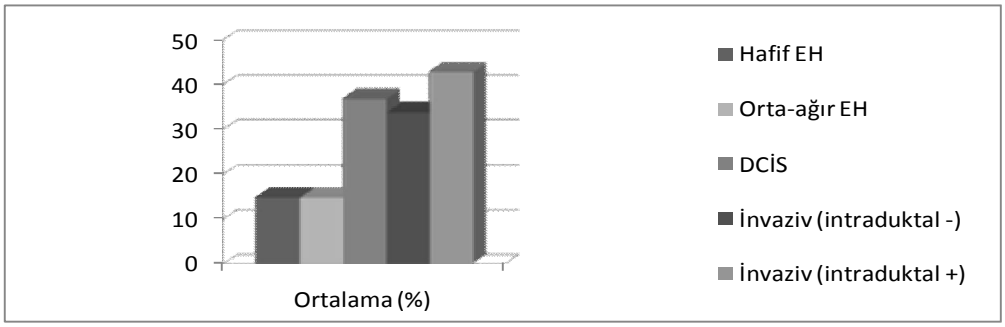


Resim 5a: İnvaziv duktal kasinom olgusunda %100 oranında SDF-1 ekspresyonu (AEC x100). Resim 5b: İnvaziv duktal karsinom olgusunda yaygın sitoplazmik SDF-1 ekspresyonu (AEC x200)

CXCR-4 ile boyanma oranları hafif derecede epitel hiperplazisi grubunda ortalama %15, orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda %15, duktal

karsinoma in situ grubunda %37, intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom grubunda %34 ve intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom grubunda %64 olarak bulundu (Tablo 20).

Tablo 20: CXCR-4 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı (ortalama)



Epitel hiperplazisi grupları arasında CXCR-4 ekspresyonu açısından farklılık saptanmadı. Kanser ve kanser olmayan grup karşılaştırıldığında CXCR-4 ekspresyonu kanser grubunda (duktal karsinoma in situ, intraduktal komponent içeren ve içermeyen invaziv duktal karsinom gruplarının toplamı) yüksek oranda ekspresyon saptandı ($p<0,0001$). Hafif derecede epitel hiperplazisi ve orta-ağır derecede epitel hiperplazisi olguları kanser grubunu oluşturan alt gruplar ile tek tek karşılaştırıldığında, kanser grubunun tüm alt gruplarında CXCR-4 ekspresyonunun belirgin olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Kanser grubunun alt grupları kendi içerisinde intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom olgularında (ort: 44,26) duktal karsinoma in situ olgularına (ort: 44,26) göre daha yüksek CXCR-4 ekspresyonu izlendi. Ayrıca invaziv duktal karsinom olguları içerisinde intraduktal karsinom içeren invaziv duktal karsinom

olgularındaki CXCR-4 ekspresyonu intraduktal komponent içermeyen invaziv duktal karsinom olgularından daha fazla idi ($p<0,05$) (Tablo 21).

Tablo 21: CXCR-4 ekspresyonunun olgulara göre dağılımı

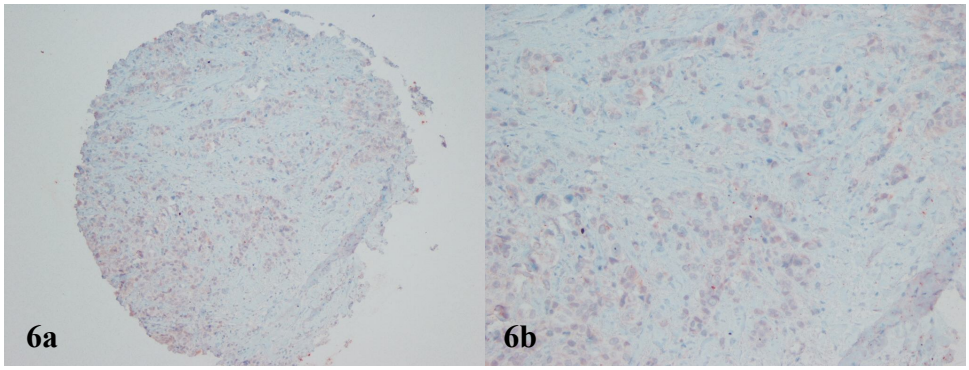
	Olgu sayısı	**Boyanma yaygınlığı ort (%)**		**p (0,005)**
Hafif duktal epitel hiperplazisi	36	15±23	OAEH	0,66
			DKİS	0,04
			İnv(int-)	0,001
			İnv(int+)	0,00001
Orta-ağır duktal epitel hiperplazisi	31	15±27	DKİS	0,04
			İnv(int-)	0,001
			İnv(int+)	0,00001
Duktal karsinoma in situ	21	37±39	İnv(int-)	0,91
			İnv(int+)	0,40
İnv. duktal kars. (intraduktal -)	213	34±34	İnv(int+)	0,03
İnv. duktal kars. (intraduktal+)	64	43±33	İnv(int-)	

Metastatik lenf nodu bulunan olgularda (ort: 72,66) ve tümör çapı 2 cm'den büyük olan (ort: 84,91) olgulardaki CXCR-4 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte metastatik olmayan olgulardan (ort: 69,27) ve

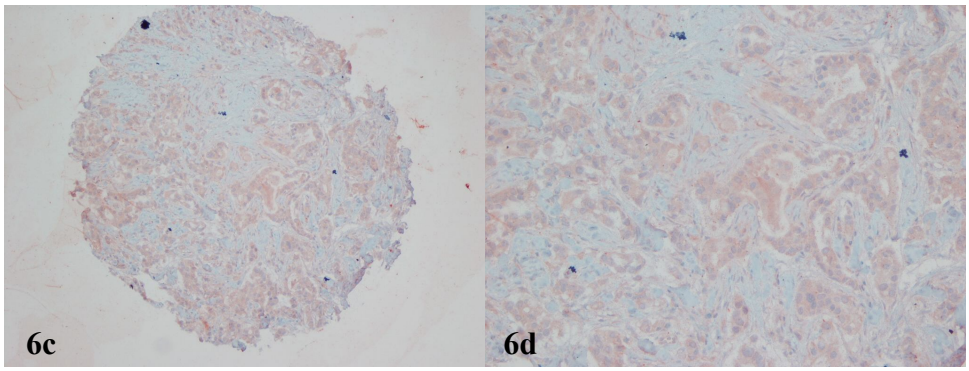
tümör çapı 2 cm'in altında olan (ort: 73,16) olgulardan daha yüksek idi (Tablo 22).

Tablo 22: CXCR-4 ekspresyonunun diğer değişkenlere göre dağılımı

Kanser varlığı			
Var	298	36±34	<0,0001
Yok	67	15±25	
Tümör boyutu			
2 cm ↓	80	34±34	0,10
2 cm ↑	77	42±31	
Metastaz varlığı			
Var	73	39±33	0,61
Yok	70	37±33	



Resim 6a: Invaziv duktal karsinom olgusunda %25 oraninda sitoplazmik CXCR-4 ekspresyonu (AEC x100). Resim 6b: Invaziv duktal karsinom olgusunda %25 oraninda sitoplazmik CXCR-4 ekspresyonu (AEC x200).



Resim 6c: Invaziv karsinom alanlarinda %100 oraninda CXCR-4 ekspresyonu (AEC x100). Resim 6d: Duktal karsinoma in situ komponenti bulunan invaziv duktal karsinom olgusunda %100 oraninda CXCR-4 ekspresyonu (AEC x200).

İnvaziv duktal karsinom olgu grubu intraduktal karsinom komponenti içeren ve içermeyen olarak ikiye ayrıldı. Ancak CXCR-4 dışındaki immünhistokimyasal belirteçler ile bu iki grup arasında anlamlı farklılık

saptanmadı. Bu sonuçlar, invaziv duktal karsinom olgularının duktal karsinoma in situ varlığından bağımsız olarak değerlendirilmesi gerektiğini, invaziv karsinom gelişimi tamamlandığında öncü lezyonun prognozu etkilemediğini gösterdi.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve kanser ölümlerinde birinci sırayı alan tümördür (1).

Meme kanseri gelişiminde prekanseröz lezyonlar atipisiz duktal epitel hiperplazisi, atipili duktal epitel hiperplazisi, duktal karsinoma in situ lezyonlarıdır. Atipisiz duktal epitel hiperplazisi lezyonlarından kanser gelişimi olasılığı, bir sonrası basamak olarak görülen atipili duktal epitel hiperplazisinden 2,5 kat daha azdır (1, 4). Meme kanseri karsinogenezinde, invaziv karsinomun orta derecede epitel hiperplazisi lezyonlarından, progresif olarak artan atipi ile duktal karsinoma in situ basamağına ve en son olarak da invaziv karsinom basamağına ulaştığı bilinmektedir (1, 24). Ancak Xu ve ark.'nın çalışmasında memenin Atipisiz duktal hiperplazi lezyonlarının progresyon sıralamasında daha ileri basamakta yer alan atipili duktal hiperplazi, duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinom lezyonları ile benzer genetik değişiklikleri gösterdiğini saptamışlar ve Atipisiz duktal epitel hiperplazilerinin memenin invaziv duktal karsinomlarının prekürsör lezyonlarından olduğunu savunmuşlardır (25).

Duktal karsinoma in situ malign transformasyon gösteren duktus epitel hücrelerinin duktus bazal membranını aşmaksızın meme duktusu içerisindeki varlığını ifade etmektedir (4). Hwang ve ark.'nın çalışmasında duktal karsinoma in situ olgularının invaziv duktal karsinomlar ile benzer bir kromozomal instabiliteye sahip oldukları, yüksek dereceli duktal karsinoma in situ olgularında

düşük/orta derece duktal karsinoma in situ olgularından farklı küçük kromozomal değişikliklerin varlığı gösterilmiştir (26).

Bu basamaklar arasındaki geçiş, keskin sınırlarla gerçekleşmeyebilir. Olgular değerlendirilerken atipili duktal epitel hiperplazisi ile duktal karsinoma in situ veya duktal karsinoma in situ ile invaziv duktal karsinom ayırıcı tanısında zorluklar yaşanabilir (27). Bu gibi ayırıcı tanı problemi yaşanan olgularda immünhistokimyasal belirteçlerden yardım alınabilir.

Gal-Gombos ve ark.'nın çalışmalarında HMWK'nın intraduktal proliferatif bir lezyonun belirlenmesinde yardımcı olduğunu ve atipi varlığında destekleyici bir bulgu olabileceğini belirtmişlerdir (28). Zhang ve ark. atipisiz duktal epitel hiperplazisi, atipili epitel hiperplazisi ve duktal karsinoma in situ lezyonlarında sırasıyla azalan oranlarda pozitiflik izlendiği sonucu ile HMWK'nın memenin intraduktal proliferatif lezyonlarının ayırıcı tanısında kullanışlı olduğunu savunmuşlardır (21). Bir başka çalışmada memenin intraduktal proliferasyonları ve sitokeratin boyanma profilleri incelenmiş, atipisiz duktal epitel hiperplazisinde difüz ve yoğun HMWK boyanması saptanmış, duktal karsinoma in situ olgularında boyanma kaybı veya fokal ve çok zayıf ekspresyon izlenmiş, atipili duktal epitel hiperplazi olgularında da duktal karsinoma in situ olgularına benzer boyanma saptanmıştır. Bu bulgular ile araştırıcılar problemli intraduktal proliferasyon olgularında HMWK'yı yardımcı olarak kabul etmişlerdir (29).

Bizim çalışmamızda hafif derecede epitel hiperplazisi olguarından orta-ağır derecede epitel hiperplazisi olgularına geçişte HMWK ekspresyonu açısından anlamlı farklılık olmamasına rağmen her iki epitel hiperplazisi grubunun invaziv duktal karsinom olgu grubu ile karşılaştırıldığında yüksek oranda boyanma göstermesi ($p<0,005$) HMWK'nın memenin benign proliferatif lezyonlarında eksprese olduğu ve progresif hastalık sürecinde ekspresyonun azaldığı görüşünü desteklemektedir. HMWKnın orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda duktal karsinoma in situ olgu grubundan daha fazla eksprese olması, tümörogenez sürecinde geçiş aralığında bulunan, ayırıcı tanı güçlüğü yaratabilecek olguların tanısında HMWK ekspresyonunun yardımcı olabileceğini düşündürmüştür. Tümör çapı ve metastatik hastalık ile HMWK ekspresyonu arasında ilişki saptanmamış olması ise HMWK ekspresyonunu ile prognostik önem taşıyan klinik veriler arasında ilişki olmadığını düşündürmüştür.

Meme kanserinde bazal fenotip bir süredir bilinmekle beraber, özellikle cDNA ekspresyon analizi ve bu özellikteki kanserlerin BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında daha yüksek oranda geliştiğinin fark edilmesi ile dikkat çekici hal almıştır (30, 31). Bazal belirteçlerin çalışıldığı diğer çalışmalarda da BRCA1 pozitif kanser hastalarında bazal tipte gen ekspresyonu varlığı izlenmektedir (32-34) . Çalışmalar arasında farklılıklar olmakla beraber bazal sitokeratinlerin saptandığı tümörlerde, bunların bağımsız prognostik belirteçler olarak ortaya çıktığını savunan çalışmalar da mevcuttur (35, 36).

Rakha ve ark. ise 1872 invaziv meme kanserli hastada doku mikro array yardımı ile hazırladıkları doku bloklarında bazal sitokeratinlerden sitokeratin 5/6 ve sitokeratin 14'ün aralarında bulunduğu bir dizi belirteç ile yaptıkları klinik takipli prospektif çalışmalarında, bazal fenotipin büyük tümör çapı, rekürrens, uzak metastaz gelişimi ve düşük yaşam beklentisi ile ilişkili olduğu sonucu yanı sıra, özellikle grade 3 tümörlerde tümör çapı, tümör derecesi, lenf nodu ve vasküler invazyon durumundan bağımsız olarak genel yaşam beklentisinde bağımsız bir belirleyici olduğu sonucuna ulaşmışlardır (37).

Dabbs ve ark.'nın çalışmasında, bazal fenotip belirteçlerinden Sitokeratin 5/6'nın daha spesifik olduğunu, Sitokeratin 14'ün de bu fenotipin belirlenmesinde yardımcı olduğunu, bazal fenotipteki duktal karsinoma in situnun invaziv karsinomun prekürsörü olduğunu, bazal fenotip varlığının klinik olarak yaşam beklentisinde yol gösterici olabileceğini savunmuşlardır (38). Bir baska çalışmada benzer şekilde bazal fenotip gösteren invaziv meme kanserlerinin prekürsor lezyonu olarak duktal karsinoma in situ lezyonlarında da bazal fenotipi destekleyen immünhistokimyasal profilin hakim olduğu gösterilmiştir (9).

Eerola ve ark. BRCA mutasyonu bulunduran meme kanserli hastalarda Sitokeratin 5/6 ekspresyonunun yüksek dereceli tümörler ve yüksek p53 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu ancak BRCA1 mutasyonu varlığı için ne Sitokeratin 5/6nın ne Sitokeratin 14'ün bağımsız göstergeler olmadığı sonucuna ulaşmışlardır (39). Bir diğer çalışmada uzak metastaz bulundurmayan olgularda, hastalıksız yaşam Sitokeratin 14 eksprese etmeyen tümör olgularında daha yüksek

iken, metastaz bulunduran olgularda Sitokeratin 14 ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (40).

Tang ve ark.'nın çalışmalarında, yüksek dereceli duktal karsinoma in situ olgularında bazal sitokeratinlerin düşük dereceli duktal karsinoma in situ olgularına göre daha yüksek oranda eksprese olduğunu göstermişler, yüksek dereceli duktal karsinoma in situ grubunun bazal hücre populasyonundan köken aldığını, daha agresif gidiş gösteren invaziv karsinomların öncüsü olan duktal karsinoma in situ olgularının, yüksek dereceli ve bazal belirteçleri eksprese eden hücrelerden köken aldığını savunmuşlardır (41). Başka bir çalışmada ise duktal karsinoma in situ lezyonlarında Sitokeratin 5/6 belirtecinin ekspresyon kaybı olduğunu gözlemişler ancak karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi ile benign proliferatif meme hastalıkları grubunda değişiklik saptanmazken, tüm duktal karsinoma in situ olgularında karakteristik genomik değişiklik olduğunu, bu sonuçlar ile bu progresyon sürecinde Sitokeratin 5/6'nın faydalı olmadığını ve benign proliferatif meme hastalıklarının duktal karsinoma in situ lezyonlarının kesin prekürsörleri olmadığını savunmuşlardır (42, 43).

Lacroix ve ark. HMWK ile karşılaştırıldığında bazal sitokeratinlerden Sitokeratin 5/6'nın benign ve malign epitelyal prolifersyonların ayırıcı tanısında, özellikle atipisiz duktal hiperplazi ve atipili duktal epitel hiperplazisi /duktal karsinoma in situ grubunun ayrımında yardımcı olacağı sonucuna ulaşmışlardır (44). Diğer taraftan MacGrogan ve ark. invaziv olmayan epitelyal meme lezyonlarında tanıya asıl olarak morfolojik analiz ile ulaşılacağı, Sitokeratin 5/6

ve E-kadherin belirteçlerinin doğru tanıya ulaşmada ve gözlemciler arası değişkenliğin azaltılmasında anlamlı bir katkı sağlamadığı sonucuna ulaşmışlardır (45).

Farklı iki çalışmada çoğu duktal karsinoma in situ olgusunun luminal sitokeratinlerle boyanma gösterdiğini, Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14 bazal belirteçleri ile boyanma göstermediklerini, ancak atipisiz duktal epitel hiperplazilerinde heterojen hücre populasyonuna işaret eder şekilde mozaik bir boyanma gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır (43, 46). Başka bir çalışmada atipisiz duktal epitel hiperplazisi olgularında Sitokeratin 5/6 ve HMWK pozitifliği izlenmiş, duktal karsinoma in situ olgularında bu boyanma paterni görülmemiştir. Ayırıcı tanı problemi olan olgularda, atipisiz duktal epitel hiperplazisi ile duktal karsinoma in situnun, bu immünhistokimyasal profil ile ayrılabildiği görüşü savunulmuştur (47).

Bizim çalışmamızda Sitokeratin 5/6 orta-ağır derecede epitel hiperplazisi basamağından itibaren hafif derecede epitel hiperplazisi grubundan daha fazla ekspresyon göstermektedir. Orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubundaki ekspresyon oranları hafif derecede epitel hiperplazisinden yüksek, duktal karsinoma in situ olgu grubuna daha yakındır. Sitokeratin 14 ekspresyonu ise epitel hiperplazileri grubunda orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda daha yüksektir. Tümörogenezin bir basamaklar bütünü olduğu düşünüldüğünde bizim olgu grubumızda orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubundan itibaren agresif bir dönüşümün başladığı düşüncesine ulaşılabilir. İnvaziv duktal karsinom

grubunda Sitokeratin 5/6 ekspresyonu duktal karsinoma in situ grubundan daha yüksek olmakla beraber Sitokeratin 14 ekspresyonu açısından farklılık bulunmamaktadır. Sitokeratin 14 belirtecinin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom olgularında intraduktal komponenti bulunmayan invaziv duktal karsinom olgularına göre daha yüksek eksprese olması, Sitokeratin 14 belirtecinin tümörün yaygınlığı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak en belirgin farklılık kanser grubu ile kanser olmayan grup arasında olup, olguların duktal karsinoma in situ basamağına geçişinden itibaren Sitokeratin 5/6 ekspresyonlarının belirgin artışı görülmektedir (p=0,05). Klinik olarak metastaz varlığı ve tümör çapının artışı ile Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14 ekspresyonlarının artışı agresifleşen tümör basamakları ile bazal belirteçlerin ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulunduğunu göstermektedir. Bulgular bazal belirteçlerin, özellikle klinik veriler ile desteklendiğinde prognoz hakkında yorum yapmaya yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Meme kanseri biyolojik olarak heterojen bir hastalıktır. Tümör boyutu ve lenf nodu durumu gibi prognoz ile ilişkili klinik parametreler (48) kullanılmakla beraber, lenf nodu negatif olan hastalarda klinik öngörü kazandırabilecek belirteç arayışı sürmektedir. Hücre siklusunda p27 anahtar role sahiptir. Barnes ve Gillett'in çalışmasında Cyclin D1 ve p27 seviyeleri ile klinik olarak iyi prognoz arasında ilişki bulunmuştur (49-51).

Tsutsui ve ark. 249 meme kanserli hastada, Bcl-2, p27 ve p53 protein ekspresyonlarının, MIB-1 değerleri ile gösterilebilen proliferatif aktiviteye

bağımlı olduğunu saptamışlardır (BMC Cancer 2006, 6:187). Aynı araştırıcıların bir başka çalışmalarında invaziv duktal karsinomlarda düşük PTEN ekspresyonu ile düşük p27 protein ekspresyonunun korele olduğunu ve ikisinin birlikte düşük ekspresyon gösterdiği olgularda kötü klinik gidiş olduğunu saptamışlar ve meme kanserlerinde agresif fenotip ile ilişikili olabileceğini savunmuşlardır (52).

Catzavelos ve ark. erken dönem meme kanseri hastalarında p27 proteininin ekspresyonundaki azalma ile kötü prognoz, hastalığın rekürrensi ve hastalığa bağlı ölümler arasında korelasyon olduğunu, p27 ekspresyonundaki azalmanın bağımsız bir kötü prognostik belirteç olabileceğini savunmuşlardır (53).

Zeng ve ark. bizim çalışmamızdaki hasta grubuna benzer bir hasta grubu ile ancak prostat dokusunda yaptıkları çalışmada, benign, premalign ve malign prostat dokularında p27'nin de aralarında bulunduğu apopitoz ilişkili belirteçlerin immünhistokimyasal ekspresyonunu değerlendirmişler, normal prostat dokularında ve benign prostat hiperplazilerinde p27'nin sitoplazmik ve nükleer pozitifliğini, prostatik intraepitelyal neoplaziler ve prostat kanserlerinde (malign tümör ile premalign lezyon arasında anlamlı fark olmaksızın) ise p27 ekspresyon kaybı olduğunu saptamışlardır (54) .

Spataro ve ark. 263'ü metastatik lenf nodu bulunduran 461 erken dönem meme kanserli hastada, p27'nin erken dönem meme kanserli hastalarda bağımsız prognostik belirteç olmadığı, histolojik derece gibi diğer prognostik belirteçler ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Lenf nodu metastazı bulunmayan hastalarda düşük

p27 pozitifliği ile yüksek Her-2/neu ekspresyonu arasında ve lenf nodu metastazı bulunan hastalarda düşük p27 pozitifliği ile yüksek Ki-67 ekspresyonu arasında ilişki bulunduğu savunulmuştur (55). Bir başka çalışmada ise düşük p27 ve yüksek Skp2 seviyelerinin, diğer kötü prognostik tümör belirleyicileri ile aynı yönde ekspresyon saptamışlar, ancak bu iki belirtecin bağımsız olarak prognostik veya hastalıksız sağ kalım sürecinde öngörülebilir anlam taşıyan belirteçler olmadıkları sonucuna ulaşmışlardır (56).

Porter ve ark. p27 proteininin düşük seviyelerdeki ekspresyonu ile düşük yaşam beklentisi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğunu, bu ilişkinin özellikle steroid reseptörü pozitif ve tamoksifen ile tedavi edilmiş hastalarda dikkat çekici olduğunu savunmuşlardır (50). Farklı iki çalışmada yüksek p27 ekspresyonunun bağımsız bir prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceğini düşünmüşlerdir (48, 57). Millar ve ark. duktal karsinoma in situ tanılı hastalarda, p27 ve hormon reseptör durumunun lokal rekürrensler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadığı, düşük p27 ekspresyonu gösteren tümörlerin östrojen ve progesteron reseptörlerinin negatif olduğu sonucuna ulaşmışlardır. (58). Diğer taraftan Esteva ve ark. P27 ekspresyonunun hastalıksız sağ kalım ile ilişkili olmadığını gösteren sonuçlara ulaşmışlardır (59).

Troncone ve ark.'nın çalışmasında, memedeki lezyonların ince iğne aspirasyonlarında p27 protein ekspresyonun, tümör yönünde diferansiyasyonun ve

sitolojik derecelemenin değerlendirilmesinde kullanışlı bir belirteç olduğu sonucuna ulaşılmıştır (60).

Palacios ve ark. BRCA1 pozitif kanserlerde bazal sitokeratinlerden CK5/6 ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek iken BRCA2 pozitif kanserlerde p27 ve p21'in belirgin eksprese olduğunu savunmuşlardır. Hücre siklusu, apopitoz ve bazal hücre belirteçlerinin hangi BRCA gen ürününün eksprese olduğu ile ilgili olarak farklılık gösterdiğini, BRCA1 pozitif meme kanserlerinin daha yüksek dereceli ve östrojen reseptörü negatif tümörler olduklarını, sıklıkla bazal fenotipe sahip olduklarını, Cyclin A'nın regülasyonun yüksek olduğunu ve dolayısıyla düşük nükleer p27 eksprese ettiklerini izlemişlerdir (61).

Traub ve ark. doku mikroarray eşliğinde yaptıkları çalışmalarında p27 ekspresyonunun azalması ve Skp2 ekspresyonunun artışını meme kanserinde temel kabul etmişler ve kanser terapisinde hedefe yönelik tedavide önemli bir seçenek olacağını düşünmüşlerdir (62).

Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak p27 belirtecinin duktal karsinoma in situ basamağından itibaren kanser olgu grubundaki ekspresyonu, epitel hipreplazisi olgu grubundan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda p27 ekspresyonu, kanser olgu grubunun her bir üyesi ile karşılaştırıldığında da anlamlı olarak daha yüksek ekspresyon izlenmektedir ($p<0,0001$). Bu sonuçlar kanser gelişimi ile birlikte hücre siklusunu düzenleyen proteinlerden biri olan p27'nin

kaybı bilgisini destekler niteliktedir. Epitel hiperplazisi grubu içerisinde orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda p27 ekspresyonu hafif derecede epitel hiperplazisi grubundan yüksek ekspresyon göstermekte olup, bu sonuç literatür bilgisi ile uyumsuzdur. Bu sonuç epitel hiperplazisi olgularının sayıca azlığından kaynaklanmış olabilir. Tümör boyutu artışı ile p27 ekspresyonundaki düşüş, belirtecin prognostik bir belirleyici olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Ancak bizim çalışmamızda p27 ekspresyonu ile metastatik hastalık varlığı arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Meme kanserli hastalarda yaşam beklentisini belirleyen en önemli prognostik faktörlerden biri metastaz varlığıdır. İnvaziv meme kanserli hastalarda en sık görülen metastaz aksiler lenf nodlarına olup, hastaların %38'inde görülmektedir (63).

CXCR-4 ve SDF-1 ekspresyonu tüm kanserlerde, farklı çalışmalarla incelenmiş, hastaların sağ kalımında rol oynayıp oynamadığı ve prognostik olarak anlamlı olup olmadığı araştırılmıştır.

SDF-1 kemik, akciğer, karaciğer, beyin, timus ve lenf nodlarının da içinde olduğu pek çok organ tarafından eksprese edilir (64). SDF-1 eksprese olduğu organlarda, temel olarak stromal hücreler (osteoblast, fibroblast ve kemik iliğinde endotelyal hücreler gibi) tarafından üretilir (65). SDF-1, CXCR-4'ün bilinen tek ligandıdır (66). SDF-1/CXCR-4 etkileşiminin bozulması hematopoetik, kardiyovasküler ve nöral sistem gelişimini negatif yönde etkilemektedir ve

embriyonel gelişim defektif olmaktadır. Bu fenotipik değişiklikler SDF-1/CXCR-4 etkileşiminin embriyonel progenitörlerin göçünde önemli rol oynadığını göstermektedir (67).

CXCR-4'ün pek çok tümör tipinde metastaz süreçlerinde (68), organ spesifik tümöral yayılım aşamalarında (69), tümör hücrelerinin proliferasyonun uyarılmasında (70), invazyon süreçlerinde (71) ve yeni damar oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (72). SDF-1, T lenfositler, monositler ve nötrofiller için kemotaktik ajan olup ayrıca pankreas, dalak, over ve ince bağırsak dokularında yüksek seviyelerde, beyin, kolon ve plasenta dokularında düşük seviyelerde eksprese edilmektedir (64, 73).

CXCR-4 kemokin reseptörü, SDF-1 aracılı kemotaksi yanıtını oluşturmak üzere T lenfositlerde, monositlerde ve ayrıca nötrofillerde, nöronlarda, glial hücrelerde, mikroglial hücrelerde ve endotel hücrelerinde bulunur. (74-78). Meme, prostat, over kanserleri, nöroblastom ve lösemilerde metastaz sürecinde rol alan reseptörlerin tümörlerin yayıldığı anatomik bölgelerde de eksprese olduğu gösterilmiş olup, bu gözlem tümör hücrelerinin spesifik bölgelere göçünde, organ-spesifik çekim molekülleri teorisini destekler nitelikte bulunmuştur (79).

CXCR-4 normal meme duktusunu döşeyen epitelde gösterilemezken, atipili duktal epitel hiperplazisi basamağından itibaren, malign transformasyonun oldukça erken bir basamağını temsil eder şekilde eksprese olmaya başlamaktadır (80). CXCR-4'ün ligandı olan SDF-1 (CXCl-12) kanser çevresinde ve bu alanı

drene eden lenf nodlarında çok yoğun eksprese edilmektedir (81). Stromal hücreler tarafından salgılanan SDF-1, tümör hücrelerinde sayıca artmış olarak bulunan CXCR-4 reseptörü aracılığı ile etkilemektedir. SDF-1 /CXCR-4 etkileşimi, metastaz sürecinde önemli rol oynamaktadır.

Kang ve ark. meme kanser hücre serilerinde yaptıkları genetik çalışmalarında, otokrin SDF-1/CXCR-4 etkileşiminin agresif gidiş, artmış invazyon potansiyeli ve tümörün artmış büyüme hızı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (82).

Ishigami ve ark. 185 mide kanseri olgusunda immünhistokimyasal olarak SDF-1 ekspresyonu ve klinik yansımalarını araştıran çalışmalarında, tümör hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz SDF-1 ekspresyonu gözledikleri 78 hastada, SDF-1 ekspresyonu saptanmayan gruba oranla invazyon derinliğinin daha fazla olduğunu, tümör çapının daha büyük olduğunu, daha fazla lenf nodu metastazı, lenfatik ve venöz invazyon saptamışlardır. İmmünhistokimyasal boyanmanın şiddeti ile invazyon derinliği veya lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (83).

Müller ve ark. meme kanserinin metastaz aşamalarında rol alan kemokin reseptörleri ile ilgili immünhistokimyasal, RNA PCR, in vitro ve in vivo basamakları olan bir çalışma yapmışlardır. İmmünhistokimyasal olarak normal meme duktus hücrelerinin CXCR-4 reseptörünü eksprese etmediklerini, ancak meme karsinom hücrelerinin yüksek seviyelerde CXCR-4 eksprese ettiğini

göstermişlerdir. Primer tümöre ek olarak, metastatik aksiler lenf nodlarında, akciğer ve karaciğere olan meme karsinom metastazlarında da yüksek seviyelerde CXCR-4 ekspresyonunu göstermişlerdir. SDF-1 mRNA'nın pek çok farklı dokuda eksprese olduğu bilinmekle beraber (84), farklı organlardaki SDF-1 ekspresyonunun kantitatif analizinin yapıldığı Müller ve ark.'nın çalışmasında SDF-1 mRNAnın özellikle lenf nodları, karaciğer, akciğer ve kemik iliğinde yüksek ekspresyon gösterdiği saptanmış olup, ince bağırsak, böbrek, deri, beyin ve iskelet kasında belirgin derecede düşük eksprese edildiğini göstermişlerdir. Yüksek seviyelerde SDF-1 ekspresyonu gösteren organların, meme kanserinin en sık metastaz yaptığı organlar olması araştırmacılar tarafından dikkati çekici bulunmuştur. Çalışmada immünsüprese fareler ile, SDF-1/CXCR-4 etkileşiminin engellendiği bir in vivo çalışma yapılmış ve anti-CXCR-4 enjekte edilmiş farelerde akciğer metastazının ve lenf nodu metaslarının kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaldığı sonucuna ulaşmışlardır. Kemokin ligand-reseptör etkileşiminin meme kanseri metastazlarında oldukça önemli bir rolü olduğun düşünmüşlerdir. (81). Meme kanser hücrelerinde CXCR-4 gen ekspresyonunun endojen olarak yok edildiği bir çalışma, meme kanser hücre göçünde belirgin bir azalma ile sonuçlanmıştır (85).

Cabioğlu ve ark.'nın 98 lenf nodu metaztazı olan, 99 lenf nodu metastazı olmayan T1 meme kanseri olgusunda, immünhistokimyasal olarak CCR-7, CXCR-4 ve Her2-neu ekspresyonu ile lenf nodu metastazı ve metastaz yaygınlığını inceleyen çalışmalarında, kemokin reseptörü CCR-7'nin lenf nodu

metastazı ile ilişkili önemli bir belirteç olduğunu, CXCR-4 ve Her2-neu belirteçlerinin de lenf nodu tutulumunun yaygınlığı ile ilişkili belirteçler olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar ile bir meme kanseri olgusunda sentinel lenf nodu tutulumu olup olmadığının öngörülebileceğini savunmuşlardır (69).

Lee ve ark. meme kanser hücrelerinde hem RT-PCR ile hem de immünhistokimyasal olarak SDF-1 ekspresyonun normal meme epitel hücrelerine göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır (86). CXCR-4'ün RNA aracılı down-regülasyonu ile in vitro olarak meme kanser hücrelerinin invazyonun azaltıldığı gösterilmiştir (85).

Kang ve ark. SDF-1/CXCR-4 kompleksinin varlığı gösterilen meme kanseri olgularının daha invaziv olduklarını ve daha hızlı hücresel göçe uğradıklarını, SDF-1 seviyesinin lenf nodu tutulumu, rekürrens ve hastalıksız sağ kalım süresinin öngörülmesinde yararlı olduğunu savunmuşlardır (87).

Woo ve ark. 105 meme kanserli hastada, diffüz nükleer CXCR-4 pozitifliği ile lenf nodu metastazı arasında östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü negatif olan tümörlerde oldukça anlamlı bir ilişki olduğunu saptamışlar ancak Her-2/neu ekspresyonu ile arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (88).

BC Schmid ve ark'nın meme kanser öncülerinden olan duktal karsinoma in situ ve atipili duktal epitel hiperplazilerinde immünhistokimyasal olarak CXCR-4 ekspresyonun araştırdıkları çalışmalarında, inceledikleri invaziv duktal karsinom komşuluğunda veya bağımsız 14 duktal karsinoma in situ ve atipili

duktal epitel hiperplazisi olgusunun 13'ünde hem duktal karsinoma in situ hem de atipili duktal epitel hiperplazisi alanları ve tüm invaziv duktal karsinom hücreleri sitoplazmik CXCR-4 pozitifliği göstermiştir. Normal meme duktus epitelinde boyanma olmamıştır. CXCR-4 ekspresyonu ile duktal karsinoma in situnun derecesi arasında ilişki bulunmadığını gözlemişlerdir (80).

Tümör hücreleri tarafından eksprese edilen CXCR-4 ve CCR-7 reseptörlerinin, metastazların oluşum sürecinde en önemli basamak olduğu düşünülmektedir (81, 89).

Salvucci ve ark.'nın çalışmasında meme tümör progresyon basamakları göz önüne alındığında, normal meme dokusundan, hiperplaziler, duktal karsinoma in situya ve invaziv meme kanserlerine doğru, CXCR-4 ile artan derecelerde nükleer boyanma gözlediklerini belirtmişler, şiddetli sitoplazmik pozitifliğin kötü klinik gidiş hakkında fikir verebileceğini ve nükleer boyanmanın bağımsız bir prognostik belirteç olduğunu saptamışlardır. Ek olarak sitoplazmik CXCR-4 pozitifliğinin tümörün agresif gidişi ile bilgi verebileceğini, artan oranlarda sitoplazmik pozitifliğin östrojen reseptörü ve progesteron reseptörlerinin negatif oluşu ve Her2-neu amplifikasyonu ve overekspresyonu ile ilişkili olduğunu gözlemişlerdir. Sonuç olarak CXCR-4 ekspresyonunun metastaz potansiyelinin belirlenmesinde ve klinik gidişin öngörülmesinde anlamlı sonuçlara sahip olduğunu, meme kanserli hastalarda veya invaziv meme kanseri için risk taşıyan hasta grubunda, hem terapötik hem de tanısal amaçlı kullanılabilecek bir belirteç olduğunu savunmuşlardır (90).

Bizim çalışmamızda tümöral progresyon ile birlikte CXCR-4 ekspresyonunun literatür ile uyumlu şekilde artış gösterdiğini saptanmıştır. Duktal karsinoma in situ basamağından itibaren kanser gelişimi ile CXCR-4 reseptörünün ekspresyonu belirgin olarak artmaktadır ($p<0,001$). Ekspresyon düzeyleri arasındaki fark epitel hiperplazileri grubu içerisinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber orta-ağır derecede epitel hiperplazisi basamağından itibaren başlamaktadır. Kanser grubu içerisinde de invaziv duktal karsinom olgularında CXCR-4 ekspresyonu duktal karsinoma in situ grubundan daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar CXCR-4 ekspresyonunun ilerleyen tümöral gelişim basamaklarında kötü progresyonu belirlemek adına yardımcı bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu belirteçlerin asıl olarak metastaz süreçlerinin öngörülebilirliği üzerine etkilerinin araştırıldığı düşünüldüğünde bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak metastatik hastalık varlığında CXCR-4 ekspresyonunun artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Tümör çapının artışı ile de CXCR-4 ekspresyonu arasında doğru orantılı bir artış saptanmış olup, CXCR-4'ün genel tümörogenez basamaklarında kötü prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

SDF-1 ekspresyonu ise kanser olgularında, kanser içermeyen olgulara göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,03$). Kanser olgularındaki her bir grubun orta-ağır derecede epitel hiperplazisi ve hafif derecede epitel hiperplazisi gruplarından daha yüksek SDF-1 ekspresyonu göstermeleri dikkat çekicidir. Epitel hiperplazisi grupları arasında da SDF-1 ekspresyonu orta-ağır derecede

epitel hiperplazisi grubunda hafif derecede epitel hiperplazisi grubundan daha yüksek bulunmuştur. Kanser olguları arasında duktal karsinoma in situ olgu grubunda SDF-1 ekspresyonunun invaziv duktal karsinom olgu gruplarından yüksek olması ile, duktal karsinoma in situ geçişi görüldüğünde olguların invaziv duktal karsinom grubu ile birlikte değerlendirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Metastatik hastalık varlığında tümörlerde SDF-1 ekspresyonunun artışı sonucu da literatür ile uyumludur. Bu sonuçlar, progresyon basamaklarını adım adım takip etmemekle birlikte SDF-1 ekspresyonun literatür ile uyumlu olarak kötü prognoz göstergelerinden biri olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Erken tanı ve tedavinin çok önemli olduğu tümör gruplarından biri olan meme karsinomlarında, göreceli kolay bir yöntem olan iğne biyopsileri ile ulaşılabilen dokularda prognostik değeri olabilecek immünhistokimyasal belirleyici arayışı sonucu bir kısmı bizim araştırmamızda da kullanılan bir dizi belirtece ulaşılmıştır. Çalışmaların amacı kolayca ve en az travma ile ulaşılabilen biyopsi örneklerinden en fazla bilgiye ulaşabilmektir. Bu anlamda yapılan çalışmalara bizim çalışmamız da eklenebilir. Çalışmamızda, CXCR-4 ve SDF-1 belirteçlerinin tümör gelişim basamaklarında, tümör boyutunun artışı ve lenf nodu metastazı varlığı ile uyumlu kötü prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği, bazal sitokeratinlerin ekspresyonunun gösterilmesi ile metastatik hastalık varlığının desteklenebileceğini, HMWK ve p27'nin ile birlikte kullanıldıklarında kanser olmayan olgu grubunda eksprese olarak özellikle atipili epitel hiperplazisi ve duktal karsinoma in situ olgu gruplarında geçiş zonunda yer alan ve ayırıcı tanı

güçlüğü yaratan biyopsilerde yardımcı olarak kullanılabileceği sonuçlarına ulaşılmıştır.

6. SONUÇ

1) Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak HMWK ekspresyonunun invaziv duktal karsinom olgularında kaybolduğu görülmüştür. Memenin benign proliferatif lezyonlarında HMWK ekspresyonunun anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,005$). Hafif derecede epitel hiperplazisi ile orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grupları arasında HMWK ekspresyonu açısından farklılık saptanmamıştır.

2) Tümör çapı ve metastatik lenf nodu varlığı ile HMWK ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

3) Bazal sitokeratin belirteçleri (Sitokeratin 5/6 ve Sitokeratin 14) kanser grubu olgularda, benign proliferatif meme lezyonları grubundan belirgin olarak daha fazla ekspresyon göstermektedir ($p<0,05$). Ayrıca epitel hiperplazisi grubu, duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinom olgu gruplarında giderek artan oranlarda Sitokeratin 5/6 ekspresyonu saptanmıştır.

4) Her iki bazal belirtecin ekspresyonu klinik olarak kötü prognostik değeri olan tümör çapı artışı ve lenf nodu metastazı ile korelasyon göstermektedir.

5) p27 kanser içermeyen olgu grubunda, kanser içeren olgu grubundan anlamlı olarak yüksek ekspresyon göstermektedir ($p<0,0001$). Orta-ağır derecede epitel hiperplazisi grubunda p27 ekspresyonu, duktal karsinoma in situ, intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom ve intraduktal komponent içermeyen

invaziv duktal karsinom olgu gruplarının her birinden daha yüksek ekspresyon göstermektedir ($p<0,0001$).

6) Tümör çapı arttıkça p27 ekspresyonu azalmaktadır ancak çalışmamızda lenf nodu metastazı varlığı ile p27 ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

7) Duktal karsinoma in situ basamağından itibaren kanser grubunda, CXCR-4 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir ($p<0,001$). Kanser grubu içerisinde, kanser progresyonu ile doğru orantılı bir biçimde CXCR-4 ekspresyonunda artış izlenmektedir.

8) Metastatik lenf nodu varlığında tümörlerdeki CXCR-4 ekspresyonu artış göstermektedir. Tümör çapının artışı ile CXCR-4 belirtecinin ekspresyonu artmaktadır.

9) SDF-1 ekspresyonu kanser olgu grubunda kanser olmayan olgu grubundan anlamlı olarak daha yüksek ekspresyon göstermektedir ($p<0,03$). Duktal karsinoma in situ olgularında SDF-1 ekspresyonu, hafif derecede epitel hiperplazisi ve orta-ağır derecede epitel hiperplazisi olgularından yüksek olup, hafif derecede epitel hiperplazisi olgu grubunda bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,005$).

10) Metastatik lenf nodu varlığında ve tümör çapı artışı ile tümör hücrelerinde SDF-1 ekspresyonu artış göstermektedir.

7. ÖZET

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve kanser ölümlerinde kadınlarda ilk sırayı alan kanser türüdür. Erken tanı ve tedavinin çok önemli olduğu tümör gruplarından biri olan meme karsinomlarında, prognostik öngörü sağlayabilecek immünhistokimyasal belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2006-2008 yılları arasında değerlendirilmiş olan modifiye radikal mastektomi materyalleri, eksizyonel meme biyopsileri ve meme iğne biyopsilerinde tanıları duktus epitel hiperplazisi, duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinom olan 365 olguda lenf nodu durumu ve tümör çapı da göz önünde tutularak HMWK, Sitokeratin 5/6, Sitokeratin 14, p27, CXCR-4 ve SDF-1 belirteçleri immünhistokimyasal olarak çalışılmıştır.

Doku mikroarray yöntemi kullanılarak hazırlanan bloklara uygulanan immünhistokimyasal boyama sonucunda, CXCR-4 ve SDF-1 belirteçlerinin tümör gelişim basamaklarında, tümör boyutunun artışı ve lenf nodu metastazı varlığı ile uyumlu kötü prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği, bazal sitokeratinler ve p27 ile birlikte kullanıldıklarında metastatik hastalık varlığının desteklenebileceğini, HMWK ve p27'nin ile birlikte kullanıldıklarında kanser olmayan olgu grubunda eksprese olarak özellikle atipili epitel hiperplazisi ve duktal karsinoma in situ olgu gruplarında geçiş zonunda yer alan ve ayırıcı tanı güçlüğü yaratan biyopsilerde yardımcı olarak kullanılabileceği sonuçlarına ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Doku mikro array, CXCR-4, SDF-1, p27, Sitokeratin 5/6, Sitokeratin 14, HMWK, benign proliferatif meme lezyonları, duktal karsinoma in situ, invaziv duktal karsinom.

8.SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer and the most common reason in cancer death in women population. Early diagnosis and treatment are very important in breast cancers. The immunohistochemical markers which could have prognostic information are always needed.

This study included 365 cases of invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ and ductal epithelial hyperplasia archived in Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Pathology between 2006-2008. All histological slides were prepared with tissue microarray method and stained immunohistochemically to show expressions of HMWK, Cytokeratin 14, Cytokeratin 5/6, p27, CXCR-4 and SDF-1 markers with the information of lymph node status and tumor size.

In conclusion, the higher CXCR-4 and SDF-1 expressions were associated with tumor progression, tumor size and lymph node status. Basal cytokeratins and p27 expressions were emphasized metastatic disease when they were used together. In benign proliferative lesions both HMWK and p27 expresions were helpful in differential diagnosis of borderline atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ.

Key words: Tissue microarray, CXCR-4, SDF-1, p27, Cytokeratin 5/6, Cytokeratin 14, HMWK, benign proliferative breast lesions, ductal carcinoma in situ, invasive ductal carcinoma.

9.KAYNAKLAR

1. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9 ed. London: Mosby; 2004.

2. Rosen PP, editor. Rosen's Breast Pathology. 3 ed: Lippincott Williams&Wilking; 2008.

3. Fattaneh A. Tavassoli PD. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003.

4. Mills SE. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004.

5. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, et al. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. Cancer 1985;55:2698-708.

6. Fletcher CDM, editor. Diagnostic Histopathology of Tumors. 3 ed. USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2007.

7. Silverberg SG, editor. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology. 4 ed. USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2005.

8. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Premalignant and malignant disease of the breast: the roles of the pathologist. Mod Pathol 1998;11:120-8.

9. Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. Mod Pathol 2006;19:617-21.

10. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. J Pathol 2006;208:495-506.

11. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998;338:436-45.

12. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 1997;15:675-705.

13. Hamada T, Tashiro K, Tada H, et al. Isolation and characterization of a novel secretory protein, stromal cell-derived factor-2 (SDF-2) using the signal sequence trap method. Gene 1996;176:211-4.

14. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 2000;12:121-7.

15. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature 1998;393:591-4.

16. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature 1996;382:635-8.

17. Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. N Engl J Med 2001;345:833-5.

18. Kucia M, Jankowski K, Reca R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. J Mol Histol 2004;35:233-45.

19. Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, et al. Control of proliferation by Bcl-2 family members. Biochim Biophys Acta 2004;1644:159-68.

20. Dabbs D, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. 2 ed. USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2006.

21. Zhang JL, Zhang HY, Wei B, et al. [Role of cytokeratin expression in differential diagnosis of intraductal proliferative lesions of breast]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 2004;33:316-9.

22. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. J Immunol Methods 1987;103:121-9.

23. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Hum Mol Genet 2001;10:657-62.

24. Marlow R, Strickland P, Lee JS, et al. SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. Cancer Res 2008;68:7819-27.

25. Xu S, Wei B, Zhang H, et al. Evidence of chromosomal alterations in pure usual ductal hyperplasia as a breast carcinoma precursor. Oncol Rep 2008;19:1469-75.

26. Hwang ES, DeVries S, Chew KL, et al. Patterns of chromosomal alterations in breast ductal carcinoma in situ. Clin Cancer Res 2004;10:5160-7.

27. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast: evolving perspectives. Cancer Treat Rev 2000;26:103-25.

28. Gal-Gombos EC, Esserman LE, Recine MA, et al. Large-needle core biopsy in atypical intraductal epithelial hyperplasia including immunohistochemical expression of high molecular weight cytokeratin: analysis of results of a single institution. Breast J 2002;8:269-74.

29. Moinfar F, Man YG, Lininger RA, et al. Use of keratin 35betaE12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type--benign and malignant intraductal proliferations. Am J Surg Pathol 1999;23:1048-58.

30. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. J Pathol 2005;207:260-8.

31. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:10869-74.

32. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:8418-23.

33. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. J Natl Cancer Inst 2003;95:1482-5.

34. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002;415:530-6.

35. Potemski P, Kusinska R, Watala C, et al. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. Oncology 2005;69:478-85.

36. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. J Pathol 2004;203:661-71.

37. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. Eur J Cancer 2006;42:3149-56.

38. Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, et al. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. Mod Pathol 2006;19:1506-11.

39. Eerola H, Heinonen M, Heikkila P, et al. Basal cytokeratins in breast tumours among BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. Breast Cancer Res 2008;10:R17.

40. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. Breast Cancer Res 2007;9:R4.

41. Tang P, Wang X, Schiffhauer L, et al. Relationship between nuclear grade of ductal carcinoma in situ and cell origin markers. Ann Clin Lab Sci 2006;36:16-22.

42. Boecker W, Buerger H, Schmitz K, et al. Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. J Pathol 2001;195:415-21.

43. Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, et al. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. Histopathology 2000;37:232-40.

44. Lacroix-Triki M, Mery E, Voigt JJ, et al. Value of cytokeratin 5/6 immunostaining using D5/16 B4 antibody in the spectrum of proliferative intraepithelial lesions of the breast. A comparative study with 34betaE12 antibody. Virchows Arch 2003;442:548-54.

45. MacGrogan G, Arnould L, de Mascarel I, et al. Impact of immunohistochemical markers, CK5/6 and E-cadherin on diagnostic agreement in non-invasive proliferative breast lesions. Histopathology 2008;52:689-97.

46. Moriya T, Kasajima A, Ishida K, et al. New trends of immunohistochemistry for making differential diagnosis of breast lesions. Med Mol Morphol 2006;39:8-13.

47. Rabban JT, Koerner FC, Lerwill MF. Solid papillary ductal carcinoma in situ versus usual ductal hyperplasia in the breast: a potentially difficult distinction resolved by cytokeratin 5/6. Hum Pathol 2006;37:787-93.

48. Wu J, Shen ZZ, Lu JS, et al. Prognostic role of p27Kip1 and apoptosis in human breast cancer. Br J Cancer 1999;79:1572-8.

49. Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1998;52:1-15.

50. Porter PL, Barlow WE, Yeh IT, et al. p27(Kip1) and cyclin E expression and breast cancer survival after treatment with adjuvant chemotherapy. J Natl Cancer Inst 2006;98:1723-31.

51. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. Nat Med 1997;3:222-5.

52. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, et al. Inactivation of PTEN is associated with a low p27Kip1 protein expression in breast carcinoma. Cancer 2005;104:2048-53.

53. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. Nat Med 1997;3:227-30.

54. Zeng L, Rowland RG, Lele SM, et al. Apoptosis incidence and protein expression of p53, TGF-beta receptor II, p27Kip1, and Smad4 in benign, premalignant, and malignant human prostate. Hum Pathol 2004;35:290-7.

55. Spataro VJ, Litman H, Viale G, et al. Decreased immunoreactivity for p27 protein in patients with early-stage breast carcinoma is correlated with HER-2/neu overexpression and with benefit from one course of perioperative chemotherapy in patients with negative lymph node status: results from International Breast Cancer Study Group Trial V. Cancer 2003;97:1591-600.

56. Ravaioli A, Monti F, Regan MM, et al. p27 and Skp2 immunoreactivity and its clinical significance with endocrine and chemo-endocrine treatments in node-negative early breast cancer. Ann Oncol 2008;19:660-8.

57. Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. Cancer Res 1997;57:1259-63.

58. Millar EK, Tran K, Marr P, et al. p27KIP-1, cyclin A and cyclin D1 protein expression in ductal carcinoma in situ of the breast: p27KIP-1 correlates with hormone receptor status but not with local recurrence. Pathol Int 2007;57:183-9.

59. Esteva FJ, Sahin AA, Rassidakis GZ, et al. Jun activation domain binding protein 1 expression is associated with low p27(Kip1)levels in node-negative breast cancer. Clin Cancer Res 2003;9:5652-9.

60. Troncone G, Migliaccio I, Caleo A, et al. p27(Kip1) expression and grading of breast cancer diagnosed on cytological samples. Diagn Cytopathol 2004;30:375-80.

61. Palacios J, Honrado E, Osorio A, et al. Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. Breast Cancer Res Treat 2005;90:5-14.

62. Traub F, Mengel M, Luck HJ, et al. Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2006;99:185-91.

63. Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinoma. World J Surg 2001;25:767-72.

64. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. Genomics 1995;28:495-500.

65. Yun HJ, Jo DY. Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. J Korean Med Sci 2003;18:679-85.

66. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature 1998;393:595-9.

67. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:9448-53.

68. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:79-94.

69. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. Clin Cancer Res 2005;11:5686-93.

70. Yoon Y, Liang Z, Zhang X, et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. Cancer Res 2007;67:7518-24.

71. Chinni SR, Sivalogan S, Dong Z, et al. CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. Prostate 2006;66:32-48.

72. Wang J, Sun Y, Song W, et al. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. Cell Signal 2005;17:1578-92.

73. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). J Exp Med 1996;184:1101-9.

74. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, et al. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. Curr Biol 1997;7:112-21.

75. Ohtani Y, Minami M, Kawaguchi N, et al. Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. Neurosci Lett 1998;249:163-6.

76. Tanabe S, Heesen M, Yoshizawa I, et al. Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. J Immunol 1997;159:905-11.

77. Volin MV, Joseph L, Shockley MS, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. Biochem Biophys Res Commun 1998;242:46-53.

78. Feil C, Augustin HG. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. Biochem Biophys Res Commun 1998;247:38-45.

79. Liotta LA. An attractive force in metastasis. Nature 2001;410:24-5.

80. Schmid BC, Rudas M, Rezniczek GA, et al. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. Breast Cancer Res Treat 2004;84:247-50.

81. Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 2001;410:50-6.

82. Kang H, Mansel RE, Jiang WG. Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. Int J Oncol 2005;26:1429-34.

83. Ishigami S, Natsugoe S, Okumura H, et al. Clinical implication of CXCL12 expression in gastric cancer. Ann Surg Oncol 2007;14:3154-8.

84. Tashiro K, Tada H, Heilker R, et al. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. Science 1993;261:600-3.

85. Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. Cancer Res 2003;63:4801-4.

86. Lee BC, Lee TH, Avraham S, et al. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. Mol Cancer Res 2004;2:327-38.

87. Kang H, Watkins G, Parr C, et al. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. Breast Cancer Res 2005;7:R402-10.

88. Woo SU, Bae JW, Kim CH, et al. A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. Ann Surg Oncol 2008;15:281-5.

89. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. Cancer Res 2002;62:5930-8.

90. Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. Breast Cancer Res Treat 2006;97:275-83.