

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNTRADUKTAL VE İNVAZİV DUKTAL MEME
KARSİNOMLARINDA PTEN, SURVİVİN
EKSPRESYONU VE APOPİTOZİS İLE İLİŞKİSİ**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Caner KIR

AFYONKARAHİSAR 2007

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNTRADUKTAL VE İNVAZİV DUKTAL MEME
KARSİNOMLARINDA PTEN, SURVİVİN
EKSPRESYONU VE APOPİTOZİS İLE İLİŞKİSİ**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Caner KIR

Danışman: Doç.Dr. Fatma Aktepe

AFYONKARAHİSAR 2007

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : İntraduktal ve İnvaziv Duktal Meme
Karsinomlarında PTEN, Survivin
Ekspresyonu ve Apoptozis ile İlişkisi

Tezi Hazırlayan : Dr. Caner Kır

Tez Savunma Tarihi :

Tez Kabul Tarihi :

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fatma Aktepe

İş bu çalışma jürimiz tarafından PATOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA
UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

ÜYE

ÜYE

ONAY

DEKAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli tez danışmanım Doç. Dr. Fatma Aktepe hocama yardımları için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Hüsniye Dilek, Doç. Dr. Çiğdem Tokyol ve Yrd. Doç. Dr. Önder Şahin'e teşekkür ederim.

Tezimi çalıştığım sürece özellikle immunohistokimya çalışmaları sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Laborant Melek Akyol ve Biyolog Mhrican Aydın Özgür'e teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
KISALTMALAR.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER.....	VI
I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. Meme Normal Gelişimi ve Yapısı.....	3
II.2.1. Meme Karsinomları.....	4
II.2.2. İnsidans ve Epidemiyoloji.....	5
II.2.3. Lokalizasyon.....	8
II.2.4. Klinik.....	8
II.2.5. Histolojik Sınıflama.....	8
II.2.6. Histolojik Grade.....	10
II.2.7. Duktal Karsinoma İn situ.....	12
II.2.8. Prognostik ve Prediktif Faktörler.....	13
II.2.9. Moleküler Biyoloji ve Genetik.....	17
II.2.10. Tedavi.....	19
II.3. Apoptoz.....	19
II.3.1. TUNEL.....	24
II.4. Survivin.....	24
II.5. PTEN.....	27
III. GEREÇ ve YÖNTEM.....	31
III.1. Olgu Seçimi.....	31
III.2. İmmunohistokimya.....	32
III.3. TUNEL Yöntemi.....	33
III.4. Değerlendirme.....	33
III.5. İstatiksel Analiz.....	35
IV. BULGULAR.....	36
V. TARTIŞMA.....	46
VI. SONUÇLAR.....	53
VII. ÖZET.....	54

VIII. SUMMARY.....	56
IX. KAYNAKLAR.....	58

KISALTMALAR

PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
TDLÜ	: Terminal Duktuler Lobüler Ünite
DKİ	: Duktal karsinoma in situ
ALN	: Aksiller lenf nodu
ER	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
LOH	: Heterozigosite kaybı
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
CGH	: Karşılaştırmalı genom hibridizasyonu
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
kDa	: Kilodalton
AI	: Apoptotik indeks

TABLO LİSTESİ

Tablo-I	: Meme tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü histolojik klasifikasyonu	9
Tablo-II	: Meme kanserleri histolojik grade'leme sistemi	11
Tablo-III	: Van Nuys DKİ sınıflama sistemi	13
Tablo-IV	: Meme kanserinde rol alan tümör baskılayıcı genler ve onkogenler	19
Tablo-V	: PTEN geninde mutasyonu gösterilmiş bazı kodonlar	29
Tablo-VI	: Primer antikörlerin klonları, inkübasyon süreleri ve dilüsyon oranları	32
Tablo-VII	: PTEN, survivin skorlanması	34
Tablo-VIII	: Tümör ve hasta özellikleri	37
Tablo-IX	: İnvaziv duktal karsinomlu olgularda PTEN, survivin boyanma skorları	38
Tablo-X	: İnvaziv duktal karsinomlu olgularda PTEN, survivin boyanma skorları, TUNEL boyanma yüzdesi ile klinikopatolojik faktörler arasındaki ilişki	41
Tablo-XI	: İnvaziv duktal karsinom, duktal karsinoma in situ, epitelyal hiperplazi ve fibrokistik değişikliklerde PTEN, survivin ve TUNEL boyanma ortalamalarının karşılaştırılması.....	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1	: Apoptozun mekanizması	23
Şekil 2	: Survivin ile apoptoz inhibisyon modeli	26
Şekil 3	: PTEN proteinin fonksiyonu	28
Şekil 4	: Akt yolunun diagramatik gösterimi	28

I-GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanserleri, kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup tüm kanserlerden ölüm nedenleri arasında 2. sıradadır. Meme kanserlerinde çok sayıda genetik değişiklik gözlenir.

Fosfataz ve tensin homolog (PTEN), hücre büyümesi ve apoptoz için gerekli sinyalleri düzenlemede (fosfoinozimid 3- kinaz-Akt yolu antagonisti) önemli rol oynayan tümör supressör proteindir. Apoptoza duyarlılığı sürdürmek için ekstrasellüler matriks ve hücre etkileşimlerini inhibe eder. PTEN yokluğu veya mutasyonunda lipid sinyal transdüksiyonu yoluyla tümör hücreleri apoptozdan korunabilir. Çeşitli insan kanserlerinde PTEN gen mutasyonu görülür ve çoğu kanserde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir. Meme kanserlerinde de PTEN ekspresyonunda azalmanın kötü prognozla ilişkili olduğu ve yeni bir prognostik belirleyici olabileceği ileri sürülmektedir.

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar. Bu sinyaller iki ana apoptotik yolu; hücre dışı / hücre ölüm reseptörü ve hücre içi / mitokondrial yolu harekete geçirirler. Apoptoz sırasında bir grup proteaz (kaspazlar) harekete geçerek, DNA kırılmasına, hücre büzülmesine ve hücre yüzeyinde çıkıntılar oluşmasına neden olur. TUNEL, apoptotik sinyal kaskadında DNA kırıklarının saptanmasında yaygın kullanılan bir yöntemdir.

İnsanlarda apoptotik mekanizmanın bozulması kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine neden olabilir. Bu hastalıklarda apoptozu kontrol eden genlerin ve moleküler mekanizmaların anlaşılması antikanser tedavide yeni ufukların açılmasını sağlayacaktır.

Survivin, apoptoz inhibitör protein ailesinin bir üyesi olup apoptoz ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rol oynar. Hücre siklusunu G2 / M fazında denetleyen multifonksiyonel bir proteindir. Mitokondride yerleşim gösterir ve

kaspazın gerçekleştirdiği postmitokondrial olayları durdurarak apoptozu inhibe eder.

Survivin çoğu kanserlerde eksprese edilir ve kemoterapi rezistansı, artmış tümör rekürrensi ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. Gelecekte anti-survivin tedavisi önemli bir kanser tedavi stratejisi olabilir.

Çalışmalarda, malign lezyonlarda normal meme dokusu veya benign lezyonlara göre, yüksek grade'li duktal karsinoma in situ'da (DKİ), yüksek grade'li olmayan DKİ'ya göre daha fazla survivin ekspresyonu gözlenmiş, rekürren tümörlerde survivin ekspresyonunun azalmadığı belirtilmiştir. Bu yüzden survivin, meme lezyonlarında prognostik belirleyici olarak rol oynayabilir.

Bu çalışmada intraduktal ve invaziv duktal meme karsinomlarında, tümöral dokuda ve tümör çevresi benign lezyonlarda PTEN ve survivin ekspresyonu incelenerek PTEN ve survivin ekspresyonunun karsinogenez sürecindeki yerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Ayrıca PTEN ve survivin ekspresyonunun meme duktal karsinomlarında apoptoz ve histopatolojik prognostik parametrelerle olan ilişkisi araştırılmıştır.

II-GENEL BİLGİLER

II.1. Meme Normal Gelişimi ve Yapısı

İntrauterin hayatın 5. haftasında süt çizgisi belirginleşir ve 7.- 8. haftalarda globüler yapılar oluşur. Epitelyal tomurcuklar gestasyonun 10-12. haftalarında belirginleşip 2. ve 3. trimesterde progresif olarak büyür. Doğumda dallanmış duktuslar ve birkaç lobüler ünite mevcut olup bunlar annenin hormonlarından etkilenip salgı da yapabilirler (1).

Memeler toraksın üzerinde ve sternumun iki yanında 2. ve 6. kostalar arasında yer alır. Her bir meme tabanı pektoralis major ve pektoralis minör kasları üzerine oturur. Meme bezinin önünde yüzeysel fasya, arkasında derin fasya bulunur. Meme derisinden derin fasyaya doğru uzanan ligamentlere “Cooper” ligamentleri denir. Bu ligamentler memeyi yerine tespit ederler. Kanserin gerek yayılma gerekse ilk belirtilerini ortaya koymada önem taşırlar.

Memenin kanlanması lateral torasik arter, arteria mamma interna, ve arteria interkostalislerden olmaktadır. Memenin lenfatiklerinin %75-97’si aksiler lenf düğümlerine, %3-25’i internal mammarian lenf düğümlerine, çok az bir kısmı ise kostavertebral ekleme yakın alandaki posterior interkostal lenf düğümlerine akar (1,2).

Meme dokusu, 6-10 ana duktus sisteminin dallanması ve bunların her birinin lobüllere ayrılmasından oluşan tubuloalveoler bez yapısındadır. Meme lobüller ve duktuslar olmak üzere iki kısımdan oluşur. Meme lobülü, her bir terminal duktusun küçük bir bölümü ve onun tomurcuklanması ile oluşan asinüslerden oluşur ve bu bölüm terminal duktuler lobüler unite (TDLU) adını alır. Burası patolojik lezyonların çoğunluğunun geliştiği bölgedir. Asinüsler içte, lümene bakan tarafta, süt üretimini sağlayan, tek katlı, kuboidal luminal hücrelerle döşelidir. Dışta ise miyofilament içeren kontraktıl, yassılaştırmış miyoepitelyal hücreler bulunur. Miyoepitelyal hücreler laktasyon esnasında sütün boşalmasına yardımcı olurlar. En dışta ise bazal membran bulunur (1,3). Lobüller ve duktuslar arası boşluğu bağ ve yağ dokusu doldurmaktadır. Memede süt salgılayan bölüm

lobüller, duktuslar ile memenin tam ortasında bulunan areola denilen koyu renkli bölgede meme başına açılırlar. Lobüllerin birleşmesiyle loplar (matür memede 15-25 adet) oluşur. Meme başı çevresinde areola denen sirküler pigmente alan vardır. Areola epitelinde küçük tüyler, yağ ve ter bezleri ile aksesuar meme bezleri bulunur. Ayrıca areola çevresinde çok sayıda sebase bezler (Montgomery bezleri) bulunmaktadır. Bu bezler gebelikte daha belirgin olup meme başının yağlı olmasını sağlar (1-3). Meme dokusu en fazla üst dış kadranda bulunur. Aksiller bölgeyi de kapsayan üst dış kadranda geniş ölçüde meme dokusu bulunması bu bölümde tümörlerin daha fazla oluşmasına neden olur.

Doğumdan yaşlılığa kadar olan süreçte memeler değişime uğramaktadır. Östrojen, progesteron, prolaktin hormonları memenin gelişmesinden ve fonksiyonlarından sorumludur. Pubertal dönemde, ilk menstruasyondan önce östrojen ve progesteronun etkisi ile memeler büyümeye başlar. Menstrüal siklus sırasında bu hormonların kandaki düzeyine bağlı olarak meme yapısında değişiklikler görülür. Geç postovulatuvar dönemde ve oral kontraseptif kullanan kadınlarda, progesteron düzeyindeki artışa bağlı olarak her bir lobülde asinüs sayısı artar, lenfositoz, stromada ödem ve mioepitelyal hücrelerde vakuolizasyon görülür. Meme bu dönemde maksimum boyuttadır. Menstruasyonda, östrojen ve progesteron düzeyinin düşmesiyle birlikte yoğun apoptozla hücreler kaybolur, stroma involüsyona uğrar ve meme boyutu küçülür (1,3). Otuz yaşından sonra başlayıp menapozdan sonra daha da artan meme boyutlarında küçülme, asinüslerdeki epitelyal ve mioepitelyal hücrelerde azalma, bazal membran kalınlaşması ve yağ doku oranında artış görülür. Gebelik ve laktasyon sırasında östrojen, progesteron ve prolaktinin etkisi ile memeler büyür, sekretuar ve laktasyonel değişiklikler artar, hücrelerde lipid ve sekretuar materyal birikir (1,2).

II.2.1. Meme Karsinomları

Meme kanserleri, kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup tüm kanserlerden ölüm nedenleri arasında 2. sıradadır (4). İnvaziv duktal karsinom, meme kanserlerinin en yaygın tipidir ve yaklaşık olarak %40-75'ini oluşturur (4).

II.2.2. İnsidans ve Epidemiyoloji

Çocukluk dönemi hariç, herhangi bir yaş grubunda görülse de, bazı familial olgular dışında 25 yaşın altında nadiren ortaya çıkar. İnsidans yaşla birlikte artış gösterir ve dördüncü on yılda 231’de 1 iken yedinci on yılda 29’da 1’e ulaşır (2). Sekiz kadından birinde hayatının bir döneminde meme kanseri gelişmektedir. Tüm dünyada her 2 dakikada yeni bir meme kanseri teşhis edilmekte ve her 13 dakikada bir kadın meme kanserinden ölmektedir (5). Erken evrede tespit edilen meme kanserlerinde prognoz çok iyidir (4).

İnsidans ve epidemiyolojik çalışmalara ilişkin gözlemler meme kanserinin oluşumundan sorumlu bir çok risk faktörünün tanımlanmasına yol açmıştır. Risk faktörlerini aşağıda başlıklar halinde sıralayabiliriz.

II.2.2.1. Genetik Yatkınlık

Meme kanserli hastaların ortalama %20’sinde genetik yatkınlık mevcuttur. Birden çok sayıda meme kanserine yakalanan bireyleri içeren aileler, meme kanserine erken yaşta yakalanan hastalar, bilateral meme kanserine sahip kişiler, over ve meme kanseri birlikteliği gösteren hastalar, meme, over, endometrium ve kolon kanserlerinin ya da değişik sarkomların görüldüğü aileler genetik geçiş olasılığını yansıtan klinik özelliklerdir. Meme kanserine yatkınlığı arttıran altı gen ve gen bölgesi tanımlanmıştır (2).

BRCA1: 17q12-q21’de lokalizedir. Tümör supresör bir gendir (3). Allellerinden biri gen dizisi mutasyonu ile kaybolur. Kalan allelin sonraki kaybı somatik meme dokusunda ortaya çıkar. Yetmiş yaş civarı BRCA1’e bağlı meme kanser gelişim riski %85’tir. Aynı yaş grubunda over kanser gelişim riski %63’tür. BRCA1 ile ilgili meme kanserleri daha genç yaş grubunda görülmektedir. Bu tümörler yüksek proliferasyon oranlarına sahiptir ve yüksek derecelidir (2).

BRCA2: 13q12-q13’de lokalizedir (3). Herediter kanserlerin %35-40’ından sorumludur. Yetmiş yaş civarında meme kanseri gelişme riski %60-70, 80 yaş civarında ise %83-97’dir (2). Erkeklerde görülen mesane, prostat, pankreas kanserlerinin gelişiminde de rol oynadığı saptanmıştır (2,3).

Li-Fraumeni Sendromu: Li-Fraumeni Sendromlu ailelerin yarısında p53 gen mutasyonu bulunmaktadır (2). Multipl kanserlerin erken yaşta ortaya çıkmasıyla karakterlidir (meme kanseri, beyin tümörleri, sarkomlar, surrenal korteks tümörü ve lösemiler).

Cowden Hastalığı: Üç germ yaprağından gelişen multipl hamartomlarla karakterize otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur. İntestinal hamartamatöz polip, fasial trikilemmomlar, akral keratoz ve oral papillom görülür. Memede de fibrokistik değişiklikler ve meme kanseri ile karakterizedir. Bu hastalarda 50 yaş civarında meme kanseri insidansı %30-50'dir (2).

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

Ataksi Telenjektazi: 11q23.1'de lokalizedir. Otozomal resesif bir multisistem bozukluğudur. İlerleyici nörolojik bozukluklar ve özellikle malign lenfoproliferatif hastalıklar ve meme kanser riskinde artmaya yol açan immünolojik problemlerle birliktelik gösterir (2).

II.2.2.2. Yaş

Meme kanseri 25 yaşın altında nadirdir. Bu yaştan sonra menapoza kadar devamlı artar ve daha sonraki dönemde bunu yavaş bir yükselme izler. Ortalama tanı yaşı 64'dür (2,3).

II.2.2.3. Proliferatif Meme Hastalığı

Proliferatif meme hastalığı artan risk ile birlikte. Özellikle atipik hiperplazi önemli bir risk faktörüdür. Meme kanseri olmayan kadınlarda riski 5 kat artırır, ailesel öykü varlığında risk 11 kat artma gösterir (2).

II.2.2.4. Karşı Meme ya da Endometrium Karsinomu

Karşı meme ya da endometrium karsinomunun varlığı meme kanseri riskini artırır (3).

II.2.2.5. Radyasyona Maruz Kalma

Radyasyon DNA hasarına yol açarak karsinogenezin erken evrelerinde etkili olur. Radyasyona maruz kalma sonucu ortaya çıkan meme kanserlerinde 10-15 yıl gibi uzun bir latent süre vardır. Yaşın genç olması ve daha yüksek radyasyon meme kanseri riskini arttırır (2,3).

II.2.2.6. Coğrafyanın Etkileri

Meme kanserinin görülme oranı ülkeler arasında önemli farklar gösterir. ABD ve Avrupa ülkelerinde meme kanseri görülme insidansı diğer ülkelere kıyasla 4-7 kat daha fazladır. Burada spesifik faktörler saptanamamıştır ancak bazı özellikler etkili olabilir (3).

Obesite : Anovulatuvar sikluslu ve siklusun geç döneminde düşük progesteron seviyelerine sahip 40 yaş altı şişman genç kadınlarda düşük bir risk vardır. Postmenapozal şişman kadınlarda ise risk artmıştır ve bundan yağ depolarındaki östrojen sentezi sorumlu tutulmaktadır (3).

Diyet : Özellikle yağlı dietin meme kanseri riskini arttırdığı ileri sürülmektedir ama geniş çalışmalarda aralarında kuvvetli bir ilişki gösterilememiştir. Bazı çalışmalarda fazla β -karoten alımının da riski azalttığı gösterilmiştir (3).

Ekzojen östrojen : Postmenapozal hormon replasman tedavisinin ya da oral kontraseptiflerin meme kanseri gelişiminde risk faktörü olarak rol oynadığı tartışmalıdır. Eğer herhangi bir risk mevcutsa bu minimal düzeydedir ve östrojene maruz kalma süresi ile ilgilidir (2).

Doğurganlık döneminin uzunluğu : Erken menarş ve geç menapozla (55 yaştan sonra) risk artar (2).

Doğum : Meme kanseri nullipar kadınlarda multiparlara oranla daha sık görülür (2).

İlk çocuğun geç doğması : İlk doğum yaşı 30'un üzerinde olan kadınlarda risk artar (2).

Emzirme : Kadınlarda uzun süreli emzirme, meme kanseri riskini önemli ölçüde azaltır (2).

II.2.3.Lokalizasyon

Meme kanserleri en sık meme epitelindeki epitelyal hücrelerin terminal duktuler lobüler ünitesinden (TDLU) kaynaklanır. Sol memede sağa göre biraz daha sık görülür (yaklaşık olarak 1,07 / 1). Tümörlerin %40-50'si üst dış kadranda yerleşir (4,6). Sonra azalan sıklıkla santral, alt dış kadran, üst iç kadran ve alt iç kadranda görülür (3,6).

II.2.4. Klinik

Meme kanserli hastalar genellikle semptomatiktir ama mammografi ve diğer görüntüleme yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla asemptomatik vakaların sayısı artmaktadır (4). Mammografik tarama ile karsinomlar sıklıkla palpabl olmadan önce saptanmaktadırlar. Ayrıca pek çok kadında duktal karsinoma in situ, invaziv kanser gelişiminden önce yakalanmaktadır (3).

Meme kanserlerinde spesifik belirti ve semptomlar görülmez ama çeşitli benign meme hastalıklarından ayırmda değerli noktalar vardır. Benign meme hastalıkları daha çok genç hastalarda görülürken meme kanserleri daha çok yaşlı kadınlarda gözlenir. Semptomatik hastalarda en yaygın bulgu memede kitledir, ağrı bulunabilir veya bulunmayabilir. Meme başı anomalileri (akıntı, çekilme, düzensizlik) daha az yaygındır (4).

II.2.5. Histolojik Sınıflama

Meme kanserlerinin Dünya Sağlık Örgütü Histolojik Klasifikasyonu tablo-I'de verilmiştir (4).

Tablo-I: Meme Tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü Histolojik Klasifikasyonu (4)

I- EPİTELİYAL TÜMÖRLER a- İnvaziv duktal karsinom (İDK) Mikst tip karsinom Pleomorfik karsinom Osteoklastik dev hücreler ile beraber İDK İDK ile beraber koryokarsinomatöz özellikler İDK ile beraber melanotik özellikler b- İnvaziv Lobüler Karsinom c- Tubuler Karsinom d- İnvaziv Kribriform Karsinom e- Medüller Karsinom f- Musinöz Karsinom ve Bol Musin İçeren Diğer Tümörler Musinöz karsinom Kistadenokarsinom ve kolumnar hücreli musinöz karsinom Taşlı yüzük hücreli musinöz karsinom g- Nöroendokrin Tümörler Solid nöroendokrin karsinom Atipik karsinoid tümör Küçük hücreli karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom h- İnvaziv Papiller karsinom i- İnvaziv Mikropapiller Ca j- Apokrin karsinom k- Metaplastik karsinom Pür epitelyal metaplastik karsinom Skumöz hücreli karsinom Adenokarsinom ile beraber iğsi hücreli metaplazi Adenoskuamöz karsinom Mukoepidermoid karsinom Mikst epitelyal / mezenşimal metaplastik karsinom l- Lipidden zengin karsinom m- Sekretuar karsinom n- Onkositik karsinom o- Adenoid kistik karsinom p- Asinik hücreli karsinom q- Glikojenden zengin şeffaf hücreli karsinom r- Sebasöz karsinom s- İnflamatuar karsinom t- Lobüler neoplazi Lobüler karsinoma in situ u- Duktal karsinoma in situ v- Mikroinvaziv karsinom w- İntraduktal papiller karsinom Santral papillom Periferik papillom Atipik papillom İntraduktal papiller karsinom İntrakistik papiller karsinom x- Adenomlar Tubuler adenom Laktating adenom Apokrin adenom Pleomorfik adenom Duktal adenom	II - MEZENŞİMAL TÜMÖRLER a- Hemanjiyom b- Anjiyomatozis c- Hemanjiyoperisitom d- Psödoanjiyomatöz stromal hiperplazi e- Myofibroblastom f- Fibromatozis (agresif) g- İnflamatuar myofibroblastik tümör h- Lipom Anjiyolipom i- Granüler hücreli tümör j- Nörofibrom k- Schwannom l- Anjiyosarkom m- Liposarkom n- Rabdomyosarkom o- Osteosarkom p- Leiomyom q- Leiomyosarkom III - FİBROEPİTELİYAL TÜMÖRLER a- Fibroadenom b - Filloides tümör Benign Borderline Malign c - Periduktal stromal sarkom, low grade IV - MYOEPİTELİYAL LEZYONLAR a - Adenomyoepitelyoma b - Malign myoepitelyoma V - MEME BAŞI TÜMÖRLERİ a - Meme başı adenomu b - Syringomatöz adenom c - Meme başı Paget hastalığı VI - MALIGN LENFOMA a - Diffüz büyük B hücreli lenfoma b - Burkitt lenfoma c- Ekstranodal marjinal zon B hücreli lenfoma, MALT tip d - Folliküler lenfoma VII - METASTATİK TÜMÖRLER VIII - ERKEK MEMESİ TÜMÖRLERİ Karsinom İnvaziv İn situ
---	--

II.2. 6. Histolojik Grade

İnvaziv duktal karsinomlarda ve diğer invaziv tümörlerde grade'leme temelinde tubül / gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz değerlendirilir (4).

Yapılan çok sayıda çalışmalarda histolojik grade ile invaziv meme karsinomları arasında belirgin bir ilişki saptanmıştır (4). İlk olarak Bloom ve Richardson tarafından gradeleme sistemi önerilmiştir (4,6,7). En son Elston ve Ellis tarafından "Bloom Richardson Sisteminin Nottingham Modifikasyonu" şeklinde düzenlenmiştir (4,6,7). Meme kanserleri histolojik gradeleme sistemi tablo II'de verilmiştir (4).

Tablo II' de verilen 3 ayrı değer toplanıp 3-9 arasında skorlanır.

Grade 1 – İyi derecede diferansiye (3-5 puan)

Grade 2 – Orta derecede diferansiye (6-7 puan)

Grade 3 – Kötü derecede diferansiye (8-9 puan) olarak gruplanır.

Tablo- II: Meme Kanseri "Elston Histolojik Grade"leme Sistemi" (4)

Özellik	Skor
1- Tubul ve Gland Formasyonu Tümörün büyük kısmında (>%75) Orta dereceli (%10-75) Az veya yok (<%10)	 1 2 3
2- Nükleer Pleomorfizm Küçük, düzgün, uniform hücreler Orta dereceli boyut ve pleomorfizm Belirgin pleomorfizm	 1 2 3
3- Mitoz (mikroskop alanına göre)	1-3
3 farklı mikroskopik alanda mitoz sayısının değerlendirilmesi	
Alan çapı (mm)	0,44 0,59 0,63
	(Nikon Labophot) (Leitz Ortholux) (Leitz Diaplan)
Alan büyüklüğü (mm²)	0,152 0,274 0,312
Mitoz sayısı (10 HPF*)	
1 puan	0-5 0-9 0-11
2 puan	6-10 10-19 12-22
3 puan	>11 >20 >23

*HPF: High power field (Büyük büyütme alanı)

II.2.7. Duktal Karsinoma İn situ

DKİ, bazal membranı geçmeksizin duktus sistemi içinde sınırlı kalmış, invazyon göstermeyen malign epitelyal hücre proliferasyonunu ifade eder (3,8). Daha önceleri tüm meme kanserlerinin %5'inden azını oluşturduğu bilinirken, son yıllarda mammografik tetkiklerin gelişmesi ve mammografinin bir tarama yöntemi olarak kullanılmasına bağlı olarak tüm meme kanserlerinin %15-30'unu oluşturduğu saptanmıştır (3).

DKİ, gerek biyolojik davranışları, gerekse morfolojik görünümleri açısından heterojen bir hastalık grubudur (8,9). İnvaziv kansere ilerleme riski ve prognoz açısından da değişik özelliklere sahip olduklarından DKİ'yi bu özellikleri öngörecekle şekilde sınıflama ihtiyacı vardır. İdeal bir DKİ sınıflaması 2 önemli kriter taşımalıdır; 1- Lokal nüks ve invaziv kanser gelişim riskini belirleyebilmeli, 2- Farklı patoloğlar tarafından yapılan değerdendirmede benzer sonuçlara varılabilmelidir (10).

Yapısal paterne göre DKİ, komedokarsinom, solid, kribriform, papiller ve mikropapiller olarak başlıca 5 gruba ayrılmıştır (3). Bu sayılan tipler dışında, nadir olarak nöroendokrin, apokrin, berrak hücreli, sekretuar, taşlı yüzük hücreli, musinöz tip DKİ görülebilir (8,10). DKİ, uzun yıllar boyunca bu yapısal paternlere göre isimlendirilmiştir. Ancak DKİ, her zaman tek bir yapısal patern sergilememekte, genelde bir ya da birkaç patern aynı lezyon içinde görülebilmektedir. Bu da yapısal paterne göre sınıflamayı güçleştirmektedir. Bugün üzerinde herkesin anlaştığı bir dereceleme şeması mevcut değildir. Ancak patoloğların yapısal özellikler yerine sitonükleer özellikleri dikkate alan sınıflama sistemlerini kullanmaları önerilmektedir (8).

Bu sınıflama sistemlerinden nükleer grade ve nekroz temel alınarak yapılan Van Nuys, uygulanması kolay ve prognostik korelasyonu iyi olduğundan geniş kullanım alanı bulmuştur. Van Nuys DKİ sınıflama sistemi histolojik özellikleri tablo 3'de gösterilmiştir (8,10).

Tablo-III: Van Nuys DKİ sınıflama sistemi

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

II.2.8. Prognostik ve Prediktif Faktörler

Meme kanserlerinde prognozu çeşitli klinik ve patolojik faktörler etkiler (6,11). Bunlar:

II.2.8.1. Klinik Faktörler

Hasta Yaşı : Tanı anında hasta yaşı 50'den gençse prognoz iyidir. Otuzbeş yaşından genç hastalarda prognoz yaşlı hastalara benzer ve uzak metastaz ile rekürrens daha sık olmaktadır (6,12).

Hamilelik : Genel olarak gebelik ve laktasyonun meme kanserinde kötü prognoza yol açtığına inanılmaktadır (4,6). Bağımsız faktör olarak kullanılması tartışmalıdır.

II.2.8.2. Morfolojik Faktörler

Lenf nodu durumu, tümör büyüklüğü, histolojik tip ve histolojik grade yaygın kullanılan klasik prognostik faktörlerdendir.

Lenf Nodu Durumu : Aksiller lenf nodu (ALN) metastazı, uzak metastaz görülmeyen meme kanserli hastalarda en önemli prognostik faktördür (3,4). Metastatik lenf nodlarının sayısı önemlidir. Dört ve dördün üzeri lenf nodu tutulumunda prognoz kötüdür (13). On yıllık hastalıksız yaşam lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda %70-80, 1-3 lenf nodu tutulumunda %35-40, 10'dan fazla lenf nodu tutulumunda %10-15' tir (3). Metastatik lezyonun çapı ve lenf nodu çevresi yumuşak dokuya yayılım da prognozu olumsuz yönde etkileyen faktörlerdendir (2,13). Küçük mikrometastazların (2 mm'den küçük metastazlar) prognostik önemi tam net değildir (3). Bazı yayınlarda prognozu olumsuz yönde etkilemediği belirtilmiştir (2). ALN metastazı olan hastalarda, sağkalım direk olarak tümörün boyutu ile ilgiliyken, ALN metastazı olmayanlarda bu ilişki yoktur. Yapılan bir çalışmada 24.740 hastada sağkalım oranı, 5 cm üzeri tümöre sahip ve ALN metastazı olan hastalarda %45.5 iken, 2 cm'den küçük tümörü ve ALN metastazı olmayan hastalarda %96.3'tür. Tümörün büyüklüğü ile lenf nodu tutulumu arasında lineer bir ilişki olduğu belirtilmiştir (14).

Tümör Büyüklüğü : Tümör büyüklüğü 2. önemli bağımsız prognostik faktördür. Artan tümör boyutu ile birlikte aksiller lenf nodu metastazı olasılığı artmakta ve 5 yıllık sağkalım oranı da düşmektedir (2,3,14). Tümör boyutu 1cm altında ve lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda tedavisiz 10 yıllık sağkalım yaklaşık %90'dır (3). Bununla birlikte bazı küçük tümörler, nadiren de olsa uzak metastaz gösterme özelliğine sahiptir (2).

Histolojik Tip : Meme kanserlerinde bazı histolojik tipler daha iyi prognoza sahiptir. Bunlar tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, musinöz karsinom, medüller karsinom, papiller karsinom ve adenoid kistik karsinomdur (2,3,4,6,11). Otuz yıllık sağkalım oranı bu tümörlerde %60'ın üzerinde iken, invaziv duktal (NOS) karsinomlarda %20'nin altındadır (3). 1.1-3 cm boyutlarında iyi prognoza sahip meme tümörleri ile 1cm ve altındaki invaziv duktal karsinomların 20 yıllık sağkalım oranları birbirine benzerdir (4). İnvaziv lobüler karsinom ile invaziv duktal karsinom arasında prognostik farklılık yoktur. Taşlı yüzük hücreli karsinom ve inflamatuvar karsinomlar genellikle kötü prognozludur. Memenin skuamöz hücreli karsinomu, metaplastik karsinom ve nöroendokrin karsinomu da kötü

prognozlu olabilmektedir (6).

Histolojik Grade : Günümüzde en yaygın kullanılan, Elston tarafından modifiye edilen “Bloom Richardson Sisteminin Nottingham Modifikasyonu” belirgin bir şekilde prognozla koreledir. Nükleer grade, tübül formasyonu ve mitoz oranı değerlendirilip tümörün histolojik diferansiasyonu verilir (3,6,7,11). Grade 3 (kötü diferansiye) tümörlerde lenf nodu durumu ve tümör boyutundan bağımsız olarak, yüksek oranda uzak metastaz ve kısa sağkalım görülür (4). On yıllık sağkalım, grade 1 (iyi diferansiye) tümörlerde % 85, grade 2 (orta diferansiye) tümörlerde %60, grade 3 (kötü diferansiye) tümörlerde %15’tir (3). Medüller karsinomlar hariç diğer invaziv meme karsinomlarında derecelendirme yapılabilir (4). Histolojik grade, kemoterapiye yanıtın değerlendirilmesinde de kullanılır, bu yüzden prognostik belirleyiciliği yanında prediktif özelliği de vardır (4).

Tümör Hücre Proliferasyonu : Proliferasyon belirleyicileri, prognoz değerlendirilmesinde geniş yer tutar (4). Proliferasyon, flow sitometri, timidin bağlama indeksi, mitoz oranı ya da hücre siklusu sırasında açığa çıkan sellüler proteinlerin (örneğin siklinler, Ki-67 gibi) immunohistokimyasal saptanması ile ölçülebilir. Yüksek proliferasyon oranlı tümörler kötü prognoza sahiptir. Proliferasyonu belirlemede en güvenilir yöntemin hangisi olduğu konusunda bir görüş birliğine varılamamıştır (3).

Lenfatik ve Kan Damarları İnvazyonu : Lenfatik damar invazyonu özellikle lenf nodu tutulumu olmayan meme kanserli hastalarda önemli ve bağımsız prognostik faktördür (4). Tümör rekürrensinde artma ile beraberdir. Kan damarları invazyonu kötü prognozla ilişkilidir. Diğer prognostik faktörlerden tumor boyutu, grade, tip, ALN durumu, uzak metastaz ile kan damarları invazyonu arasında belirgin korelasyon vardır (6,15).

Perinöral İnvazyon : Bazı çalışmalarda invaziv meme kanserlerinde prognostik faktör olabileceği öne sürülmektedir. Ancak bağımsız prognostik faktör özelliği gösterilememiştir (4).

Tümör Nekrozu : Özellikle geniş tümör nekrozu, artmış lenf nodu metastaz

varlığı ve kısa sağkalım ile ilişkilidir. Genellikle yüksek histolojik dereceli tümörlerde görülür (6,13).

İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu : Bazı çalışmalarda, yüksek histolojik derece ile belirgin mononükleer hücre infiltrasyonu ilişkili bulunmuştur. Prognostik önemi tartışmalıdır (4).

İnvazyonun Varlığı veya Yokluğu : Temel prognostik faktördür. İn situ karsinomların cerrahi tedavisiyle kürabilenin %100 olduğu bildirilmekle beraber duktal-komodo karsinomlarda metastaz izlenebildiği de unutulmamalıdır (6).

Tümör Stroması : Periferinde inflamatuvar cevap olmayan tümörlerin ilginç olarak daha az lenf nodu metastazı yaptığı izlenmiştir. Bu durum medüller karsinom için geçerli değildir (6). İnvaziv kanserlerde fibrotik odak varlığının kötü prognostik faktör olabileceği belirtilmekle birlikte kesin değildir (4).

Steroid Hormon Reseptörleri (Östrojen ve Progesteron reseptörü) : Günümüzde invaziv meme karsinomuna ait biyopsi örneklerinde östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron reseptörlerinin (PR) varlığının araştırılması, meme kanserli hastaların tedavilerinin yönlendirilmesinde standart bir uygulama haline gelmiştir (2). Primer meme kanserlerinin ortalama %55-65'i, metastazların ise %45-55'i ER pozitifdir. ER pozitif olan hastaların hastalıksız sağkalım süresi daha uzun olup östrojen reseptörü pozitif olan tümörler endokrin tedaviye daha iyi cevap vermektedir (6). Primer ve metastatik meme kanserlerinin %45-60'ı PR içerir. PR'de tıpkı ER'de olduğu gibi meme kanserlerinin davranışını belirlemede değerlidir ve PR negatif tümörlerin kötü prognozu belirlediği kabul edilir (2,3).

c-erbB2 Onkogeni : Bu gen 17. kromozomda lokalizedir. c-erbB2 pozitifliği yüksek histolojik dereceli, ER ve PR negatif, lenf nodu pozitif olan, anöploid ya da yüksek proliferasyon gösteren meme kanserlerinde ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda c-erbB2 pozitifliğinin hormonal tedavi, adjuvan radyoterapi ile siklofosamid, methotraxate ve fluorourasilli adjuvan kemoterapiye yanıtta negatif bir prediktör olduğu bildirilmiştir (2). c-erbB2'ye karşı geliştirilen bir monoklonal antikör olan trastuzumab (Herceptin), c-erbB2'nin overekspresyonunu

hedefleyen yeni bir anti-kanser ilaç olarak sunulmuş ancak Herceptin'in, c-erbB2'nin pozitif olduğu hastaların ancak %20'sinde etkili olduğu görülmüştür (4,16,17).

p53 Mutasyonu : Yaklaşık %25 meme kanserinde p53 mutasyonu görülür (4). Tümör hücrelerinde p53 proteinin fazla birikimi özellikle kısa sağkalım ile birliktelik göstermektedir (4,6). Bunun dışında p53, özellikle lenf nodu negatif meme kanserli hastalarda yararlı bir prognostik belirleyici olarak görülmektedir (2).

Heterozigozite Kaybı : Heterozigozite kaybı kısa sağkalım süresi ile birliktelik gösterir (4).

II.2.9. Moleküler Biyoloji ve Genetik

Meme kanserinin gelişimi, aktifleşen veya inaktifleşen bir dizi geni ilgilendiren değişiklikleri içerir. Meme kanserinde saptanan genetik anormallikler tümör supressör genlerde gelişen heterozigozite kaybı (LOH) ve onkogen amplifikasyonlarıdır (tablo IV) (18).

Meme kanserindeki kromozom anormalliklerinin tayini; akım sitometri, sitogenetik çalışmalar, floresan in situ hibridizasyon (FISH), karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (CGH) gibi yöntemlerle yapılmaktadır (2,3,19).

Gen amplifikasyonları genomik instabilite kazanmış tümör hücrelerinde bulunduğundan, tümör gelişiminin geç evrelerinde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Benign meme hastalıklarında amplifiye olmuş kromozom bölgesinde yer alan hiçbir onkogen tanımlanmamıştır. Onkogen amplifikasyonu çok basamaklı meme karsinogenezinde erken bir basamak değildir ve DKİ evresinde ortaya çıkar. Onkogen amplifikasyon derecesi de histolojik subtipi göre değişir; örneğin HER2 / neu amplifikasyonu kribriform tipte komedo tipe göre daha düşüktür. HER2 / neu amplifikasyonunun derecesi DKİ'dan invaziv duktal karsinomaya geçişte azalır, lobüler karsinoma in situ'da yoktur, invaziv lobüler karsinomda ise çok nadirdir. Sonuçta, onkogen amplifikasyonu bazı histolojik subtipler için spesifiktir ve onkogenle yönlendirilen çoğalma meme kanseri gelişiminde ara bir basamak olup

metastatik hastalığa ilerlemede belirgin bir öneme sahip değildir.

Benign meme hastalıklarında 1p, 3p, 7q,11p, 17p, 17q, 18q kromozom lokuslarında LOH saptanmaz. Duktal hiperplazilerde herhangi bir lokus için LOH nadirken, tipik duktal hiperplazide %37, atipik duktal hiperplazide %42 oranında kayıplara rastlanması hiperplazilerde değişik birçok tümör supressör genlerin rol aldığını düşündürmektedir. Tipik hiperplazilerde 16q, 7q, 17p kromozom bölgelerinde, atipik hiperplazilerde 16q ve 17p bölgelerinde LOH saptanır. DKİ'da 16q, 17p ve 17q yanısıra 2p ve 11p gibi kromozomlarda da LOH saptanması, bu bölgedeki tümör supressör genlerin invaziv hastalığa ilerlemede rolü olabileceğini göstermektedir. Tümör gelişiminde 3p kromozom kaybı erken dönemde gelişirken, 11p ve 15. kromozom kaybı gibi değişiklikler geç dönemde gelişir. 11p kaybı sadece invaziv tümörlerde saptanırken, in situ tümörde saptanmaz (19).

Tablo IV. Meme kanserinde rol alan tümör baskılayıcı genler ve onkogenler

Ailesel Meme Kanseri Başlangıcı
Baskılayıcı Genler
P53 (Li-Fraumeni sendromu)
Baskılayıcı Gen gibi davrananlar
BRCA 1 (meme ve over kanser aileleri)
BRCA 2 (meme kanser aileleri)
Meme Kanseri Progresyonu
Onkogenler (amplifiye olmuş)
Siklin D1, Her-2 / neu, myc
Baskılayıcı Genler
P53, PTEN, Rb-1, siklin E
Onkogen Adayları
ER, PR, EGFR, ras
Baskılayıcı Gen Adayları
MSH-2 / MLH-1, STK11 / LKB-1, E-cadherin, FHIT geni, p27 / kip, nm23

II.2.10. Tedavi

Meme kanserlerinin yaygınlığına ve tipine bağlı olarak cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi ve kemoterapiyi içerir (6). Lokal ve bölgesel kontrolü sağlama, cerrahi ve postoperatif radyasyon kombinasyonu ile yapılmakta bunun yanı sıra sistemik kontrollerde hormonal tedavi ya da kemoterapi veya her ikisine birlikte yer verilmektedir. Aksiler lenf nodu diseksiyonu pognostik amaçlı yapılmaktadır (5,6). Son yıllarda büyüme faktör reseptörleri, stromal proteazlar ve anjiogenez inhibisyonunu içine alan tedavi stratejilerine de yer verilmektedir (6).

II.3. Apoptoz

Apoptoz; koordine, internal kontrollü genlerin düzenlediği seri olayların aktivasyonu ile, istenmeyen hücrelerin eliminasyonudur (20,21). Yunanca “Dökülen Yaprak” anlamına gelen apoptoz patolojide “Programlı Hücre Ölümü”nü ifade etmektedir. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı

patologlar tarafından apoptoz terimi kullanılmıştır (22,23).

Birçok özellikleri, nekrotik hücre ölümünün diğer tipleri ile çıkarır. Bazı hücreler uyarının şiddeti ve süresine, ölüm olayının hızına, etkilenen hücrenin ATP tüketim hızına bağlı olarak apoptoz veya nekroz gösterir. Gelişim sırasında, dokulardaki normal hücre popülasyonunun devamında denge sağlayıcı mekanizma olarak, immün sistem reaksiyonlarında korunma mekanizması olarak, hücreler kalıcı olarak zedelendiğinde ve yaşlılıkta apoptoz görülür (20,24).

Embriyogenez sırasında hücrelerin programlı yıkımı, hormon-bağımlı involüsyon, tümörler, akut inflamatuvar yanıtta polimorf nüveli lökositlerin ölümü gibi çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olay apoptozu tetikler. Ayrıca çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olay apoptozdan sorumludur. Bunlar sitotoksik T lenfositlerin oluşturduğu hücre ölümü (hücrel immünite reaksiyonları ve Graft Versus Host reaksiyonu), kanal obstrüksiyonu sonrasında parankimal organlarda olan atrofide (pankreas, paratiroid ve böbrekte olduğu gibi) belli viral hastalıklarda hücre zedelenmesi (viral hepatitte ölü karaciğer hücreleri), değişik zedeleyici uyarıların oluşturduğu hücre ölümü gibi durumlardır (20,24).

Morfolojik özellikler:

Hücre büzülmesi: Hücre daha küçük boyuttadır, sitoplazma yoğundur, organeller göreceli olarak normal olmalarına rağmen daha sıkı paketlenmiştir.

Kromatin kondansasyonu: Bu, apoptozun en karakteristik özelliğidir. Kromatin periferde nükleer membranın altında çeşitli şekil ve büyüklüklerde, iyi sınırlı, yoğun kitleler olarak kümelenir. Nükleus ise iki veya daha fazla parçaya ayrılabilir.

Sitoplazmik baloncuklar veya apoptotik cisimlerin oluşumu: Apoptotik hücre ilk önce sitoplazmik baloncuklar gösterir. Daha sonra ise çok sayıda nükleer parça içerebilen membranla çevrili sitoplazma ve organel parçacıklarına dönüşür.

Apoptotik cisimler ve hücrelerin fagositozu: Yakındaki komşu hücreler, parankimal hücreler ve makrofajlar, apoptotik cisimleri fagosite eder. Apoptotik

cisimler hızla lizozomlar içinde parçalanır, komşu hücreler migrasyonla veya proliferasyon olarak apoptotik hücrenin boşluğunu doldurur (20).

Hematoksilen-eozin ile boyanmış dokularda, apoptoz tek hücreyi veya hücre kümelerini tutar. Apoptotik hücreler oval veya yuvarlak, yoğun eozinofilik sitoplazmalı, dens nükleer kromatin parçaları ile birlikte görülür. Hücre küçülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşması hızlıdır ve parçalar hızla fagosite edilir, parçalanır veya lümene dökülür. Histolojik kesitlerde görünür olmadan önce dokuda anlamlı apoptoz meydana gelebilir. Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmaz ve bu da histolojik olarak saptanmasını güçleştirir (20,24).

Biyokimyasal özellikler

Apoptotik hücreler genellikle daha önce tanımlanmış patolojik değişikliklerin altında yatan farklı biyokimyasal modifikasyonlar gösterirler. Bu özelliklerin bazıları nekrotik hücrelerde de görülebilir. Apoptozun spesifik bir özelliği kaspaz adlı bir enzim grubu ile protein hidrolizidir. Transglutaminaz aktivitesi ile aşırı protein çapraz bağlanması sitoplazmik proteinleri kovalent bağlı büzülmüş tabakalara çevirir, bu tabakalar apoptotik cisimler haline parçalanabilir. Apoptotik hücreler 50-300 kilobazlık büyük parçalar halinde olmak üzere karakteristik DNA yıkımı gösterirler. Sonradan, DNA'nın Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonükleazlar ile internükleozomal parçalanması sonucunda 180-200 bazlı oligonükleozom parçalarına dönüşür. Apoptotik hücreler, plazma membranlarının dışında fosfatidil serin ve trombospondin bağları bulundurlar (20,22). Bu değişiklikler proinflamatuvar hücresel içerik salınmaksızın, ölü hücrenin, makrofajlar ve diğer komşu hücreler tarafından fagositoz için erken tanınmasına olanak verir (24).

Mekanizmalar

Apoptoz belli olaylar ile başlatılan, birbiri ile çakışan fakat ayrılabilen dört komponentten oluşan, enerji bağımlı bir süreçtir.

Sinyal yolu- Apoptotik uyaran ilk olarak bir sinyal yaratır. Transmembran sinyaller apoptozun pozitif veya negatif belirleyicileri olabilir.

Kontrol ve integrasyon fazı- İntrasellüler pozitif veya negatif düzenleyici moleküller apoptozu başlatır, uyarır ya da inhibe eder.

Bunlar spesifik proteinlerle gerçekleştirilir. Bu proteinlerin önemi, aksiyonlarının potansiyel olarak letal (hücre ölümü) sonuçlanabilmesindedir. Büyük ölçüde mitokondrial fonksiyonu düzenleyerek apoptotik süreçte yer alırlar.

Apoptoz mitokondri'yi iki yolla etkiler; 1- Mitokondrial şişme: Apoptotik sinyal mitokondrial permeabilite değişimi ile sonuçlanır. 2- Sitokrom C sitozol içine salınır ve proteolitik olayların gelişimi hazırlanır (20,22).

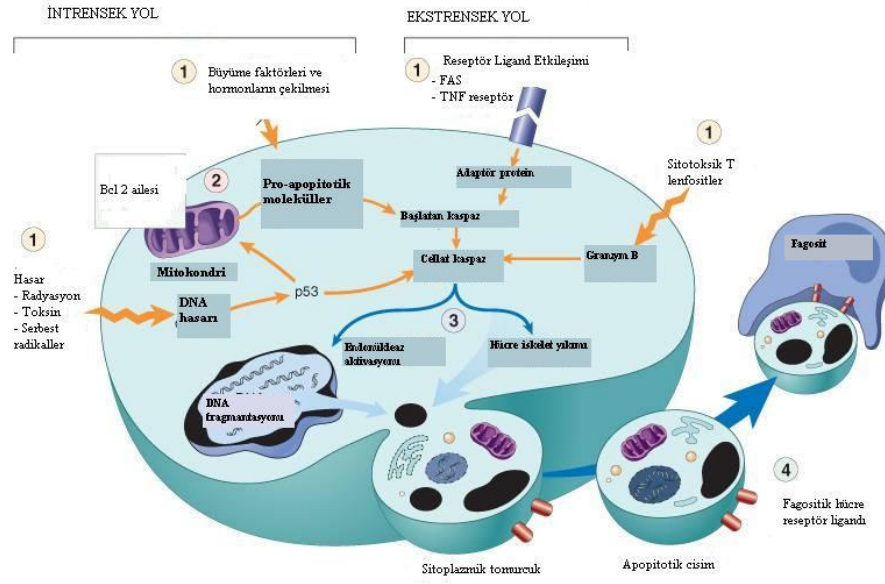
Uygulama (infaz) fazı: Proteazların kaspaz ailesi büyük ölçüde sorumludur. Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluşturur. İnaktif prekürsörler olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir. Biyolojik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

- 1- Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 14
- 2- Apoptozu başlatanlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10
- 3- Apoptozu yürütenler (efektör grup): Kaspaz 3, 6, 7

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise proteolitik etkiyle apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olur (25-27)

Apoptozun uygulama fazı son yoldur, proteolitik bir kaskattır. Kaspazlar hücre iskeleti ve nükleer matriks proteinlerini parçalayarak hücre iskeletini yıkarlar (Şekil 1).

Ölü hücrelerin fagositozla eliminasyonu; apoptotik hücre ve parçalarının yüzeylerinde bulunan işaretleyici moleküller, komşu hücreleri ve fagositleri uyarır (20,22).



Şekil 1: Apoptozun mekanizması*

* Kumar V. Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Philadelphia, 2005;7th ed:26-32.

Düzensiz apoptoz birçok hastalığın komponenti olarak görülür. Esas olarak iki grup hastalık ortaya çıkar:

1. Apoptozun inhibe olduğu (artmış hücre yaşamı nedenli) hastalıklar.

Uygunsuz olarak apoptoz hızında azalma anormal hücrelerin yaşam süresini artırır.

Bu biriken hücrelerle:

- 1) Kanser (özellikle p53 mutasyonlarında artış veya meme, over, prostat gibi hormon bağımlı tümörlerle birliktelerse),
- 2) Otoimmün hastalık meydana gelir.

2. Artmış apoptoz ve aşırı hücre ölümü ile birliktelik gösteren hastalıklar.

Bu hastalıklar belirgin olarak normal veya koruyucu hücre kaybı ile

karakterizedir.

- 1) Nörodejeneratif hastalıklar (Spinal musküler atrofi gibi spesifik nöron grubu kaybı ile birliktedirler)
- 2) İskemik hasar (myokard infarktüsü veya şok)
- 3) Virüslerin oluşturduğu lenfosit eksikliği (AIDS) (20)

II.3.1 TUNEL

TUNEL (TdT-mediated nick and labeling technique)

TUNEL, apoptotik sinyal kaskadında DNA kırıklarının saptanmasında yaygın kullanılan bir yöntemdir (28). İlk kez 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (21,28). Apoptozda sonlandırıcı proteinler aktive olduktan sonra sitoplazma ve çekirdekte hedef proteinleri yıkarlar (29). Bu proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca-Mg bağımlı endonükleaz DNA kırıkları oluşturur (30). TUNEL yöntemi bu DNA kırıklarının saptanmasını sağlar (28,29). Bu yöntemde oluşan DNA kırık uçlarının, kimyasal olarak spesifik uçlar olması prensibinden yola çıkılmaktadır. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalanmakta olduklarından kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir (30). Hücrede terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin-dUTP'yi parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder (29-31). Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları avidin eklendiğinde görünür hale gelirler (30).

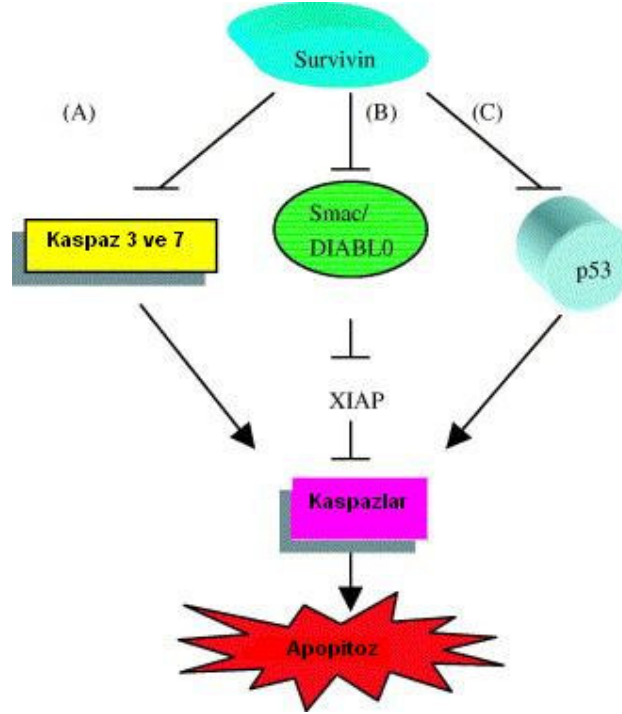
II.4. Survivin

Survivin, apoptoz inhibitör protein ailesinin bir üyesi olup apoptoz ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rol oynar (32). İlk defa 1997'de Ambrosini ve arkadaşları tarafından fetal veya embriyonik dokularda varlığı gösterilmiştir (33).

İnhibitör apopitotik proteinler (İAP) orijinal olarak baculoviruslardan identifiye edilmiştir (34,35). İnsanlarda İAP'lerin ekspresyonları çeşitli stimuluslara neden olur. Günümüzde insanda yedi tane homolog IAP klonlanmıştır. Bunlar; NAİAP, cİAP1, cİAP2, x-chromosome linked İAP (XİAP), survivin, apollon ve livin'dir (35).

Survivin, 17. kromozomda lokalize, 142 aminoasit içeren, 16.3 kilodalton (kDa) ağırlığında, hücre siklusunu G2 / M evresinde denetleyen multifonksiyonel bir proteindir (32,34,36). Apopitoz inhibisyon mekanizmaları tam olarak anlaşılmış değildir (32). Mitokondride yerleşim gösterir ve terminal efektör kaspazlar 3, 7, 9'un gerçekleştirdiği postmitokondrial olayları durdurarak apopitozu inhibe eder (32,36). Survivin, sitoplazma içine sitokrom c salınımını bloke ederek ve p53 inhibisyonu (p53 reseptör down regülasyonu) yaparak apopitoz inhibisyonunu gerçekleştirir. İnsan kanserlerindeki apopitoz inhibisyonuna ek olarak, hücrel proliferasyonun düzenlenmesi ve anjiogeneizde rolü vardır (37).

Survivin birçok tümörde (meme, akciğer, prostat, kolon..) eksprese edilir ama ileri diferansiye normal hücre / dokularda nadiren tespit edilir (36,38). Özellikle primitif hematopoetik hücreler, T lenfositler, PMNL ve vasküler endotel hücreleri olmak üzere normal adult hücrelerinde de eksprese edilir (38). Tümörlü dokuda ekspresyonu genellikle kötü prognoz ve tedaviye rezistansla ilişkilidir (32,34,36). Birçok yazar, nüks eden kolorektal kanserlerde survivin ekspresyonunu PCR yöntemi veya immunohistokimyasal olarak rapor etmiştir (39). Yine kolorektal karsinomlarda survivin ekspresyonu ile düşük apopitotik indeks korelidir ve bu vakalarda 5 yıllık sağkalımda anlamlı kısalma gözlenmiştir (39).



Şekil 2: Survivin ile apoptoz inhibisyon modeli*

* Khan Z., Khan J.G. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. Cancer Letters, 2006;244:164-171.

Survivin çeşitli apoptotik stimuluslara karşı bir aktivite oluşturur. Örneğin; IL3'ün geri çekilmesi, fas stimülasyonu, kaspaz 3, 7, 8, Bax'ın fazla salınımı ve etoposid gibi kemoterapötik ilaçların etkilerini baskılar. Potansiyel terapötik rolü, survivin transfekte hücrelerde, antikanser ilaçlarla apoptoza rezistans rapor edilmesi ile daha iyi anlaşılmıştır (40). Survivin ekspresyonu, hasta yaşı ve tümör büyüklüğünden bağımsızdır. Literatürde survivin nükleer ekspresyonunun değerli bir bağımsız prognostik faktör olduğu ileri sürülmektedir (32,36). Singh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, survivin'in benign meme dokularında malign lezyonlardan daha az hücre yüzdesinde (%45) eksprese edildiği gösterilmiş, rekürren tümörlerde nükleer survivin ekspresyonunun azalmadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak malign lezyonlarda normal meme dokusu veya benign lezyonlara göre, yüksek grade'li DKİ'da, yüksek grade'li olmayan DKİ'ya göre daha fazla

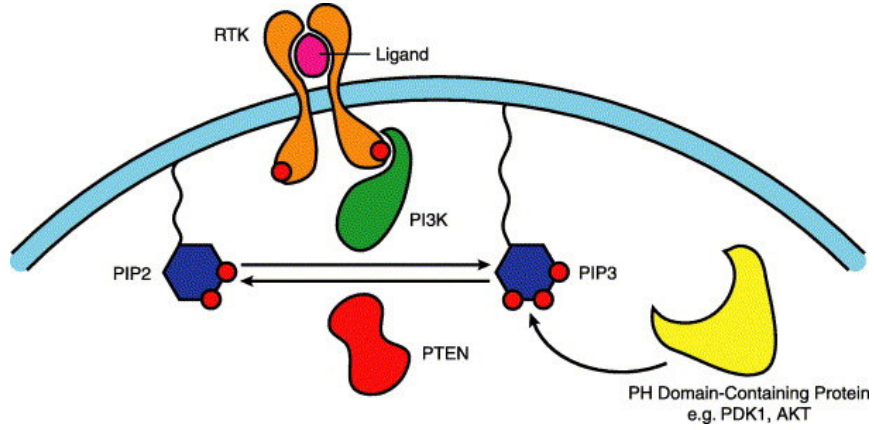
survivin ekspresyonu gözlenmiştir. Bu yüzden survivin, meme lezyonlarında prognostik belirleyici olarak rol oynayabilir (36,41).

II.5. PTEN

PTEN geni, birçok insan tümör tipinde heterozigosite kaybı sıklığı ile karakterli bir genomik bölge olan 10q23.3 kromozomal bandı üzerinde lokalize, 403 aminoasit içeren, yaklaşık 47 kDa ağırlığında, tirozin fosfataz ve tensin homoloğu tümör supressör proteindir. Tirozin fosfatazlar üzerinde araştırma yapılırken tesadüfen saptanmıştır (42-44).

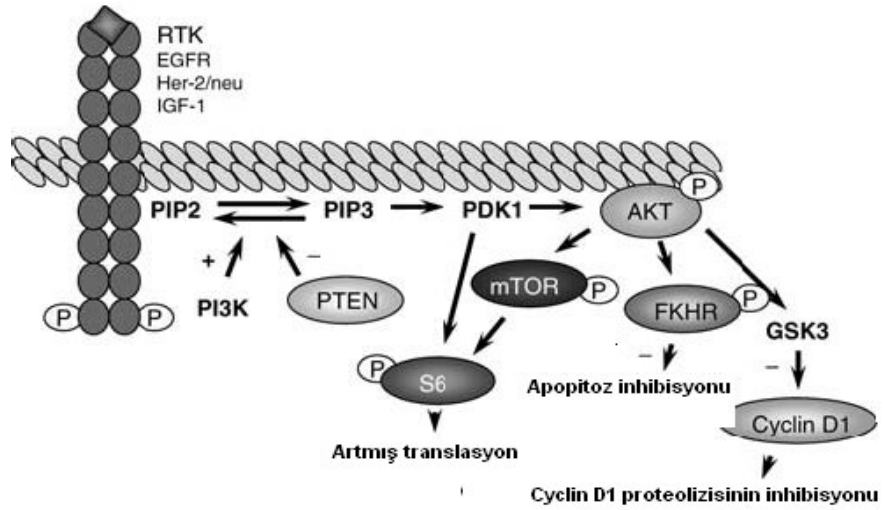
PTEN geninin somatik delesyon ve / veya mutasyonları bazı tümör tiplerinde oldukça sık olarak görülürken, bazı tümör tiplerinde ise daha az sıklıkla görülmektedir. Somatik mutasyonun sık olarak görüldüğü tümörler; endometrium kanseri (özellikle endometrioid tip), malign melanom, meme kanseri, high grade glioblastoma, metastatik prostat kanseri, tiroid ve böbrek kanserleridir (42,43,45-47).

PTEN, hücre büyümesi ve apoptoz için gerekli sinyal yollarını düzenlemede (fosfoinositid 3-kinaz-Akt sinyal yolu antagonisti) önemli rol oynar (44,48,49). Bu düzenlemeyi embriyonik gelişimde ve kanser biyolojisinde rol oynayan integrin fonksiyonlarını negatif olarak düzenleyerek yapar (46). Ayrıca PTEN sinyal transdüksiyon lipidlerinin defosforilasyonunda da anahtar rol oynar. PTEN yokluğunda lipid sinyal transdüksiyonu yoluyla tümör hücreleri apoptozdan korunabilir (46,48). PTEN, lipid fosfataz ve protein tirozin fosfataz aktiviteli önemli bir tümör supressör geni olup ekstrasellüler matriks ve hücre etkileşimlerinin negatif düzenleyicisidir (44,46). Son yapılan çalışmalarda meme kanserlerinde PTEN protein ekspresyonunda %38 azalma veya kayıp gözlenmiştir (47,48). PTEN ekspresyonunda azalma ile östrojen, progesteron ekspresyonunda azalma ve anöploid korele bulunurken, hastaların sağkalım süresi ile korelasyon gözlenmemiştir (47). İleri evre tümörler ve metastatik hastalıklarda PTEN'in biallelik kaybı söz konusudur (44,47).



Şekil 3 : PTEN proteinin fonksiyonu *

* Chow L.M., Baker S.J. PTEN function normal and neoplastic growth.
Cancer Letters 2006;241(2):184-196



Şekil 4: Akt yolunun diagramatik gösterimi**

** Bose S., Chandran S., Mirocha J.M., Bose N. The Akt pathway in human breast cancer : a tissue-array-based analysis. Modern Pathology 2006;19:238-245

Son yıllarda yapılan çalışmalarda pek çok primer ve metastatik neoplazmda PTEN geninin bulunduğu 10q23 lokusunu ilgilendiren çeşitli genetik anomali gösterilmiştir. PTEN geninin çeşitli kodonlarda bildirilmiş mutasyonlarından bazıları Tablo V'de gösterilmiştir (50). Literatürde bildirilmiş çeşitli

neoplazilerdeki PTEN mutasyonlarının derlendiği bir çalışmaya göre, genetik anomalilerin başında frameshift ve missense mutasyonlar ile homozigot gen kayıpları gelmektedir (50).

Tablo- V. PTEN geninde mutasyonu gösterilmiş bazı kodonlar (50)

Kodon No	Özellikleri	Toplam germline mutasyon (n=75)	Toplam somatik mutasyon (n=273)
129	Fosfataz core motif	6 (%8)	3 (%1)
130	Fosfataz core motif; CpG	11 (%14.7)	20 (%7.3)
157	Tersiyer yapı	4 (%5.3)	0
173	CpG	0	12(%4)
233	CpG; Tyr-P yeri	6 (%8)	8 (%2.9)
316-323	Poly (A) 6; tekrar motif;Tyr-P yeri	1 (%1.3)	24 (%9)
332-338	335 CpG; Tyr-P ve Ser-P yeri	5 (%7)	11 (%4)

Depowski ve arkadaşlarının (51) çalışmasında primer meme karsinomlu 151 hastada (ortalama yaş 62 yıl) immunohistokimyasal metodla PTEN protein ekspresyonu değerlendirilmiş ve sonuçlar klinikopatolojik parametrelerle korele edilmiştir. Ortalama takip süresi 56 ay (1-169 ay) olan tüm grupta vakaların 73'ünde (%48) PTEN protein ekspresyonunda kayıp saptanmıştır. Tek değişkenli analizlerde, hastalığa bağlı ölüm ile evre, lenf nodu metastazı, grade ve PTEN ekspresyonunda kayıp arasında korelasyon gözlenmiştir. PTEN protein ekspresyonunda kayıp ise lenf nodu tutulumu ve östrojen reseptör kaybı ile korelasyon göstermiştir.

Bose ve arkadaşlarının yürüttüğü bir başka çalışmada, immunohistokimyasal olarak PTEN genotip moleküler durumu bilinen 34 invaziv ve 18 in situ meme karsinomlu olguda PTEN protein ekspresyonuna bakılmış, invaziv meme karsinomlu hastaların %38'inde, in situ kanserli hastaların ise %11'inde PTEN protein ekspresyonunda azalma ya da kayıp saptanmıştır (52). Ekspresyondaki azalmanın evre II ve evre III tümörlerde en sık olduğu görülmüştür. Azalmış ekspresyon aynı zaman da anöploidi ile de korelasyon göstermiştir. Ayrıca DKI kısmında hem in situ hem invaziv komponent birlikte olan tümörlerde, invaziv komponenttekine benzer şekilde protein ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ileri evre meme kanserlerinde, PTEN ekspresyonunda azalma olduğu görüşü ileri sürülmüştür (52).

PTEN meme kanseri hücre dizilerinde büyümeyi P13K sinyal yolunun downregülasyonu ile suprese etmekte , öncelikle hücre siklusu progresyonunda duraklamaya, ardından hücre ölümünün indüksiyonuna yol açmaktadır. Weng ve arkadaşlarının MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinde artmış wild tip ve mutant PTEN ekspresyonunun sonuçlarını inceledikleri bir araştırmada, PTEN aşırı ekspresyonu varlığında hücre büyümesinde supresyon görülmüştür (53). Büyüme supresyonunun erken dönemlerde G1 fazında duraklamaya bağlı iken, ileri dönemlerde hem G1 fazındaki duraklamaya hem de hücre ölümüne bağlı olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda büyüme supresyonu öncesi Akt fosforilasyonunda azalma izlenmiştir. Yine MCF-7 hücrelerinin wortmannin (P13K inhibitörü) ile inkübasyonu, PTEN aşırı ekspresyonunun yol açtığı etkilere benzer şekilde hücre büyümesinde inhibisyona yol açmış ve meme kanseri hücre dizilerinde PTEN protein seviyeleri ile Akt fosforilasyonu arasında zıt yönde bir ilişki olduğu görülmüştür (53).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1.Olgu Seçimi

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2000-2006 yılları arasında invaziv duktal karsinom tanısı alan 53 adet mastektomi vakasına ait hematoksil-eozin boyalı preparatlar ve bloklar arşivden çıkarılarak yeniden gözden geçirildi. Elliüç adet mastektomiden 14 tanesi tümöral doku bloklarına ulaşılamadığı için çalışmadan çıkarıldı. Çalışmaya dahil edilen 39 vakadan 13 tanesi önceden eksizyonel biyopsi ile tümör dokusu çıkarılmış olup sonradan mastektomi uygulanan vakalardı. İnvaziv duktal karsinom tanısı almış 15 adet olgu aynı zamanda DKİ'da içermekteydi. Her bir invaziv duktal karsinom ve / veya duktal karsinoma in situ olgusundan normal meme dokusu, tümör dokusu ve varsa benign meme lezyonlarını içeren bloklar seçildi.

Retrospektif olarak hematoksil-eozin kesitlerinde invaziv duktal karsinom ve DKİ histolojik grade, yaş, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, meme başı Paget hastalığı, ER, PR, c-erbB2 ekspresyonu ile eşlik eden epitelyal hiperplazi ve fibrokistik değişiklikler tekrar değerlendirildi. İnvaziv duktal karsinom alanları modifiye Bloom-Richardson gradeleme sistemine göre, DKİ alanları da Van Nuys gradeleme sistemine göre iyi, orta ve kötü derecede diferansiye olarak derecelendirildi (4, 8,10). Tümör boyutu olarak ≤ 2 , 2.1-4.9, ≥ 5 , yaş için Türkiye'deki ortalama menapoz yaşı (44.38 ± 5.30) temel alındı (54). Lenf nodu metastazı, vasküler invazyon ve Paget hastalığı pozitif / negatif olarak değerlendirildi. ER ve PR immunohistokimyasal boyamaları için tümör dokusunda %10 ve üstü kırmızı renkte nükleer boyanma pozitif kabul edildi. C-erbB2 ekspresyonu değerlendirilirken 4 ayrı grupta skorlandı:

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

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

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

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

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

III.2. İmmunohistokimya

Primer antikor olarak PTEN ve survivin uygulandı (Tablo-VI).

- Seçilen bloklardan 2 mikronluk kesitler alındı. Kesitler deparafinize edildi.
 - Antiijen retrievel aşaması için citrat buffer pH 6 (Labvision, USA) kullanılarak mikrodalga fırında minimum güçte 20 dakika kaynatıldı. Daha sonra oda ısısında 20 dakika soğutuldu.
 - Distile su ile yıkandı.
 - Hidrojen peroksit (Labvision, USA) ile 10 dakika muamele edildi.
 - Distile su ile yıkandı.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda (Labvision, USA) 5'er dakika yıkandı.
 - Beş dakika Ultra V blok (Labvision, USA) uygulandı.
 - Primer antikor uygulandı.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - Streptavidin - biyotin peroksidaz sistemi (Anti-Polyvalent System, HRP, UltraVision , USA) 20'şer dakika uygulandı.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - 10 dakika kromojen (UltraVision AEC Substrate System, USA) ile muamele edildi.
 - Mayers Hematoksilen ile 30 saniye karşıt boyama yapıldı.
 - Ultra Mount (Labvision, USA) ile kapatıldı.
- İmmunohistokimyasal boyamalar için üretici firma tarafından belirlenen uygun pozitif kontrol kullanıldı.

Tablo-VI: Primer antikorların klonları, inkübasyon süreleri ve dilüsyon oranları

Primer antikor	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon süresi
PTEN(Labvision, USA)	MS-1601-R7	Hazır	+4°C'de 1 gece
Survivin(Labvision, USA)	RB-9245-R7	Hazır	+4°C'de 1 gece

III.3. TUNEL Yöntemi

TUNEL yöntemi (DNA Fragmentation Detection Kit, Cat. No QIA33, FragEL)

- Seçilen bloklardan 2 mikronluk kesitler alındı. Kesitler deparafinize edildi.
 - Kesitler suya indirgendi.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda (Labvision, USA) 5'er dakika yıkandı.
 - Proteinaz K ile oda ısısında 20 dakika muamele edildi.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - Hydrojen peroksit (Labvision, USA) ile 5 dakika muamele edildi.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - 5 x TdT dengeleme tamponunda oda ısısında 30 dakika bekletildi.
 - TdT enzim reaksiyon karışımında 37°C'de 2 saat kesitler parafilmle kapatılarak inkübasyonu yapıldı.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - Stop Buffer'da oda ısısında 5 dk muamele edildi.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - Blocking Buffer'da oda ısısında 10 dk bekletildi.
 - Kuluçka aşaması olarak oda ısısında 30 dk bekletildi.
 - Üç ayrı tris buffer solüsyonunda 5'er dakika yıkandı.
 - DAB solüsyonunda oda ısısında 15 dk bekletildi.
 - Distile su ile yıkandı.
 - Metil green'de oda ısısında 5 dk muamele edildi.
 - Saf alkolde 2-4 defa çalkalandı.
 - Ksilolden geçirilip montaj yapıldı.
- Kontrol olarak lenf nodu kesitleri kullanıldı.

III.4. Değerlendirme

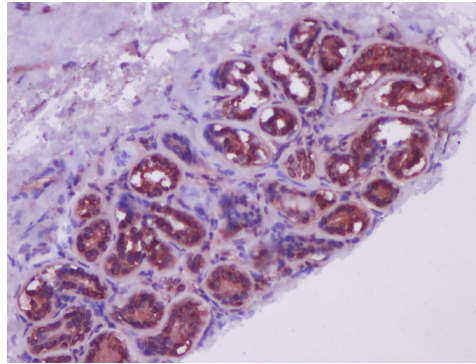
PTEN ve survivin immunohistokimyasal boyamalarında sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. Boyanma yoğunluğuna göre, pozitif kontrol olarak kullanılan prostat adenokarsinomu, iç pozitif kontrol olarak kullanılan komşu normal meme duktus epiteli ve vasküler endotel ile karşılaştırıldı, boyanma

yok, hafif ve yoğun (kontrol grubuyla aynı boyanma) olarak derecelendirildi (Resim 1a,1b, Resim 2a-2c, Resim 3a-3c, Tablo-VII, 55-58) .

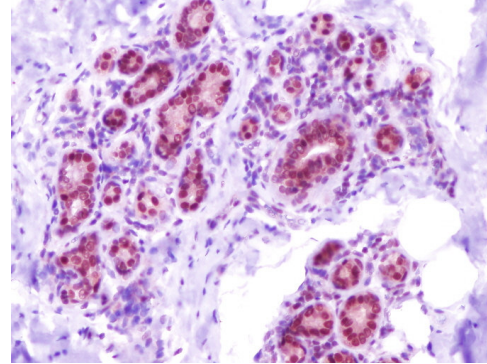
TUNEL ile boyanmanın en yoğun olduğu uygun alanlarda x400 büyütmede 1000 tümör hücresi sayıldı. Kahverengi boyanan, morfolojik olarak oval-yuvarlak şekilli, dar-yoğun sitoplazmalı, nükleer kondansasyon ve fragmantasyon gözlenen apoptotik hücreler pozitif kabul edildi ve pozitif hücre sayıları % olarak belirlendi.

Tablo-VII: PTEN, survivin skorlanması

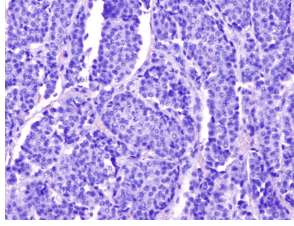
Boyanma yoğunluğu	Boyanma derecesi
Boyanma yok	0
Hafif	1
Yoğun	2



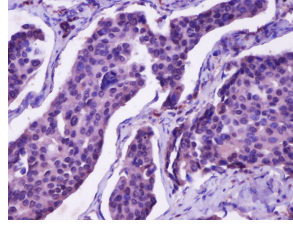
Resim 1a: Normal duktuler sitoplazmik PTEN pozitifliği (x200)



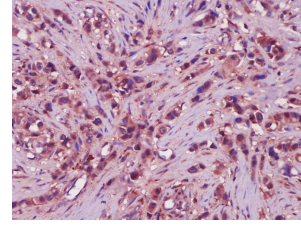
Resim 1b: Normal duktuler sitoplazmik survivin pozitifliği (x200)



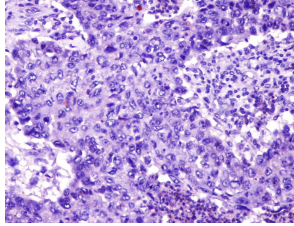
Resim 2a: İnvaziv duktal karsinomda derece 0 PTEN boyanması (x200)



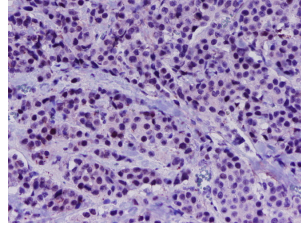
Resim 2b: İnvaziv duktal karsinomda derece 1 PTEN boyanması (x200)



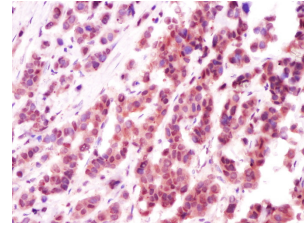
Resim 2c: İnvaziv duktal karsinomda derece 2 PTEN boyanması (x200)



Resim 3a: İnvaziv duktal karsinomda derece 0 survivin boyanması (x200)



Resim 3b: İnvaziv duktal karsinomda derece 1 survivin boyanması (x200)



Resim 3c: İnvaziv duktal karsinomda derece 2 survivin boyanması (x200)

III.5.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde ‘Windows XP’ yazılımında SPSS 13.00 versiyonu ile Kruskal Wallis, ‘Mann-Whitney U’ testi ve Pearson Korelasyon testi kullanıldı. $p < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Sürekli veriler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

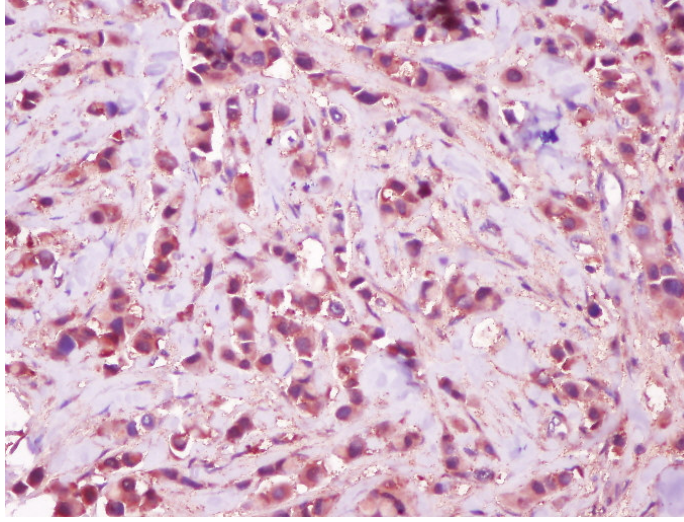
IV. BULGULAR

İnvaziv duktal karsinom olgularının tamamı (%100) kadın idi. Yaş aralığı 37 ile 80 yıl(ortalama $56.58 \pm SD$) arasında değişmekteydi. Olguların 21'i (%53.84) sağ memede, 18'i (%46.16) sol memede ve en sık olarak üst dış kadranda lokalizeydi. İnvaziv duktal karsinomlu 23 olgu (%58.97) grade 1, 10 olgu (%25.65) grade 2, 6 olgu (%15.38) ise grade 3'tü. İnvaziv duktal karsinom tanısı almış 15 adet olgu aynı zamanda DKİ'da içermekteydi. Bu olgulardaki DKİ değerlendirildiğinde 4 tanesi (%26.66) grade1, 6 tanesi (%40) grade 2, 5 tanesi de (%33.34) grade 3'tü. Dört hastada (%10.25) meme başı Paget hastalığı mevcut idi. Lenf nodu metastazı 20 (%51.28) olguda görülürken, vasküler invazyon 8 (%20.51) hastada bulunmaktaydı. İnvaziv duktal karsinomlu 19 hastada (%48.71) fibrokistik değişiklikler gözlenirken, 8 hastada hafif-orta, 6 hastada şiddetli olmak üzere toplam 14 hastada da (%35.89) epitelyal hiperplazi gözlendi. İnvaziv duktal karsinom olgularının tümör ve hasta özellikleri tablo-VIII'de gösterilmiştir.

PTEN: İnvaziv duktal karsinomlu 39 adet olgunun %5.1'inde PTEN ile boyanma gözlenmezken, % 66.7'sinde zayıf boyanma, %28.2'sinde de güçlü boyanma izlendi (Resim 4,Tablo-IX). PTEN ekspresyonu ile epitelyal hiperplazi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($r:0,724$; $p:0,007$, Tablo-X). Hafif-orta dereceli ve şiddetli epitelyal hiperplazi arasında PTEN ekspresyonu açısından negatif bir korelasyon saptandı. Epitelyal hiperplazi komponenti içeren invaziv duktal karsinomlarla, içermeyen invaziv duktal karsinomlar arasında ise anlamlı ilişki tespit edilmedi.

Tablo-VIII : Tümör ve Hasta Özellikleri

Özellik	Olgu Sayısı	(%)
Yaş		
< 45 (premenapoz)	7	17.94
≥ 45 (postmenapoz)	32	82.16
Tümör Boyutu (cm)		
≤ 2	20	51.28
2.1-4.9	16	41.02
≥ 5	3	7.7
Grade		
1	23	58.97
2	10	25.65
3	6	15.38
Grade (DKİ)		
1	4	26.66
2	6	40.00
3	5	33.34
Lenf Nodu Metastazı		
Negatif	19	48.72
Pozitif	20	51.28
Vasküler İnvazyon		
Negatif	31	79.49
Pozitif	8	20.51
Paget Hastalığı		
Negatif	35	89.75
Pozitif	4	10.25
ER Durumu		
Negatif	12	30.76
Pozitif	27	69.24
PR Durumu		
Negatif	15	38.46
Pozitif	24	61.54
c-erbB2 Durumu		
Negatif	31	79.48
Pozitif	8	20.52
Epitelyal Hiperplazi		
Hafif-orta	8	57.14
Şiddetli	6	42.86
Fibrokistik değişiklik		
Negatif	20	51.29
Pozitif	19	48.71



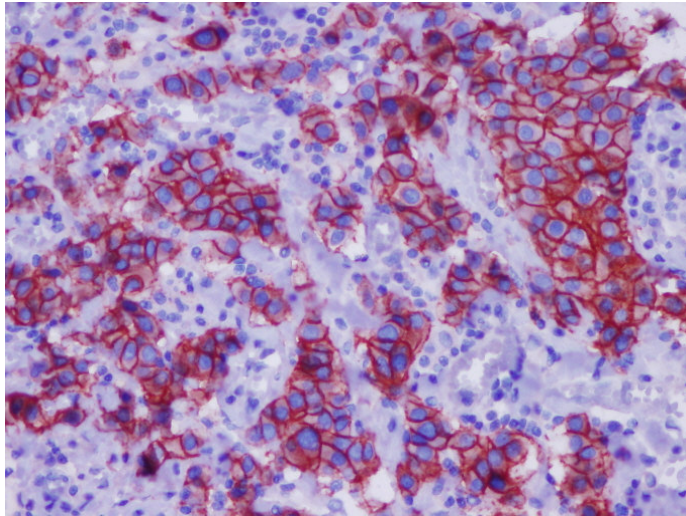
Resim 4: İnvaziv duktal karsinomda sitoplazmik PTEN pozitifliği (x200)

Tablo-IX: İnvaziv duktal karsinomlu olgularda PTEN, survivin boyanma skorları

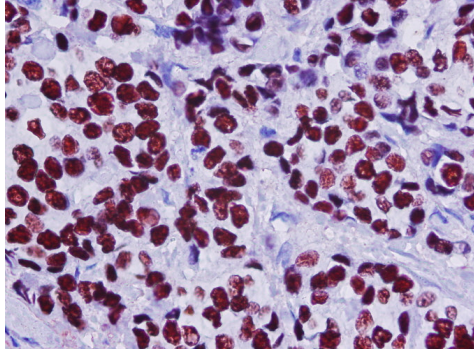
	Vaka Sayısı (%)
PTEN Boyanma Skoru	
0	2 (5.1)
1	26 (66.7)
2	11 (28.2)
Survivin Boyanma Skoru	
0	2 (5.1)
1	24 (61.6)
2	13 (33.3)

PTEN ekspresyonu ile yaş, tümör boyutu, grade, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, Paget hastalığı, ER, PR, c-erbB2 durumu, fibrokistik değişiklikler gibi klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Resim 5, Resim 6a, Resim 6b, Tablo-X). PTEN boyanma ortalamaları invaziv duktal karsinom olgularında $1,23 \pm 0,5$, DKİ'da $1,53 \pm 0,51$, epitelyal hiperplazide $0,51 \pm 0,75$ ve fibrokistik değişikliklerde $1,72 \pm 0,46$ idi (Tablo-XI). İnvaziv duktal karsinomlardaki PTEN ekspresyonunda DKİ ve fibrokistik değişikliklere göre daha fazla, epitelyal hiperplaziye göre daha az kayıp gözlemlendi. İstatistiksel olarak invaziv duktal karsinomlarda PTEN boyanma skoru ortalamasıyla hem epitelyal hiperplazi ($p < 0,001$, Tablo-XI) hem de fibrokistik

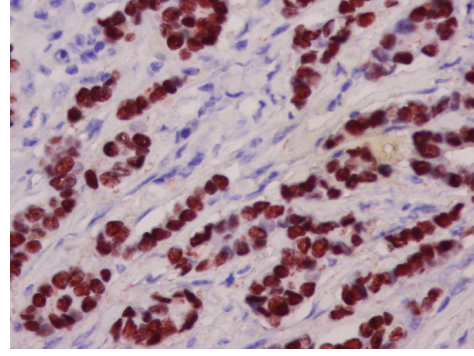
değişiklikler (p:0,002, Tablo-XI) arasında anlamlı fark gözlemlendi. DKİ içeren 15 adet olgunun %66.7'sinde PTEN ile zayıf boyanma, % 33.3'ünde güçlü boyanma izlenirken, DKİ grade'i ile PTEN ekspresyonu arasında ilişki tespit edilmedi (Resim 7). Ayrıca DKİ komponenti içeren invaziv duktal karsinomlarla, DKİ içermeyen invaziv duktal karsinomlar arasında da PTEN ekspresyonu açısından anlamlı bir fark gözlemlenmedi. DKİ grubunun PTEN ekspresyonu epitelyal hiperplaziye göre daha fazlaydı. Aralarındaki bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (p<0,001, Tablo XI). PTEN ekspresyonu boyanma yoğunluğuna göre, pozitif kontrol olarak kullanılan prostat adenokarsinomu, iç pozitif kontrol olarak kullanılan komşu normal meme duktus epiteli ve vasküler endotel ile karşılaştırıldı. Hafif-orta dereceli epitelyal hiperplazi içeren 8 adet olgunun 6'sında (%75) PTEN ile güçlü boyanma, 2'sinde (%25) zayıf boyanma izlenirken, şiddetli epitelyal hiperplazi içeren 6 adet olgunun tamamında (%100) zayıf boyanma izlendi (Resim 8). Fibrokistik değişiklikler içeren 19 adet olgudan %68.4'ünde PTEN ile zayıf boyanma, %21'inde güçlü boyanma izlendi, %10.6'sında boyanma izlenmedi. Fibrokistik değişiklikler PTEN ile epitelyal hiperplaziye kıyasla daha yüksek oranda pozitiflik gösterdi. Aralarındaki bu fark istatistiksel olarakta anlamlıydı (p:0,000, Tablo XI).



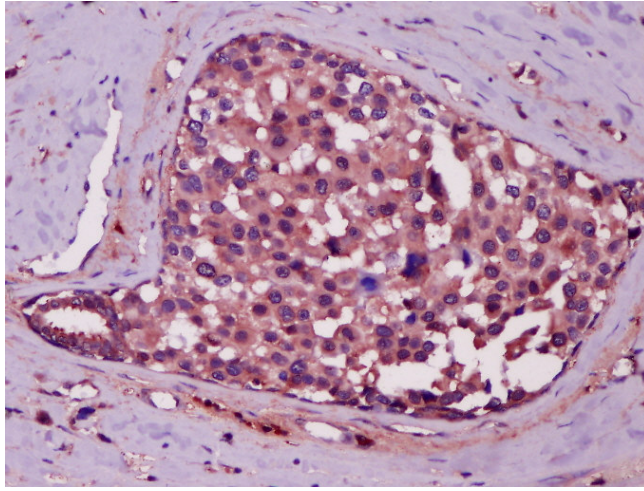
Resim 5: İnvaziv duktal karsinomda membranöz c-erbB2 pozitifliği (x200)



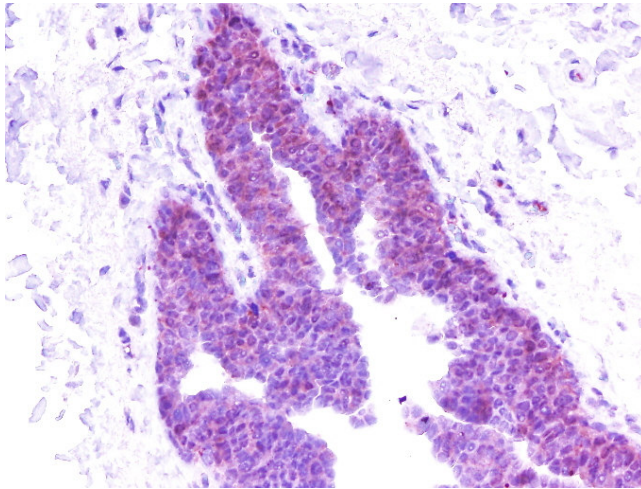
Resim 6a: İnvaziv duktal karsinomda
nükleer ER pozitifliği (x400)



Resim 6b: İnvaziv duktal karsinomda
nükleer PR pozitifliği (x400)



Resim 7: Duktal karsinoma in situ'da sitoplazmik PTEN pozitifliği (x200)



Resim 8 : Epitelyal hiperplazide sitoplazmik PTEN pozitifliği (x200)

Tablo-X: İnvaziv duktal karsinomlu olgularda PTEN, survivin boyanma skorları, TUNEL boyanma yüzdesi ile klinikopatolojik faktörler arasındaki ilişki

Klinikopatolojik Faktörler	Olgu Sayısı	PTEN			P Değeri	Survivin			P Değeri	TUNEL (%)	P Değeri
		0	1	2		0	1	2			
Yaş											
< 45	7	1	4	2	0,583	0	4	3	0,595	0,060±0,000	0,950
≥ 45	32	1	22	9		2	20	10		0,031±0,003	
Tümör Boyutu (cm)											
≤ 2	20	2	11	7	0,683	1	12	7	0,794	0,0026±0,003	0,007
2.1-4.9	16	0	12	4		0	11	5		0,0040±0,003	
≥ 5	3	0	3	0		1	1	1		0,0147±0,004	
Grade											
1	23	1	13	9	0,213	1	17	5	0,017	0,003±0,003	0,307
2	10	1	7	2		0	3	7		0,0055±0,005	
3	6	0	6	0		1	4	1		0,0063±0,006	
Grade (DKİ)											
1	4	0	3	1	0,430	0	2	2	0,278	0,0041±0,005	0,664
2	6	0	3	3		0	5	1		0,002±0,001	
3	5	0	4	1		0	2	3		0,0065±0,005	
Lenf Nodu Metastazi											
Negatif	19	1	11	7	0,307	2	10	7	0,974	0,0042±0,005	0,444
Pozitif	20	1	15	4		0	14	6		0,0041±0,004	
Vasküler İnvazyon											
Negatif	31	2	21	8	0,411	2	19	10	0,640	0,0032±0,003	0,016
Pozitif	8	0	5	3		0	6	2		0,0079±0,006	
Paget Hastalığı											
Negatif	35	2	23	10	0,978	0	23	12	0,416	0,0004±0,004	0,441
Pozitif	4	0	3	1		0	2	2		0,0052±0,005	
ER Durumu											
Negatif	12	0	10	2	0,531	1	5	6	0,255	0,005±0,006	0,499
Pozitif	27	2	16	9		1	19	7		0,0037±0,003	
PR Durumu											
Negatif	15	1	10	4	0,623	1	7	7	0,372	0,0042±0,005	0,749
Pozitif	24	1	18	5		1	18	5		0,0041±0,004	
c-erbB2 Durumu											
Negatif	31	2	20	9	0,966	2	20	9	0,640	0,0037±0,004	0,110
Pozitif	8	0	6	2		0	4	4		0,0057±0,005	
Epitelyal Hiperplazi											
Hafif-orta	8	0	2	6	0,007	0	2	6	0,133	0,0008±0,001	0,269
Şiddetli	6	0	6	0		0	4	2		0,0003±0,001	
Fibrokistik değişiklik											
Negatif	20	0	13	7	0,179	2	11	7	0,831	0,0042±0,004	0,843
Pozitif	19	2	13	4		0	13	6		0,0041±0,005	

Tablo-XI: İnvaziv duktal karsinom, DKİ, epitelyal hiperplazi, fibrokistik değişikliklerde PTEN, survivin ve TUNEL boyanma ortalamalarının karşılaştırılması

	İnvaziv Duktal Karsinom	DKİ	Epitelyal Hiperplazi	Fibrokistik değişiklik	P ¹	P ²	P ³	P ⁴	P ⁵	P ⁶
PTEN	1,23±0,53	1,53±0,51	0,51±0,75	1,72±0,46	0.31	0.000	0.002	0.000	0.361	0.000
Survivin	1,28±0,56	1,53±0,51	1,57±0,51	1,55±0,51	0.14	0.100	0.090	0.839	0.900	0.930
TUNEL	0,004±0,004	0,002±0,002	0,0006±0,0009	0,0005±0,0002	0.17	0.000	0.000	0.019	0.001	0.031

Veriler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

P¹: İnvaziv duktal karsinom - DKİ

P²: İnvaziv duktal karsinom - Epitelyal hiperplazi

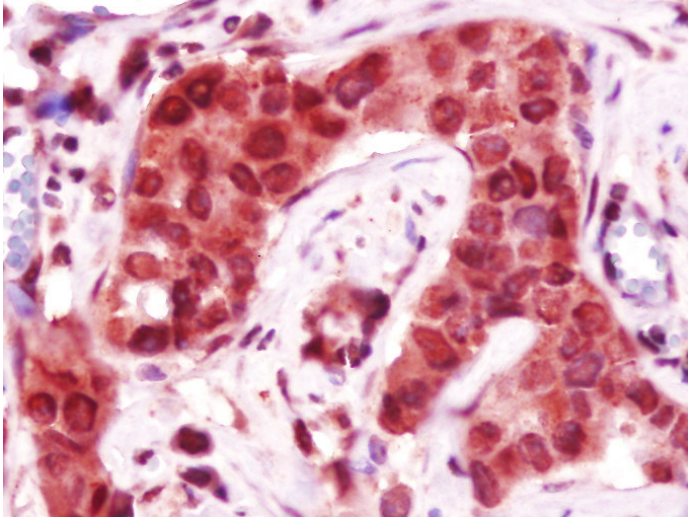
P³: İnvaziv duktal karsinom – Fibrokistik değişiklik

P⁴: DKİ – Epitelyal hiperplazi

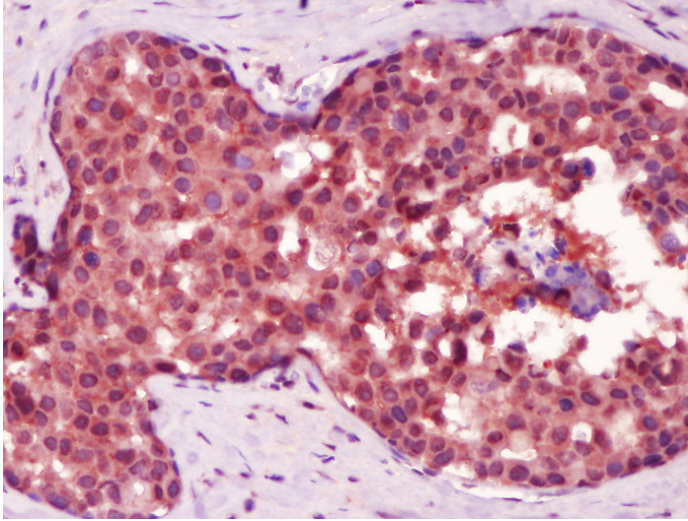
P⁵: DKİ – Fibrokistik değişiklik

P⁶: Epitelyal hiperplazi – Fibrokistik değişiklik

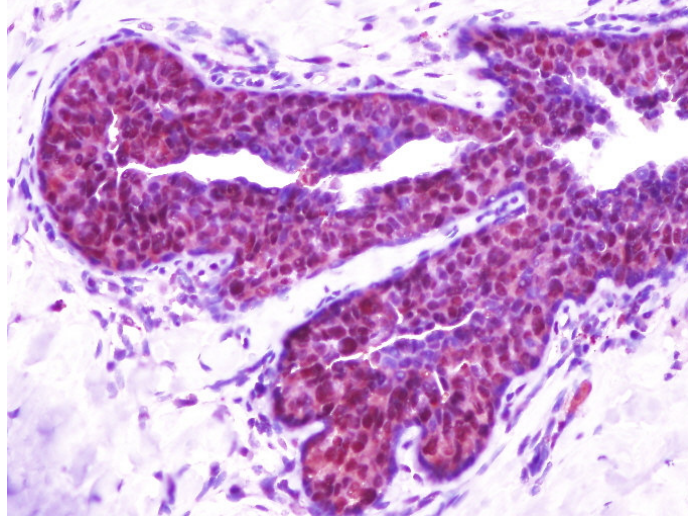
SURVİVİN: İnvaziv duktal karsinomlu 39 adet olgunun %5.1’inde survivin ile boyanma gözlenmezken , % 61.6’sında zayıf boyanma, %33.3’ünde de güçlü boyanma izlendi (Resim 9,Tablo-IX). Survivin ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (tablo-X). Survivin boyanma skoru ortalamaları, invaziv duktal karsinom olgularında 1,28±0,56, DKİ’da 1,53±0,51, epitelyal hiperplazide 1,57±0,51 ve fibrokistik değişikliklerde 1,55±0,51 idi (Tablo-XI). İnvaziv duktal karsinomda survivin ekspresyonunda bir azalma görülmekle birlikte DKİ, epitelyal hiperplazi ve fibrokistik değişiklikler ile survivin boyanma ortalamaları açısından istatistiksel bir fark bulunmadı. DKİ içeren 15 adet olgunun %60’ında survivin ile zayıf boyanma, %40’ında güçlü boyanma izlendi (Resim 10). Epitelyal hiperplazi içeren 14 adet olgunun %42.9’unda survivin ile zayıf boyanma, %57.1’inde güçlü boyanma izlenirken (Resim 11), fibrokistik değişiklikler içeren 19 adet olgudan %68.4’ünde survivin ile zayıf boyanma, %31.6’sında da güçlü boyanma izlendi.



Resim 9: İnvaziv duktal karsinomda sitoplazmik survivin pozitifliği (x400)



Resim 10: Duktal karsinoma in situ'da sitoplazmik survivin pozitifliği (x200)

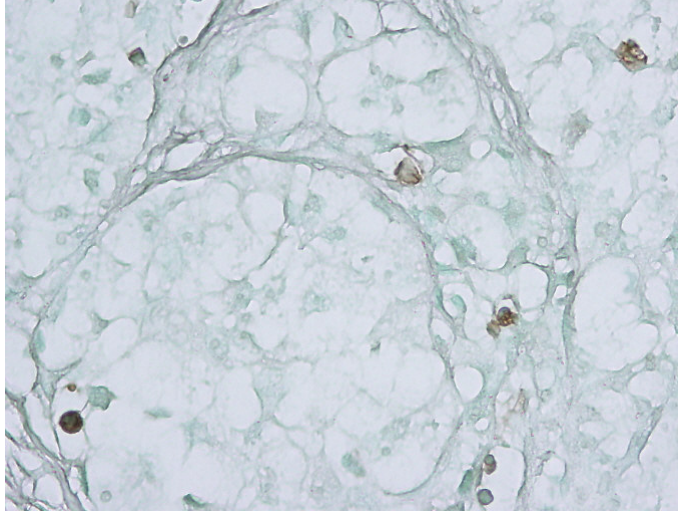


Resim 11: Epitelyal hiperplazide sitoplazmik survivin pozitifliği (x200)

TUNEL: İnvaziv duktal karsinomlarda TUNEL ile hem tümör boyutu ($r:0,636;p:0,007$) hem de vasküler invazyon ($r:0,455;p:0,0016$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmiş olup her 2 parametre ile de pozitif korelasyon saptandı. Tümör boyutu olarak ≤ 2 ve ≥ 5 ile 2.1-4.9 ve ≥ 5 cm grupları arasında boyut arttıkça apoptozun da arttığı gözlemlendi. TUNEL ekspresyonu ile diğer klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo-X). TUNEL boyanma skoru ortalamaları, invaziv duktal karsinom olgularında $0,004 \pm 0,004$, DKİ'da $0,002 \pm 0,002$, epitelyal hiperplazide $0,0006 \pm 0,0009$ ve fibrokistik değişikliklerde $0,0005 \pm 0,0002$ idi (Tablo-XI). İnvaziv duktal karsinom grubunda TUNEL ile diğer gruplara göre daha fazla pozitif boyanma izlendi (Resim 12). TUNEL boyanma ortalamaları açısından invaziv duktal karsinom ile epitelyal hiperplazi arasında ($p < 0,001$) ve invaziv duktal karsinom ile fibrokistik değişiklikler arasında ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edildi. DKİ grubu da hem epitelyal hiperplazi hem de fibrokistik değişikliklere göre TUNEL ile daha fazla boyanma gösterdi. TUNEL boyanma ortalamaları açısından DKİ ile epitelyal hiperplazi arasında ($p: 0,019$) ve DKİ ile fibrokistik değişiklikler arasında ($p:0,001$) istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı. Epitelyal hiperplazi grubunun TUNEL ekspresyonu fibrokistik değişikliklere göre daha fazlaydı. Aralarındaki bu

fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p: 0.031). Özetle invaziv duktal karsinom grubunda apoptoz diğerlerine göre anlamlı olarak yüksek bulunurken en az boyanma fibrokistik değişikliklerde saptandı.

İnvaziv duktal karsinomlarda PTEN, survivin, TUNEL boyalarından hiçbirisi arasında korelasyon saptanmadı.



Resim 12: İnvaziv duktal karsinomda TUNEL pozitifliği (x200)

V. TARTIŞMA

Meme kanserleri, kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup tüm kanserlerden ölüm nedenleri arasında 2. sıradadır (57). Günümüze değin meme kanserlerinde birçok genetik değışiklik tanımlanmıştır. Bu genetik değışikliklerin bir kısmı erken dönemlerde tespit edilirken ve tümör inisiasyonu ile ilgili iken, bir kısmı da geç dönemlerde tespit edilir ve hastalık progresyonundan sorumludur (47).

PTEN kromozom 10q23 lokusunda lokalize bir tümör süpresör gen olup, gen ürünü protein tirozin fosfataz ailesine üye bir proteindir (59). PTEN hem protein, hem de lipid fosfataz özelliğine sahip bir dual fosfatazdır ve bir enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör supresör moleküldür (60). PTEN, reseptör tirozin kinazlar tarafından hücre büyümesini ve çoğalmasını uyarın büyüme faktörleri ve sitokinler gibi ekstrasellüler moleküllerden aldıkları sinyalleri hücre içine ileten PI3K / Akt yolağında fonksiyon görmektedir. Büyüme faktörleri ile uyarılan PI3K, hücre membranına bağlı PIP2'leri fosforilleyerek PIP3'e dönüştürmektedir. PIP3 ise, bir onkoprotein olan Akt molekülünü aktive eden bir ikincil mesaj molekülüdür. Aktive olan Akt intrasitoplazmik pek çok kinazın, transkripsiyon faktörünün ve hücre siklus regülatörü molekülün fosforilasyonunu gerçekleştirerek hücreye gelen uyarıcı sinyallerin nukleusa iletilmesini sağlamaktadır. PTEN lipid fosfataz fonksiyonu ile lipid mediatör PIP3 molekülünü defosforile ederek inaktifleştirmektedir. PTEN'in tümör süpresör özelliğı bu lipid fosfataz fonksiyonundan gelmektedir. Hücre içi PTEN düzeyinin artması ve buna bağılı Akt inaktivasyonu hücre siklusunda G1 arresti ve apoptozise neden olur. PTEN fonksiyonu olmayan hücrelerde ise hücre proliferasyonu artmaktadır (61).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli primer ve metastatik tümörlerde 10q23 lokusunu ilgilendiren genetik anomali gösterilmiştir. PTEN anomalilerinin en sık gösterildiğı neoplazmlar glioblastomlar, prostat, meme, endometrium ve tiroid karsinomları ile malign melanomlardır. Bunun dışında akciğer kanseri, baş-boyun bölgesinin skuamöz hücreli karsinomları, böbrek, mide ve kolorektal karsinomlarda da PTEN mutasyonları gösterilmiştir (50).

Genetik lezyonların mekanizmaları çeşitlidir. Tümör supressör genleri ilgilendiren klasik neoplastik transformasyon modellerinde, tümör supressör genin

önce bir allelinde mutasyon meydana gelmektedir. Daha sonra karşı allelin kaybı ile malign transformasyona kadar ilerleyen selektif bir proliferasyon süreci başlamaktadır. İkinci allelin kaybı (heterozigosite kaybı) sıklıkla geniş bir kromozom bölgesini ilgilendiren delesyonlar sonucu meydana gelmektedir. Heterozigosite kaybı delesyonlar yanı sıra genom üzerinde nokta mutasyonlar veya insersiyon gibi mekanizmalarla da meydana gelebilmektedir. PTEN’de en sık gösterilen genetik anomaliler bu delesyonlar ve nokta mutasyonlardır (50).

Bose ve ark.’ları (52), invaziv tipteki sporadik meme kanserlerinde kromozom 10q’daki (PTEN gen lokalizasyonu) LOH sıklığını %40 olarak saptamışlardır (52). LOH insidansının sıklığına rağmen, PTEN gen mutasyon insidansı değişik çalışmalarda oldukça düşük oranda tespit edilmiştir (51,52).

Meme kanserinde PTEN protein ekspresyon durumu ile ilgili yapılan 4 çalışmada PTEN immün boyanmasında ortalama kayıp veya azalma %33-%50 olarak saptanmıştır (47,51,62,63). Perren ve ark.’larının (51) çalışmasında (toplam 33 olgu) ekspresyon azalması oranı %33 iken, Depowski ve ark.’larının (62) çalışmasında (toplam 151 olgu) bu oran %48 bulunmuştur. Bu iki çalışmadaki oranların farklılığı, ekspresyon tayininde kullanılan antikorların farklı olmasıyla açıklanabilir. Bose ve ark.’larının serisinde (34 olgu) ise bu oran %38 olarak tespit edilmiştir (47). Bizim çalışmamızdaki 39 olguda PTEN ekspresyonu değerlendirildiğinde, olguların 28’inde (%71.77) ekspresyonda azalma veya kayıp izlenirken 11 (%28.23) olgunun tümör doku örneklerindeki PTEN protein ekspresyon düzeyleri ile çevre meme dokularındaki PTEN protein düzeyleri arasında farklılık gözlenmemiştir. Çalışmamızda PTEN ekspresyonunda kayıp ya da azalma literatürdeki diğer sonuçlardan daha fazla bulunmuştur. Çeşitli malign neoplazilerde genetik defekti gösterilmiş bir tümör supressör gen olan PTEN’deki bu kayıp ya da azalma, olgularımızın büyük bir kısmında PTEN’in meme invaziv karsinom gelişiminde patogeneze den sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Depowski ve ark.’ları primer invaziv meme karsinomlu 151 hastanın formalin ile fikse edilmiş parafin bloklarında immünohistokimya yöntemi ile PTEN protein ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, değerlendirilen 151 tümör doku örneğinin 73’ünde (%48) ekspresyonda kayıp saptanmıştır. Aksiller lenf nodu metastazı olan 74 vakanın 49’unda (%60) PTEN protein kaybı tespit edilmiş ve bu

oran lenf nodu metastazı olmayanlardan yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada ER negatif olan 25 olgunun 17'sinde (%68) kayıp saptanmış ve ER pozitif olanlardan anlamlı bir şekilde yüksek olarak değerlendirilmiştir. PR durumu, evre, nüks ve grade ile PTEN protein ekspresyonu arasında bir ilişki saptanmamıştır (51). Chung ve ark.'ları (64) 88 invaziv duktal karsinom ve 13 DKİ olgusundan oluşan çalışmalarında DKİ grubunda PTEN ekspresyon kaybı saptamamışken, invaziv duktal karsinomlarda %32 ekspresyon kaybı bildirmişlerdir. PTEN ekspresyonunda kayıp ile lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir pozitif ilişki bulunurken tümör boyutu, grade ve rekürrens arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda, hafif-orta dereceli ve şiddetli epitelyal hiperplazi arasında PTEN ekspresyonu açısından negatif korelasyon saptandı. Epitelyal hiperplazi komponenti içeren invaziv duktal karsinomlarla, içermeyen invaziv duktal karsinomlar arasında ise anlamlı ilişki tespit edilmedi. PTEN ekspresyonu ile diğer klinikopatolojik prognostik parametreler arasında da anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Bir başka araştırmada, PTEN genotip moleküler durumu bilinen 34 invaziv ve 18 in situ meme kanserli doku örneğinde immünohistokimya ile PTEN ekspresyonu çalışılmış ve klinikopatolojik parametrelerle (evre, grade, ER, PR durumu, c-erbB2, LOH) ilişkisine bakılmıştır (47). Ekspresyonda azalma invaziv tümörlerin %38'inde tespit edilirken, in situ tümörlerin ise %11'inde saptanmıştır. PTEN ekspresyon azalmasının sadece evre ile ilişkili olduğu belirlenmiş, diğer parametrelerle ilişki bulunmamıştır. Ekspresyonda azalma sıklığının evre II ve evre III tümörlerde daha belirgin olduğu görülmüştür. Hem in situ hem de invaziv komponenti olan tümörlerde, DKİ komponentindeki ekspresyon paterni invaziv komponenttekine benzerlik göstermiştir (47). Çalışmamızdaki PTEN boyanma ortalamalarını değerlendirdiğimizde invaziv duktal karsinomlardaki PTEN ekspresyonunda DKİ ve fibrokistik değişikliklere göre daha fazla, epitelyal hiperplaziye göre daha az kayıp gözlemlendi. Aralarındaki bu fark DKİ grubu hariç istatistiksel olarak ta anlamlıydı. Bu durum epitelyal hiperplazi olgu sayısının azlığından kaynaklanabilir. DKİ komponenti içeren invaziv duktal karsinomlarla, DKİ içermeyen invaziv duktal karsinomlar arasında PTEN ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Lee ve ark.'ları (57) yaptıkları 99 adet invaziv duktal karsinomu içeren bir çalışmada, PTEN ekspresyon kaybını %27.3 olarak bildirmişler ve PTEN ekspresyon kaybıyla tümör grade'i, evre ve lenf nodu metastazı arasında ilişki saptamışlardır. Bose ve ark.'ları (55) 145 invaziv duktal karsinomlu olguda yaptıkları bir çalışmada PTEN ekspresyonunda kayıp ile yüksek tümör grade'i, lenfatik invazyon, proliferatif index arasında pozitif bir ilişki gözlemişler, ER, PR ve c-erbB2 ile ilişki saptamamışlardır. Garcia ve ark.'ları (57) 10q23 lokusu üzerinde LOH ile lenf nodu metastazı ve histolojik grade'in ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Survivin, normalde hücre siklusunun G2 / M fazında eksprese edilen, hücre siklusunu düzenleyici rolü olan apoptoz inhibitör protein ailesinden multifonksiyonel bir proteindir. Apoptoz inhibisyonuna ek olarak, hücre bölünmesinin regülasyonunda ve angiogeneizde de önemli rolü bulunur (65). İlk olarak Ambrosini ve ark.'ları (66) tarafından 1997 yılında fötal dokularda varlığı saptanmış, diferansiye adult dokularında bildirilmemiştir. Mitokondride mikrotübüllerde yerleşir, survivin-mikrotübül etkileşmelerindeki bozulmalar sonucu antiapoptozis fonksiyonu kayba uğrar ve kaspaz-3 aktivitesinde artış görülür (65).

Kolon, meme, pankreas, prostat, özefagus, mesane, akciğer, endometrium, serviks, lösemiler, nöroblastom, glioblastom, osteosarkom gibi birçok tümörde survivin ekspresyonu bildirilmiştir (65). Tümörlerde yaygın ekspresyonuna karşılık normal dokularda genellikle zayıf eksprese edilmesi nedeniyle survivin'in apoptozis temeline dayanan kemoterapi tedavisinde değerli, yeni bir ajan olabileceği belirtilmektedir (65). Konno ve ark.'ları (65) yaptıkları bir çalışmada normal endometriumda bazal ve glandüler hücre sitoplazma ve nukleuslarında survivin eksprese edildiğini belirtmişler ve boyanma paternini menstruel siklusun proliferatif ve sekretuar fazlarıyla ilişkili bulmuşlardır. Gianani ve ark.'ları (67) survivin ekspresyonunu kolon adenokarsinomları, hiperplastik polip, adenomatöz polipler yanında normal kolon dokusunda da saptamışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda invaziv karsinomlardan normal meme dokusuna kadar tüm meme lezyonlarında survivin ekspresyonu gösterilmiştir (41). Çoğu kanserde survivin düşük AI, kötü prognoz ve artmış rekürrens riski ile ilişkilidir (68). Çok değişkenli

analizlerde invaziv meme kanserlerinde survivin ekspresyonunun sağkalımı gösteren güçlü bir bağımsız prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (41).

Survivin de PTEN gibi apoptoz ve hücre siklus düzenleyicisidir. Deng ve ark.'ları gastrik kanserlerde survivin ile PTEN ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptamışlar ve her ikisinin de ileri evre gastrik kanserlerde moleküler belirleyici olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (68).

Sohn ve ark.'ları (36) 80 primer meme kanseri, 20 atipik hiperplazi ve 20 lenf nodu metastazında survivin ekspresyonunu araştırmışlar ve meme kanserlerinde %65, atipik hiperplazilerde %70 ve lenf nodu metastazlarında %85 survivin ekspresyonu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da epitelyal hiperplazide survivin ekspresyonunu invaziv duktal karsinoma göre hafif yüksek tespit edildi ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aynı çalışmada sitoplazmik survivin ekspresyonuyla histolojik grade, evre ve lenf nodu metastazı arasında korelasyon saptanırken, tümör boyutu, ER durumu ile bir ilişki saptanmamıştır (36). Çalışmamızda klinikopatolojik prognostik parametrelerle survivin ekspresyonu arasında bir ilişki saptanmadı.

Kennedy ve ark.'larında (65) 293 meme kanserli hastada yaptıkları bir çalışmada %60 oranında tümör dokusunda survivin ekspresyonu saptamış ve bunların %31'inde nükleer boyanma, %13'ünde sitoplazmik boyanma, %16'sında da hem nükleer hem sitoplazmik boyanma gözlemiştir. Çoğu tümörlerde survivin ekspresyonu predominant olarak sitoplazmik boyanma göstermesine rağmen bazı tümörlerde temel olarak nükleer boyanma izlenmektedir (33). Çalışmamızda sitoplazmik survivin ekspresyonu yanısıra nükleer survivin ekspresyonu da saptandı. Ancak kullandığımız survivin antikorunun kullanma kılavuzunda boyanma paterni olarak yalnızca sitoplazmik boyanma temel alındığı için bizde sitoplazmik boyanmayı esas aldık. Aynı çalışmada klinikopatolojik prognostik parametrelerle (hasta yaşı, tümör boyutu, histolojik grade, lenf nodu metastazı, ER durumu) survivin ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır (65). Tanaka ve ark.'ları sitoplazmik survivin ekspresyonunun meme kanserlerinde kötü prognozla ilişkili olabileceğini bildirmişler ama istatistiksel ilişki gözlemlememişlerdir. Yine aynı çalışmada apoptotik indeks (AI) ile survivin ekspresyonu arasında belirgin bir korelasyon saptamışlar ve sitoplazmik survivin ekspresyonunun meme

kanserlerinde kötü prognozla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (69). Kolorektal kanserlerde yapılan bir çalışmada survivin ekspresyonu ile düşük Aİ ve kısa sağkalım süresi arasında korelasyon saptanmıştır (70). Okada ve ark.'ları (71) mide kanserlerinde hem sitoplazmik hem de nükleer survivin ekspresyonunu rapor ettikleri bir çalışmada sitoplazmik survivin ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu saptamışlardır. Çok değişkenli analizlerde nükleer survivin ekspresyonunun iyi bir prognostik faktör olabileceği belirtilmiştir. Yine Okada ve ark.'larının (71) hepatosellüler karsinomlarda TUNEL metoduyla değerlendirdikleri Aİ ile survivin ekspresyonu arasında bir korelasyon gözlemlememişlerdir. Bizim çalışmamızda da invaziv duktal karsinomlarda survivin ile TUNEL ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

Sing ve ark.'ları (41) survivin'in benign meme dokularında malign lezyonlardan daha az hücre yüzdesinde (%45) eksprese edildiğini belirtmişler, düşük dereceli DKİ grubunda yüksek dereceli DKİ'ya göre daha az boyanma saptamışlardır. Aynı çalışmada survivin ekspresyon ortalamaları, invaziv duktal karsinom ve DKİ'da benzer olup epitelyal hiperplazi, fibrokistik değişiklikler gibi benign meme lezyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla boyanma görülmüştür. Ayrıca survivinle yüksek oranda boyanan meme tümör hücrelerinin büyük bölümünde ER ve PR ile negatif, c-erbB2 ile pozitif boyanma görülmüş ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (41). Bizim çalışmamızda ise invaziv duktal karsinomlarda survivin boyanması DKİ ve diğer lezyonlardan düşük bulundu ancak boyanma ortalamaları arasında fark saptanmadı. Düşük dereceli DKİ grubunda, yüksek dereceli DKİ'ya göre survivin ile boyanma açısından bir fark görülmedi.

Meme karsinogenezi sürecinde hızlı hücre değişimi görülür (72). TUNEL metodu, bu hızlı hücre değişimi sonucu oluşan DNA kırıklarının ve dolayısıyla apoptotik hücrelerin saptanmasında yaygın kullanılan bir yöntemdir (73).

Harn ve ark.'ları (73) 63 meme kanserli hastada invaziv duktal karsinom, DKİ ve metastatik lenf nodlarında apoptitozu araştırmışlardır. DKİ grubunda Aİ'i invaziv duktal karsinom ile metastatik lenf nodlarına göre daha yüksek bulmuşlar, ER ve PR durumuyla apoptoz arasında herhangi bir ilişki saptamamışlardır. Bodis ve ark.'ları (72) DKİ'larda apoptotik aktivite ile yüksek histolojik grade'i korele

bulmuşlardır (72). Shen ve ark.'ları (74) çalışmalarında, DKİ'da invaziv duktal karsinomlardan daha fazla apoptoz görüldüğünü bildirmişler, meme karsinomlarında evre ile apoptoz arasında istatistiksel olarak belirgin korelasyon saptamışlardır. Bai ve ark.'ları (72) invaziv duktal karsinomlarda DKİ'ya göre ve hiperplazilerde de normal epitele göre Aİ'i yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda da invaziv duktal karsinom grubunda TUNEL ile diğer gruplara göre daha fazla pozitif boyanma olduğu saptandı. İnvaziv duktal karsinomlarda AI ile tümör boyutu ve vasküler invazyon arasında pozitif bir korelasyonun varlığı dikkati çekti. Ayrıca invaziv duktal karsinomlu olgulardaki tümör hücrelerinde saptanan Aİ ortalamalarının, epitelyal hiperplazi ve fibrokistik değişiklikler gösteren duktus epitelindekilerden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü. TUNEL boyanma ortalamaları açısından invaziv duktal karsinom ile epitelyal hiperplazi arasında ve invaziv duktal karsinom ile fibrokistik değişiklikler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Yaptığımız çalışmada invaziv duktal karsinomlarda Aİ ile PTEN ve survivin arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Sonuç olarak, invaziv duktal karsinom patogeneğinde PTEN ekspresyonunda azalma ve apoptozisteki artışın önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Survivin ekspresyonu invaziv duktal karsinomda, in situ karsinom ve benign lezyonlardan düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir. Meme karsinomlarının tedavisi için yakın gelecekte yeni tedavi şekillerinde PTEN ve survivin molekülü hedef olarak seçilebilir. Meme kanserleri patogeneğinde PTEN ve survivin mekanizması ve meme karsinogeneğinde potansiyel rolünü tam anlamıyla açığa kavuşturmak için daha çok olgu içeren, daha geniş kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇLAR

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir:

- 1- İnvaziv duktal karsinomlarda PTEN ekspresyonunda kayıp ya da azalma literatürdeki diğer sonuçlardan daha fazla bulunmuştur. PTEN boyanma ortalamalarında DKİ ve fibrokistik değişikliklere göre daha fazla, epitelyal hiperplaziye göre daha az kayıp gözlenmiştir. Aralarındaki bu fark DKİ grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- 2- PTEN ekspresyonu ile klinikopatolojik parametrelerden, sadece hafif-orta dereceli ve şiddetli epitelyal hiperplazi arasında PTEN ekspresyonu açısından negatif bir korelasyon saptanmıştır. Epitelyal hiperplazi komponenti içeren invaziv duktal karsinomlarla, içermeyen invaziv duktal karsinomlar arasında ise anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.
- 3- İnvaziv duktal karsinomda survivin ekspresyonu DKİ ve benign lezyonlara göre düşük olmakla birlikte aralarında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Survivin ekspresyonuyla klinikopatolojik prognostik parametrelerle herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir.
- 4- İnvaziv duktal karsinom grubunda TUNEL ile diğer gruplara göre daha fazla pozitif boyanma izlenmiştir. Apoptoz ortalamaları açısından invaziv duktal karsinom ile epitelyal hiperplazi arasında ve invaziv duktal karsinom ile fibrokistik değişiklikler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. DKİ grubu da hem epitelyal hiperplazi hem de fibrokistik değişikliklere göre TUNEL ile istatistiksel olarak anlamlı daha fazla boyanma göstermiştir. Klinikopatolojik parametrelerden tümör boyutu ve vasküler invazyon ile apoptoz arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır.
- 5- Aİ ile PTEN ve survivin arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır.

VII. ÖZET

Meme kanserleri, kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup tüm kanserlerden ölüm nedenleri arasında 2. sıradadır. Pek çok malign neoplazide görüldüğü gibi meme karsinomlarında da görülen genetik anomaliler onkogenleri ilgilendiren kromozom translokasyonları, tümör supresör genlerindeki delesyonlar ve mutasyonlar, değişik sayısal kromozomal anomaliler ve diğer çeşitli genetik kusurlardır. Patogeneze sorumlu olası moleküler genetik defektlerin tespiti, diğer malignitelerde görüldüğü gibi, meme karsinomlarının da daha iyi anlaşılması ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için gereklidir.

PTEN kromozom 10q23 lokusunda lokalize bir tümör süpresör gen olup, hücre büyümesi ve apoptoz için gerekli sinyalleri düzenlemede (fosfoinozid 3- kinaz-Akt yolu antagonisti) önemli rol oynar. PTEN yokluğu veya mutasyonunda lipid sinyal transdüksiyonu yoluyla tümör hücreleri apoptozdan korunabilir. Çeşitli insan kanserlerinde PTEN gen mutasyonu görülür ve çoğu kanserde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir. Meme kanserlerinde de PTEN ekspresyonunda azalmanın kötü prognozla ilişkili olduğu ve yeni bir prognostik belirleyici olabileceği ileri sürülmektedir.

Survivin, apoptoz inhibitör protein ailesinin bir üyesi olup apoptoz, angiogenez ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rol oynar. Survivin çoğu kanserlerde eksprese edilir ve kemoterapi rezistansı, artmış tümör rekürrensi ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir.

Bu çalışmada 39 invaziv duktal meme karsinomlu olguda immunohistokimyasal yöntemle PTEN ve survivin ekspresyonunun klinikopatolojik prognostik parametreler ve apoptozis ile ilişkisi incelendi.

İnvaziv duktal karsinomların büyük kısmında (%71.77) PTEN ekspresyonunda kayıp ya da azalma izlendi. PTEN ekspresyonu ile sadece hafif-orta dereceli ve şiddetli epitelyal hiperplazi ($r:0,724$ $p:0,007$) arasında negatif bir korelasyon saptanırken yaş, tümör boyutu, grade, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, Paget hastalığı, ER,PR, c-erbB2 durumu, fibrokistik değişiklikler gibi klinikopatolojik parametreler arasında ilişki saptanmadı. İnvaziv duktal karsinom olgularında, survivin ile %33.3'ünde güçlü boyanma, %61.6'sında zayıf boyanma görülürken %5.1'inde boyanma gözlenmedi. Survivin ekspresyonuyla

klınıkopatolojik prognostik parametreler arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi. İnvaziv duktal karsinomda survivin ekspresyonu ($1,28\pm0,56$), DKİ ($1,53\pm0,51$), epitelyal hiperplazi ($1,57\pm0,51$) ve fibrokistik değışikliklerdeki ($1,55\pm0,51$) survivin ekspresyonundan az olmakla birlikte aralarında boyanma ortalamaları açısından fark saptanmadı. İnvaziv duktal karsinom ve DKİ grubunda TUNEL ile diğer gruplara göre daha fazla pozitif boyanma izlendi. Klinikopatolojik parametrelerden tümör boyutu ($r:0,636$ $p:0,007$) ve vasküler invazyon ($r:0,455$ $p:0,0016$) ile apoptoz arasında pozitif bir korelasyon saptandı. İnvaziv duktal karsinomlarda apoptoz ile PTEN ve survivin arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Bu sonuçlar invaziv duktal karsinoma progresyonunda PTEN ekspresyonunda azalma ve apoptozisteki artışın önemli olabileceğini göstermektedir. Survivin ekspresyonu invaziv duktal karsinomda in situ karsinom ve benign lezyonlardan düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir. Apoptozis ile PTEN ve survivin ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. PTEN ve survivin'in duktal karsinogenezis sürecindeki yerini ve apoptozis ile ilişkilerini tam olarak açığa kavuşturabilmek için daha geniş serilerde ileri çalışmalara gereksinim vardır.

VIII. SUMMARY

Breast carcinoma is the most commonly seen carcinoma that is the second cause of death due to all carcinoma types. The genetic anomalies seen in breast carcinomas are, as seen in most of malign neoplasies, oncogene related chromosome translocations, deletions and mutations in tumor suppressor genes, various numerical chromosomal anomalies and other different genetic abnormalities. The determination of possible molecular genetic defects responsible for pathogenesis is necessary for better understanding of breast carcinomas and development of more effective treatment methods, as is in other malignities.

PTEN chromosome, a tumor suppressor gene located in 10q23 locus, plays an important role in arrangement of signals required for cell growing and apoptosis. In case of absence or mutations of PTEN, tumor cells can protect themselves against apoptosis by the way of lipid signal transduction. PTEN gene mutations are seen various human cancers and related with advanced stage and poor prognosis in most cancers. It has also been suggested that a decrease in PTEN expression be related with poor prognosis and would be new prognostic determinant in breast carcinomas.

Survivin, a member of apoptosis inhibitor protein family, plays role in arrangement of apoptosis, angiogenesis and cell division. Survivin is expressed in most carcinomas and related with resistance to chemotherapy, increased tumor recurrence and short survival.

In this study, the relationship of PTEN and Survivin expression with clinico-pathologic prognostic parameters and apoptosis was investigated by the means of immunohistochemical method in 39 patients with invasive ductal breast carcinoma.

A decrease or loss in PTEN expression was observed in an important portion (71.8%) of invasive ductal carcinomas. A negative correlation was detected only between PTEN expression and grade of hyperplasia ($r:0.724$ $p:0.007$), while there was no correlation with other clinicopathologic parameters such as age, tumor dimension, grade, lymph node metastasis, vascular invasion, Paget disease, ER, PR, c-erbB2 status and fibrocystic changes. In cases with invasive ductal carcinomas, strong staining with survivin was observed in 33.3% of cases, while

there was weak staining in 61.6% and no staining in 5.1% of cases. No significant relationship between Survivin expression and clinicopathologic prognostic parameters was detected. Although survivin expression in IDC (1.28 ± 0.56) was fewer than survivin expression in DCI (ductal carcinoma in situ) (1.53 ± 0.51), epithelial hyperplasia (1.57 ± 0.51) and fibrocystic changes (1.55 ± 0.51), differences were not statistically significant. In the groups of IDC and DCI more positive staining with TUNEL was detected as compared to other groups. From the clinicopathologic parameters, tumor dimension and vascular invasion showed positive correlation with apoptosis ($r:0.636$ $p:0.007$ and $r:0.455$ $p:0.0016$, respectively). PTEN, survivin expression and apoptosis did not show any correlation with each other in the IDC group.

Our results suggested that a decrease in PTEN expression and increase in apoptosis be important in progression of IDC. Although survivin expression in IDC was lower than survivin expression in carcinoma in situ and benign lesions, it was not statistically significant. No relationship was found between apoptosis and PTEN or survivin expression. Further studies with large case series are needed to clarify importance of PTEN and survivin in progress of IDC and their relationship with apoptosis.

IX. KAYNAKLAR

1. Collins L.C., Schnitt S.J. Breast. In: Stacey E.M., ed. Histology for Pathologists. 3th ed. Philadelphia:Lippincott Williams&Wilkins, 2007:57-68.
2. Erhan Y., Canda T. Meme Hastalıkları Patolojisi ve Meme Kanseri. In: Mocan Kuzey G, ed. Temel Patoloji. Ankara:Güneş Kitabevi, 2007:705-739.
3. Lester S.C. The Breast. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N, eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Philadelphia, 2005:1120-1149.
4. Tavassoli F.A., Devilee P. Tumours of the breast. In: Tavassoli F.A., Devilee P., eds. Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARCPress Lyon, 2003:13-59.
5. Pisani P., Parkin DM., Bray F., Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int J Cancer 1999;83:18-29.
6. Rosai J. Breast. In: Rosai J, ed. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Mosby Edinburg, 2004:1787-1827.
7. Elston C.W., Ellis I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer : experience from a large study with long-term follow-up. Author Commentary, Histopathology 2002;41:151-153.
8. Zerrin Calay. Intraduktal Karsinom ve Lobüler Neoplazi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2006;54:73-78.
9. Poller D.N. Pathology of ductal carcinoma in situ of the breast: current status. European Journal of Surgical Oncology 2001;27:498-503.

10. Shoker B.S., Sloane J.P. DCIS grading schemes and clinical implications. *Histopathology* 1999;35:393-400.
11. Schnitt S.J., Mills S. The Breast. In: Mills S.E., Carter D., Reuter V., Greenson J.K., Stoler M.H., Oberman H., eds. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. 4th ed. Philadelphia:Lippincott Williams& Wilkins, 2004:355-358.
12. Rapiti E., Fioretta G., Verkooijen HM., Vlastos G., Schafer P., Kurtz J. Survival of young and older breast cancer patients in Geneva from 1990 to 2001. *European Journal of Cancer* 2005;41:1446–1452.
13. Sivridis E., Giatromanolaki A., Galazios G., Koukourakis M. Node-related factors and survival in node-positive breast carcinomas *The Breast* 2006;15:382–389.
14. Carter C.L., Allen C., Henson D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-187.
15. Fisher E.R., Anderson S., Tan-Chiu E., Fisher B., Eaton L., Wolmark N. Fifteen Year Prognostic Discriminants for Invasive Breast Carcinoma : National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer* 2001;91:1679-1688.
16. Ocana A., Cruz J., Pandiella A. Trastuzumab and Antiestrogen Therapy Focus on Mechanisms of Action and Resistance. *Am J Clin Oncol* 2006;29:90–95.
17. Dieras V., Vincent Salomon A., Degeorges A., Beuzeboc B. Trastuzumab (Herceptin) and breast cancer : mechanisms of resistance. *Bull Cancer*. 2007;94:259-266.

18. Allred D.A., Clark G.M., Elledge R. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:200-206.
19. O'Connell P., Pekkeli V., Fuqua S.A. Malignant tumors of the breast. 'Cancer Principles and Practice of Oncology'. 6. Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001:1651-1716.
20. Kumar V., Abbas A., Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Elsevier Philadelphia, 2005:26-32.
21. Willingham M.C. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 1999;47:1101-1109.
22. Turgut B., Demir T., Çeliker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi* 2006;11: 6-11.
23. Kiechle L., Xinbo Z. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta* 2002;326:27-45.
24. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002;9:142-148.
25. Zhang H.J., Zhang Y. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews* 2003;2:357-366.
26. Duane R.S., William J.H. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2003;32:345-369.
27. Petak I., Houghton J.A., Kopper L. Molecular targeting of cell death signal transduction pathways in cancer. *Current Signal Transduction Therapy* 2006;1:113-131.

28. Dubska L., Matalova E., Mísek I. Detection of Apoptosis in Parafin Embedded Tissues: the Influence of Tissue Type and Fixation. *Acta Vet. BRNO* 2002;71:529-553.
29. Negoescu A., Guillermet C., Lorimier P. Brambilla E. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to Tunel specificity. *Biomed Pharmacother.* 1998;52:252-258.
30. Hekim N. Apoptosis. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. 2003:115-140.
31. Katherine L, Jonathan M. Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:821-832.
32. Khan Z., Khan J.G. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters* 2006;244:164-171.
33. Jiang X., Wilford C., Duensing S., Munger K., Jones G., Jones D. Participation of Survivin in Mitotic and Apoptotic Activities of Normal and Tumor-Derived Cells. *J Cell Biochem.* 2001;83:342-354.
34. Akhtar M., Gallagher L., Rohan S. Survivin: Role in diagnosis, prognosis and treatment of bladder cancer. *Adv Anat Pathol.* 2006;13:122-126.
35. Duckett C.S., Nova V.E., Gedrich R.W. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;15:2685-2694.
36. Sohn DM., Kim SY., Baek M.J., Lim C.W., Lee M.H. Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2006;60:289-292.

37. O'Connor D.S., Schechner J.S., Adida C., Mersi M. Control of Apoptosis during Angiogenesis by Survivin Expression in Endothelial Cells. *Am J Pathol* 2000;156(2):393-398.
38. Fukuda S., Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1087-1098.
39. Sarela A., Scott N., Ramsdale J., Markham AF. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001;8:305-310.
40. Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Reed JC. IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas(CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320.
41. Singh M., Bleile M.J., Shroyer L., Heinz D., Jarboe E., Shroyer K.R. Analysis of Survivin Expression in a Spectrum of Benign to Malignant Lesions of the Breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:296-304.
42. Li J., Yen C., Liaw D. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-1947.
43. Teng D.H., Hu R., Lin H., Davis T., Iliev D., Frye C. MMAC1 / PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:5221-5225.
44. Chu E.C., Tarnawski A.S. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit* 2004;10:235-241.
45. Risinger J.I., Hayes A.K., Berchuck A., Barrett JC. PTEN / MMAC1 Mutations in Endometrial Cancers. *Cancer Res.* 1997;57:4736-4738.

46. Tamura M., Gu J., Tran H., Yamada K.M. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1820-1828.
47. Bose S., Crane A., Hibshoos H., Mansukhani M., Sandweis L. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol* 2002; 33:405-409.
48. Khan S., Kumagai T., Vora J.P. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 2004;112:407-410.
49. Maehama T., Okahara F., Kanaho Y. The tumour suppressor PTEN: involvement of a tumour suppressor candidate protein in PTEN turnover. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:343-347.
50. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational Spectra of PTEN/MMAC1 Gene: a Tumor Suppressor With Lipid Phosphatase Activity. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1922-1932.
51. Depowski P.L., Rosenthal S.I., Ross J.S. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001;14:672-676.
52. Bose S., Wang S.I., Terry M.B. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene* 1998;17:123-127.
53. Weng L.P., Smith W.M., Dahia P.L., Ziebold U., Gil E., Eng C. PTEN Suppresses Breast Cancer Cell Growth by Phosphatase Activity-dependent G1 Arrest followed by cell death. *Cancer Res* 1999;59:5808-5814.
54. Discigil G., Gemalmaz A., Tekin N., Basak O. Profile of menopausal women in west Anatolian rural region sample. *Maturitas* 2006;55(3):247-254.

55. Bose S., Chandran S., Mirocha J.M., Bose Namrata. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol* 2006;19:238-245.
56. Barnes N., Haywood P., Flint P., Knox WF., Bundred NJ. Survivin expression in insitu and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer* 2006;94:253-258.
57. Lee J.S., Hyung K., Young K., Cheol L., Chang P., Whan M. Reduced PTEN expression is associated poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:205-210.
58. Panigrahi A.R., Pinder S.E., Chan S.Y., Paish E.C., Robertson J.F.R., Ellis I.O. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* 2004;204:93-100.
59. Li J., Yen C., Liaw D. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997; 275:1943-1947.
60. Myers M.P., Stolarov J.P., Eng C., Li J., Wang S., Wigler M., Parsons R., Tonks R.K. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual- specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:9052-9057.
61. Myers MP., Pass I., Batty I.H., Van der Kaay J., Stolarov J.P., Brian A. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:13513-13518.
62. Perren A., Weng L.P. Boag A., Ziebold U., Thakore A., Dahia P.L., Komminoth P., Lees J., Mulligan L.M., Mutter G.L. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast. *Am J Pathol*, 1999;155:1253-1260.

63. Torres J., Navarro S., Rogla I., Ripoll F., Lluch A., Garcia Conde J., Llombart-Bosch A., Cervera J., Pulido R. Heterogeneous lack of expression of the tumour suppressor PTEN protein in human neoplastic tissues. *Eur J Cancer* 2001;37:114-121.
64. Chung M.J., Jung S.H., Lee B.J., Kang M.J., Lee D.G. Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis of breast cancer. *Pathol Int* 2004;54:10-15.
65. Kennedy S.M., O'Driscoll L., Purcell R., Fitz-simons N., McDermott E.W., Hill A.D., O'Higgins N.J., Parkinson M., Linehan R., Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1077-1083.
66. Ambrosini G., Adida C., Sirugo G., Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182.
67. Gianani R., Jarboe E., Orlicky D., Frost M., Bobak J., Lehner R., Shroyer K.R. Expression of survivin in normal, hyperplastic and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001;32:119-125.
68. Deng H., Wu R.L., Zhou H.Y., Huang X., Chen Y., Liu L. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:1013-1017.
69. Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., Tanigawa N. Expression of survivin and Its Relationship to Loss of Apoptosis in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134.

70. Kawasaki H., Toyoda M., Shinohara H., Okuda J., Watanabe I., Yamamoto T., Tanaka K., Tenjo T., Tanigawa N. Expression of Survivin Correlates with Apoptosis, Proliferation and Angiogenesis during Human Colorectal Tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032.
71. Okada E., Murai Y., Matsui K., Isiawa S., Cheng C., Masua M., Takano Y. Survivin expression in tumour cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-116.
72. Bai M., Agnantis N.J., Kamina S., Demou A., Zagorianakou P., Katsaraki A., Kanavaros P. In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001;3:276-283.
73. Harn H.J., Shen K.L., Yueh K.C., Ho L.I., Chiu S.C., Lee W.H. Apoptosis occurs more frequently in intraductal carcinoma of human breast cancer and correlates with altered p53 expression: detected by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC nick end labeling (TUNEL) *Histopathology* 1997;31:534-539.
74. Shen K.L., Harn H.J., Ho L., Yu C.P., Chiu S.C., Lee W.H. The extent of Proliferative and Apoptotic Activity in Intraductal and Invasive Ductal Breast Carcinomas Detected by Ki-67 Labeling and TUNEL. *Cancer* 1998;82:2373-2381.