

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ ve TRASTUZUMAB
TEDAVİSİNE DİRENÇTE p95'İN ROLÜ**

Nuket ELİYATKIN

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA TEZİ

İZMİR-2015

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2011970068

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ ve TRASTUZUMAB TEDAVİSİNE DİRENÇTE p95'İN ROLÜ

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA TEZİ

Nuket ELİYATKIN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Safiye AKTAŞ

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından “2012-KB SAG 025” numaralı proje ile desteklenmiştir.

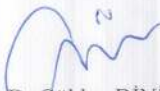
TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2011970068

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora /Yüksek Lisans programı öğrencisi Nuket ELİYATKIN "Meme Kanseri ve Transtuzumab Tedavisine Dirençte P95'in Rolü"konulu Doktora/Yüksek Lisans tezini 04/06/2015 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Nur OLGUN
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)
BAŞKAN


Doç. Dr. Yasemin BAŞKIN
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)
ÜYE


Doç. Dr. Merih GÜRAY DURAK
(DEÜ Tıp Fak.)
ÜYE


Doç. Dr. Gülden DİNİZ
(İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Has.)
ÜYE


Doç. Dr. Ragıp ORTAÇ
(İzmir Üniv. Tıp Fak.)
ÜYE


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
DANIŞMAN
(oy kullanmıyor)

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Uğur YILMAZ
(İzmir Üniv. Tıp Fak.)
YEDEK ÜYE

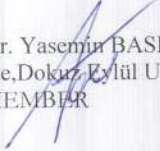
Nuket ELİYATKIN, the PhD Student of Basic Oncology in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences Department of Oncology, has successfully completed her thesis about "Breast Cancer and Role of p95 in Resistance of Trastuzumab Treatment" at 04/06/2015



Prof. Dr. Nur OLGUN
(Oncology Institute, Dokuz Eylül University)
CHAIR



Assoc. Prof. Dr. Merih GÜRAY DURAK
(Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University)
MEMBER



Assoc. Prof. Dr. Yasemin BASKIN
(Oncology Institute, Dokuz Eylül University)
MEMBER



Assoc. Prof. Dr. Gülden DİNİZ
(İzmir Tepecik Teaching Hospital)
MEMBER



Assoc. Prof. Dr. Ragıp ORTAÇ
(İzmir University Faculty of Medicine)
MEMBER



Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
SUPERVISOR
(NON-VOTING MEMBER)

Assoc. Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
(Oncology Institute, Dokuz Eylül University)
SUBSTITUTE MEMBER

Prof. Dr. Uğur YILMAZ
(İzmir University Faculty of Medicine)
SUBSTITUTE MEMBER

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2. Araştırmanın Amacı	6
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	6

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri	7
2.1.1. Geleneksel, eski moda uygulama	8
2.1.2. Yeni dönem, yeni başlangıç	9
2.1.3. Moleküler subgrupların önemi	11
2.2. HER Ailesinin Patofizyolojisi	11
2.3. Meme Kanseri Patogenezinde HER2	14
2.4. HER-2 Pozitif Meme Kanseriinde Trastuzumabın Yeri ve Önemi	17
2.5. Trastuzumabın Etki Mekanizmaları	18
2.5.1. Trastuzumaba Direnç Mekanizmaları ve p95HER2	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi	24
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	24
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme	24
3.4. Çalışma materyali	24
3.5. Araştırmanın değişkenleri	25
3.6. Veri toplama araçları	25

3.6.1. Araç ve Gereçler:.....	25
3.6.1.1. Tez çalışmasında kullanılan gereçler	25
3.6.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri:	26
3.6.1.3. Kitler ve reaktifler:	26
3.6.2. Yöntemler:	26
3.6.2.1. Parafine gömülü arşiv bloklarından yapılan kesitlerde immnunohistokimyasal olarak, HER2 gen ürünü proteinlerinin doku ekspresyonunun araştırılması:	26
3.6.2.1.1. Genel ilke:	26
3.6.2.2. Parafine gömülü arşiv bloklarından kromojenik in situ hibridizasyon yöntemi ile HER2 amplifikasyonunun araştırılması:	29
3.6.2.3.Parafine gömülü arşiv bloklarından RNA ekstraksiyonu ve EZ-PZR Çalışması	32
3.6.2.4.Diğer Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	34
3.6.2.5. Trastuzumaba Direncin Tanımı	35
3.7. Araştırma planı ve Takvimi	38
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	39
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	39
3.10. Etik Kurul Onayı	40
 4. BULGULAR	
4.1. Çalışma Olgularının Bulgularına Genel Bakış	41
4.2. Trastuzumab Tedavisi Alan Olgulara ait Bulgular	49
4.3. İstatistiksel bulgular	53
4.3.1.Trastuzumab Tedavisi Alan Olgularda İstatistiksel Bulgular.....	53
4.3.2.Çalışma Olgularının Kinikopatolojik Özelliklerine ait İstatistiksel Bulgular.....	55
 5. TARTIŞMA	59
 6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
 7. KAYNAKLAR	74

8. EKLER

8.1. Laboratuvar Kullanım İzin Belgesi	81
8.2. Etik Kurul Belgesi	82
8.3. Tez Başlık Değişikliğine İlişkin Etik Kurul Belgesi	83
8.4. Özgeçmiş ve Yayın Listesi	84
8.5. Tez ve Tez ile İlişkili Yayımlanan Makaleler ve Bildiriler	93

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Çalışma Olgularının Özellikleri	45
Tablo 2: HER2 ve p95HER2 ekspresyon seviyeleri	49
Tablo 3: Trastuzumab direnci gösteren/göstermeyen olgularda p95HER2 Seviyesi	51
Tablo 4: Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgularda ölçümsel değerlendirmeler	52
Tablo 5: Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgularda biyolojik ve klinikopatolojik parametreler	53
Tablo 6: Trastuzumab direnci gösteren/göstermeyen olgularda HER2 ve p95HER2 sonuçlar	54
Tablo7: Trastuzumab direnci gösteren/göstermeyen olguların karşılaştırmalı görünümü	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: HER ailesi üyeleri ve ligand bağlayıcılarının şematik görünümü	12
Şekil 2: HER ailesinin onkojenik sinyalizasyon yollarının şematik görünümü	13
Şekil 3: HER2 ve HER3 heterodimerizasyonunun şematik görünümü	14
Şekil 4: Normal meme hücresinde HER2 reseptörü	15
Şekil 5: HER2 pozitif meme kanser hücresinde çok sayıda HER2 reseptörün varlığının şematik görünümü	16
Şekil 6: Trastuzumabın etki mekanizmasının şematik görünümü	17
Şekil 7: Trastuzumab ile intrasellüler sinyalizasyonun inhibisyonu, şematik görünüm	19
Şekil 8: A; 611-CTF ve B: 687-CTF	21
Şekil 9: Trastuzumab direnç mekanizmalarının şematik görünümü	23
Şekil 10: Metastatik durum ve postadjuvan durumda trastuzumab direnç kriterleri	36
Şekil 11: Trastuzumaba dirençte tümör biyolojisini tanımlayan şematize görünüm	37
Şekil 12: İnvaziv duktal karsinom (invaziv karsinom, nonspesifik tip) (H&Ex200)	41
Şekil 13: İnvaziv lobüler karsinom (H&Ex100)	42
Şekil 14: Müsinöz karsinom (H&Ex100)	42
Şekil 15: Lenf düğümünde karsinom metastazı (H&Ex100)	43
Şekil 16: Tümör hücrelerinde nükleer boyanma gösteren ER pozitifliği	44
Şekil 17: CerbB2 ile farklı boyanma skorları görülmekte (cerbB2x100)	46

Şekil 18: Çalışma olgularının İHK ile cerbB2 durumunun grafiksel görünümü	46
Şekil 19: Tümör hücrelerinde koyu kahverengi kümeler şeklinde sinyal veren HER gen kopyaları: HER2 gen amplifikasyonu pozitif (KİSH x400)	47
Şekil 20: Tümör hücrelerinde küçük, kahverengi noktasal sinyaller: HER2 gen amplifikasyonu negatif (KİSH x400)	48
Şekil 21: Çalışma olgularının KİSH yöntemi ile HER2 gen durumunun grafiksel görünümü	48
Şekil 22: Çalışma olgu sayısı, trastuzumab uygulanan olgu sayısı, trastuzumab karşılaştırması yapılan olgu sayısının şematik görünümü	50
Şekil 23: Trastuzumab tedavisi alan olgularda p95 durumuna göre hastalıksız sağkalım analizi	55

KISALTMALAR

WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
ER.....	Östrojen Reseptörü
PgR.....	Progesteron Reseptörü
HER2.....	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü -2
TNM	Tümör, Nod, Metastaz
EIO	Avrupa Onkoloji Enstitüsü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
İHK	İmmunohistokimya
İSH	İn Situ Hibridizasyon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ASCO	Amerikan Klinik Onkoloji Grubu
CAP	Amerikan Patoloji Grubu
CTF	Karboksi Terminal Fragmanları
IGF-1R	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
KİSH.....	Kromojenik İn Situ Hibridizasyon
EZ-PZR.....	Eş Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DKİS	Duktal Karsinoma İn Situ
FİSH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
AJCC	Amerikan Kanser Topluluk Komitesi
RF	Rölatif Floresan
V-ATPaz	Vakuolar H ⁺ ATPaz

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, çalışkanlığı ve iş disiplini ile hepimize örnek olan, yeri geldiğinde bizimle arkadaş olabilen sevgili danışmanım Prof.Dr. Safiye Aktaş'a;

Onkolojiyi her yönü ile değerlendirmemizi öğreten ve bize sevdiren başta Prof.Dr. Nur Olgun olmak üzere tüm Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyeleri'ne;

Doktora eğitimime başlamam konusunda beni teşvik eden bilgi, deneyim ve hoşgörü konusunda önemli dersler veren Doç.Dr. Hakan Postacı'ya;

Patolojiyi bana sevdiren, vakaları her yönü ile değerlendirmenin gerekliliğini öğreten, gönlümde hep bir hoca olan sevgili Dr. Ayşe Yağcı ve Dr. Elif Selek'e;

Tezimin şekilsel düzenlenmesinde, tüm şekillerin hazırlanmasında ve tüm bilgi işlem konusunda sonsuz destek veren dostum çok sevgili Kemal Kaya'ya;

Her zaman çocukları için her türlü fedakarlığı yapan ve hiçbir özveriden yılmayan, bana tüm hayatım boyunca destek olan, evde yokluğumu çocuklarıma aratmayan ve akademik başarımın asıl kahramanı sevgili annem Nalan Özkavruk'a;

Çocukluğumuzu birlikte geçirdiğimiz, her konuda büyük desteklerini her zaman hissettiğim ve beni her zaman iyi, güzel yeni bir şeylere doğru sürükleyen fedakar, iyi kalpli ablalarım Bircan'a ve Birben'e;

Benim başarılı olmam ve hep daha ilerilere ilerleyebilmem için her türlü desteği veren, yeri geldiğinde cesaretlendiren, zor dönemlerimde bana hep destek olan, iyi dostum, sevgili eşim Orhan Eliyatkin'a;

Her zaman gurur kaynağım olan ve bana yaşam sevinci veren, iyi kalpli, duygusal, akıllı çocuklarım birtanecik canım kızım Birsen'e ve birtanecik canım oğlum Batuhan'a;

Varlıkları ile bana mutluluk veren, doğumlarından itibaren hep birlikte büyüdüğümüz biricik yeğenlerim Buket'e, Efe'ye, Selin'e ve Halitcem'e;

Dostluklarını ve desteklerini her daim hissettiğim, çok sevdiğim, manevi destekçilerim, doğru insanlar çok sevgili Özlem'e ve İpek'e;

Büyüdüğümü, doktor olduğumu, güzel şeyleri başardığımı ve kendisine her şekilde çok benzediğimi en çok görmesini istediğim, bana doğruları, fedakarlığı, dürüstlüğü, yardımsever ve anlayışlı olmayı ilk öğreten, her zaman kalbimin en derinlerinde yaşayan ve yaşayacak olan babam Halit Zeki Özkavruk'a

Teşekkür ederim...

MEME KANSERİ ve TRASTUZUMAB TEDAVİSİNE DİRENÇTE p95'İN ROLÜ

Yard. Doç. Dr. Nuket Eliyatkin, Patoloji Uzmanı

Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, 09100,

Aydın-Türkiye, E-mail: drnuket2003@yahoo.com

ÖZET

Amaç: *HER2* onkogenini hedefleyen trastuzumab, *HER2* amplifikasyonu gösteren meme kanser hastalarında belirgin klinik yarar sağlar. Güçlü aktivitesine rağmen, *HER2* pozitif meme kanser hastalarının bazıları, trastuzumab direnci nedeniyle klinik yarar görmez. Trastuzumab direncinin moleküler mekanizmalarından birisi, p95HER2 (truncated *HER2*)'nin aşırı ekspresyonudur. Bu çalışmanın amacı, p95HER2 aşırı ekspresyonu gösteren meme kanserlerinin trastuzumaba direnç gösterip göstermediğini araştırmaktır.

Materyaller ve Yöntemler: p95HER2 ve *HER2* ekspresyon seviyesi, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptandı. *HER2* protein ekspresyonu ve *HER2* gen amplifikasyonu, immunohistokimya ve kromojenik in situ hibridizasyon ile belirlendi. Tüm değerlendirmeler, formalinde tespit edilmiş parafine gömülmüş 80 meme kanser dokusu arşiv materyalinden elde edilen örneklerde yapıldı. Tanı sırasında, hastaların hiçbirinde uzak metastaz yoktu. *HER2* pozitif meme kanser hastalarına, kemoterapi ile birlikte yada tek ajan trastuzumab tedavisi uygulandı.

Bulgular: Bu çalışma seksen meme kanser hastasından oluşmaktadır. Otuzdokuz olgu, *HER2* pozitif ve trastuzumab tedavisi aldı. Bu 39 hastanın 11'i (%28,2), trastuzumaba dirençli idi ve 28'i (%71,8) trastuzumaba dirençli değildi. Üç hasta takip sırasında eks oldu. Trastuzumab direnci gösteren 11 olguda, p95HER2 ortalama değeri $11,01 \pm 19,73$ (0,41-5,89) olarak bulundu. Trastuzumab direnci göstermeyen 28 olguda ise p95HER2 ortalama değeri $1,99 \pm 1,37$ (0,51-6,63) idi. p95HER2 oranı düşük ise, trastuzumab direnci yoktur şeklinde bir sonuç elde edilemedi ($p=0,210$ Mann-Whitney U testi). Ancak, p95HER2 oranının yüksek olduğu her durumda trastuzumab direnci vardı.

Sonuç: p95HER2'nin, trastuzumab direnci ile korele olduğu bulundu. Ancak, yalnızca p95HER2'nin değerlendirilmesinin, trastuzumab direncinin belirleyicisi

olmadığı saptandı. Bu sonuç, trastuzumab direncinin öngörülmesinde, p95HER2'nin duyarlı ancak özgün olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, HER2, trastuzumab, p95HER2, direnç

BREAST CANCER and THE ROLE of p95HER2 IN TRASTUZUMAB RESISTANCE

Nuket Eliyatkin, MD, Assistant Prof, Specialist of Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, 09100, Aydin-Turkey Phone: +90 506 417 3659, E-mail: drnuket2003@yahoo.com

ABSTRACT

Aim: Trastuzumab, the HER2 oncogene targeting drug, shows remarkable clinical efficacy in HER2-amplified breast cancer patients. In spite of robust activity, some of the patients with HER2-positive breast cancers do not get the benefit because of the resistance to trastuzumab. Overexpression of p95HER2 (truncated HER2) is one of the molecular mechanisms of trastuzumab resistance. We aimed to investigate whether p95HER2 overexpressing breast cancers were resistant to trastuzumab.

Materials and Methods: p95HER2 and HER2 expression was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. HER2 protein expression and *HER2 gene* amplification was also determined by immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. 80 formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tumor tissue archive materials were used to analyze all of the evaluations. According to clinical information of the cases, none of the cases had distant metastases in the initial diagnosis. HER2 positive cases underwent trastuzumab regimens with/without chemotherapy.

Results: This study included 80 breast cancer cases. 39 cases were HER2 positive and had trastuzumab treatment. 11 (28,2%) of these 39 cases were trastuzumab resistance and 28 (71,8%) of 39 cases did not show trastuzumab resistance. 3 cases were exitus. p95HER2 mean ratio was $11,01 \pm 19.73$ (0,41-5,89) on 11 cases which were trastuzumab resistant. p95HER2 mean ratio was $1,99 \pm 1.37$ (0,51-6,63) on 28 cases without trastuzumab resistance. If p95HER2 ratio was low, there was no trastuzumab resistance. However, for every statement on which p95HER2 ratio was high, there was trastuzumab resistance ($p=0,210$ Mann Whitney test).

Conclusion: p95HER2 was found to be correlated with trastuzumab

resistance, but it was not a determinant of trastuzumab resistance alone. We suggest that p95HER2 is sensitive but not specific for prediction of the trastuzumab resistance.

Key Words: Breast cancer, HER2, trastuzumab, p95HER2, resistance

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Meme kanseri, kadınlarda sık görülen ve kansere bağlı ölümlerde ön sıralarda yer alan bir kanserdir. Tüm kanser olgularının % 23'ünü ve kanser ölümlerinin % 14'ünü oluşturur (1). Yakın zamana kadar, meme kanserinin tedavisinde, yoğun cerrahi tedavi programları uygulanmaktaydı (2). Son yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü (WHO - *World Health Organization*) meme tümörleri sınıflamasında, meme kanserinin 20 major tip ve 18 minör subtip olmak üzere çok sayıda varyantı tanımlanmıştır (3). Ancak, bu tanımlanan varyantların biyolojik önemi tartışılmaktadır.

Günümüzde, meme kanserinin genetik, epigenetik ve transkriptomik değişiklikler nedeniyle çok farklı histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik bulguları farklı olan ve tedaviye cevapları farklılık gösteren, beraberinde multipl antiteleri içeren heterojen bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (3,4). Bu fenotipik farklılık, çok belirgin olarak meme kanserinin tanısını, tanıya göre uygulanacak tedaviyi ve bunun sonucunda da prognozunu etkilemektedir. Meme kanserinde, tümörün patolojik değerlendirilmesi ile yapılan histolojik derecelendirme semikantitatifdir. Ancak prognozu belirlemede güçlü bir öngörü sağlar (5,6). Histolojik derecelendirmenin, histolojik tip yanısıra östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PgR) ekspresyonu, *human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)* gen amplifikasyonu gibi moleküler değişikliklerle de belirgin şekilde birlikte olduğu bilinmektedir (7). Ayrıca tedaviye karar verme sürecinde, sağkalım ve metastatik hastalığın gelişim öngörüsünün başarısını yükseltmek amacıyla tümör, nod, metastaz (TNM) evreleme sistemi, Avrupa Onkoloji Enstitüsü (*European Institute Oncology-EIO*) uzmanları tarafından oluşturulan TNM_{EIO} sistemi, *Nottingham* Prognostik İndeks, *Adjuvant! Online* ve *St. Gallen* benzeri indeksler de yaygın olarak kullanılmaktadır (8-13).

Meme kanserinde "Moleküler Sınıflama" terminolojisi ilk tanımlandığından bu yana, meme kanserinin moleküler subtiplemesinin en doğru şekilde yapılabilmesi için çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (14-24). Tedaviye cevapların ve metastatik paternlerin de, moleküler subtype göre değiştiğinin gösterilmesi moleküler sınıflamanın değerini daha da artırmıştır (25,26). Bugün için, geçerli moleküler sınıflama ile meme kanserleri, lüminal A, lüminal B, HER2, bazal ve normal meme benzeri olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, invaziv

meme karsinomlarının yaklaşık olarak %15-20'sinde, HER2 gen amplifikasyonu yada bu genin protein ürününün aşırı ekspresyonu görülür (27). Meme karsinomunda HER2 pozitifliği; agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa sağkalım ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birlikte (28-31). Bu kötü prognozlu meme kanserinde, moleküler bir belirleyici olan HER2'nin yapısı, etki mekanizmaları ve kanserdeki rolü değişik çalışmalar ile araştırılmıştır (32-35).

HER2'ye karşı geliştirilen monoklonal antikor "Trastuzumab", HER pozitif meme kanser hastalarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (36-38). Trastuzumabın etki mekanizmaları değişik çalışmalarla ayrıntılı olarak tanımlanmış ve HER2 pozitif hastalarda güçlü etkinliği kanıtlanmıştır (39-42). Trastuzumabın güçlü etkinliğine rağmen, HER2 pozitif meme kanser hastalarının bir kısmında klinik etki sağlanamamaktadır (43). Bu nedenle farklı meme kanser klinik tablolarında, trastuzumab etkinliği ve direnç mekanizmaları araştırılmaya başlanmıştır (44-45).

Trastuzumab direnç mekanizmalarından biri trastuzumabın, HER2'ye bağlanmasında azalmaya neden olan p95 HER2 (truncated HER2)' dir (46). Meme kanser dokusunda, biyolojik olarak p95HER2 ekspresyonu varsa trastuzumab HER2 reseptörüne bağlanamayacağı için etki gösteremeyecektir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu projenin amacı, meme kanseri tedavisinde trastuzumaba dirençte p95HER2'nin rolünün araştırılmasıdır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmanın hipotezi, meme kanseri tedavisinde trastuzumaba dirençte p95HER2 ekspresyon seviyesi önemlidir ve prognozu olumsuz olarak etkiler.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadın sağlığını olumsuz olarak etkileyen önemli ve sık görülen, aynı zamanda kansere bağlı ölümlerde ön sırada yer alan bir kanserdir. Tüm kanser olgularının %23'ünü ve kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturur (1). Yıllarca Mısırlı hekimler tarafından ölümcül hastalık olarak kabul edilmiş ve yirminci yüzyıla girene kadar da yoğun cerrahi tedavi uygulanmıştır (2). Son yüzyılın başlangıcında, meme kanser hastasında, bir meme malignitesi olduğunun bilinmesi yeterliydi ve meme kanser hastalarının tümüne tek tip tedavi uygulanmaktaydı. Zamanla aynı tip kanser tanısı alan hastaların farklı prognoz gösterdiğinin gözlemlenmesi ve son elli yıldan uzun süredir her geçen gün artan şekilde, patologların farklı morfolojik varyantlar tanımlaması, meme kanser sınıflamasının tartışılır olmasına neden olmuştur. Bugün için bilinen ve son yayınlanan WHO tümör sınıflamasında, meme kanserinin yirmi major tip ve onsekiz minör subtip olmak üzere çok sayıda varyantı bulunmaktadır (3). Ancak bu tanımlanan varyantların biyolojik olarak önemli olup olmadığına dair bazı kuşklar dile getirilmiştir. Ayrıca, bu kadar çok sayıda varyant tanımlamanın patologların kendi tasarımlarının bir sonucu olabileceği de düşünülmüştür. Bununla birlikte patologlar, zaten uzun süredir, meme kanserinin tek bir hastalık olmadığını, tam tersine heterojen bir hastalık olduğunun altını çizmişlerdir. Günümüzde çok açık bir şekilde, meme kanserinin genetik, epigenetik ve transkriptomik değişiklikler nedeniyle çok farklı histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik bulguları farklı olan ve tedaviye cevapları farklılık gösteren, beraberinde multipl antiteleri içeren heterojen bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Bu fenotipik farklılık, çok belirgin olarak meme kanserinin tanısını, tanıya göre uygulanacak tedaviyi ve bunun sonucunda da prognozunu etkilemektedir. Tüm bu karmaşanın temelinde, belirleyici özel biyobelirteçlerin bulunmaması ve meme dokusunu oluşturan epitelin, hücrel gelişiminin tam olarak anlaşılmamış olması söz konusu gibi görünmektedir (4,5). Gen ekspresyon şekli benzeri moleküler tekniklerin ilerlemesi ile "meme kanserinde heterojenite kavramı" artık genel kabul görür hale gelmiştir. Böylece meme kanser sınıflamasında yeni bir sınıflandırma gelişmeye başlamıştır. Bu gelişim, cerrahlar ve onkologlar arasında, patologların standard histopatolojik analizi ile hazırladıkları raporların, hasta tedavisini düzenlemede bazı önemli verileri içermemesi ve bunun

sonucunda hasta tedavisinin uygun şekilde düzenlenmemiş olabileceği şeklinde bir endişeye neden olmuştur. Patologlar da geleneksel eski moda “morfolojik” sınıflamayı geliştirerek yeni dönem yeni sınıflama denen “Moleküler Sınıflama” ile tanışmaya başlamışlardır. Bu sınıflama ile birlikte meme kanserinde hedefe yönelik tedavi ve daha da önemlisi bireyselleştirilmiş tedavi programlarının uygulanması mümkün olmuştur.

2.1.1. Geleneksel, eski moda uygulama

İnvaziv meme kanseri, günümüzde özel olmayan tipte duktal karsinom yeni terminolojiye göre invaziv karsinom-nonspesifik tip ve özel subtipler olarak sınıflanmaktadır (3). Özel subtipler içinde yer alan meme kanserleri, spesifik tanımlamalara sahipken, özel olmayan tip ise, özel subtipler dışındaki karsinomları içeren bir çöp sepeti gibidir. Özel olmayan tipte invaziv duktal karsinomlar tüm meme kanserlerinin yaklaşık %60-75’ini kapsar. Özel subtipler ise %20-25’ini oluşturur ve lobüler, tübüler, papiller ve müsinöz tümörler bu grup içinde en yaygın tipleri temsil eder (3,4). Tek bir tümör içinde (intratümöral) veya genelde morfolojik olarak benzer görünümlü aynı tip tümörler arasında (intertümöral) heterojenite günümüzde bilinir ve kabul edilir hale gelmiştir. Bu nedenle patologlar da, klinisyenlerin, hastalarını daha iyi takip edebilecekleri yeni sistemler üretmeye çalışmışlardır. Patoloji raporunun mutlak gerekli bir komponenti olan “histolojik derece”; tümörde diferansiyasyon derecesi (tübül formasyonu), nükleer pleomorfizm/derece ve proliferasyonun (mitoz oranı) değerlendirilmesi ile belirlenir. Bu şekilde yapılan histolojik derecelendirme semikantitatifdir, ancak hasta prognozunu belirlemede oldukça güçlü bir öngörü sağlar (5,6). Ayrıca, histolojik derecelendirmenin, histolojik tip yanısıra ER ya da PgR reseptörü ekspresyonu ve HER2 gen amplifikasyonu gibi moleküler değişikliklerle de belirgin şekilde birlikte olduğu bilinmektedir (7).

Geleneksel yaklaşımda, tümör büyüklüğü ve yayılım paterni (özellikle lenf nodu tutulum durumu) gibi hastalığın evresini belirleyen güçlü birtakım parametreler vardır ve bunlar çok önemli prognostik faktörlerdir. Pierre Denoix tarafından tüm kanser tiplerine uygulanabilecek evreleme sisteminin prensipleri ve tanımlanan parametreleriyle TNM sistemi geliştirilip bir süre sonra da kabul edilip yaygın olarak kullanılmıştır (8,9). TNM sisteminin, tedavi merkezleri arasında ortak dil olarak kullanılması, tedavi planlamada yol gösterici olması, uygulanan tedavinin etkinliğinin

takip edilebilmesine olanak sağlaması ve hastaların prognozunu göstermesi nedeniyle tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, meme kanseri tanı ve tedavisi ile ilgili ilerlemeler, gelişen teknoloji ve bilgi artışı, tümör biyolojisinin daha detaylı değerlendirilme girişimleri, prognostik faktörlerin büyük bölümünün tümörün biyolojik özellikleri ile ilgili olduğuna dair yeni verilerin birikmesi ve en önemlisi TNM sisteminde aynı grupta yer alan, aynı histolojik tipteki tümörlerin sağkalım oranlarının birbirinden çok farklı olabilmesi nedeniyle alternatif çözüm arayışları başlamıştır.

EIO uzmanları tarafından, meme kanserinde tedavi kararını etkileyebilecek tümöre ait tüm biyobelirteçlerin ve hastaya ait kişisel özelliklerin de dahil edildiği bir sistem (TNM_{EIO}) önerilmiştir (10). Bu sistemde tümöre ait tüm anatomik ve ER, PgR, HER2 gibi tümöre ait bazı biyolojik özellikler yer almaktadır. Uygulanacak tedavi şeklinin belirlenmesinde, hastalıksız sağkalım ve tamsağkalım sürelerinin öngörüsünde belirleyici olarak St. Gallen, Nottingham Prognostik İndeks ve Adjuvant! Online gibi indeksler de yaygın olarak kullanılmaktadır (11-13). Histopatolojik değerlendirme, meme kanser hastasında klinik tedavinin şekillenmesinde çok etkilidir. Ancak, aynı histolojik subtiplere sahip hastalar arasında (tübüler karsinom gibi) ve aynı histolojik derece-aynı evre (lenf nodu negatif hastalık gibi) hastalar arasında hem tedaviye cevapta hem de uzun süreli sağkalım açısından önemli farklılıkların bulunması, ayrıca ER pozitif hastaların tamoksifen, HER2 amplifikasyonu gösteren hastaların trastuzumab tedavisinden gördükleri yarar, meme kanserinin heterojen bir hastalık grubu olduğu yolundaki görüşleri destekler ve böylece tümörün biyolojik özelliklerinin, tümör yönetimindeki önemini gösterir. Sınırlı klinik veriler, küçük klinik çalışma sonuçları ve tanımlanmış bazı algoritmaların çok sınırlı değerleri ile birlikte, yeni jenerasyon moleküler methodların, meme kanser sınıflamasında daha kusursuz, daha kesin bir sınıflamayı ve beraberinde hedefe yönelik ve belki de kişiye yönelik tedavi imkanları sağlayabilecek olması umut vericidir.

2.1.2. Yeni dönem, yeni başlangıç

Kanser dokusuna uygulanan her türlü moleküler analitik yöntem, kanserin prognostik ve prediktif faktörlerini belirlememize yardımcıdır. Bu yararlı moleküler analitik yöntemlerden mikroyarray temelli teknolojik uygulamalarla genomik ve ekspresyon profillemeye çalışmalarının gelişmesi ve kullanımı, meme kanserinde

morfolojiden çok tümör biyolojisi temelinde bir klasifikasyon sisteminin geliştirilmesine neden olmuştur.

Meme kanserinde “Moleküler Sınıflama” terminolojisi, ilk olarak ikibin yılında Perou ve Sorlie tarafından yapılan gen ekspresyon farklılıklarını gösteren kapsamlı bir çalışma ile önerilmiştir (14). Bu çalışma ile çok sayıda gen ekspresyonuna göre, meme kanserleri farklı alt gruplara ayrılmıştır: “Lüminal” (sıklıkla iki ya da üç subgruba ayrılan; ER, ER düzenleyici genlerin ve normalde lüminal epitelyal hücrelerden eksprese edilen genlerin ekspresyonunu yansıtan), “HER2 pozitif” (HER2 amplifikasyonu ve overekspresyonu gösteren), “bazal” (ER, PgR ve HER2 negatif olan ve memenin normal bazal/myoepitelial hücreleri tarafından eksprese edilen gen ekspresyonu gösteren). Normal benzeri subgrup da tanımlanmıştır, ancak bu sub grubun tanımlanmasının önemi ve beraberinde getireceği sonuçlar belirsizdir, çünkü bu grup, tümör hücre içeriği az, buna karşın normal doku komponenti fazla olan örnekleri temsil ediyor gibi görünmektedir. Meme kanserinin moleküler subtiplemesinin en doğru şekilde yapılabilmesi için değişik yöntemleri içeren çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (15-24). Bu yöntemlerin birbirine üstünlükleri günümüzde tartışılıyor olmasına rağmen, temelde lüminal A, lüminal B, HER2, bazal ve normal benzeri moleküler subgrupların farklı prognostik subgrupları temsil ediyor olması, önerilen sınıflama sisteminin hızlı bir şekilde klinik kullanımına neden olmuştur.

Moleküler sınıflama sisteminin, diagnostik bir araç olarak yaygın kullanımını ve geçerliliğini sağlamak için çok çaba gösterilmiştir. Bu konuda yapılan değişik hasta çalışma gruplarından ve farklı array platformlarından analiz edilen birçok farklı verilerin, klasifikasyon sistemi ile oldukça sıkı bir şekilde örtüştüğü de kanıtlanmıştır (15-18). Tedaviye cevapların ve metastatik paternlerin de, moleküler subtipine göre değiştiğinin gösterilmesi moleküler sınıflamanın değerini daha da artırmıştır (25,26). Sonuçta, bir meme kanser hastasının, tümörün moleküler subtipine göre sınıflanabileceği ve böylece uygun, spesifik, hedefe yönelik tedavi programlarına yönlendirilebileceği fikri çok cazip hale gelmiştir. Çünkü artık günümüzde tüm kanser tiplerinde, hastanın tümörüne özel hedefe yönelik, kişiselleştirilmiş tedavi programları arayışları önplandadır. Bu noktada tümörün histolojik derecesi, ER, PgR, HER2 durumu ve Ki67 proliferasyon indeksi gibi değerlendirmelerden elde edilen verilerin,

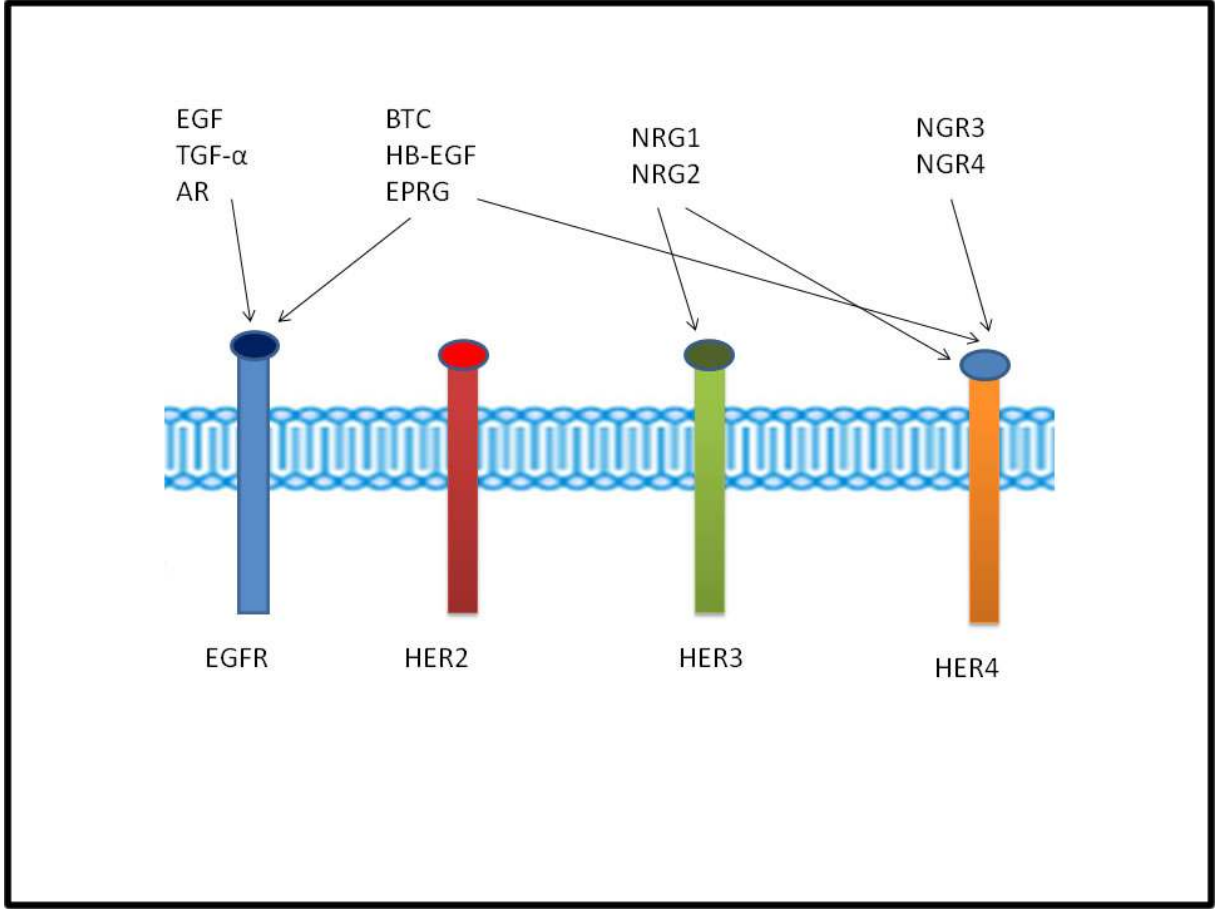
moleküler sınıflamanın getireceği uygun tedavi programlarını sağlayabileceği konusunda tartışmalar bulunmaktadır.

2.1.3. Moleküler subgrupların önemi

Bugün için, geçerli moleküler sınıflama ile meme kanserleri, ilk olarak lüminal A, lüminal B, HER2, bazal ve normal meme benzeri olmak üzere beş gruba ayrılır. Bu şekilde tanımlanan subgrupların daha ileri boyutta gruplanıp ayrımlaştırılması da mümkündür ve zorunlu gibi görünmektedir. Klinik davranışı, radyolojik ve patolojik özellikleri ile biyolojik potansiyeli farklı olan heterojen bir hastalık olan meme kanserinde moleküler subgruplar oluşturulduğunda bile aynı subgruptaki tümörlerin farklı biyolojik heterojenite özellikleri nedeniyle aynı subgrup içinde yeni bir alt gruplama yapılması gerekli olabilmektedir. Bu heterojenite, her bir meme kanseri olgusunun, bu geniş spektrum içindeki uygun ve doğru yerine, ayrı ayrı yerleştirilmesi ihtiyacını beraberinde getirir. Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik parametreler yanı sıra morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler, yani moleküler belirteçlerin bilinmesi ve değerlendirilmesi, ayrıca her hasta için gerekli bireysel tedavi planının oluşturularak kişiye özel tedavinin sağlanması ile mümkün olabilmektedir. Bu bağlamda, patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olarak bir biomarker olan HER2 durumu, aynı zamanda tedavi planlanmasını da yönlendirecek önemli verilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnvaziv meme karsinomlarının yaklaşık olarak %15-20'sinde, HER2 gen amplifikasyonu ya da bu genin protein ürününün aşırı ekspresyonu görülür (27). Meme karsinomunda HER2 pozitifliği; agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa sağkalım ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birliktedir (28-31).

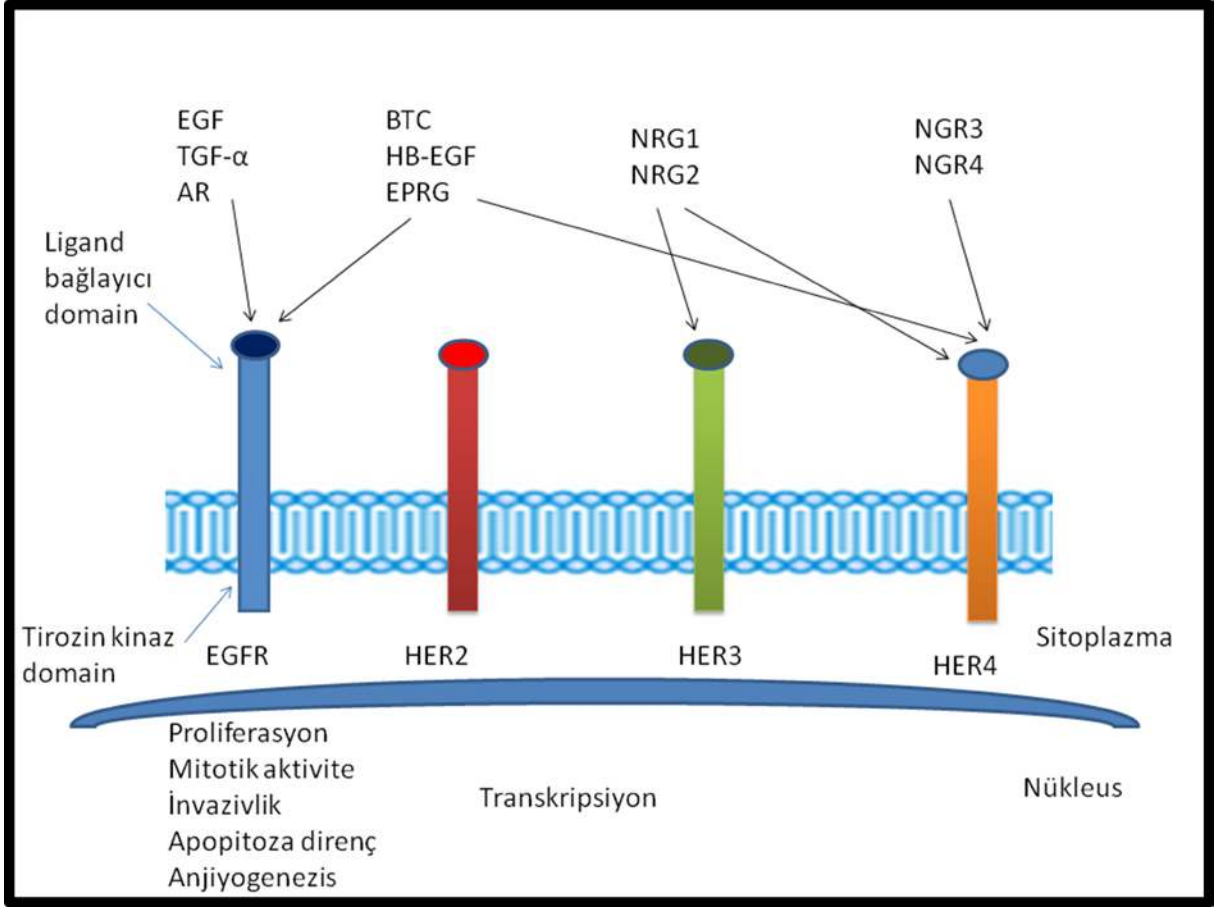
2.2. HER Ailesinin Patofizyolojisi

c-erbB-2 olarak da bilinen HER2 protoonkogeni, 17. kromozomda (17q21) lokalizedir. Bu gen, 185 kilodalton moleküler ağırlığa sahip ve 1255 amino asit içeren HER2 glikoproteinini kodlar. HER2, bir transmembran tirozin kinaz reseptörü olup HER ailesine aittir. HER ailesinin dört üyesi vardır; Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)/HER1, HER2, HER3 and HER4. HER2 hariç, HER ailesinin her bir üyesinin tanımlanmış ligandları vardır (Şekil 1).



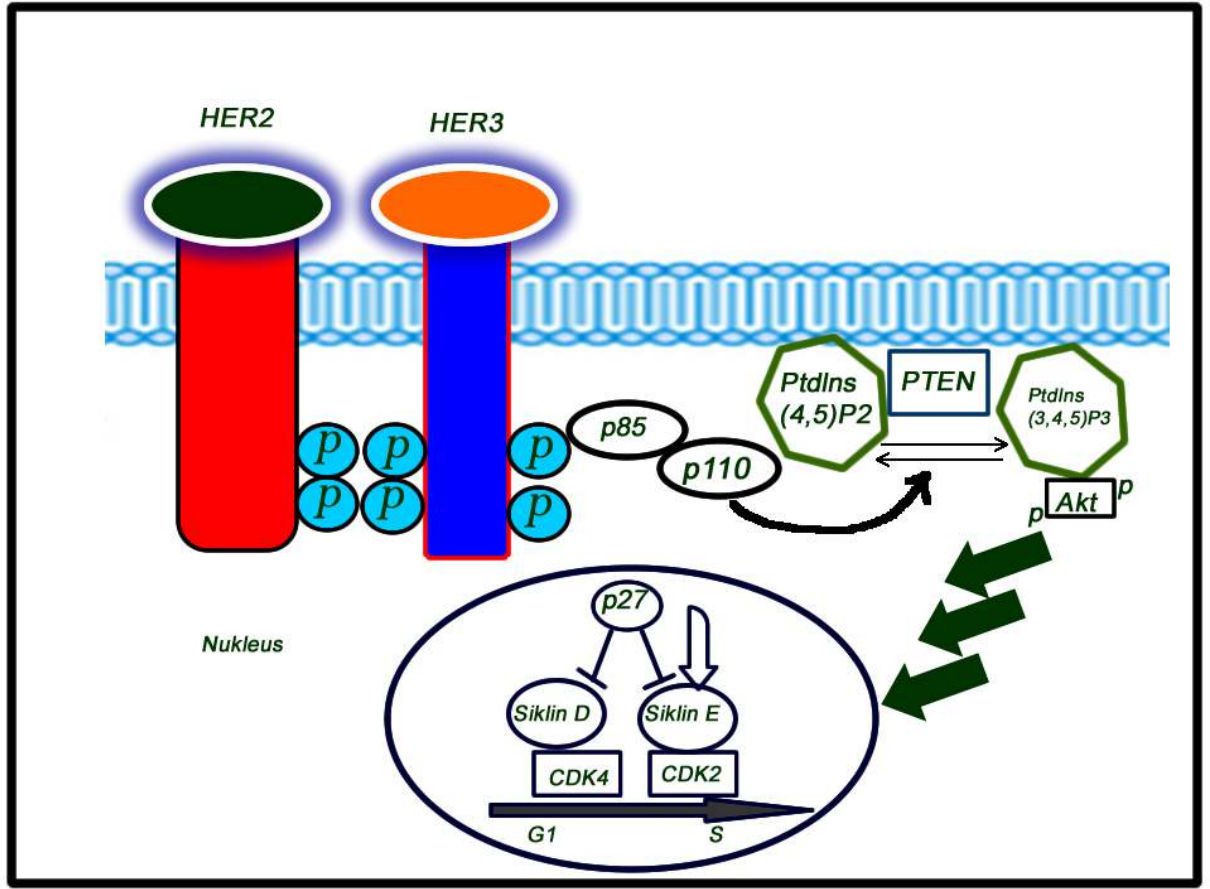
Şekil 1: HER ailesi üyeleri ve ligand bağlayıcılarının şematik görünümü. AR, ampiregulin; BTC, betasellulin; EGF, epidermal büyüme faktörü; EPRG, epiregulin; HB-EGF, heparin bağlayıcı EGF; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; NRG, nöregulin; TGF- α , transforme edici büyüme faktörü- α .

Ekstrasellüler bölümlere bağlanan ligand, reseptörde homodimerizasyona ya da heterodimerizasyona neden olan konformasyonel değişikliklere neden olur ve reseptör tirozin kinaz olarak etki gösterir. Daha sonra her bir dimer, PI3K/Akt, Ras/Raf/EK/ERK, ve STAT gibi çeşitli hücre içi sinyalizasyon yollarını tetikleyebilir. Bu gibi yolların tümü, proliferasyon, sağkalım, motilite ve angiogenezis gibi hücrel onkojenik süreçlerde önemli rol oynar (Şekil 2).



Şekil 2: HER ailesinin onkojenik sinyalizasyon yollarının şematik görünümü.

HER2'nin tanımlanmış bir ligandı olmadığı için, fizyolojik durumlarda diğer HER ailesi üyeleri ile dimerizasyon yapmak zorundadır. Ancak, HER2 aşırı ekspresyon durumunda, HER2 sürekli aktive olabilir (32). HER2, teorik olarak HER1, HER2, HER3 veya HER4 olarak dört farklı tipte dimerle dimerizasyon oluşturabilir, ancak HER2/HER3 heterodimerinin en mitojenik ve transforme edici özellikte olduğu söylenmektedir (33,34). HER3'ü, diğer HER aile üyelerinden ayıran iki önemli özelliği vardır: HER3'ün tirozin kinaz aktivitesi yoktur. Class I PI3K 'ın düzenleyici üniği olan p85 için en az 6 adet birbiriyle ilişkili domaini vardır (Şekil 3).

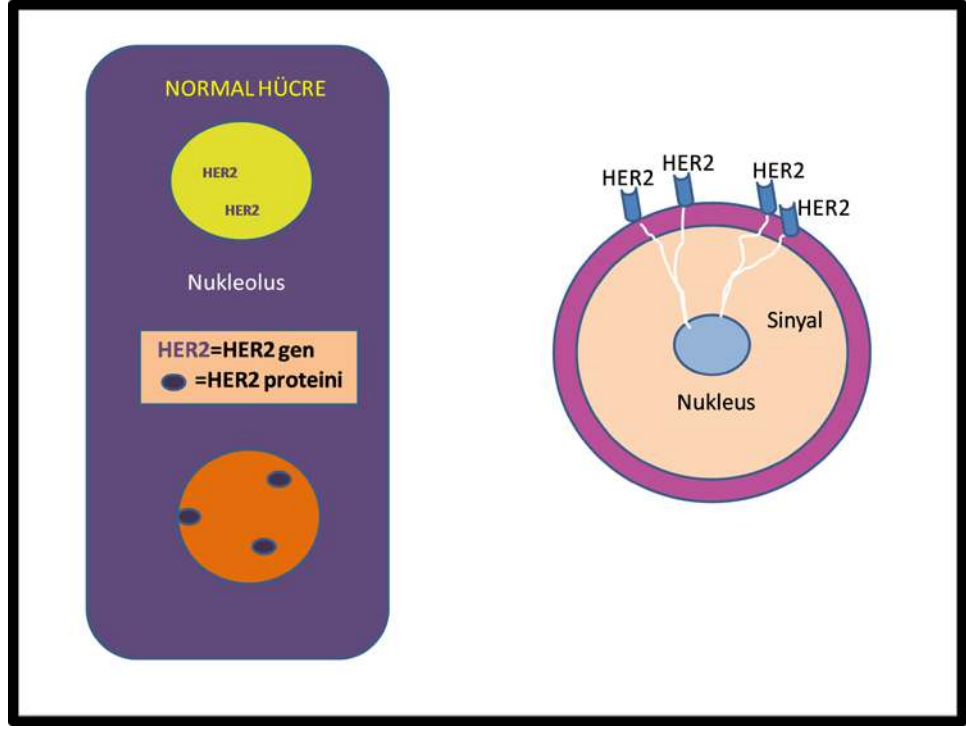


Şekil 3: HER2 ve HER3 heterodimerizasyonunun şematik görünümü.

Bu gibi özelliklerin, HER3'ün PI3K yolağını daha etkin olarak tetiklemesini sağladığı düşünülmektedir. Bu durum hem HER2 hem de HER3 eksprese eden meme kanser hücre hattının, daha yüksek bir Akt fosforilasyon derecesine sahip olduğunu gösteren bir çalışma ile de desteklenmiştir (35).

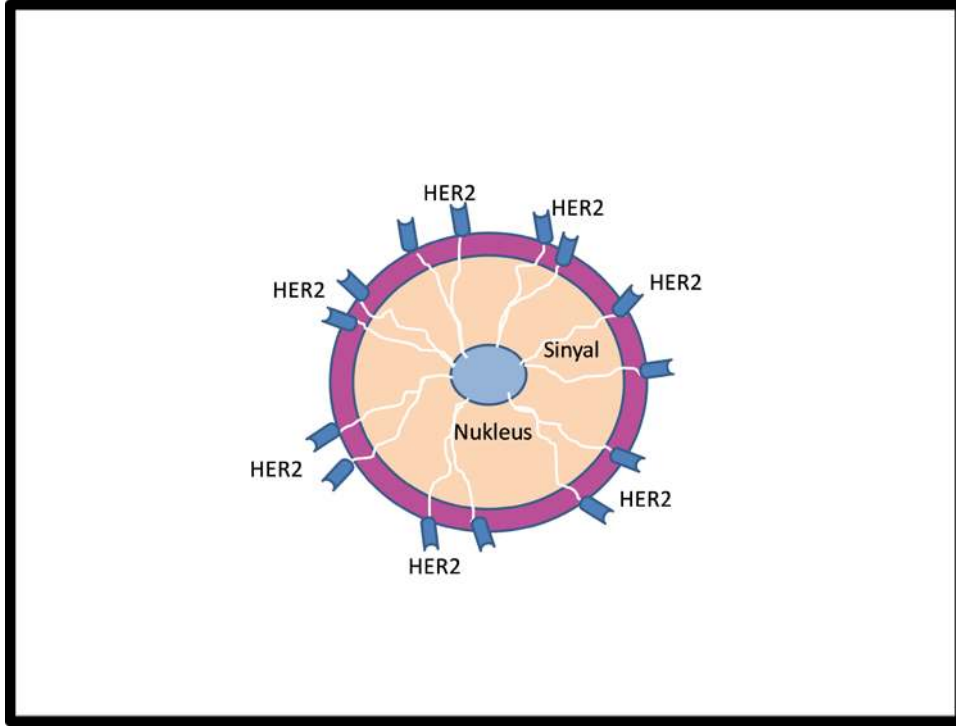
2.3. Meme Kanser Patogeneğinde HER2

Normal meme epitel hücreleri, HER2 geninin iki kopyasını içerir ve hücre yüzeyindeki HER2 reseptörünü düşük seviyelerde eksprese eder (Şekil 4). Ancak bazı kişilerde, hücredeki gen kopyalarının sayısı, onkojenik değişim nedeniyle artmaktadır. Bu durumda genin amplifikasyonu, HER2 proteinin artmış membran ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle de HER2 protein aşırı ekspresyonunun temel mekanizmasının, gen amplifikasyonu olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 4: Normal meme hücresinde HER2 reseptörü.

HER2 proteininin artmış membran ekspresyonu, dimerizasyonu artırarak HER2 tirozin kinazı aktive eder. Bu aktivasyon sinyali, hücre nükleusuna iletilir. Onkojenik transformasyona uğrayan hücrede, proliferasyon, sağkalım ve motiliteye neden olur (Şekil 5).



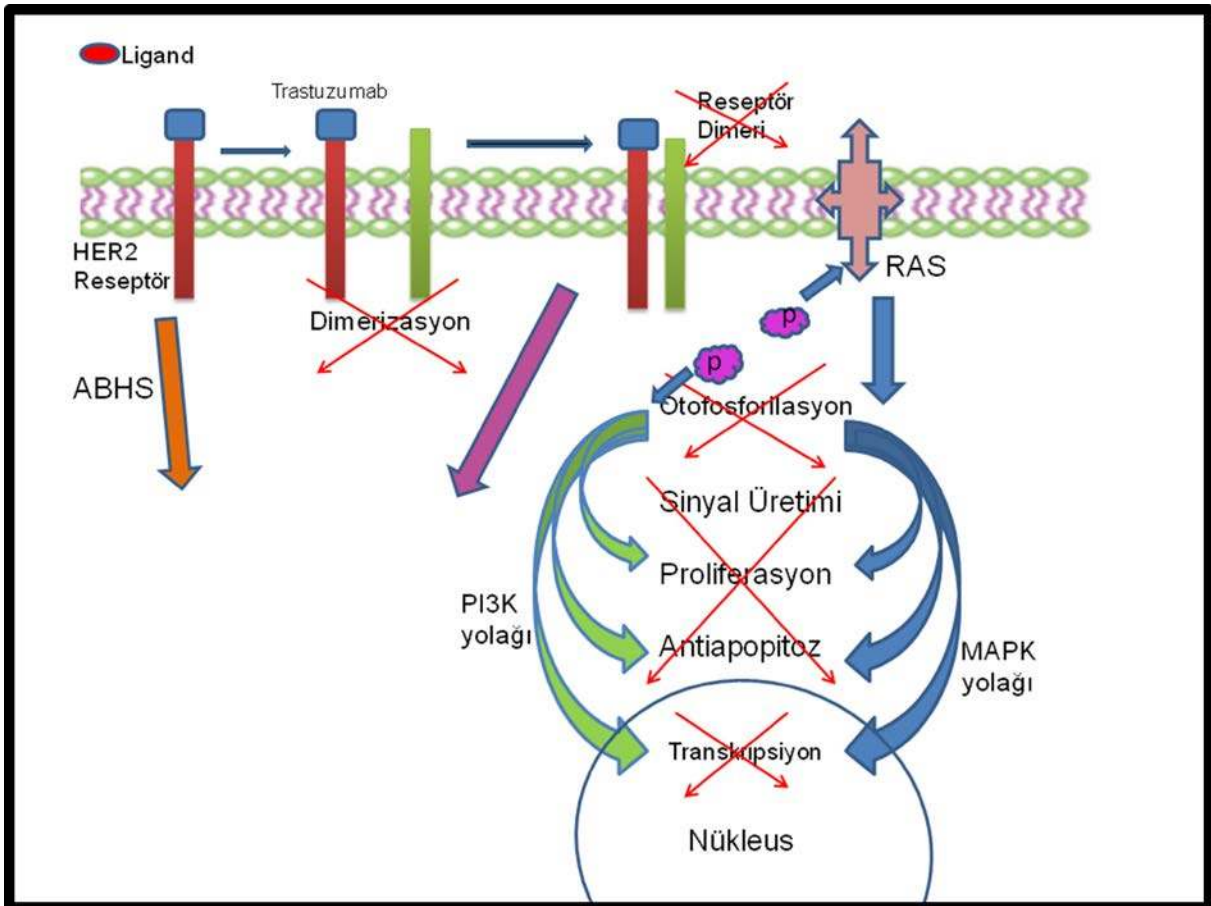
Şekil 5: HER2 pozitif meme kanser hücresinde çok sayıda HER2 reseptörün varlığının şematik görünümü.

İnvaziv meme karsinomlarının yaklaşık olarak %15-20'sinde, HER2 gen amplifikasyonu yada bu genin protein ürününün aşırı ekspresyonu görüldüğü için bu hastalarda hedefe yönelik tedavi programına başlayabilmek için, pozitif HER2 durumunun doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle de tümörde gen amplifikasyonunu ve/veya aşırı ekspresyonunu saptamada basit, doğru, yaygın olarak kullanılan, klinik olarak uygulanabilir, aynı zamanda tekrarlanabilir ve düşük maliyetli methodların kullanılması hem klinisyen hem de patolog açısından oldukça önemlidir. Ancak, meme kanser hastalarında tümörün HER2 durumunun hangi yöntemle tespit edilmesi gerektiği uzun yıllar tartışmalı bir konu olmuştur (27). HER2 durumu; onkoprotein miktarı, gen amplifikasyon miktarı veya m-RNA düzeyinin, immünohistokimya (İHK), elisa, in situ hibridizasyon (İSH) yöntemleri veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile değerlendirilmesi ile belirlenebilir. Literatürde üstünde net olarak görüş birliğine varılmış en uygun bir yöntem bulunmamaktadır. Her yeni çıkan uygulamanın diğerlerine üstünlükleri ve kısıtlılıkları söz konusudur, değişik çalışmaların sonuçlarının birikmesi ve değerlendirilmesi daha sağlıklı veriler elde edilmesini sağlayacaktır.

Son güncel bilgi olarak Amerikan Klinik Onkoloji Grubu (ASCO-The American Society of Clinical Oncology) ve Amerikan Patoloji Grubu (CAP- The College of American Pathologists) (ASCO/CAP) 2013 kılavuzu, meme kanserinde HER2 durumunun, İHK ve tek ya da dual problu İSH yöntemleri ile değerlendirilmesini önermektedir (27).

2.4. HER-2 Pozitif Meme Kanserinde Trastuzumabın Yeri ve Önemi

Meme karsinomlarının bir kısmında, normal meme dokusuna göre HER2 ekspresyon seviyelerinin artması ve HER2 pozitif tümörlerin progresyonunda etkin bir faktör olması nedeniyle, HER2 spesifik tedavi edici yaklaşımlar için ideal bir hedef haline gelmiştir. “Trastuzumab” 1998 yılında, HER2 proteininin ekstrasellüler domaine karşı geliştirilmiş rekombinant monoklonal bir antikordur (Şekil 6).



Şekil 6: Trastuzumabın etki mekanizmasının şematik görünümü.

ABHS: Antikor bağımlı sitotoksitesite.

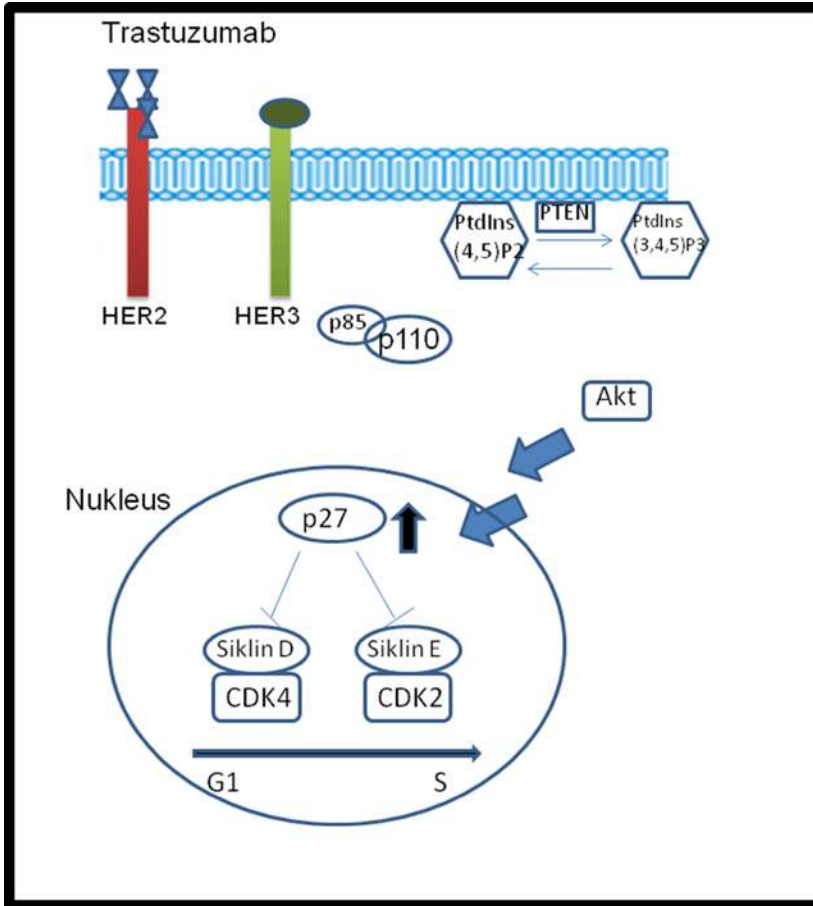
HER2 pozitif ileri evre metastatik meme kanser hastalarında klinik tedavi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA-“The Food and Drug Administration”) onayı

alan ilk monoklonal antikor olması ile de ayrı bir öneme sahiptir (36). 2006 yılından bu yana, trastuzumab erken meme kanser hastalarının hem adjuvan hem de neoadjuvan tedavisinde de uygulanmaktadır (37-38). Uzun süredir, bu ajanın potansiyel tedavi edici etkisi yoğun olarak araştırılmıştır. Özellikle de trastuzumabın, konvansiyonel kemoterapi ile kombinasyonunun, HER2 eksprese eden metastatik kanserlerin tedavisinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir.

2.5. Trastuzumabın Etki Mekanizmaları

Trastuzumab, bugün için bilinen temelde iki farklı etki mekanizmasına sahiptir:

1-Intrasellüler sinyalizasyonun inhibisyonu (sinyal transdüksiyon yolları ve hücre siklus progresyonunun inhibisyonu); HER2'nin birçok sinyalizasyon yollarını tetiklediği bilinmektedir. Böylece teorik olarak HER2 inhibisyonu, bu gibi sinyalizasyon yollarının inaktivasyonuna neden olmalıdır. Trastuzumabın, HER2 aktivitesini inhibe etme şekli tam olarak anlaşılmamıştır. Bazı çalışmalar bu ilacın, HER2'nin internalizasyonunu ve degradasyonunu düzenleyebileceğini göstermişlerdir (39,40). Daha yeni çalışmalarda, HER2'yi aşırıeksprese eden hücrelerdeki hücre proliferasyonunda, HER2/HER3/PI3K kompleks yapısının ve bu yapının etkisiyle PI3K/Akt sinyalizasyon yolağının temel rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece bu kompleks yapının dağılmasının, trastuzumabın temel moleküler etki mekanizması olabileceği düşünülmüştür (41). Trastuzumab uygulandığında, hücre siklusu G1/S geçişinde durur. Bu durum, sıklıkla p27 seviyesinde artış ve siklinD1 ve siklin-dependent kinaz 2 aktivitesinde azalma ile birliktedir (Şekil 7).



Şekil 7: Trastuzumab ile intrasellüler sinyalizasyonun inhibisyonu, şematik görünüm.

2-İmmun sistem ilişkili antitümör cevabın uyarılması: İn vivo çalışmalardan elde edilen veriler, trastuzumabın antikör bağımlı hücrel sitotoksite ve kompleman-bağımlı sitotoksite gibi immün cevapların indüksiyonuna aracılık edebilme yeteneğini göstermiştir (42).

- Antikör bağımlı hücrel sitotoksisite (=ABHS): Fcγ reseptörü eksprese eden immün efektör hücreler, IgG1 antikörünün (trastuzumabın) Fc domainini tanır ve bağlanır, antikora tutunmuş hücrede (HER2 pozitif hedef hücre) lizis meydana gelir. Preklinik (Fcγ reseptörü olmayan farelerde etki yok) ve az sayıda in vivo çalışma (tedavi öncesi ve sonrası tümörde lenfoid hücre infiltrasyonu) ile de desteklenmiştir (37).

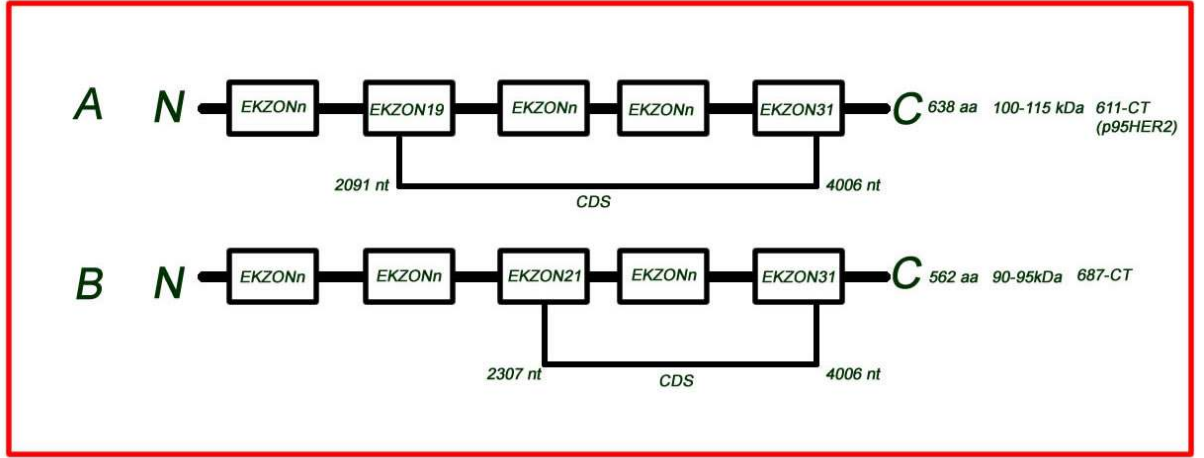
- Kompleman-bağımlı sitotoksisite

2.5.1. Trastuzumaba Direnç Mekanizmaları ve p95HER2

HER2'yi aşırıeksprese eden metastatik meme kanserinin tedavisinde, trastuzumab ve konvansiyonel kemoterapi kombinasyonunun, tek ajan kemoterapi kullanımına göre, belirgin olarak etkin olduğu gösterilmiştir (31). Bu nedenle, trastuzumab, HER2'yi aşırıeksprese eden opere edilebilir meme kanserlerinde adjuvan veya neoadjuvan olarak kullanıma girmiştir (36-38). Objektif klinik verilere rağmen, anti-HER2 ajanları, HER2 pozitif meme kanser hastalarının yaklaşık yarısında klinik yarar sağlamakta olup bir kısım hastada etkili olmamaktadır (43). Bu nedenle farklı meme kanser klinik tablolarında, trastuzumab etkinliğinin ve rezistansının mekanizmaları araştırılmıştır (44-45). Günümüzde bilinen ve değişik çalışmalarla doğrulanan rezistans mekanizmaları aşağıdaki gibi sıralabilir:

1-Trastuzumabın, HER2'ye bağlanmasında azalma (ekstrasellüler domain-truncated HER2-p95 HER2' nin ekspresyonu yada MUC4'ün aşırıekspresyonu ile):

-Truncated HER2 (p95 HER2): HER2-pozitif hastaların bir kısmında HER2'nin karboksi terminal fragmanları (CTF- C-terminal fragment) eksprese edilir (46). CTF birbirinden farklı iki mekanizmayla meydana gelir: proteolitik dökülme ve alternatif translasyon. Metalloproteazlar, HER2'nin ekstrasellüler domaininin, transmembran domainin proksimal bölümünden ayrılmasına neden olur (proteolitik dökülme). Bu şekilde alanin 648'den başlayan ve 95-100 kilodalton ağırlığında bir fragman oluşur. Bu fragman p95HER2 olarak bilinir (45). Alternatif translasyon, 611. ve 687. pozisyonundaki iki internal başlangıç aminoasidi metioninden başlayarak HER2'yi kodlayan mRNA'nın alternative şekilde kodlama yapmasıdır (tam uzunlukta moleküler göre 611 ve 687 kodonları ile isimlendirilen) (Şekil 8 A ve B).



Şekil 8: A; 611-CTF ve B: 687-CTF.

Bu iki fragman, bir transmembran domaini ve sisteinden zengin kısa bir ekstrasellüler domain içeren 76 aminoasidlik bir zincir açısından farklılık gösterirler (47). 611-CTF fragmanı, bir sinyal peptidi içermemesine rağmen, sekretuar yollara etkin şekilde dahildir. Bu fragman, sinyalin plazma membranına taşınmasına yardımcıdır. Buna karşılık, 687-CTF, hem sitoplazmada hem de nükleusta bulunabilir. Ancak, solubl intrasellüler 687-CTF fragmanı intakt bir kinaz domainine sahip olmasına rağmen inaktiftir. Transmembran domaini içeren 648- ve 611-CTF ları ise çok sayıda intrasellüler sinyal transdüksiyon yollarını aktive edebilir (48). İlginç şekilde bu gibi yolların aktivasyon seviyesi bu iki HER2 CTF (648- ve 611-CTF) arasında da belirgin farklılık gösterir. 611-CTF, disülfid bağlarının korunmasını sağlayarak sürekli olarak homodimerler oluşturduğu için, mitozu aktive eden protein kinazı ve Akt yollarını, 648-CTF ye göre daha fazla aktive eder. Buna karşın 648-CTF homodimerler oluşturmaz ve aktivitesi tam uzunluktaki HER2 benzerdir. Bunun sonucu olarak, 611-CTF spesifik bir gen setinin düzenlenmesine neden olur. Bu gen setinde yer alan genlerin bazıları (MMP1, ANGPTL4, MET, CD44, PLAUR, EPHA2, ITGA2, ITGFB, TGFA, and IL-11 gibi) metastatik progresyonda etkin olan genlerdir ve kötü prognozlu HER2 pozitif meme kanser hastalarının bir kısmının, p95HER2 olarak bilinen HER2 CTF'nın heterojen bir grubunu eksprese ettiği bildirilmiştir (48). Böylece p95HER2 pozitif tümörlerin progresyonunda, muhtemelen 611-CTF gen durumunun etkili olduğu ve trastuzumab

kullanımının bu gibi hastalarda hedefe yönelik tedaviyi sağlayamacağı sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle meme kanserinde, HER2 pozitif meme kanser hastalarının tedavi planlanmasında, trastuzumab tedavisine başlamadan önce ya da HER2 ile birlikte p95HER2 değerlendirilmesi yararlı olabilir. Ancak bu konuda yeni yapılacak prospektif klinik çalışmalar, bu belirtecin gerçek rolünü ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır.

-MUC4'ün aşırı ekspresyonu: Membran ilişkili bir müsin olan MUC4'ün, HER2 gen amplifikasyonu ve trastuzumaba primer direnç gösteren tümörlerde, HER2'nin ekstra-sellüler domainine antikorların bağlanmasını azalttığı gösterilmiştir (49) (Şekil 9).

2-Alternatif sinyalizasyon (insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1R), diğer epidermal büyüme faktör reseptör ailesi üyeleri veya MET'den kaynaklı) (45):

-IGF-1R'den alternatif sinyalizasyon:

*IGF-1R; PI3K yolağının major tetikleyicisi olarak karakterize bir reseptör tirozin kinazdır. Hem HER2 hem de IGF-1R aşırı ekspresyona eden hücreler trastuzumaba dirençlidir.

* IGF-1 sinyalizasyonu, p27 için bir ubiquitin ligazı olan SKP2'nin seviyesini artırır. Böylece p27 seviyesi azalır. Trastuzumab varlığına rağmen hücre siklusu G1/S fazında durmaz.

-EGFR aile üyelerinden alternatif sinyalizasyon: EGFR için bir ligand olan transforming growth factor- α (TGF- α), trastuzumaba dirençli olgularda artmış ekspresyon göstermektedir.

-MET'den alternatif sinyalizasyon: MET (RTK) ve ligandı HGF trastuzumaba dirençli hastalarda, dirençli olmayanlara göre daha yüksek seviyelerdedir.

3-Sinyalizasyonda aberrant aktivasyon (45):

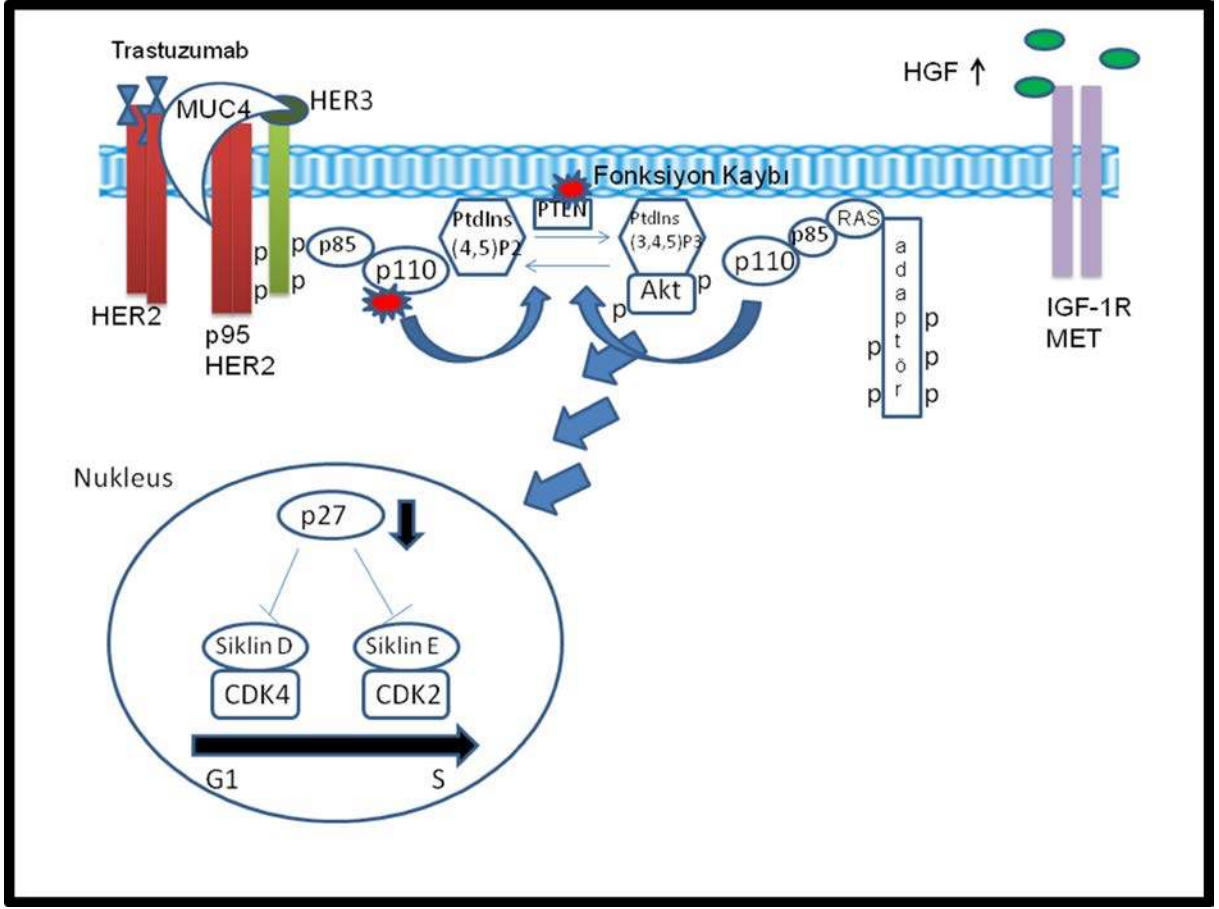
-PTEN fonksiyon kaybı:

PTEN, PIP3'ü PIP2'ye çeviren bir fosfotazdır ve fizyolojik durumlarda Class I PI3K'nin negatif düzenleyici olarak görev yapar. Düşük PTEN protein ekspresyon seviyeleri trastuzumaba karşı azalmış cevap ile ilişkilidir.

-PIK3CA-aktivasyon mutasyonu

-p27'nin downregülasyonu:

4-FCGR3A polimorfizmleri (45):



Şekil 9: Trastuzumab direnç mekanizmalarının şematik görünümü.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma tanımlayıcı bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Güneş Patoloji Laboratuvarında 2008-2012 yılları arasında meme kanser tanısı alan hastaların biopsi materyalleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Olguların tedavi sonrası izlemleri için ilgili klinik doktorundan bilgi alınmıştır. İHK ve kromojenik İSH (KİSH) ile HER2 durumunun değerlendirilmesi, ve HER2 ve p95HER2 mRNA protein ekspresyon seviyelerinin eş zamanlı-PZR (EZ-PZR) ile değerlendirilmesi, tüm tekrar testler ve verilerin analizi 01.04.2012-01.05.2015 arasında DEÜTF Onkoloji Enstitüsü Araştırma Laboratuvarı'nda uygulanmıştır (Ek 1).

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi:

Araştırmanın evrenini Güneş Patoloji Laboratuvarı'nda, tanı konan 80 hasta oluşturmaktadır. Örneklemi ise olguların meme biopsi materyallerinden Güneş Patoloji Laboratuvarı'nda hazırlanan parafin bloklar oluşturmaktadır.

3.4. Çalışma Materyali:

Güneş Patoloji Laboratuvarı'na ait kayıtlarda meme kanser hastaları kaydedildi. Hastalara ait tüm preparatlar, preparat arşivinden çıkarılarak dikkatlice incelendi. Çalışmaya dahil edilecek hastalar belirlendi. Hastaların demografik bilgileri laboratuvar elektronik arşivinden ve klinik doktorlarından elde edildi. Işık mikroskopik değerlendirmeye saptanan tüm histopatolojik parametreler kaydedildi. Nekroz alanları içermeyen canlı demonstratif tümör dokusu bulunduran bloklar ayrıldı. Bu bloklardan polizimli lamlara 5 mikrometre kalınlıkta kesitler hazırlandı. İHK'sal ve KİSH boyamaları yapıncaya dek oda ısısında saklandı. Ayrıca EZ-PZR metodu ile parafin doku bloklarındaki tümör dokusunda çalışılması planlan HER2 ve p95HER2 için her hastadan örnek doku alındı ve oda ısısında saklandı.

Bu çalışmanın amacı trastuzumab direncinde p95HER2'nin rolü olduğu için, trastuzumab alan hastaların klinik bilgilerine eksiksiz şekilde ulaşılması gerekliydi. Bu nedenle hastaların izlemleri klinik doktorundan tamamlanmaya çalışıldı. Trastuzumab başlama ve bitiş tarihleri kaydedildi. Lokal nüks ya da metastaz tarihleri de kaydedildi. Klinik doktorundan, hastaların son izlem tarihleri ve son durumları kaydedildi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Bu çalışmadaki bağımsız değişkenler tümörde p95HER2 ekspresyon seviyesi, HER2 ekspresyon seviyesi, hastanın yaşı, tümör boyutu, tümörün histolojik tipi, tümörün histolojik derecesi, duktal karsinom in situ varlığı (DKİS), tümörde ER ve PgR hormon reseptör durumu, p53 mutasyonu, Ki67 proliferasyon indeksi, cerbB2 protein ekspresyonu, vasküler ve lenfatik invazyon, nodal tutulum, perinodal invazyon, klinik evre, lokal nüks, metastaz, hastalıksız sağkalım süresi, tam sağkalım süresi gibi özelliklerden oluşmuştur. Çalışmadaki primer amaç trastuzumab direncinde p95'in rolü olduğu için tanımlanan kriterlere direnç gösteren ve göstermeyen gruplar oluşturuldu.

3.6. Veri Toplama Araçları:

3.6.1. Araç ve Gereçler:

3.6.1.1. Tez çalışmasında kullanılan gereçler:

-Mikrotom.....	Leica RM2125RT
-Polilizinli lam.....	Isolab
-Sınırlayıcı kalem.....	Dakopen
-Lamel 22x22mm.....	Isolab
-PCR.....	GeneAmp (9700)
-RT-PCR.....	Roche Light Cycler 15
-RT-PCR.....	Roche Light Cycler 480II
-Tartı.....	Denver
-Mikroskop.....	Nikon E400
-Vorteks.....	Biovortex V1
-Mikrodalga fırın.....	Arçelik MD551
-Santrifüj cihazı.....	Centrifuge S424
-Etüv.....	Nüve FN500
-Tartı.....	Shimadzu AY120
-pH metre.....	NEL elektronik pH890
-Otomatik pipet (0,5-10 mikrolitre).....	DiaMed-ID pipette FP5
-Otomatik pipet (20-200mikrolitre).....	ISOLAB
-Otomatik pipet (1000 mikrolitre).....	ISOLAB
- Buzdolabı (+4 ve -20 derece).....	Arçelik 450 lüks

- Eppendorf.....minispin
- Polilizinli lam.....ISOLAB
- Plastik pipet ucu sarı, beyaz ve mavi.....Barrier100
- Sınırlayıcı kalem.....DAKOpen
- Lamel 22x22mm.....Isolab

3.6.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri:

- Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) 150mM NaCl + 10nM Na-Fosfat, pH:7,4
- TRİS: 11,1 gr+ 940 ml bidistile H₂O + 7 ml HCL, pH:7,2
- %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu
- Sitrat tampon çözeltisi, pH:6,0
- Proteinaz K stok çözeltisi
- Tamponlu %4'lük paraformaldehid

3.6.1.3. Kitler ve reaktifler:

- %96 Etil alkol
- Ksilol
- Lam kapatıcısı (mounting medium, Surgipath MicroMounth)
- PBS tampon solüsyonu, hazır toz karışım formunda (Scy Tek)
- Proteinaz K (Sigma P2308)
- İmmünohistokimyasal değerlendirme için üniversal kit, LSAB, Thermo
- Anti-HER2 (klon:21564, Bioss Antibodies, Boston, USA)
- İnvitrogen SP0T-Light® HER2 CISH Kiti,
- DAB kromojen, Thermo
- DNA ekstraksiyon kiti, QIAamp DNA FFPE Tissue

3.6.2. Yöntemler:

3.6.2.1. Parafine gömülü arşiv bloklarından yapılan kesitlerde immünohistokimyasal olarak, HER2 gen ürünü proteinlerinin doku ekspresyonunun araştırılması:

3.6.2.1.1. Genel ilke:

İmmünohistokimyasal testler; hücre veya doku antijenlerinin, uygulanan antikor ile tepkimeye girme esasına dayalı testlerden biridir. Bu test ile hücre veya dokuda bulunan antijenler, bu gibi antijenlere yönelik olarak geliştirilmiş ve farklı ara elemanlarla etiketlenmiş antikorlarla karşılaştırılır. Böylece hücre ya da dokuda

varolan antijen, antikor ile reaksiyona girer ve mikroskopik değerlendirmede görünür hale gelir. Bu gibi testlerde kullanılmak üzere geliştirilen antikorlar genellikle deney hayvanlarında üretilir ve genellikle de IgG tipinde monoklonal antikorlardır. Daha sonra başka bir deney hayvanında, bu antijene karşı geliştirilmiş olan antikorlara karşı, yine bir deney hayvanında sekonder antikorlar yaptırılır. Bu gibi sekonder antikorlar bir enzimle işaretlenir. Bu enzim de mikroskopik değerlendirmede görünür hale getirmeyi sağlayan kromojeni aktive eder. Avidin-biotin kompleks (ABC) sistemi ise indirekt olarak tanımlanan bir testtir. Bu testte sekonder antikor enzimle işaretlenmez. ABC yöntemi ile uygulama, yumurta akında bulunan avidin adlı bir glikoproteininin biyotin olarak bilinen vitaminle arasındaki affiniteye göre geliştirilmiştir. Avidin glikoproteinine benzer bir molekül olan streptavidin, *Streptomyces avidinii* adlı bir bakteriden elde edilir. Streptavidin, nötral yapıda bir molekül olduğu için ve karbonhidrat komponenti taşımadığı için bu molekülün kullanımında nispeten boya artefaktı daha az olarak görülür. Biotinin, değişik enzim ve antikorlar ile bağ kurması daha kolaydır. Primer antikorla avidin-biotin kompleksi arasındaki ilişkinin sağlanması sekonder antikorlar sağlar aracılığı ile olur. Bu mekanizma tüm enzim kompleksi testlerindeki gibidir. Dokuda antijen mevcut değilse, antikor bağlanacak antikor bulamaz ve yıkamalar esnasında antikorla bağlanmayan tüm antijenler atılır ve boyanma olmaz. Primer antikorlar dışındaki tüm ara reaktifler,  niversal şekilde ticari forma sahiptir.

3.6.2.1.2. Uygulama basamakları:

- İHK için manuel yöntem uygulandı.
- Olgulara ait tümör dokusu içeren demonstratif bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler yapılarak lizinli lamlara alındı,
- Hazırlanan bu kesitler 1 gece 60 C'lik etüvde bekletilerek parafini eritildi.
- Ertesi sabah hemen, ksilol i eine alındı ve yaklaşık 1 saat süreyle oda ısısında bekletildi.
- Konsantrasyonu giderek azalan (%95, %90, %80, %70) etil alkol serilerinden geçirildi.
- Distile suyun içinde 10 dakika yıkama yapıldı.
- %3 hidrojen peroksit solusyonunda 15 dakika bekletildi.
- Ardından distile suda 5 dakika süreyle yıkama yapıldı.

- Sitrat tampon (pH:6) içerisinde, kapağı kapalı plastik şalelerde 30 dakika süreyle mikrodalga fırında 400 Watt'ta ön işlem yapıldı.
- Oda ısısında soğuyuncaya dek beklendi.
- Distile suda 10 dakika yıkandı.
- PBS (pH:7,4) içinde 10 dakika bekletildi.
- Lamlar üzerindeki dokular sınırlayıcı kalemle çerçeveselendi.
- İHK'sal boyamada indirekt ABC yöntemi uygulandı.
- Blokan solüsyonda 5 dakika bekletildi.
- Yıkama yapılmadan primer antikor (anti-HER2) uygulandı.
- 1 saat süreyle lamların kurumaması için altına ıslak kağıt yayılmış plastik boyama kabında lamlar bekletildi.
- PBS tampon solüsyonu içinde 10 dakika yıkandı.
- Anti polivalant biotinli antikor oda ısısında 20 dakika uygulandı.
- PBS tampon solüsyonu içinde 10 dakika yıkandı.
- Bayır turbu peroksidazı (horseradish peroxidase: HRP) eklenmiş streptavidin solüsyonuyla kaplanan kesitler oda ısısında 30 dakika bekletildi.
- PBS tampon solüsyonu içinde 10 dakika yıkandı.
- DAB, hidrojen peroksitli hazır solüsyonu ile 1/20 oranında sulandırıldı ve lamlar üzerinde 10 dakika tutuldu.
- Distile suda yıkandı.
- Harris hematoksilen ile 15 saniye zemin boyama yapıldı.
- Akar çeşme suyunda yıkandı.
- Konsantrasyonu giderek artan (%70, %80, %90, %95) etil alkol serilerinden geçirilip havada kurutuldu.
- Ksilen içinde 30 dakika bekletildi ve kapama maddesi damlatılıp lamelle kapatıldı.
- Boyalı preparatlar ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

Tüm olgular ASCO/CAP 2013 rehberine göre aşağıdaki şekilde skorlandı (27).
İHK 3+: İnvaziv tümör hücrelerinin %10 dan fazlasında komplet, güçlü çepeçevre membranöz boyanma,

İHK2+: İnvaziv tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında inkomplet ve/veya hafif-orta derecede çepeçevre membranöz boyanma yada tümör hücrelerinin %10 ve altında ancak yoğun komplet ve çepeçevre membranöz boyanma,

İHK1+: İnvaziv tümör hücrelerinin >%10 hafif-belirsiz inkomplet membran boyanma

İHK 0: Boyama yok yada <=%10 hafif-belirsiz inkomplet membranöz boyanma.

Bu skorlamaya göre İHK3+ pozitif, İHK2+ kuşkulu, İHK0 yada İHK1+ ise negatif olarak kabul edildi.

3.6.2.2. Parafine gömülü arşiv bloklarından kromojenik in situ hibridizasyon yöntemi ile HER2 amplifikasyonunun araştırılması:

3.6.2.2.1. Genel ilke:

KİSH tekniğinde, HER2 gen loküsü (kromozom 17q11.2-21 de lokalizedir) için spesifik olan digoksigenin-işaretle DNA probları, insan meme kanser örneğinde komplementer nükleik asitlerini hibridize etmek için kullanılır. İşaretle HER2 probu, insan nükleik asitlerinde bulunan (Alu ve LINE elementleri gibi) önemli oranda azalmış tekrar sekanslarıyla özgü problemler oluşturan markalı ve patentli bir teknoloji (Subtraction Prob Teknoloji-SPT), kullanımıyla yapılır. Bu problemin, PZR ile HER2 genini içerdği ve normal lenfositlerde metafaz floresan İSH (FISH) yöntemiyle, kromozom 17q11.2-2de, spesifik olarak HER2 gen lokusuna bağlandığı gösterilmelidir. Kullanılan bu problemler, doğal olarak spesifiktir, sitogenetik DNA problemleri için gerekli olduğu şekilde tekrar sekans bloklama gerektirmez. KİSH tekniği, kromojenik belirleyici kullanılarak ışık mikroskobu ile genetik aberasyonların değerlendirilmesini sağlar.

KİSH boyanma sonuçları standard ışık mikroskobu ile 40 büyütmede kolayca görülebilir ve HER2 gen amplifikasyon durumu, çevreleyici doku morfolojisi ile birlikte değerlendirilebilir.

Deparafinizasyondan sonra, örnekler sıcak önısıtma işlemine tabi tutulur, sonra enzim digesyonu uygulanır. Daha sonra örnekler dehidrate edilir ve HER2 probleminin ilavesinden önce havada kurutulur. Örneğe problemin ilavesi ve coverslipten sonra kombinasyon denatüre edilir ve 10 saatten uzun süre yada tüm gece hibridize edilir. Sonra, örnek, unhibridize probu çıkartmak için yıkanır. Daha sonra digoksigenine ve horsedish peroksidaz-polimer (HRP) konjugatına karşı antikorun ardışık ilavesiyle,

sinyal kromojenik olarak saptanır. DAB kromojeni ve H₂O₂ substratıyla HRP bağlanmasının reaksiyonu ile renk geliştirilmiştir. Sonuç olarak, örnek, doku morfolojisini tanımlamak için Mayer's hematoksilin ile zıt boyamaya tabi tutulur. HER2 gen sinyali, tek, koyu kahverengi sinyal ile tanımlanır. Çok sayıda sinyal varlığında ise sinyal kahverengi kümeler olarak görülür. Tümör hücre alanları, önce ışık mikroskopunun küçük büyütmesi ile incelenir. Uygun alan bulunduğu, HER2 gen kopyaları büyük büyütmede (x40) sayılır. DAB, renkli, kalıcı ve solmayan bir çöküntü oluşturur, böylece sonuçlar arşivlenebilir ve daha sonraki bir tarihte yeniden incelenebilir.

3.6.2.2.2. Uygulama basamakları:

- KISH uygulama için manuel yöntem kullanıldı.
- Lizinli lamlara, olgulara ait demonstratif bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı.
- Deparafinizasyon yapıldı;
 - Ksilende bekletildi 2x5 dakika
 - %100 EtOh da yıkama yapıldı 3x3 dakika
 - Distile suda yıkama yapıldı 3x 2 dakika
- 98° su banyosunda Reaktif A içinde preparatlar 15 dakika kaynatıldı
- Preparatlar oda ısısında distile suda içinde yıkandı.
- Lamlar üzerindeki dokular dikkatlice sınırlayıcı kalemle çerçeveselendi.
- Oda ısısında Enzim Pretreatment Reaktif B (kullanıma hazır) doku kesitini örtecek kadar eklendi ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Distile suda 3x2 dakika yıkandı.
- %70- 85-95-100 ve 100 lük dereceli etanol serilerinde dehidrasyon yapıldı.
- Havada kuruyana kadar beklendi.
- Reaktif C (HER2 probu), her bir örnek için 15 mikrolitre eklendi, coverslipe kapatıldı.
- 950 5 dakika denatürasyon, sonra 370 nemli ortamda sabaha kadar bekletildi.
- Dokuyu koruyarak coverslipler çıkartıldı. İki ayrı SCC (Reaktif D) hazırlandı; oda ısısında ve 700.
- Oda ısısındaki SCC (Reaktif D) de 2 dakika, sonra 700 SCC de 5 dakika yıkama yapıldı.

- Distile suda 3x2 dakika yıkama yapıldı.
- % 3 lük H₂O₂ absolü metanol ile 10 dakika yıkama yapıldı.
- PBS/Tween20 de 3x2 dakika yıkama yapıldı.
- Reaktif F (blokan) damlatılarak 10 dakika bekletildi.
- Reaktif G (antidigoksin) damlatıldı, 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- PBS/Tween20 de 3x2 dakika yıkama yapıldı.
- Reaktif H (Goat anti-mouse HRP polimer konjugatı) damlatıldı, nemli ortamda ve oda ısında 30 dakika enkübe edildi.
- PBS/Tween 2 3x2 dakika yıkama yapıldı.
- DAB ilave edildi. Nemli ortamda 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- Çeşme suyunda yıkama yapıldı.
- Hematoksilen ile 3-5 saniye gibi hızlı boyama yapıldı.
- Çeşme suyu altında akıtma yapıldı.
- Dereceli alkol serilerinde (%70- 85-95-100 ve 100 lük) sırayla her birinde 2 dakika yıkandı.
- Ksilolde bekletildi.
- Histomount (Reaktif K) damlatıp lamel kapatıldı.

Kromojenik sinyal durumu iki ayrı patolog (SA, NE) tarafından, 20x ve 40x objektifle yapıldı. Değerlendirme üretici firma tarafından yeni olarak güncellenmiş skorumlama sistemine göre yapıldı. Bu skorumlama sistemine göre; her olgu için üretici firmanın skorumlama tablosuna göre 30 hücre sayıldı, sayılan tümör hücrelerinde ortalama HER2 geninin kopya sayısı saptandı. 6-10 gen kopyası yada HER2 geninin çok sayıda kopyaları ve küçük kümelerin karışımı varsa amplifikasyon pozitif-düşük; tümör hücrelerinden HER2 gen kopya sayısı 10'un üzerinde yada büyük kümelerin yada multipl dot ve büyük kümelerin karışımı varsa amplifikasyon pozitif-yüksek olarak değerlendirildi. Sayılan tümör hücrelerinde HER2 gen kopya sayısı 4'ün altında ise amplifikasyon negatif (AN); HER-2 geninin kopya sayısı 4-6 arasında bir değerde bulunan olgularda 30 hücre daha sayıldı ve iki ayrı sayım ile elde edilen sonuçların ortalaması ile toplam 60 hücrede (30 hücre+30 hücre) bir sonuç değer elde edildi. Eğer tanımlanan kriterlere göre, amplifikasyon var ise KISH pozitif, yok ise KISH negatif olarak değerlendirildi.

3.6.2.3. Parafine gömülü arşiv bloklarından RNA ekstraksiyonu ve EZ-PZR Çalışması:

3.6.2.3.1. Genel ilke:

PZR, insan ve insan dışı bir organizmanın, genomik DNA'daki hedeflenen özel bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan in vitro DNA sentez yöntemidir. Bu yöntem, basittir, hızlıdır ve çok başarılıdır. PZR, DNA molekülünün milyonlarca-milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmayı sağlayan bir tekniktir. PZR reaksiyonlarında 3 basamak vardır; denatürasyon, hibridizasyon, polimerizasyon (sentez). Denatürasyon aşaması, PZR işleminin ilk aşaması olup bu aşamada, amplifiye edilecek DNA başlangıçta 95-100⁰C'ye kadar ısıtılır. Denatürasyon için genellikle 30 saniye gibi kısa bir süre 90-95⁰C ısı uygulanır. Hibridizasyon aşamasında DNA'nın ısıyla denatüre edilmesi yani çift sarmallı DNA sarmalının birbirinden ayrılması sağlanır. Sıcaklığın 50⁰C'ye düşürülmesi ile primerler DNA üzerinde yoğunlaşırlar. Primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, anti paralel olarak diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimeraz'ın çalışması yönüne uygun olarak (5'-3') bağlanırlar. Hibridizasyon ısısı genellikle primerlerin erime ısısının 5⁰C altında olup 55-65⁰C'lerde en iyi sonuç verir. Polimerizasyon (sentez) basamağında ise primerlerin DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla hedef DNA sarmalını tamamlamaları işlemi gerçekleşir. Yeni şekillenmiş olan sarmal orijinal hedef DNA'dan denatürasyon yolu ile ayrılır ve primer hibridizasyonunu, DNA sentezi ve denatürasyon siklusu tekrar edilir. Bütün DNA molekülleri, reaksiyonun sonunda çift sarmallı olarak bulunur. TaqDNA polimeraz enzimi, 5'-3' yönünden olmak üzere, ortamdaki nükleotidler kullanılır, primerlerin 3' terminusuna nükleotidler yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

3.6.2.3.2. Uygulama:

- Olguların her birinden seçilen bloklarda işaretlenen demonstratif tümör dokularından yaklaşık 2 mm çapında parçalar bistüri yardımıyla çıkartıldı ve steril ependorflara konuldu.
- RNA ekstraksiyonu yapılması amacıyla geliştirilmiş hazır Qiagen miRNeasy FFPG Kiti (Qiagen, Penzberg, Germany) kullanıldı.
- Hazır kitin içerisinden çıkan uygulama önerisine göre işlemler gerçekleştirildi.

- Her bir ependorfa doku içindeki parafini çıkartmak amacıyla 1 mililitre ksilen eklendi ve 10 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- Yüksek hızda 2 dakika santrifüj yapıp üstteki solüsyon atıldı.
- Tüplere %96-100'lük etanol eklendi ve vortekslendi.
- Yüksek hızda santrifüj edilip üstteki solüsyon atıldı.
- Ağızı açık olarak 37°C'lik etüvde kalan alkolün uçması için en az 10 dakika bekletildi. Çok büyük olan örnekler steril bistüri yardımıyla parçalara ayrıldı
- Her bir ependorf tüpe 150 mikrolitre (yada doku büyükse 240 mikrolitre) Buffer PKD (proteinaz K digestive) eklendi, vortekslendi.
- Her tüpe 10 mikrolitre proteinaz K ilave edildi.
- Etüvde 56°C'lik ısıda ağızı kapalı tüpler doku yıkımı için 15 dakika, sonra 80° de 15 dakika kuru ısı bloklarında inkübe edildi.
- Bu aşamada mekanik parçalama sağlamak amacıyla özel olarak MagNA Lyser green beadlerden her tüpe bir miktar ilave edildi.
- MagNA Lyser da 2800rpm de 45 sn çevrildi.
- Açığa çıkan RNA ların bozulması önlemek için epandorf tüpleri direk soğuk ortama alındı.
- 15 dakika 13.500 rpm, 20,000 xg santrifüj edildi.
- Santrifüj edildikten sonra üstteki solüsyon kite ait özel filtreli (membranlı) tüplere alındı. Daha sonra santrifüj yapıldı
- Alttaki süzüntü atılıp, yeni toplayıcı tüpler yerleştirildi.
- 16 mikrolitre (doku büyükse 25 mikrolitre) DNase Booster Buffer ve 10 mikrolitre DNAase I stock solüsyonu ilave edildi ve kapalı şekilde biraz çalkalayarak 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- Lizat, DNAase I stock solüsyonu ve DNase Booster Buffer içeren tüplere, 320 mikrolitre RBC Buffer (RNA binding C buffer) eklendi.
- Filtreli tüplerde filtre üstünde asılı kalan RNA içeren lizat üzerine 1120mikrolitre (doku büyükse 1750 mikrolitre) etanol (%100) ilave edildi.
- Tüpteki örnekten pipetajlama yaptıktan sonra 750 mikrolitre alıp yeni tüplere aktarma yapıldı ve 15 saniye 8000xg de santrifüj yapıldı.
- Bu aşamada RNA filtreye takıldı, diğer hücre artıkları alta geçti.

- Filtreli tüplere 500 mikrolitre Buffer RPE ilave edildi, 15 saniye 8000xg de çevrildi.
- Süzüntü atıldı, filtreli kısımları yeni tüpe konuldu, üzerlerine 500 mikrolitre Buffer RPE ilave edildi, 2 dakika 8000xg de çevrildi.
- Filtrede kalan RNA içeren tüple 2 dakika full speed döndürüldü ve yeni tüplere koyuldu.
- Yeni hazırlanan filtreli tüplere 33 mikrolitre RNaz-free water eklendi ve 1 dakika full speed döndürüldü.
- Filtreden süzülen süzüntüde RNA izole edilmiş oldu.
- Örneklerin her birinde nanodropla ölçüm yapıldı.
- 0,2 lik PZR tüpleri soğuk tablaya yerleştirildi.
- Tüplere 2 mikrolitre primer (nükleotidlerin A,T,G,S tüm olası kombinasyonları içeren) eklendi.
- Primerleri koyduğumuz 0,2 lik PZR tüplerinin üstüne izole edilen RNA lardan 11 mikrolitre eklendi.
- 65⁰ de, klasik PZR- termal cyler da 10 dakika bekletildi
- Revers transkriptaz enzimi, Buffer, RNA az inhibitörü ve nükleotidleri içeren hazır kit uygulama şemasına göre hazırlandı, her bir olguya 7 mikrolitre ilave edildi.
- Tüpler klasik PZR da 25 derecede 10 dakika, 55 derecede 1 saat ve 85 derecede 5 dakika olacak şekilde işleme alındı.

3.6.2.4. Diğer Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi:

Tüm hastalara ait hazır H&E preparatları dikkatlice incelendi. Tümörün histolojik tipi belirlendi. Histolojik derece, Nottingham dereceleme sistemi olarak da bilinen Nottingham kombine dereceleme sistemine göre derecelendirildi. Herhangi bir preparatta tümöre komşu alanda yada tümör içinde DKİS, vasküler invazyon ve lenfatik invazyon varlığı araştırıldı. Metastatik lenf nodları, perinodal invazyon varlığı açısından incelendi. Arşive ait hazır ER, PgR, p53 ve Ki67 immunohistokimyasal boyamalar yeniden değerlendirildi. ER ve PgR reseptörü $\geq$ %1 ise pozitif, p53 $\geq$ %10 ise pozitif, Ki67 $\geq$ %14 ise pozitif olarak değerlendirildi (3). Tüm hastaların tümörü, ilk tanı aldığı zamandaki bulgular göz önüne alınarak ve Amerikan Kanser Komitesi (AJCC-American Joint Committee on Cancer)'nin patolojik tümör-nodal tutulum-metastaz sınıflaması göre sınıflandı (3). Tümör $\leq$ 2cm ise T1, 2cm< tümör boyutu $\leq$

5cm ise . T2, tümör boyutu >5cm ise T3 olarak değerlendirildi. Göğüs duvarı ve/veyaderiye direkt yayılım gösteren (ülserasyon ve deri nodülleri şeklinde) herhangi bir boyuttaki tümör T4 olarak kabul edildi. Bölgesel lenf nodu metastazı yok ise N0, aksiler lenf nodlarında 1-3 metastaz N1 iken 4-9 metastaz N2 olarak değerlendirildi. 10 ve üzeri metastaz ise N3 olarak kabul edildi.

3.6.2.5. Trastuzumaba Direncin Tanımı:

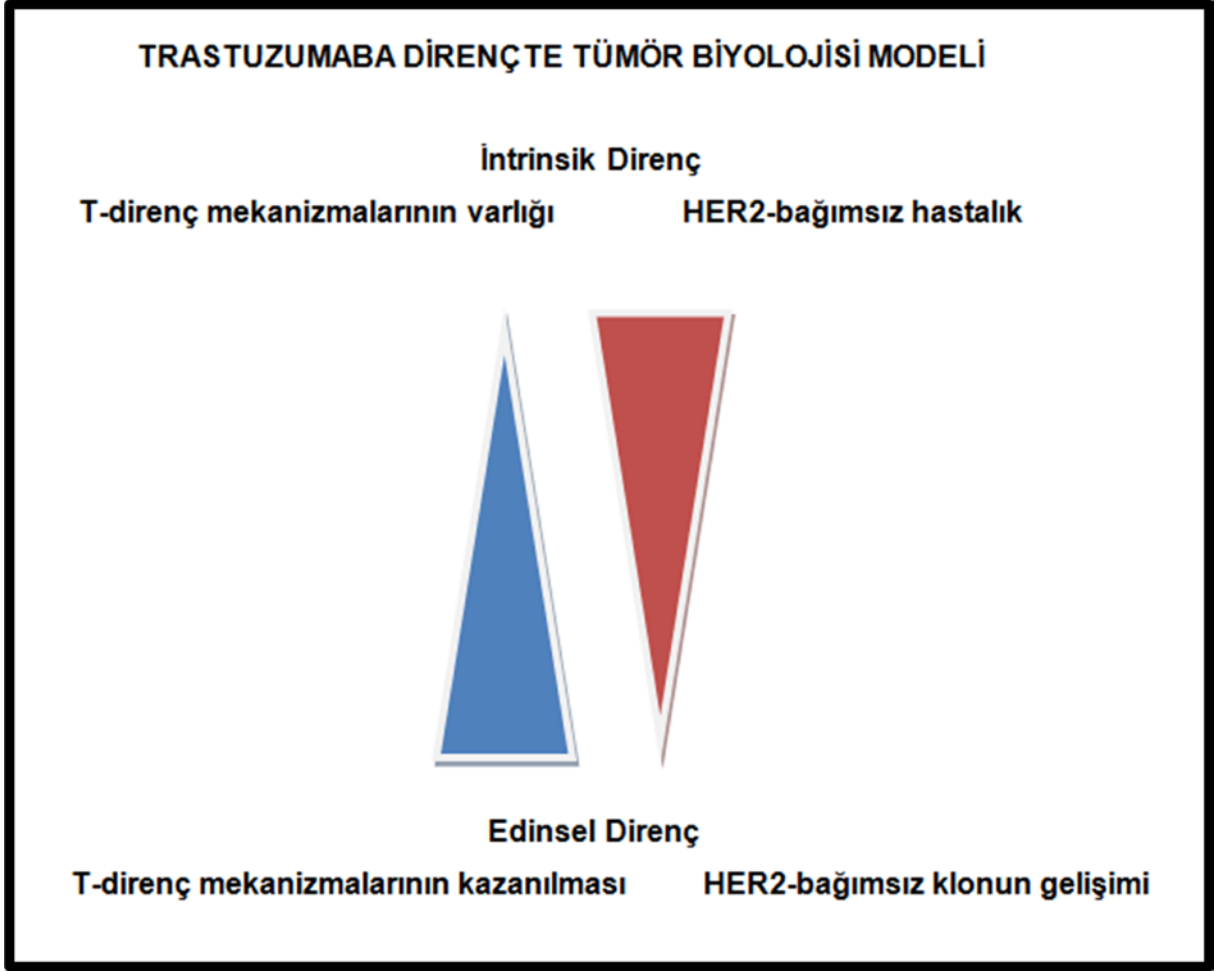
Trastuzumabın klinik pratiğe girmesinden sonra, HER2 pozitif meme kanser hastalarının yönetimi, tedavisi ve seyri çok değişmiştir. Ancak bu hedef ilacın tüm etkinliğine rağmen, tek ajan trastuzumab ile tedavi edilen metastatik HER2 pozitif meme kanser hastalarının >%50'sında, ilk radyolojik değerlendirmede hastalık progresyonu (primer rezistans) saptanmıştır (50,51). Başlangıçta trastuzumaba duyarlı hastaların çoğunluğunda, zaman içinde edinsel rezistans ortaya çıkmaktadır. Literatürde trastuzumab direnci yada refrakterliği için ortak bir tanımlama yoktur, sıklıkla da birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Bu nedenle de trastuzumab direnç mekanizmalarının değerlendirildiği çalışmaların karşılaştırılması ve yorumlanması zordur. Trastuzumab içeren tedavinin çoklu basamaklarından sonra progresyon gösteren ancak, anti-HER2 tedavilere cevap veren tümörlerde, ilk basamak trastuzumab tedavisi sırasında progresyon gösteren tümörlerden farklı rezistans mekanizmaları söz konusu olabilir.

Wong ve arkadaşları yaptıkları bir derleme çalışmalarında, trastuzumab tedavisine dirençli ve refraktör HER2 pozitif meme kanseri tanımlamalarını çok açık ve net bir şekilde tanımlamışlardır. Bu çalışmada, trastuzumab direnci, metastatik HER2 pozitif meme kanser hastasının birinci basamak tedavisinin (trastuzumab±kemoterapi) 8.-12. haftasında yapılan ilk radyolojik değerlendirmede, progresyon varlığı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca adjuvan trastuzumab tedavisi sırasında yada tamamlanmasından sonraki 12 ay içinde ortaya çıkan rekürrensler de trastuzumab direnci olarak tanımlanmıştır. Trastuzumab refrakterliği ise, trastuzumab içeren 1. basamak tedavinin ilk radyolojik değerlendirmesinde stabil olan yada regresyon saptanan hastalarda trastuzumab içeren 2. yada 3 basamak tedavi sonrası progresyon gelişmesi olarak tanımlanabileceğini bildirmişlerdir (52). Trastuzumab direncinin klinik davranış modelinin şematize edilmiş görünümü şekil 10'da görülmektedir.

TRASTUZUMABA DİRENÇTE KLİNİK DAVRANIŞ MODELİ	
Metastatik durum	Postadjuvan durum
*T kullanırken progresyon (8-12 haftadaki ilk radyolojik değerlendirmede)	*T kullanırken rekürrens
*T sonrası progresyon (3 ay içinde)	*T sonrası rekürrens (12 ay içinde)

Şekil 10: Metastatik durum ve postadjuvan durumda trastuzumab direnç kriterleri.
T: Trastuzumab

Wong ve arkadaşları aynı çalışmada trastuzumab rezistansı veya trastuzumab refrakter hastalık ile intrinsik yada edinsel rezistans arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir model önermişlerdir (52). Bu modelde, trastuzumab rezistansı ve trastuzumab refrakterliği trastuzumab yetersizliğinin klinik gözlemi olarak tanımlanmıştır. İntrinsik yada edinsel rezistansın ise tümörün biyolojisini gösterdiği düşünülmüştür. Bu düşünce modeline göre, intrinsik rezistansın, trastuzumaba dirençli hastalıkta baskın bir rol oynadığı diğer yandan, edinsel rezistansın trastuzumab refrakter hastalıkta nispeten daha önemli olduğunu belirtmişlerdir. Trastuzumaba dirençte tümör biyolojisini açıklayan model şekil 11 de görülmektedir.



Şekil 11: Trastuzumaba dirençte tümör biyolojisini tanımlayan şematize görünüm.

Beyin metastazı, trastuzumab direncinin değerlendirilmesinde ayrıca dikkate alınması gerekli bir durumdur. Meme kanserinde HER2 pozitifliğinin, beyin metastazının gelişimi için bağımsız bir faktör olduğu bildirilmiştir (53). HER2 pozitif meme kanserinde beyin metastazının insidansı, trastuzumab tedavisinin başarısının sonucu olarak artmıştır. Yüksek moleküler ağırlığı nedeniyle trastuzumabın, santral sinir sistemine penetrasyonu zayıftır. Bu nedenle de trastuzumab tedavisinden sonra ilk ve tek progresyon yeri olarak beyin metastazları söz konusu ise bu durumun trastuzumab direnci olarak kabul edilmesinin doğru olmayacağı düşünülmüştür. Tam tersine, santral sinir sistemi dışında trastuzumaba duyarlı hastalığı kontrol etmek için oldukça etkin olduğunu söylemek daha doğru olabilir. Literatürde, trastuzumabla tedavi edilen HER2 pozitif meme kanserinde beyin metastazı gelişiminde standard bir tedavi önerisi yoktur.

Bu çalışmada trastuzumab direnci tanımı, yukarıda tanımlanan kriterlere göre değerlendirildi ve hastalar gruplandı. Yalnızca beyin metastazı olan olgular trastuzumab direnci olarak değerlendirilmedi.

3.7. Araştırma planı ve takvimi:

Güneş Patoloji Laboratuvarı'nda meme kanseri tanısı alan olguların elektronik ortam arşivinden kaydedilmesi (01.04.2012-15.04.2012)



Kaydedilen olgulara ait arşiv preparatları incelenmesi ve yeterli tümör dokusu içeren olguların seçilmesi (01.05.2012-30.05.2012)



Demonstratif tümör alanı içeren parafin bloklardan 5 mikrometrelilik kesitlerin lizinli lamlara alınması ve demonstratif tümör alanı içeren parafin bloklardan tümör örneklerinin ayrılması (01.06.2012-15.06.2012)



İHK ve KİSH çalışmalarının yapılması (15.06.2012-30.06.2012)



PZR ile HER2 ekspresyonunun değerlendirilmesi (01.09.2012-06.09.2012)



PZR ile p95HER2 ekspresyonunun değerlendirilmesi (10.02.2013-15.02.2013)



Sterilizasyon amacıyla tekrar PZR ile HER2 ve p95HER ekspresyonunun değerlendirilmesi (01.11.2014-15.02.2014)



Verilerin istatistiksel analizi (01.03.2014-30.03.2014)



Sonuçların analizi ve değerlendirilmesi (01.04.2014-30.04.2014)



Tez konusu ile ilgili literatür bilgilerinin güncellenmesi (01.05.2014-30.06.2014)



Tez yazımı ve şekilsel düzenlemelerin yapılması (01.09.2014-01.02.2015)



Tez savunma sunum hazırlığı ve tez savunması (01.03.2015-04.06.2015)

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

3.8.1. İstatistik Yöntem:

İstatistiksel değerlendirme SPSS16.0 programı kullanılarak yapıldı. HER2 protein ekspresyonu İHK ve *HER2 gen* amplifikasyonu KISH ile nonparametrik veriler ile değerlendirildi. HER2 m-RNA ekspresyonu ve p95HER2 ekspresyonu EZ-PZR ile ölçüm verileri olarak ölçeklendirildi. Ayrıca hasta yaşı, tümör boyutu, metastatik lenf düğümü sayısı, lokal nüks ve metastaza kadar geçen süre, tam sağkalım süresi ve izlem süresi de ölçüm verileri ile ölçeklendirildi. Vasküler ve lenfatik invazyon, DCIS, perinodal tutulum, pT, pN, lokal nüks, metastaz, organ metastazı sayısal verilerle değerlendirildi.

Olgu sayısı ve verinin ölçüm birimi temel alınarak değişkenler arasındaki ilişki, Ki-Kare testi, Mann–Whitney U testi, Spearman korelasyon testi ile test edildi. Progresyonsuz sağ kalım ve tam sağkalım periyodları Kaplan-Meier metodu ile ölçüldü ve subgrupların sağkalım eğrileri log-rank test ile karşılaştırıldı. 0.05'den küçük p değerleri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlıkları:

Bu çalışmada primer amaç, HER2 pozitif meme kanser hastalarında, trastuzumab tedavisine karşı gelişen direncin moleküler mekanizmalardan biri olan p95HER2'nin rolünün araştırılmasıdır. Ancak, literatür bilgilerimize göre, p95HER2 aşırı ekspresyonu dışında, birçok trastuzumab direnç mekanizmaları tanımlanmıştır. Bunlar arasında PI3K-AKT yolağının aktivasyonu, PTEN supresyonu, IGF1R, HER3 ve EGFR sinyalizasyonu, MUC4 ekspresyonu sayılabilir. Bu nedenle de, trastuzumab direnci saptanmasına rağmen p95HER2 ekspresyon seviyesi yüksek olmayan hastalarda, p95HER2 dışı bir direnç mekanizması söz konusu olabilir. Çalışmamızda trastuzumab direnç mekanizmalarından yalnızca sadece p95HER2 ekspresyonunun araştırılması, trastuzumab direnci görülen ve p95HER2 aşırı ekspresyonu görülmeyen olguları açıklamamızda kısıtlılığa neden olmuştur.

p95HER2 ekspresyon durumu, yalnızca EZ-PZR yöntemi ile meme kanser dokusunda analiz edilmiştir. Anti-p95 primer antikorunun ticari formu çalışma tamamlandığı sırada elde edilemediği için meme kanser dokusu içeren parafin doku kesitlerinde p95HER2 protein ekspresyonu immunohistokimyasal değerlendirme ile analiz edilememiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı:

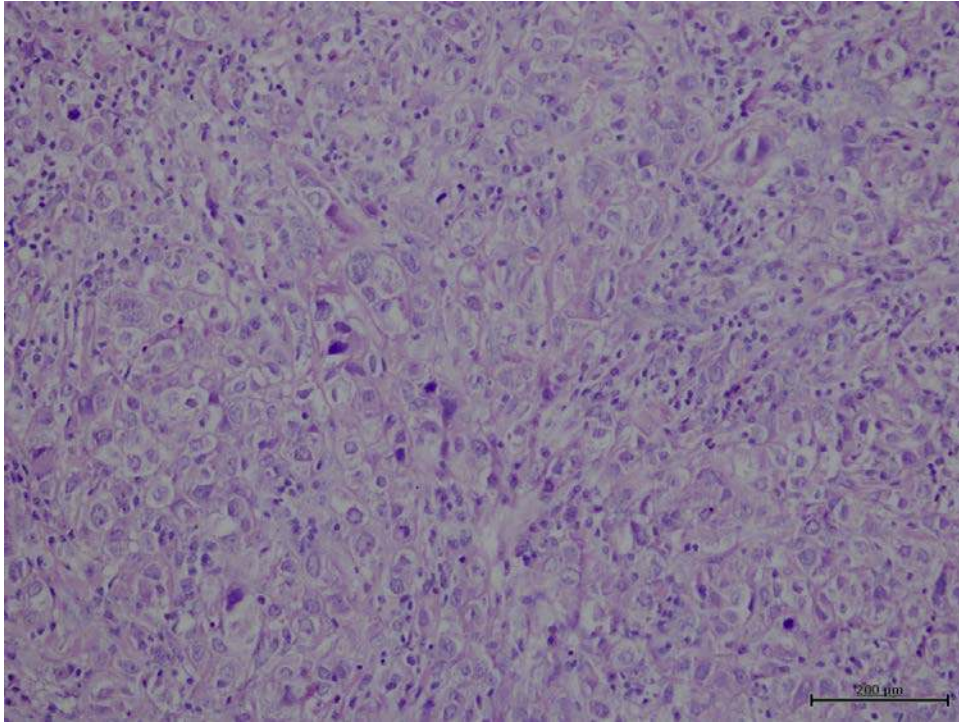
Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Daire Başkanlığı tarafından “2012-KB SAG 025” numaralı proje olarak desteklenmiştir ve 30.06.2011 tarihinde 2011/22-15 no ile etik kurul onayı alınmıştır (Ekler: 8.2).

28.05.2015 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu’nun 2015/14-45 no’lu kararı ile tez başlığının ‘Meme Kanseri ve Trastuzumab Tedavisine Dirençte p95’in rolü” olarak değiştirilmesi onaylanmıştır (Ekler: 8.3).

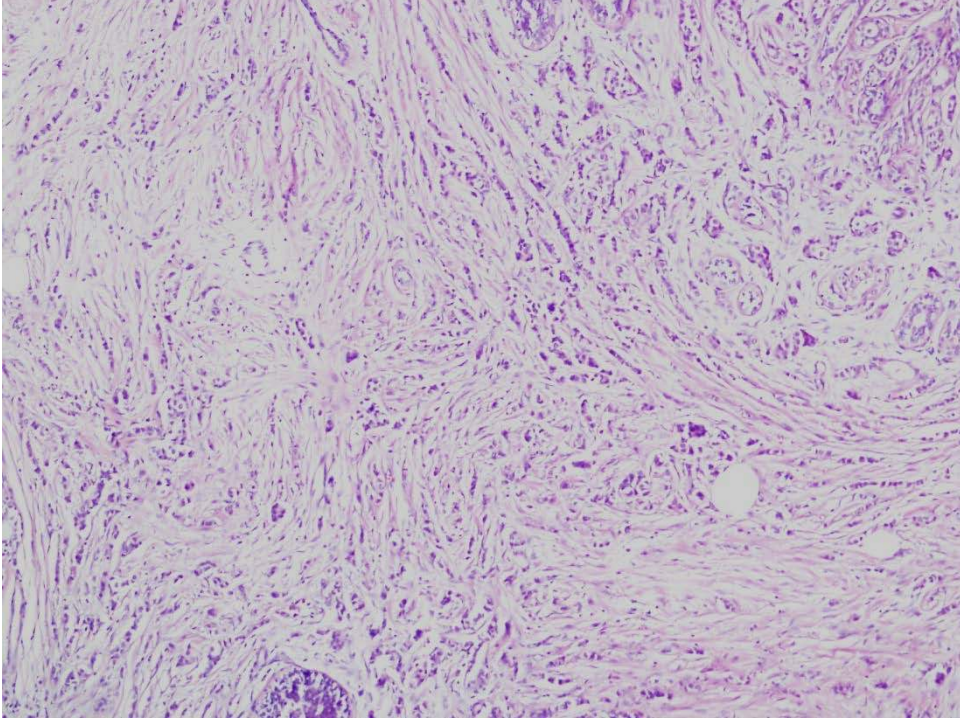
4.BULGULAR:

4.1. Çalışma Olgularının Bulgularına Genel Bakış:

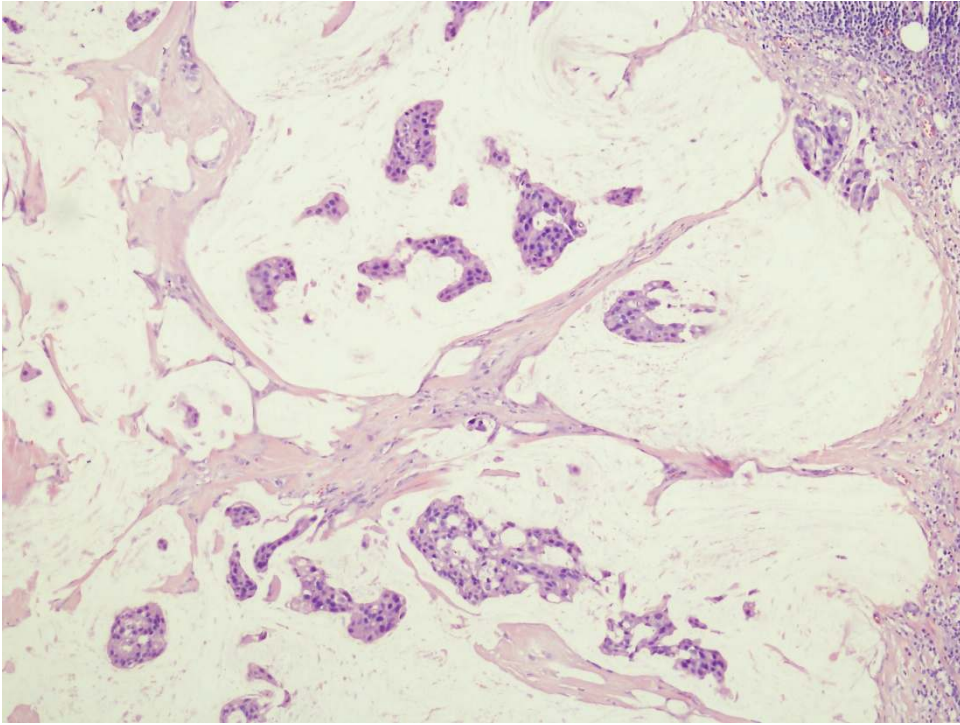
Meme kanseri tanısı alan 80 hasta değerlendirmeye alındı. Hastaların hiçbirinde tanı sırasında metastaz bulgusu yoktu. Hastaların ortalama yaşı $52,80 \pm 12,55$ yıl (28-81 yıl) olarak hesaplandı. Ortalama tümör boyutu $2,47 \pm 1,19$ cm (0,5-7cm) idi. Kırkbir olguda (%51,2) tümör sağ meme, 39 olguda (%48,8) tümör sol meme lokalizasyonluydu. Olguların 70'i (%87,5) invaziv duktal karsinom, 3'ü (%3,8) invaziv lobüler karsinom, 7'si (%8,8) diğer histolojik subtip (müsinöz karsinom, invaziv kribriform karsinom, mikropapiller karsinom, kombine meme karsinomu gibi) morfolojisindeydi (Şekil 12, 13 ve 14).



Şekil 12: İnvaziv duktal karsinom (invaziv karsinom, nonspesifik tip) (H&E x200).

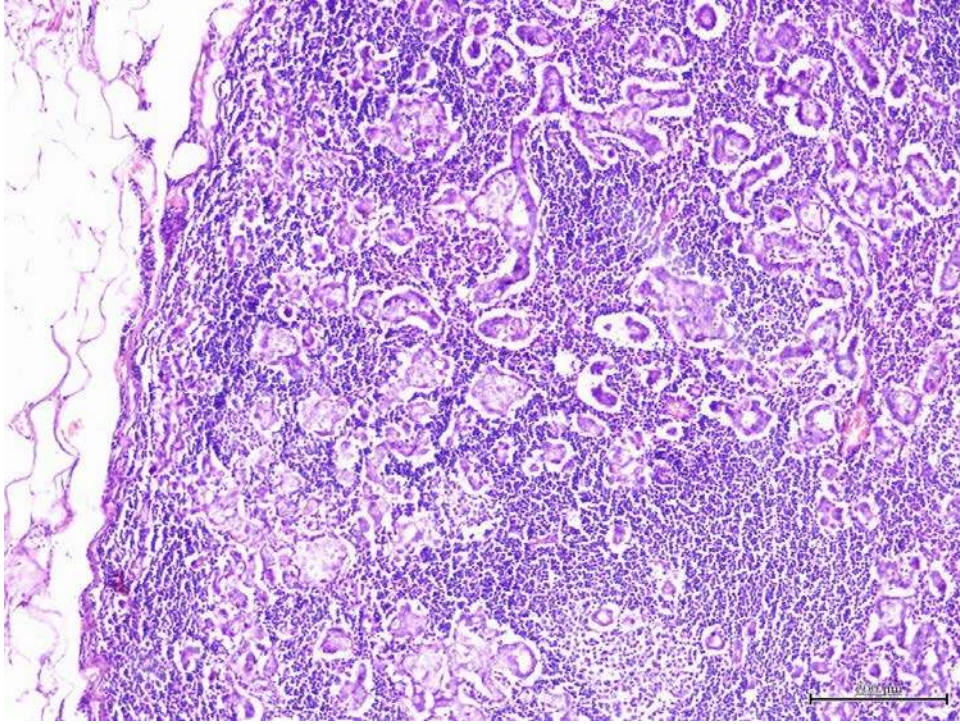


Şekil 13: İnvaziv lobüler karsinom (H&E x100).



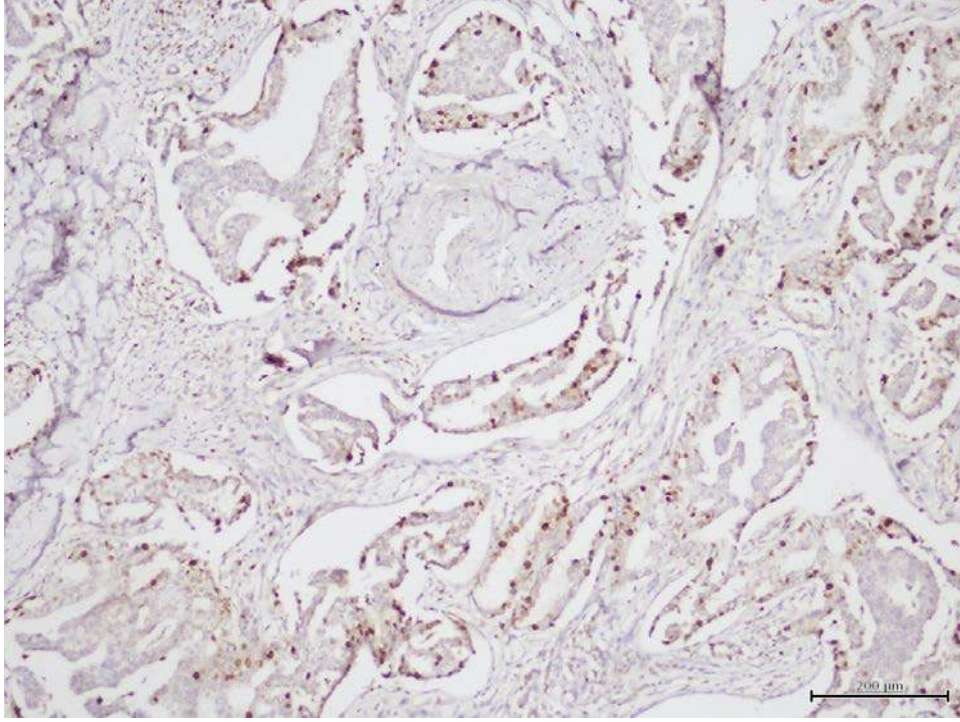
Şekil 14: Müsinöz karsinom (H&E x100).

Olgular histolojik dereceye göre sırasıyla; 3 olgu (%3,8) histolojik derece I, 54 olgu (%67,5) histolojik derece II, 23 olgu (%28,8) histolojik derece III olarak dağılım gösterdi. DKİS 48 olguda (%60) izlenirken, 32 olguda (%40) izlenmedi. Vasküler invazyon 15 olguda (%18,8), lenfatik invazyon 49 olguda (%61,2) mevcuttu. Aksiller diseksiyon materyallerindeki lenf düğümü sayısının ortalaması $15,16 \pm 5,48$ (4-40), metastatik lenf düğümü sayısının ortalaması $2,85 \pm 5,54$ (0-39) olarak bulundu (Şekil 15).



Şekil 15: Lenf düğümünde karsinom metaztası (H&E x100)

ER reseptörü 55 olguda (%68,8) pozitifken, PgR reseptörü 52 olguda (%65) pozitif (Şekil 16).



Şekil 16: Tümör hücrelerinde nükleer boyanma gösteren ER pozitifliği (ER x100).

Ki-67 proliferasyon indeksi, 53 olguda değerlendirildi ve 29'unda (%36,2) %14'ün üzerindeydi. p53 gen mutasyon durumu 38 olguda değerlendirildi ve 12'sinde (%15) p53 mutasyonu pozitif.

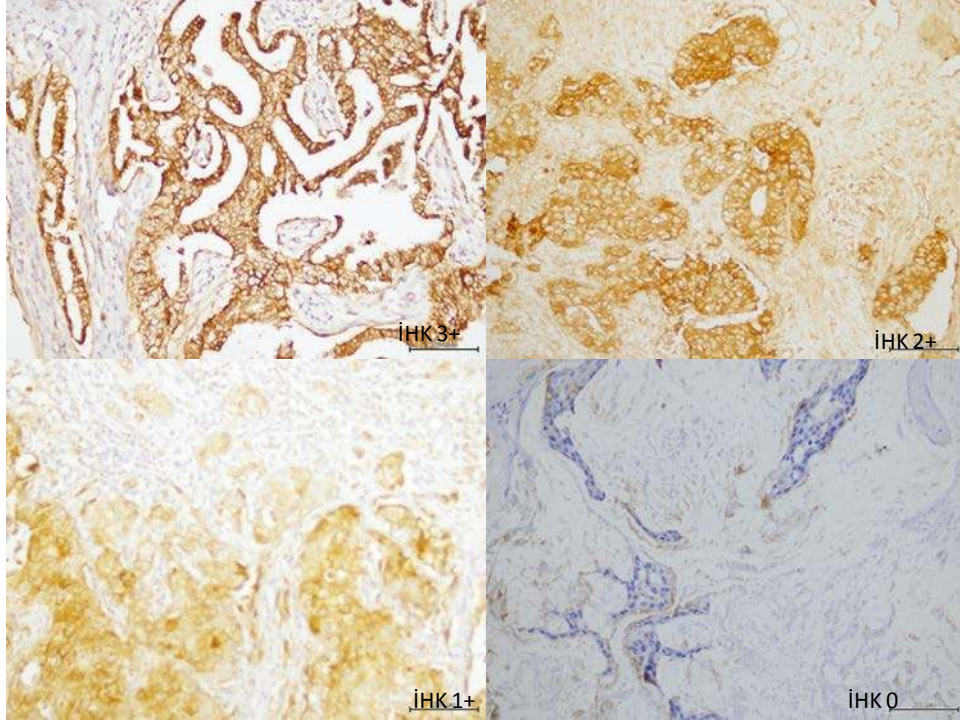
Onsekiz olguda (%22,5) evre I tümör, 37 olguda (%46,2) evre II tümör, 25 olguda (%31,2) evre III tümör saptandı. Lokal nüks 2 olguda (%2,5), metastaz 21 olguda (%26,2) saptandı. On olguda (%12,5) kemik metastazı, 7 olguda (%8,8) akciğer metastazı, 6 olguda (%7,5) karaciğer metastazı, 2 olguda (%2,5) beyin metastazı, 2 olguda (%2,5) uzak lenf düğümü metastazı vardı.

Olguların özellikleri tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Çalışma Olgularının Özellikleri

Özellikler	Ortalama/%
Yaş (Ortalama yıl)	52,80
Tümör boyutu (Ortalama cm)	2,47
Lokalizasyon	
Sağ meme	51,2
Sol meme	48,8
Histolojik Subtip	
İnvaziv duktal karsinom	87,5
İnvaziv lobüler karsinom	3,8
Diğer subtipler	8,8
Histolojik Derece	
Derece I	3,8
Derece II	67,5
Derece III	28,8
Vasküler İnvazyon	
Var	18,8
Yok	81,2
Lenfatik İnvazyon	
Var	61,2
Yok	38,8
Lokal Nüks	
Var	2,5
Yok	97,5
Metastaz	
Var	26,2
Yok	73,8
Evre	
Evre I	22,5
Evre II	46,2
Evre III	31,2

İHK sal yöntemle tüm olgularda cerbB2 protein ekspresyonu değerlendirildi. Skorlama ASCO/CAP 2013 kılavuzuna göre yapıldı (27). cerbB2 20 olguda (%25) 0/1+, 25 olguda (%31,2) 2+, 35 olguda (%43,8) 3+ ti (Şekil 17).



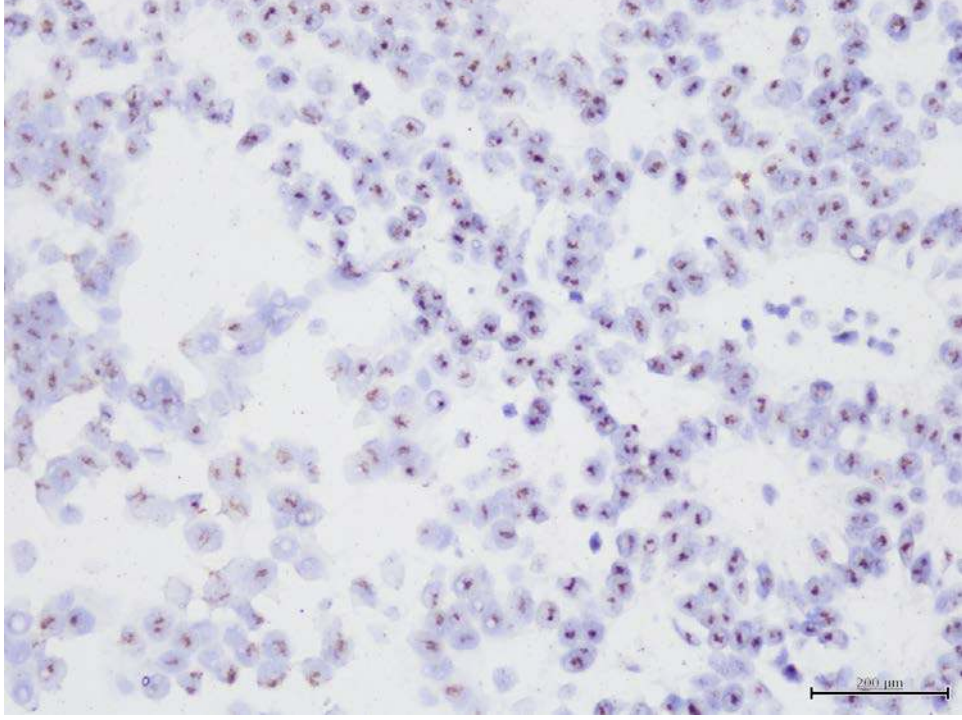
Şekil 17: CerbB2 ile farklı boyanma skorları görülmekte (cerbB2 x100).

Olguların cerbB2'ye göre dağılımları grafik şekilde hazırlanmıştır (Şekil 18).

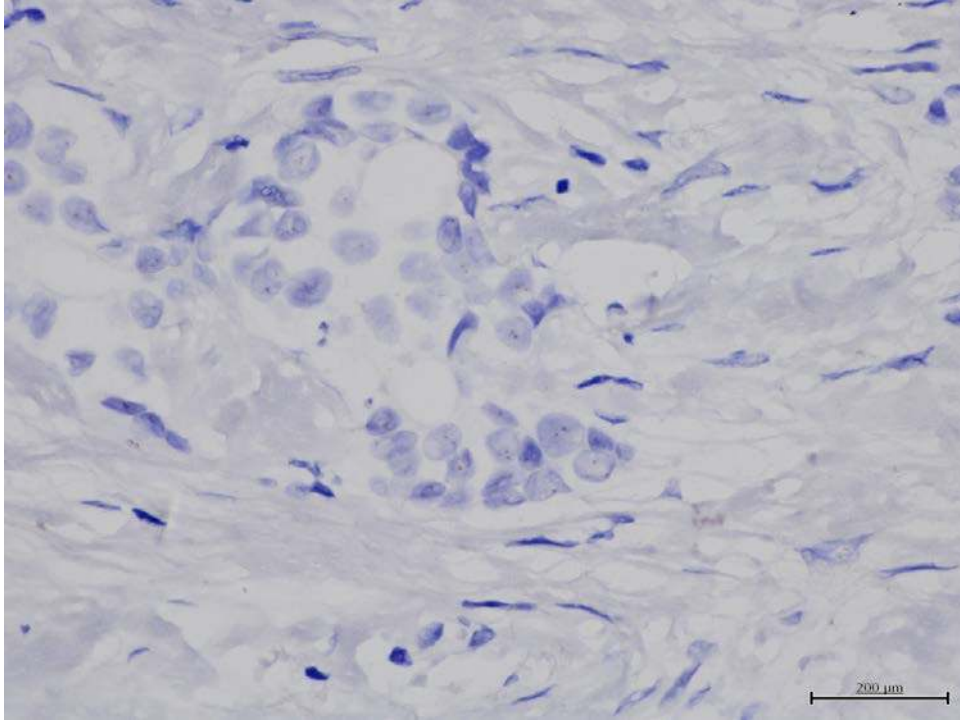


Şekil 18: Çalışma olgularının İHK yöntemi ile cerbB2 durumunun grafiksel görünümü.

Tüm olgularda *HER2* gen amplifikasyonu, KİSH yöntemi ile belirlendi. Değerlendirme üretici firmanın ve ASCO/CAP 2013 kılavuzunun önerilerine göre yapıldı. Kırkbeş olguda (%56,2) amplifikasyon saptanırken, 35 olguda (%43,8) amplifikasyon görülmedi (Şekil 19 ve 20).

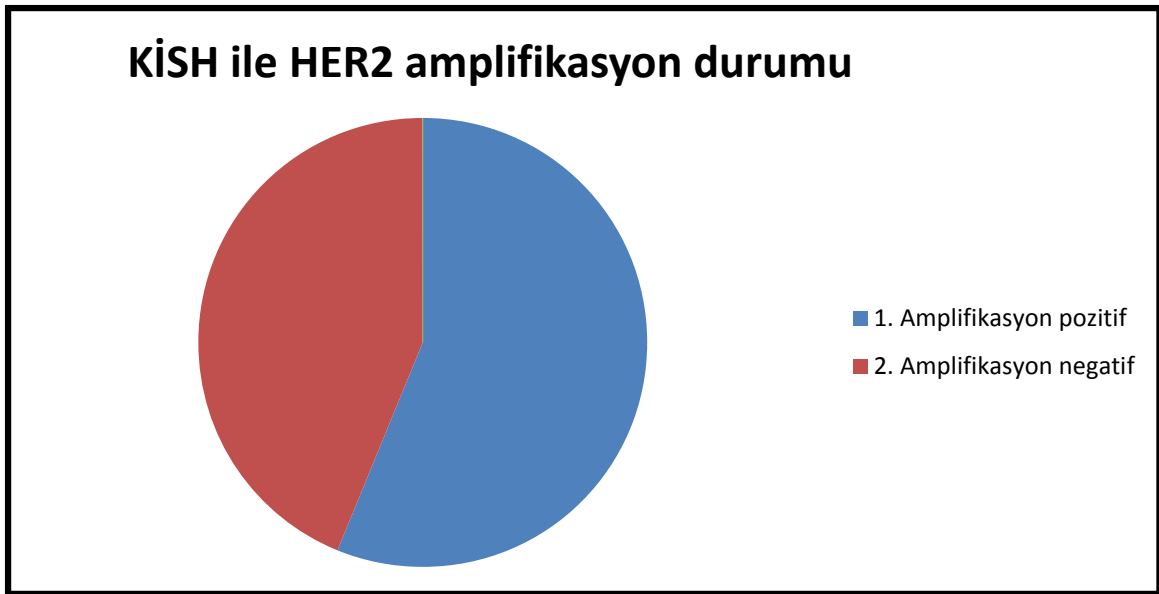


Şekil 19: Tümör hücrelerinde koyu kahverengi kümeler şeklinde sinyal veren HER gen kopyaları: HER2 gen amplifikasyonu pozitif (KİSH x400).



Şekil 20: Tümör hücrelerinde küçük, kahverengi noktasal sinyaller: HER2 gen amplikasyonu negatif (KİSH x400).

Olguların KİSH uygulama sonucuna göre amplifikasyon durumunun grafiksel görünümü aşağıda görülmektedir (Şekil 21).



Şekil 21: Çalışma olgularının KİSH yöntemi ile HER2 gen durumunun grafiksel görünümü.

EZ-PZR yöntemi ile tüm olgularda HER2 ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Çalışmaya alınan 80 olgunun 9'unda EZ-PCR değerlendirmesi çoklu denemelere rağmen başarılı olmadı. Sonuç alınan olguların EZ-PZR oranlarının ortalaması $5,77 \pm 18,97$ (0,8-155,38) olarak bulundu. EZ-PZR ile HER2 değerlendirme sonucu ≥ 2 ise pozitif olarak kabul edildi. Bu eşik değere göre olguların 35'i (%43,8) pozitifken, 36'sı (%45) negatifti.

EZ-PZR yöntemi ile tüm olgularda p95HER2 ekspresyon düzeyleri de analiz edildi. Toplam 69 olguda değerlendirme başarılı oldu. Sonuç alınan olguların p95HER2 EZ-PZR oranlarının ortalaması $7 \pm 2,82$ (0,13-227,54) olarak bulundu. Tablo 2' de görülmektedir.

Tablo 2: HER2 ve p95HER2 ekspresyon seviyeleri

HER2	$5,77 \pm 18,97$ (0,80-155,38)
p95HER2	$7,00 \pm 2,82$ (0,13-227,54)

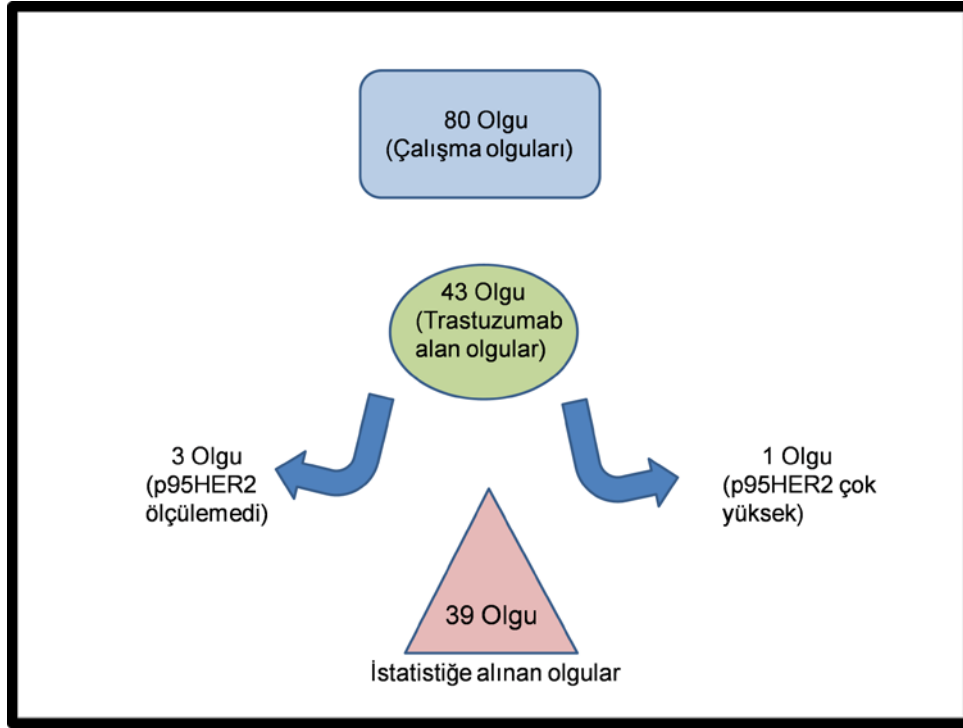
Olguların 43'ü (%53,8) trastuzumab tedavisi alırken, 37'si (%46,2) almadı. KİSH ile amplifikasyon saptanmayan ve trastuzumab tedavisi almayan olgu sayısı 34, KİSH ile amplifikasyon saptanan ve trastuzumab tedavisi alan olgu sayısı 42 idi. KİSH ile amplifikasyon göstermeyen bir olgu trastuzumab tedavisi aldı. Üç olgu KİSH ile amplifikasyon göstermesine rağmen trastuzumab tedavisi almadı.

Lokal nüks/metastaza kadar geçen sürenin ortalaması $26,23 \pm 12,71$ ay (1,54-56,21 ay) idi. Hastalıksız sağkalım süresi $44,10 \pm 2,2$ ay (1,54-88,31 ay) olarak hesaplandı. Ortalama izlem süresi $48,71 \pm 20,1$ ay (15,38-92,42 ay) olarak belirlendi. Son izlem tarihinde olguların 71'i (%88,8) sağ iken, 9 hasta (%11,2) eks olduğu saptandı.

4.2. Trastuzumab Tedavisi Alan (Trastuzumab Direnci Gösteren ve Göstermeyen) Olgulara ait Bulgular:

Trastuzumab tedavisi alan 43 olgunun 3'ünde (27, 55, 83 no'lu olgular) p95HER2 ekspresyon seviyesi çoklu denemelere rağmen ölçülemedi. Bir olgu (66 no'lu olgu), p95HER2 ekspresyon seviyesi çok yüksek (227,54) olduğu için, verilerin normalizasyonu amacıyla değerlendirme dışı bırakıldı. Böylece trastuzumab tedavisi uygulanan ve klinik olarak takip edilen 4 olgu açıklanan nedenlerle istatistiksel

analizlere alınamadı. İstatiksel analize alınacak olgu sayısı 39 olarak belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22: Çalışma olgu sayısı, trastuzumab uygulanan olgu sayısı, trastuzumab karşılaştırması yapılan olgu sayısının şematik görünümü.

Bu grubun 28'inde (%71,8) takipler sırasında lokal nüks yada metastaz saptanmadığı için trastuzumab direnci görülmedi olarak değerlendirildi. 11 (%28,2) olguda lokal nüks yada metastaz saptandığı için trastuzumab direnci mevcut olarak değerlendirildi.

Trastuzumab kullanan ve takip sırasında ölen 4 olgu (31, 65, 66 ve 81 no'lu olgular) vardı. Bu olguların 1'i (66 no'lu olgu), p95HER2 ekspresyon seviyesi çok yüksek olduğu için değerlendirme dışı bırakılmıştı. Sonuçta trastuzumab tedavisi alan ve izlem sırasında eks olan 3 olgu vardı. Eks olan 3 olgunun 2'si (65 ve 81 no'lu olgular) trastuzumaba direnç gösterirken, 1 olgu (31 no'lu olgu) trastuzumaba direnç göstermedi.

Trastuzumab direnci gösteren 11 olguda, p95HER2 ortalama değeri $11,01 \pm 19.73$ (0,41-58,9) idi. Trastuzumab direnci göstermeyen 28 olguda ise p95HER2 ortalama değeri $1,99 \pm 1.37$ (0,51-6,63) idi. Tablo 3'de trastuzumab tedavisi uygulanan olgularda p95HER2 seviyesi görülmektedir.

Tablo 3: Trastuzumab direnci gösteren/göstermeyen olgularda p95HER2 seviyesi

	Olgu sayısı (n)	p95HER2 seviyesi
Trastuzumaba direnç var	11	11,01±19.73 (0,41-5,89)
Trastuzumaba direnç yok	28	1,99±1.37 (0,51-6,63)

Trastuzumab direnci gösteren olgularda tanı sırasında ortalama yaş 54,64±10.68 (37-74) idi. Bu gruptaki hastalarda ortalama tümör boyutu 3,17±1.28 cm (1,8-6,0 cm) olarak belirlendi. EZ-PZR yöntemi ile 8 olguda HER2 değeri elde edilebildi. HER2'nin ortalama değeri 0,96±0,72 (0,13-2,06) olarak belirlendi. Metastatik lenf düğümü sayısının ortalaması 6,82±6,70 (0-23) idi. Lokal/nüks metastaza kadar geçen süre ve hastalıksız sağkalım süresinin ortalama değeri aynı olup 20,81±9,00 ay (1,54-30,03 ay) olarak saptandı. İzlem süresi 36,89±10,69 (22,14-48,85) idi.

Trastuzumab direnci göstermeyen olgularda tanı sırasında ortalama yaş 51,18±13.59 (28-81) idi. Ortalama tümör boyutu 2,42±1.49 (0,5-7) olarak belirlendi. EZ-PZR ile analiz edilen HER2 değeri için 26 olguda bir sonuç elde edilebildi. Ortalama değeri 12,79±30,38 (0,52-155,38) olarak saptandı. Metastatik lenf düğümü sayısının ortalaması 3,29±7,44 (0-39) idi. Lokal/nüks metastaza kadar geçen sürenin ortalama değeri 39,28±10,90 ay (26,81-56,21 ay), hastalıksız sağkalım süresinin ortalama değeri 48,63±20,52 ay (18,63-92,42 ay) olarak saptandı. İzlem süresi 53,42±21,46 ay (18,63-92,42 ay) idi. Trastuzumab tedavisi uygulanan hastaların ölçümsel değerlendirmeleri tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgularda ölçümsel değerlendirmeler.

	Trastuzumab Direnci (+)	Trastuzumab Direnci (-)
	11 olgu	28 olgu
Yaş (yıl)	54,64±10.68 (37-74)	51,18±13.59 (28-81)
Tümör Boyutu (cm)	3,17±1.28 (1,8-6,0)	2,42±1.49 (0,5-7)
HER2 ekspresyonu	0,96±0,72 (0,13-2,06)	12,79±30,38 (0,52-155,38)
Metastatik lenf düğümü	6,82±6,70 (0-23)	3,29±7,44 (0-39)
Hastalıksız sağkalım (ay)	20,81±9,00 (1,54-30,03)	48,63±20,52 (18,63-92,42)

Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular ER ve PgR reseptör durumu, p53 mutasyonu, Ki67 proliferasyon indeksi, vasküler ve lenfatik invazyon, tümörün patolojik evresi, nodal tutulum, evre, lokal nüks ve/veya metastaz varlığı, organ metastazları açısından da değerlendirildi. Bulgular tablo 5’de görülmektedir.

Tablo 5: Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgularda biyolojik ve klinikopatolojik parametreler.

	Trastuzumab Direnci (+)	Trastuzumab Direnci (-)
	n (%)	n (%)
ER reseptör pozitifliği	6(54,5)	20(71,4)
PgR reseptör pozitifliği	5(45,5)	19(67,9)
p53 pozitifliği	1(33,3)	6(54,5)
Ki67 pozitifliği	9(81,8)	11(61,1)
Vasküler invazyon varlığı	4(36,4)	7(25)
pN		
N0	1(9,1)	15(53,6)
N1	2(18,2)	5(17,9)
N2	6(54,5)	7(25,0)
N3	2(18,2)	1(3,6)
Evre		
Evre I	-	9(32,1)
Evre II	2(18,2)	10(35,7)
Evre III	9(81,8)	9(32,1)
Lokal nüks varlığı	11(100)	2(7,1)
Metastaz varlığı	11(100)	6(21,4)
Organ metastazi		
Kemik	5(45,5)	4(14,3)
Akciğer	4(36,4)	2(7,1)
Karaciğer	3(27,3)	1(3,6)
Beyin	2(18,2)	-

4.3. İstatistiksel bulgular

4.3.1. Trastuzumab Tedavisi Alan Olgularda İstatistiksel Bulgular:

Trastuzumab kullanan 39 olgu üzerinden istatistiksel analiz yapıldı. Evre I ve II bir grup, evre III ve IV bir grup olarak ayrılarak istatistiksel analize alındı. Tanımlanan kriterlere göre trastuzumab direnci gösteren 11 olguda, p95HER2 ortalama değeri trastuzumab direnci göstermeyen 28 olgudaki p95HER2 ortalama değerinden belirgin şekilde yüksek olmasına rağmen bu fark, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,210$ Mann-Whitney U testi).

p95HER2 ekspresyon seviyesi, düşük olduğunda trastuzumab direnci görülmedi. Ancak p95HER2 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu her durumda trastuzumab direnci vardı.

p95HER2 ekspresyon seviyesi trastuzumab direncini belirlemek için sensitifti, ancak spesifik değildi.

EZ-PZR ile analiz edilen HER2 ekspresyon seviyeleri trastuzumab direnci gösteren olgularda $0,96 \pm 0,72$ (0,13-2,06), trastuzumab direnci göstermeyen olgularda $12,79 \pm 30,38$ (0,52-155,38) olarak belirlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,0001$ Mann-Whitney U testi). Tablo 6'da sonuçlar karşılaştırmalı olarak görülmektedir.

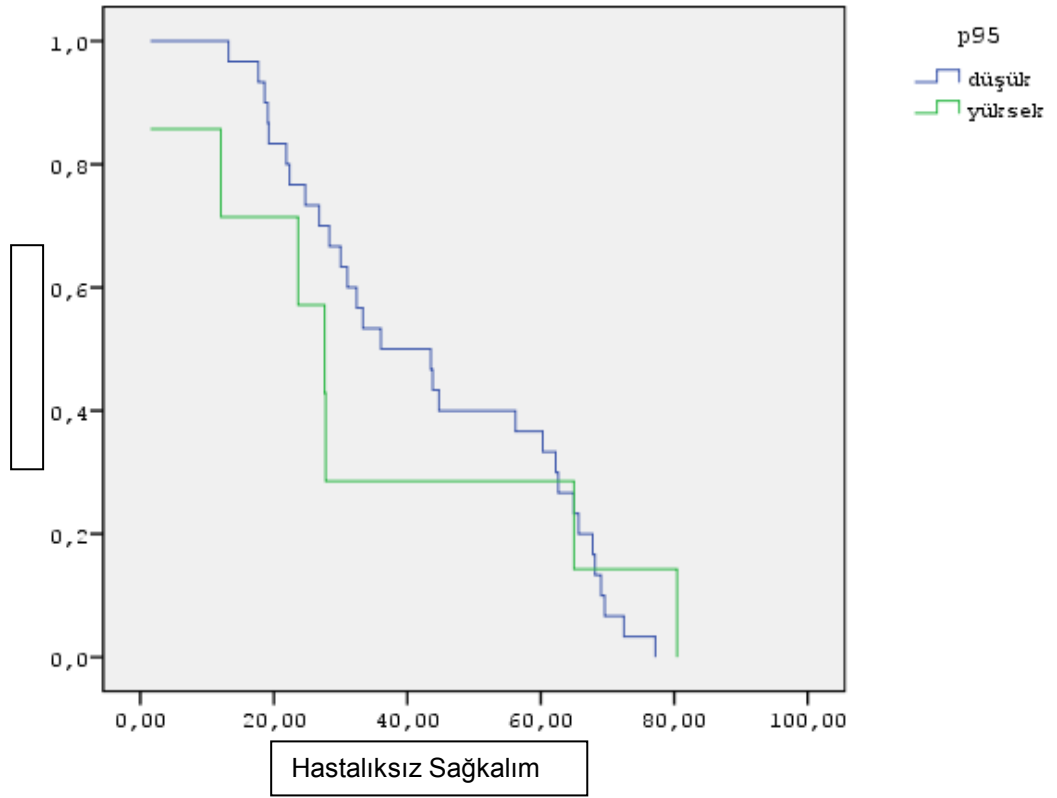
Tablo 6: Trastuzumab direnci gösteren/göstermeyen olgularda HER2 ve p95HER2 sonuçları.

	Trastuzumab direnci (+)	Trastuzumab direnci (-)	
	n (%)	n (%)	p değeri
Olgu sayısı	11 (28,2)	28 (71,8)	-
HER2 ekspresyonu	$0,96 \pm 0,72$ (0,13-2,06)	$12,79 \pm 30,38$ (0,52-155,38)	0,0001
p95HER2 ekspresyonu	$11,01 \pm 1,97$ (0,41-58,9)	$1,99 \pm 1,37$ (0,51-6,63)	0,210

Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında tanı sırasındaki yaş ($p=0,346$) ile aralarında istatistiksel bir ilişki yoktu (Mann-Whitney U testi).

Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında DCIS ($p=0,446$), vasküler invazyon ($p=0,694$), inflamatuvar meme ($p=0,545$), p53 mutasyonu ($p=1,000$), ER ($=0,453$), PgR ($p=0,277$), Ki67 ($p=0,412$), kemik metastazı ($p=0,085$), karaciğer metastazı ($p=0,060$), beyin metastazı ($p=0,074$) ve lokal nüks ($p=1,000$) ile ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Ki-kare testi).

Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında tümör boyutu ($p=0,034$), lokal nüks/metastaza kadar geçen süre ($p=0,005$), hastalıksız sağkalım süresi ($p=0,0001$) ve izlem süresi ($p=0,037$) ile ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (Mann-Whitney U testi) (Şekil 23).



Şekil 23: Trastuzumab tedavisi alan olgularda p95 durumuna göre hastaliksız sağkalım analizi (p95 cut off:4) $p=0,989$ (Log Rank).

Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında lenfatik invazyon ($p=0,009$), nodal tutulum ($p=0,014$), perinodal invazyon ($p=0,0001$), metastatik lenf düğümü sayısı ($p=0,013$), metastaz (0,0001), akciğer metastazı ($p=0,042$) ve evre ($p=0,011$) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı (Ki-kare testi). Tablo 7'de trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında sonuçlar görülmektedir.

Tablo 7: Trastuzumab direnci gösteren/göstermeyen olguların karşılaştırmalı görünümü.

	Trastuzumab direnci (+)	Trastuzumab direnci (-)	p değeri
	n (%)	n (%)	
Yaş (yıl)	54,64±10.68 (37-74)	51,18±13.59 (28-81)	0,346
Tümör Boyutu (cm)	3,17±1.28 (1,8-6,0)	2,42±1.49 (0,5-7)	0,034
DCIS	9(81,8)	18(64,3)	0,446
Vasküler İnvazyon	4(36,4)	7(25)	0,694
Lenfatik İnvazyon			0,009
ER pozitifliği	6(54,5)	20(71,4)	0,453
PgR pozitifliği	5(45,5)	19(67,9)	0,277
Nodal tutulum	10(90,9)	13(46,4)	0,014
Perinodal invazyon	11 (100)	10(35,7)	0,0001
Evre			0,011
Lokal nüks	11(100)	2(7,1)	1,000
Metastaz	11(100)	6(21,4)	0,0001
Hastalıksız sağkalım (ay)	20,81±9,00(1,54-30,03)	48,64±20,52(18,63-80,43)	0,0001

4.3.2. Çalışma Olgularının Kinikopatolojik Özelliklerine ait İstatistiksel Bulgular:

p95HER2 ekspresyon seviyesi ile tümör boyutu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,035 Pearson korelasyon testi).

p95HER2 ekspresyon seviyesi ile HER2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki istatistiksel anlamlı değildi (p=0,712 Pearson korelasyon testi).

p95HER2 ekspresyon seviyesi ile metastatik lenf düğümü sayısının ortalama değeri arasındaki ilişki (p=0,744) ve hastalıksız sağkalım arasındaki ilişki (p=0,517) istatistiksel olarak anlamlı değildi (Pearson korelasyon testi).

p95HER2 ekspresyon seviyesi ile DCIS (p=0,418), inflamatuvar meme (0,151), lenfatik invazyon (p=0,191), perinodal tutulum (p=0,646), ER (p=0,129) ve PgR (p=0,312) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (Student's T testi).

p95HER2 ekspresyon seviyesi ile vasküler invazyon varlığı (p=0,288), p53 mutasyonu (p=0,449), yüksek Ki67 proliferasyon indeksi (p=0,088), lokal nüks varlığı (p=0,104), metastaz varlığı (p=0,179), kemik metastazı (p=0,755), akciğer metastazı (p=0,905), karaciğer metastazı (p=0,071) ve beyin metastazı (p=0,224) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Mann-Whitney U testi).

Tümör boyutu ile tanı sırasındaki yaş ($p=0,095$), metastatik lenf düğümü sayısının ortalama değeri ($p=0,368$) ve HER2 ekspresyon seviyesi ($p=0,533$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Pearson korelasyon testi).

Tümör boyutu ile inflamatuvar meme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı ($p=0,012$ Mann-Whitney U testi).

Tümör boyutu ile vasküler invazyon ($p=0,288$) ve ER reseptör pozitifliği ($p=0,775$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Mann-Whitney U testi).

Tümör boyutu ile lenfatik invazyon ($p=0,001$) ve perinodal tutulum ($p=0,007$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (Student's T testi).

Tümör boyutu ile DCIS varlığı ($p=0,958$) ve HER2 amplifikasyon pozitifliği ($p=0,136$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu (Student's T testi).

Tümör boyutu ile lokal nüks kadar geçen süre ($p=0,038$), metastaza kadar geçen süre ($p=0,0001$) ve hastalıksız sağkalım süresi ($p=0,011$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (Pearson korelasyon testi).

Vasküler invazyon varlığı ile lenfatik invazyon ($p=0,0001$), perinodal tutulum ($p=0,0001$), metastaz gelişimi ($p=0,002$), HER2 amplifikasyon varlığı ($p=0,009$), beyin metastazı ($p=0,033$) ve kemik metastazı ($p=0,017$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (Ki-kare testi).

Vasküler invazyon varlığı ile inflamatuvar meme ($p=0,572$), lokal nüks ($p=0,342$), ER hormon reseptör pozitifliği ($p=0,062$), p53 mutasyonu ($p=1,000$), yüksek Ki67 proliferasyon indeksi ($p=0,086$), karaciğer metastazı ($p=0,313$) ve akciğer metastazı ($p=0,118$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Ki-kare testi).

ER hormon reseptör pozitifliği ile PR hormon reseptör pozitifliği ($p=0,0001$), perinodal tutulum ($p=0,047$) ve metastaz ($p=0,005$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı (Ki-kare testi).

ER hormon reseptör pozitifliği ile HER2 amplifikasyonu ($p=0,224$), p53 mutasyonu ($p=1,000$), HER2 EZ-PZR pozitifliği ($p=0,605$) ve lokal nüks ($p=0,520$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Ki-kare testi).

Yüksek Ki67 proliferasyon indeksi ile metastaz gelişimi ($p=0,004$), HER2 amplifikasyon varlığı ($p=0,004$), DCIS varlığı ($p=0,020$), perinodal tutulum ($p=0,012$),

ER hormon reseptör pozitifliği ($p=0,048$), PR hormon reseptör pozitifliği ($p=0,011$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı (Ki-kare testi).

Yüksek Ki67 proliferasyon indeksi ile lokal nüks gelişimi ($p=0,495$), akciğer metastazı ($p=0,678$), karaciğer metastazı ($p=0,056$), beyin metastazı ($p=1,000$), lenfatik invazyon ($p=0,772$), inflamatuvar meme ($p=0,617$), p53 mutasyonu ($p=0,302$), HER2 EZ-PZR pozitifliği ($p=0,071$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu (Ki-kare testi).

HER2 amplifikasyonu ile HER2 ekspresyon seviyesi ($p=0,0001$) ve metastaz gelişimi ($p=0,0001$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (Ki-kare testi).

HER2 amplifikasyonu ile perinodal tutulum ($p=0,012$), metastaz ($p=0,0001$), kemik metastazı ($p=0,002$), akciğer metastazı ($p=0,014$) ve karaciğer metastazı ($p=0,033$) ile arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı. (Ki-kare testi).

HER2 amplifikasyonu ile lenfatik invazyon ($p=0,064$), DCIS ($p=0,107$), lokal nüks ($p=0,502$), lenf düğümü metastazı ($p=0,260$) ve beyin metastazı ($p=0,502$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Ki-kare testi).

Hastalıklı sağkalım ile HER2 ekspresyon seviyesi ($p=0,071$) ve tanı sırasındaki yaş ($p=0,120$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (Pearson korelasyon testi).

EZ-PZR ile pozitif/negatif olarak değerlendirilen HER2 durumu ile nodal metastaz arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,814$ Ki-kare testi).

5. TARTIŞMA:

HER2 pozitif meme kanseri, meme kanserinin moleküler sınıflamasında ayrı bir grubu temsil eden özel bir moleküler ve klinik antitedir. Bu grup meme kanserinin, trastuzumabla etkin şekilde tedavisi, hastalığın yönetimini ve seyrini belirgin şekilde değiştirmiştir. Ancak başlangıçta trastuzumaba cevap veren bazı meme kanser hastalarında zaman içinde hastalık progresyonunun ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu güçlü etkinliğe sahip ilacın, yaygın şekilde kullanılmasına rağmen progresyon görüldüğünde uygulanacak standard bir tedavi protokolü geliştirilememiştir. Bu nedenle de trastuzumaba cevap vermeyen HER2 pozitif meme kanser hastaları için alternatif tedavi seçimlerini sağlayacak yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, HER2 pozitif meme kanser hastalarında, bugün için bilinen ve yukarıda ayrıntıları ile açıklanmış olan trastuzumab tedavisine karşı gelişen direncin moleküler mekanizmalarından biri olan p95HER2'nin rolü araştırıldı. Çalışmada primer tümörde, EZ-PZR ile p95HER2 seviyesi ölçüm değeri üzerinden belirlendi. Trastuzumab tedavisi uygulanan hastalarda, klinik olarak tanımlanan direnç gelişmiş ve gelişmemiş gruplar arasında p95HER2 ekspresyon seviyesi değerlendirildi. Ayrıca bu subgruplar arasında klinikopatolojik parametreler açısından farklılık olup olmadığı da araştırıldı. Diğer araştırılan durumlar ise, çalışmadaki tüm olgularda tüm klinikopatolojik parametrelerin değerlendirilmesidir.

Tanımlanan kriterlere göre trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında p95HER2 ortalama değerinin farklılığı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,210$ Mann-Whitney U testi). Ancak, p95HER2 ekspresyon seviyesinin düşük olduğu olgularda trastuzumab direnci görülmedi. Buna karşın p95HER2 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu her durumda trastuzumab direnci vardı. Trastuzumab kullanan ve tanımlanan kriterlere göre trastuzumab direnci gösteren bir olgu (66 no'lu olgu), p95HER2 ekspresyon seviyesi 227,54 gibi çok yüksek bir değer olduğu için istatistiksel analize alınmamıştır. Eğer bu olgu değerlendirme dışı bırakılmasaydı, trastuzumab direnci gösteren olgularda p95HER2 ekspresyon seviyesinin ortalamasının daha yüksek olacağı açıktır. Bu duruma rağmen, elde ettiğimiz sonuç, p95HER2 ekspresyon seviyesinin, trastuzumab direncini belirlemek için duyarlı, ancak özgün olmadığını göstermiştir.

HER2 ekspresyon seviyeleri, trastuzumab direnci gösteren gruba göre trastuzumab direnci göstermeyen grupta belirgin olarak yüksekti ($p=0,0001$). Bu gözlem, trastuzumab direnci gösteren hastalarda, p95HER2 aşırı ekspresyonunun normal uzunluktaki HER2 ekspresyonunu baskılıyor olabileceğini düşünmemize neden oldu. Belki bu iki değer arasındaki oran yada oransal bir değişim direnci belirlemede istatistiksel olarak daha anlamlı olabilir. Trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen hastalarda bu iki değerın ölçümlemlerini içeren çok sayıda olguyu içeren çalışmaların birikmesiyle bu konuda daha net bilgiler oluşacaktır.

Yakın zamana kadar trastuzumab direncinin tanımı konusunda standard bir tanımlama yoktu (52). Ayrıca rezistans ve refrakter terimleri sık sık birbirinin yerine kullanılmaktadır. Bu nedenle trastuzumab tedavisine karşı direnç konusunda yapılan çalışmaları birbiri ile karşılaştırmak zor olmaktadır. Çünkü değişik çalışmalarda direnç tanımı farklı olabilmektedir. Araştırdığımız literatürde direnç gösteren ve göstermeyen subgruplar arasındaki ilişkiyi hem HER2 hem de p95HER2 ekspresyon seviyelerinin ölçümsel değerleri üzerinden karşılaştıran bir çalışma bulunamadı. Çalışmalarda belli eşik değer pozitiflik olarak kabul edilmiştir (54,55)

Tural ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada p95HER2 varlığının, trastuzumab tedavisine azalmış cevabını ($p=0,001$), kısalmış hastalıksız sağkalım sürelerini ($p=0,0001$) ve tamsağkalım sürelerini ($p=0,045$) öngörebileceği sonucuna ulaşmışlardır (56). Bu çalışmada p95HER2 yanı sıra yine immunhistomiyasal yöntemle, PTEN kaybı ve PI3K ekspresyonu da değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada, p95HER2'nin, immunohistokimyasal yöntemle yani protein düzeyinde bir değerlendirme ile analiz edildiği bildirilmiştir. p95HER2 eksprese eden ve p95HER2 eksprese etmeyen şeklinde gruplanmıştır. Bu gruplama tümör hücrelerinde ≥ 50 sitoplazmik boyanma pozitif kabul edilmiş. Sitoplazmik boyanma ile birlikte nükleus boyanması da görülmüş. Nükleer boyanma değerlendirmeye alınmamış. Immunohistokimyasal boyamada kullanılan primer antikor, Abcam firmasına ait ab32074 katalog numaralı, p95 NBS1 (Y112) tavşan monoklonal primer antikorudur. Uygulamada 1/100 dilüsyon oranının kullanıldığı ve tümör dokularının üzerinde 52 dakika bekletildiği belirtilmiştir. Pozitif kontrol olarak derinin skuamöz hücreli karsinomu kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 100 meme kanser hastasının 33'ünde (%33), p95HER2 ekspresyonu pozitif saptanmış. Bu çalışma sonucuna

göre, araştırmacılar, meme kanser hastalarında p95HER2'nin günlük pratikte, standardize edilmiş immunohistokimyasal bir değerlendirmenin kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmada, p95HER2 eksprese eden hastaların hastalıksız sağkalım sürelerinin ortalaması 8 ay iken p95HER2 eksprese etmeyen hastalarda 22 ay olarak bulunmuştur. Bu durumun, p95HER2 reseptör proteinini eksprese eden ve trastuzumab kullanan hastalarda direnç nedeniyle hastalıksız sağkalım süresinin kısalması ile ilişkilendirmişlerdir. Tam sağkalım sürelerine bakıldığında ise, p95HER2 eksprese eden hastalarda tam sağkalım sürelerinin ortalaması 24 ay iken p95HER2 eksprese etmeyen hastalarda bu değer 29,1 olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda, p95HER2 ekspresyonunun analizi için immunohistokimyasal bir yöntem kullanılmadı. p95HER2 ekspresyonu, gen düzeyinde m-RNA ekspresyon düzeyin analiz edilmesi ile belirlendi. Öncelikle trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen gruplar (klinik bilgiler eşliğinde) arasında değişik parametreler açısından bir ilişki olup olmadığı araştırıldı. Bizim çalışmamızda da trastuzumab direnci olan grupta p95HER2 ekspresyon düzeyi ile hastalıksız sağkalım süresi arasında ($p=0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı.

p95HER2 ekspresyonunun, protein düzeyinde immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildiği bir başka çalışma Kocar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (57). Çalışma 38 HER2 pozitif metastatik meme kanserini içermektedir. Meme kanser dokusunu içeren arşiv parafin bloklardan hazırlanan kesitler immun boyama öncesi sitrat solüsyonu ile ön işleme alınmıştır. Primer antikor olarak, Abcam firmasına ait ab 75778 no'lu katalog numarasına sahip anti-95 NBS1 (phospho S432) (EPR2470Y) antikoru kullanılmıştır. Primer antikor, tümör dokusunun üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Değerlendirme, tümör hücrelerinin membranöz boyanma durumuna göre yapılmıştır. Tümör dokusunda $>\%10$ membranöz bir boyanma pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme kriterlerine göre 38 hastanın 14'ünde ($\%36,8$) p95HER2 pozitif, 26'sında ($\%63,2$) negatif olarak saptanmıştır. p95HER2 pozitif hastalarda hastalıksız sağ kalım sürelerinin ortalama değeri 11,6 ay iken, p95HER2 negatif hastalarda bu değer 12,37 ay olarak bulunmuştur. Tam sağkalım süreleri dikkate alındığında, p95HER2 pozitif hastalarda tamsakalım sürelerinin ortalama değeri 27,66 iken, p95HER2 negatif hastalarda bu değer 24,02 olarak hesaplanmıştır. p95HER2 ile hastanın tanı sırasındaki yaşı, tümörün histolojik

derecesi, hormon reseptör durumu, metastataz gelişim yerleri ve 5 yıllık sağkalım süreleri arasında bir korelasyon saptanmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, literatürdeki diğer benzer çalışmalarla kıyaslandığında nispeten daha yüksek p95HER pozitifliğinin (%36,8) saptanmasını iki nedenle açıklamaya çalışmışlardır. Biri p95HER2 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirme ile analiz edilmesi olarak öne sürülmüştür. Diğer ise, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının (38 hasta) az olması ile ilişkilendirilmiştir.

Yukarıdaki tartışılan son iki çalışmada, meme kanser dokusu içeren parafin bloklardan hazırlanan kesitlerde p95HER2'nin protein ekspresyon analizi yapılmıştır (56,57). Bu iki çalışma ayrıntılı şekilde incelendiğinde her ikisinin de kullandığı antikor, Abcam firmasına ait anti-p95 NBS primer antikor olduğu dikkatimizi çekti. Tural ve arkadaşları, çalışmalarında ab32074 katalog numaralı, anti-p95 NBS1 (Y112) tavşan monoklonal primer antikorunu kullanırken, Kocar ve arkadaşları ab 75778 katalog numaralı anti-95 NBS1 (phospho S432) (EPR2470Y) antikorunu kullanmışlardır. Tural ve arkadaşları, membranöz boyanmayı pozitiflik olarak kabul etmişlerdir. Kocar ve arkadaşları ise sitoplazmik boyanmayı dikkate almışlardır. Biz de çalışmamızı planlarken, p95HER2 ekspresyon analizi için immunohistokimyasal değerlendirme yapmayı planlamıştık. Ancak, meme kanser dokusu içeren parafin doku bloklarından hazırlanan kesitlerde, bu proteinin immunohistokimyasal yöntemle analiz edebileceğimiz bir ticari antikor sağlayamadık. p95 adı altında ticari formları bulunan antikorların, bizim aradığımız proteine karşı gelen antikor olmadığını saptadık. Bir çalışma planlanırken, kullanılacak primer antikorların, çalışmadaki hedef proteine karşı olup olmadığının çok iyi bir şekilde araştırılması gereklidir. Yanlış antikorların kullanımı ile çalışmanın sonuçlarını çok farklı yerlere varabilir. Tural ve arkadaşları çalışmalarında, HER2 pozitif meme kanser hastalarında, p95HER2'nin varlığının, trastuzumab tedavisine rağmen kötü cevabı, kısalmış hastalıksız sağkalım ve tam sağkalım ile birlikte olduğunu saptamışlardır. Yanlış bir antikor ile değerlendirme yapılmış olmasına rağmen literatürle uyumlu bir sonuç elde edilmiştir (56). Kocar ve arkadaşları ise, p95HER ile trastuzumab direnci arasında korelasyon saptamadıklarını bu sonuçların literatür ile uyumsuz olduğunu belirtmişlerdir.

Sperinde ve arkadaşları laboratuvar koşullarında, p95HER2 proteinine karşı geliştirdikleri antikor ile parafinize meme kanser dokularında immunohistokimyasal bir

değerlendirme yapmışlardır (54). Bu çalışmada p95HER2 ekspresyon seviyesini VeraTag teknolojisi ile de belirlemişlerdir. Yüksek p95HER2 ekspresyon seviyesinin, azalmış hastalıksız sağkalım süreleri ($p=0,022$) ve tamsağkalım süreleri ($p=0,009$) ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada p95HER2 değerlendirme yöntemi olarak immunohistokimyanın, VeraTag teknolojisi kadar duyarlı ve ölçümsel (kantitatif) özellikte olmadığını vurgulamışlardır (54). Bu durum Kocar ve arkadaşlarının çalışmasında ortaya çıkan, literatür ile uyuşmayan sonucun, yalnızca immunohistokimyanın kullanılmasına bağlı olabileceği düşüncesini doğrulamaktadır (57). Tümör dokusunun preanalitik, analitik ve postanalitik işlemlerden etkilenmesine bağlı olarak immunohistokimyasal değerlendirmelerde istenen sonuca ulaşamadığı bilinen bir durumdur. İmmunohistokimyasal değerlendirmelerin hücresel protein düzeyinde bir belirleme olması ve nispeten subjektif olması nedeniyle, meme kanserinde HER2 durumunun belirlenmesinde immunohistokimyanın yetersiz yada kuşku olduğu durumlarda *HER2 gen* amplifikasyonu ile genetik düzeyde bir analiz önerilmektedir (27). Bu yöntemin daha doğru ve tekrarlanabilir olduğu bilinmektedir. p95HER2'nin immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi konusunda daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç var gibi görünmektedir.

Tam uzunluktaki HER2'den, proteolitik dökülme ve alternatif translasyon gibi farklı mekanizmalarla CTF'ları oluşur. Metalloproteazlar, HER2'nin ekstrasellüler domaininin, transmembran domainin proksimal bölümünden ayrılmasına neden oldukları için bu mekanizma proteolitik dökülme olarak bilinir. Bu şekilde alanin 648'den başlayan ve 95-100 kilodalton ağırlığında bir CTF fragmanı meydana gelir. Bu fragman yaygın şekilde p95 HER2 olarak bilinir (45). Alternatif translasyon mekanizması ise, HER2'yi kodlayan mRNA'nın, 611. ve 687. pozisyonda yer alan başlangıç aminoasidi metioninden başlayarak alternatif şekilde kodlama yapması şeklinde tanımlanır (45). Alternatif translasyon mekanizması ile oluşan bu iki fragman, sırasıyla 611-CTF ve 687-CTF olarak da bilinir. 611-CTF fragmanı, bir sinyal peptidi içermemesine rağmen sekretuvar yolaklarda etkindir. Bu fragman, sinyalin plazma membranına taşınmasına yardımcıdır. Buna karşılık, 687-CTF, hem sitoplazmada hem de nükleusta bulunabilir. Ancak, solubl intrasellüler 687-CTF fragmanı, intakt bir kinaz domainine sahip olmasına rağmen inaktiftir. Transmembran domaini içeren 648- ve 611-CTF'ları ise çok sayıda intrasellüler sinyal transdüksiyon

yolaklarını aktive edebilir (48). İntrasellüler sinyal iletim yollarının aktivasyon seviyesi, 648CTF ve 611-CTF arasında da belirgin farklılık gösterir. 611-CTF, disülfid bağlarının korunmasını sağlayarak sürekli olarak homodimerler oluşturduğu için, mitozu aktive eden protein kinazı ve Akt yollarını, 648-CTF ye göre daha fazla aktive eder. Buna karşın 648-CTF homodimerler oluşturmaz ve aktivitesi tam uzunluktaki HER2 benzerdir. Böylece p95HER2 pozitif tümörlerin progresyonunda, muhtemelen 611-CTF gen durumunun etkili olduğu ve trastuzumab kullanımının bu gibi hastalarda hedefe yönelik tedaviyi sağlayamacağı sonucuna ulaşılmıştır (48).

Tam uzunluktaki HER2 ekspresyon seviyesi, primer ve metastatik meme kanserinde benzerdir. Ancak p95HER2 ekspresyonu, metastatik lenf nodlarında primer tümördeki ekspresyona göre belirgin şekilde artış gösterir, bu durum da hastalık progresyonu ve metastazdaki rolünü ortaya çıkarmaktadır (58). Saez ve arkadaşları, p95HER'nin prognostik önemini araştırdıkları çalışmalarında, HER2 ve p95HER2 seviyelerini western-blot analizi ile değerlendirmişlerdir. Western blot, HER2 durumunu belirlemek için nadiren kullanılır. Bunun nedeni, rutin örnekler için pratik değildir ve daha kullanışsızdır. Ancak tam uzunluktaki HER2 ile p95HER2 arasında ayırım yapmak için kullanılabilir metoddur. Saez ve arkadaşları HER2 ve p95HER2 seviyelerini yüksek-düşük seviye şeklinde değerlendirmişlerdir. Bu çalışma, 483 primer meme kanser hastasını içermektedir. HER2 aşırı ekspresyonu bulunan hastaların sayısı 145 (%30) olarak saptanmıştır. Hastaların 44'ü, (%9), p95HER2 için yüksek seviyelerde pozitif olarak belirlenmiştir. Primer tümörde p95HER2'nin yüksek seviyesinin azalmış hastaliksız sağkalımı ile korele ($p=0,0001$) olduğunu ancak yüksek HER2 seviyesinin azalmış hastaliksız sağkalım ile korele olmadığını ($p=0,261$) bulmuşlardır (58). Bizim çalışmamızda p95HER2 seviyeleri bir eşik değerine göre düşük-yüksek şeklinde iki ayrı gruba ayrılmamıştı. Hastaliksız sağkalım ve tamsağkalım parametreleri ölçüm verileri (ay cinsinden-parametrik bir değer) cinsindendi. HER2 ve p95HER2 ekspresyon seviyeleri de parametrik bir ölçüm verisiydi. Çalışmadaki tüm hastalar için, hem HER2 hem de p95HER2 ekspresyon seviyesi azalmış hastaliksız sağkalım ile korele değildi (sırasıyla ($p=0,071$ ve $p=0,517$)). Ancak, çalışmamızda, trastuzumab direnci gösteren grupta yüksek p95HER2 ekspresyon düzeyi ile azalmış hastaliksız sağkalım süresi arasında ($p=0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı.

p95HER2 aşırı ekspresyonunun ksenograftlarda ve insan meme tümörlerinde trastuzumaba azalmış cevap ile birlikte olduğu bildirilmiştir (59). Bu retrospektif analiz, tam uzunlukta HER2 eksprese eden hastalara göre p95HER2 eksprese eden hastalarda, trastuzumab ve trastuzumab-kemoterapi kombinasyonuna önemli oranda azalmış cevap oranları saptanmıştır. p95HER2, immnunofloresan metod ve western-blot analizi ile belirlenmiştir ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bilindiği gibi bu değerlendirme yöntemleri protein düzeyini ölçen yöntemlerdir. Bu yöntemler yerine günlük rutinde daha yaygın kullanılabilecek ve tekrarlanabilirliği yüksek testlere ihtiyaç vardır.

p95HER2 seviyelerini, ölçümsel olarak (kantitatif) saptamak üzere bir değerlendirmenin yapıldığı çalışmada (54), HER2 pozitif metastatik meme kanser hastalarında trastuzumabla tedaviye önemli oranda azalmış progresyonsuz sağkalım saptanmıştır. Bizim çalışmamız ilk tanı sırasında uzak metastaz bulgusu bulunan meme kanser olgularını içermiyordu. Çalışmaya alınan tüm olguların primer invaziv tümör alanlarından alınan örneklerde, p95HER2 ekspresyon seviyesi analiz edildi. Klinik olarak trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular ayrıca değerlendirildi.

Bilindiği gibi meme kanserlerinin bugün için geçerli moleküler sınıflamasında, HER2 ve ER ekspresyonu önemli bir oynar. Bu iki reseptör, etkin ve yaygın olarak kullanılan anti-tümör ilaçlar için hedeftir. Malign progresyon sırasında, HER2 ve ER çapraz etkileşim gösterebilir. Bazı meme kanser hastalarında, HER2 aşırı ekspresyonu, ER düzenleniminde inhibisyona ve anti-ER tedavilere cevabın azalmasına neden olur. Kötü prognoz gösteren HER2 pozitif meme kanser hastalarının bir kısmında p95HER2'nin aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Palau ve arkadaşları, p95HER2 ve ER arasındaki fonksiyonel etkileşimin analiz edildiği bir çalışma yapmışlardır (60). Bu çalışmada, kültüre edilmiş meme kanser hücrelerinde, p95HER2 ekspresyonunun, ER'yi baskıladığı ve anti-ER tedaviye direnç sağladığı gösterilmiştir. Bu etkiyi, bir klinik tablo modelinde de gösterebilmek amacıyla meme kanser örneklerinde (immun aracılı) p95HER2'yi saptamak için spesifik antikorlar geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu spesifik antikorlar ile, p95HER2 eksprese eden tümörlerin %31,2'sinin ER ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır. Buna karşılık, ER ve HER2 eksprese eden, ancak p95HER2 eksprese etmeyen tümörler %72,6 olarak

bulunmuştur. Bu oranın (%72,6), ER eksprese eden HER2 negatif tümörlere benzer bir oran olduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışma ile HER2 pozitif tümörlerde, ER'nin baskılanmasında p95HER2'nin önemli olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmamızda ER reseptör pozitifliği, trastuzumab direnci bulunmayan hastalarda (%71,4), trastuzumab direnci bulunan hastalara (%54,5) göre daha fazla olarak saptandı. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,453$).

Bu çalışmada, trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen olgular arasında tümör boyutu ($p=0,034$) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin varlığı saptanmış olup bu konuda böyle bir ilişkinin daha önce değerlendirildiğini gösteren bir bilgi literatürde bulunamamıştır. Tüm çalışma olguları analiz edildiğinde p95HER2 ekspresyon seviyesi ile tümör boyutu ($p=0,035$) arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu anlamlı ilişkiyi, p95HER2 ekspresyonun, tümör hacminin artışı ile artacağı şeklinde basitçe açıklamak mümkün değildir. Çünkü tüm hasta grubunda da benzer anlamlı bir ilişki mevcuttu. Bu nedenle trastuzumab direnci gösteren olgularda tümör boyutu daha büyüktür sonucuna ulaşamamıştır.

Çalışmadaki tüm hastalar göz önüne alındığında, p95HER2 ekspresyon seviyesi ile lenfatik invazyon ($p=0,191$), perinodal tutulum ($p=0,646$), metastatik lenf düğümü sayısı ($p=0,744$), metastaz ($p=0,179$) ve hastalıksız sağkalım süresi ($p=0,517$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonucun, tüm hastaları içeren grupta başka parametrelerin sonucu etkiliyor olabileceği düşünülmüştür.

Sperinde ve arkadaşları 25.06.2013 tarihinde, "US 8,470,542 B2" patent numarası ile örnekte p95HER2 ve p95HER2 ilişkili yapıların ölçümü için uygulanan metod ve değerlendirmeler ve/veya p95'e özgü antikolar için patent almışlardır (61).

Son yapılan çalışmalarda p95HER2'nin immunohistokimyasal değerlendirme yöntemleri kullanılmaktadır (56,57). Bu çalışmalarda Sperinde ve arkadaşlarının ürettiği antikor kullanılarak formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş tümör içeren bloklardan hazırlanan kesitlerde, immunohistokimyasal değerlendirmeyle p95HER2 protein ekspresyonu analiz edilmiştir (54). Kocar ve arkadaşlarının çalışmasındaki hasta grubu, HER2 pozitif metastatik meme kanseri tanısı konmuş ve trastuzumab içeren birinci basamak tedavi almış hastalardan oluşmaktaydı (57). Bu hastalara ait meme kanser dokusunda immunohistokimyasal yöntemle p95HER2 ekspresyonu

analiz edilmiştir. Çalışma 38 hasta içermektedir. p95HER2 ekspresyonu pozitif veya negatif şeklinde tanımlanmıştır. Olguları 14'ünde (%36,8) p95HER2 pozitif olarak bulunmuştur. Ancak, p95HER2 ekspresyonu ile tam sağkalım, hastalıksız sağ kalım ve trastuzumaba cevap arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Çalışmayı yapan araştırmacılar immunohistokimyanın kullanıldığı bir analizin, p95HER2'yi belirlemek için yeterli olmayabileceğini düşündüklerini belirtmişlerdir. Ayrıca daha geniş hasta grupları ile çalışmaya gereksinim olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışma için biz de benzer düşüncelere sahibiz. Çalışmada yalnızca immunohistokimyasal değerlendirme yapılmıştır. Tümör hücresinin protein ekspresyonu dışında daha moleküler düzeyde bir başka yöntemin kullanılması sonucu etkileyebileceğini düşündük. Çalışmadaki olgu sayısı çok sınırlıdır. Ancak bu gibi çalışmalarda olgu sayısını arttırmak için ortak yapılacak çalışmalar sonuçları olumlu yönde etkileyebilir.

Bir başka önemli konu, meme kanserinde, trastuzumab kullanımına azalmış cevap olarak ne anlatılmak istendiğidir. Literatürde 2011 yılında Wong ve arkadaşlarının yaptıkları metaanaliz çalışmaları ile trastuzumab direnci ve refrakterliği tanımlı çok açık ve net bir şekilde yapılmıştır (52). Trastuzumab direnci, metastatik HER2 pozitif meme kanseri tanımlı hastanın birinci basamak tedavisinin (trastuzumab±kemoterapi) 8.-12. haftasında yapılan ilk radyolojik değerlendirmede, progresyon varlığı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca adjuvan trastuzumab tedavisi sırasında yada tamamlanmasından sonraki 12 ay içinde ortaya çıkan rekürrensler de trastuzumab direnci olarak tanımlanmıştır. Trastuzumab refrakterliği ise, trastuzumab içeren 1. basamak tedavinin ilk radyolojik değerlendirmesinde stabil olan yada regresyon saptanan hastalarda trastuzumab içeren 2. yada 3 basamak tedavi sonrası progresyon gelişmesi olarak tanımlanabileceğini bildirmişlerdir (52).

Bu tarihe kadar trastuzumab direnci ve refrakterliği birbirinin yerine kullanılan karmaşık terimlerdi. Bu nedenle de literatürdeki trastuzumab direnci ile ilgili çalışmaları birbiri ile karşılaştırmak zordur. Wong ve arkadaşları aynı çalışmada trastuzumab rezistansı veya trastuzumab refrakter hastalık ile intrinsik yada edinsel rezistans arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir model önermişlerdir (52). Bu modelde, trastuzumab rezistansı ve trastuzumab refrakterliği trastuzumab yetersizliğinin klinik gözlemi olarak tanımlanmıştır. İntrinsik ya da edinsel rezistansın ise tümörün biyolojisini gösterdiği düşünülmüştür. Bu düşünce modeline göre, intrinsik

rezistansın, trastuzumaba dirençli hastalıkta baskın bir rol oynadığı diğer yandan, edinsel rezistansın trastuzumab refrakter hastalıkta nispeten daha önemli olduğunu belirtmişlerdir. Yukarıda, araç ve gereçler ana başlığı altında, trastuzumaba direncin tanımı alt başlığı içinde ayrıntılı olarak açıklanmış ve görsel olarak sunulmuştur.

Meme kanser hastalarında, HER2 pozitifliği, beyin metastazı gelişimi açısından artmış bir risk faktörüdür. Bu risk faktörünün çeşitli nedenleri tanımlanmıştır. Bu nedenlerden biri, HER2 pozitif hastalığın, meme dışı organlara yayılım potansiyeli olan daha kötü seyirli bir meme kanseri subtipi olması ile açıklanmıştır (62). Diğer neden, santral sinir sistemi dokusunun, HER2'yi aşırı eksprese eden hücreler için tercih edilen bir göç yeri olduğu tanımlanmıştır. Ancak bu hipotez, klinik çalışmalarda doğrulanmamıştır (63). Diğer ve son açıklama, HER2 pozitif meme kanser hastalarının trastuzumabla tedavisinin, ekstrakranial hastalık kontrolünü etkin şekilde sağladığı, hastaların daha uzun yaşadığı ve sonuç olarak da santral sinir sistemi tutulumunun daha sık olarak ortaya çıkacağı şeklindedir. Trastuzumab etkinliğini değerlendirmede beyin metastazı tartışmalı bir konudur. Biz çalışmamızda, trastuzumab kullanımında progresyonun ilk ve tek yeri olarak beyin metastazlarının varlığını, trastuzumab direnci olarak değerlendirmedik. Çünkü hem metastatik hem de adjuvan trastuzumab tedavisi sırasında yalnızca santral sinir sistemi metastazının gelişim, bu ilacın santral sinir sistemine zayıf penetrasyonu ile açıklanabileceğini düşünüyoruz. Hatta tam tersine santral sinir sistemi dışı hastalığı kontrol etmede etkin olduğunu gösterir diye düşünmek de mümkündür.

Duchnowska ve arkadaşları, beyin metastazı gelişmiş hastaların hem primer tümöründe hem de beyin metastazında p95 VeraTag yöntemini kullanarak, kantitatif p95 protein ekspresyonunu değerlendirmişlerdir (53). p95Vera Tag ölçümünde, p95'in aktif M611 karboksi terminal fragman formuna karşı spesifik bir fare (Mouse) p95 monoklonal antikör kullanılmıştır. Bu antikör, floresan işaretli bir bağlayıcı ile konjuge olan anti-mouse sekonder antikora bağlanır. Bu bağlanma ditiotretiol tarafından, redüksiyona duyarlı bir bağlayıcı ile sağlanmaktadır (54). Duchnowska ve arkadaşları, bu çalışmada açığa çıkan flüoresen bağlayıcıyı, kapiller elektroforezle kantite etmişlerdir. Tümöre ait dokunun kesitlerinde, invaziv tümör alanının her milimeterkaresine karşılık gelen rölatif floresan (RF) bölgelerini belirleyebilmek için, parafinize doku kesitlerindeki invaziv tümör alanları kullanılmıştır. Ölçümler, bilinen

p95 hücre hattı standartlarına göre normalize edilmiştir (54) . $p95 \geq 2,8$ RF/mm² pozitif olarak kabul edilerek yapılmıştır. Bu çalışmada, beyin metastazında p95HER2 ekspresyon ortalaması, primer tümördeki p95HER2 ekspresyonundan 1,5 kat fazla olarak bulunmuştur ($p=0,007$) ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır (53). Bizim çalışmamızda beyin metastazı gösteren 2 hasta mevcuttu. Bu hastaların primer tümörlerindeki p95HER2 ekspresyon seviyeleri; 1,43 (76 no'lu olgu) ve 0,59 (77 no'lu olgu) olarak belirlenmişti. p95HER2 ekspresyon seviyelerininin ortalama değerini, trastuzumab direnci gösteren ve göstermeyen hastalarda karşılaştırma yaptığımızda trastuzumab direnci gösteren hastalarda, yaklaşık 5 kat gibi bir artış saptandı. Ancak biz sadece primer tümörde değerlendirme yaptık. Metastatik tümörde, p95HER2 ekspresyon analizi yapılmadı. Duchnowska ve arkadaşları bu çalışmada p95HER2 ekspresyonu yanı sıra HER2 toplam protein ekspresyonunu da değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirmeyi, Huang ve arkadaşlarının tanımladıkları HERmark ölçümlemleri kullanarak yapmışlardır (55). HERmark, 2010 yılında meme kanseri için özel olarak tasarlanmış, VeraTag teknoloji platform uygulamasının yeni bir örneğidir. İki farklı kantitatif ölçüm içerir; toplam HER2 ekspresyonu ve HER2 homodimerleri. Bu ölçüm değerlendirmeleri formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş dokularda yapılmaktadır. HERmark assay, formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş dokularda, protein ekspresyonu ve protein-protein komplekslerini (hücre yüzey dimerleri ile birlikte), doğru ve tekrarlanabilir şekilde ölçmek için tasarlanmış bir metoddur.

Toplam HER2 ekspresyonu ve HER2 homodimerleri, HER2'nin sitoplazmik domainine karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikora bağlanan floresan belirleyicinin (VeraTag ajanı), salınımı yoluyla saptanır. VeraTag ajan moleküllerinin salınımı, HER2 ışık duyarlı molekül antikoruna, VeraTag antikorunun moleküler yakınlığını gerektirir. Kapiller elektroforez ile ölçülen sinyal, formalinde fikse parafinize doku kesitindeki invaziv tümör alanına normalize edilir. Birbirini takip eden HER2 sonuçları HERmark negatif, HERmark kuşkulu ve HERmark pozitif olarak gruplanır. HERmark değeri $<10,5$ ise negatif; HERmark değeri $10,5 \leq \text{HERmark} \leq 17,8$ ise kuşkulu; HERmark değeri $> 17,8$ ise pozitif olarak değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme yöntemi, *Clinical Laboratory Improvement Amendments* ile tanımlanan şartlara uygun

olarak geçerliliği onaylanmıştır. Ayrıca, özel biyolaboratuvar şartlarında CAP sertifikalı klinik referans laboratuvarında da uygulanmaktadır (55) .

Duchnowska ve arkadaşları, primer meme kanseri ve aynı tümörün beyin metastazında, HERmark yöntemi ile ölçtükleri kantitatif HER2 ekspresyon seviyelerini, beyin metastazında primer tümöre göre 2,1 kat daha yüksek ($p<0,0001$) bulmuşlardır (53). Bu çalışmanın sonucu olarak (beyin metastazında HER2 ve p95HER2'nin artmış ekspresyonunun saptanması), geniş tabanlı meme kanser hasta popülasyonunu içeren klinik çalışmalarda diğer biyobelirleyiciler yanı sıra HER2 ve p95HER2'nin kantitatif ölçümlerinin yer alması için bir gerekçe sağlayacağı açıktır.

Trastuzumab yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Trastuzumab, HER2'ye yüksek afinite ile bağlanarak sağkalım yollarının inhibisyonuna, HER2'nin diğer HER reseptörleri ile heterodimer formasyonunun oluşumunun inhibisyonuna yada lizozomlarda HER2'nin endositozuna ve degradasyonuna neden olarak sitostatik bir etki oluşturur. İn vivo olarak, trastuzumabın antikor bağımlı hücresel sitotoksite ve kompleman bağımlı sitotoksite gibi immun cevapların indüksiyonuna aracılık edebilme yeteneği gösterilmiştir (42). Trastuzumab direnci hakkında yapılan çok sayıda prelinik çalışmalar ve hücre hattı çalışmaları ile gösterilmiş çeşitli direnç mekanizmalarının varlığı kanıtlanmıştır. Ancak, şimdiye kadar trastuzumab direnci gösteren hastalarda etkin bir tedavi modeli geliştirilememiştir. Bu nedenle, trastuzumaba cevap vermeyen HER2 pozitif hastalar için alternatif tedavi sağlayabilecek yeni stratejilerin geliştirilmesi gereklidir. Bu konuda son zamanlarda yapılan bir çalışmada, bir multisubunit proton pompası olan, vakuolar H^+ -ATPaz (V-ATPaz)'ın bu anlamda bir hedef olabileceği düşünülmüş ve trastuzumab direncindeki rolü araştırılmıştır (64). V-ATPaz, ökaryotik hücrelerde, pH dengesinin düzenlenmesinden sorumludur. Bu molekül, membranöz proton translokasyonu yapan V_0 subüniti ve ATP'nin hidrolize edildiği sitoplazmik V_1 subünitinden oluşmaktadır (65). Bu moleküllerin, hücre içi yolların, çeşitli aşamalarında, rol oynadıkları bilinmektedir (66). Bu bilgiler ışığında, Schwarzenberg ve arkadaşları, V-ATPaz'ın inhibisyonunun (endositotik yolağın masif şekilde bozulmasına neden olarak), meme tümör hücrelerinde onkojenik HER2 sinyalizasyonunu engelleyebileceğini düşünmüşlerdir (64). V-ATPaz'ın inhibe edilmesinin, trastuzumabın etki mekanizmasından tamamen bağımsız bir etki

mekanizması olduğu için trastuzumab direnci bulunan tümörlerde etkin olacağı öngörölmüştür. *Arkazolid*, miksobakteriyal orjinli etkin bir V-ATPaz inhibitörüdür (67,68). Tüm bu bilgileri birleştirek, Schwarzenberg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, arkazolidin hem in vivo hem de in vitro olarak trastuzumaba direnç gösteren hücre hattının (JIMT-1) gelişimini inhibe ettiğini ve apoptoza yol açtığını göstermişlerdir (64). Ayrıca, bu gibi etkilerin, HER2 ilişkili sinyalizasyonun inhibisyonu ve hücre yüzeyindeki HER2'nin azalmış ekspresyonu ile birlikte olduğunu da göstermişlerdir (64). Bu çalışmanın sonuçları, V-ATPaz inhibisyonunun, trastuzumaba dirençli tümörlerin tedavisi için bir hedef olabileceği umudunu vermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

HER2 pozitif meme kanseri, farklı bir moleküler ve klinik antitedir. Hedef tedavinin gelişmesinden önce, HER2 pozitif hastalıkta, HER2 negatif hastalığa göre, kısalmış hastalıksız sağkalım ve tam sağkalım görülmekteydi. Trastuzumabın, klinik uygulanıma girişi ile HER2 pozitif meme kanserinin tedavisi ve prognozu olumlu yönde değişmiştir. Ancak, bu hedef ajanın, etkin aktivitesine rağmen, bazı HER2 pozitif hastalarda hastalık progresyonu görülmektedir. Ortaya çıkan progresyonu açıklamak için yapılan çok sayıda çalışmalar sonucunda, progresyona neden olan durumlar arasında p95HER2'nin rolü olduğu kanıtlanmıştır.

Trastuzumab uygulanımına rağmen progresyon gösteren hastaları önceden belirlemek ve trastuzumab yerine bir başka ilacın kullanılmasını sağlayabilmek önemlidir. Ancak, bu grup hastalarda yalnızca p95HER2'nin rolü olmadığı da bir gerçektir.

Bu çalışmada p95HER2'nin trastuzumab direnci gösteren olgularda trastuzumab direnci göstermeyen olgulara göre yüksek seviyede olduğu saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca, HER2 ekspresyon seviyesi trastuzumab direnci gösteren olgularda, trastuzumab direnci göstermeyen olgulara göre daha düşük seviyedeydi ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu durum, p95HER2 aşırı ekspresyonunun, normal uzunluktaki HER2 ekspresyonunu baskıladığını düşündürmüştür.

p95HER2 ekspresyonunun, trastuzumab direncinin öngörülmesinde değerlendirilmesi gereken biyobelirteçler arasında yer alması gereklidir.

HER2 pozitif meme kanser hastalarının prognozunu iyileştirmek için hedef moleküler ve klinik çalışmaların yapılması gereklidir. Bu çalışmalarda direnç gelişimi öncesinde ve direnç gelişimi sonrasında, etkin şekilde tümör dokusunun elde edilmesi çok önemlidir. Yapılacak klinik çalışmalar aracılığıyla HER2 yolak direnç mekanizmalarının prospektif analizi, next jenerasyon sekanslama teknolojileri, ve consistent tanımlamaları gelişim için öncelikli bir alandır. Tedavi cevabını ve direncini öngörebilecek biyobelirteçlerin geliştirilmesi aşağıdaki nedenlerle büyük öneme sahiptir;

- HER2 hedef tedavilerinin maliyetini iyileştirmek,

-HER2 yolak ilişkili intrinsik dirençli hastalar için yeni tedavi edici yaklaşımları geliştirmek,

-Tedavinin gruplandırılmasının sağlanması

-Hasta prognozunun iyileştirilmesi.

7. KAYNAKLAR:

- 1- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61: 69-90. (PMID: 21296855)
- 2- Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. CA Cancer J Clin 2006;56: 37-47. (PMID: 16449185)
- 3- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: IARC Press, 2012: 8-9.
- 4- Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol 2009;6: 718-30. (PMID: 9942925)
- 5- Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schäfer KL, et al. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. J Pathol 1999;189: 521-6. (PMID: 10629552)
- 6- Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. Breast Cancer Res 2010;12: 207. (PMID: 20804570)
- 7- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2010;120: 293-308. (PMID: 20107892)
- 8- Denoix PF. Nomenclature classification des cancers [in French]. Bull Inst Nat Hyg (Paris) 1952;7: 743-8.
- 9- International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. Geneva, Switzerland: International Union Against Cancer; 1968.
- 10- Veronesi U, Viale G, Rotmensz N, Goldhirsch A. Rethinking TNM: Breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research The Breast 2006;15: 3-8. (PMID: 16473737)
- 11- Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1992;22: 207-19. (PMID: 1391987)
- 12- Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. J J Clin Oncol 2001;15;19: 980-91. (PMID: 11181660)

- 13- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, et al. Panel members: Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16: 1569-83. (PMID: 16148022)
- 14- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406: 747-52. (PMID: 10963602)
- 15- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, et al. Gene expression patterns breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(19): 10869-74. (PMID: 11553815)
- 16- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression datasets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;1(14): 8418-23. (PMID: 12829800)
- 17- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8): 1160-7. (PMID: 19204204)
- 18- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7: 96-107. (PMID: 16643655)
- 19- Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006;11(8): 868-77. (PMID: 16951390)
- 20- Andre F, Pusztai L. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nat Clin Prac Oncol* 2006;3(11): 621-32. (PMID: 17080180)
- 21- Kapp AV, Jeffrey SS, Langerod A, Borresen-Dale AL, et al. *BMC Genomics*. 2006;7(1): 231. (PMID: 16965636)
- 22- Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, et al. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interob-server agreement. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(8): 662-73. (PMID: 21421860)
- 23- Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S, Culhane AC, et al. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst* 2012;104: 311-25- (PMID: 22262870)

- 24- Prat A, Parker JS, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(1): 301-6. (PMID: 22752290)
- 25- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3271-7. (PMID: 20498394)
- 26- Korde LA, Lusa L, McShane L, Lebowitz PF, et al. Gene expression pathway analysis to predict response to neoadjuvant docetaxel and capecitabine for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119: 685–99. (PMID: 20012355)
- 27- Wolff AC, Hammond E, Hicks D, Dowsett M, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(2): 241-56. doi:10.5858/arpa.2013-0953-SA.
- 28- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235: 177-82.
- 29- Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004;5: 63-9.
- 30- Molina MA, Saez R, Ramsey EE, Garcia-Barchino MJ, et al. NH(2) –terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 347-53.
- 31- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fucks H, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344: 783-92.
- 32- Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol* 1990;2: 992-1003.
- 33- Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, et al. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 1995;14: 4267-75.

- 34- Zhang K, Sun J, Liu N, Wen D, et al. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 1996;271: 3884-90.
- 35- Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2003;22: 3205-12.
- 36- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;16: 2659-71.
- 37- Gennari R, Ménard S, Fagnoni F, Ponchio L, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumours overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5650-5.
- 38- Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 2010;375: 377-84.
- 39- Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene* 2003; 22: 6570–8.
- 40- Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 2001;12(1): 3-8.
- 41- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, et al. Ligand-independent HER2 /HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 2009;15: 429-40.
- 42- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5: 341-54.
- 43- Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001;93: 1852-7.
- 44- Shimizu C, Hasegawa T, Ando M, Fujiwara Y, et al. Relation between Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression and the efficacy of trastuzumab (T)

monotherapy for hormone-resistant HER2-positive metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 2004;22: 9578.

45- Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci* 2010;102(10): 1-8.

46- Yuan CX, Lasut AL, Wynn R, Neff NT, et al. Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site. *Protein Expr Purif* 2003;29: 217-22.

47- Sasso M, Bianchi F, Ciravolo V, Tagliabue E, Campiglio M. HER2 splice variants and their relevance in breast cancer. *Journal of Nucleic Acids Investigation* 2011;2(1): 53-9.

48- Pedersen K, Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, et al. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumour growth and metastasis. *Mol Cell Biol* 2009;29: 3319-31.

49- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AL, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005;65: 473-82.

50- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20: 719-26.

51- Baselga J, Carbonell X, Castañeda-Soto NJ, Clemens M, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005;23: 2162-71.

52- Wong H, Leung R, Kwong A, Chiu J, et al. Integrating molecular mechanisms and clinical evidence in the management of trastuzumab resistant or refractory HER-2⁺ metastatic breast cancer. *The Oncologist* 2011;16(11): 1535-46.

53- Duchnowska R, Sperinde J, Chenna, Huang W, et al. Quantitative HER2 and p95HER2 levels in primary breast cancers and matched brain metastases. *Neuro-Oncology* 2015; 0,1-9. doi:10.1093/neuonc/nov012

54- Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010;16: 4226–35.

- 55- Huang W, Reinholz M, Weidler J, Lie Y, et al. Comparison of Central HER2 Testing With Quantitative Total HER2 Expression and HER2 Homodimer Measurements Using a Novel Proximity-Based Assay. *Am J Clin Pathol* 2010;134:303-311. doi:10.1309/AJCP3BZY4YAFNTRG
- 56- Tural D, Serdengecti S, Demirelli F, Öztürk T, et al. Clinical significance of p95HER2 overexpression, PTEN loss and PI3K expression in p185HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *British Journal of Cancer* 2014;110:1968-76. doi:10.1038/bjc.2014.72.
- 57- Kocar M, Bozkurtlar E, Telli F, Yumuk F, et al. p95-HER2 and trastuzumab resistance in metastatic breast cancer; is immunohistochemistry appropriate? *J BUON* 2014 Jan-Mar;19(1): 245-9.
- 58- Sa´ez R, Molina AM, Ramsey EE, Rojo F, et al. p95HER-2 Predicts Worse Outcome in Patients with HER-2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(2): 424-31.
- 59- Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, et al. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti - HER2 Therapies in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99: 628-38.
- 60- Parra-Palau JL, Pedersen K, Peg V, Scaltriti M,. A Major Role of p95/611-CTF, a Carboxy-Terminal Fragment of HER2, in the Down-modulation of the Estrogen Receptor in HER2-Positive Breast Cancers. *Cancer Res* 2010; 70(21): 8537-46.
- 61- <https://www.google.com/patents/US8470542>.
- 62- Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, et al. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991;49(5): 650-5.
- 63- Montagna E, Cancellio G, D'Agostino D, Lauria R, et al. Central nervous system metastases in a cohort of metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63(2): 275–80.
- 64- von Schwarzenberga K, Lajtosb T, Simon L, Müller R, Vereb G. V-ATPase inhibition overcomes trastuzumab resistance in breast cancer. *Molecular Oncology* 2014;8: 9-19.

- 65- Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8: 917-29.
- 66- Kozik P, Hodson NA, Sahlender DA, Simecek N, et al. A human genome-wide screen for regulators of clathrin-coated vesicle formation reveals an unexpected role for the VATPase. *Nat Cell Biol* 2013;15: 50-60.
- 67- Huss M, Sasse F, Kunze B, Jansen R, et al. Archazolid and apicularen: novel specific V- ATPase inhibitors. *BMC Biochem* 2005;6: 13.
- 68- Sasse F, Steinmetz H, Hofle G, Reichenbach. Archazolids, new cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production, isolation, physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* 2003;56: 520-5.

8. EKLER:

8.1. Laboratuvar Kullanım İzin Belgesi:



TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı



Sayı : 51202101 /
Konu :

İLGİLİ MAKAMA;

Uzman Dr. Nüket ELİYATKIN'ın 'Meme Kanserinde Trastuzumab Tedavisine Dirençte p95'in Rolü' başlıklı Temel Onkoloji Doktora Programı tez çalışması uygulamaların, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji AD. Bşk.

Mithatpaşa Caddesi No:1606 İnciraltı 35340 İzmir
Tel: 0(232) 412 8201 Fax: 0(232) 278 9495
e-posta: temelonkoloji

Ayrıntılı bilgi için
Gülperi ÇANKAYA
Tel.: 412 8201

izmir

8.2. Etik Kurul Belgesi:

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/22-15	Tarih:30.06.2011
	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu "Meme Kanserinde İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörüne (HER) Karşı Uygulanan Tedaviye Dirençte P95'in Rolü" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Ösman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Adem</i>
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Mehtap</i>
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Zuhal</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Nejat</i>
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ömer</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Servet</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>M. Güneli</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ayşe</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>İşıl</i>
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Meltem</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>İhsan</i>

8.3. Tez Başlık Değişikliğine İlişkin Etik Kurul Belgesi:

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2015/14-45	Tarih:28.05.2015
	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu "Meme Kanseriinde İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörüne (HER) Karşı Uygulanan Tedaviye Dirençte P95'in Rolü" isimli klinik araştırmaya ait sorumlu araştırmacı tarafından gönderilen dilekçeye ilişkin olarak; -Çalışma adı değişikliği (yeni çalışma adı: Meme Kanseri ve Trastuzumab Tedavisine Dirençte p95'in Rolü) ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Banu
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Reyhan
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Nejat
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ece
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Vesile
Prof.Dr.Ahmet Turan IŞIK	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ayşe
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Nihal
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Müge
Doç.Dr.Şeyda Seren INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Sefa
Doç.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	Mehmet

8.4. Özgeçmiş ve Yayın Listesi

ÖZGEÇMİŞ

Yrd.

Doçent NUKET ELİYATKIN

TC Kimlik No / Pasaport No:	31729046888
Doğum Yılı:	1968
Yazışma Adresi :	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı 09010 Aydın/Türkiye
Telefon :	256-2181800
e-posta :	drnuket2003@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi		Tıbbi Patoloji	Tıpta Uzmanlık	1999
Türkiye	Ege Üniversitesi	TIP FAKÜLTESİ	TIP FAKÜLTESİ	Lisans	1991

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Adnan Menderes Üniversitesi	Türkiye	Aydın	TIP FAKÜLTESİ	Yrd. Doç. Dr.	2014-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Meme Kanseriinde Trastuzumab Tedavisine Dirençte p95'in Rolü	Dokuz Eylül Üniversitesi	54	01.06.2012-01.06.2014	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Türk Kulak Burun Boğaz & Baş Boyun Cerrahisi Vakfı Prof. Dr.Orhan SUNAR Poster Ödülü	Türk Kulak Burun Boğaz & Baş Boyun Cerrahisi Vakfı	2014

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

Ozgur, Halil Hakan; Ercetin, Ayse Pinar; Eliyatkin, Nuket; Seren, Asli; Kupelioglu, Ali; Ortac, Ragip; Diniz, Gulden; Aktas, Safiye, Regulatory T Cells and Their Prognostic Value in Hepatopancreatobiliary Tumours, 2014, HEPATO-GASTROENTEROLOGY
Coskun, Ali; Eliyatkin, Nuket; Yildirim, Mehmet; Top, Omer Erdinc; Vardar, Enver; Erkan, Nazif, Completely free and mobile intra-abdominal tumor, 2014, SURGERY
Ozgur Halil Hakan; Ercetin Ayse Pinar; Eliyatkin Nuket; Seren Asli; Kupelioglu Ali; Ortac Ragip;Diniz Gulden; Aktas Safiye, Regulatory T Cells and Their Prognostic Value in Hepatopancreatobiliary Tumours, 2014, Hepato-gastroenterology
Postaci, Hakan; Zengel, Baha; Yazarbas, Ulkem; Uslu, Adam; Eliyatkin, Nuket; Akpinar, Goksever; Cengiz, Fevzi; Durusoy, Raika, Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer: Predictors of Axillary and Non-Sentinel Lymph Node Involvement, 2013, BALKAN MEDICAL JOURNAL
Eliyatkin, Nuket; Top, Ömer Erdinç; Yalçın, Evrim; Zengel, Baha; Özgür, Hakan; Aykas, Ahmet; Vardar Enver, Phylloides Tumor of Anogenital Mammary-like Glands with Diffuse Pseudoangiomatous Stromal Hyperplasia, 2013, Turkish Journal of Pathology
Eliyatkin, Nuket; Zengel Baha; Aktaş Safiye, Meme Kanserinde HER-2/NEU (C-ERB-B2) Durumunun Önemi: Hangi Yöntemle Değerlendirmek Daha Uygun? , 2013, Meme Sağlığı Dergisi
Eliyatkin, Nuket; Öztürk Rafet; Postacı Hakan; Vidinli Halit, Endoservikal Mavi Nevüs, 2013, İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi
Zengel Baha; Yazarbaş Ulkem; Duran Ali; Uslu Adam; Eliyatkin Nuket; Demirkıran Mehmet Ali; Cengiz Fevzi; Simsek Cenk; Postacı Hakan; Vardar Enver; Durusoy Raika., Comparison of the clinicopathological features of invasive ductal, invasive lobular, and mixed (invasive ductal + invasive lobular) carcinoma of the breast, 2013, Breast Cancer
Kuran, Fehmi Doruk; Pekedis, Mahmut; Yildiz, Hasan; Aydin, Figen; Eliyatkin, Nuket, Effect of hyperbaric oxygen treatment on tendon healing after Achilles tendon repair: an experimental study on rats, 2012, ACTA ORTHOPAEDICA ET TRAUMATOLOGICA TURCICA
Uslu, Adam; Bati, Hasan; Postaci, Hakan; Nart, Ahmet; Eliyatkin, Nukhet; Yetis, Halit; Corumlu, Baris; Aykas, Ahmet; Zengel, Baha, Impact of Histopathology on the Outcome of D1/D2 Gastrectomies with R0 Resection, 2012, DIGESTION
Bilgir, Oktay; Bilgir, Ferda; Eliyatkin, Nukhet; Calan, Mehmet; Ercan, Ismail Alper; Isikyakar, Tolgay; Sari, Ferit, Case Report: Blastic Mantle Cell Leukemia, 2011, TRANSFUSION AND APHERESIS SCIENCE
Eliyatkin, Nuket; Gunlusoy, Bulent; Olgun, Alev Gulsah; Sezgin, Arsenal; Postaci, Hakan, Inflammatory Myofibroblastic Tumor of the Urinary Bladder: Differential Diagnosis, 2010, TURKIYE KLINIKLERI TIP BILIMLERI DERGISI
Sezgin, Arsenal; Postaci, Hakan; Eliyatkin, Nuket, Correlation of Gleason scores between needle biopsy and radical prostatectomy specimens in prostatic adenocarcinoma, 2007, VIRCHOWS ARCHIV

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Eliyatkin, Nuket; Özgür, Hakan; Erçetin, Pınar; Aktaş Safiye, Küpelioglu Ali, Meme karsinomlarında HER-2 durumunun immunohistokimyasal ve moleküler analizlerle değerlendirilmesi, 2015, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi
Eliyatkin, Nuket; Yalçın, Evrim; Zengel, Baha; Aktaş, Safiye; Vardar, Enver, Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way, 2015, J Breast Health
Yakan Savaş; Sarı Erdem; Erkan Nazif; Yıldırım Mehmet; Vardar Enver; Coşkun Ali; Çetin Durmuş Ali; Eliyatkin Nükhet, Breast Carcinosarcomas, 2014, J Breast Health
Yıldırım Mehmet; Eliyatkin Nuket; Postacı Hakan; Erkan Nazif, Extra-abdominal Breast Fibromatosis: A Rare Breast Pathology in Medical Practice, 2014, El Mednifico Journal
Yılmaz Murat; Yurt Alaattin; Eliyatkin Nuket; Aydın Ömer, Nörofibromatozis Tip 1'li Hastada Servikal Sinir Kökünden Orijin Alan Nörofibrom Zemininde Gelişen Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörü: Olgu Sunumu., 2013, Türk Nöroşirürji Dergisi
Yıldırım Mehmet; Oztekin Ozgur; Eliyatkin Nuket; Postacı Hakan, A Gastrointestinal Stromal Tumor of the Jejunum Mimicking a Pelvic Mass in a Patient With Von Recklinghausen, 2012, Journal Curr Surgery
Eliyatkin, Nuket; Karasu, Başak; Selek, Elif; Keçeci, Yavuz; Postacı, Hakan, Memenin Hızla Büyüyen Nodüler Psödoanjiyomatöz Stromal Hiperplazisi: Olgu Sunumu, 2011, Turkish Journal Of Pathology
Eliyatkin, Nuket; Karasu, Başak; Selek, Elif; Keçeci, Yavuz; Postacı, Hakan, Memenin Hızla Büyüyen Nodüler Psödoanjiyomatöz Stromal Hiperplazisi: Olgu Sunumu, 2011, Türk Patoloji Dergisi/Turkish Journal of Pathology
Eliyatkin, Nuket; Karasu, Başak; Zengel, Baha; Postacı Hakan, Sigmoid Kolon ve Lenf Düğümünde Ekstragenital Endometriozis: Olgu Sunumu, 2010, Dicle Tıp Dergisi
İlhan, Enver; Eliyatkin, Nuket; Selek, Elif; Sezgin, Arsenal; Tekin, Volkan; Yaylalı, Cemil; Postacı, Hakan; Yıldırım, Mehmet, A Rare Case: Bilateral Phyllodes Tumor of Breast (Metachronous and Synchronous), 2010, The Journal of Breast Health
Gülhan, İbrahim; Eliyatkin, Nuket; Sezgin, Arsenal; Çelik, Esin; Postacı Hakan, Servikovaginal Smear Sonuçlarımızın Analizi ve ?perinükleer halo? nun Önemi, 2008, Medical Journal of Izmir Hospital
Eliyatkin, Nuket; Keçeci Demir, Sibel; Canpolat, Selin; Nart, Ahmet; Postacı Hakan, Nuchal-Tip Fibrom: Olgu Sunumu, 2007, Ege Journal of Medicine
Eliyatkin, Nuket; Keçeci Demir, Sibel; Sezgin, Arsenal; Postacı, Hakan; Tekeli, Tahsin; Deneçli, Ali Galip, Diffuse Hemangiomas of The Spleen-Case Report, 2006, Aegean Pathology Journal
Eliyatkin, Nuket; Sural, Serap; Ağdeniz, Servet; Yıldırım, Mehmet; Postacı, Hakan, Yekişkinde İnvaginasyon Nedeni: İnce Barsak Lipomu, 2006, İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi
Özkök, G; Eliyatkin, Nuket; Sezgin, Arsenal; Sural, Serap; Postacı, Hakan, Dev Rozetler İçeren

Hyalinize İğ Hücreli Tümör: Olgu Sunumu, 2005, SSK İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi (Medical Journal of Izmir Hospital)
Eliyatkin, Nuket; Keçeci Demir, Sibel; Özgüzer, Alp; Postacı, Hakan; Önal, Yusuf Ziya, Kondroid Lipom: Olgu Sunumu, 2005, Ege Journal of Medicine
Eliyatkin, Nuket; Sayhan, Sehnaz; Keçeci Demir, Sibel; Postacı, Hakan; Avcı, Birgül, Pulmoner Hamartomlarda Papiller Projeksiyonların ve Mast Hücrelerinin Varlığı (8 Olguluk Çalışma), 2005, Ege Journal of Medicine
Eliyatkin, Nuket; Çetinel, M; Postacı, Hakan; Erel, Nuri, Servikal Vertebranın Osteoid Osteoması: Olgu Sunumu, 2004, Ege Journal Medicine
Yeniyol, Cem; Yağcı Sayın, Ayşe; Çiçek, Sedat; Eliyatkin, Nuket; Arslan, Murat; Ayder, Ali Rıza; Postacı, Hakan, Renal Hücreli Karsinomda Multifokalite, 2000, SSK İzmir Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi (Medical Journal of Izmir Hospital)
Selek, Elif; Eliyatkin, Nuket; Dikicioğlu, Emel; Postacı, Hakan, Elif Selek, Nuket Eliyatkin, Emel Dikicioğlu, Hakan Postacı. Sekretuar Meningiom: Olgu Sunumu. Ege Tıp Dergisi 38(1): 37-40, 1999., 1999, Ege Journal of Medicine
Yağcı, Ayşe; Eliyatkin, Nuket; Gül, Erdal; Postacı Hakan, Paranasal Sinüste İnvaziv Mukormikozis Olgusu, 1999, Ege Journal of Medicine
Dikicioğlu, Emel; Eliyatkin, Nuket; Tunçyürek Müge, Apendiks vermiformisin Adenokarsinoid Tümörü, 1998, Ege Journal of Medicine
Yağcı, A; Şahin, Tamer; Eliyatkin, Nuket; Postacı, Hakan, Dieulafoy Hastalığı (masif, tekrarlayan kanamaya neden olan, submukozal arteriovenöz malformasyon), 1997, SSK İzmir Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi (Medical Journal of Izmir Hospital)
Dicle, Nilgün, Yağcı, Ayşe; Selek, Elif; Eliyatkin, Nuket, Postacı, Hakan, Primer Apendektomi Materyallerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi (2473 olguluk seri), 1997, SSK İzmir Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi (Medical Journal of Izmir Hospital)

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Ali Küpelioglu. The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer, EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress , 2015
Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Ali Küpelioglu. The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer., EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress , 2015
Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Yasemin Baskın, Zafer Kozacıoglu. Mesanenin Primer Küçük Hücreli Karsinom Olgusunda KIT ve PDGFR-A mutasyon analizi. , II.Nadir Tümörler Sempozyumu-İzmir Onkoloji Günleri, 2015
Güldidar Basmacı, Nuket Eliyatkin, Senem Ersavaş, Hakan Postacı. Malign Tümörlerde Yaygın Osseöz Metaplazi: Mesanenin Yüksek Dereceli Ürotelial Karsinom ve Metastatik Kolon Adenokarsinomu. , 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014
Tiroidin Hyalinize Trabeküler Tümörü, 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014

Güldidar Basmacı, Nuket Eliyatkin, Duygu Ayaz, Hakan Postacı. Renal Pelviste Metaplazi Zemininde Skuamöz Hücreli Karsinom: İki Olgu. , 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014
Nuket Eliyatkin, Senem Deniz, Ayşe Yağcı, Eyüp Yeldan. Kondroid Tipte Mezenkimal Diferansiyasyon Gösteren Metaplastik Meme Karsinomu., 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014
Birgül Karahan, Ayşe Yağcı, Nuket Eliyatkin, Ömer Erdinç Top, Baha Zengel, Hakan Postacı. Granülomatöz Mastit ve İdiyopatik Granülomatöz. Mastit, 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014
Nuket Eliyatkin, Baha Zengel, Ayşe Yağcı, Erdem Çomut, Hakan Postacı. Bilateral Meme Kanseri Hastalarında Metastaz Paterni. , 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014
Nuket Eliyatkin, Ayşe Yağcı, Didem Ersöz, Çağlar Sarıgül, Baha Zengel, Hakan Postacı. Bilateral (Senkron/Metakron) Meme Kanseri Hastalarında MSI Proteinlerinin Önemi. , 24.Ulusal Patoloji Kongresi, 2014
Baha Zengel, Halit Yetiş, Zehra Adıbelli, Fevzi Cengiz, Ahmet Aykas, Cenk Şimşek, Göksever Akpınar, Nuket Eliyatkin, Ali Duran, İsmail Zihni, Barış Çorumlu, Adam Uslu. Distal Rektum Kanseri Hastalarında Neoadjuvan Eşzamanlı Kemoradyoterapinin Yerel ve Bölgesel Yineleme Kontrolüne Katkısı. , 19.Ulusal Cerrahi Kongresi, 2014
Halil Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş. Hepatopankreatobilier Tümörlerde Düzenleyici T Lenfositler ve Prognostik Önemi. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Halil Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş. Hepatopankreatobilier Tümörlerde Düzenleyici T Lenfositler ve Prognostik Önemi., İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Hakan Postacı, Nuket Eliyatkin, Yasin Ceylan, Birgül Çiftçi, Tamer Şahin, Ömer Erdinç Top. Mesane Lenfoepitelyoma Benzeri Karsinomu. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Zafer Kozacıoğlu, Çağlar Sarıgül, Erdem Çomut. Nadir Bir Mesane Karsinomu: Küçük Hücreli Karsinom: Olgu Sunumu. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Nuket Eliyatkin, Çağlar Sarıgül, Didem Ersöz, Yüksel Olgun, Mehmet Emrah Ceylan, Ayşe Yağcı. Nadir Bir Antite: Adult Kistik Lenfanjiom: Olgu Sunumu. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Nuket Eliyatkin, Senem Ersavaş, Sevil Sayhan, Çağlar Sarıgül, İsmail Zihni, Ayşe Yağcı. Leiomyoadenomatoid Tümör Olgusu. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Nuket Eliyatkin, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu. Meme Kanseri Hastalarında Tümör ve Tümör Mikroçevresinde Galektin-1 Ekspresyonu. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014
Nuket Eliyatkin, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu, Baha Zengel, Hakan Postacı. ASCO/CAP 2007 ve 2013 Meme Kanseri Hastalarında HER2 Değerlendirme Önerilerine Göre İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçlarının Karşılaştırılması. , İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu , 2014

Emin Sır, Nuket Eliyatkin, Melike Güngör, Senem Deniz, Alper Aksoy. Ameloblastomun Skalp Metastazı. , Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği 35.Ulusal Kurultayı, 2013
Ayşe Yağcı, Güliz Özkök, Tamer Şahin, Nuket Eliyatkin, Ömer Erдің Top, Alaattin Yurt, Hakan Postacı. İntrakranial Anaplastik Hemanjioperisitom: Olgu Sunumu., 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 2013
Güliz Özkök, Ayşe Yağcı, Nuket Eliyatkin, Didem Ersöz, Birgöl Çiftçi, Zehra Erkul, Mehmet Yıldırım. Alışılmadık Bir Meme Tümörü: Myoid Hamartom., 23. Ulusal Patoloji Kongresi. , 2013
Erdem Çomut, Nuket Eliyatkin, Ayşe Yağcı, Hale Kızanoğlu. Meme Karsinomu Taklitçisi: Memede Fibromatozis. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi. , 2013
Evrin Yalçın, Nuket Eliyatkin, Elif Selek, Hakan Postacı. Midenin Parietal Hücreli Adenokarsinomu. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 2013
Hakan Özgür, Nuket Eliyatkin, Pınar Erçetin, Ragıp Ortaç, Güliden Diniz Ünlü, Ali Küpelioglu, Safiye Aktaş. Pankreatik Adenokarsinom Olgularında, FOXP3+ Düzenleyici T Hücrelerin Dağılımı ve Prognostik Parametrelerle Karşılaştırılması. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 2013
Birgöl Çiftçi, Nuket Eliyatkin, Tulu Kebat, Sevil Sayhan. Dermal Sinir Kılıfı Miksomu: Olgu Sunumu. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi. 6-10 Kasım 2013 İzmir Kongre Bildirileri. P164, S:85, 2013
Erдің Top, Nuket Eliyatkin, Evrin Yalçın, Çağlar Sarıgül, Zehra Erkul. Nadir Bir İnce Barsak Obstrüksiyon Nedeni: İnflamatuar Fibroid Tümör: Olgu Sunumu. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi. , 2013
- Nuket Eliyatkin, Didem Ersöz, İsmail Zihni, Rafet Öztürk, Ahmet Aykas, Enver Vardar. FMF Tanılı İki Olguda Tiroide Diffüz, Amorf, Eosinofilik Birikim; Amiloid? 23. Ulusal Patoloji Kongresi. 6-10 Kasım 2013 İzmir Kongre Bildirileri. P10, S:26, 6-10 Kasım 2013 İzmir Kongre Bildirileri. P10, S:26, 2013
Nuket Eliyatkin, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu, Baha Zengel, Metin Ceyhan. HER2 pozitif Meme Kanserin Trastuzumabla Tedavisinde p95/611-CTF'nin (HER-2'nin Karboksi Terminal Fragmanı) Rolü. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi. , 2013
Nuket Eliyatkin, Evrin Yalçın, Güliz Özkök, Hakan Postacı. Midenin Kötü Diferansiye Medüller Karsinomu. , 23. Ulusal Patoloji Kongresi. , 2013
Orhan Üreyen, Enver İlhan, Emrah Dadalı, Uğur Gökçelli, Nuket Eliyatkin, Hilmi Güngör. Okült Meme Kanseri Tedavi Yaklaşım Ne Olmalı?: Bir Olgu Sunumu , 12. Ulusal Meme Hastalıkları Kongresi, 2013
Evrin Yalçın, Enver Vardar, Nuket Eliyatkin, Adam Uslu, Asuman Argon. Relationship of Parameters between Immunohistochemical cerbB-2 Status and Clinicopathological Prognostic Parameters in Stomach Carcinomas, 10. International Gastric Cancer Congress , 2013
Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş. Ekstrahepatik bilier kanserde Lenfosit ile Nötrofillerin dağılımı ve CD25 + Düzenleyici T Lenfositlerin Konakçı İmmün Yanıttaki Yeri. , 20. Ulusal Kanser Kongresi., 2013
Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş. Ekstrahepatik bilier kanserde Lenfosit ile Nötrofillerin dağılımı ve CD25 + Düzenleyici T Lenfositlerin Konakçı İmmün Yanıttaki Yeri.

20. Ulusal Kanser Kongresi. 19-23 Nisan 2013. Antalya Bildiri Özetleri Kitabı. Sözlü Sunum:22. S: 11., 20. Ulusal Kanser Kongresi, 2013
Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Nuket Eliyatkin, Safiye Aktaş. Ekstrahepatik bilier kanserde Lenfosit ile Nötrofillerin dağılımı ve CD25 + Düzenleyici T Lenfositlerin Konakçı İmmun Yanıttaki Yeri. , 20. Ulusal Kanser Kongresi, 2013
Nuket Eliyatkin, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu, Baha Zengel, Metin Ceyhan. HER2 pozitif Meme Kanser Tedavisinde p95HER2: Trastuzumab Direncinde Biyobelirteç Olabilir mi? , 20. Ulusal Kanser Kongresi. , 2013
Nuket Eliyatkin, Enver Vardar, Senem Deniz, Filiz Gülistan, Levent Olgun. Diagnostik Tuzak: Boyun Lateralinde Tiroid Papiller Karsinomu (Ektopik Tiroid Dokusunda Primer Papiller Karsinom yada Tiroid Papiller Karsinom Metastazi?)., 20. Ulusal Kanser Kongresi. 19-23 Nisan 2013. , 2013
Evrin Yalçın, Enver Vardar, Nuket Eliyatkin, Asuman Argon, Enver İlhan, Adam Uslu . Gastrik Karsinomlarda Helicobacter Pylori ve İntestinal Metaplazi Varlığının ve İntestinal Metaplazi Subtiplerinin Klinik ve Patolojik Parametreler ile Karşılaştırılması ve Prognostik Önemi. , IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi., 2012
Nuket Eliyatkin, Ömer Erdinç Top, Baha Zengel. Anogenital Meme Benzeri Bezlerin Filloides Tumorı: Yaygın Psodoanjioz Stomal Hiperplazi ile Birlikte. , 22.Ulusal Patoloji Kongresi, 2012
Birgül Çiftçi, Enver Vardar, Ayşe Yağcı, Nuket Eliyatkin, Didem Ersöz. Testiste Mikrolitiazis Olgu Sunumu. , 22.Ulusal Patoloji Kongresi, 2012
Didem Ersöz, Enver Vardar, Yavuz Keçeci, Elif Selek, Nuket Eliyatkin, Hale Kızanoğlu: Elde Yumuşak Doku Aktinomikozizi Olgu Sunumu. , 22.Ulusal Patoloji Kongresi, 2012
Evrin Yalçın, Enver Vardar, Nuket Eliyatkin, Halit Yetiş, Rafet Öztürk, Adam Uslu. Gastrik Karsinomlarda HER2/neu (cerbB-2) Ekspresyonunun Klinik ve Patolojik Parametreler ile Karşılaştırılması ve Prognostik Önemi. , 22.Ulusal Patoloji Kongresi., 2012
Nuket Eliyatkin, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu. Meme Karsinomunda HER2/NEU Durumunu Değerlendirmede Alternatif Yöntem: REAL TIME-PCR., 22.Ulusal Patoloji Kongresi , 2012
Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Rafet Öztürk, Halit Vidinli. Endoservikal Mavi Nevüs., 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 2011
Mehmet Yıldırım, Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı. Ekstraabdominal Meme Fibromatozisi (Desmoid Tümör). , 19.Ulusal Kanser Kongresi, 2011
Nuket Eliyatkin, Başak Karasu, Ayşe Yağcı, Hakan Postacı. 100 Meme Kanseri Olgusunda p53 Pozitifliğinin Yaş ve Tümör Tipi ile İlişkisi., II. Kongre AntiAging ve Estetik Tıp Derneği, 2009
Enver İlhan, Nuket Eliyatkin, Arsenal sezgin, Volkan Tekin, Cemil Yaylalı, Hakan Postacı, Mehmet Yıldırım. Nadir Bir Olgu: Bilateral Filloides Tümörü (Sistosarkoma Fillodes)., X. Ulusal Meme Hastalıkları Kongresi, 2009
İbrahim Gülhan, Nuket Eliyatkin, Arsenal Sezgin, Esin Çelik, Hakan Postacı. Perinükleer Halo Kavramı ve Smear Sonuçlarının Analizi. , Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Kongresi-I. Ulusal

Kolposkopi ve Servikal Patolojiler Kongresi, 2008
-İbrahim Erdinç, Arsenal Sezgin, Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Mustafa Karaçelik. Comparison of Weights of Carotid Endarterectomy Plaques. , XXII.Kardiyoloji ve Kardiovasküler Cerrahide Yenilikler Kongresi, 28 Kasım-2 Aralık 2007, Antalya, 2007
İbrahim Erdinç, Arsenal Sezgin, Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Mustafa Karaçelik. Histopathological Examination of Carotid Endarterectomy Materials-Atherome Plaques. , III.Kardiyoloji ve Kardiovasküler Cerrahide Yenilikler Kongresi, 28 Kasım-2 Aralık 2007, Antalya. , 2007
İbrahim Erdinç, Arsenal Sezgin, Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Mustafa Karaçelik. Karotid endarterektomi yapılan hastalarda aterom plağının patolojik yapısının karşılaştırılması. XXIII. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, 19-23 Ekim 2007, Antalya. Sözlü bildiri:117, S:39., XXIII. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, 2007
Arsenal Sezgin, Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı. Correlation of Gleason Scores Between Needle Biopsy and Radical Prostatectomy Specimens in Prostatic Adenocarcinoma. , 21st European Congress of Pathology, 2007
İbrahim Erdinç, Arsenal Sezgin, Nuket Eliyatkin, Hakan Postacı, Mustafa Karaçelik. Histopathological Examination of Carotid Endarterectomy Materials-atherome Plaques. , 3rd Clinical Vascular Biology Congress, 25-29 April, 2007, Antalya., 2007
Nuket Eliyatkin, Sibel Demir, Hakan Postacı, Tahsin Tekeli, Ali Galip Deneçli. Diffuse Hemangiomatosis of The Spleen (Case Report)., XIII. World Congress of Pathology and Laboratory Medicine, 26th-30th May 2005, Istanbul, 2005
Birgül Yılmaz Avcı, Hakan Postacı, Nuket Eliyatkin. , I.Ulusal Akciğer Kanseri Kongresi, 2004
Güliz Özkök, Nuket Eliyatkin, Arsenal Sezgin, Serap Sural, Hakan Postacı. Dev Rozetler İçeren Hyalinize İğ Hücreli Tümör. , XVII. Ulusal Patoloji Sempozyumu, 2004
Nuket Eliyatkin, Şehnaz Sayhan, Sibel Keçeci, Hakan Postacı, Birgül Avcı. Pulmoner Hamartomlarda Villöz Papiller Projeksiyonların ve Mast Hücrelerinin Varlığı (8 Olguluk Çalışma). , XVII. Ulusal Patoloji Sempozyumu, 2004
Ayşe Yağcı, Güliz özkök, Nuket Eliyatkin, Yusuf Çakır., XIII.Serebellar Hemanjioblastom, 1997
Elif Selek, Nuket Eliyatkin, Emel Dikicioğlu. Sekretuar Meningioma (İki Olgu). , XIII. Ulusal Patoloji Kongresi, 1997

Diğer yayımlar

Düzenleme Tarihi :24/06/2015

8.5. Tez ve Tez ile İlişkili Yayımlanan Makaleler ve Bildiriler:

Makaleler;

-**Nuket Eliyatkin**, Baha Zengel, Ayş a Yağcı, Erdem Ç omut, Hakan Postacı, Adam Uslu. "Properties Of Synchronous Versus Metachronous Bilateral Breast Carcinoma With Long Time Follow Up" başlıklı makale Asian Pacific Journal of Cancer Prevention dergisinde yayımlanmak üzere kabul edilmiştir.

-**Nuket Eliyatkin**, Hakan Ö zgür, Pınar Erç etin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioğ lu. Meme Karsinomlarında HER-2 Durumunun İmmunohistokimyasal ve Moleküler Analizlerle Değ erlendirilmesi. Tepecik Eğ itim ve Araştırma Dergisi 2015; 25(1):19-27
doi:10.5222/terh.2015.019

-**Nuket Eliyatkin**, Evrim Yalç ın, Baha Zengel, Safiye Aktaş, Enver Vardar. Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk. J Breast Health 2015; 11: 59-66. DOI: 10.5152/tjbh.2015

-Savaş Yakan, Erdem Sarı, Nazif Erkan, Mehmet Yıldırım, Enver Vardar, Ali Coş kun, Durmuş Ali Ç etin, **Nukhet Eliyatkin**. Breast Carcinosarcomas. J Breast Health 2014; 10: 161-165 DOI: 10.5152/tjbh.2014.2197

-Hakan Postacı, Baha Zengel, Ü lkem Yararbaş , Adam Uslu, **Nuket Eliyatkin**, Göksever Akpınar, Fevzi Cengiz, Raika Durusoy. Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer: Predictors of Axillary and Non-Sentinel Lymph Node Involvement. Balkan Medical Journal 2013; 30: 415-21. DOI: 10.5152/balkanmedj. 2013.9591

-Baha Zengel, Ü lkem Yararbaş , Ali Duran, Adam Uslu, **Nuket Eliyatkin**, Mehmet Ali Demirkıran, Fevzi Cengiz, Cenk Ş imş ek, Hakan Postacı, Enver Vardar, Raika Durusoy. Comparison of the clinicopathological features of invasive ductal, invasive lobular, and mixed (invasive ductal + invasive lobular) carcinoma of the breast. Breast Cancer 2013. DOI 10.1007/s12282-013-0489-8

-**Nuket Eliyatkin**, Baha Zengel, Safiye Aktaş. Meme Kanserinde HER-2/NEU (C-ERB-B2) Durumunun Önemi: Hangi Yöntemle Değerlendirmek Daha Uygun? J Breast Health 2013; 9: 175-181. DOI: 10.5152/tjbh.2013.28

Bildiriler;

-**Nuket Eliyatkin**, Safiye Aktas, Hakan Ozgur, Pınar Erçetin, Ali Küpelioglu. The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. The 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey, 18th-19th of May 2015, Oral Presentation.

-**Nuket Eliyatkin**, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu, Baha Zengel, Hakan Postacı. ASCO/CAP 2007 ve 2013 Meme Kanserinde HER2 Değerlendirme Önerilerine Göre İmmunohistokimyasal Değerlendirme Sonuçlarının Karşılaştırılması. İzmir Onkoloji Günleri Nadir Tümörler Sempozyumu, 28 Şubat-2 Mart 2014, İzmir, Sempozyum Bildirileri. E-Poster, S:5

-**Nuket Eliyatkin**, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu, Baha Zengel, Metin Ceyhan. HER2 pozitif Meme Kanserinin Trastuzumabla Tedavisinde p95/611-CTF'nin (HER-2'nin Karboksi Terminal Fragmanı) Rolü. 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, İzmir, Kongre Bildirileri. P622, S:270

Nuket Eliyatkin, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu, Baha Zengel, Metin Ceyhan. HER2 pozitif Meme Kanseri Tedavisinde p95HER2: Trastuzumab Direncinde Biyobelirteç Olabilir mi? 20. Ulusal Kanseri Kongresi. 19-23 Nisan 2013, Antalya, Bildiri Özetleri Kitabı. Sözlü sunum:34. S:16-17.

-**Nuket Eliyatkin**, Hakan Özgür, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Ali Küpelioglu. Meme Karsinomunda HER2/NEU Durumunu Değerlendirmede Alternatif Yöntem: REAL TIME-PCR. 22.Ulusal Patoloji Kongresi. 7-11 Kasım 2012, Manavgat, Antalya. Sözlü sunum: 27, S:16.

Comparison of the clinicopathological features of invasive ductal, invasive lobular, and mixed (invasive ductal + invasive lobular) carcinoma of the breast

Baha Zengel · Ulkem Yararbas · Ali Duran · Adam Uslu ·
Nukhet Eliyatkin · Mehmet Ali Demirkıran · Fevzi Cengiz ·
Cenk Şimşek · Hakan Postacı · Enver Vardar ·
Raika Durusoy

Received: 11 February 2012 / Accepted: 28 July 2013
© The Japanese Breast Cancer Society 2013

Abstract

Background In this retrospective analysis, the clinicopathological features and pattern of metastatic spread of invasive ductal carcinoma (IDC), invasive lobular carcinoma (ILC), and mixed ductal/lobular carcinoma (MDLC), together with the type and outcome of surgical intervention, were comparatively evaluated.

Methods A total of 633 breast cancer patients with histopathological subtype IDC, ILC or MDLC were included in the study. The mean age was 52.6 ± 12.7 years. Follow-up period ranged between 0 and 33 (median 6.0) years. The groups were compared with respect to age, tumor size, nodal involvement, stage, hormonal therapy, multicentricity, multifocality, bilaterality, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/neu, p53, and Ki67 expression, disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) rates, and surgical approach.

Results The distribution of patients was as follows: IDC 508 (80.3 %), ILC 78 (12.3 %), MDLC 47 (7.4 %). Among the parameters evaluated, statistically significant differences were observed in mean tumor size (IDC 2.5 ± 1.98 cm, ILC 3.0 ± 1.8 cm, MDLC 3.2 ± 2.4 cm), advanced T stage (T3 + T4) at diagnosis (IDC 14.7 %, ILC 21.4 %, MDLC 25.6 %), N stage (N0 was dominant in IDC and ILC; N3 was dominant in MDLC), tumor–node–metastasis (TNM) stage (stage II was dominant in IDC and ILC; stage III was dominant in MDLC), HER2/neu expression (IDC 23.8 %, ILC 11.8 %, MDLC 21.4 %), and frequency of bone metastasis (IDC 14.3 %, ILC 17.9 %, MDLC 25.5 %).

Conclusions MDLC-type tumors have different histopathological characteristics and are often diagnosed at advanced stage. However, their survival outcomes do not vary significantly from ILC and IDC.

Keywords Breast cancer · Invasive ductal carcinoma (IDC) · Invasive lobular carcinoma (ILC) · Mixed ductal/lobular carcinoma (MDLC)

B. Zengel (✉) · A. Duran · A. Uslu · M. A. Demirkıran ·
F. Cengiz · C. Şimşek
Department of General Surgery, Turkish Ministry of Health
Izmir Bozyaka Research and Training Hospital, Saim Cıkırcı
Cad. No: 59 Bozyaka, Izmir 35 110, Turkey
e-mail: bahazengel@gmail.com

U. Yararbas
Department of Nuclear Medicine, Medical Faculty,
Ege University, Bornova, Izmir, Turkey

N. Eliyatkin · H. Postacı · E. Vardar
Department of Pathology, Turkish Ministry of Health Izmir
Bozyaka Research and Training Hospital, Izmir, Turkey

R. Durusoy
Department of Public Health, Medical Faculty, Ege University,
Bornova, Izmir, Turkey

Introduction

Breast cancer is the most common cancer and one of the leading causes of death in women [1, 2]. Two major histological variants of breast cancer are invasive ductal carcinoma (IDC) and invasive lobular carcinoma (ILC) [3]. Although therapeutic approach at equivalent stage does not differ significantly except for stage 0 disease, these two subtypes vary in terms of clinicopathological features [4]. The major characteristics of ILC are multicentricity, multifocality, bilaterality, difficulty in detection by mammographic examinations due to ill-defined margins, more

frequent hormone receptor positivity, and tendency to metastasize to gastrointestinal organs and peritoneum [5–8]. There is still debate on the clinicopathological and prognostic features of ILC and MDLC, due to not only the limited number of ILC patients in most of the published reports but also the disagreement on classifying mixed histology as a distinguished histologic type in many studies [8–13].

The primary objective of this retrospective analysis is to determine the clinicopathological features, pattern of metastatic spread, and prognosis of IDC, ILC, and MDLC subtypes comparatively and to review our surgical strategy for these 3 different entities.

Patients and methods

Patients

Database of Turkish Ministry of Health-Izmir Bozyaka Research and Training Hospital was reviewed. Breast cancer patients with IDC, ILC or MDLC histology treated between 1976 and 2012 were identified. Patients with tubular, mucinous, and papillary carcinomas and those with stage 0 disease were excluded. A total of 633 patients were found eligible for the study.

Routine preoperative evaluation consisted of breast ultrasound and mammography. Dynamic magnetic resonance imaging (MRI) was used in patients with ambiguous findings. Chest X-ray, computerized tomography of abdomen and thorax, and bone scintigraphy were used for distant metastasis survey.

The three histological subtypes were comparatively evaluated with regard to age, tumor size, nodal status, disease stage, use of oral contraceptives, multicentricity, multifocality, bilaterality, surgical intervention for breast and axilla, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2/neu, p53, and Ki67 expression, local relapse, distant metastasis, and disease-free and overall survival rates.

Surgical method

Primary tumor was treated by breast-conserving surgery or total mastectomy. From 1976 to 2007, axillary approach was merely axillary dissection (AD), whereas after 2007, it was sentinel lymph node biopsy (SLNB) and/or AD when indicated.

Pathology

The classification of breast carcinomas is based on the World Health Organization (WHO) classification of tumors

[14]. According to this latest edition, the terminology of infiltrating ductal carcinoma—not otherwise specified (IDC) has been revised to invasive carcinoma of no special type (IC-NST). Taking this into consideration, we defined IDC (IC-NST) as an invasive tumor having a nonspecialized pattern of >50 % of its mass as judged by examination of representative sections. The histological diagnosis of ILC depended on the presence of a recognized lobular type constituted by dispersed infiltrating tumor cells, often in the form of a single file without cohesion, and small cells with relatively little nuclear pleomorphism. The invasive lobular carcinoma subtype had been also classified as solid, alveolar, pleomorphic, and tubulolobular variant. We defined mixed ductal/lobular histology as tumors in which the infiltrating ductal (IDC) component accounted for between 10 and 49 % of the tumor, the rest being of a recognized lobular type.

Serial sections of hematoxylin and eosin (H&E)-stained specimens with 4–5 μ m thickness were reviewed. Immunohistochemistry slides were evaluated with respect to expression of ER, PR, HER2/neu, p53, and Ki67 by the tumor. For this purpose we assessed the nuclear staining ratio in nuclei of 100 invasive tumor cells from separate areas for estrogen receptor, progesterone receptor, Ki67, and p53. The intensity of immunohistochemical staining was recorded as percentages, and p53 expression >10 %, Ki67 >14 %, and ER and PR $\geq$ 1 % were accepted as positive [11, 15–22].

In this analysis, the tissue blocks of all patients were entirely available, thus E-cadherin and p120 staining was done for all cases with suspicious diagnosis without exception. Immunostaining of E-cadherin and p120-catenin was performed by tissue microarray. p120-Catenin-specific monoclonal antibody of mouse origin (15D2 clone; Santa-Cruz Biotechnology Inc.) at 1/50 dilution was used because of its excellent recognition of all known isoforms of p120 in formalin-fixed tissue sections. In addition, we used E-cadherin monoclonal antibody (SPM471 clone; Thermo-Scientific Inc.) at 1/100 dilution to stain carcinoma tissue. Membranous staining for E-cadherin and cytoplasmic staining for p120-catenin above background levels were considered positive. Known negative and positive controls were run with the samples.

We determined HER2/neu status by immunohistochemistry (IHC). However, if necessary, this was followed by fluorescent in situ hybridization (FISH). Positive, negative, and equivocal results for HER2/neu were immunohistochemical staining of 3+ (uniform, intense membrane staining of >30 % of invasive tumor cells), 0 or 1+ (no or barely perceptible incomplete membrane staining), and 2+ (10–30 % of tumor cells with strong complete membrane staining or >10 % of tumor cells with moderate complete membrane staining), respectively. The immunostaining

was scored by a senior pathologist, who was blinded to patients' survival outcomes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) for Windows. Median follow-up of the three subgroups was compared by Kruskal–Wallis test. Analysis of variance (ANOVA) test was used for comparison of age distribution between subgroups. The clinicopathological variants of IDC, ILC, and mixed-type tumors were compared using cross tabulation and Pearson Chi square. Disease-free (DFS) and overall survival (OS) curves were estimated by the Kaplan–Meier method, and compared by using the log-rank (Mantel–Cox) test for univariate analysis.

Results

Immunostaining for E-cadherin was reassessed in 44 patients with ILC and in 32 patients with IDC for confirmation of previous diagnosis. Loss of membrane expression of E-cadherin was present throughout the tumor in 40 of 44 cases of ILC (91 %) (Fig. 1). In the remaining three cases, there was weak focal membrane staining.

In contrast to ILC, E-cadherin expression was present throughout the tumor in 28 of 32 patients (87 %) with IDC. Immunostaining of p120-catenin is distinctive for IDC and ILC. We demonstrated cytoplasmic staining of p120-catenin in 26 of 28 patients with ILC. In IDC, there was only membranous staining of p120-catenin.

The distribution of the 633 patients according to histological subtype was as follows: IDC 508 patients (80.3 %), ILC 78 patients (12.3 %), MDLC 47 patients (7.4 %). The

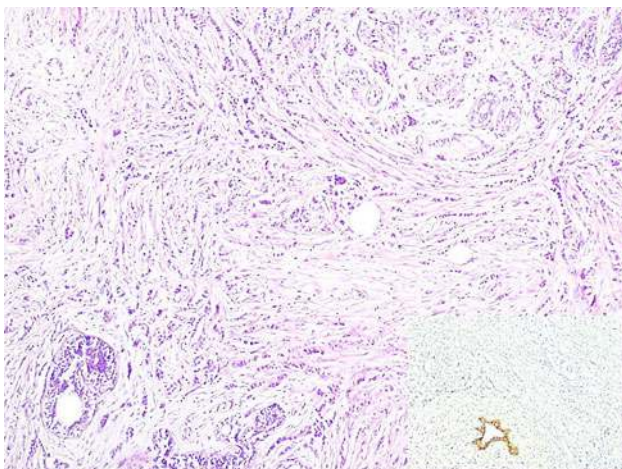


Fig. 1 H&E of an invasive lobular carcinoma (×200). *Inset* lack of membrane expression on E-cadherin immunostaining (×200)

age ranged between 23 and 84 years (mean 52.6 ± 12.7 years). Of the patients, 626 (98.9 %) were female and 7 (1.1 %) were male. Histologic variants of ILC were identified as follows: solid lobular carcinoma ($n = 3$), tubulolobular carcinoma ($n = 4$), pleomorphic lobular carcinoma ($n = 1$), and histiocytoid lobular carcinoma ($n = 1$).

Median follow-up was 6.0 years for IDC and ILC, 7.0 years for MDLC, and 6.0 years for the whole study group (range 0–33 years). No statistically significant difference was observed between the groups ($p = 0.421$).

Clinicopathological characteristics of the histologic subtypes are summarized in Table 1. Menopausal status, frequency of bilaterality and axillary involvement, HER2/neu expression, and estrogen and progesterone receptor, p53, and Ki67 status were not statistically different between the groups. ILC patients were older ($p = 0.036$) and tended to have more multifocal or multicentric tumors ($p = 0.024$). Mean tumor size was 2.5 ± 1.98 cm for IDC, 3.0 ± 1.8 cm for ILC, and 3.2 ± 2.4 cm for MDLC ($p < 0.018$).

In all histological subgroups, the most frequent T stage was T2. Advanced T stage (T3 + T4) at presentation was most frequently observed in MDLC (25.6 %), followed by ILC (21.4 %) and IDC (14.7 %). The distribution of T stage between IDC versus MDLC was statistically significant ($p = 0.004$).

With regard to nodal status, N0–N1 disease was common in IDC and ILC patients ($p = 0.036$) whereas N2–N3 predominated in patients with MDLC histology ($p = 0.052$).

Stage IV disease at diagnosis was extremely rare in all groups. The most frequent disease stage was II in IDC and ILC and III in MDLC patients ($p = 0.052$).

The patients with MDLC received hormone replacement therapy more often than patients with IDC and ILC histology ($p = 0.01$).

The type of surgery for primary tumor and axillary region was not different between the study groups (Table 2).

Two-, five-, ten-, and twenty-year DFS rates were 87.4 ± 0.0 , 76.5 ± 0.0 , 66.5 ± 0.0 , and 47.4 ± 0.0 % for IDC; 83.1 ± 0.0 , 75.1 ± 0.1 , 60.5 ± 0.1 , and 60.5 ± 0.1 % for ILC; and 84.4 ± 0.1 , 64.3 ± 0.1 , 54.0 ± 0.1 , and 54.0 ± 0.1 % for MDLC (Fig. 2). The DFS difference between the groups was not significant ($p = 0.342$).

Two-, five-, ten-, and 20-year OS rates were 96.5 ± 0.0 , 87.9 ± 0.0 , 70.9 ± 0.0 , and 48.9 ± 0.1 % for IDC; 92.2 ± 0.0 , 82.4 ± 0.0 , 63.8 ± 0.1 , and 54.7 ± 0.1 % for ILC; and 97.7 ± 0.0 , 91.8 ± 0.0 , 82.6 ± 0.1 , and 65.1 ± 0.1 % for MDLC (Fig. 3). OS rates were not statistically different between the three groups ($p = 0.201$).

Table 1 Demographic characteristics by histologic subgroup

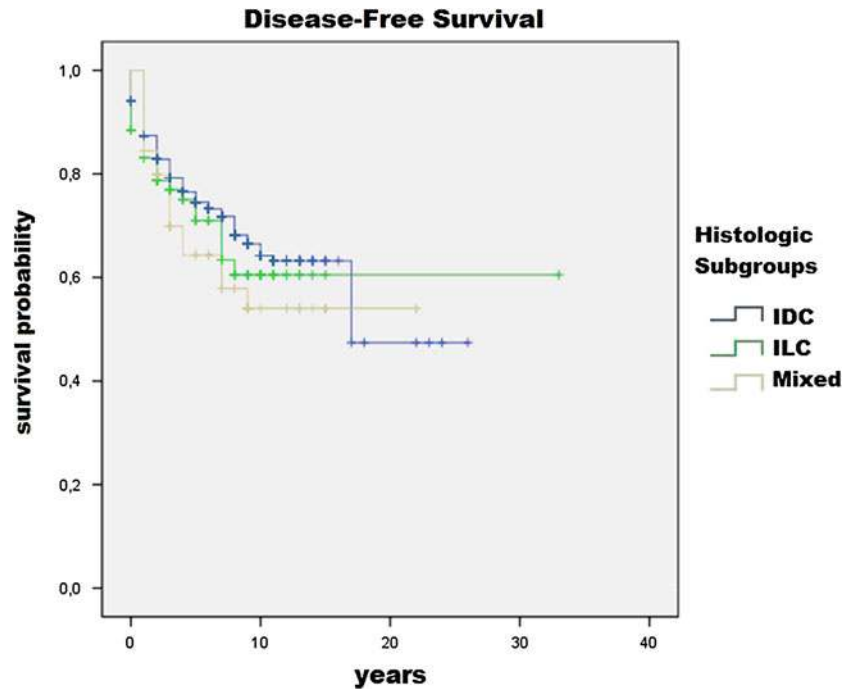
	IDC, <i>N</i> (%)	ILC, <i>N</i> (%)	Mixed, <i>N</i> (%)	Total, <i>N</i> (%)	<i>p</i>
Age (years)					
≤50	254 (50.0)	29 (37.2)	28 (59.6)	311 (49.1)	0.036
>50	254 (50.0)	49 (62.8)	19 (40.4)	322 (50.9)	
Menopausal status					
Premenopausal	188 (40.9)	26 (34.7)	22 (56.4)	236 (41.1)	0.079
Postmenopausal	272 (59.1)	49 (65.3)	17 (43.6)	338 (58.9)	
HRT					
(+)	144 (37.6)	25 (44.6)	18 (60.0)	186 (39.9)	0.040
(−)	239 (62.4)	31 (55.4)	12 (40.0)	280 (60.1)	
Multicentricity, multifocality					
(+)	47 (9.5)	15 (19.7)	4 (8.5)	66 (10.7)	0.024
(−)	447 (90.5)	61 (80.3)	43 (91.5)	551 (89.3)	
Bilaterality					
(+)	28 (5.5)	8 (10.3)	4 (8.5)	40 (6.3)	0.230
(−)	478 (94.5)	70 (89.7)	43 (91.5)	591 (93.7)	
Axillary involvement					
(+)	303 (63.3)	40 (56.3)	31 (70.5)	374 (63.0)	0.299
(−)	176 (36.7)	31 (43.7)	13 (29.5)	220 (37.0)	
T stage					
T1	147 (32.1)	18 (24.0)	7 (16.3)	172 (29.9)	0.004
T2	244 (53.3)	41 (54.7)	25 (58.1)	310 (53.8)	
T3	41 (9.0)	5 (6.7)	9 (20.9)	55 (9.5)	
T4	26 (5.7)	11 (14.7)	2 (4.7)	39 (6.8)	
N stage					
N0	176 (36.7)	31 (43.7)	13 (29.5)	220 (37.0)	0.052
N1	136 (28.4)	21 (29.6)	7 (15.9)	164 (27.6)	
N2	98 (20.5)	9 (12.7)	11 (25.0)	118 (19.9)	
N3	69 (14.4)	10 (14.1)	13 (29.5)	92 (15.5)	
Stage					
Stage I	82 (18.1)	13 (18.3)	4 (9.3)	99 (17.5)	0.052
Stage II	198 (43.8)	38 (53.5 %)	15 (34.9)	251 (44.3)	
Stage III	172 (38.1)	20 (28.2)	24 (55.8 %)	216 (38.2)	
ER status					
ER(−)	190 (40.1)	21 (29.2)	19 (43.2)	230 (39.0)	0.175
ER(+)	284 (59.9)	51 (70.8)	25 (56.8)	360 (61.0)	
PR status					
PR(−)	185 (39.5)	27 (38.6)	14 (32.6)	226 (38.9)	0.677
PR(+)	283 (60.5)	43 (61.4)	29 (67.4)	355 (61.1)	
HER2/neu					
(neg or 1+)	266 (62.6)	54 (79.4)	28 (66.7)	348 (65.0)	0.112
(3+++ or FISH+)	101 (23.8)	8 (11.8)	9 (21.4)	118 (22.1)	
(2++)	58 (13.6)	6 (8.8)	5 (11.9)	69 (12.9)	
p53					
≤10 %	304 (78.4)	50 (86.2)	31 (83.8)	385 (79.7)	0.311
>10	84 (21.6)	8 (13.8)	6 (16.2)	98 (20.3)	
Ki67					
≤14 %	252 (71.6)	44 (73.3)	29 (80.6)	325 (72.5)	0.512
>14 %	100 (28.4)	16 (26.7)	7 (19.4)	123 (27.5)	

IDC invasive ductal carcinoma,
ILC invasive lobular carcinoma,
Mixed mixed invasive ductal/
lobular carcinoma, *HRT*
hormone replacement therapy,
ER estrogen receptor, *PR*
progesterone receptor

Table 2 Surgical methods performed for primary tumor and axilla by histologic subgroup

IDC invasive ductal carcinoma, *ILC* invasive lobular carcinoma, *Mixed* mixed invasive ductal/lobular carcinoma, *BCS* breast-conserving surgery, *AD* axillary dissection, *SLNB* sentinel lymph node biopsy

	IDC, N (%)	ILC, N (%)	Mixed, N (%)	Total, N (%)	<i>p</i>
Surgical treatment					
Mastectomy	436 (86.0)	67 (85.9)	42 (89.4)	545 (86.2)	0.586
BCS	62 (12.2)	8 (10.3)	5 (10.6)	75 (11.9)	
Not operated	9 (1.8)	3 (3.8)	0 (0.0)	12 (1.9)	
Axillary treatment					
AD	421 (83.0)	63 (80.8)	41 (87.2)	525 (83.1)	0.259
SLNB	73 (14.4)	10 (12.8)	6 (12.8)	89 (14.1)	
Not operated	13 (2.6)	5 (6.4)	0 (0.0)	18 (2.8)	

Fig. 2 Kaplan–Meier curve of disease-free survival of patients according to histologic subgroup ($p = 0.342$). *IDC* invasive ductal carcinoma, *ILC* invasive lobular carcinoma, *Mixed* mixed invasive ductal/lobular carcinoma

Bone metastasis was the most frequent remote organ spread for the three histologic subtypes, with frequency of 14.3 % for IDC, 17.9 % for ILC, and 25.5 % for MDLC ($p = 0.107$). With respect to other remote organ metastasis and new onset of different malignancies, there was no difference between the groups (Table 3).

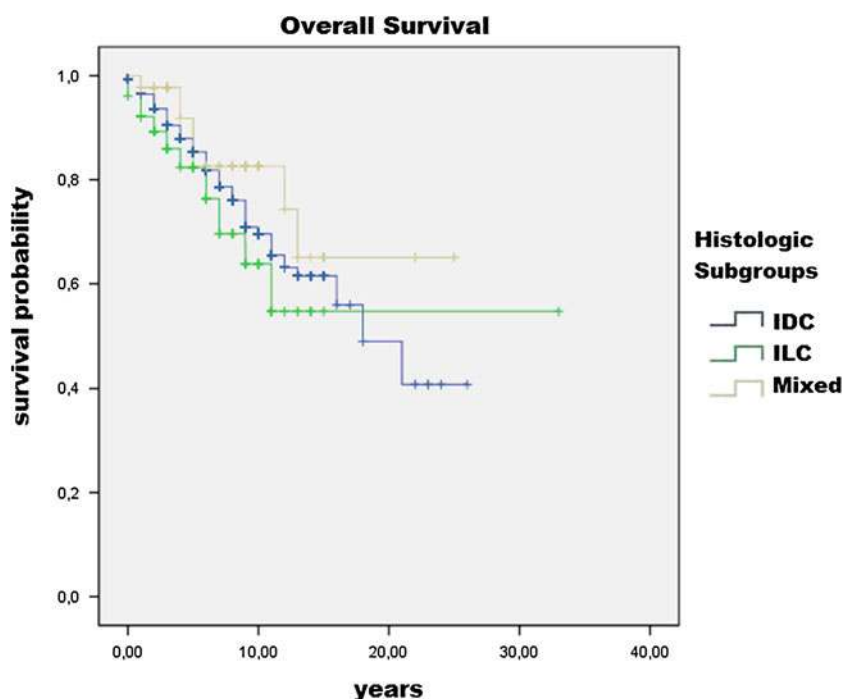
Discussion

IDC accounts for three-quarters of all breast cancers, while ILC and MDLC subtypes are relatively rare [8, 10, 23]. Besides, mixed histology has not been considered as a different histological subtype by many opponents [8, 13, 24–26]. Current studies have reported that the incidence of IDC has remained stable, while the incidences of ILC and MDLC are increasing, particularly among postmenopausal women [26, 27]. In our study group, the incidence of mixed

histology (7.4 %) was slightly above the range reported in relevant literature, which might be due to variable pathological criteria used in diagnosis of a tumor with mixed histological pattern [24, 26]. On our histologic review, we diagnosed MDLC as a tumor comprising areas with solid/cohesive growth pattern consistent with IDC admixed with areas of discohesive malignant cells with single-cell infiltration pattern.

Analysis of expression of E-cadherin and p120 may help to differentiate between IDC and ILC that are difficult to classify on the basis of morphological criteria. Previous studies have demonstrated that E-cadherin expression is lost in the majority of ILC (80–90 %) and in the areas of lobular morphology in mixed tumors, while it is usually positive in IDC (particularly in low-grade tumors), and in areas of ductal morphology in mixed invasive carcinomas [28]. In this study, we similarly demonstrated E-cadherin positive staining in the areas with IDC-type morphology in mixed tumors.

Fig. 3 Kaplan–Meier curve of overall survival of patients according to histologic subgroup ($p = 0.201$). *IDC* invasive ductal carcinoma, *ILC* invasive lobular carcinoma, *Mixed* mixed invasive ductal/lobular carcinoma



The incidence of tumors with lobular histology is increasing, and hormone replacement therapy has been speculated as a predisposing factor [25–27]. However, in our study group, history of hormonal therapy was obtained most frequently in mixed-type tumors (60.0 %), followed by ILC (44.6 %) and IDC (37.6 %) ($p = 0.04$).

In one of the largest series evaluating the characteristics of ILC, patients were at more than twofold risk of developing contralateral breast carcinoma compared with IDC cases [8]. On the contrary, some groups have reported incompatible results [10, 29]. In our study group, multifocality and multicentricity were observed significantly more in the ILC group than IDC and MDLC groups.

A distinct metastatic spread pattern of ILC and/or mixed ductal/lobular tumors has been described in several studies. Although the mechanism is not clear, the microenvironment of the involved organ or physical properties including the size or shape of the cells and also decreased cell-to-cell adhesion secondary to loss of E-cadherin molecule are thought to influence the metastatic pattern [8]. In accordance with most of the previous reports, the ratio of bone metastasis was higher in ILC and mixed-type tumors in our study group [23, 29]. Incidence of distant organ metastasis other than bone and second primary tumors was not different in the three histologic subgroups.

There is consensus in the literature in terms of ER and PR receptor positivity and HER2/neu negativity of ILC and mixed-type tumors [8, 10–12, 23–25, 30–33]. In our study, expression of ER, PR, p53, and Ki67 was similar in all

histological subtypes. Besides, HER2/neu levels were significantly lower in ILC compared with the other groups.

ILC and mixed tumors differ from IDC in some respects. One is the recognition of ILC and MDLC at more advanced stages. However, as shown in our study and in many others where overall and disease-free survival differences were compared stage by stage, no scientific evidence indicating a difference in outcome between IDC versus ILC and mixed-type tumors has been obtained [8, 10, 12, 23].

In the majority of the studies, some limitations in survival analysis exist. These include the lack of stage-matched comparison of survival rates and inadequate patient population. Wasif et al. [9] overcame these limitations by comparing a stage-matched study group including 27,639 ILC and 235,769 IDC cases, demonstrating more favorable disease-free survival in the ILC group. Pestazolli et al. reported better survival for ILC in the first year but poorer survival after 6 years, emphasizing the importance and influence of prolonged follow-up in survival comparisons. In some previous studies, better survival rates in ILC and/or mixed-type tumors were attributed to the frequency of steroid hormone receptor positivity in these tumors, which is an undisputed favorable prognostic factor in breast cancer [10]. In our study population, no significant difference was observed in ER or PR status between the 3 subgroups, and to some extent this observation may explain the similarity in survival rates within the 3 different histologic subtypes.

Table 3 Metastatic involvement by histologic subgroup

Metastasis	IDC, <i>N</i> (%)	ILC, <i>N</i> (%)	Mixed, <i>N</i> (%)	Total, <i>N</i> (%)	<i>p</i>
Axillary lymph node involvement					
(+)	303 (63.3)	40 (56.3)	31 (70.5)	374 (63.0)	0.299
(−)	176 (36.7)	31 (43.7)	13 (29.5)	220 (37.0)	
Distant metastasis					
(+)	131 (26.0)	22 (28.2)	16 (34.0)	169 (26.9)	0.479
(−)	372 (74.0)	56 (71.8)	31 (66.0)	459 (73.1)	
Bone					
(+)	72 (14.3)	14 (17.9)	12 (25.5)	98 (15.6)	0.107
(−)	431 (85.7)	64 (82.1)	35 (74.5)	530 (84.4)	
Lung					
(+)	55 (10.9)	8 (10.4)	7 (14.9)	70 (11.2)	0.693
(−)	448 (89.1)	69 (89.6)	40 (85.1)	557 (88.8)	
Liver					
(+)	49 (9.7)	6 (7.7)	5 (10.6)	60 (9.6)	0.820
(−)	454 (90.3)	72 (92.3)	42 (89.4)	568 (90.4)	
Brain					
(+)	10 (2.0)	1 (1.3)	1 (2.1)	12 (1.9)	0.908
(−)	492 (98.0)	77 (98.7)	46 (97.9)	615 (98.1)	
Gynecologic					
(+)	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0.883
(−)	502 (99.8)	78 (100.0)	47 (100.0)	627 (99.8)	
Others ^a					
(+)	4 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.6)	0.606
(−)	499 (99.2)	78 (100.0)	47 (100.0)	624 (99.4)	
Secondary primary tumors ^b					
(+)	9 (1.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (1.4)	0.325
(−)	495 (98.2)	77 (100.0)	47 (100.0)	619 (98.6)	

IDC invasive ductal carcinoma,
ILC invasive lobular carcinoma,
Mixed mixed invasive ductal/
lobular carcinoma

^a Orbital metastasis, adrenal
metastasis

^b Chronic myelogenous
leukemia, pancreatic cancer,
gallbladder cancer

Conclusions

In a few studies, mixed tumors have been described as a distinct pathological subtype having clinical and histopathological characteristics between IDC and ILC or an entity resembling ILC [23, 24, 32]. However, the clinical and biological features of this tumor are yet to be determined. In our study, MDLC clinically differed from IDC and ILC with respect to presentation at higher T, N, and TNM stage and increased tendency for bone metastasis. However, these unfavorable features did not yield significant difference in survival outcomes between the three histologic subtypes.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917.
2. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci*. 1979;9:144–56.
3. Tulinius H, Bjarnason O, Sigvaldason H, Bjarnadottir G, Olafsdottir G. Tumours in Iceland. 10. Malignant tumours of the female breast. A histological classification, laterality, survival and epidemiological considerations. *APMIS*. 1988;96:229–38.
4. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines Version 1.2012. Invasive Breast Cancer, pp. 12–19.
5. Lesser ML, Rosen PP, Kinne DW. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. *Surgery*. 1982;91:234–40.
6. Krecke KN, Gissvold JJ. Invasive lobular carcinoma of the breast: mammographic findings and extent of disease at diagnosis in 184 patients. *AJR Am J Roentgenol*. 1993;161:957–60.
7. Harris M, Howell A, Chrissohou M, Swindell RI, Hudson M, Sellwood RA. A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1984;50:23–30.
8. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res*. 2004;6:R149–56.
9. Wasif N, Maggard MA, Ko CY, Giuliano AE. Invasive lobular vs. ductal breast cancer: a stage-matched comparison of outcomes. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(7):1862–9.
10. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of

- 15 International Breast Cancer Study Group Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):3006–14.
11. Moran MS, Yang Q, Haffty BG. The Yale University experience of early-stage invasive lobular carcinoma (ILC) and invasive ductal carcinoma (IDC) treated with breast conservation treatment (BCT): analysis of clinical-pathologic features, long-term outcomes, and molecular expression of COX-2, Bcl-2, and p53 as a function of histology. *Breast J*. 2009;15(6):571–8.
12. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Orvieto E, Maiorano E, Galimberti V, et al. Lack of prognostic significance of “classic” lobular breast carcinoma: a matched, single institution series. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;117(1):211–4.
13. Hanagiri T, Nozoe T, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Yasuda M, et al. Clinicopathological characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast. *Asian J Surg*. 2009;32(2):76–80.
14. Ellis IO, Collins L, Ichihara S, Mac Grogan G. Invasive carcinoma of no special type. Tumours of the breast. In: Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijvereditors MJ, editors. *Classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the breast*. Lyon: IARC Press; 2012. p. 36.
15. Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, et al. Accumulation of p53 determined by immunohistochemistry as a prognostic marker in node negative breast cancer; analysis according to St Gallen consensus and intrinsic subtypes. *J Surg Oncol*. 2011;103(3):207–11.
16. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784–95.
17. Rossner P Jr, Gammon MD, Zhang YJ, Terry MB, Hibshoosh H, Memeo L, et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3847–57.
18. Hill KA, Sommer SS. p53 as a mutagen test in breast cancer. *Environ Mol Mutagen*. 2002;39(2–3):216–27.
19. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.
20. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.
21. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, International Breast Cancer Study Group, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(3):207–12.
22. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell’Orto P, Breast International Group Trial 1-98, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008;26(34):5569–75.
23. Rakha EA, Gill MS, El-Sayed ME, Khan MM, Hodi Z, Blamey RW, et al. The biological and clinical characteristics of breast carcinoma with mixed ductal and lobular morphology. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;114(2):243–50.
24. Bharat A, Gao F, Margenthaler JA. Tumor characteristics and patient outcomes are similar between invasive lobular and mixed invasive ductal/lobular breast cancers but differ from pure invasive ductal breast cancers. *Am J Surg*. 2009;198(4):516–9.
25. Biglia N, Mariani L, Sgro L, Mininanni P, Moggio G, Sismondi P. Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):549–67.
26. Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA*. 2003;289(11):1421–4.
27. Li CI, Anderson BO, Porter P, Holt SK, Daling JR, Moe R. Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. *Cancer*. 2000;88(11):2561–9.
28. Goldstein NS. Does the level of E-cadherin expression correlate with the primary breast carcinoma infiltration pattern and type of systemic metastases? *Am J Clin Pathol*. 2002;118(3):425–34.
29. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer*. 1996;77:113–20.
30. Horvath JW, Barnett GE, Jimenez RE, Young DC, Povoski SP. Comparison of intraoperative frozen section analysis for sentinel lymph node biopsy during breast cancer surgery for invasive lobular carcinoma and invasive ductal carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2009;7:34. doi:[10.1186/1477-7819-7-34](https://doi.org/10.1186/1477-7819-7-34).
31. Korhonen T, Huhtala H, Holli K. A comparison of the biological and clinical features of invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;85(1):23–9.
32. Suryadevara A, Paruchuri LP, Banisaeed N, Dunnington G, Rao KA. The clinical behavior of mixed ductal/lobular carcinoma of the breast: a clinicopathologic analysis. *World J Surg Oncol*. 2010;8:51. doi:[10.1186/1477-7819-8-51](https://doi.org/10.1186/1477-7819-8-51).
33. Truin W, Voogd AC, Vreugdenhil G, van der Sangen MJ, van Beek MW, Roumen RM. Influence of histology on the effectiveness of adjuvant chemotherapy in patients with hormone receptor positive invasive breast cancer. *Breast*. 2011;20(6):505–9.

Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer: Predictors of Axillary and Non-Sentinel Lymph Node Involvement

Hakan Postacı², Baha Zengel¹, Ülkem Yazarbaşı³, Adam Uslu¹, Nuket Eliyatkin², Göksever Akpınar¹, Fevzi Cengiz¹, Raika Durusoy⁴

¹Department of General Surgery, Turkish Ministry of Health İzmir Bozyaka Research and Training Hospital, İzmir, Turkey

²Department of Pathology, Turkish Ministry of Health İzmir Bozyaka Research and Training Hospital, İzmir, Turkey

³Department of Nuclear Medicine, Ege University Medical Faculty, İzmir, Turkey

⁴Department of Public Health, Ege University Medical Faculty, İzmir, Turkey

ABSTRACT

Background: Sentinel lymph node biopsy is a standard method for the evaluation of axillary status in patients with T1-2N0M0 breast cancers.

Aims: To determine the prognostic significance of primary tumour-related clinico-histopathological factors on axillary and non-sentinel lymph node involvement of patients who underwent sentinel lymph node biopsy.

Study design: Retrospective clinical study.

Methods: In the present study, 157 sentinel lymph node biopsies were performed in 151 consecutive patients with early stage breast cancer between June 2008 and December 2011.

Results: Successful lymphatic mapping was obtained in 157 of 158 procedures (99.4%). The incidence of larger tumour size (2.543 ± 1.21 vs. 1.974 ± 1.04), lymphatic vessel invasion (70.6% vs. 29.4%), blood vessel invasion (84.2% vs. 15.8%), and invasive lobular carcinoma subtype (72.7% vs. 27.3%) were statistically significantly higher in patients with positive SLNs. Logistic stepwise regression analysis disclosed tumour size (odds ratio: 1.51, $p=0.0021$) and lymphatic vessel invasion (odds ratio: 4.68, $p=0.001$) as significant primary tumour-related prognostic determinants of SLN metastasis.

Conclusion: A close relationship was identified between tumour size and lymphatic vessel invasion of the primary tumour and axillary lymph node involvement. However, the positive predictive value of these two independent variables is low and there is no compelling evidence to recommend their use in routine clinical practice.

Key Words: Breast neoplasms, lymphatic metastasis, sentinel lymph node biopsy.

Received: 24.06.2013

Accepted: 26.09.2013

Introduction

Subsequent to breast-conserving surgery, sentinel lymph node biopsy (SLNB) has emerged as another major step in the surgical treatment of breast cancer. In the meantime, it is accepted as the standard method for the evaluation of axillary status in patients with T1-2N0M0 breast cancers. Completion of axillary lymph node dissection (ALND) is the standard surgical procedure for patients with metastatic SLNs (1). The prognostic significance of micrometastasis in SLN or non-SLN is still a matter of debate. A meta-analysis by Dowlathshahi et al. indicated a statistically significant reduction in survival of patients with occult micrometastatic nodal disease (2). Recent data from studies investigating the prognostic significance of lymph node micrometastases compared with node-negative disease revealed poorer disease-free survival (DFS) (3), which was close to 40% (4), or overall survival (OS) rates in the micrometastatic group (5, 6). Thus, the data emphasised the risk of observational protocols in this subgroup of patients (7). On the contrary, a novel conservative approach omitting ALND in SLN-positive patients has been suggested recently (8). In view of the

literature mentioned above, we have so far accepted both macro- and micrometastatic disease essentially as the stages of a disease process and have treated them with the same surgical methods and medical approach.

Following the evolution of axillary conservation concept, determination of risk factors influencing axillary lymph node involvement aroused interest in many investigators (9, 10). Moreover, estimation of the risk of positive non-SLN in SLN-positive patients has been an area of research and several mathematically designed nomograms that are essentially based on information about pathological features and the method of detection were developed (11-14).

In this retrospective analysis, we reviewed our results in SLNB and elucidated the association between primary tumour-related histopathological factors and axillary lymph node involvement. In addition, we systematically reviewed the current evidence on this issue and evaluated the positive predictive value (PPV) of primary tumour-related factors on SLN involvement in a meta-analysis. As a secondary objective, we employed patient characteristics and primary tumour-related histopathological factors to evaluate their effectiveness in predicting the involvement of non-SLN metastasis.



Material and Methods

The study group consisted of 157 breast cancer patients (155 female and 2 male) who underwent SLNB between June 2008 and December 2011. All patients had unilateral lesions. A total of 158 SLNBs were performed. The age range was 24–86 years (mean: 56.8 ± 13.8). Thirty-three patients had prior excisional biopsy. Patient characteristics such as age, menopausal status, primary tumour characteristics including histological type (HT), histological grade (HG) via the modified Bloom and Richardson system, tumour size (TS), lympho-vascular invasion (LVI), and blood vessel invasion (BVI), and ER, PR, *cerb-B2*, *p53*, and *Ki67* status were assessed as potential predictive factors of axillary lymph node involvement.

Lymphatic mapping was performed by a combined method (blue dye and radiocolloid) in 87 procedures and only by radiocolloid in the remaining 75 procedures due to temporary blue-dye shortage. Three different radiocolloids, with respect to colloid diameter and chemical composition, were used. Of the commercially available products; Tc^{99m} -tin colloid (TC) (Amerscan Hepatate II; Amersham International, Amersham, U.K.) was used in 17, Tc^{99m} nanocolloid of serum albumin (NC) (Nanocol; Nycomed Amersham Sorin s.r.l., Saluggia, Italy) was used in 43, and Tc^{99m} colloidal rhenium sulphide (CS) (Nanocis; CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, France) was used in 89 procedures. Mean colloid diameter was 72–88 nm in TC, 8 nm in NL, and 22–29 nm in NC. Radiocolloid was injected subdermally in the four quadrants of the periareolar region on the day (18–24 hr) before surgery in all 149 procedures. For each injection, 0.25 mCi of radiocolloid was prepared in 0.1 mL volume. Before the operative procedure, lymphatic images were collected at anterior and lateral projections within an hour following injection. Isosulphan blue 1% (Lymphazurin® Tyco Healthcare Group LP, Norwalk, CT 06856 USA) was injected into the subareolar space in 5 mL volume following induction of anaesthesia. Five minutes of efficient massage was performed to stimulate lymphatic drainage. In group A, all hot and/or blue nodes and in group B, all hot nodes were accepted as SLNs and were harvested. Hot nodes were defined as nodes bearing radioactivity fourfold of the background activity and were localised using a hand-guided gamma probe (Navigator® GPS, Tyco Healthcare, Group LP, Norwalk, CT USA). 'Successful lymphatic mapping' was defined as localisation of one or multiple SLN(s) by radiocolloid and/or blue dye. SLNs were evaluated with frozen section analysis intraoperatively. At least two sections were prepared and examined. In case of suspicion, an additional two sections from the same SLN were evaluated. The remaining tissue fragments of the SLNs were formalin-fixed, paraffin-embedded, and sectioned. Haematoxylin&Eosin (HE) staining was used for histological evaluation. Immunohistochemistry using cytokeratin antibody was used for lymph nodes that were negative with HE staining. The detection of metastatic cells in one of these steps was defined as a 'positive SLN'. Metastatic lymph nodes were classified according to the size of metastatic deposit as macrometastasis (>2 mm) and micrometastasis (0.2-2 mm). Cell clusters or isolated tumour cells of <0.2 mm diameter were described as submicrometastasis. Patients having macro- or

micrometastasis in sentinel nodes underwent axillary dissection (ALND). No additional axillary clearance was performed in patients with submicroscopic deposits because of unknown biological relevance of these cells.

The precise effect of patient and primary tumour characteristics in different studies were qualitatively examined in a meta-analysis. The primary objective was to determine the PPV of the statistically significant prognosticators of SLN involvement in independent studies (9, 15-19).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) for Windows. The relationship between clinico-pathological variables and axillary lymph node involvement was initially evaluated using univariate analysis. Following this, multivariate logistic regression analysis was performed in order to demonstrate the relationship between significant dependent variables and their relevance to metastatic involvement of SLNs or non-SLNs. Two-sided *p* values were calculated for all tests and a *p* value less than 0.01 was considered statistically significant.

Results

Successful lymphatic mapping was achieved in 157 of 158 procedures (99.4%). Radiocolloid uptake was observed in all 148 cases. The single patient with unsuccessful lymphatic mapping had a prior excisional biopsy in the upper outer quadrant and was treated by the combined method.

SLNs were metastatic in 59 (37.6%) cases. Forty-seven of them were diagnosed during frozen section analysis and 12 during the evaluation of H&E-stained paraffin sections or immunohistochemistry. In this latter group, 10 SLNs had micrometastasis and one had macrometastasis. In a single patient with three consecutive negative SLNs, we harvested a parasentinel node with suspicious macroscopic appearance and demonstrated micrometastatic deposits in paraffin sections. Among 47 patients, one had micrometastasis and 46 had macrometastasis. Complementary axillary dissection was performed in all patients with positive SLNs and in the particular patient with positive parasentinel node.

No additional metastatic lymph nodes were identified in paraffin section analysis of the ALND specimens of 12 patients with micrometastatic nodal disease. However, additional metastatic lymph nodes were detected in 19 of 47 (40.4%) patients with macrometastasis in SLNs (range: 1-25, median: 2). Of the 12 patients with micrometastatic nodal involvement, only one (8.3%) was detected by frozen section analysis.

Patient characteristics and results of the histopathological evaluation of the primary tumour are shown in Table 1. Patient demographics and histopathological features of the primary tumour that were likely to predict metastatic involvement of SLNs are shown in Table 2. Any potential confounder that had a $p < 0.01$, which reflected a relationship with the outcome was included in the multiple logistic regression analysis. TS ($p = 0.002$), tumour histology (presence of ILC, $p = 0.001$), and blood and lymphatic vessel invasion ($p < 0.0001$) were statistically significantly associated with tumour involvement of SLNs

Table 1. Patient and tumour characteristics

Characteristics	Number of patients (%)
All cases	151
Mean age, years (range)	56.8 (24–88)
Sex	
Female	149 (98.7)
Male	2 (1.3)
Menopausal Status	
Postmenopausal	97 (65.1)
Premenopausal	52 (34.9)
Breast Surgery	
Mastectomy	81 (51.6)
Lumpectomy	76 (48.4)
Histology	
Invasive ductal carcinoma	99 (63.1)
Invasive lobular carcinoma	11 (7.0)
Mixed (invasive ductal + invasive lobular carcinoma)	16 (10.2)
Ductal carcinoma in situ	10 (6.4)
Others	21 (13.4)
Histological Grade	
1	14 (8.9)
2	89 (56.7)
3	36 (22.9)
Mean Tumour Size (cm) (range)	2.192 (0.2–6)
SLN Metastasis	
None	97 (61.8)
Metastatic	47 (29.9)
Micrometastatic	13 (8.3)
ER	
Positive	110 (70.1)
Negative	44 (28.0)
Unknown	3 (1.9)
PR	
Positive	109 (69.4)
Negative	45 (28.7)
Unknown	3 (1.9)
c-erbB2	
Positive	29 (18.5)
Negative	116 (73.9)
Unknown	12 (7.6)
p53	
Positive	34 (21.7)
Negative	91 (58.0)
Unknown	32 (20.4)
Ki67	
Positive	31 (19.7)
Negative	95 (60.5)
Unknown	31 (19.7)

SLN: sentinel lymph node; ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor

Table 2. Comparison of clinical and histopathological characteristics in SLN (+) and SLN (-) patients and their statistical significance

	SLN (-) N (%)	SLN (+) N (%)	p
Age (years)			
>50	35 (57.4)	26 (42.6)	0.192
≤50	63 (65.6)	33 (34.4)	
Menopausal Status			
Premenopausal	31 (57.4)	23 (42.6)	0.396
Postmenopausal	65 (64.4)	36 (35.6)	
Tumour Histology			
IDC	58 (58.6)	41 (41.4)	0.001
ILC	3 (27.3)	8 (72.7)	
Mixed (IDC+ILC)	8 (50.0)	8 (50.0)	
DCIS	10 (100.0)	0 (0.0)	
Others	18 (85.7)	3 (14.3)	
Histological Grade			
HG1	12 (85.7)	2 (14.3)	0.09
HG2	51 (57.3)	38 (42.7)	
HG3	19 (52.8)	17 (47.2)	
Tumour Size (cm) (mean±SD)	1.974±1.038	2.254±1.207	0.002
Lymphatic Vessel Invasion			
(-)	87 (70.7)	36 (29.3)	<0.0001
(+)	10 (29.4)	24 (70.6)	
Blood Vessel Invasion			
(-)	94 (68.1)	44 (31.9)	<0.0001
(+)	3 (15.8)	16 (84.2)	
Oestrogen Receptor			
ER (-)	27 (61.4)	17 (38.6)	0.958
ER (+)	67 (60.9)	43 (39.1)	
Progesterone Receptor			
PR (-)	29 (64.4)	16 (35.6)	0.578
PR (+)	65 (59.6)	44 (40.4)	
c-erbB2			
Negative or (1+) or (2++) and FISH (-)	72 (62.1)	44 (37.9)	0.309
(3+++) or (2++) and FISH (+)	15 (51.7)	14 (48.3)	
p53 (+) >10%			
(-)	51 (56.0)	40 (44.0)	0.780
(+)	20 (58.8)	14 (41.2)	
Ki67 (+) >14%			
(-)	56 (58.9)	39 (41.1)	0.474
(+)	16 (51.6)	15 (48.4)	

SLN: sentinel lymph node; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; DCIS: ductal carcinoma in situ; FISH: fluorescence in situ hybridization

Table 3. Multivariate logistic regression analysis for predicting tumour-related variables having a potential influence on SLN metastasis

	Odds ratio	95% confidence interval	p value
Tumour size	1.511	1.065–2.144	0.0021
Lymphovascular invasion	4.680	1.865–11.743	0.001

in the univariate analysis. These four independent variables were further evaluated by logistic stepwise regression analysis, which disclosed tumour size (odds ratio: 1.51, $p=0.0021$) and LVI (odds ratio: 4.68, $p=0.001$) as the only significant primary tumour-related prognostic determinants of SLN metastasis (Table 3). However, the PPV of both tumour size (0.47) and LVI (0.70) in determining SLN involvement remained lower than expected.

The same variables were reevaluated to identify their probable impact on non-SLN involvement of patients with micro- or macrometastatic SLNs following ALND (Table 4). Here again, LVI of the primary tumour ($p=0.002$) appeared as the unique prognostic determinant of non-SLN metastasis. With regard to other covariates, the impact of tumour size and BVI ($p=0.066$) disclosed a statistical trend, but was not statistically significant.

The review of the literature revealed six methodologically sound studies with some risk factors being included in the assessment of metastatic involvement of SLNs (Table 5 and 6). Tumour size and/or LVI were invariably the significant two factors in determining SLN metastasis in multivariate regression analysis in all studies. We evaluated the PPV and NPV (negative predictive value) of these two determinants cumulatively and display the results in Tables 5 and 6.

Discussion

SLNB is currently the accepted standard method for the evaluation of axillary status in patients with stage 1 and 2 breast cancer (1, 20-23). Almost 75% of patients in this group benefit from the technique by avoidance of unnecessary axillary dissection and its related morbidity (24).

Many controversial issues have been disputed following the introduction of SLNB for the assessment of axillary status in early breast cancer. Some authors recommended complementary axillary dissection in patients with micrometastasis due to the relationship of subclinical nodal disease with worse survival figures (3, 5-7, 25).

On the contrary, this concept has been questioned even in patients with metastatic SLNs, due to the encouraging survival results in recent publications. The Z0011 trial, the only multicentre randomised phase 3 study, compared ALND with no further axillary treatment in patients with axillary lymph node metastasis. The primary objective of this study was OS with the determination of non-inferiority of SLND to ALND. The study prematurely closed due to enrolment of less than 50% of the targeted population (planned: 1900 patients, enrolled:

Table 4. Clinical and histopathological features of metastatic or tumour-free non-SLNs in SLN-positive patients who underwent axillary lymph node dissection

	Non-SLNs without tumour N (%)	Non-SLNs with tumour N (%)	p
Age (years)			
≤50	17 (65.4)	9 (34.6)	0.470
>50	23 (69.7)	10 (30.3)	
Menopausal Status			
Premenopausal	14 (60.9)	9 (39.1)	0.363
Postmenopausal	26 (72.2)	10 (27.8)	
Tumour Histology			
IDC	27 (65.9)	14 (34.1)	NA
ILC	7 (87.5)	1 (12.5)	
Mixed (IDC+ILC)	5 (62.5)	3 (37.5)	
Others	2 (66.7)	1 (33.3)	
Histological Grade			
HG1	2 (100.0)	0 (0.0)	NA
HG2	29 (76.3)	9 (23.7)	
HG3	7 (41.2)	10 (58.8)	
Tumour Size			
(cm) (median±IR)	2.0±1.5	2.8±1.5	0.066
Lymphatic Invasion			
(-)	30 (83.3)	6 (16.7)	0.002
(+)	11 (45.8)	13 (54.2)	
Blood Vessel Invasion			
(-)	33 (75.0)	11 (25.0)	0.066
(+)	8 (50.0)	8 (50.0)	
Oestrogen Receptor			
ER (-)	11 (64.7)	6 (35.3)	0.704
ER (+)	30 (69.8)	13 (30.2)	
Progesterone Receptor			
PR (-)	11 (68.8)	5 (31.3)	0.967
PR (+)	30 (68.2)	14 (31.8)	
c-erbB2			
Negative or (1+) or (2++) and FISH (-)	29 (65.9)	15 (34.1)	0.486
(3+++) or (2++) and FISH (+)	10 (71.4)	4 (28.6)	
p53 (+) >10%			
(-)	30 (75.0)	10 (25.0)	0.083
(+)	7 (50.0)	7 (50.0)	
Ki67 (+) >14%			
(-)	29 (74.4)	10 (25.6)	0.123
(+)	8 (53.3)	7 (46.7)	
SLN: sentinel lymph node; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; FISH: fluorescence in situ hybridization			

SLN: sentinel lymph node; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; FISH: fluorescence in situ hybridization

Table 5. Analysis of the impact of tumour size on sentinel lymph node metastasis (literature review) (9, 15-19)

Study	T≤2 cm/All	T>2 cm/All	p value	PPV	NPV	Sensitivity	Specificity	Accuracy
Rivadeneira	NA	NA	0.01	NA	NA	NA	NA	NA
Fan	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ozmen	65/218	83/161	<0.0001	0.52	0.70	0.56	0.66	0.62
Mustac	NA	NA	0.004	NA	NA	NA	NA	NA
Aitken	69/286	160/337	<0.01	0.47	0.76	0.70	0.55	0.61
Boler	69/222	67/110	0.0001	0.61	0.69	0.49	0.78	0.66
Present Study	29/91	31/66	0.002	0.47	0.68	0.52	0.64	0.59
Total	232/817	341/674	NA	0.51	0.72	0.60	0.64	0.62

T: tumour size; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value

Table 6. Analysis of the impact of lymphovascular invasion on sentinel lymph node metastasis (literature review) (9, 15-19)

Study	LVI (-)/All	LVI (+)/All	p value	PPV	NPV	Sensitivity	Specificity	Accuracy
Rivadeneira	68/450	14/28	0.0001	0.50	0.85	0.17	0.96	0.83
Fan	81/336	32/47	NA	0.68	0.76	0.28	0.94	0.75
Ozmen	67/223	81/161	<0.001	0.50	0.70	0.55	0.66	0.62
Mustac	38/195	21/64	0.034	0.33	0.81	0.36	0.79	0.69
Aitken	127/455	97/168	<0.001	0.58	0.72	0.43	0.82	0.68
Boler	51/210	82/109	0.0001	0.75	0.76	0.62	0.85	0.76
Present Study	36/123	24/34	<0.0001	0.71	0.71	0.40	0.90	0.71
Total	468/1992	351/611	NA	0.57	0.77	0.43	0.85	0.72

LVI: lymphovascular invasion; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value

891 patients). The definition of clinical non-inferiority was too lax and the assumption was 5-year survival in the SLND arm to be no less than 75% of that in the ALND arm. Initially, 500 deaths were required to reach 90% statistical power to confirm non-inferiority of SLND with the use of a two-sided 90% confidence interval (8). However, final survival analysis has been reported at a median follow-up of 6.3 years with 94 deaths (42 in the SLN group and 52 in the ALND group). Moreover, axillary recurrence rate in the SLN arm was double that in the ALND arm (26). With these drawbacks in mind, the conclusion of the authors that SLND was non-inferior to ALND in patients with SLN metastasis should be interpreted very cautiously.

Improvements in imaging, surgical and radiation methods, and introduction of sophisticated pathological evaluation and effective systemic adjuvant chemotherapy entail revisiting of standard local therapy (27). In our series, none of the 11 patients with micrometastasis in SLNs had additional metastatic lymph nodes in dissection material, whereas 44.2% of patients with macrometastatic disease in SLNs had additional metastatic non-sentinel lymph nodes. These results are compatible with the current literature (12). With a conservative point of view, one might claim that all patients with micrometastasis and 55.8% of patients with macrometastasis in SLNs have been overtreated in our study group. In order to avoid unnecessary ALND, preoperative risk assessment for axillary

status is of the utmost importance to estimate the metastatic involvement of the SLN and the likelihood of additional residual disease in the non-SLN (15, 28-30). In both situations, certain demographic characteristics of the patient and histological features of the tumour that are highly predictive of SLN and non-SLN status would be helpful in decision making.

As reported in the previous studies, the low identification rate of micrometastases by frozen section and conventional H&E staining (7) and the strong evidence about the impact of micrometastatic nodal disease on locoregional recurrence (31, 32) warrant identification of primary tumour-related histopathological factors with high predictive ability. Many studies have validated the MSKCC nomogram, which was proposed for predicting non-SLN metastases. Some of them did not find it trustworthy particularly for SLNs with micrometastatic involvement, while others have proposed a different procedure for improving predictive accuracy (11, 33). Given that the patients presented with a high frequency of micrometastasis, the predictive ability of non-SLN involvement of the Tenon and Stanford nomograms is the most important in this regard (14, 34). In two studies, the MSKCC nomogram did not prove to be reliable for identifying non-SLN metastasis in patients with micrometastasis-positive SLNs, with an area under the ROC curve of 54% and 59%, respectively (11, 34). However, the Cambridge model and a novel Turkish formula seem to be uninfluenced by SLN micrometastasis and non-SLN positivity

rates and have an area under the ROC curve of over 80% each, and thus deserve further validation in prospective trials (13, 14, 35). Age, menopausal status, HT, HG, size of the tumour, lymphatic and blood vessel invasion, and hormone receptor status are previously studied factors.

Despite the inhomogeneity of data concerning predictors of axillary positivity, the literature review and our results pointed to tumour size and lymphovascular invasion as factors having an influence on axillary metastatic rates (9, 15-19). Recently, in a prospective study of 177 patients concerning early invasive breast cancer treatment via tumour excision and SLNB, TS ($p=0.003$) and LVI ($p=0.01$) appeared to be the only histopathological characteristics having a significant association with lymph node positivity in multivariate analysis (36). However, the PPV of these two parameters in determining metastatic involvement of SLNs remained very low both in our study and in cumulative analysis of six studies including more than 4000 patients, thus hindering us from recommending their use in routine clinical practice and surgical decision making.

In our study, the low detection rate of micrometastatic deposits in SLNs by frozen section analysis was an interesting observation. Almost 92% percent (11 of 12 patients) of micrometastasis had been missed during intraoperative frozen section. There is a disparity of view on the contribution of complementary rapid IHC for improving the diagnostic ability of intraoperative FS in the subset of patients with micrometastatic disease (37-39). Our technique using H&E staining during frozen section analysis yielded a sensitivity of 97.9% for macrometastatic disease, which is comparable to prior reports based on the rapid-IHC technique (39).

In conclusion, frozen section analysis using H&E staining was very successful in detecting macrometastatic disease in SLNs; however, the technique failed to detect most of the micrometastasis. Among various factors, TS and lymphovascular invasion of the primary tumour were determined as predisposing factors for axillary SLN and non-SLN involvement. True-cut or excisional biopsy of primary tumour in patients with early stage breast cancer is a common clinical practice. Histopathological evaluation of paraffin-embedded but not frozen section specimens clearly demonstrated the prognosticators of axillary involvement. However, as the PPV of these prognosticators was unacceptably low, it is very premature to recommend the application of this information before proceeding to axillary dissection.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study.

Informed Consent: Written informed consent was received from the participants of this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept – H.P., B.Z., Ü.Y.; Design – B.Z., Ü.Y.; Supervision – A.U., H.P.; Resource – H.P., B.Z., N.E.; Materials – H.P., B.Z., N.E., A.U.; Data Collection&/or Processing – B.Z., N.E., G.A.; Analysis&/or Interpretation – B.Z., A.U., R.D.; Literature Search – B.Z., Ü.Y., A.U., G.A.; Writing – B.Z., Ü.Y., A.U.; Critical Reviews – H.P., A.U.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study received no financial support.

References

- Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U; Consensus Conference Committee. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19-22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer* 2002;94:2542-51. [\[CrossRef\]](#)
- Dowlathshahi K, Fan M, Snider H, Habib F. Lymph node micrometastases from breast carcinoma:reviewing dilemma. *Cancer* 1997;80:1188-97. [\[CrossRef\]](#)
- Colleoni M, Rotmensz Z, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Mazzarol G, Pruneri G, et al. Size of breast cancer metastases in axillary lymph nodes:clinical relevance of minimal lymph node involvement. *J Clin Oncol* 2005;23:1379-89. [\[CrossRef\]](#)
- van der Heiden-van der Loo M, Schaapveld M, Ho VK, Siesling S, Rutgers EJ, Peeters PH. Outcomes of a population-based series of early breast cancer patients with micrometastases and isolated tumour cells in axillary lymph nodes. *Ann Oncol* 2013;24:2794-801. [\[CrossRef\]](#)
- Grabau D, Jensen MB, Rank F, Blichert-Toft M. Axillary lymph node micrometastasis in invasive breast cancer:national figures on incidence and overall survival. *APMIS* 2007;115:828-37. [\[CrossRef\]](#)
- Kuijt GP, Voogd AC, van de Poll-Franse LV, Scheijmans LJ, van Beek MW, Roumen RM. The prognostic significance of axillary lymph-node micrometastases in breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:500-5. [\[CrossRef\]](#)
- Wada N, Imoto S. Clinical evidence of breast cancer micrometastases in the era of sentinel node biopsy. *Int J Clin Oncol* 2008;13:24-32. [\[CrossRef\]](#)
- Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group 2001 randomized trial. *Ann Surg* 2010;252:426-33.
- Aitken E, Osman M. Factors affecting nodal status in invasive breast cancer:a retrospective analysis of 623 patients. *Breast J* 2010;16:271-8. [\[CrossRef\]](#)
- Wada N, Imoto S, Yamauchi C, Hasebe T, Ochiai A. Predictors of tumour involvement in remaining axillary lymph nodes of breast cancer patients with positive sentinel lymph node. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:29-33. [\[CrossRef\]](#)
- Alran S, De Rycke Y, Fourchotte V, Charitansky H, Laki F, Falcou MC, et al. Institut Curie Breast Cancer Study Group, Validation and limitations of use of a breast cancer nomogram predicting the likelihood of non-sentinel node involvement after positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2007;14:2195-201. [\[CrossRef\]](#)
- Moghaddam Y, Falzon M, Fulford L, Williams NR, Keshtgar MR. Comparison of three mathematical models for predicting the risk of additional axillary nodal metastases after positive sentinel lymph node biopsy in early breast cancer. *Br J Surg* 2010;97:1646-52. [\[CrossRef\]](#)
- Gur AS, Unal B, Ozbek U, Ozmen V, Aydogan F, Gokgoz S, et al. Turkish Federation of Breast Disease Associations Protocol MF08-01 investigators. Validation of breast cancer nomograms for predicting the non-sentinel lymph node metastases after a positive sentinel lymph node biopsy in a multi-center study. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:30-5. [\[CrossRef\]](#)
- Zhu L, Jin L, Li S, Chen K, Jia W, Shan Q, et al. Which nomogram is best for predicting non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients? A meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137:783-95. [\[CrossRef\]](#)
- Ozmen V, Karanlık H, Cabioglu N, Igci A, Kecer M, Asoğlu A, et al. Factors predicting the sentinel and non-sentinel lymph node

- metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95:1-6. [\[CrossRef\]](#)
16. Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, Hanna K, Daly JM, Osborne MP. Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg* 2000;191:1-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Boler DE, Uras C, Ince U, Cabioglu N. Factors predicting the non-sentinel lymph node involvement in breast cancer patients with sentinel lymph node metastases. *The Breast* 2012;21:518-23. [\[CrossRef\]](#)
18. Mustac E, Matusan-Ilijas K, Marijic B, Smokvina M, Jonjic N. Predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast carcinoma patients with positive sentinel node biopsy. *Int J Surg Pathol* 2010;18:36-41. [\[CrossRef\]](#)
19. Fan YG, Tan YY, Wu CT, Treseler P, Lu Y, Chan CW, et al. The effect of sentinel node tumor burden on non-sentinel node status and recurrence rates in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:705-11. [\[CrossRef\]](#)
20. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. Sentinel-lymph-node biopsy as a staging procedure in breast cancer:update of a randomised controlled study. *Lancet Oncol* 2006;7:983-90. [\[CrossRef\]](#)
21. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:546-53. [\[CrossRef\]](#)
22. McMasters KM, Tuttle TM, Carlson DJ, Brown CM, Noyes RD, Glaser RL, et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer:a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *J Clin Oncol* 2000;18:2560-6.
23. Samphao S, Eremin JM, El-Sheemy M, Eremin O. Management of the axilla in women with breast cancer:Current clinical practice and a new selective targeted approach. *Ann Surg Oncol* 2008;15:1282-96. [\[CrossRef\]](#)
24. Kell MR, Burke JP, Barry M, Morrow M. Outcome of axillary staging in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:441-7. [\[CrossRef\]](#)
25. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet*. 1999;354:896-900. [\[CrossRef\]](#)
26. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis:a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305(6):569-75. [\[CrossRef\]](#)
27. Schwartz GF. Clinical practice guidelines for the use of axillary sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast:current update. *Breast J* 2004;10:85-8. [\[CrossRef\]](#)
28. Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de Velde CJ, Mansel RE, Bogaerts J, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1854-61. [\[CrossRef\]](#)
29. Silverstein M, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinoma. *World J Surg* 2001;25:767-72. [\[CrossRef\]](#)
30. Gajdos C, Tartter PI, Bleiweiss JJ. Lymphatic invasion, tumor size and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancers. *Ann Surg* 1999;230:692-6. [\[CrossRef\]](#)
31. Tjan-Heijnen VC, Pepels MJ, de Boer M, Borm GF, van Dijk JA, van Deurzen CH, et al. Impact of omission of completion axillary lymph node dissection or axillary radiotherapy in breast cancer patients with micrometastases or isolated tumor cells in the sentinel lymph node:results from the MIRROR study. *J Clin Oncol* 2009;27:18s.
32. Cox C, Vrcel V, Riker A, White L, Allred N, Ramos D, et al. Significance of sentinel lymph node micrometastase on survival for patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(Suppl 1):12-21.
33. van la Parra RF, Ernst MF, Bevilacqua JL, Mol SJ, Van Zee KJ, Broekman JM, et al. Validation of a nomogram to predict the risk of nonsentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy:validation of the MSKCC breast nomogram. *Ann Surg Oncol* 2009;16:1128-35. [\[CrossRef\]](#)
34. D'Eredita G, Troilo VL, Giardina C, Napoli A, Rubini G, Fischetti F, et al. Sentinel lymph node micrometastasis and risk of non-sentinel lymph node metastasis:validation of two breast cancer nomograms. *Clin Breast Cancer* 2010;10:445-51. [\[CrossRef\]](#)
35. Pal A, Provenzano E, Duffy SW, Pinder SE, Purushotham AD. A model for predicting non-sentinel lymph node metastatic disease when the sentinel lymph node is positive. *Br J Surg* 2008;95:302-9. [\[CrossRef\]](#)
36. Klevesath MB, Pantel K, Agbaje O, Provenzano E, Wishart GC, Gough P, et al. Patterns of metastatic spread in early breast cancer. *Breast* 2013;22:449-54. [\[CrossRef\]](#)
37. Viale G, Bosari S, Mazzarol G, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, et al. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer* 1999;85:2433-8. [\[CrossRef\]](#)
38. Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, et al. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer* 2009;115:1555-62. [\[CrossRef\]](#)
39. Choi YJ, Yun HR, Yoo KE, Kim JH, Nam SJ, Choi YL, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultrarapid immunohistochemistry in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36:489-93. [\[CrossRef\]](#)

RESEARCH ARTICLE

Properties of Synchronous Versus Metachronous Bilateral Breast Carcinoma with Long Time Follow Up

Nuket Eliyatkin^{1*}, Baha Zengel², Ayse Yagci³, Erdem Comut³, Hakan Postaci³, Adam Uslu⁴, Safiye Aktas⁵

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cancer type among women with increasing incidence rates, improved prognosis and survival. According to the localization of the tumor, breast cancer is designated as unilateral (UBC) or bilateral (BBC). BBC can be classified as synchronous (SCCB) or metachronous (MBBC) based on the time interval between the diagnosis of the first and the secondary tumors. According to the guideline of WHO 2012, BBC is generally defined as SBBC when contralateral breast carcinoma is diagnosed within 3 months. The aim of this study was to compare the characteristics and patterns of metastasis of BBC patients with UBC. **Materials and Methods:** A cohort of 768 patients with breast cancer treated at the Turkish Ministry of Health-Izmir Bozyaka Research and Training Hospital between 1976 and 2012 were studied. Survival analysis was performed comparing UBC and BBC patients. In addition, evaluations were performed in patients with SBBC and MBBC sub-groups. We used a 3-months interval to distinguish metachronous from synchronous. **Results:** When clinical and histopathological parameters were statistically evaluated, ER status, event-free and overall survival were found to be significant between UBC and BBC patients. In comparison of SBBC and MBBC patients, age, histological type of tumor, event-free and overall survival were found to be significant. **Conclusions:** BBC cases were found to show worse prognosis than UBC cases. Among BBC, SBBC had the worst prognosis based on overall survival rates.

Keywords: Bilateral breast cancer - unilateral breast cancer - metachronous - synchronous

Asian Pac J Cancer Prev, 16 (xx), XXXX-XXXX

Introduction

Breast cancer is the most common cancer type among women which has increasing incidence rates, improved prognosis and survival (Hartman 2007). Various breast cancer types may present with different clinical and biological characteristics. According to the localization of the tumor, breast cancer is designated as unilateral and bilateral. The unilateral breast cancer (UBC) is defined when the tumor is appeared in only one breast tissue. If the tumor arise in each breast tissue, this type of breast carcinoma is called bilateral breast cancer (BBC). Among all breast cancers BBC accounts 2-6 % and the development risk of BBC is two to six fold higher in women who already had primary UBC (Hartman 2007, Chen 1999).

BBC can be classified as synchronous and metachronous based on the time interval between the diagnosis of the first and the secondary tumors. Some previous studies have defined synchronous bilateral breast cancer (SBBC)

as the presentation of breast cancer within 0- 12 months of each other (Chen 2013). According to the guideline of WHO 2012, BBC is generally defined as SBBC when contralateral breast carcinoma is diagnosed within 3 months. If contralateral breast carcinoma is diagnosed more than 3 months, this type of BBC is defined as metachronous bilateral breast carcinoma (MBBC) (Hartman 2007, Irvine 2009). SBBC is also defined as the presentation of breast cancer within 12 months in studies from an epidemiological point of view (Huo 2011, Ibrahim 2015). The SBBC is found to be relatively low between 1 and 3 % of all cases of breast cancers (Holm 2014). SBBC and MBBC shows distinct biological characteristics which are mainly reflecting differences in histopathological features, stage and prognosis (Senkus 2014).

Some studies showed that BBCs are associated with worse outcome and reduced survival. On the contrary, some other studies claimed that there is no significant difference in survival between UBC and BBC. Despite the previous and recent ongoing studies, the impact of the type

¹Pathology, Faculty of Medicine, Adnan Menderes University and Basic Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, Aydin, ²Basic Oncology Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, ³General Surgery, ⁴Pathology, Turkish Ministry of Health-Izmir Bozyaka Research and Training Hospital and Basic Oncology, Institute of Oncology, ⁵General Surgery, Turkish Ministry of Health-Izmir Bozyaka Research and Training Hospital, Izmir, Turkey, *For correspondence: drnuket2003@yahoo.com

of BBC on the prognosis and the survival of the patients, still remains uncertain. (Yoshimura 2013).

The aim of this study to compare the characteristics and patterns of metastasis of BBC patients with UBC. Survival analysis was performed comparing UBC and BBC patients. In addition same evaluations were performed in patients with sub-groups of BBC as SBBC and MBBC.

Materials and Methods

Patients

We identified 768 patients (760 female, 8 male) women who were diagnosed as breast cancer and treated for an invasive primary breast cancer at Turkish Ministry of Health-Izmir Bozyaka Research and Training Hospital between 1976 and 2012. We collected clinical and pathological information of the patients from clinical archive files until October 2014. UBC patients were followed up for 1- 293 months (± 81.65). BBC patients were followed up for 10-401 months (± 117.2). Median follow up period was 90 months. 8 patients were excluded because no further data was achieved after diagnosis. The patients were operated for mastectomy or prophylactic mastectomy. We evaluated estrogen receptor (ER), progesteron receptor (PgR) and CerB2 status, TNM stages, location and number of metastasis, subtype as unilateral or bilateral, SBBC and MBBC types and survivals. Mammographical image of a SBBC patient was shown in Figure 1. Our outcome of interest were local recurrence or distant metastasis. Distant metastases were defined as any lesion located outside the breast tissue, mastectomy scar, ipsilateral axillary lymph nodes or ipsilateral supraclavicular lymph nodes. Metastatic sites were grouped as: bone, lung, liver, central nervous system, gynecological, distant cutaneous; distant lymph nodes; multiple organs. We used a 3-months interval to distinguish metachronous from synchronous CBC.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using SPSS 16.0 software (for Windows, Chicago, IL). Descriptives and frequencies of the parameters in the study were

evaluated with standard derivation. The correlation analysis was done by Pearson correlation test. Statistical analysis were performed by Chi Square test, Mann Whitney U nonparametric test and Independent sample t test. According to the distribution of the parameters and/ or number of the cases in each parameter. Survival analysis was performed by Kaplan Meier test with log rank analysis. P values < 0.05 was considered to be statistically significant.

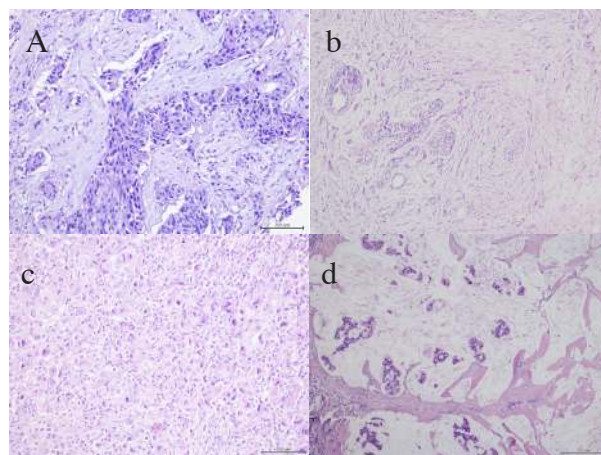


Figure 2. a) Invasive Ductal Carcinoma; b) Invasive Lobular Carcinoma; c) Carcinoma with Signet-Ring Cell; d) Mucinous Carcinoma

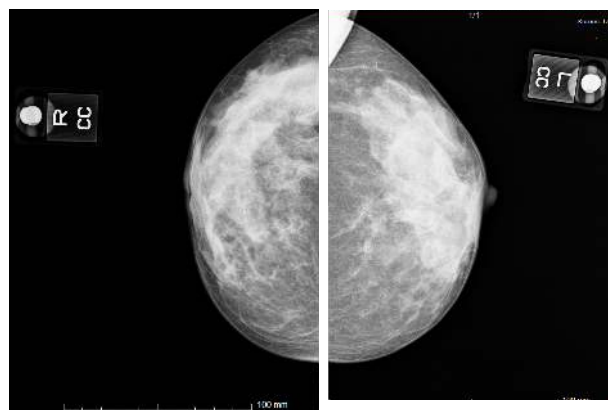


Figure 1. Senkronous Bilateral Breast Carcinoma Mammography

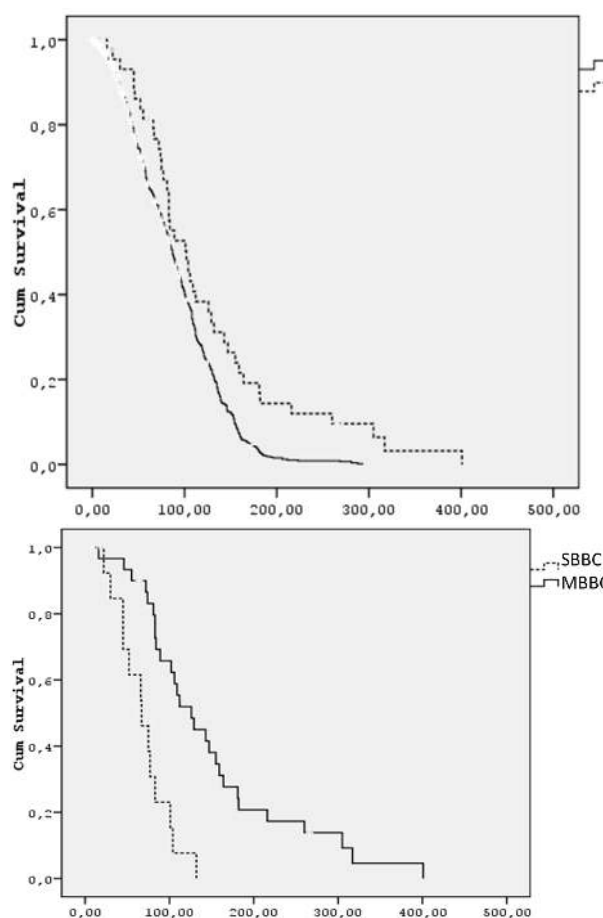


Figure 3. a) Overall Survival Analysis; b) Overall Survival Analysis

Results

This study included 768 patients with breast cancer. 45 of them were BBC either metachronous (n=30) or synchronous (n=15). Eight of the cases were male (all of them were unilateral). 39.5% of the cases had used birth control pills in the past. 43.5% of the cases were premenopause. 85.6% of the cases had underwent modified radical mastectomy, 12.5% cases lumpectomy/quadrantectomy. 65.8% of the cases were diagnosed as invasive ductal carcinoma, 10.8% of the cases were diagnosed as invasive lobular carcinoma and 23.6% of the cases were diagnosed as other types of breast cancer. 59.4% of the cases were ER positive, 59.1% of the cases were PgR positive. 66.4% of the cases were cerbB2 score 0/1+, 12.5% of the cases were cerbB2 score 2 and 21.1% of the cases were cerbB2 score 3. p53 was positive in 20.1% of the cases. Ki67 proliferation index was high (over 14.0%) in 26.3% of the cases. 15.7% of the cases were stage I, 40.9% of the cases were stage II and 33.2%

of the cases were stage III. Stage was not accessed in 8.1% of the cases. 4.9% of the cases had local recurrence. 14.1% of the cases had bone metastasis while 10.2% of the cases had lung metastasis, 8.8% of the cases had liver metastasis and 2% of the cases had brain metastasis. 45.4% of the cases were right sided breast tumor and 48.7% of the cases were left sided breast tumor. 45 of the cases had BBC (5.9%). 15 of the 45 BBC cases had synchronous tumor (33.3%). 30 of the 45 bilateral breast cancer cases had metachronous breast cancer (66.7%) ($p > 0.005$ Chi Square test). The descriptives and frequencies of the clinical and pathological characteristics of all cases were as shown in Table 1.

When histopathologic diagnosis of the groups compared, the invasive ductal carcinoma whether in combination with ductal component or not, was observed in 65.7% of cases in unilateral group, besides it was 75.6% in bilateral group at the first breast diagnosis (Figure 2). 46.6% of the synchronous cases were in the same histopathologic morphology of both sides. Besides 60%

Table 1. [PLEASE SUPPLY]

Characteristics	Unilateral (n=723)	First tumor of BBC (n=45)	P value
Median age (years) (range)	52.79±12.8	52.55±11.31	p=0.167
Histological types:			
Invasive ductal carcinoma	62%	66.7%	p=0.12
Invasive lobular carcinoma	9.7%	12.8%	
Combined carcinoma	9.3%	7.7%	
Others	18%	12.8%	
Tumor size (mean value)	3.22±1.88 cm	3.41±2.16 cm	p=0.574
ER status:			
Positive	58.5%	73.2%	p=0.043
Negative	41.5%	26.8%	
PgR status:			
Positive	58.5%	69.2%	p=0.122
Negative	41.5%	10.8%	
cerbB2 status:			
Positive	20.7%	25%	p=0.078
Negative	67.3%	55%	
Equivocal	12%	20%	
Ki67 proliferation index:			
< 14%	73.6%	72.2%	p=0.898
≥ 14%	26.4%	27.8%	
Nodal status:			
N0	37.3%	40.9%	
N1	24.8%	25%	p=0.518
N2	18.1%	18.2%	
N3	13.9%	11.4%	
TNM stage:			
Stage I	15.6%	17.8%	
Stage II	39.5%	48.9%	p=0.169
Stage III	33.8%	24.4%	
Stage IV	2.6%	6.7%	
Metastasis:			
Positive	24.7%	28.9%	p=0.319
Negative	75.3%	71.1%	
Metastatic site:			
Bone	6.7%	6.2%	
Others (lung, liver, brain)	-	-	p=0.864
None	75.4%	73.3%	
Survival:			
Alive	64.1%	62.2%	p=0.0001
Ex	22.7%	28.9%	

Table 2. [PLEASE SUPPLY]

Characteristics	Synchronous BBC (n=15)	Metachronous BBC (n=30)	P value
Mean age (years) (range)	59.86±11.18	49.13±9.78	p=0.005
Histological types:			
Invasive ductal carcinoma	42.8%	79.2%	p=0.032
Invasive lobular carcinoma	14.2%	12.5%	
Combined carcinoma	21.4%	8.3%	
Others	21.4%	-	
Tumor size (mean value, cm)	3.49±1.53	3.38±2.43	p=0.468
ER status:			
Positive	76.9%	71.4%	p=0.513
Negative	23.1%	28.6%	
PgR status:			
Positive	84.6%	61.5%	p=0.134
Negative	15.4%	38.5%	
cerbB2 status:			
Positive	15.4%	29.6%	p=0.514
Negative	53.8%	55.6%	
Equivocal	30.8%	14.8%	
Ki67 proliferation index:			
< 14%	91.7%	62.5%	p=0.069
≥ 14%	8.3%	37.5%	
Nodal status:			
N0	21.4%	50%	p=0.771
N1	42.9%	16.7%	
N2	28.6%	13.3%	
N3	7.1%	13.3%	
TNM stage:			
Stage I	13.3%	20%	p=0.489
Stage II	46.7%	50%	
Stage III	26.7%	23.3%	
Stage IV	13.3%	3.3%	
Metastasis:			
Positive	20%	33.3%	p=0.285
Negative	80%	66.7%	
Metastatic focus:			
None	80%	70%	p=0.441
Single	13.3%	16.7%	
Multiple	6.7%	13.3%	
Metastatic site:			
None	80%	70%	p=0.327
Bone	13.3%	3.3%	
Others (lung, liver, brain)	-	2%	
Bone + others	6.7%	6.7%	
Overall Survival:			
Alive	73.3%	56.7%	p=0.0001
Exitus	13.3%	36.7%	
N/A	13.3%	6.7%	

of the metachronous cases have the same histopathologic morphology. In bilateral breast cancer cases, metachronous group were mainly diagnosed as invasive ductal or lobular carcinoma. However in synchronous group, other types of breast carcinoma like signet-ring cell differentiated carcinoma, mucinous carcinoma, tubular carcinoma, carcinoma with medullary carcinoma, intracystic papillary carcinoma, apocrine carcinoma were observed especially in one side (Figure 2). The concordance of the histopathologic diagnosis in both breasts were not observed in synchronous. The descriptives and frequencies of the clinical and pathological characteristics of SBBC and MBBC were as shown in Table 2.

When clinical and histopathological parameters were statistically evaluated, ER status, event-free and overall

survival were found to be significant between UBC and BBC patients. In comparison of SBBC and MBBC patients, age, histological type of tumor, event-free and overall survival were found to be significant. The mean age of synchronous cases is 59±8.6. But in metachronous cases, the mean age is 49.13±9.78. The mean age of unilateral cases is 52.79±12.8. There was no statistically significance for age when unilateral and bilateral cases compared (independent samples T test p=0.89). But metachronous cases were younger than synchronous cases (p=0.005). BBC cases had ER expression more than UBC cases (p=0.043). Event-free survival (EFS) is found to be statically correlated between unilateral and bilateral cases (p=0.009) (log-rank test). Event-free survival (EFS) is found to be statically correlated between metachronous

and synchronous bilateral breast cancer unilateral and bilateral cases ($p=0.013$) (log-rank test). SBBC patients had higher overall survival rates than both UBC and MBBC ($p=0.0001$) (Figure 3).

Discussion

Several studies had reported that UBC and BBC types showed various metastatic and prognostic patterns. According to these previous studies, the family history of breast cancer, young age at the time of the first diagnosis, a lobular histology or multicentricity of the first primary breast cancer were found to be increasing the risk of BBC development (Schwenter 2012, Shi 2012). However, metastatic and prognostic patterns of sub-groups of BBC that are known as SBBC and MBBC have not been well clarified. Therefore, in this study the clinical and pathological parameters were analysed in comparison with UBC and BBC also in subgroups of SBBC and MBBC.

Shi et al, had shown that MBBC patients diagnosed within 24 months after the initial diagnosis had significantly worse prognosis than SBBC patients (Shi, 2012). In this study, the diagnosis age of first metachronous tumor was found to be the earliest in MBBC patients among all other patients. According to the long interval between the first and the second tumor diagnosis in these MBBC patients, we suggest that there should be a different multistep carcinogenetical pathway inducing the occurrence of the second tumor. We questioned if the histopathological types of MBBCs differ from each other based on time so first we sub-grouped MBBC as early (time of diagnosis <36 months) or late (>36 months). In these subgroups we found that invasive lobular or ductal breast carcinoma types were found to be the most common type among late MBBCs. On the contrary, the late MBBCs patients most commonly had the signet-ring cell carcinoma type. The classification of the signet-ring cell carcinoma type is a conflict whether it is included in ductal or lobular carcinoma. As we found that this complex carcinoma type was more common in late MBBCs even though both breast tissues were exposed to the same carcinogenic effects. During the late interval of the secondary tumor occurrence, an additional biological change might be responsible for the transformation to this complex type.

Hartman et al. (2007) showed that SBBC and MBBC diagnosed at different ages showed profound differences in the incidence trends and prognostic outlook (Hartman et al., 2007). In this study, the age of diagnosis did not show statistical significance between UBC and BBC cases however MBBC patients were found to be younger than SBBC patients.

Baykara et al investigated 90 MBBC and 60 SBBC in a retrospective analysis of ten years period (Baykara 2012). They found that MBBC was different from SBBC by having more advanced grade and stage, beside less ER expression, more frequent rates of local relapse and distant metastasis. In their series, MBBC cases responded better to chemotherapy in case of relapse/metastasis. Similarly, we founded that MBBC patients had less ER expression and more frequent rates of single or multipl metastasis than SBBC patients. Also, there was more advanced stage

for stage I and II in MBBC. We founded that the most common stage in MBBC was stage II.

Schwentner et al, had studied the association of UBC and BBC types with prognosis. They showed that the patients with BBC have primarily a worse prognosis in terms of relaps-free and overall survival than patients with primarily UBC (Schwentner, 2012). Ibrahim et al compared SBBC and MBBC patient characteristics and evaluated their impact on prognosis. They followed up and evaluated 110 cases of BBC between 2005 and 2009. They defined patients as SBBC when contralateral breast carcinoma was diagnosed less than 12 months. According to this evaluation they found that SBBC patients might have worse prognosis (Ibrahim, 2015). Similarly, we evaluated the overall survival of all cases considering the subgroups of UBC, SBBC and MBBC. However, we defined patients with SBBC when contralateral breast carcinoma was diagnosed within 3 months. We found that SBBC patients had higher overall survival rates than both UBC and MBBC. We suggest that the main reason for this finding could be the fact that SBBC patients had underwent bilateral mastectomy.

In this study, we evaluated 768 breast carcinoma cases on the point of view of characteristics of BBCs. BBC cases were 5.86% of all cases; 3.91% was MBBC and 1.95% was SBBC. Among MBBCs invasive ductal carcinoma subtype was higher than SBBC. Rare types of tumors were observed SBBC cases. BBC cases had ER expression more than UBC cases. The reason of hormonal receptor dependence of BBC should be explored. These data indicate that SBBC cases and MBBC cases might be derived from different carcinogenetic processes. In this series, BBC cases were found to show worse prognosis than UBC cases. Among BBC, SBBC had the worst prognosis based on overall survival rates. The data about proliferation index, cerbB2 status, stage, nodal status, tumor size or metastasis status were not found to be the reason of this prognostic difference. Our next plan is to compare molecular characteristics of SBBC and MBBC to search for new prognostic

References

- Baykara M, Ozturk SC, Buyukberber S, et al (2012). Clinicopathological Features in Bilateral Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, **13**, 4571-5.
- Chen SF, Du CW, P. Yang, et al (2013). The molecular and clinicopathologic characteristics of bilateral breast cancer. *Sci Rep*, **3**, 2590.
- Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y (1999). Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 855-61.
- Hartman M, Czene K, Reilly M, et al (2007). Incidence and prognosis of synchronous and metachronous bilateral breast cancer. *J Clin Oncol*, **25**, 4210-6.
- Holm M, Tjonneland A, Balslev E, Kroman N (2014). Prognosis of synchronous bilateral breast cancer: a review and meta-analysis of observational studies. *Breast Cancer Res Treat*, **146**, 461-75.
- Huo D, Melkonian S, Rathouz PJ, Khramtsov A, Olopade OI (2011). Concordance in histological and biological parameters between first and second primary breast cancers. *Cancer*, **117**, 907-15.

- Ibrahim NY, Sroor MY, Darwish DO (2015). Impact of bilateral breast cancer on prognosis: synchronous versus metachronous tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, **16**, 1007-10.
- Irvine T, Allen DS, Gillett C, Hamed H, Fentiman IS (2009). Prognosis of synchronous bilateral breast cancer. *Br J Surg*, **96**, 376-80.
- Schwentner L, Wolters R, Wischnewsky M, Kreienberg R, Wöckel A (2012). Survival of patients with bilateral versus unilateral breast cancer and impact of guideline adherent adjuvant treatment: a multi-centre cohort study of 5292 patients. *Breast*, **21**, 171.
- Senkus E, Szade J, Pieczynska B, et al (2014). Are bilateral breast cancers and breast cancers coexisting with ovarian cancer different from solitary tumors? A pair-matched immunohistochemical analysis aimed at intrinsic tumor phenotype. *Pathol Int*, **64**, 508-17.
- Shi YX, Xia Q, Peng RJ, et al (2012). Comparison of clinicopathological characteristics and prognoses between bilateral and unilateral breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **138**, 705.
- Yoshimura N, Murakami S, Kaneko M, et al (2013). Synchronous bilateral solid papillary carcinomas of the breast. *Case Rep Surg*, **2013**, 812129.

Breast Cancer

The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BRCA-D-15-00165	
Full Title:	The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Nuket Eliyatkin, MDPHd, assistant professor Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, AYDIN, TURKEY	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Faculty of Medicine, Adnan Menderes University,	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Nuket Eliyatkin, MDPHd, assistant professor	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Nuket Eliyatkin, MDPHd, assistant professor	
	Safiye Aktas, Professor, MDPHd	
	Halil Hakan Ozgur, MD, PhD	
	Ayse Pinar Ercetin, PhD	
	Ali Kupelioglu, Professor	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Dokuz Eylul University Department of Scientific Research Projects (2012-KB SAG 025)	MDPhDc, assistant professor Nuket Eliyatkin
Abstract:	Background: Trastuzumab, the HER2 oncogene targeting drug, shows remarkable clinical efficacy in HER2-amplified breast cancer patients. In spite of robust activity, some of the patients with HER2-positive breast cancers do not get the benefit because of the resistance to trastuzumab. Overexpression of p95HER2 is one of the molecular mechanisms of trastuzumab resistance. We aimed to investigate whether p95HER2 overexpressing breast cancers were resistant to trastuzumab. Methods: p95HER2 (truncated HER2) and HER2 was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. HER2 protein expression and HER2 gene amplification was also determined by immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. 80 formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tumor tissue archive materials were used to analyze all of the evaluations. embedded . According to clinical information of the cases, none of the cases had metastases in the initial diagnosis. HER2 positive cases underwent trastuzumab regimens with/without chemotherapy. Results: This study included 80 breast cancer cases. 39 cases were HER2 positive and had trastuzumab treatment. 11 (28,2%) of these 39 cases were trastuzumab resistance and 28 (71,8%) of 39 cases did not show trastuzumab resistance. 17 (43,6%) of 39 cases were recurrence. 22 (56,4%) of 39 cases weren't recurrence. 3 cases were exitus. p95HER2 mean ratio was $11,01 \pm 19.73$ (0,41-5,89) on 11 cases which were trastuzumab resistant. p95HER2 mean ratio was $1,99 \pm 1.37$ (0,51-6,63) on 28 cases without trastuzumab resistance. If p95HER2 ratio was low, there was no trastuzumab resistance. However, for every statement on which p95HER2 ratio was high, there was trastuzumab resistance ($p=0,210$ Mann Whitney test). Conclusion: p95HER2 was found to be correlated with trastuzumab resistance, but it was not a determinant of trastuzumab resistance alone. We suggest that p95HER2 is sensitive but not specific for prediction of the trastuzumab resistance.	

The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

-Nuket Ozkavruk Eliyatkin, MD, PhD, Assistant Prof, Specialist of Pathology,
Department of Pathology, Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, Aydin,
Turkey

-Safiye Aktas, MD, PhD, Prof, Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, Basic
Oncology, Izmir, Turkey

-Hakan Ozgur, MD, PhD, Specialist of Pathology, Gunes Pathology Laboratory,
Izmir, Turkey

-Pinar Erçetin, MSc., PhD, Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, Basic
Oncology, Izmir, Turkey

-Ali Kupelioglu, Prof, Gunes Pathology Laboratory, Izmir, Turkey

Corresponding Author: Nuket Ozkavruk Eliyatkin, Department of Pathology,
Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, 09100 Aydin, Turkey
Phone: +90 506 417 3659 E-mail: drnuket2003@yahoo.com

Running Title: p95HER2 in Breast Cancer

Key Words: Breast cancer, trastuzumab resistance, p95HER2

ABSTRACT

Background: Trastuzumab, the HER2 oncogene targeting drug, shows remarkable clinical efficacy in HER2-amplified breast cancer patients. In spite of robust activity, some of the patients with HER2-positive breast cancers do not get the benefit because of the resistance to trastuzumab. Overexpression of p95HER2 is one of the molecular mechanisms of trastuzumab resistance. We aimed to investigate whether p95HER2 overexpressing breast cancers were resistant to trastuzumab.

Methods: p95HER2 (truncated HER2) and HER2 was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. HER2 protein expression and HER2 gene amplification was also determined by immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. 80 formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tumor tissue archive materials were used to analyze all of the evaluations. embedded. According to clinical information of the cases, none of the cases had metastases in the initial diagnosis. HER2 positive cases underwent trastuzumab regimens with/without chemotherapy.

Results: This study included 80 breast cancer cases. 39 cases were HER2 positive and had trastuzumab treatment. 11 (28,2%) of these 39 cases were trastuzumab resistance and 28 (71,8%) of 39 cases did not show trastuzumab resistance. 17 (43,6%) of 39 cases were recurrence. 22 (56,4%) of 39 cases weren't recurrence. 3 cases were exitus. p95HER2 mean ratio was $11,01 \pm 19.73$ (0,41-5,89) on 11 cases which were trastuzumab resistant. p95HER2 mean ratio was $1,99 \pm 1.37$ (0,51-6,63) on 28 cases without trastuzumab resistance. If p95HER2 ratio was low, there was no trastuzumab resistance. However, for every statement on which p95HER2 ratio was high, there was trastuzumab resistance ($p=0,210$ Mann Whitney test).

Conclusion: p95HER2 was found to be correlated with trastuzumab resistance, but it was not a determinant of trastuzumab resistance alone. We suggest that p95HER2 is sensitive but not specific for prediction of the trastuzumab resistance.

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the most common cancer type seen in female patients and is among the most common reasons of cancer related deaths. It is a highly heterogeneous disease which can be microscopically divided into subgroups according to it's morphologic structure and which can be divided into molecular subgroups by evaluation of some specific biomarkers. Estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) are used for molecular classification and have a particular importance. HER2 overexpression and/or amplification is seen in approximately 20% of invasive breast carcinomas (1). HER2 positivity is reported to be correlated with an aggressive clinical course and low survival rates (1-3). Trastuzumab is a monoclonal antibody developed to act against the extracellular domain of HER2. It is an important targeted agent for both early and advanced stage breast cancers. The course of HER2 positive breast cancers have changed since trastuzumab came into clinical use. Despite it's stong efficieny, progression occurs in more than a half of HER2 positive breast cancer patients, within one year or later, due to primary or acquired resistance (4-5).

Approximately in 30% of HER2 positive breast cancer patients, 90-115 kDa weighting receptor fragments all together known as p95HER2 carboxy terminal fragments (CTF) are expressed (6-7). These p95HER2-CTFs are generated by two different mechanisms: proteolytic sheeding and alternative translation. Compared to tumors expressing HER2 receptor at full length, tumors expressing p95HER2 have poorer prognosis, have higher risk of metastasis and resistant to trastuzumab treatment (8-9). Most p95HER2/CTFs are inactive. However only one of these CTFs (611-CTF) are an oncogenic form. This form is generated by alternative initiation of translation from the AUG codon at position 611 (611-CTF) and drives breast cancer progression in vivo (10). Therefore it is understood that state of 611-CTF gene possibly influences in the progression of HER2 positive tumors and use of trastuzumab does not meet a targeted treatment in such patients. For this reason, in breast cancer, evaluation of either p95HER2 or p95HER2 with HER2 may be beneficial before the initiation of trastuzumab when planning the treatment of HER2 positive breast cancer patients. However further prospective clinical studies about this subject will help to reveal the actual role of this marker.

1 In this study, we aimed to investigate the predictive and prognostic roles of
2 p95HER2 expression, in case of trastuzumab resistance during breast cancer
3 treatment.
4

5 **METHODS**

6
7 112 patients (who had been given the diagnosis of invasive breast cancer in
8 Private Gunes Pathology Laboratory between the years of 2008-2012) were included
9 in the study. This study has been supported by Dokuz Eylul University Department of
10 Scientific Research with given a project number "2012-KB SAG 025" and has been
11 approved by ethics committee. Archived FFPE tissue blocks and readily archived
12 dyed preparates of the patients were retrospectively investigated. Samples of 80
13 patients with primary invasive breast cancer were adequate for datum analysis.
14

15 Demographic datas of the patients were obtained from electronic media records and
16 from relevant clinical doctors. Archived ready H&E preparates of the patients were
17 attentively examined. Histological type(according to WHO 2012) and grade (in
18 accordance with Nottingham grading system) of tumors were determined. Presence
19 of vascular and lymphatic invasions were questioned. Entire tumors belonging to the
20 patients were classified with the classification system of AJCC-American Joint
21 Committee on Cancer according to pathological tumor-nodal involvement-metastasis
22 criteria, regarding the findings present at the time of initial diagnosis (11). Tumors
23 were classified as follows: T1 if tumor ≤ 2 cm, T2 if $2\text{cm} < \text{tumor size} \leq 5$ cm, T3 if tumor
24 > 5 cm. Presence of chest wall invasion and/or direct invasion to skin (as ulcerations
25 and skin nodules) were accepted as T4 no matter the size of tumor. No metastasis to
26 regional lymph nodes was accepted as N0, metastases in 1-3 axillary lymph nodes
27 were accepted as N1, while 4-9 were accepted as N2. 10 and more metastases were
28 accepted as N3. Metastatic lymph nodes were examined to reveal the existence of
29 perinodal invasion.
30

31 Immunohistochemical investigations were completed at the time of first
32 primary breast cancer diagnosis of the patients. Archived ready
33 immunohistochemical dyings of ER, PgR, p53 and Ki67 were re-examined. ER and
34 PgR receptors were accepted positive if $\geq 10\%$, p53 was accepted positive if $\geq 10\%$,
35 Ki67 was accepted positive if $\geq 14\%$. Tumor tissue samples of the patients showed a
36 distribution of 0, 1+, 2+, 3+ with the categorization of immunohistochemical dying at
37 the time if first diagnosis.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Reflex ISH for HER2 gene amplification had been performed at the time of first
2 diagnosis. HER2 protein expression and HER2 gene amplification were assessed by
3 re-dyeing the tissue samples of the patients within scope of this study. Additionally,
4 HER2 and p95HER2 expressions were quantitatively assessed by RT-PCR. For this
5 assessment, blocks containing demonstrative living tumor tissue which were devoid
6 of necrosis, were designated. Tumoral region was identified in H&E sections of these
7 blocks, a sample of tumor tissue was taken into eppendorf tube and kept in room
8 temperature until performing RT-PCR.

9 Because the primary goal of this study is to find out the role of p95HER2 in
10 trastuzumab resistance, it was essential to properly obtain the clinical datas of the
11 patients who received trastuzumab. Therefore clinical datas were collected from
12 patients themselves and their clinical doctors. Initiation and termination dates of
13 trastuzumab were recorded. Time of local recurrence or metastasis, last date of
14 follow up and last status were recorded.

15 **Definition of Trastuzumab Resistance:**

16 There is not a common definition for definition of trastuzumab in literature, they
17 are often used interchangeably (12). In this study, trastuzumab resistance was
18 defined as the presence of progression detected in first radiologic evaluation
19 (performed at 8.-12. weeks) of metastatic HER2 positive breast cancer patient who
20 receives first line therapy (trastuzumab±chemotherapy). Additionally, recurrences
21 during adjuvant trastuzumab treatment for recurrences within 12 months of the
22 treatment termination was admitted as trastuzumab resistance (12). Because HER2
23 positivity in breast cancer is known to be an independent factor for the development
24 of brain metastasis, evaluation of trastuzumab resistance requires to consider brain
25 metastases (13). If brain metastases were the first and a single region of progression
26 after trastuzumab treatment, this situation was not considered as trastuzumab
27 resistance due to the high molecular weight there by poorer penetration of
28 trastuzumab to central nervous system (13).

29 **Statistics:**

30 Statistical evaluation was performed by using SPSS16.0 programme. Proteine
31 expression of HER2 was evaluated with IHC and amplification of *HER2 gene* was
32 evaluated with KISH according to nonparametric datas. HER2 m-RNA expression and
33 p95HER2 expression were scaled with RT-PCR as measurement datas. Additionally
34 age of patient, tumor size, number of metastatic lymph nodes, local recurrence and
35

time until metastasis occurrence, full survival time and follow up time were scaled with measurement datas. Vascular and lymphatic invasion, DCIS, perinodal involvement, pT, pN, local recurrence, metastasis, metastasis to organs were assessed with numeric datas. Based on number of cases and measurement unit of datas, correlation between variables were tested with Chi-Square test, Mann-Whitney U test and Spearman correlation test. Analyses of survival without progression and full survival were measured with Kaplan-Meier method and survival curves of subgroups were compared with log-rank test. P value smaller than 0.05 was accepted as statistically significant.

RESULTS:

80 patients with breast cancer diagnosis has been taken under review. No patient had the sign of distant metastasis at initial diagnosis. All characteristics of the patients were given in table 1. Biomarkers like ER and PgR status, p53 mutant gene, Ki67 proliferation index, HER2 amplification, HER2 and p95HER2 expression levels were analysed in all cases. These are given in table 2. While 43 cases (53,8%) received trastuzumab treatment, 37 did not receive this treatment (46,2%). 34 cases did not receive trastuzumab treatment and did not show amplification with ISH. 42 cases received trastuzumab treatment and showed amplification with ISH. One case received trastuzumab treatment and did not show amplification with CISH. 3 cases did not receive trastuzumab treatment despite the amplification with ISH. HER2 positivity was detected as shown in Figure 1 by CISH.

Mean time until local recurrence/metastasis was $26,23 \pm 12,71$ months (1,54-56,21 months). Disease free survival was found as $44,10 \pm 2,2$ months (1,54-88,31 months). Mean follow up time was determined as $48,71 \pm 20,1$ months (15,38-92,42 months). In the last follow up, 71 (88,8%) were alive, 9 (11,2%) patients were ex.

Findings Belonging to the Cases who Received Trastuzumab Treatment (With and Without Trastuzumab Resistance):

Trastuzumab treatment was taken by 39 cases. In this group, 28 cases (71,8%) were categorized as non-resistant to transtuzumab because no local recurrence or metastasis had been watched during follow ups. 11 cases (28,2%) showed local recurrence or metastasis therefore categorized as trastuzumab resistant.

In 11 cases with trastuzumab resistance, mean p95HER2 level was $11,01 \pm 19,73$ (0,41-58,9). Mean HER2 level was $0,96 \pm 0,72$ (0,13-2,06). Mean time until local recurrence/ metastasis and mean disease free survival time were the same

and found as $20,81 \pm 9,00$ months (1,54-30,03 months). In 28 cases who did not show trastuzumab resistance, mean p95HER2 level was $1,99 \pm 1,37$ (0,51-6,63). Mean HER2 expression level was detected as $12,79 \pm 30,38$ (0,52-155,38). Mean time until the development of local recurrence/metastasis was $39,28 \pm 10,90$ months (26,81-56,21 months), mean disease free survival time was $48,63 \pm 20,52$ months (18,63-92,42 months).

Statistical Findings of Cases Who Received Trastuzumab:

Statistical analysis of 39 trastuzumab using cases was performed. Stage I and II were taken into a group, stage III and IV was taken in another group for statistical analysis. According to the defined criteria, in 11 cases with trastuzumab resistance, mean p95HER2 level was obviously higher compared to the mean p95HER2 level of 28 cases who were non resistant to trastuzumab, however this difference was not statistically significant ($p=0,210$ Mann-Whitney U test). Trastuzumab resistance was not detected when the level of p95HER2 expression was low. But whenever p95HER2 level was high, trastuzumab resistance was present. p95HER2 expression levels was sensitive for the detection of trastuzumab yet not specific (Figure 2).

Levels of HER2 expression analyzed by RT-PCR was $0,96 \pm 0,72$ (0,13-2,06) in trastuzumab resistant cases and was $12,79 \pm 30,38$ (0,52-155,38) in non-resistant cases. This difference was statistically significant ($p=0,0001$ Mann-Whitney U test). Time until local recurrence/metastasis ($p=0,005$) between trastuzumab resistant and non-resistant cases, relationship with disease free survival time ($p=0,0001$) were statistically significant (Mann-Whitney U test). Amplification curves of p95 and HER2 were as shown in Figure 3.

There was a statistically significant relationship (Chi-square test) between trastuzumab resistant and non-resistant cases in terms of lymphatic invasion ($p=0,009$), nodal involvement ($p=0,014$), perinodal invasion ($p=0,0001$), number of metastatic lymph nodes ($p=0,013$), metastasis (0,0001), lung metastasis ($p=0,042$) and stage ($p=0,011$). Results between trastuzumab resistance and non-resistance cases are given comparatively in table 3.

DISCUSSION

HER2 positive breast cancer is a special molecular and clinical entity which represents a different grup. Efficient treatment of this group of breast cancers with trastuzumab significantly has changed the management and course of the disease.

1 However, it is known that some breast cancer patients who responded to
2 trastuzumab at initiation shows progression later on. Although this highly efficient
3 drug is commonly used, no standard treatment protocol was developed in case of
4 progression. Therefore new strategies should be developed as alternative treatments
5 for HER2 positive breast cancer patients who do not respond to trastuzumab.
6
7

8
9 In HER2 positive breast cancer patients, the role of p95HER2 which is one of
10 molecular mechanism of resistance against trastuzumab treatment has been
11 investigated in this study. According to defined criteria, p95HER2 expression was
12 not statistically significant between trastuzuman resistant and non-resistant groups.
13 However, trastuzumab resistance was not detected in groups expressing low levels
14 of p95HER2. In spite of that, whenever p95HER2 highly expressed, trastuzumab
15 resistance was detected. This result showed that p95HER2 expression levels were
16 sensitive but not specific in determination of trastuzumab resistance.
17
18

19
20 HER2 expression levels were significantly higher in trastuzumab resistant group
21 compared to the non-resistant group ($p=0,0001$). This observation suspected us
22 about possibility of p95HER2 overexpression to suppress normal length HER2
23 expression in trastuzumab resistant patients. The ratio between these two levels or
24 proportional change may carry more statistical significance for determination of
25 resistance. The data about this subject will become clearer as more studies which
26 contain measurements of these two levels in trastuzumab resistant and non-resistant
27 cases, are conducted.
28
29

30
31 In literature, no study could be found which compared the relationship between
32 trastuzumab resistant and non resistant subgroups on the basis of quantitative
33 values of both HER2 and p95HER2 expression levels in HER2 positive primary
34 breast carcinoma. A certain threshold value is determined as positive in conducted
35 studies (14-15). Sperinde et al. made an immunohistochemical evaluation in
36 paraffinized breast cancer tissues, thanks to an antibody that they developed against
37 p95HER2 proteine in laboratory conditions (54). In this study, they determined the
38 level of p95HER2 expression by VeraTag technology as well. They found that high
39 p95HER2 expression levels were correlated with reduced disease free survival
40 ($p=0,022$) and full survival ($p=0,009$). Additionally in this study, they emphasized that
41 immunohistochemistry was not as sensitive and quantitative as VeraTag tag
42 technology in terms of p95HER2 assessment method (14).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Full length HER2 expression levels are similar in primary and metastatic breast cancer. However, p95HER2 expression level shows significant increase in metastatic lymph nodes compared to the expression in primary tumor and this situation demonstrates the role of p95HER2 in disease progression and metastasis (8). In a study investigating the prognostic value of p95HER, Saez et al. evaluated the levels of HER2 and p95HER2 by western-blot analysis. In this study, they determined HER2 and p95HER2 levels as "high level" or "low level". They found that high level of p95HER2 expression was correlated with decreased disease free survival ($p=0,0001$) but high HER2 level was not correlated with disease free survival ($p=0,261$) in primary tumor (8). In our study, p95HER2 levels were not divided into two groups as "high" and "low" based on a threshold level. Measurement datas of disease free survival and full survival parameters were in same unit (term of month- a parametric value). HER2 and p95HER2 expression levels were a parametric measurement datas as well. For all patients involved in study, both HER2 and p95HER2 expression levels were not correlated with decreased disease free survival (respectively ($p=0,071$ and $p=0,517$)). However, in our study, a statistically significant relationship between high p95HER2 expression levels and decreased disease free survival ($p=0,0001$) was detected in trastuzumab resistant group.

p95HER2 over expression shows cooccurrence with reduced trastuzumab response in xenografts and human breast cancers (9). With this retrospective analysis, significantly reduced response rates to trastuzumab and trastuzumab-chemotherapy combination were detected in p95HER2 expressing patients compared to the patients expressing full length HER2. p95HER2 was detected by immunoflorescent method and western-blot analysis and consistent results were obtained. However, as is known, this evaluation methods calculates the level of proteines. Instead of these methods, more feasible methods with high repeatability is needed in daily routine. Regarding all patients enrolled in this study, a statistically nonsignificant relationship between p95HER2 expression level and lymphatic invasion($p=0,191$), perinodal involvement, number of metastatic lymph nodes ($p=0,744$), metastasis ($p=0,179$) and disease free survival time ($p=0,517$) was present. This results raised a suspect that another parameters may effect the statistical outcome in the group containing all of the patients.

Duchnowska et al. quantitatively evaluated the expression of p95 proteine both in primary tumor and brain metastasis of patients who developed brain

metastasis by using VeraTag (13). In this study, mean p95HER2 expression was found to be 1,5 times higher than p95HER2 expression in primary tumor ($p=0,007$) and this situation was statistically significant (13). In our study, there were two patients with brain metastasis. Level of p95HER2 expression in their primary tumor were determined as; 1,43 (case number 76) and 0,59 (case number 77). When the mean p95HER2 expression levels were compared with trastuzumab resistance and non-resistance patients, nearly 5 fold increase was detected in trastuzumab resistance patients. But, our evaluation covered only primary tumor. Expression analysis of p95HER2 was not performed in metastatic tumor. Duchnowska et al. assessed total HER2 proteine expression as well as p95HER2 expression in this study. They made this assessment by using HERmark measurements defined by Huang et al. (15). In primary breast cancer and in brain metastasis of same tumor, Duchnowska et al. found that quantitative levels of HER2 expression (which they measured by HERmark method) were 2,1 times higher ($p<0,0001$) compared to primary tumor in brain metastasis (13). As a result of this study, in broad based clinical studies which involves the population of breast cancer patients requires quantitative measurements of HER2 and p95HER2 along with other biomarkers.

CONCLUSION

We conclude that significantly reduced response rates to trastuzumab and trastuzumab±chemotherapy combination were detected in p95HER2 expressing patients compared to the patients expressing full length HER2. And also, according to the literature, it is understood that overexpression of p95HER2 possibly influences in the progression of HER2 positive tumors and therefore, use of trastuzumab does not meet a targeted treatment in such patients. Therefore, we finally suggest that in breast cancer, evaluation of either p95HER2 or p95HER2 with HER2 may be beneficial before the initiation of trastuzumab when planning the treatment of HER2 positive breast cancer patients.

CONFLICT OF INTEREST

Each author is actively and sufficiently participated in this study while is being performed and reported. Each author is approved for the final version of the manuscript. The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- 1- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-82.
- 2- Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, et al. Neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. J Clin Oncol. 1998; 16:1340–1349. [PubMed: 9552035]
- 3- Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of cerbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. J Clin Oncol. 1998; 16:462–469. [PubMed: 9469329]
- 4- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002;20: 719-26.
- 5- Baselga J, Carbonell X, Castañeda-Soto NJ, Clemens M, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. J Clin Oncol 2005;23: 2162-71.
- 6- Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. Cancer Sci 2010;102(10): 1-8.
- 7- Yuan CX, Lasut AL, Wynn R, Neff NT, et al. Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site. Protein Expr Purif 2003;29: 217-22.
- 8- Sa´ez R, Molina AM, Ramsey EE, Rojo F, et al. p95HER-2 Predicts Worse Outcome in Patients with HER-2-Positive Breast Cancer. Clin Cancer Res 2006;12(2): 424-31.
- 9- Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, et al. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti - HER2 Therapies in Breast Cancer. J Natl Cancer Inst 2007;99: 628-38.

- 10- Pedersen K, Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, et al. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumour growth and metastasis. *Mol Cell Biol* 2009;29: 3319-31.
- 11- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: IARC Press, 2012: 8-9.
- 12- Wong H, Leung R, Kwong A, Chiu J, et al. Integrating molecular mechanisms and clinical evidence in the management of trastuzumab resistant or refractory HER-2⁺ metastatic breast cancer. *The Oncologist* 2011;16(11): 1535-46.
- 13- Duchnowska R, Sperinde J, Chenna, Huang W, et al. Quantitative HER2 and p95HER2 levels in primary breast cancers and matched brain metastases. *Neuro-Oncology* 2015; 0,1-9. doi:10.1093/neuonc/nov012
- 14- Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010;16: 4226–35.
- 15- Huang W, Reinholz M, Weidler J, Lie Y, et al. Comparison of Central HER2 Testing With Quantitative Total HER2 Expression and HER2 Homodimer Measurements Using a Novel Proximity-Based Assay. *Am J Clin Pathol* 2010;134:303-311. doi:10.1309/AJCP3BZY4YAFNTRG

FIGURE LEGENDS

- Figure 1. HER2 amplification detected by CISH (x200)
- Figure 2. Roc curve of the relation between p95HER2 expression and trastuzumab resistance
- Figure 3. Amplification curves of HER2 and p95HER2 detected by RT-PCR
- Table 1: Clinicopathological characteristics of all cases in this study.
- Table 2: Characteristics of the biomarkers in primary tumor.
- Table 3: Comparison of the cases with/without trastuzumab resistance.

FIGURES

Figure 1. HER2 amplification detected by CISH (x200)

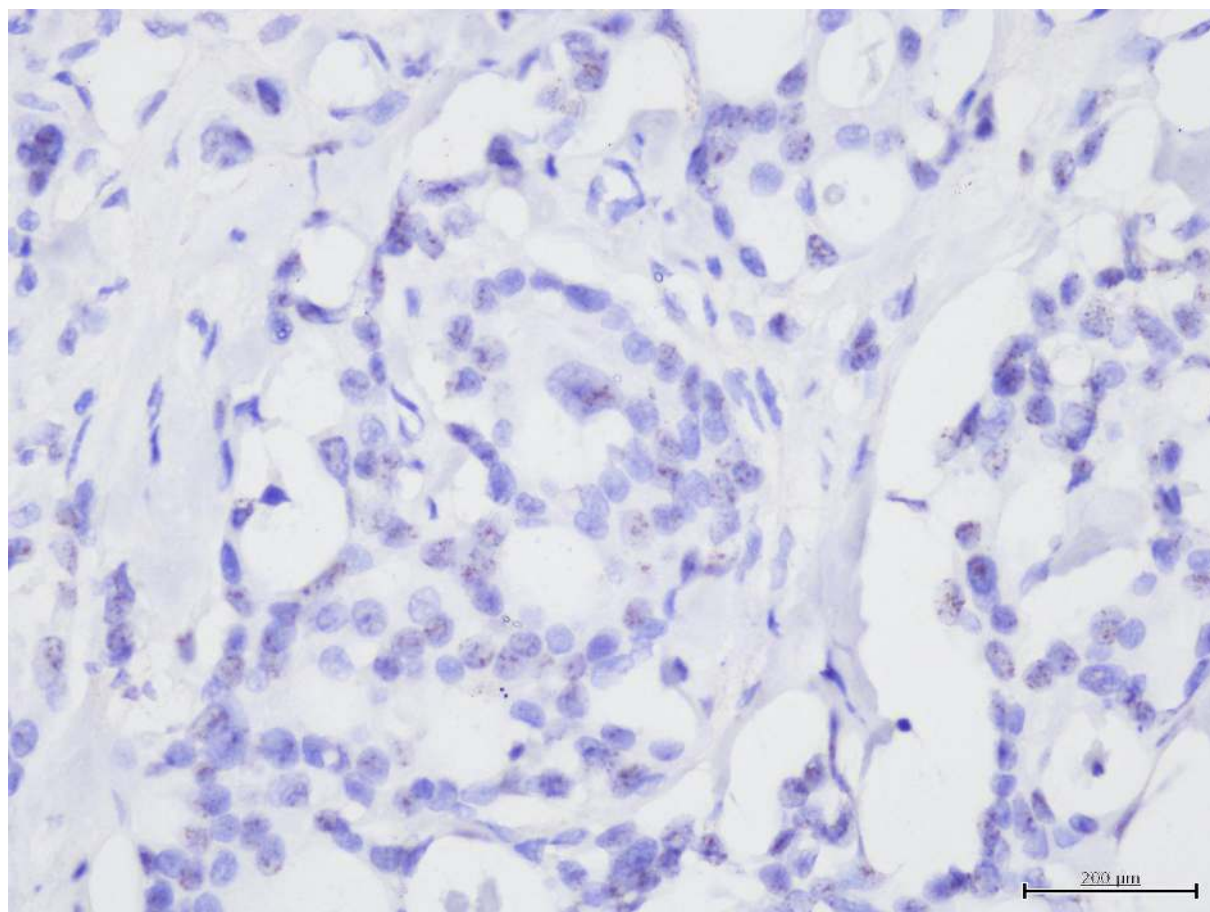


Figure 2. Roc curve of the relation between p95HER2 expression and trastuzumab resistance

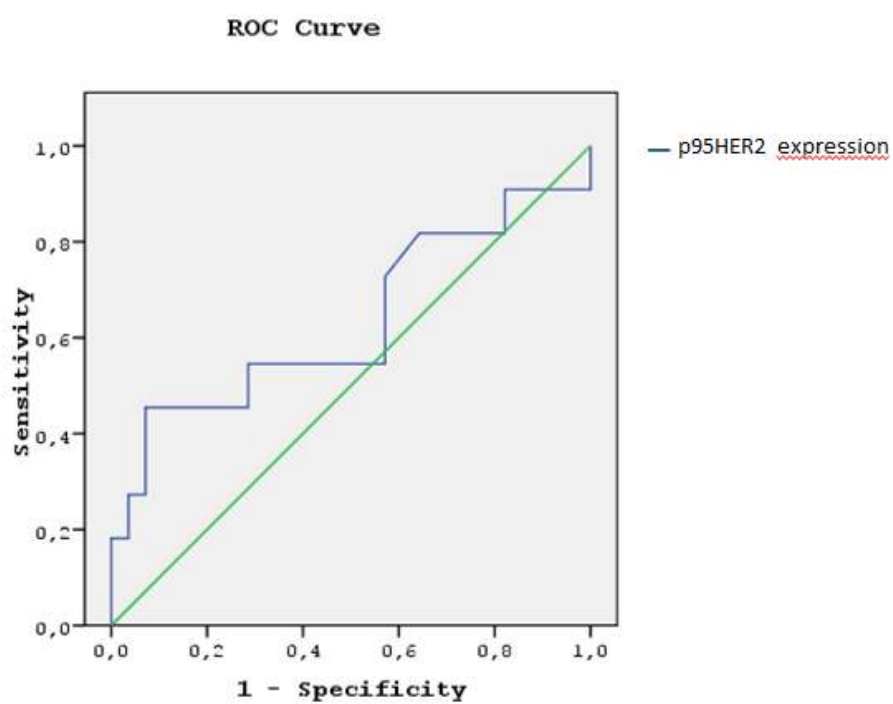


Figure 3. Amplification curves of HER2 and p95HER2 detected by RT-PCR

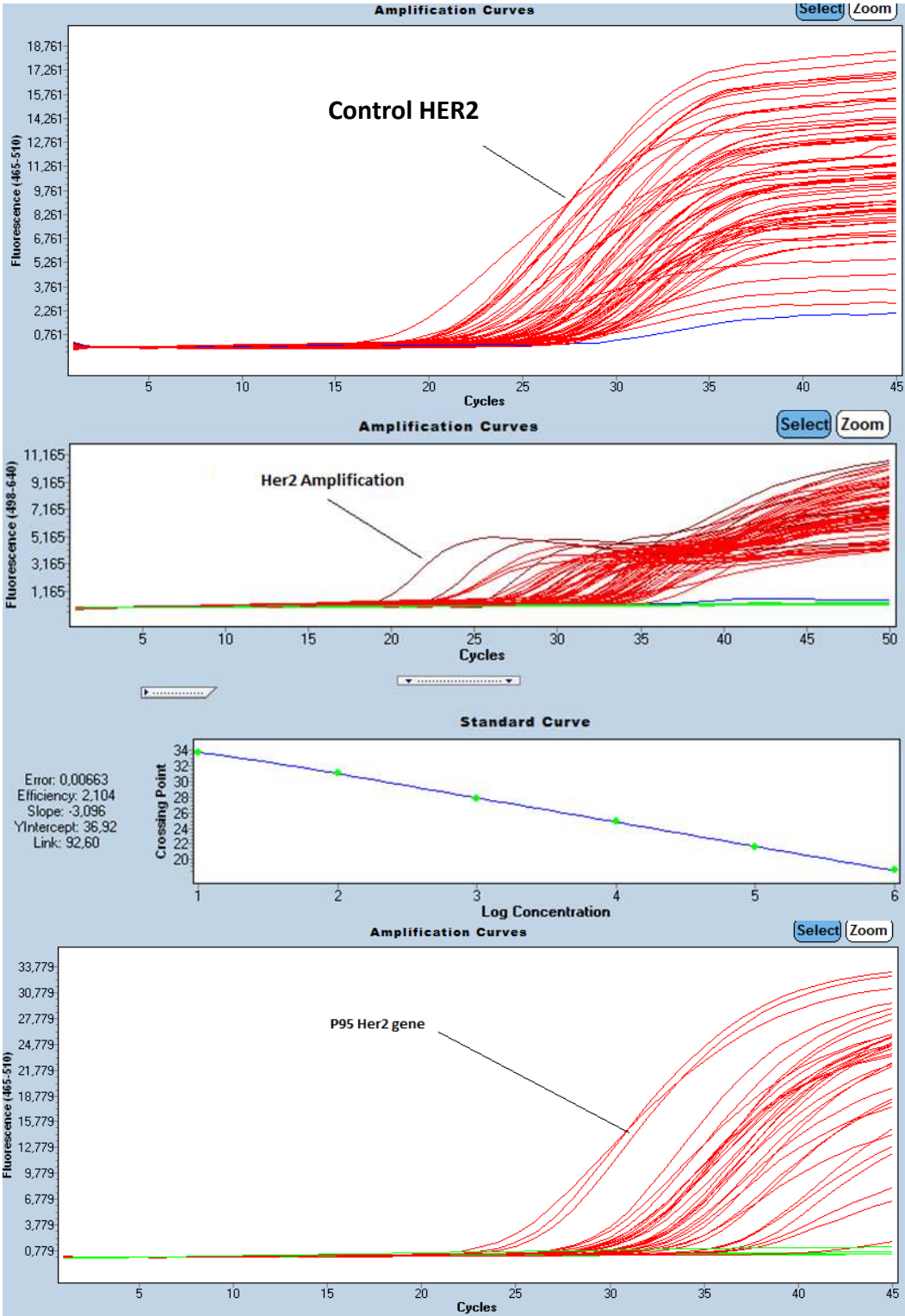


Table 1: Clinicopathological chararacteristics of all cases in this study.

Characteristics	Mean/%
Age (years)	52,80
Tumor size (cm)	2,47
Localization	
Right breast	51,2%
Left breast	48,8%
Histologic type	
Invasive ductal carcinoma	87,5%
Invasive lobular carcinoma	3,8%
Other subtypes	8,8%
Histologic grade	
Grade I	3,8%
Grade II	67,5%
Grade III	28,8%
Vasculary invasion	
Positive	18,8%
Negative	81,2%
Lymphatic invasion	
Positive	61,2%
Negative	38,8%
Lokal recurrence	
Positive	2,5%
Negative	97,5%
Metastasis	
Positive	26,2%
Negative	73,8%
Stage	
Stage I	22,5%
Stage II	46,2%
Stage III	31,2%
Stage IV	-

Table 2: Characteristics of the biomarkers in primary tumor.

Characteristics	Mean/%
ER status	
Positive	68,6%
Negative	31,2%
PgR status	
Positive	65%
Negative	35%
ISH	
Positive	56,2%
Negative	43,8%
Ki67	
Positive	36,2%
Negative	63,8%
p53	
Positive	15%
Negative	85%
cerbB2 status	
3+	43,8%
2+	31,2%
0/1+	25%
HER2 expression level (RT-PCR)	5,77±18,97
p95HER2 expression level (RT-PCR)	7±2,82

Table 3: Comparison of the cases with/without trastuzumab resistance.

	Trastuzumab direnci (+)	Trastuzumab direnci (-)	p value
	Mean / n(%)	Mean / n(%)	
Age(years)	54,64±10.68 (37-74)	51,18±13.59 (28-81)	0,346
Tumor size (cm)	3,17±1.28 (1,8-6,0)	2,42±1.49 (0,5-7)	0,034
Vascular invasion	4(36,4)	7(25)	0,694
Lymphatic invasion			0,009
ER positivety	6(54,5)	20(71,4)	0,453
PgR positivety	5(45,5)	19(67,9)	0,277
Ki67 positivety	9(81,8)	11(61,1)	0,412
Nodal involvement	10(90,9)	13(46,4)	0,014
Perinodal invasion	11 (100)	10(35,7)	0,0001
Stage I-II	2(18,2)	19(67,8)	0,011
Stage III-IV	9(81,8)	9(32,1)	0,011
Lokal recurrence	11(100)	2(7,1)	1,000
Metastasis	11(100)	6(21,4)	0,0001
HER2 expression	0,96±0,72 (0,13-2,06)	12,79±30,38(0,52-155,38)	0,0001
p95HER2 expression	11,01±1.97 (0,41-58,9)	1,99±1.37 (0,51-6,63)	0,210
DFS (months)	20,81±9,00(1,54-30,03)	48,64±20,52(18,63-80,43)	0,0001

DFS: Disease free survival

Breast Cancer

CERTIFICATION FOR MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript No.

Title: *The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer.*

I/We hereby certify to the editor of *Breast Cancer* that our manuscript meets all the following conditions:

1. None of the material of the manuscript has been published elsewhere in whole or in part, except in abstract form.
2. The manuscript is not simultaneously under consideration for publication elsewhere in a journal, a book, or electronic media.
3. All authors have agreed to be so listed and have seen and approved the manuscript, its contents, and its submission to *Breast Cancer*.
4. Written permission from the copyright holder(s) of any table(s) and/or figure(s) cited in the manuscript has been obtained, and citation is indicated in the manuscript.

Author's name(block letters):

Signature:

Date:

Nuket Ellyath

[Signature]

06/11/2015

Safiye Aktas

[Signature]

06/11/2015

Hakan Ozgur

[Signature]

06/11/2015

Pinar Ercetin (E.P.)

[Signature]

06/11/2015

Ali Kupelloglu

[Signature]

06/11/2015

(Form 2)

Breast Cancer Conflict of Interest Disclosure Statement

Manuscript No. _____
 Manuscript Title: The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

**Each author is required to complete and return this form to the corresponding author.
 (Please do not send to the JBCS office)**

When submitting a manuscript to the Breast Cancer, all authors are required to disclose any financial relationship with a biotechnology manufacturer, a pharmaceutical company, or other commercial entity that has an interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript. When your manuscript is accepted for publication, all of the disclosures will appear in your article in the "Conflict of Interest Statement" in Breast Cancer as follows.

Conflict of Interest Statement: A (author name) serves as a consultant to Z (entity name); B's spouse is chairman of Y; C received a research grant from X; D received lecture fees from V; E holds a patent on U; F has been reimbursed by T for attending several conferences; G received honoraria for writing promotional material for S; H has no conflict of interest.

If you, your spouse, a relative in the first degree, or any other person who shares income or assets, has any of the listed relationships with a commercial entity that has an interest in the subject matter in your manuscript, please refer it to the JBCS's definition for conflicts of interest that must be disclosed (http://www.jbcs.gr.jp/english/Bccrcidp_e.html). And then, check the appropriate "Applicable" box below and provide details. If the listed relationship does not apply to you or any member of your family, check the appropriate "Not applicable" box.

1. Position as an officer or advisor of a company or for-profit organization and remuneration amount	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization. Company or organization name: _____ Position: _____ Amount of remuneration: _____
2. Stock ownership and profit resulting from the stock	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company. Company name: _____ Number of shares: _____ Declared share price: _____ Profit from the share: _____
3. Remuneration paid as patent royalties or licensing fees from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record details for each patent. Company or organization name: _____ Patent name: _____ Royalties or licensing fees: _____
4. Honoraria (such as lecture fees) paid by a company or for-profit organization as compensation	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: _____ Amount of lecture fees: _____
5. Manuscript fees paid from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: _____ Amount of manuscript fees: _____
6. Research funding from companies or for-profit organizations	<u>Applicable</u> / Not applicable (Circle one) If applicable, record the following details for each clinical research project. Company or organization name: <u>Dokuz Eylül University Department of Scientific Research Projects</u> Name of clinical research: _____ Amount of remuneration: <u>No: 2012-KB SAG 025/54.000 Turkish Liras</u>
7. Other remunerations (travel, gifts, or the in-kind payments not directory related to research)	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization name. Company or organization name: _____ Amount of remuneration: _____

Print name: Nuket Ehyathan

Signature: [Signature]

Date: 06/01/2015

All of the forms from each author need to be uploaded online and submitted with the manuscript at the time of submission by the corresponding author.

Breast Cancer

Conflict of Interest Disclosure Statement

Manuscript No. The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in
 Manuscript Title: Breast Cancer

Each author is required to complete and return this form to the corresponding author.
(Please do not send to the JBCS office)

When submitting a manuscript to the Breast Cancer, all authors are required to disclose any financial relationship with a biotechnology manufacturer, a pharmaceutical company, or other commercial entity that has an interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript. When your manuscript is accepted for publication, all of the disclosures will appear in your article in the "Conflict of Interest Statement" in Breast Cancer as follows.

Conflict of Interest Statement: A (author name) serves as a consultant to Z (entity name); B's spouse is chairman of Y; C received a research grant from X; D received lecture fees from V; E holds a patent on U; F has been reimbursed by T for attending several conferences; G received honoraria for writing promotional material for S; H has no conflict of interest.

If you, your spouse, a relative in the first degree, or any other person who shares income or assets, has any of the listed relationships with a commercial entity that has an interest in the subject matter in your manuscript, please refer it to the JBCS's definition for conflicts of interest that must be disclosed (http://www.jbcs.gr.jp/english/Bccrcidp_e.html). And then, check the appropriate "Applicable" box below and provide details. If the listed relationship does not apply to you or any member of your family, check the appropriate "Not applicable" box.

1. Position as an officer or advisor of a company or for-profit organization and remuneration amount	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization. Company or organization name: Position: Amount of remuneration:
2. Stock ownership and profit resulting from the stock	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company. Company name: Number of shares: Declared share price: Profit from the share:
3. Remuneration paid as patent royalties or licensing fees from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record details for each patent. Company or organization name: Patent name: Royalties or licensing fees:
4. Honoraria (such as lecture fees) paid by a company or for-profit organization as compensation	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: Amount of lecture fees:
5. Manuscript fees paid from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: Amount of manuscript fees:
6. Research funding from companies or for-profit organizations	<u>Applicable</u> / Not applicable (Circle one) If applicable, record the following details for each clinical research project. Company or organization name: <u>Osmaniyah University Department</u> Name of clinical research: <u>of Scientific Research Projects</u> Amount of remuneration: <u>No: 2012-VB SAG 025/54-200 Turkish Liras</u>
7. Other remunerations (travel, gifts, or the in-kind payments not directory related to research)	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization name. Company or organization name: Amount of remuneration:

Print name: Safiye Aktas

Signature: S.A.

Date: 06/03/2015

All of the forms from each author need to be uploaded online and submitted with the manuscript at the time of submission by the corresponding author.

Breast Cancer Conflict of Interest Disclosure Statement

Manuscript No.

Manuscript Title:

The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance
in Breast Cancer

Each author is required to complete and return this form to the corresponding author.

(Please do not send to the JBCS office)

When submitting a manuscript to the Breast Cancer, all authors are required to disclose any financial relationship with a biotechnology manufacturer, a pharmaceutical company, or other commercial entity that has an interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript. When your manuscript is accepted for publication, all of the disclosures will appear in your article in the "Conflict of Interest Statement" in Breast Cancer as follows.

Conflict of Interest Statement: A (author name) serves as a consultant to Z (entity name); B's spouse is chairman of Y; C received a research grant from X; D received lecture fees from V; E holds a patent on U; F has been reimbursed by T for attending several conferences; G received honoraria for writing promotional material for S; H has no conflict of interest.

If you, your spouse, a relative in the first degree, or any other person who shares income or assets, has any of the listed relationships with a commercial entity that has an interest in the subject matter in your manuscript, please refer it to the JBCS's definition for conflicts of interest that must be disclosed (http://www.jbcs.gr.jp/english/Bccrcidp_e.html). And then, check the appropriate "Applicable" box below and provide details. If the listed relationship does not apply to you or any member of your family, check the appropriate "Not applicable" box.

1. Position as an officer or advisor of a company or for-profit organization and remuneration amount	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization. Company or organization name: Position: Amount of remuneration:
2. Stock ownership and profit resulting from the stock	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company. Company name: Number of shares: Declared share price: Profit from the share:
3. Remuneration paid as patent royalties or licensing fees from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record details for each patent. Company or organization name: Patent name: Royalties or licensing fees:
4. Honoraria (such as lecture fees) paid by a company or for-profit organization as compensation	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: Amount of lecture fees:
5. Manuscript fees paid from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: Amount of manuscript fees:
6. Research funding from companies or for-profit organizations	<u>Applicable</u> / Not applicable (Circle one) If applicable, record the following details for each clinical research project. Company or organization name: <u>Dokuz Eylül University Department of Scientific Research Projects</u> Name of clinical research: <u>No: 2012-KB-SAG 025/54.000 TL</u> Amount of remuneration:
7. Other remunerations (travel, gifts, or the in-kind payments not directory related to research)	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization name. Company or organization name: Amount of remuneration:

Print name: Hakan OlgunSignature: [Signature]Date: 06/02/2015

All of the forms from each author need to be uploaded online and submitted with the manuscript at the time of submission by the corresponding author.

Breast Cancer Conflict of Interest Disclosure Statement

Manuscript No. _____

Manuscript Title: The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

**Each author is required to complete and return this form to the corresponding author.
(Please do not send to the JBCS office)**

When submitting a manuscript to the Breast Cancer, all authors are required to disclose any financial relationship with a biotechnology manufacturer, a pharmaceutical company, or other commercial entity that has an interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript. When your manuscript is accepted for publication, all of the disclosures will appear in your article in the "Conflict of Interest Statement" in Breast Cancer as follows.

Conflict of Interest Statement: A (author name) serves as a consultant to Z (entity name); B's spouse is chairman of Y; C received a research grant from X; D received lecture fees from V; E holds a patent on U; F has been reimbursed by T for attending several conferences; G received honoraria for writing promotional material for S; H has no conflict of interest.

If you, your spouse, a relative in the first degree, or any other person who shares income or assets, has any of the listed relationships with a commercial entity that has an interest in the subject matter in your manuscript, please refer it to the JBCS's definition for conflicts of interest that must be disclosed (http://www.jbcs.gr.jp/english/Bccrcidp_e.html). And then, check the appropriate "Applicable" box below and provide details. If the listed relationship does not apply to you or any member of your family, check the appropriate "Not applicable" box.

1. Position as an officer or advisor of a company or for-profit organization and remuneration amount	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization. Company or organization name: _____ Position: _____ Amount of remuneration: _____
2. Stock ownership and profit resulting from the stock	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company. Company name: _____ Number of shares: _____ Declared share price: _____ Profit from the share: _____
3. Remuneration paid as patent royalties or licensing fees from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record details for each patent. Company or organization name: _____ Patent name: _____ Royalties or licensing fees: _____
4. Honoraria (such as lecture fees) paid by a company or for-profit organization as compensation	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: _____ Amount of lecture fees: _____
5. Manuscript fees paid from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: _____ Amount of manuscript fees: _____
6. Research funding from companies or for-profit organizations	<u>Applicable</u> / Not applicable (Circle one) If applicable, record the following details for each clinical research project. Company or organization name: <u>Dokuz Eylul University Department of Scientific Research Projects</u> Name of clinical research: <u>No: 2012-KB-SAG025</u> Amount of remuneration: <u>54.000 Turkish Liras</u>
7. Other remunerations (travel, gifts, or the in-kind payments not directory related to research)	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization name. Company or organization name: _____ Amount of remuneration: _____

Print name: Pinar ErcetinSignature: [Signature]Date: 06/01/2015

All of the forms from each author need to be uploaded online and submitted with the manuscript at the time of submission by the corresponding author.

Breast Cancer Conflict of Interest Disclosure Statement

Manuscript No. _____

Manuscript Title: The Role of P95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

Each author is required to complete and return this form to the corresponding author.
(Please do not send to the JBCS office)

When submitting a manuscript to the Breast Cancer, all authors are required to disclose any financial relationship with a biotechnology manufacturer, a pharmaceutical company, or other commercial entity that has an interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript. When your manuscript is accepted for publication, all of the disclosures will appear in your article in the "Conflict of Interest Statement" in Breast Cancer as follows.

Conflict of Interest Statement: A (author name) serves as a consultant to Z (entity name); B's spouse is chairman of Y; C received a research grant from X; D received lecture fees from V; E holds a patent on U; F has been reimbursed by T for attending several conferences; G received honoraria for writing promotional material for S; H has no conflict of interest.

If you, your spouse, a relative in the first degree, or any other person who shares income or assets, has any of the listed relationships with a commercial entity that has an interest in the subject matter in your manuscript, please refer it to the JBCS's definition for conflicts of interest that must be disclosed (http://www.jbcs.gr.jp/english/Bccrcidp_e.html). And then, check the appropriate "Applicable" box below and provide details. If the listed relationship does not apply to you or any member of your family, check the appropriate "Not applicable" box.

1. Position as an officer or advisor of a company or for-profit organization and remuneration amount	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization. Company or organization name: Position: _____ Amount of remuneration: _____
2. Stock ownership and profit resulting from the stock	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company. Company name: _____ Number of shares: _____ Declared share price: _____ Profit from the share: _____
3. Remuneration paid as patent royalties or licensing fees from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record details for each patent. Company or organization name: _____ Patent name: _____ Royalties or licensing fees: _____
4. Honoraria (such as lecture fees) paid by a company or for-profit organization as compensation	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: _____ Amount of lecture fees: _____
5. Manuscript fees paid from companies or for-profit organizations	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or funding organization. Company or organization name: _____ Amount of manuscript fees: _____
6. Research funding from companies or for-profit organizations	<u>Applicable</u> / Not applicable (Circle one) If applicable, record the following details for each clinical research project. Company or organization name: <u>Dokuz Eylül University</u> Name of clinical research: <u>Department of Scientific Research -</u> Amount of remuneration: <u>No: 2012-KB SAG-025/54000 TL Project</u>
7. Other remunerations (travel, gifts, or the in-kind payments not directory related to research)	Applicable / <u>Not applicable</u> (Circle one) If applicable, record the following details for each company or organization name. Company or organization name: _____ Amount of remuneration: _____

Print name: Ali KüpelioğluSignature: AliDate: 06/02/2015

All of the forms from each author need to be uploaded online and submitted with the manuscript at the time of submission by the corresponding author.



EACR - Sponsored
3rd ANTICANCER AGENT
Development Congress

18th – 19th of May 2015

Dokuz Eylul University Izmir-Turkey

www.cancerresearch2015.org



ABSTRACT BOOK

**11:30 – 12:00 PLENARY LECTURE****Chair: Leonard Girnita**

11.30 - 12:55

Hermis Iatrou (GREECE)*Smart Polymeric Materials for Drug Delivery to Treat Pancreatic Cancer*

11:55 - 12:00

Discussion

12:10 -12:50**ORAL PRESENTATIONS****Chairs: Zekiye Altun, Semra Koçtürk****Yusuf Tutar**

12:10 - 12:18

A Novel Approach to Inhibit Heat Shock Response as Anticancer Strategy by Coumarine Compounds Containing Thiazole Skeleton

12:18 - 12:20

Discussion

Hakan Cengiz

12:20 - 12:28

ZINC SUPPLEMENTATION EXHIBITS ANTI-TUMOR EFFICACY AND ENHANCES DOCETAXEL-INDUCED CYTOTOXICITY IN LUNG AND HORMONE-RESISTANT PROSTATE CANCER CELLS

12:28 - 12:30

Discussion

Çiğdem Özen

12:30 - 12:38

New Calcium Channel Blocker Compounds With Anticancer Activity

12:38 - 12:40

Discussion

Zelal Adigüzel

12:40 - 12:48

A novel platinum-blue complex exerts its cytotoxic activity via DNA damage and induces apoptosis in breast cancer cells

12:48 - 12:50

Discussion

13:00 - 14:00**LUNCH****14:00 – 14:30****PLENARY LECTURE****Chair: Abdullah Karadağ**

14:00 - 14:25

Mehmet Korkmaz (TURKEY)*Boron derivatives for combating against cancer*

14:25 - 14:30

Discussion

14:30 -15:30**ORAL PRESENTATIONS****Chairs: İlhan Yaylim, Serap Çelikler**

14:30 - 14:38

Banu Iskender*Myrtucommulone-A Treatment Decreases Pluripotency- and Multipotency-associated Marker Expression in Bladder Cancer Cell Line HTB-9.*

14:38 - 14:40

Discussion

Abbas Jafarizad

14:40- 14:48

Mitoxantrone-conjugated gold nanoparticles for stem cell therapy

14:48- 14:50

Discussion

Faisal Gulzar

14:50- 14:58

PATTERN OF IMMUNOHISTOCHEMICAL FACTORS IN BREAST CANCER PATIENTS

14:58- 15:00

Discussion

Nuket Eliyatkin

15:00- 15:08

The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

OP-15

The Role of p95HER2 in trastuzumab resistance in breast cancer

Nuket Eliyatkin^{1,2}, Safiye Aktas², Hakan Ozgur^{2,3}, Pinar Erçetin², Ali Küpelioglu³

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

²Department of Basic Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, İzmir, Turkey

³Gunes Pathology Laboratory, İzmir, Turkey

Introduction/Aim: Trastuzumab, the HER2 oncogene targeting drug, shows remarkable clinical efficacy in HER2-amplified breast cancer patients. In spite of robust activity, some of the patients with HER2-positive breast cancers do not get the benefit because of the resistance to trastuzumab. Overexpression of p95HER2 is one of the molecular mechanisms of trastuzumab resistance. We aimed to investigate whether p95HER2 overexpressing breast cancers were resistant to trastuzumab.

Materials and Methods: p95HER2 (truncated HER2) and HER2 was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. HER2 protein expression and HER2 gene amplification was also determined by immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. 80 formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tumor tissue archive materials were used to analyze all of the evaluations. embedded. According to clinical information of the cases, none of the cases had metastases in the initial diagnosis. HER2 positive cases underwent trastuzumab regimens with/without chemotherapy.

Results: This study included 80 breast cancer cases. 39 cases were HER2 positive and had trastuzumab treatment. 11 (28,2%) of these 39 cases were trastuzumab resistance and 28 (71,8%) of 39 cases did not show trastuzumab resistance. 17 (43,6%) of 39 cases were recurrence. 22 (56,4%) of 39 cases weren't recurrence. 3 cases were exitus. p95HER2 mean ratio was $11,01 \pm 19,73$ (0,41-5,89) on 11 cases which were trastuzumab resistant. p95HER2 mean ratio was $1,99 \pm 1,37$ (0,51-6,63) on 28 cases without trastuzumab resistance. If p95HER2 ratio was low, there was no trastuzumab resistance.. However, for every statement on which p95HER2 ratio was high, there was trastuzumab resistance ($p=0,210$ Mann Whitney test).

Conclusion: p95HER2 was found to be correlated with trastuzumab resistance, but it was not a determinant of trastuzumab resistance alone. We suggest that p95HER2 is sensitive but not specific for prediction of the trastuzumab resistance