



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MİKRO RİBONÜKLEİK ASİTLERİN MEME
KANSERİNDE MULTİSENTRİSİTEYİ
ÖNGÖRMEDEKİ YERİ**

Dr. Hüseyin AKBULUT
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeliz Emine ERSOY

İSTANBUL-2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MİKRO RİBONÜKLEİK ASİTLERİN MEME KANSERİNDE
MULTİSENTRİSİTEYİ ÖNGÖRMEDEKİ YERİ**

Dr. Hüseyin AKBULUT
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeliz Emine ERSOY

Bu araştırma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.

İstanbul, 2016

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tez Sahibi : Dr. Hüseyin AKBULUT

Tez Başlığı : Mikro Ribonükleik Asitlerin Meme
Kanserinde Multisentrisiteyi
öngörmedeki yeri

İmza

Jüri Bşk. (Danışman)

.....

.....

.....

Üye

.....

.....

.....

Üye

.....

.....

.....

Üye

.....

.....

.....

Üye

.....

.....

.....

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İMZA

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İsim ve soy isim:

İmza:

Tarih:

TEŞEKKÜR

Beş yıllık genel cerrahi asistanlık hayatım boyunca her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen ve bu süreci tamamlamada sonsuz katkılarından dolayı eőim Dr. Damla Gökçeer Akbulut'a, aileme ve baőta Prof. Dr. Erhan Ayőan, Prof. Dr. Mahmut Müslümanoğlu, tez danıőmanım Doç. Dr. Yeliz Emine Ersoy olmak üzere çok değerli hocalarıma, tezimin her aşamasında bana destek olan ve ęalıőmanın tamamlanmasını sağlayan Dr. Ender Coőkunpınar'a ve tüm ęalıőma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.



ÖZET

Klinik ve histopatolojik olarak heterojen özelliklere sahip meme kanserinin tanı ve tedavisinde genetik faktörlerin rolü son dönemlerde ön plana çıkmıştır. Özellikle miRNA'ların ekspresyon profillerinin farklı kanser tiplerinde farklılıklar gösterdiği; mRNA ekspresyonunu regüle ettikleri, ya da translasyonu inhibe edici rolleri ile meme kanseri hücrelerinin progresyon, invazyon ve metastaz yapmasında etkin olabilecekleri gösterilmektedir. Multisentrik olarak saptanan meme kanserli vakaların tedavi planında meme koruyucu cerrahinin lokal rekürrens ve survival üzerine etkisi halen tartışmalıdır. Çalışmamızda, meme kanserlerinde ekspresyon farklılığı bildirilmiş olan 84 miRNA geninin multisentrisiteyi öngörmedeki etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD Meme Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran, cerrahi tedavi öncesinde kemoterapi / kemoradyoterapi almamış ve daha önce kanser anamnezi olmayan 31 unifokal-26 multisentrik meme kanseri tanılı bayan hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların operasyonları sırasında tümörlü dokular ve cerrahi sınırlar dışındaki sağlam meme dokularından alınan parçalar " RNA later solüsyonu " içinde -80°C'de muhafaza edildi. İÜ İTF İç Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik BD, Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda tüm dokularda "Human Breast Cancer miRNA PCR Array" kit ile 84 miRNA çalışıldı. Çalışmanın etik ilkelere uygunluğu Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek etik onam alındı.

Çalışmamızda fold change cut off değeri 4 olarak kabul edildi. Unifokal grupta 13 adet upregüle, 5 adet downregüle, multisentrik grupta 3 adet upregüle 7 adet downregüle miRNA tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, mikroRNA, multisentrisite

ABSTRACT

The role of genetic factors in diagnosis and treatment of breast cancer, which is heterogeneous in both histopathological and clinical ways, has come into prominence. Especially, expression profiles of miRNA are shown to be different in various cancers, to regulate expression of mRNA or to have a role in inhibition of translation, thus it shows the possible effect in progression, invasion and metastasis of breast cancer cells. The effect of breast conserving treatment in local recurrence and survival rates for the patients who has multifocal breast cancer is still controversial. In our study, we intended to evaluate the foresight of 84 miRNAs which is identified in breast cancer for having differentiated expressions.

31 patients with unifocal, and 26 patients with multicentric breast cancer who admitted to General Surgery Department of Bezmialem Vakif University Hospital and who have no any other cancer known before, nor any neoadjuvant therapy prior to surgery were included in this study. The tissue samples of both tumoral and normal breast tissues which were taken during the operation procedure were kept in “RNA later solution” at -80°C. In all of the samples, 84 miRNAs were studied with “Human Breast Cancer miRNA PCR Array” at Division of Medical Genetics, Department of Internal Medicine, Istanbul Medical Faculty, Istanbul University.

Fold change cut off value was accepted as four. As the results; in unifocal group there were 13 upregulated and five downregulated miRNAs, and in multicentric group, there were three upregulated and seven downregulated miRNAs.

Keywords: Breast cancer, microRNA, multicentricity

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE.....	3
2.2. MEMENİN ANATOMİSİ	4
2.2.1. EMBRİYOLOJİ.....	4
2.2.2. BÖLGESEL ANATOMİ	6
2.2.3. MEMENİN KAN DOLAŞIMI	8
2.2.4. MEMENİN SINIRLERİ	9
2.2.5. MEMENİN LENFATİK SİSTEMİ	9
a. Memenin yüzeysel lenfatikleri	10
b. Memenin derin lenfatikleri	10
c. Aksiller lenf nodları	11
1. Eksternal meme nodülleri (anterior ya da pektoral grup):	11
2. Skapular nodüller (posterior veya subskapular grup):	11
3. Santral nodüller:	11

4.	İnterpektoral nodüller (Rotter):	11
5.	Aksiller ven nodülleri(lateral grup):.....	11
6.	Subklaviküler nodüller (apikal grup):	11
2.2.6.	AKSİLLA	12
2.3.	MEME KANSERİ.....	13
2.3.1.	EPİDEMİYOLOJİ	13
2.3.2.	RİSK FAKTÖRLERİ	13
2.3.3.	MEME KANSERİ HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMA	14
a.	Karsinoma in Situ	14
b.	İnvaziv Meme Karsinomları	15
2.3.4.	MOLEKÜLER SUBTİPLER	17
a.	Luminal A ve Luminal B	18
b.	HER2 zengin grup	18
c.	Basal-Like grup.....	18
d.	Claudin-fakir grup.....	19
e.	Normal-like grup.....	19
2.3.5.	EVRELEME	19
2.3.6.	MEME KANSERİNDE MULTİFOKALİTE VE MULTİSENTRİSİTE	23
2.3.7.	TEDAVIDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR	24
a.	Meme Koruyucu Cerrahi	24
b.	Sentinel Lenf Nodu Biopsisi	25
c.	Palpe Edilemeyen Lezyonların Çıkarılması	26
d.	Cilt Koruyucu ve Meme Başı Koruyucu Mastektomiler	26
e.	Radyoterapi	27
f.	İntraoperatif Radyoterapi	27
g.	Hormonoterapi	28

h. Kemoterapi.....	29
i. İmmünoterapi	29
2.4. MİKRO-RNA'LAR	30
2.4.1 MİKRO-RNA'LAR VE MEME KANSERİ	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Vakaların çalışmaya dahil edilme kriterleri	34
3.2. Vakaların çalışmaya alınmama/çalışmadan çıkarılma kriterleri	34
3.3. Kullanılan cihazlar	35
3.4. Hasta örneklerinin toplanması.....	36
3.5. Doku Homojenizasyonu ve RNA izolasyonu	36
3.6. Qiagen miRNeasy Kit ile miRNA izolasyon basamakları	36
3.7. NanoDrop II Spektrofotometre ile RNA konsantrasyon ölçüm protokolü	38
3.8. Qiagen miSCRIPT II RT kit ile cDNA sentez prosedürü	39
3.9. Qiagen miSRIPT II RT cDNA protokolü	39
cDNA KONTROL PCR'ı protokolü:	40
3.10. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA.....	55
6. KAYNAKÇA	61

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASCO : American Society of Clinical Oncology/Amerikan Klinik Onkoloji Topluluğu

BIRADS : Breast Imaging Reporting and Data System

BRCA 1: Meme Kanseri 1 geni (Breast Cancer Gene 1)

BRCA 2: Meme Kanseri 2 geni (Breast Cancer Gene 2)

CEA: Karsinoembriyonik Antijen

DKIS (DCIS): Duktal Karsinoma In Situ (Ductal Carcinoma In Situ)

DNA : Deoksiribonükleik Asit

FDA : Food and Drug Administration/Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

İDK : İnvaziv Duktal Karsinom

İİAB : İnce İğne Aspirasyon Biopsisi

İLK : İnvaziv Lobuler Karsinom

İORT : İntraoperatif Radyoterapi

LKIS (LCIS) : Lobüler Karsinoma In Situ (Lobular Carcinoma In Situ)

LN : Lenf Nodu

miRNA : Mikro Ribonükleik Asit

MKC : Meme Koruyucu Cerrahi

MMG : Mammografi

MÖ : Milattan önce

MS : Milattan sonra

MR : Manyetik rezonans

mRNA : Messenger Ribonucleic Acid (mesaj taşıyan ribonükleik asit)

ROLL : Radionuklid rehberliğinde okült lezyon lokalizasyonu (Radionuclid-guided Occult Lesion Localisation)

SLN : Sentinel Lenf Nodu

SLNB : Sentinel Lenf Nodu Biopsisi

tRNA : Translasyonel Ribonükleik Asit

VCS : Vena Cava Superior

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Memenin normal embriyolojik gelişimi (A) 5. haftada görülen meme tomurcuğu. (B) Tomurcuğun 5. haftadan sonra göğüs içerisine doğru genişlemesi (C) İkincil tomurcukların gelişimi (D) 12. haftada meme lobullerinin oluşması (D) 12. haftadan sonra duktusların gelişip ağ şeklini alması ve ortada birleşerek içe çökük meme başını oluşturmaları.....	4
Şekil 2 Süt çizgileri (Visual Art: © 2012.The University of Texas MD Anderson Cancer Center).....	5
Şekil 3 Erkek meme dokusu (A) Vertikal kesit çizimi (B) Medio-lateral oblik (MLO) mammografik kesit.....	6
Şekil 4 Kadın meme dokusu (A) Vertikal kesit çizimi (B) Medio-lateral oblik (MLO) mammografik kesit.....	6
Şekil 5 Memenin tanjansiyel ve sagittal kesitleri (Romrell LJ, Bland KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites. In: Bland KI, Copeland EMI, eds. The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases. Philadelphia: Saunders, 2009. Copyright Elsevier).....	7
Şekil 6 Memenin arteriyal dolaşımı (Romrell LJ, Bland KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites. In: Bland KI, Copeland EMI, eds. The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases. Philadelphia: Saunders, 2009. Copyright Elsevier).....	8
Şekil 7 Memenin lenfatik yolları (oklar lenf akımı yönünü belirtmekte) (Visual Art : 2012. The University of Texas MD Anderson Cancer Center).....	10
Şekil 8 Aksiller lenf nodu grupları (Visual Art: © 2012. The University of Texas MD Anderson Cancer Center).....	12
Şekil 9: Duktal karsinoma in situ mikroskopik kesit.....	15
Şekil 10: Duktal karsinoma in situ mammografik görünüm.....	15
Şekil 11 microRNA sentezi.....	30
Şekil 12 microRNA etki mekanizması.....	31
Şekil 13:Qiagen miRNeasy Kit ile miRNA izolasyon basamakları (118).....	38
Şekil 14: miScript II RT kit uygulama şeması (118).....	39

Şekil 15: Unifokal ve multisentrik tümörlerin mastektomi açısından karşılaştırması.....	50
Şekil 16: Evrelere göre miRNA karşılaştırması	50
Şekil 17: miR-182-5p biyobelirteç olabilir mi?.....	51
Şekil 18: Unifokal ve multisentrik gruplarda downregule miRNA'lar	52
Şekil 19: Unifokal ve multisentrik tümörlerin reseptör pozitifliği açısından karşılaştırması	53



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: LKIS ve DKIS'a ait özellikler (12).....	14
Tablo 2: Tümör çapının T evresi için değerlendirilmesi (38).....	20
Tablo 3: Lenf nodu evrelemesi (klinik değerlendirme) (38)	21
Tablo 4: Bölgesel lenf nodlarının evrelemesi (patolojik değerlendirme) (38)	221
Tablo 5: Uzak metastaz varlığına göre evreleme (38).....	22
Tablo 6: TNM evre gruplaması (38).....	222
Tablo 7: Başlangıç için RNA miktarları ve çeşitli PCR uygulamaları için reverse transkripsiyon reaksiyonlarına yönelik buffer önerileri (118).....	40
Tablo 8: Multisentrik tümör kolunda qRT-PCR görüntüsü (floresans-siklus grafiği) amplifikasyon eğrileri.....	41
Tablo 9: Unifokal tümör grubunda qRT-PCR görüntüsü (floresans-siklus grafiği) amplifikasyon eğrileri.....	41
Tablo 10: miRNA genlerinin disregülasyonuna yönelik p değerleri.....	44
Tablo 11: Unifokal kolda disregüle miRNA genleri için fold change grafiği.....	45
Tablo 12: Multisentrik kolda disregüle miRNA genlerinin fold change grafiği	45
Tablo 13: Multisentrik tümör grubunda upregüle ve downregüle miRNA genleri (fold regülasyonu > 4)	46
Tablo 14: Unifokal tümör grubunda upregüle ve downregüle miRNA genleri (fold regülasyonu > 4)	47
Tablo 15: p değerleri ve miRNA genlerine ait grafik görüntüsü.....	47
Tablo 16: Gen ekspresyon şemasının magnitud görüntüsü	48
Tablo 17: Unifokal-Multisentrik tümör karşılaştırması.....	49
Tablo 18: Menapoz öncesi ve sonrası karşılaştırma	49
Tablo 19: Disregüle miRNAların korelasyon ve p değeri karşılaştırması.....	49
Tablo 20: miR-182-5p biyobelirteç olabilir mi?.....	50
Tablo 21: Unifokal ve mutisentrik gruplarda downregule miRNA'lar.....	51
Tablo 22: Unifokal ve multisentrik tümörlerin reseptör pozitifliği açısından karşılaştırması.....	52
Tablo 23: Multisentrik tümörlerde artmış ifade gösteren 3 miRNA tarafından ortak hedef alınan genler.....	52

Tablo 24: Multisentrik tümörlerde artmış ifade gösteren 3 miRNA tarafından ortak hedef alınan yolaklar.....	53
Tablo 25: Multisentrik tümörlerde azalmış ifade gösteren miRNA'lar tarafından genel olarak hedef alınan genler.....	53
Tablo 26: Multisentrik tümörlerde azalmış ifade gösteren miRNA'lar tarafından ortak hedef alınan yolaklar.....	53



1. GİRİŞ VE AMAÇ

MikroRNA'lar transkripsiyon sonrası mRNA'yı baskılayarak gen ekspresyonunu protein sentezi aşamasında kontrol eden ve protein kodlamayan bir RNA grubudur. Günümüzde insan genomunda 2040 civarında mikroRNA geni tanımlanmıştır ve genomdaki 25000 civarındaki genin üçte birinin bu düzenleyiciler tarafında kontrol edildiği bilinmektedir. MikroRNA'ların birçok hücrel fonksiyonun kontrol edilmesinde rol oynadığı, birçok kanser tipinde de ekspresyon profillerinin değiştiği, kanser oluşum süreçlerinde kritik rol oynadıkları anlaşılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kanser türlerine özgü olarak mikroRNA'ların tümör dokusu dışında, serumdaki varlıkları ve miktarlarının da değişkenlik gösterdiği gözlenmekle birlikte, özellikle kolon kanseri hastalarında yapılmış olan çalışmalarda dolaşımda bulunan ve dokuda eksprese olan mikroRNA miktarlarının birbirleri ile %98 uyumlu olduğu bilinmektedir. Yeni mikroRNA biyobelirteçlerinin keşfi özellikle kanser tedavi süreçlerinde önemli bir katkı sağlayacaktır.

Son zamanlarda mikroRNA'lar için mikroarray ve PCR array tarama panellerinin geliştirilmesi sayesinde, solid tümörlerle yapılan çalışmalarda kanser hastalarının serumlarında bulunan mikroRNA'ların, biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmaların daha fazla sayıda kanser türü ile perçinlenmesi gerekmektedir. Kromozomların kırık bölgesi yakınında mikroRNA genlerinin bulunması ve malign dokularda bu genlerin ekspresyon düzeylerinin değişmesi, kanser ile kurulan bağlantıyı desteklemektedir.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup tüm kanser çeşitleri içinde, kadınlarda mortaliteye sebep olan ikinci en sık kanser olduğu bilinmektedir. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 232,340 yeni vaka tanımlanmaktadır (1). Bu veriler doğrultusunda tanı ve tedavide her ne kadar büyük gelişmeler katedilmiş olsa da, meme kanseri hala toplumsal bir sağlık sorunu olarak yerini korumaktadır. Hastalığın erken ve doğru olarak teşhisi hem uygulanacak tedavinin başarı şansını arttıracak, hem de prognostik değerlendirme açısından yararlı olabilecektir.

Multifokal ve multisentrik meme kanserlerinin unifokal meme kanserleriyle kıyaslandığında daha kötü prognostik faktörlere sahip olduğu, yapılan cerrahiden bağımsız olarak da artmış lokal rekürrens riski taşıdıkları bildirilmiştir (2).

Bu çalışmada multisentrik meme kanserinin erken teşhisinde ve progresyonun takibinde kullanılmak üzere hızlı, güvenilir ve yaygın olarak uygulanabilir bir biyobelirteç tanımlamayı amaçlamaktayız.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Meme vücutta gözle görülebilen lokalizasyonda ve laktasyondan sorumlu bir organ olması nedeniyle, ilk çağlardan beri insanların ve hekimlerin dikkatini çekmiş ve memeye ait patolojiler açısından önemli gözlemlerin yapılmasını sağlamıştır (3).

Meme hastalıkları ile ilgili ilk yazılı kayıtlara Eski Mısır'da rastlanmıştır. M.Ö. 3000 yılına ait bu papiruslar Teb şehrinde Edwin Smith tarafından 1862 yılında okunmuştur. Papiruslarda 48 vaka anlatılmış; travma, apse, enfekte yaralar ve tümör hakkında bilgiler verilmiştir. Vakalardan 8'i sert, dokunulduğunda soğuk ve sıvı içermemesi nedeniyle apse ve enfekte yaralardan ayırt edilmekte ve tedavi olanağı olmadığı belirtilmesi nedeniyle tümörü düşündürmektedir ki; sadece bir olguda yanan bir odunla yaranın koterizasyonu denenmiştir (3). Hamurabi'nin hastasının ölümüne neden olan doktorun da öldürülmesine yönelik kanunu ve Hipokrat'ın diğer kanserler gibi meme kanserinin de cerrahiden yarar görmeyeceğine yönelik düşüncesi hekimleri bir süre meme kanseri ile uğraşmaktan alıkoymuştur.

İkinci yüzyılda Galen kendi klasikleşmiş klinik gözlemini tanımlarken memedeki tümörü yengece benzetti: "Aynı yengecin iki yanında bacakları olduğu gibi bu meme hastalığında da etrafında doğal olmayan damarsal genişlemeler görülmekte ve olgunlaştıkça yengeç ayağını andırmakta." (4). Ebu Kasım 10.yy'da, Mondeville ve Lanfranc 13.yy'da Leonides'in tekniğini geliştirmişlerdir (5). Önce Fabry tarafından 16.yy'da memeyi sıkıştırarak amputasyon yapan bir alet geliştirilmiş ve 17.yy'da Arceo ilk kez mastektomiye tariflemiştir. Cabrol buna pektoralis majör kasının çıkarılmasını eklemiş ve kısa bir süre sonra Severinus koltuk altı disseksiyonunu ilave etmiştir (5).

Günümüzde halen uygulanmakta olan mastektomi 1894 yılında hem Halsted hem de Mayer tarafından tarif edilmiştir. Cerrahi ve anestezi geliştikçe bir yandan modifiye radikal mastektomi gibi çıkarılan kısımların genişletildiği, bir yandan da basit mastektomi ve lumpektomi gibi çıkarılan kısımların daraltıldığı bir dizi ameliyat tariflenmiştir ancak, ilk uygulamaları 1940'lı yıllara dayanan ve sınırlı rezeksiyon sonrası memeyi korumaya yönelik ameliyat sonrası memenin ışınlanmasına yönelik uygulamalar radyoterapinin o dönemdeki komplikasyonları sonucu çok taraftar toplayamamıştır (3,5).

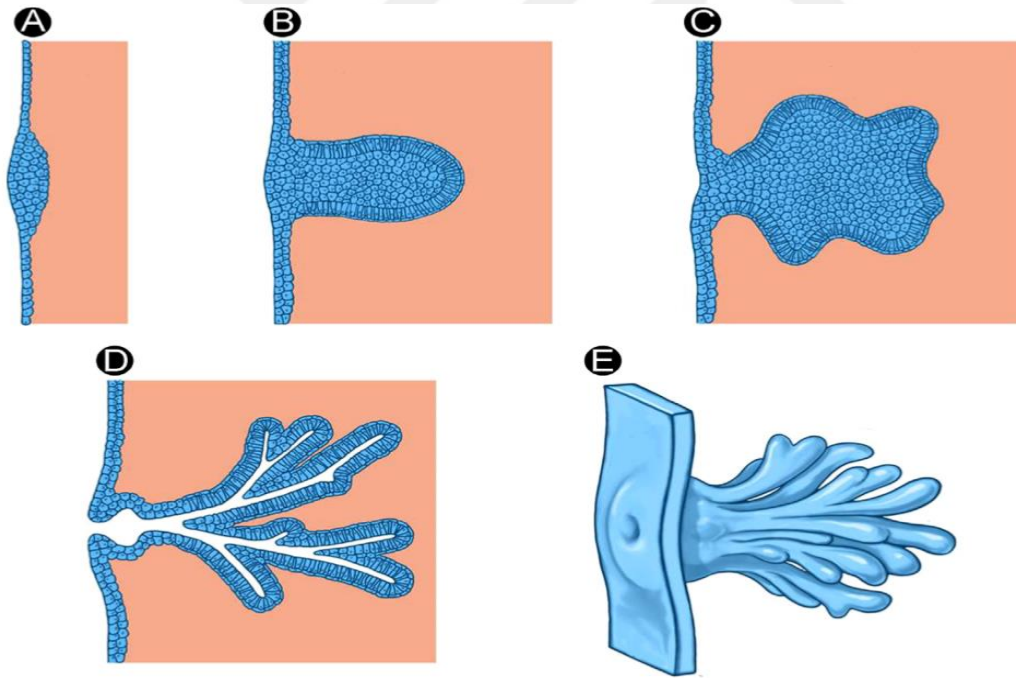
Günümüzde teknolojinin modern tıba entegrasyonu arttıkça radyoterapinin yan etkilerinin azalması ve yeni cihazların kullanıma geçmesiyle meme koruyucu ameliyatlar yaygınlaşmış ve genel kabul görmüş durumdadır.

Moleküler ve genetik alanda da tümör biyolojine yönelik yolların daha fazla incelenmesi ve önemli yolların katedilmesi sayesinde daha güçlü tedavi olanakları gündeme gelmiş ve giderek bireysel tedavi önem kazanmıştır. Neoadjuvan tedavinin tanımlanması ile lokal ileri meme kanserlerinde dahi memeyi korumaya yönelik cerrahi girişimler ön plana çıkmıştır.

2.2. MEMENİN ANATOMİSİ

2.2.1. EMBRİYOLOJİ

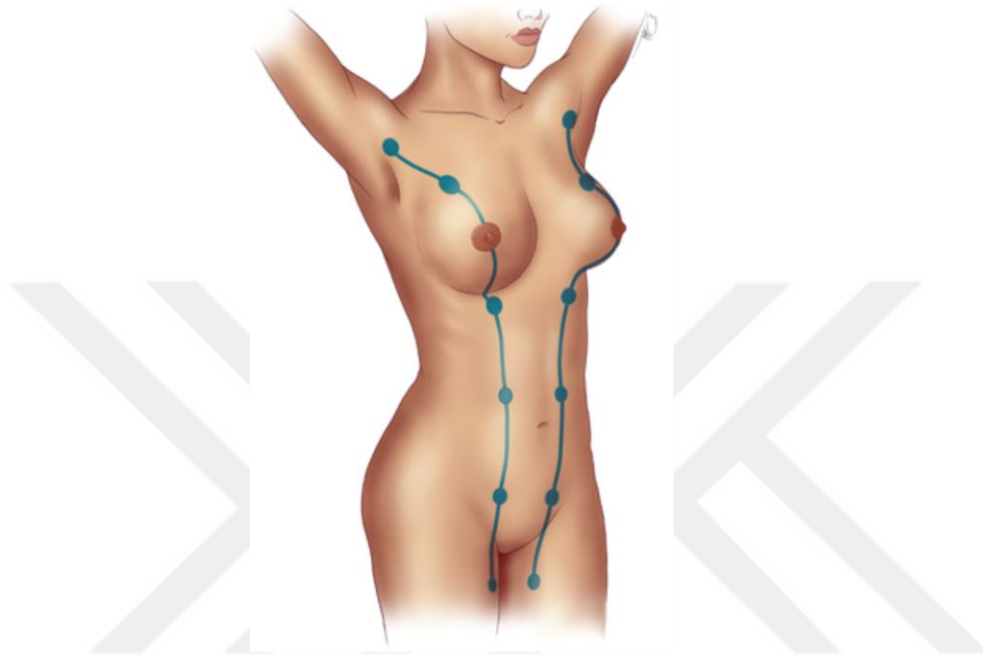
İnsan meme dokusu hormonal ve genetik etkiler altında ektoderm hücrelerinden embriyonik hayatın dördüncü haftalarında gelişme gösterir. Gestasyonun beşinci haftasında ektodermal kalınlaşma meme tomurcuğu yönünde gelişir (Şekil 1A). Vücudun ön yüzünde, aksillanın üst kısmından kasık bölgesinin aşağısına kadar uzanan kalınlaşmış ektoderm (süt



Şekil 1 Memenin normal embriyolojik gelişimi. (A) 5.haftada görülen meme tomurcuğu. (B) Tomurcuğun 5.haftadan sonra göğüs içerisine doğru genişlemesi. (C) İkincil tomurcukların gelişimi. (D) 12. haftada meme lobüllerinin oluşması. (E) 12. haftadan sonra ductusların gelişip ağ şeklini alması ve ortada birleşerek içe çökük meme başını oluşturmaları.

çizgileri) meme bezlerinin oluşum yerleridir. Ancak 4. interkostal aralık dışındaki tomurcuklarda gerileme olmaması durumunda süt çizgileri boyunca aksesuar meme (polimasti), aksesuar meme başı (politelia) görülebilir (6) (Şekil 2) . Gestasyonun 5. haftasından

12. haftasına kadar olan süreçte primer meme tomurcuğu göğsün içine doğru büyüyerek ikincil tomurcuklar ve lobuller oluşmaya başlar (Şekil 1B-D) (7). İkincil tomurcuklar 12. hafta sonrasında uzamaya ve dal vermeye devam ederek karmaşık bir ağ görünümünü alan duktusları oluşturmaya başlarlar ki, birleştikleri merkezde bir içe çökük alan oluşur. Bu içe çökük alan daha sonra meme başı olarak gelişir ve genellikle doğumdan sonra Montgomery olarak



Şekil 2 Süt çizgileri (Visual Art: © 2012.The University of Texas MD Anderson Cancer Center)

adlandırılan sebace glandların proliferasyonu ile dışa doğru everte olur (7). Pubertenin başlaması ile meme dokusunun gelişimi erkeklerde ve kadınlarda farklılık gösterir.

Peripubertal dönemde, erkeklerde androjenik hormonların etkisiyle proliferasyon görülmezken, kadınlarda östrojenin etkisi ile duktal ve stromal proliferasyon görülür. Sonuç olarak; erkeklerde meme dokusunda çoğunluğu yağ hücreleri olmak üzere, birkaç adet rezidüel duktus ve atrofiye uğramış stromal yapılar bulunmaktadır (Şekil 3). Kadınlarda ise pubertal dönemin başlaması ile kanda östrojen seviyesi yükselir ve memede yağ ve periduktal bağ dokusunda artma ve duktal sistemde kalınlaşma görülür. Buna bağlı olarak ergenliğin erken döneminde genç kızlarda meme cildinin altında palpe edilebilen doku farkedilebilir ki, kitlesel lezyon şüphesi oluşturabilir ancak meme gelişimini etkileyebileceğinden dolayı biopsi yapılmamalıdır. Olgunlaşma tamamlandığında meme dokusunda duktuslar, yağ ve fibroglandüler stromal dokunun dengeli dağılımı görülmektedir (Şekil 4) (7,8).

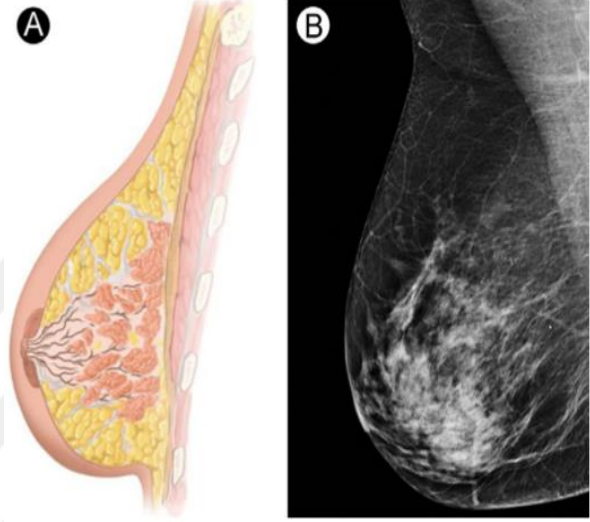
2.2.2. BÖLGESEL ANATOMİ

Erişkin kadınlarda meme dokusu ikinci ve altıncı kostalar arasında yer alır. Medialde sternum, lateralde midklavikuler hatta ya da ön aksiller çizgiye kadar uzanmaktadır (8).

Meme glandı göğüs duvarının yüzeysel pektoral fasyasının derin ve yüzeysel yaprağı arasında yer almaktadır. Üst dış kadrandan da koltuk altına doğru uzanım gösteren meme



Şekil 3 Erkek meme dokusu. (A)Vertikal kesit çizimi. (B) medyal lateral oblik (MLO) mammografik kesit

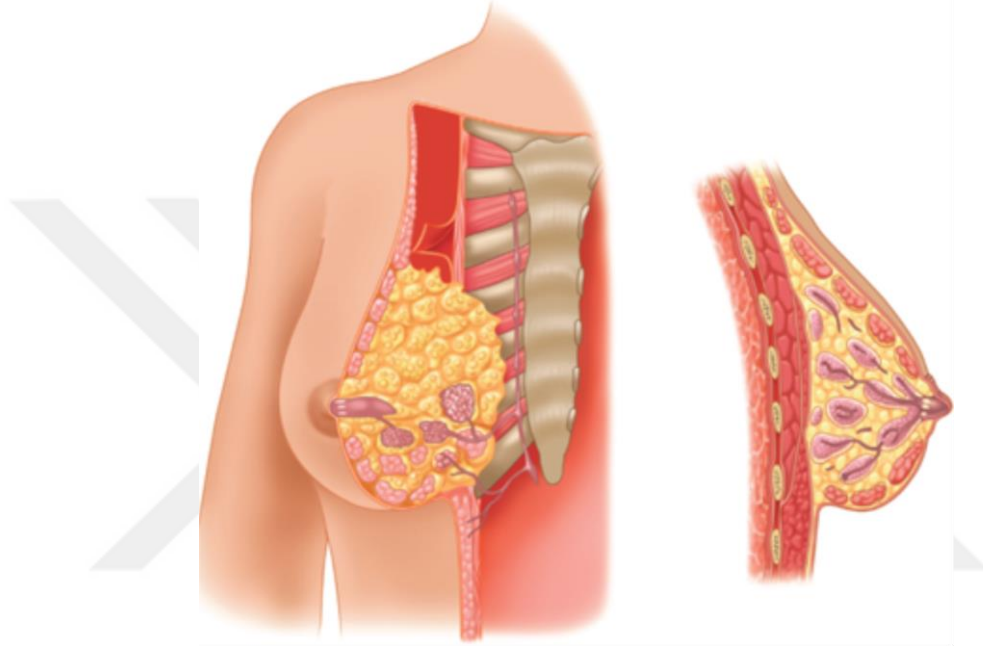


Şekil 4 Kadın meme dokusu. (A)Vertikal kesit çizimi. (B) medyal lateral oblik (MLO) mammografik kesit.

dokusuna “Spence’in aksiller kuyruğu” denir. Bu yapı derin fasyayı Langer deliği olarak adlandırılan aralıktan geçerek aksillaya uzanır. (4, 9). Her bir meme, lobullerden oluşan 15 ila 20 lobu içermektedir. Ek olarak yumuşak dokudan gelişen fibröz bantlar mevcuttur ve bu bantlar meme cildine dik bir şekilde girerek memenin şeklini korumasına yardımcı olur. Bu bantlara Cooper’ın asıcı ligamanları denmektedir. Bu ligamanların bir tümör tarafından invazyona uğraması durumunda kontraksiyon ve buna bağlı derinin sabitlenmesine, gamzeleşmesine ya da çekinti yapmasına sebep olur (9).

Genel görünüm olarak konik şekle sahip olan meme dokusunun tabanı yuvarlak şekilde ve kişiden kişiye değişmekle birlikte ortalama 10-12 cm çapındadır. Doğum yapmamış kadınlarda memeler hemisferik görünümde olup meme başı superioru nispeten daha düz bir formdadır. Hormonal etkilerin eşlik ettiği gebelik ve laktasyon ile birlikte hacim ve yoğunluk artar ve yaşlılık ile birlikte giderek gevşek ve daha sarkık bir hal alabilir, hacmi azalabilir (6).

Meme başı ve areola etrafı pigmentlidir ve puberte süresince giderek koyulaşır ve meme başı eleve olur. Gebelik boyunca areola büyümeye devam eder; sebace glandlar ve ter bezleri sebebiyle küçük kabarıklıklar oluşur ve Montgomery tüberkülleri olarak isimlendirilir. Yoğun bağ dokusu içerisinde sirküferansiyel olarak ve duktuslar etrafında longitudinal olarak uzanan düz kas grupları meme başına erektil özellik sağlar. Meme başının tepesinde dermal papillada çok miktarda duysal sinir uçları ve Meissner cisimcikleri mevcuttur ki, bu sayede yenidoğanın emzirme sürecinde süt üretiminin devamını sağlayan nörohümorale reaksiyonlar başlar (6).



Şekil 5 memenin tanjansiye ve saggital kesitleri (Romrell LJ, Bland KI. *Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites.* In: Bland KI, Copeland EMI, eds. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases.* Philadelphia: Saunders, 2009. Copyright Elsevier.)

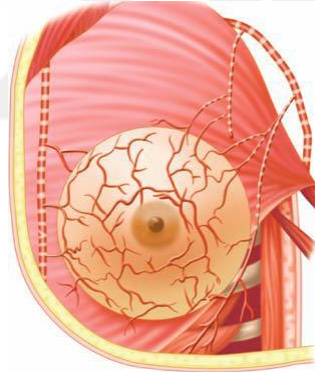
Süt kanalları sistemi asinüslerin birleşerek terminal duktus olarak isimlendirilen kanala açılması ile oluşur. Lobül içerisinde terminal duktusun iki bölümü mevcuttur, bunlardan biri intralobuler, diğeri ise ekstralobuler segment olarak adlandırılır (10). Birkaç lobülün terminal duktusları birleşerek laktifer duktusları oluşturur. Her lobun ayrı bir laktifer duktusu mevcuttur ve laktifer duktuslar meme başına doğru yaklaşarak laktifer sinus olarak isimlendirilen genişlemeyi gösterirler. Çapları bu şekilde 2-3 mm'den 5-8 mm'ye değişir. Laktifer sinusler koni şeklinde ve ampulla olarak adlandırılan alandan dışarı açılır (Şekil 5). Ampulla çok katlı epitel hücreleri ile döşelidir ve aktif olmayan bir memede dökülen hücreler duktus ağzlarını tıkaç gibi örter (11).

2.2.3. MEMENİN KAN DOLAŞIMI

Meme kanlanması zengin olan bir organdır. Kanlanmasını internal mammarian arterin delici dallarından, posterior interkostal arterin lateral dallarından, aksiller arterden gelen; üst torasik, lateral torasik, subskapular ve akromiotorasik arterin pektoral dallarından almaktadır (12) (Şekil 6).

Memenin yaklaşık %60'ı (özellikle medial ve santral kısımlar) internal mammarian arterin ön delici dalları ile beslenmektedir (13). Subklavian arterin yan dalı olan internal mammarian arterin 1, 2, 3 ve 4. ön delici dalları sternum kenarı komşuluğunda buldukları interkostal aralıklar düzeyinde göğüs duvarını deler ve pektoral majör kasını geçerek meme glandına ulaşır.

Memenin yaklaşık %30'u, özellikle üst ve dış kadrantlar aksiller arterin ikinci kısmından çıkan lateral torasik arterden beslenir (13). Aksiller arterin en üst torasik dalı genellikle göğüs duvarının kanlanmasını sağlamaktadır ancak memeye giden dallara da sahiptir. Posterior interkostal arterlerin lateral delici dalları da memeye kan vermektedir.



Şekil 6 Memenin arteriyal dolaşımı (Romrell LJ, Bland KI. *Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites*. In: Bland KI, Copeland EMI, eds. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. Philadelphia: Saunders, 2009. Copyright Elsevier)

Subskapular arter ise aksiller arterin en büyük dalı olup lateral göğüs duvarında inferiora doğru seyir gösterirken torakodorsal arter adını alarak latissimus dorsi ve serratus anterior kaslarını besler. Mastektomi sırasında bu alandaki arteriyal dallarda ve eşlik eden venöz yapılarda yaralanma ciddi kanamalara neden olduğundan “kanlı köşe” adı ile anılmaktadır. Torakodorsal arter meme beslenmesinde belirgin role sahip değildir ancak aksiller diseksiyon sırasında santral ve skapular lenf nodlarına yakın ilişki göstermesi nedeniyle işlem esnasında bu artere dikkat etmek gerekir.

Memenin venleri de arter dağılımına uymakta ve onlara eşlik etmektedir. Ek olarak yaptıkları anastomozlar da metastatik karsinom embolilerine bağlı olarak uzak organ metastazlarını belirler (11).

Buna göre;

- İnternal mammarian ven ve aksiller ven – İnnominate ven – Vena Cava Superior (V.C.S.) – Akciğer kapiller ağı
- İnterkostal venler – Azygos venleri – V.C.S. – Akciğer kapiller ağı
- İnterkostal venler – Vertebral venöz pleksuslar – Vertebra metastazları

Batson teorisine göre; belirtilen son ilişkide, içinde kapakçık olmayan sistemden dolayı basıncın da düşük olması nedeniyle retrograd kan akımı oluşabilir ve böylelikle retrograd olarak metastaz gerçekleşebilir (12).

2.2.4. MEMENİN SİNİRLERİ

Duysal inervasyon başlıca 3, 4, 5, 6. interkostal sinirlerin lateral kütanöz dalları tarafından sağlanmaktadır (lateral mammari dalları). Aksiller diseksiyon sırasında iki sinir önemli role sahiptir; santral ve skapular lenf nodları arasında yol aldığından dolayı diseksiyon esnasında korumanın zor olduğu ve kesilmesi durumunda belirgin klinik soruna yol açmayan torakodorsal sinir ve serratus anterior kasını innerve eden nervus torasikus longus (Charles Bell siniri). Bu sinirin korunamaması durumunda “skapula alata-kanat skapula” durumu ortaya çıkar (9). İkinci interkostal sinirin lateral kütanöz dalı olan interkostobrakial sinir aksilla diseksiyonu sırasında görülebilir ve kesilmesi durumunda önkol medial kısmında duyu kaybına neden olabilir (12).

2.2.5. MEMENİN LENFATİK SİSTEMİ

Lenfatik sistem iki grup altında incelenebilir.

- a. Yüzeysel lenfatikler (deri lenfatikleri)
- b. Derin lenfatikler (parankimal lenfatikler)

a. Memenin yüzeyel lenfatikleri

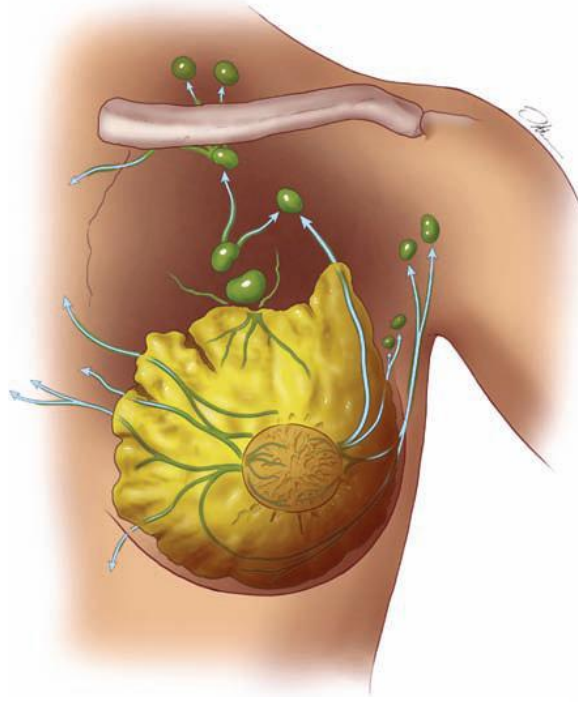
Embriyolojik olarak ektodermden köken alan memenin lenfatik yapısı diğer bölgelerdeki deri eklerine uymaktadır. Başlıca iki adet lenf ağı bulunmaktadır.

- i. Subepitelyal (papiller) pleksus
- ii. Subdermal pleksus

Subepitelyal pleksusta kapak yoktur ve lenf akımı herhangi bir yönde olabilir. Subdermal pleksusta kapak mevcuttur ve akım tek yönlüdür. Areolanın inferiorunda subareolar pleksus (Sappey pleksusu) bulunur. Yüzeyel lenfatikler derin lenfatikler vasıtası ile aksillaya drene olur.

b. Memenin derin lenfatikleri

Laktifer duktuslara ait lenf damarları (periduktal lenfatikler) lobuller etrafında ince bir ağ oluşturur. Bu ağdan çıkan birçok toplayıcı lenfatik trunkus mevcuttur. Trunkuslardaki akım yönü ile ilgili kabul gören görüş lenf akımının derin subkütanöz ve intramammer lenfatik damarlardan sentrifugal olarak aksiller ve internal mamarian lenf nodlarına doğru olduğudur (12) (Şekil 7).



Şekil 7 Memenin lenfatik yolakları (oklar lenf akımı yönünü belirtmekte) (Visual Art : 2012. The University of Texas MD Anderson Cancer Center)

c. Aksiller lenf nodları

Memenin lenfatik drenajı ve aksillanın anatomisinin meme kanseri tedavisindeki önemi aşikardır ancak sınırları net demarke edilememekte ve çeşitli varyasyonlar görülebilmektedir (12). Bu bağlamda meme kanserinin yayılma derecesini belirlemek amacıyla lenf nodülleri 6 gruba ayrılarak incelenmektedir (14).

1. Eksternal meme nodülleri (anterior ya da pektoral grup):

Lateral torasik damarlar ile birlikte pektoralis majör kasının dış kenarının altında bulunur. Bu nodüllerden çıkan efferent lenfatikler büyük ölçüde santral lenf nodüllerine ve subklaviküler lenf nodüllerine gider.

2. Skapular nodüller (posterior veya subskapular grup):

Bu nodüller subskapüler venin aksiller vene döküldüğü alandan latissimus dorsi kası ile birleştiği yere kadar ulaşır ve lateral göğüs duvarında bulunur. İnterkostobrakial sinir ve torakodorsal sinir skapular nodüllerin içinden geçen seyir göstermektedir. Aksiller diseksiyon sırasında bu iki siniri korumaya çalışmak metastaz içeren lenf nodlarının total eksizyonuna mani olabilir, zira kesilmeleri durumunda belirgin bir sakatlık oluşmaz.

3. Santral nodüller:

En kolay palpe edilebilen nodüllerdir çünkü aksillanın merkezinde ve en büyük çaplı nodüllerdir. Metastazlar da en çok bu nodüllerde gelişir.

4. İnterpektoral nodüller (Rotter):

Bu nodüller minör ve majör pektoral kasları arasında bulunur ve 1 ila 4 nodülü ihtiva eder.

5. Aksiller ven nodülleri(lateral grup):

Aksiller venin distal kısmı boyunca, medialinde ya da posteriorunda yerleşim gösteren nodüllerdir. Diseksiyon sırasında aksiller ven kılıfının açılması gerekli değildir.

6. Subklaviküler nodüller (apikal grup):

Bu grup aksillanın en tepesinde ve torakoakromiyal ven çıkış noktasının medialinde bulunmaktadır. Bu grup lenf bezlerinde metastaz varlığı inoperabilite bulgusudur ve radikal ameliyat yapmak mümkün değildir (9).

Bu lenfatikler arasında yaygın damarlar mevcuttur ve bir pleksus oluştururlar. Pleksuslardan çıkan bir ya da daha fazla subklaviküler lenfatik trunkuslar oluşur.

Memeyi drene eden lenf nodları cerrahi açıdan pektoralis minor kasıyla olan ilişkilerine göre 3 grupta değerlendirilir (Şekil 8).

1.Düzey lenf nodları; pektoralis minör kasının dış yanında, aksiller venin inferiorunda yer alır.

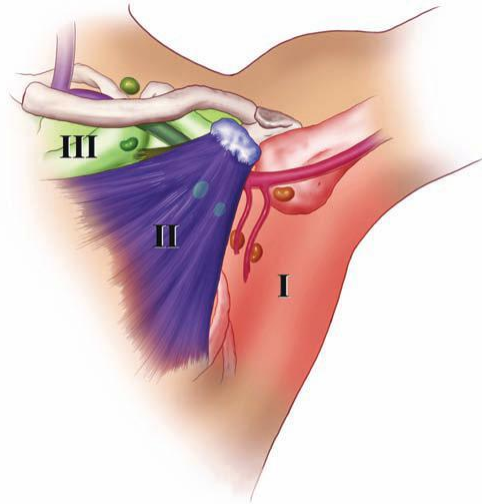
2.Düzey lenf nodları: pektoralis minör kasının arkasında, aksiller venin iç kısmında yer alır.

3.Düzey lenf nodları; pektoralis miör kasının iç kenarı ve 1. kosta arasında uzanır.

2.2.6. AKSİLLA

Aksilla; piramidal şekilli, toraks duvarı ve üst ekstremité arasında yer alan, 4 kenarı ve bir tepesi bulunan kompartmandır. Apeks olarak adlandırılan tepe kısmı superiorda servikoaksiller kanal ile boyun posterior üçgenine uzanır (15). Ön duvarda pektoralis majör ve minör kasları ve klavipektoral fasya bulunur. Arka duvar ise subskapular kas, teres majör, latissimus dorsi kasları ve üzerini örten fasya bulunur. Medial duvar serratus anterior kası ve ilk dört kosta ve bunları örten interkostal kaslar tarafından oluşturulur. Lateral duvar da latissimus dorsinin tutunduğu humerus iç yüzdeki intertübüküler oluk, korakobrakialis ve biceps kasları tarafından oluşturulur (15).

Aksiller damar sinir demeti aksillanın tepesinden geçtikten sonra üst tarafa ilerleyerek kola kadar gelir ki bu demetin içinde aksiller arter, ven ve brakial pleksus bulunur. Brakial



Şekil 8 Aksiller lenf nodu grupları (Visual Art:
© 2012. The University of Texas MD
Anderson Cancer Center)

pleksusa ait yapıların meme ile ilişkisi olmamasına rağmen cerrahi açıdan postoperatif morbidite açısından aksiller ven çok önemlidir.

2.3. MEME KANSERİ

2.3.1. EPİDEMİYOLOJİ

Meme kanseri 20-60 yaş arası kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (12). Kadınlarda yeni tanı alan kanserlerin %29'unu ve kansere bağlı ölümlerin %14'ünü oluşturmaktadır (12). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılında yaklaşık 234.580 meme kanseri tanısı olacağı ve 40.030 kişinin meme kanseri nedeniyle ölmüş olacağı tahmin edilmektedir (1). 1970'li yıllarda bir kadının meme kanserine yakalanma ihtimali 13'te 1 iken, 1980'li yıllarda 11'de 1 olmuş ve 2004'te bu oran 8'de 1'e yükselmiştir (1). Meme kanseri insidansındaki bu artış özellikle 55 yaş üstü kadınlarda görülmüş, kadınlar arasında erken menarş, ilk gebeliğin daha ileriki yaşlarda görülmesi gibi risk faktörlerinin yaygınlaşmasına ek olarak kullanımı yaygınlaşan mammografi ile ilişkili olduğu da öne sürülmüştür (16). Aynı zamanda metastatik hastalık insidansı azalma eğilimine girmiştir. 1960'lı yıllarda meme kanseri 5 yıllık toplam sağkalım oranı %63 iken 1981 yılında bu oran %78'e ve 2008 yılında %92'ye yükselmiştir (12).

Meme kanseri insidansındaki artış nedenleri ile mortaliteyi arttıran nedenler birbirinden farklı faktörler olabilir. İnsidans oranları; emzirmeye başlama yaş ortalaması daha küçük olan ve anne başına doğum oranları daha fazla olan, emzirme süresi fazla olan kadınların bulunduğu toplumlarda daha düşük olmaktadır. Bu faktörler genellikle gelişmemiş toplumların ve çoğu doğu ırklarının karakterize özellikleri arasında yer almaktadır. İnsidanstaki bu azalışa rağmen meme kanserine bağlı mortalite oranları bu toplumlarda etkili mammografik tarama programlarının bulunmayışı buna bağlı erken tanı konamamasına ve multidisipliner kanser tedavi programlarına ulaşılamamasına bağlı olarak görece yüksektir (1).

2.3.2. RİSK FAKTÖRLERİ

Meme kanseri insidansındaki artış; erken menarş yaşı, geç yaşta gebe kalma, daha az gebelik, kısa süreli emzirme periodları, geç menapoz gibi risk faktörlerinin yaygınlaşmasından

dolayı şaşırtıcı değildir (16). İnsidans artışına katkıda bulunan diğer risk faktörleri; obezite, alkol tüketimi, inaktif yaşam, hormon replasman tedavisi gibi nedenlerdir (17). Herediter meme kanserinde de artış mevcuttur. Örneğin İzlanda’da “Meme Kanseri 2” (BRCA2) gen mutasyonunun son yüzyılda 4 kat arttığı gösterilmiştir (18).

2.3.3. MEME KANSERİ HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMA

a. Karsinoma in Situ

Kanser hücreleri bazal membrana invazyon durumlarına göre invaziv ya da in situ olarak sınıflandırılır (20). Broder’in yaptığı orijinal tanımlamada in situ kanser; etraf stroma, doğal duktus ve alveolar sınırlara taşmamış kanser olarak değerlendirilmiştir (20). Ancak bu tanımın net olarak konması için multipl sayıda mikroskopik kesitlerin alınması ve incelenmesi gerekmektedir. 1941 yılında Foote ve Stewart lobuler (LCIS) ve duktal (DCIS) karsinoma in situyu birbirinden ayırmıştır (21). Mammografi kullanıma girmeden önce meme kanseri tanısı fizik muayene ile yapılmaktaydı ve in situ kanser oranı %6 iken, mamografinin kullanıma

	LCIS	DCIS
YAŞ	44-47	54-58
İNSİDANS*	%2-5	%5-10
KLİNİK BULGULAR	Yok	Ağrı, kitle, meme başı akıntısı
MAMMOGRAFİK BULGULAR	Yok	Mikrokalsifikasyonlar
PREMENOPOZAL	2/3	1/3
SENKRON İNVAZİV KARSİNOM İNSİDANSI	%5	%2-46
MULTİSENTRİSİTE	%60-90	%40-80
BİLATERALİTE	%50-70	%10-20

*mammografik olarak tanı almış meme lezyonlarından alınan biopsi spesimenlerinde (19)

Tablo 1: LCIS ve DCIS'a ait özellikler (12)

girmesi ve yaygınlaşması ile in situ kanser oranı %45’e yükseldi (6). Aynı kadranda ya da 5 cm’den daha yakın mesafede ikinci bir meme kanseri odağı bulunması multifokal, farklı kadrarlarda ya da 5 cm’den daha uzakta ikinci bir meme kanseri odağı bulunması multisentrik meme kanseri olarak tanımlanmıştır. LCIS’ta multisentrisite %60-90 arasında görülmekte iken

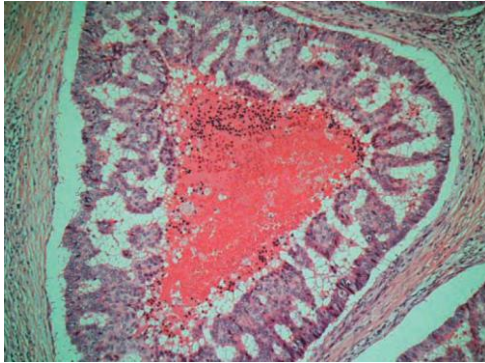
bu oran DCIS için %40-80 arası rapor edilmiştir. LCIS, %50-70 bilateral görülebilmekte iken, DCIS'ta bu oran %10-20 olarak raporlanmıştır (6).

Lobular ve duktal karsinoma in situ olgularına yönelik özellikler Tablo 1'de belirtilmiştir.

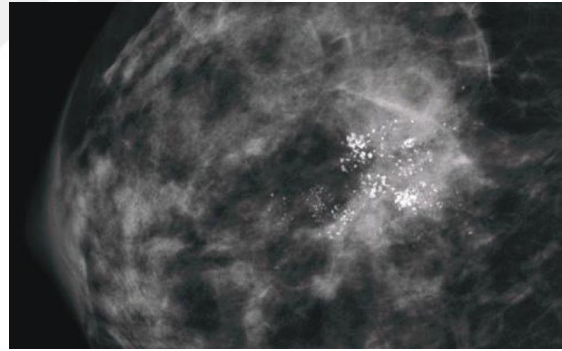
Duktal karsinoma in situ tanısı alan kadınlarda invaziv kanser gelişme riski 5 kat artmıştır (22). İnvaziv kanserler aynı memede ve sıklıkla aynı kadranda duktal karsinom olarak görüldüğünden DCIS, invaziv duktal meme kanseri için anatomik prekürsör olarak düşünülmektedir; ancak LCIS öyküsü olan kadınlarda invaziv kanser gelişme sıklığı %65'e kadar çıkmaktadır ve lobuler değil duktal karsinomlar izlenmektedir. Bu nedenle LCIS, invaziv kanser gelişimi için risk faktörü olmakla birlikte anatomik prekürsör olarak kabul edilmez (12).

b. İnvaziv Meme Karsinomları

Kaynaklandığı dokuya göre meme karsinomları lobular ya da duktal olarak sınıflandırılmaktadır. Önceden kullanılan klasifikasyonlarda LCIS ile ilişkili invaziv karsinom;



Şekil 9: Duktal karsinoma in situ mikroskopik kesit



Şekil 10: Duktal karsinoma in situ mammografik görünüm

invaziv lobular karsinom olarak sınıflandırılırken diğer tüm invaziv meme kanserleri duktal karsinom olarak adlandırılmakta idi, ancak mevcut histolojik sınıflandırmalarda özel tipler (meme kanseri olgularının %10'u) tanımlanmıştır.

Foote ve Stewartın yaptığı yayında da tariflenen sınıflama şöyledir;

- 1 – Memenin Paget hastalığı
- 2 – İnvaziv duktal karsinom(%80)
- 3 – Medüller karsinom(%4)
- 4 – Müsinöz karsinom(%2)
- 5 – Papiller karsinom(%2)

6 – Tubuler karsinom(%2)

7 – İnvaziv lobuler karsinom(%10)

8 – Nadir kanserler(adenoid kistik, skuamöz hücreli, apokrin) (21).

Memenin Paget hastalığı 1841 yılında tarif edilmiştir ve genellikle meme başının kronik egzematöz erüpsiyonu olarak ortaya çıkmakta ve bazen ülserasyona kadar ilerlemektedir. Genellikle DCIS ile ilişkili olup invaziv karsinoma ilerleyebilmektedir. Ayırıcı tanıya özellikle yüzeysel yayılım gösteren melanom girmektedir ve ayırım için immunohistokimyasal boyama yapılmaktadır. Melanomda S-100 antijeni, Paget hastalığında ise karsinoembriojenik antijen(CEA) pozitifdir (12). Cerrahi tedavi seçenekleri; meme başı-areola kompleksinin ne kadar geniş etkilendiğine ve DCIS varlığı ya da invaziv karsinom varlığına göre lumpektomi ya da mastektomi olabilir.

İnvaziv duktal karsinom tüm meme karsinomlarının %80'ini oluşturmaktadır ve mikroskobik ya da makroskobik aksiller lenf nodu metastazı, görüntüleme ile tanı konmuş vakaların %25'inde, semptomatik vakaların %60'ında görülebilmektedir (23). Yaşamın 5 ve 6. dekadında görülme sıklığı artmakta ve solid ele gelen kitle şeklinde ortaya çıkmaktadır. Fizik muayenede sınırları net olmayıp civar dokuya yıldızsı uzanımlar göstermektedir.

Medüller karsinom, meme kanserinin özel bir tipi olup tüm invaziv meme kanserlerinin %4'ünü oluşturmaktadır (6). Genel olarak kanser dokusu yumuşak ve kanamaya meyillidir. Kitle boyutlarında ani artış nekrozis ya da kitle içi kanamaya sekonder gelişebilir. Fizik muayenede derin yerleşimli ve büyük olarak palpe edilen lezyonlar oluştururlar. %20 vakada bilateral olduğu raporlanmıştır (23). %50 olgu DCIS ile ilişkili olup kanserin periferinde ortaya çıkmaktadır (12). 5 yıllık sürvi invaziv duktal ya da invaziv lobuler karsinom ile kıyaslandığında daha iyidir (6).

Müsinöz karsinom, meme kanserinin diğer bir özel türü olup tüm invaziv meme karsinomlarının %2'lik kısmını oluşturur. Tipik olarak yaşlılarda memede ele gelen büyük kitle olarak ortaya çıkar. Hücre dışı müsin havuzları ve bunların etrafında düşük dereceli kanser hücre birikimleri karakteristiktir. %90 üzerinde hormon pozitifler ve lenf nodu metastaz oranları %33 civarında görülmektedir. 5 yıllık sağkalım %73, 10 yıllık sağkalım %59 oranında görülür (24).

Papiller karsinom genellikle yaşamın 7. dekadında ve sıklıkla beyaz olmayan disproporsiyone kadınlarda görülür ve tüm invaziv meme kanserlerinin %2'lik kısmını oluşturur. Lezyonlar genellikle 3 cm'den küçüktür. %87 oranında östrojen reseptörü pozitifdir

(23). Aksiller lenf nodu yayılım oranları düşük ve sağkalım oranları müsinöz ve tubuler karsinomlara benzer konumdadır (25).

Tubuler karsinomlar da invaziv meme kanserlerinin %2'lik kısmını oluşturmaktadır ve geniş veri tabanlı bir çalışmada %94 östrojen reseptör ekspresyonu yönünden pozitif bulunmuştur (24). Hastalar perimenopozal ya da postmenopozal erken dönemde tanı almaktadırlar. Aksiller lenf nodu yayılımı %10 hastada görülmektedir ancak, bir ya da iki lenf nodu pozitifliği uzun dönem sağkalımı etkilememektedir ve %100'e yakındır (12).

İnvaziv lobuler karsinom meme kanserli olguların %10'unu oluşturmaktadır ve genellikle multifokal, multisentrik ve bilateral görülürler. Yavaş büyüme paterni ve belirgin mammografik görüntüleme özelliklerinin olmaması nedeniyle geç tanı alabilmektedirler ve %90'ın üzerinde östrojen reseptörü pozitifdir (24).

2.3.4. MOLEKÜLER SUBTİPLER

Meme kanseri değişik moleküler özellik gösteren, farklı morfolojilere sahip heterojen ve karmaşık bir hastalığı yansıtmaktadır (26). Çoğu hastaya erken dönemde tanı konabilmektedir ve bazıları için lokal tedavi yeterli olmaktadır. Ancak rekürrens riski olanlar ve metastatik hastalığa sahip olanların önceden tanınması ve bunlara yönelik tedaviler sağkalımı arttırmaktadır.

Rekürrens riski geleneksel olarak; tümör çapı, histolojik grade, lenf nodu tutulumu, östrojen reseptör durumu, progesteron reseptör durumu, insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) gibi klinikopatolojik özellikler değerlendirilerek belirlenmektedir (27). Yüksek riske sahip hastalar sistemik tedavi almakta ve bazı hastalar için bu fazla tedaviye sebep olabilmektedir. Yine düşük risk grubunda değerlendirilen hastalarda da nüks ya da metastatik hastalık gelişimi gözlenebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda tümör biyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar artmış ve hedefe yönelik tedavi ön plana çıkmıştır. Kanser moleküler yapısını anlamak verilecek tedaviye yanıtı anlamayı ve daha etkin tedavi sağlamayı olağan kılacaktır (27).

Perou, Sorlie ve arkadaşları gen ekspresyon profili ile meme kanseri olgularını 5 farklı moleküler sınıfa ayırmıştır; luminal A, luminal B, basal-like, HER2'den zengin, normal-like (29, 30). Takip eden çalışmalarda claudin-fakir adlı grup da bu sınıflamaya eklenmiştir (28). Bu sınıflamada tümörün östrojen reseptörü ve HER2 durumuna göre alt gruplar

oluşturulmuştur, ancak gruplar bu değişkenlerden bağımsız olarak farklı sağkalım oranları ve tedaviye yanıt oranları göstermektedir (29).

a. Luminal A ve Luminal B

Luminal A en yaygın görülen subtip olup, meme kanserlerinin %40-60'ını oluşturmaktadır (26). Bu tümörler baskın olarak ER+/PR+ ve HER2 negatiftir (30). Düşük histolojik grade ve Ki67 dahil olmak üzere proliferatif genlerin az seviyede ekspresyonu mevcuttur (30). Bu da luminal A ve B subtiplerinin diğer subtiplere oranla daha uzun sağkalım ve düşük oranda hastalık nüksü ile ilişkili olduğunu açıklamaktadır. (31).

Luminal B alt grubu meme kanserlerinin %15 kadarını oluşturmaktadır (26). Luminal A ile ortak özelliği yüksek seviyede lüminal sitokeratinler eksprese etmesi ve östrojen reseptörü pozitif olmasıdır ancak luminal A'nın aksine daha agresif ve prognozu daha kötüdür (26). Proliferatif gen ekspresyon seviyeleri (Ki67, siklin B1 vb.) luminal A'dan daha fazladır (30). Progesteron reseptör düzeyleri ve HER2 durumu ise değişiklik gösterebilir (30).

Sonuç olarak luminal A alt grubunda tedavi merkezinde antiandrojen terapi yer almakta ve kemoterapiye daha az yanıt söz konusudur. Luminal B'de ise antiandrojen tedavi yanıtı ER/+ olmalarına rağmen daha azdır ancak kemoterapiye yanıt daha ön plandadır (30).

b. HER2 zengin grup

Bu grup meme kanserlerinin %10 kadarını oluşturmaktadır (26). HER2 ve ilişkili genlerin ekspresyonu karakteristik olarak yüksektir. Proliferatif genlerin ekspresyonu ve genomik instabilite de yüksek seviyededir (32). HER2 hedefli ilaçların kullanımından önce kemosenitif olmalarına rağmen kötü prognoz ile ilişkili idiler (32). Micro-array ile HER2 zengin olduğu gösterilmiş olguların %70'inde protein aşırı ekspresyonu mevcuttur, %30 luk grupta HER2 histolojik olarak pozitif olup klinik olarak negatif olan %30'luk grupta anti-HER2 tedavinin etkisi net değildir (33).

c. Basal-Like grup

Bu tip meme kanserleri tüm meme kanseri olgularının %10-25'ini oluşturur ve yüksek oranda proliferasyon göstermektedir, ek olarak p53 mutasyonları yüksek oranda görülür (33). Östrojen, progesteron reseptörleri ve HER2 ekspresyonu yapmaz, klinik olarak tariflenen "triple-negative" meme kanserleri ile örtüşmektedir (33). Triple-negatif meme kanserlerinin %85'i basal-like alt grubuna girmektedir (33). BRCA1 meme kanserleri de bu grup ile

ilişkilidir. Bu kanserler kemoterapiye duyarlı olsa da, kötü prognozlu olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (27, 30).

d. Claudin-fakir grup

Meme kanseri olgularının %7-14'ü claudin 3,4,7 ve e-kadherin gibi hücreler arası bağlantı proteinlerini düşük oranda eksprese eder (27). Bu tümörler metaplastik ve medüller farklılaşma göstermekte ve büyük çoğunluğu triple-negatif meme kanseri olarak ortaya çıkmaktadırlar (33). Kötü prognozları olup, kemoterapiye yanıt açısından luminal ve basal-like meme kanserlerinin arasında kalmıştır.

e. Normal-like grup

Meme kanserlerinin %3-10'unu oluşturmaktadır ve yağ dokusu karakterinde gen ekspresyonu mevcuttur (34). Sıklıkla östrojen reseptörü pozitif olup, proliferatif gen ekspresyon oranı yüksek değildir. Bu sebeple luminal A grubu dışındaki tüm moleküler subtip meme kanserlerinden daha iyi yaşam süresi görülmektedir (30).

2.3.5. EVRELEME

Meme kanserinin klinik evresi memenin cildi ve dokusunun, koltukaltı, supraklavikular, internal mammarian lenf nodlarının fizik muayenesi ile belirlenir. Ancak, fizik muayenenin koltuk altı metastatik lenf nodlarını sa

ptamada doğruluk oranı %33'tür (35). Bu aşamada ultrason, tek başına fizik muayeneden daha sensitiftir ancak şüpheli ya da arada kalınan durumlarda ince-iğne aspirasyon biopsisi (İİAB) kullanılabilir; tek başına ultrason ile karşılaştırıldığında daha duyarlıdır (36).

Patolojik evreleme; çıkarılan meme dokusundaki kanserin ve alınan bölgesel lenf nodlarının patolojik bulgularını birleştirerek sonuç vermektedir. Fisher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Level 1 ve Level 2'nin dahil olduğu aksiller kürajda çıkarılan 10 adet lenf nodunun aksiller evreleme için aksiller metastazın belirlenmesinde yeterliği olduğu bulunmuştur (37).

Sıklıkla kullanılan sınıflama sistemi TNM (tümör çapı, lenf nodu tutulumu, metastaz varlığı) sistemidir. Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) bu sınıflamayı modifiye etmiştir (Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5). Tümör çapının da lenf nodu metastaz oranı ile ilişkili olduğu

bilinmektedir (6). Hastaliksız sağkalımın tümör çapı, koltukaltı lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6). 10-20 yıllık sağkalım oranlarının en önemli belirleyici faktörü tutulan lenf nodlarının sayısıdır (6). İnternal mammarian lenf nodlarının rutin biopsisi genellikle yapılmamakta, ancak alt seviye aksiller biopsi ya da internal mammarian lenf nodunu içeren “triple nod” biopsi yaklaşımında pozitiflik aynı seviyede prognostik önem ihtiva etmektedir (6). Sentinel lenf nodu diseksiyonundaki gelişmeler ve preoperatif yapılan lenfosintigrafiler sayesinde örneklenecek lenf nodlarının yerleri belirlenmekte, bu yaklaşımla internal mammarian lenf nodları da daha fazla örneklenmeye başlanmıştır. AJCC evreleme sisteminin 7. Edisyonunda internal mammarian lenf nodu da önem arz etmektedir (38). Santral ya da medial yerleşimli tümörlerde internal mammarian lenf noduna yayılımın daha sık olduğu saptanmıştır (6). Supraklavikuler lenf nodu yayılımı evre 4 kanser olarak kabul görmekten çıkmıştır ancak, bunun için skalen ya da supraklavikuler lenf nodu biopsisi endikasyonu yoktur (6).

Tx	Primer tümör değerlendirilemiştir.
T0	Primer tümöre ait kanıt yoktur
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör çapı 2cm'den küçüktür
T1mi	Tümör çapı 1mm'den küçüktür.
T1a	Tümör çapı 1mm ve 5mm arasındır
T1b	Tümör çapı 5mm ve 10 mm arasındır.
T1c	Tümör çapı 10mm ve 20 mm arasındır.
T2	Tümör çapı 2 cm ve 5 cm arasındır
T3	Tümör çapı 5 cm'den büyüktür.
T4	Herhangi bir tümör çapı ile birlikte göğüs duvarı ve/veya cilt invazyonu
T4a	Göğüs duvarı invazyonu varlığı
T4b	Ülserasyon ve/veya ipsilateral satellit nodül ve/veya ciltte ödem(peaud'orange)
T4c	T4a ve T4b bulgularının birlikteliği
T4d	İnflamatuar karsinoma

Tablo 2 Tümör çapının T evresi için değerlendirilmesi (38)

Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememiştir.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral level 1 ve 2 lenf nodlarında metastaz
N2	İpsilateral level 1 ve 2 lenf nodlarında metastaz(klinik olarak fikse) ya da ipsilateral internal mammarian lenf nodlarında metastaz
N2a	İpsilateral level 1 ve 2 lenf nodlarında metastaz(birbirine fikse olmuş)
N2b	İpsilateral level 1 ve 2 lenf nodlarında metastaz hariç internal mammarian nodlarda metastaz
N3a	İpsilateral infraklavikular lenf nodlarında metastaz varlığı
N3b	İpsilateral aksiller lenf nodları ve internal mammarian lenf nodlarında metastaz
N3c	İpsilateral supraklavikular lenf nodlarında metastaz

Tablo 3 lenf nodu evrelemesi (klinik değerlendirme) (38)

pNx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememekte
pN0	Histolojik olarak lenf nodu metastazı bulunamaması
pN0 (i-)	Histolojik olarak lenf nodu metastazı bulunamaması(immünohistokimya negatif)
pN0 (i+)	Bölgesel lenf nodlarında immünohistokimya ile saptanan 0.2 mm'den küçük malign hücreler
pN0 (mol-)	Histolojik olarak lenf nodu metastazı bulunmaması(RT-PCR ile negatif moleküler bulgular)
pN0 (mol+)	Klinik ve histolojik olarak lenf nodu metastazı saptanamayıp RT-PCR ile pozitif moleküler bulguların olması
pN1mi	0.2 mm'den büyük ve 2 mm'den küçük ya da 200 hücreden fazla (mikrometastaz) varlığı
pN1a	1-3 lenf nodunda en az birinde 2 mm'den büyük metastaz varlığı
pN1b	Klinik olarak saptanamamış ancak sentinel lenf nodu biopsisinde internal mammarian lenf nodlarında metastaz
pN1c	Klinik olarak saptanamamış ancak sentinel lenf nodları biopsisinde 1-3 lenf nodunda ve internal mammarian lenf nodlarında mikro ya da makrometastaz varlığı

pN2a	4-9 lenf nodunda metastaz varlığı(2 mm'den büyük en az bir tümör depoziti varlığı)
pN2b	Klinik olarak da saptanmış internal mammarian lenf nodlarında metastaz varlığı
pN3a	10 ya da daha fazla lenf nodunda metastaz varlığı ya da level 3 lenf nodlarına metastaz
pN3b	Bir ya da daha fazla metastatik lenf noduna eş olarak klinik olarak da saptanmış ipsilateral internal mammarian lenf nodunda metastaz; ya da klinik olarak saptanamamış ancak sentinel lenf nodu biopsisi ile saptanan 3'ten fazla aksiller lenf nodu metastazı ve internal mammarian lenf nodları metastazı birlikteliği
pN3c	İpsilateral supraklavikuler lenf nodlarında metastaz

Tablo 4 bölgesel lenf nodlarının evrelemesi(patolojik değerlendirme) (38)

M0	Klinik ya da radyolojik olarak ortaya konmuş uzak metastaz yok
cM0(i+)	Klinik ya da radyolojik olarak ortaya konmuş uzak metastaz bulunmaması ancak kanda, kemik iliğinde moleküler ya da mikroskopik olarak saptanmış tümör hücreleri mevcudiyeti; ya da bölgesel olmayan lenf nodlarında 0.2 mm'den küçük depozit varlığı
M1	Klinik veyahut radyolojik olarak tespit edilebilen uzak metastaz varlığı ya da histolojik olarak uzak dokuda 0.2 mm'den büyük tümöral yayılım

Tablo 5 uzak metastaz varlığına göre evreleme (38)

Evre 0	TIS	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
Evre 2A	T0	N1b	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N0	M0
Evre 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre 3A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre 3B	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre 3C	Herhangi bir T	N3	M0
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 6 TNM evre gruplaması (38)

2.3.6. MEME KANSERİNDE MULTİFOKALİTE VE MULTİSENTRİSİTE

Multifokal ya da multisentrik meme kanserleri; aralarında normal meme dokusu ile tamamen ayrı olmak kaydı ile iki veya daha fazla neoplazinin aynı memede senkron olarak bulunmasını kastetmektedir. Aynı kadranda bulunması halinde multifokal, farklı kadrarlarda bulunması durumunda multisentrik terimi kullanılmaktadır.

Bazı otörlere göre multifokal kanserler ya da odaklar arası beş santimetreden az olan kanserler aynı duktal toplama sisteminden kaynaklanmakta iken, multisentrik meme kanserleri ya da iki odak arası beş santimetreden fazla olan kanserler farklı duktal toplama sistemlerinden gelişmektedir. Bu durumda multifokal meme kanseri monoklonal kabul edilirken, multisentrik meme kanseri monoklonal kabul edilmemektedir (39). Ancak, genel olarak araştırmacıların çoğu multifokal ve multisentrik meme kanserlerini, kadrarlara belirlenmesinde anatomik sınırların net tarif edilememesi ve iki odak arası uzaklığın kesin değerinin önceden yanlış tahmin edilebilecek olması gibi nedenlerle, birlikte ele almaktadırlar (39).

Mammografik inceleme yöntemlerinin yaygınlaşması ve daha sensitif görüntüleme metodlarının kullanılmaya başlanması nedeniyle multifokal ve multisentrik meme kanseri görülme sıklığı giderek artmaktadır. Literatürde multisentrisite ve multifokalite prevalansı; çalışmalarda aynı standardizasyonun ve tanımlamanın olmaması nedeniyle %9'dan %75'e kadar geniş bir yelpaze göstermektedir (40).

Multisentrik ve multifokal meme kanserlerine tedavi yaklaşımı yıllar içerisinde değişiklik göstermektedir. 90'lı yıllarda yapılan çalışmalar ışığında mastektomi daha ön planda önerilmekte idi (41). Bunun sebebi; multisentrik ve multifokal kanserlerde meme koruyucu uygulanması durumunda lokal rekürrens 5 yıllık takip süresince %23-40'a kadar görülmesiydi. Lokal rekürrens kabul edilemeyecek kadar yüksek olması nedeniyle hastalara mastektomi önerilmekteydi. 2000'li yıllara gelindiğinde yapılan yeni çalışmalarda; uygun radyoterapinin de tedaviye eklenmesi ile güvenli cerrahi sınırlara ulaşan, aynı zamanda da uygun kozmetik sonuçlar elde edilen meme koruyucu yaklaşımda, lokal rekürrens oranının 6 yıllık takip süresince %3 ile %5.1 arasında olduğu bildirilmiştir (42). Ancak meme koruyucu cerrahi için uygun hastaların seçilememesi, tedavide bireysel yaklaşımların gözardı edilmesi başarı şansını azaltacaktır.

2.3.7. TEDAVİDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Meme kanseri ilk olarak eski Mısır papiruslarında memede tedavisi olmayan yara ve kütleler olarak bahsedilmiş ve sık görülmesi de geç evrelerde daha semptomatik olduğundan hekimler sistemik hastalık olarak kabul etmişlerdir (43).

Cerrahi teknikler güçlü bir şekilde gelişme göstermiş ve 19. yüzyılda birçok yönden uygulanabilir olmuştur. 1880'li yıllarda meme kanserinin modern tedavisinin ilk adımları atılmıştır. Halsted tarafından hastalığın her zaman sistemik olmadığı görülmüş ve cerrahi bir yaklaşım geliştirilmiştir. Halsted'in tariflediği mastektomide meme, en blok olarak pektoral kaslar, koltuk altı lenf nodları ve büyük ölçülerde cilt ile birlikte çıkarılmakta idi. Bu yaklaşım tedavi edici olduğundan 20. yüzyılın büyük bir kısmına kadar standart tedavi olarak kaldı. Ancak bu yaklaşımla hastalar postoperatif süreçte uzun dönemli ağrı ve hareket kısıtlılığı yaşamaktaydı. Bu sebeple, 1920'li yıllarda daha az zorlayıcı yaklaşımlar denendi. Örneğin; Frankfurt'tan bir jinekolojist olan Max Hirsch tümörün çıkarılmasının ardından dokuya radyoterapi uyguladığı büyük bir seriye sahipti (44). 1970'li yıllarda Halsted'in mastektomisi modifiye edilerek, pektoral kas rezeksiyona dahil edilmez oldu. Yine de, takip eden yıllarda daha konservatif yaklaşımlara ciddi ilgi gelişti (44).

a. Meme Koruyucu Cerrahi

İlk olarak; 1981 yılında yapılan bir randomize çalışmada Halsted mastektomi ile koltuk altı diseksiyonu ve kalan meme dokusuna tam doz radyoterapinin eklendiği meme koruyucu cerrahi karşılaştırılmış ve 2 cm altındaki tümörlerde sağkalımda bir fark olmadığı ortaya koyulmuş, hatta quadrantektomi yapılan grupta daha iyi estetik sonuçlar elde edilmişti (45). Milan'da yine aynı grup tarafından destekleyen devam çalışmaları yapılmış ve 2002'de Milan çalışmasının uzun dönem sonuçları yayınlanmıştı (46). 1985 yılında ise; Amerika'da Fisher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, evre 1 ve 2 meme kanserlerinde tümör çapı 4 cm'yi geçmeyen vakalarda daha konservatif bir yaklaşım olan lumpektomi ile kasın değil ancak fasyanın dahil edildiği mastektomi karşılaştırıldı, aynı zamanda Milan çalışmasındaki gibi her 3 levele yönelik aksiller diseksiyon değil, level 1 ve 2 aksiller diseksiyon yapıldı (47). Çalışma sonucunda lumpektomi kolundaki vakaların hastaliksız sağkalım ve toplam sağkalım oranlarının mastektomi kolundan daha kötü olmadığı ortaya kondu (47).

Bu çalışmaların doğrultusunda meme koruyucu cerrahi mastektominin önüne geçerek daha çok tercih edilen tedavi modalitesi olmuştur. Öyle ki; Amerika'da 1988'de erken evre meme kanseri nedeniyle mastektomi yapılma oranı %77 iken, 2004'te % 38'e düşmüştür (48). 2010 yılına gelindiğinde ise; Avrupa'da erken evre meme kanseri nedeniyle cerrahi tedavi gören kadınların sadece %18.6'sı mastektomi ile tedavi edilmiştir (49).

b. Sentinel Lenf Nodu Biopsisi

Sentinel lenf nodu biopsisi; tümör yakınına ya da meme başına enjekte edilen metilen mavisi ya da radyoaktif maddenin koltukaltında takip edilerek ilk drenajın olduğu lenf nodlarının bulunması ve bunların histopatolojik olarak çalışılmasını kapsar. Bu girişimin hipotezi sentinel lenf nodları durumunun hastalığın koltukaltına yayılım durumunu yansıttığıdır (44). Koltukaltı diseksiyonunun meme cerrahisinin ana yapıtaşlarından biri olmasının sebebi; 1980'li yıllarda çoğu hastada başvuru anında koltukaltı lenf bezi metastazı görülmesi ve aynı zamanda hastalığın N evresini belirlemede gerekli olmasıydı (50). Ancak koltukaltı diseksiyonu sonrası kalıcı lenfödem, hareket kısıtlılığı, ağrı gibi yaşamı etkileyen komplikasyonlar görülmekte idi. NSABP B04 çalışmasında koltukaltı diseksiyonu yapılmayan mastektomi hastalarında, yapılanlarla karşılaştırıldığında daha fazla ölüm ve uzak hastalık riskinin sözkonusu olmadığı belirtilmişti (51). 1990'lı yıllarda sentinel lenf nodunun aksillanın durumunu güvenilir şekilde tahmin ettiği gösterildi (52). 2005 yılında Milan'da yapılan 516 hastanın dahil edildiği çalışmada; SLNB sonrası standart aksiller küraj yapılan hastalar ve SLNB negatif bulunduğunda küraj yapılmayan hastalar 5 yıl sonra karşılaştırıldı; koltukaltında tekrar hastalık gelişimi açısından, uzak metastaz açısından ve sağkalım açısından farklılık yoktu (53). Ek olarak sadece SLNB yapılan grupta hareket kısıtlılığı ve kol ağrısı daha az görülmekte idi (53). Destekleyen çalışmalar sayesinde SLNB, koltukaltına standart yaklaşım halini aldı ve 2014 ASCO Rehberinde de SLNB negatif hastalarda koltukaltı kürajından kaçınılması gerektiği belirtildi.

Son yapılan çalışmalarda SLNB pozitif dahi olsa kürajın her zaman gerekli olmadığı gündeme geldi. IBCSG 23.01 çalışmasında; 5 cm'ye kadar olan tümöre sahip hastalar çalışmaya dahil edildi ve sonuçlarında sadece mikrometastaz varlığında, koltukaltı lenf bezi diseksiyonu yapmanın, yapmamaya bir avantajı olmadığı bildirildi (54). Z0011 çalışmasında da aksillada 1-2 lenf nodunda pozitif mikrometastaz olması durumunda kürajın güvenle atlanabileceği desteklendi (55). Ancak çalışmadaki çoğu hasta sistemik tedavi ve radyoterapi almıştı.

c. Palpe Edilemeyen Lezyonların Çıkarılması

Mammografi ve meme ultrasonunu kullanımının yaygınlaşması ve kadınların meme kanseri konusunda bilinçlenmesi ile meme kanserine daha erken tanı konmaya başlanmış ve tanı anında lezyonun henüz palpe edilemediği olguların sayısı artmıştır (44). Bu hastalara yaklaşım açısından; telle işaretli eksizyon, karbon işaretleme ve ROLL (radioguided occult lesion localization) gibi seçenekler gündeme gelmiştir (44).

ROLL ilk olarak 1996 yılında Milan'da Avrupa Onkoloji Enstitüsü'nde tarif edilmiştir. Ultrason(US) ya da mamografi (MMG) kontrolünde radyonüklid madde, lezyonun merkezine enjekte edilir. Cerrahi sırasında gamma prob kullanılarak işaretlenen lezyonun yeri tespit edilir ve bu bölge eksize edilir. ROLL tekniğinin, karbon işaretleme ve telle işaretleme göre daha avantajlı olduğuna dair çalışmalar yayınlanmıştır (56). ROLL, sentinel lenf nod biopsisi ile birlikte uygulandığında SNOLL olarak isimlendirilmiş ve lezyon santraline, tümör lokalizasyonu amacıyla radyonüklid enjeksiyonuna ek olarak peritümöral alana da radyonüklid enjekte edilip oluşan mikro-agregatların koltukaltı lenf bezlerine ulaşması ardından gama prob ile sentinel lenf nodunu bulma hedeflenmiştir.

d. Cilt Koruyucu ve Meme Başı Koruyucu Mastektomiler

Mastektomi; büyük, multisentrik tümörlerde, küçük meme volümü olan orta boyutlu tümörlerde, meme koruyucu tedavi sonrası gelişen rekürrenslerde ve diffüz intraepitelyal neoplazilerde standart tedavi olarak uygulanmakta (44). Cilt koruyucu mastektomilerde ise meme dokusu tamamiyle çıkarılmakta ancak üzerindeki cildin büyük bir kısmı korunarak eş zamanlı rekonstrüksiyona olanak sağlamaktadır ve onkolojik açıdan güvenli olduğu kabul edilmiştir (57). Ek olarak ikinci seans rekonstrüksiyonlar ile karşılaştırıldığında maliyetin daha iyi olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (57). Ancak meme başının olmamasının kimi hastalarda kozmetik açıdan memnuniyetsizliğe sebep olması, meme başının korunduğu cilt koruyucu mastektomileri gündeme getirmiştir. Bu teknikte meme başı altındaki küçük bir meme dokusu kanlanmanın devamı amacıyla bırakılmakta bu da retroareolar rekürrens riskini az da olsa arttırabilmektedir ki; bu nedenle multaka intraoperatif olarak areola arkasından frozen gönderilmektedir (44).

e. Radyoterapi

Cerrahi sonrası geride kalan meme dokusuna radyoterapi verilmesi meme koruyucu cerrahinin ana bileşenlerindedir (44). Bu konuda yapılan eski çalışmalarda radyoterapinin yapılmamasının lokal rekürrensi arttırdığı, ancak sağkalıma etkisinin olmadığını bildirilmişti (58).

Son zamanlara kadar standart tedavi; tümör yatağına 10 Gy destek sonrası iki tanjansiyel ışın şeklinde 5-7 hafta devam eden 50 Gy radyoterapi verilmesi idi. Ancak 2008 ve 2010'da büyük ölçekli yapılan çalışmalarda 3 hafta boyunca 40 Gy radyoterapi uygulanan hipofraksiyone rejimlerin geleneksel rejimlere oranla rekürrenste ve geç yan etkilerde bir farkının olmadığı gösterildi (59).

Düşük fraksiyonlu radyoterapiyi destekleyen yayınlar çoğalırken, görüntüleme ve bilgisayar sistemlerindeki tekniğin de gelişmesiyle, üç boyutlu radyoterapi ve yoğunluk ayarlamalı radyoterapi gibi ileri düzey radyoterapi modaliteleri geliştirilmeye başlandı. Bu teknikler ile ışın komşu dokulara daha az etki gösterip daha az toksisiteye sebep olmakta, kısıtlı ve daha doğru hedeflenen bir alana daha yüksek doz radyoterapi uygulanarak etkinliği arttırılmaktadır (44). Ancak uzun dönemli sonuçların incelendiği daha fazla yayına ihtiyaç vardır.

f. İntraoperatif Radyoterapi

Meme kanseri nedeniyle çıkarılan meme dokusunda okült odaklar görülse bile, cerrahi sonrası lokal rekürrenslerin %85'e yakını skar bölgesinde gelişmektedir (44). Bu bulgular eşliğinde çoğu hastada sadece tümör yatağının ışınlanması yeterli gözükmemektedir. Hatta bu radyasyon tek bir seansta verilebilirse, geleneksel ışın tedavisinin yan etkilerinin azalacağı, hastanın hayat koşullarını büyük ölçüde etkilemeden tedavi edici olabileceği düşünülmektedir (44). Bu avantajlardan dolayı Avrupa Onkoloji Enstitüsü'nde 20 Gy radyasyonun birkaç dakika içinde uygulanabildiği intraoperatif radyoterapi (İORT) tekniği geliştirilmiş ve 1305 vakanın dahil edildiği bir çalışma yayınlanmıştır (60). Bu çalışmada, meme kanseri 2.5 cm'yi aşmayan kadınlarda tüm memeyi ışınlama ve İORT karşılaştırılmıştır. Median 5.8 yıl sonra İORT kolundaki hastalarda ipsilateral rekürrens daha fazla görülmüş, ancak sağkalımda fark görülmemiş, deride görülen yan etkiler ise daha az ortaya çıkmıştır (60). Ipsilateral rekürrensi belirleyen faktörler olarak; tümör çapı, grade ve moleküler subtip gösterilmiş ve sonuç olarak

uygun hastalara İORT uygulanabileceği ancak patolojik inceleme sonrasında kısa dönem tüm memeye ışın tedavisi uygulanmasının önerildiği belirtilmiştir (60).

Takip eden dönemde, 50Gy'ye kadar çıkan İORT ve sonrasında düşük doz eksternal ışın tedavisi ile devam eden çalışmalar planlanmıştır (61).

g. Hormonoterapi

19. yüzyılın başlarından beri bilateral ooferektomide olduğu gibi, hormonal durum değiştiğinde meme kanserinde de remisyonun sağlandığı bilinmektedir (44). 1971'de bir oral kontraseptif olarak sunulan tamoksifenin ileri evre meme kanserinde kalıcı remisyonu arttırdığını gösteren ilk çalışma yapıldı (62). İleri evre meme kanserinde kullanılmaya başlansa da, erken evre meme kanserlerinde kemoterapiye ek olarak verilen tamoksifenin östrojen reseptörü pozitif vakalarda sağkalımı arttırdığı gösterildi (63). Takip eden yıllarda tamoksifen uygulanım süresi 5 yıla kadar uzatıldığında, rekürrensi ve mortaliteyi daha etkin bir şekilde azalttığı gösterildi (64), ancak tamoksifenin endometrium ve diğer dokularda östrojen reseptör agonisti olarak etki etmesinden dolayı 2 yıllık uygulamanın endometrium kanseri riskini 2 kat arttırdığı, 5 yıllık uygulamada 4 kat arttırdığı bildirildi.

2014 ASCO (American Society of Clinical Oncology/ Amerikan Klinik Onkoloji Topluluğu) kılavuzuna göre östrojen pozitif hastalığı olan kadınlara; 5 yıl kullanıma göre daha düşük rekürrens ve kontralateral meme kanseri oranı olmasından dolayı, kar zarar hesabına göre; endometrial kanser, uterin kanser, derin ven trombozu gibi yan etkilerine rağmen 10 yıl tamoksifen kullanımı önerilmektedir.

Androjenin östradiole dönüşümünü sağlayan aromataz enzimini inhibe eden ajanlar ile östrojen seviyelerinin postmenapozal kadınlarda azaldığı gösterilmiştir. Perimenapozal kadınlarda ise tek başına aromataz inhibitörlerinin östrojenin etkilerini azaltmada etkili olmadığı, bu ajanlara ek olarak overyan supresyon yapılması gerektiği bildirilmektedir (65). Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki; aromataz inhibitörleri kullanıldığında meme kanseri rekürrensi, hem aynı memede hem de karşı memede azalmaktadır; uzak metastaz riskinde de azalma sağlanmaktadır (66). Hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinde, üçüncü kuşak aromataz inhibitörlerinin (anastrozol, letrazol) tamoksifen ile karşılaştırıldığında daha etkin olduğu ve yan etkiler açısından daha güvenli olduğu bildirilmiştir (67). Olumlu etkilerine karşın aromataz inhibitörlerinin menapozal semptomları ağırlaştırması, kardiovasküler hastalıkları

arttırması ve kemiklerin zayıflamasına ve fragil kırıklara neden olması, istenmeyen etkileri arasındadır (68).

Tamoksifenin yaygın kullanımının yanı sıra daha güncel bir östrojen reseptör düzenleyici olan raloksifen ile ilgili çalışmalar da yapılmış ve daha az tromboembolik olay ile ilişkili olduğu ve endometriyal kanser gelişim riskini tamoksifenden daha az arttırdığı, ancak tamoksifenin meme kanserini önlemede daha potent olduğu bildirilmiştir (69).

h. Kemoterapi

Metastatik meme kanserinde sitotoksik ajanların kombinasyonu 1960'lı yıllarda kullanılmaya başlandı. Bernard Fisher ve Gianni Bonadonna 1970li yıllarda adjuvant tedavi olarak kemoterapi uygulamaya başladı (44). Bonadonna'nın çalışmasında 5 yıllık sonuçlara göre kemoterapi (metotreksat, siklofosomid, fluorourasil kombinasyonu) verilen grupta mastektomi kolu ile karşılaştırıldığında daha uzun hastalısız sağkalım ve yine daha uzun toplam sağkalım oranları mevcut idi. Takip eden yıllarda neo-adjuvant tedavinin de gündeme gelmesi ile meme koruyucu cerrahi oranları ciddi oranda arttı. Ancak onkologların da farkında olduğu; kusma, bulantı, saç dökülmesi, ağrı, kilo kaybı ya da aşırı kilo alımı, kemik iliği baskılanması gibi yan etkiler sıkça görülebilmektedir.

i. İmmünoterapi

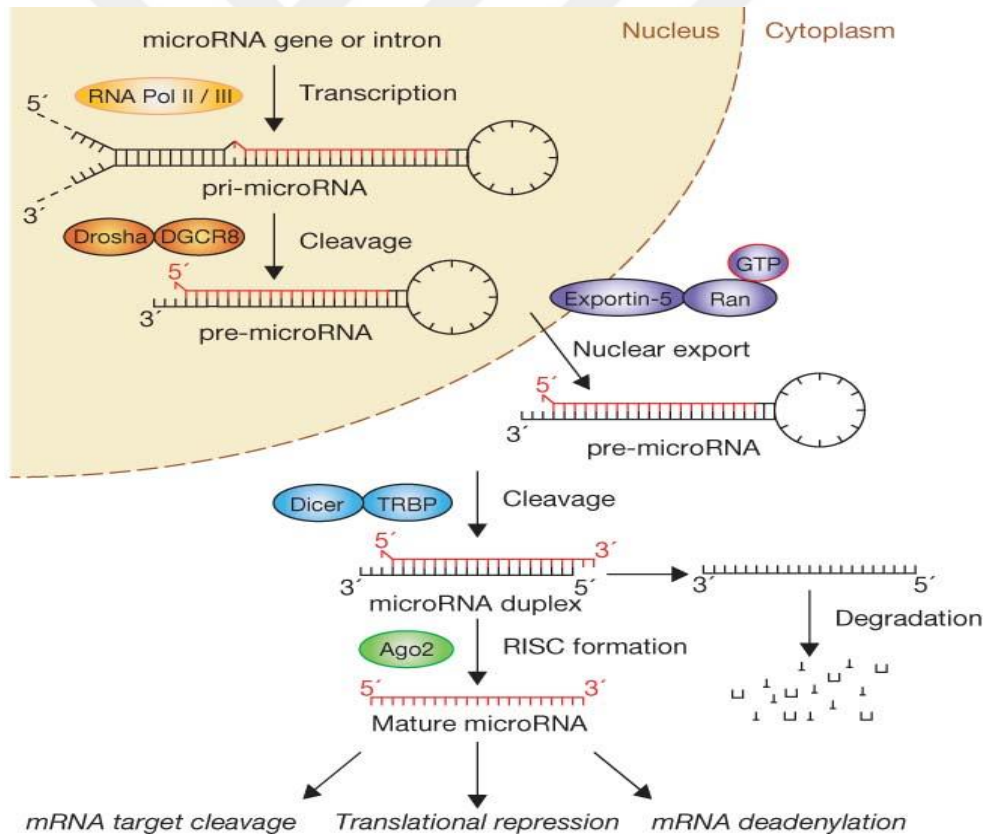
İlk başarılı immünoterapi ajanı monoklonal HER2 antikoru olan trastuzumabtır. HER2 erken evre meme kanserinde hücrelerin membranlarında %20 kadar aşırı eksprese olmakta ve mitojenik sinyal yollarında rol almaktadır, aynı zamanda kötü prognoz ile de ilişkilidir (44). 2000'li yıllarda trastuzumab ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmış ve HER2 aşırı ekspresyon yönünden yüksek pozitifliğe sahip kanser vakalarında kemoterapiye ek olarak uygulanmıştır. Ancak özellikle antrasiklinli rejimler ile uygulandığında kardiyotoksisite ciddi problem oluşturmakta idi. Bu sebeple ideal tedavi süresini belirlemeye yönelik çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda HER2 pozitif hastalıkta en uygun sürenin 1 yıl olduğu gösterildi (70).

2012 yılında FDA (Food and Drug Administration/Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onay alan bir diğer insan monoklonal HER2 antikoru da pertuzumab oldu. Pertuzumabın, HER2 pozitif hastalığı olan olgulara trastuzumab ve docetaxele ek olarak uygulandığı "CLEOPATRA" çalışmasında; pertuzumab kolunda toplam sağkalımın 15,7 aylık

median uzama sağlandığı gösterildi, ancak ishal, mukozal inflamasyon, febril nötropeni, kuru cilt döküntüleri gibi yan etkilerin daha fazla görüldüğü bildirildi (71).

2.4. MİKRO-RNA'LAR

1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ın larval gelişimiyle ilgili yapılan çalışmalarda, Lee ve ark. tarafından keşfedilen miRNA'ların, *C. elegans*'ta bulunan heterokronik gen *lin-4*'ün 22 ve 61 bazlık protein kodlamayan RNA çiftini kodladığı ve bu kısa RNA dizilerinin *lin-4*'ün 3'UTR'sindeki bazı tekrar dizilerle komplementer olduğu ve *lin-4*'ün *lin-14* proteinini negatif olarak düzenlediği bulunmuştur (72). 2001 yılında *Science* dergisinde bu küçük kodlanmayan düzenleyici RNA'lar ilk defa "mikroRNA" olarak isimlendirildi (73). MikroRNA'lar (miRNA) 19-25 nükleotid uzunluğunda endojen, tek zincirli, endojen, protein kodlaması yapmayan kısa RNA dizileridir (74).

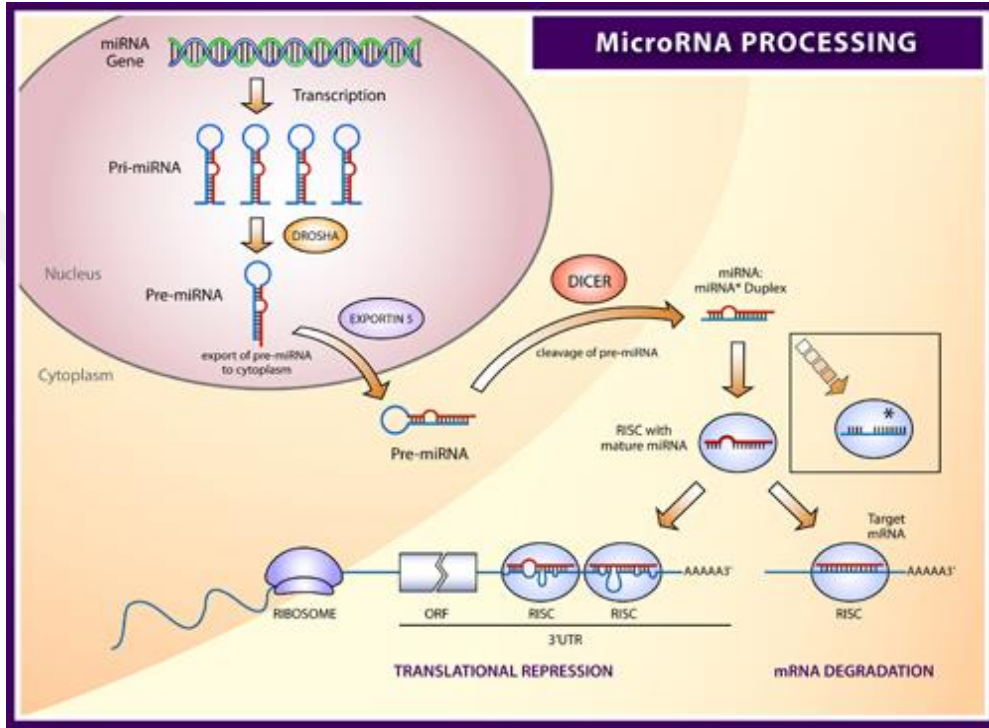


Şekil 11 microRNA sentezi

Yaklaşık 2 kb uzunluğunda pri-miRNA adı verilen uzun nükleotid dizileri şeklinde transkribe edilirler. Nukleusta Drosha ve çift iplikli RNA bağlayıcı protein DGCR8 tarafından

işlenerek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda, saç tokası şeklinde pre-miRNA'lar oluşturulur (Şekil 11).

Drosha ve Pasha enzim aileleri tarafından pre-miRNA haline dönüşümleri sağlanan bu miRNA'lar eksportin-5 enzimi aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Dicer'lar aracılığıyla RISC'e (RNA Inducing Silencing Complex) dâhil olarak mRNA'nın translasyonunu inhibe ederler (Şekil 12) (75).



Şekil 12 microRNA etki mekanizması

Kodlama yapan genlerin ekspresyonunu düzenlemek için, hedef genlerin mRNA'larının 3'-translasyona uğramayan bölgeleri (3'UTR) içerisinde bulunan komplementer nükleotid dizilerine bağlanırlar. MikroRNA'ların bağlanma özgülüğü; miRNA'ların 5'ucunda bulunan 7 nükleotidlik bölgenin hedef m-RNA'daki 3'-translasyona uğramayan komplementer baz eşleşme bölgesine, bağlanma bölge sayısına ve bağlanma bölgelerinin serbest enerji durumuyla belirlenen uygunluğuna bağlıdır (76).

MikroRNA'ların hedef mRNA'ya bağlanması, mRNA parçalanması veya translasyon ve protein sentezinin inhibisyonuyla hedef genlerin azalmış ekspresyonuna yol açar. miRNA'lar genelde hedef mRNA'nın 3'UTR'sine bağlanırlar. Ya hedef mRNA'yı degrade ederek, ya translasyonu bloke ederek, ya da her ikisini birden yaparak post-transkripsiyonel gen

düzenlenmesini indüklemeye yeteneğindedirler (77). Ayrıca inhibitör miRNA'ların azalmış ekspresyon seviyesi direkt olarak artmış hedef gen ekspresyonuna yol açabilmektedir (76).

miRNA'lar hücrel diferansiyasyon, proliferasyon, apoptozis, eritropoez, fibrozis, angiogenez, immunité gibi birçok hücrel ve biyolojik olaylarda rol oynamaktadır (78). MikroRNA'lar insan genomunda yer alan tüm genlerin % 2'sinden fazlasını oluşturmakta ve insan genomundaki 23000 civarındaki genin üçte birinin bu düzenleyiciler tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Ayrıca, miRNA'ların her biri 1000'den fazla hedef gene sahipken; her bir protein kodlayan gen de çok sayıda miRNA tarafından düzenlenmektedir (79). Özgül miRNA'ların ekspresyonunu düzenleyen birçok transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (80).

MikroRNA'ların çoğu doku, hücre ve/veya hastalığa spesifik tarzda eksprese olduğundan, onların ekspresyon paternleri altta yatan patofizyolojik olayları yansıtmaktadır (81). MikroRNA'lar genellikle polisistronik olarak sentez edilirler. Bu güne kadar miRBase (www.mirbase.org) veritabanına göre 2000 civarında insan miRNA geni tanımlanmıştır (82). Bunlardan bazıları onkogenik (mir- 17-92 ve mir-21) ve tümör baskılayıcı genler (let-7/mir-98 ve mir-141/200) olarak da sınıflandırılabilirler (83).

MikroRNA'ların ekspresyon profillerinin farklı kanser tiplerinde farklılıklar gösterdiği ve kanser oluşum süreçlerinde rol oynadıkları anlaşılmaktadır. Birçok kanser türüyle yapılan genomboyu çalışmalar miRNA'ların kanser gelişimi ve ilerlemesiyle direkt olarak ilişkili olabileceğini de göstermektedir (84). Kromozomların kırık bölgesi yakınında bulunan miRNalar ve malign dokularda bu genlerin ekspresyon düzeyindeki değişiklikler, kanser ile kurulan bağlantıyı desteklemektedir (85) MikroRNA'ların kanser oluşumundaki rolünün anlaşılması onların tedavide kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur. MikroRNA'ların tedavi amaçlı kullanılabilmesi için genomik organizasyonlarını, biyogenezini, hedef molekölü tanıma mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak bilmek gerekmektedir.

2.4.1 MİKRO-RNA'LAR VE MEME KANSERİ

Yapılan çalışmalar doğrultusunda meme kanseri olgularında miRNA'ların, onkogen susturma, metastazı tetikleme ya da baskılama, kemoterapiye direnç kazandırma yolları ile etkili olduğu gösterilmiştir (86).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda; miR-7, miR-17/20, miR-30, miR-31, miR-126, miR-146a/b, miR-183, miR-193b, miR-205, miR-206, miR-335, miR-339-5p ve let-7'nin metastazı baskılayıcı, miR-10b, miR- 141, miR-200a/b/c, miR-429 ve miR-661'in metastazı

hem baskılayıcı hem de tetikleyici, miR-9, miR-17-92, miR-21, miR-27b, miR-29a, miR-155, miR-210, miR-373, miR-378, miR-520c ve miR-520h'nin ise metastazı tetikleyici özellikle olduğu belirlenmiştir (87). Onkogenik başlıca mikroRNA'lar ise miR-206, miR-17-5p, miR-125a/b, miR-200, let-7, miR-34a ve miR-31 tümör baskılayıcı, miR-21, miR-155, miR-10b ve miR-373/520c olarak belirtilmiştir (88).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında unifokal ve multisentrik meme kanseri hastalarında ekspresyon düzeylerinde farklılık olabileceği düşünülen 84 mikroRNA geninin kantitatif olarak tespit edilmesi, hastalara ait diğer laboratuvar ve klinik bulgularla birlikte değerlendirilerek, meme dokusuna özgül, tedavide biyobelirteç olarak kullanılabilen mikroRNA'ların tespiti amaçlanmıştır. Çalışmanın hem kendi içerisindeki tutarlılığının ortaya konması ve hem de elde edilecek sonuçların kalitesi açısından 6 ayrı housekeeping gen ve 2 adet de kontrol geni kullanılarak çalışmanın her aşaması 4 kez tekrar edilmiştir.

3.1. Vakaların çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. 18 yaş üstü olma
2. Serum serbest betaHCG değeri ile verifiye edilen gebe olmama durumu
3. Daha önceden meme cerrahisi geçirmemiş olma
4. Başka bir malignite öyküsüne sahip olmama
5. Aktif emzirme öyküsü olmama
6. Histopatolojik olarak verifiye edilen meme kanseri tanısı alma
7. Çalışmayı anlayıp kabul edecek bilinç düzeyi veya cezai ehliyet sahibi olma
8. Çalışmaya katılmak için onam vermiş olma
9. Neoadjuvan tedavi almamış olma
10. Çalışmaya katılan vakaların hastalık evresine göre cerrahi tedavi endikasyonu olması

3.2. Vakaların çalışmaya alınmama/çalışmadan çıkarılma kriterleri

1. 18 yaşını doldurmamış olma
2. Serum serbest betaHCG değeri ile doğrulanan gebelik durumu olması
3. Daha önceden meme cerrahisi öyküsü olması
4. Başka bir malignite öyküsüne sahip olma
5. Aktif emzirme öyküsü olma
6. Histopatolojik olarak meme kanseri tanısı olmaması
7. Çalışmayı anlayıp kabul edecek bilinç düzeyi veya cezai ehliyeti olmama
8. Çalışmaya katılmak için onam vermemiş olma
9. Neoadjuvan tedavi almış olma
10. Hastalık evresine göre cerrahi dışı tedavi endikasyonu olması

3.3. Kullanılan cihazlar

- Buzdolabı (+ 4 °C Bosch)
- Derin Dondurucu (-20 °C Bosch)
- Derin Dondurucu (-80°C Thermo Scientific)
- Çeker Ocak (TEZSAN)
- Derin dondurucu -80 derece (Thermo)
- Etüv (Nüve)
- Güç kaynağı (Stratagene)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Isı bloğu (Fisher scientific model111004)
- Soğutmalı santrifüj (Bechman Coulter)
- Masaüstü mini santrifüj (Nüve)
- Spektrofotometre (NanoDrop2000)
- Light Cycler 480 RT- PCR (Roche)
- PCR cihazı (Thermal Cycler) (BioRad)
- Otomatik pipetler (Gilson) (Eppendorf)(Thermo)
- PH metre (Corning)
- Laminar kabin (Hepa filtreli) (Thermo, Scientific)
- İnkübatörler (37°C - 56°C Elektro Mag ve Nüve)
- Orbital çalkalayıcı (Thermo, Scientific)
- Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL, Thermo)
- Güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
- Mikrodalga fırın (Bosch)
- UV transilluminator (BioRad UV/White light)

3.4. Hasta örneklerinin toplanması

Çalışmaya 2013-2015 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı, Meme Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran, meme kanseri semptom ve bulguları açısından değerlendirilerek histopatolojik olarak invaziv meme karsinomu tanısı alan, aksilla dışında metastaz yapmamış olan ve görüntüleme modalitelerince multisentrik olduğu değerlendirilen 26, ve unifokal olarak değerlendirilen 31 hasta dahil edilmiştir.

Katılımcılara sözlü olarak araştırmanın kapsamı hakkında bilgi verildikten sonra yazılı onam alınmıştır. Çalışmanın etik ilkelere uygunluğu Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş, etik onam ve Bezmialem BAP desteği alınmıştır (Tarih: 27.11.2013 / Sayı: 1306642/050/01/04/231).

Çalışmaya dahil edilen vakalarda, eksizyon yapıldıktan hemen sonra formol uygulanmaksızın, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalında, her defasında aynı patolog tarafından unifokal kanserli olguların piyeslerinde tümörden ve sağlıklı meme dokusundan, multisentrik kanserli olguların piyeslerinde en büyük lezyondan, doku almaya uygun en uzaktaki ikinci odaktan ve sağlıklı meme dokusundan örnekler alınmıştır. Örneklenen dokular numaralandırılmış ve "RNA later" solüsyonu içerisinde derhal İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı'na soğuk zincirde ulaştırılmıştır. Örnekler çalışma yapılana kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

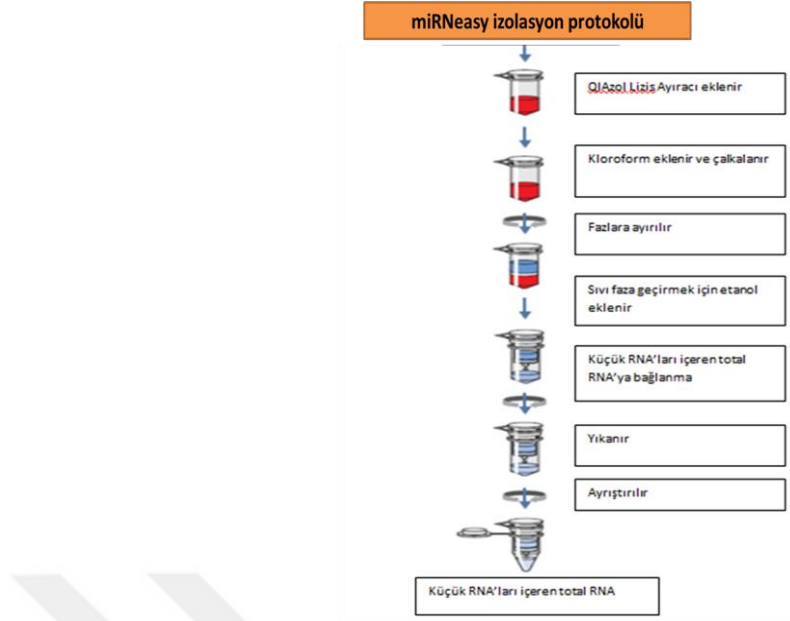
3.5. Doku Homojenizasyonu ve RNA izolasyonu

- Dokular -80°C'den çıkarılıp, buz üzerinde çözülmeye bırakıldı.
- Dokular homojenizasyon için pens yardımıyla homojenizasyon tüpüne ("bead"li tüplere) aktarıldı ve üzerlerine ortalama 100 µg. doku için 600 µl. Tissue Lysis Buffer eklendi.
- Tüpler soğutmalı homojenizatörde 6500 speed'de 1 dakika homojenize edildi.
- Homojenizatörden çıkarılan tüpler coldblockta 3-5 dakika (köpükleri gidinceye kadar) bekletildi.

3.6. Qiagen miRNeasy Kit ile miRNA izolasyon basamakları

Toplanan doku örneklerinden Qiagen miRNeasy Kit (Cat. No 217184, QIAGEN, gMBh, D-40724 Hilden, Germany) ile Kit protokolüne uygun olarak total RNA ve miRNA izolasyonu yapıldı (Şekil 13). İzolasyon protokolü aşağıdaki gibidir:

- Homojenize edilmiş olan her bir örneğin üzerine 1ml QIAzol Lysis Buffer eklendi ve vortekslendi.
- Oda sıcaklığında (15-25 °C) 5 dk. inkübe edildi.
- 3,5 µl miRNeasy Spike-In Control eklendi.
- Üzerine 400 µl kloroform eklendi ve 15 saniye çalkalandı.
- Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.
- 12,000×g'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
- Üst faz alındı ve yeni ependorflara transfer edildi. Yeni ependorflara alınan örnek miktarlarınının 1.5 katı kadar 100% etanol eklendi ve pipetleme yapıldı.
- 700 µl örnek alındı ve RNeasy MinElute spin column içine aktarıldı ve 8000×g de 15 saniye santrifüj yapıldı. Koleksiyon tüpleri atıldı ve spin kolon yeni koleksiyon tüplerine alındı. Bu işlem kalan örnekler için de tekrarlandı.
- 700 µl RWT solüsyonu eklendi ve 8000×g de 15 saniye santrifüj yapıldı, koleksiyon tüpleri atıldı ve spin column yeni koleksiyon tüplerine alındı.
- 500 µl RPE solüsyonu eklendi ve 8000×g de 15 saniye santrifüj yapıldı, koleksiyon tüpleri atıldı ve spin column yeni koleksiyon tüplerine alındı.
- 500 µl 80% etanol eklendi ve 8000×g de 2 dakika santrifüj yapıldı, koleksiyon tüpleri atıldı ve spin column yeni koleksiyon tüplerine alındı.
- RNeasy MinElute spin column 2 ml'lik yeni koleksiyon tüpüne alındı ve maximum hızda 5 dakika santrifüj yapıldı, koleksiyon tüpleri atıldı ve spin column 1.5 ml'lik ependorf içine alındı.
- 14 µl RNase-free dH₂O spin column membranının ortasına eklendi ve maximum hızda 1 dakika santrifüj yapıldı.
- İçerisinde RNA olan ependorflar -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil 13: Qiagen miRNeasy Kit ile miRNA izolasyon basamakları (119)

Elde edilen Total RNA ve miRNA örneklerinin konsantrasyon ölçümü için NanoDrop II spektrofotometre kullanıldı.

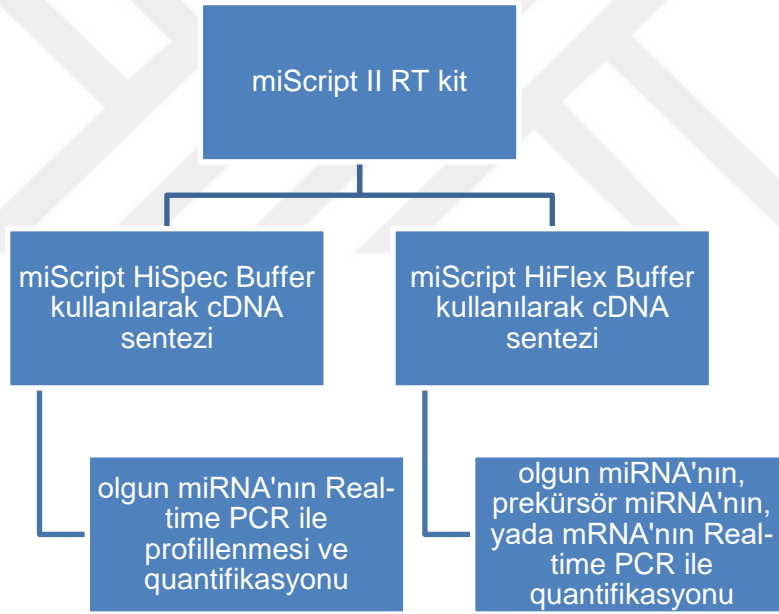
3.7. NanoDrop II Spektrofotometre ile RNA konsantrasyon ölçüm protokolü

- Cihazın ölçebileceği uygun konsantrasyon aralığı 2-15000 ng/ μ l'dir.
- 1 μ l Rnase-DNAse free dH₂O NanoDrop cihaz kaidesi (optik yüzey) üzerine pipetlendi ve bilgisayardaki program analiz başlatıldı.
- 1 μ l örnek için kullanılan elution buffer NanoDrop cihaz kaidesi (optik yüzey) üzerine pipetlendi ve blank alındı.
- RNA örneğinden 1 μ l alınarak optik yüzey üzerine pipetlendi.
- Cihazın bilgisayarına ait program ile örnekler 260, 280, 230 nm dalga boylarında okundu.
- Ölçüm esnasında her seferinde bir sonraki ölçüme geçmeden önce optik yüzey temizlendi.
- Ölçüm tamamlandıktan sonra değerler ayrı bir klasöre kaydedildi ve optik yüzey üzerine 1 μ l Rnase-DNAse free dH₂O bırakılarak cihaz kapatıldı.
- RNA'lar konsantrasyonları 100 ng/ μ l. olacak şekilde dilüe edildi. İzole edilen RNA'lar çalışma yapılana kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.8. Qiagen miSCRIPT II RT kit ile cDNA sentez prosedürü

cDNA sentezine başlamadan önce:

- miScript-II-RT-Kit içinde 2 çeşit buffer bulunmaktadır: 5X miScript HiSpec Buffer ve 5X miScript HiFlex Buffer. Reverse Transkripsiyon işlemi sırasında bu bufferlardan sadece biri kullanılır (Şekil 14).
- 5X miScript HiSpec Buffer Kullanımı: Eğer PCR array ve quantifikasyon çalışmaları yapılacaksa, cDNA sentezi bu buffer kullanılarak yapılmalıdır (Tablo 7).
- Bu protokol için, 5X miScript HiSpec Buffer kullanılarak 10 pg–2 µg arası cons. RNA'dan cDNA sentezi yapılabilir.
- 5X miScript HiSpec Buffer kullanılarak hazırlanan cDNA'dan, Real-Time PCR işlemi yapılacaksa miScript miRNA PCR Arrays kullanılmalıdır.



Şekil 14: miScript II RT kit uygulama şeması (119)

3.9. Qiagen miSCRIPT II RT cDNA protokolü

- Template RNA buz üzerinde 5-10 dk. bekletildi,
- 10X Nucleics mix ve 5X miScript Hispec Buffer veya 5X miScript Hiflex Buffer'ı oda sıcaklığında (15-25°C) 5-10 dk bekletildi.
- Reverse Transcription Mastermix hazırlandı.

- Reverse Transcription Mastermix, template RNA dışında ilk zincir cDNA sentezi için gerekli olan bütün komponentleri içerir.
- Not: miScript RT mix, master mix'in hazırlanmasından önce -20°C'den alınmalıdır ve buzda bekletilmelidir.
- RT Mastermix içeren her tüpe template RNA'dan eklendi.
- Yavaşça karıştırıldı ve santrifüj edildi. Buzda bekletildi.
- 37°C'de 60 dk inkübe edilir.
- miScript RT mix'i 95°C'de 5dk inkübe ederek inaktif hale getirilir.

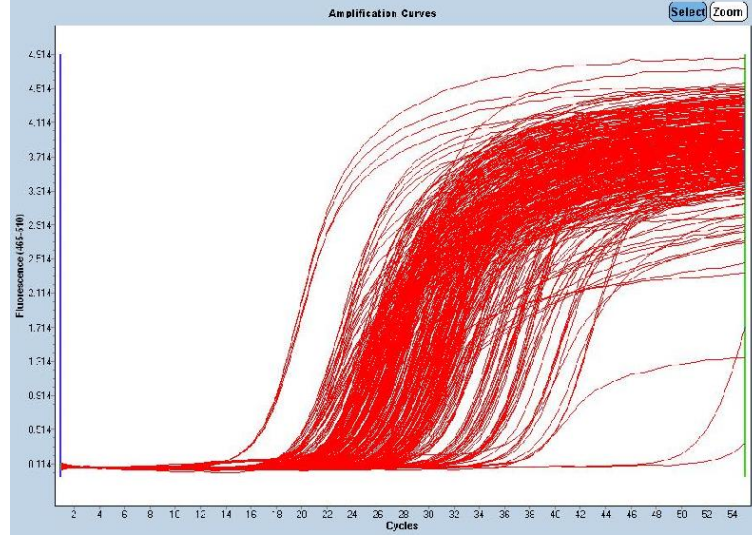
cDNA sentezi tamamlandı ve örnekler PCR Array çalışmasına kadar -20°C'de saklandı. Elde edilen 20 µl cDNA üzerine 100 µl RNAase free water eklendi. Total volume 120 µl idi.

PCR application	Assay/array	Buffer	Recommended RNA input*
Pathway profiling of mature miRNA	miScript miRNA PCR Arrays	5x miScript HiSpec Buffer	125–250 ng per RNA sample [†]
Whole miRNome profiling of mature miRNA	miScript miRNA PCR Arrays	5x miScript HiSpec Buffer	250–500 ng per 384-well plate or per 4 x 96-well plates/Rotor-Discs (the number of plates provided in a miRNome miScript miRNA PCR Array varies depending on the species of interest) [†]
Mature miRNA quantification only	miScript Primer Assays	5x miScript HiSpec Buffer	Depends on abundance and number of target miRNAs to be quantified; from 10 ng up to a maximum of 2 µg
Parallel real-time PCR quantification of mature miRNAs, precursor miRNAs, mRNAs, and/or other noncoding RNAs	miScript Primer Assays, miScript Precursor Assays, and/or QuantiTect Primer Assays	5x miScript HiFlex Buffer	Depends on abundance and number of target miRNAs to be quantified; up to a maximum of 1 µg
Precursor miRNA detection	miScript Precursor Assays	5x miScript HiFlex Buffer	Depends on abundance and number of target miRNAs to be quantified; up to a maximum of 0.5 µg

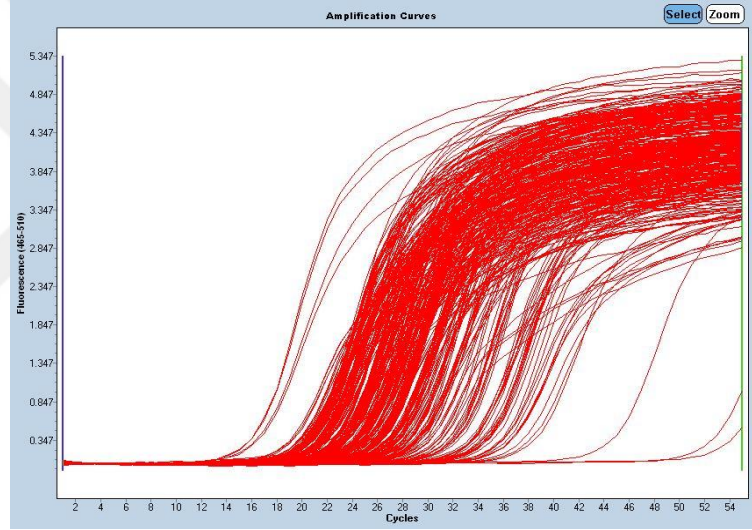
Tablo 7: başlangıç için RNA miktarları ve çeşitli PCR uygulamaları için reverse transkripsiyon reaksiyonlarına yönelik buffer önerileri (119).

cDNA KONTROL PCR'ı protokolü:

dH ₂ O	: 1.5 µl
2X Sybr Green Master	: 3.0 µl
10 X Uni. Primer (3')	: 0.5 µl
U6 (Forward primer)	: 0.5 µl



Tablo 8: Multisentrik tümör kolunda qRT-PCR görüntüsü(floresans-siklus grafiği) amplifikasyon eğrileri



Tablo 9: Unifokal tümör grubunda qRT-PCR görüntüsü(floresans-siklus grafiği) amplifikasyon eğrileri

3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, ilk olarak değişkenlerin gruplara göre dağılımları Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılımda olan değişkenler t-testi ile incelenirken, parametrik olmayan değişkenler Mann-Whitney U testi ile incelenmiştir. Ki-67 değerlerinin miRNA ifade seviyeleriyle korelasyonu Pearson korelasyon testi ile analiz edilirken, miRNA ifade seviyelerinin unifokal ve multisentrik hastaları ayırt etme gücü alıcı işletim karakteristiği testi ile incelenmiştir. Unifokal ve multisentrik tümörler ve operasyon tipi arasındaki ilişki lojistik regresyon ile analiz edilmiştir. Kategorik değişkenler arası ilişki Ki-

Kare veya Fisher Exact testi ile araştırılmış, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows) 21.0 programı kullanılmıştır. Farklı ifade seviyeleri gösteren miRNA'lar tarafından hedef alınan gen ve yolakların belirlenmesi için ise web tabanlı *miRSystem* analiz yazılımı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

Yapılan power analiz sonucunda unifokal ve multisentrik meme kanseri gruplarının herbiri için 20 hastanın yeterli olduğu belirlendi. Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan 31 unifokal ve 26 multisentrik meme kanseri tanılı toplam 57 olgunun yaş aralığı 41 ve 91 arasında değişmekte idi (median değer: 53). Katılımcıların 36'sı postmenapoze, 21'i premenopoze idi ve unifokal, multisentrik kollara dağılım açısından istatistiksel fark yoktu.

Memeye yönelik yapılan cerrahilerde; unifokal grupta 29 geniş lokal eksizyon, 2 mastektomi, buna karşılık multisentrik kolda 16 geniş lokal eksizyon, 10 mastektomi prosedürü uygulandı.

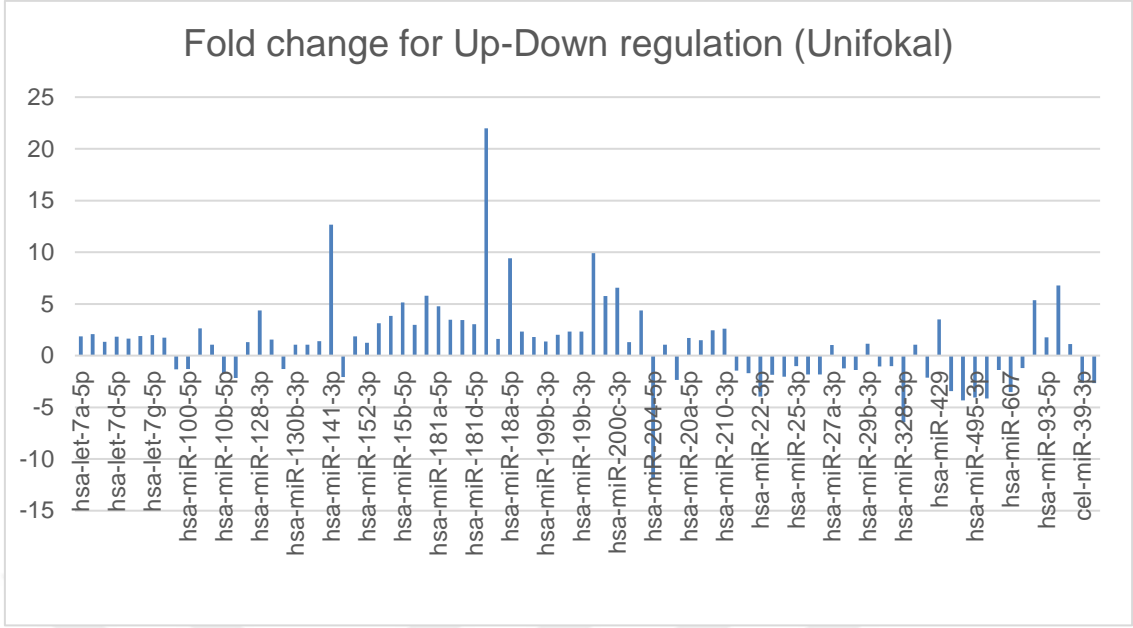
Vücut kitle indeksi açısından değerlendirildiğinde unifokal grup ortalaması 27,42 (min:21,87-max:38,29) ve multisentrik grup ortalaması 28,83 (min:22,03-max:39,06) idi. Bu parametre açısından iki grup arasında istatistiksel fark yoktu.

Patolojik tipler kıyaslandığında unifokal grupta 1 vaka invaziv lobuler karsinom, diğer 30 hasta invaziv duktal karsinom; multisentrik grupta 5 vaka invaziv lobuler karsinom, diğer 21 vaka invaziv duktal karsinom idi.

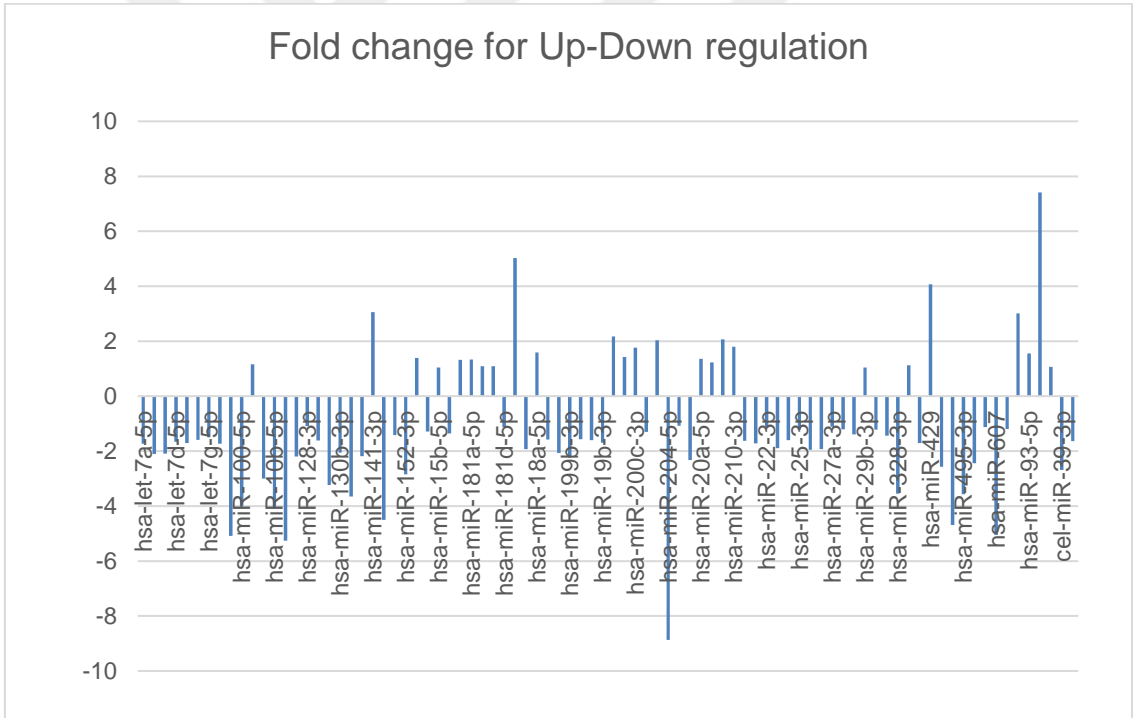
PCR Array metodu ile yapılan çalışmamızda fold change cut off değeri 4 ve üzeri olan toplam 24 adet disregüle miRNA geni saptandı. Bunların 10 tanesi downregüle, 14 tanesi upregüle idi. Klinik parametreler ve sonlanım noktaları ile miRNA'ların ilişkisinin incelenmesi için miRNA seçimi; daha önce yapılmış validasyon analizlerini de içeren az sayıdaki çalışmalara benzer şekilde upregüle veya downregüle olan grubun içinden fold change'i 4 ve üzerinde olup, p değeri istatistiksel olarak anlamlılık seviyesinde olan miRNA'ların alınması şeklinde yapıldı (Tablo 10). Bu seçim sonunda miR-128-3p, miR-141-3p, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-182-5p, miR-18a-5p, miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-203a-3p, miR-7-5p, miR-96-5p, miR-204-5p, miR-328-3p, miR-489-3p, miR-495-3p, miR-497-5p, miR-429, miR-1-3p, miR-10b-5p, miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-607 ileri analiz yapılmak üzere incelendi (Tablo 11, Tablo 12) .

miRNA		p-value
hsa-let-7d-5p	0.003555	0.008596
hsa-let-7e-5p	0.011467	0.021029
hsa-let-7f-5p	0.000503	0.037569
hsa-let-7g-5p	0.000022	0.000523
hsa-miR-10b-5p	0.00419	0
hsa-miR-125b-5p	0	0
hsa-miR-129-5p	0.014211	0.00974
hsa-miR-130a-3p	0.040201	0
hsa-miR-140-5p	0.003066	0.000003
hsa-miR-141-3p	0.000001	0.001645
hsa-miR-145-5p	0.000055	0.000002
hsa-miR-152-3p	0.028078	0
hsa-miR-17-5p	0.001349	0.022116
hsa-miR-182-5p	0.000131	0
hsa-miR-186-5p	0.006198	0.000226
hsa-miR-193b-3p	0.007574	0.017939
hsa-miR-195-5p	0.000481	0.000282
hsa-miR-199b-3p	0.007464	0.000062
hsa-miR-199a-5p	0.000022	0.001811
hsa-miR-19b-3p	0.006033	0.048322
hsa-miR-200a-3p	0.000019	0.000017
hsa-miR-200b-3p	0.000007	0.011927
hsa-miR-200c-3p	0	0.00001
hsa-miR-203a-3p	0.000136	0.000438
hsa-miR-204-5p	0	0
hsa-miR-206	0.000013	0.000001
hsa-miR-20a-5p	0.000731	0.000238
hsa-miR-20b-5p	0.014038	0.018797
hsa-miR-21-5p	0	0.000129
hsa-miR-210-3p	0.000002	0.000609
hsa-miR-212-3p	0.006674	0.00015
hsa-miR-214-3p	0.000064	0.000308
hsa-miR-222-3p	0	0
hsa-miR-26a-5p	0.000003	0
hsa-miR-26b-5p	0.000043	0.000012
hsa-miR-29a-3p	0.001421	0.000022
hsa-miR-328-3p	0.000044	0.000268
hsa-miR-424-5p	0.000032	0.000112
hsa-miR-485-5p	0.000007	0.000008
hsa-miR-489-3p	0.000004	0
hsa-miR-495-3p	0.000011	0
hsa-miR-497-5p	0	0
hsa-miR-607	0	0
hsa-miR-93-5p	0.000012	0.00002
hsa-miR-96-5p	0	0.000069

Tablo 10: miRNA genlerinin disrregulasyonuna yönelik p değerleri



Tablo 11: Unifokal kolda disregüle miRNA genleri için fold change grafiği



Tablo 12: Multisentrik kolda disregüle miRNA genlerinin fold change grafiği

Upregüle Genler		Downregüle Genler	
miRNA	Fold Regülasyonu	miRNA	Fold Regülasyonu
hsa-miR-182-5p	5,0305	hsa-miR-1-3p	-5,083
hsa-miR-429	4,0712	hsa-miR-10b-5p	-4,0799
hsa-miR-96-5p	7,4112	hsa-miR-125b-5p	-5,2558
		hsa-miR-145-5p	-4,5019
		hsa-miR-204-5p	-8,8668
		hsa-miR-489-3p	-4,6894
		hsa-miR-607	-5,0461

Tablo 13 : Multisentrik tümör grubunda upregüle ve downregüle miRNA genleri (fold regülasyonu > 4)

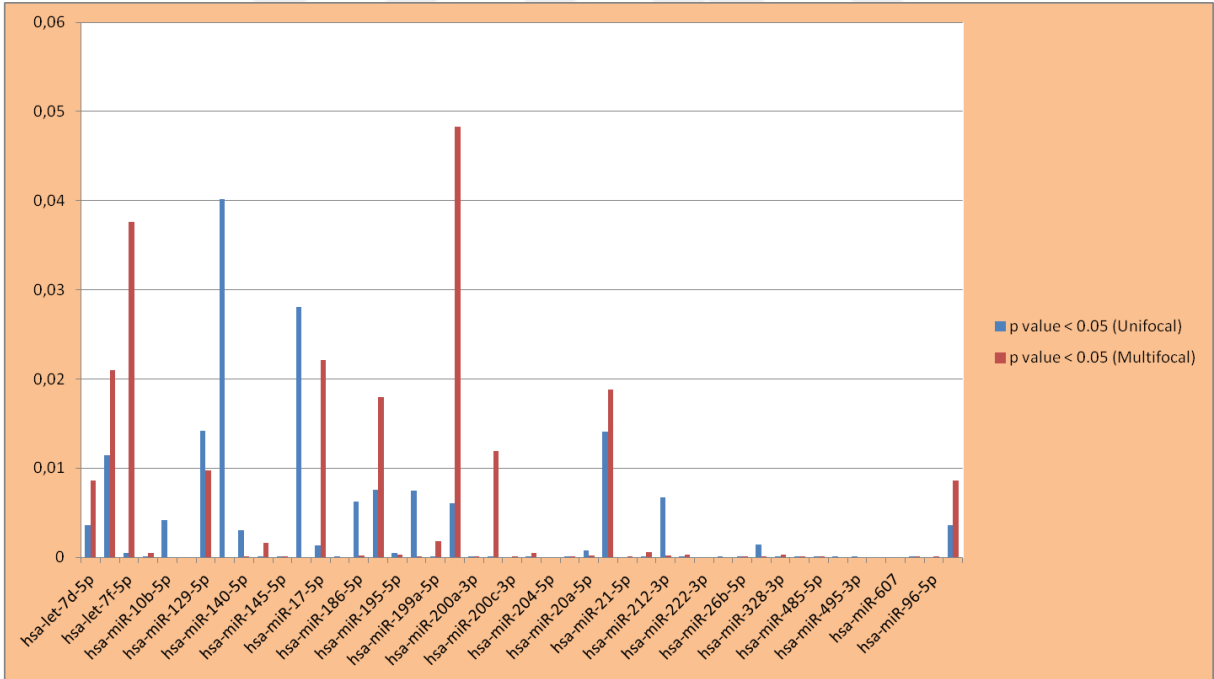
Multisentrik hasta grubunda; miR-182-5p (fold regülasyonu: 5,0305), miR-429 (fold regülasyonu: 4,0712), miR-96-5p (fold regülasyonu: 7,4112) genlerinin upregüle olduğu, miR-1-3p (fold regülasyonu: -5,083), miR-10b-5p (fold regülasyonu: -4,0799), miR-125b-5p (fold regülasyonu: -5,2558), miR-145-5p (fold regülasyonu: -4,5019), miR-204-5p (fold regülasyonu: -8,8668), miR-489-3p (fold regülasyonu: -4,6894), miR-607 (fold regülasyonu: -5,0461) genlerinin downregüle olduğu görüldü (Tablo 13). **Error! Reference source not found.**

Upregüle Genler		Downregüle Genler	
miRNA	Fold Regülasyonu	miRNA	Fold Regülasyonu
hsa-miR-128-3p	4,2498	hsa-miR-204-5p	-11,8419
hsa-miR-141-3p	11,3813	hsa-miR-328-3p	-6,4355
hsa-miR-15b-5p	4,8665	hsa-miR-489-3p	-4,3269
hsa-miR-17-5p	5,3304	hsa-miR-495-3p	-4,0588
hsa-miR-181a-5p	4,5774	hsa-miR-497-5p	-4,1488
hsa-miR-182-5p	18,6905		
hsa-miR-18a-5p	9,1933		
hsa-miR-200a-3p	8,9429		
hsa-miR-200b-3p	5,4254		
hsa-miR-200c-3p	5,9935		
hsa-miR-203a-3p	4,3388		
hsa-miR-7-5p	4,9584		

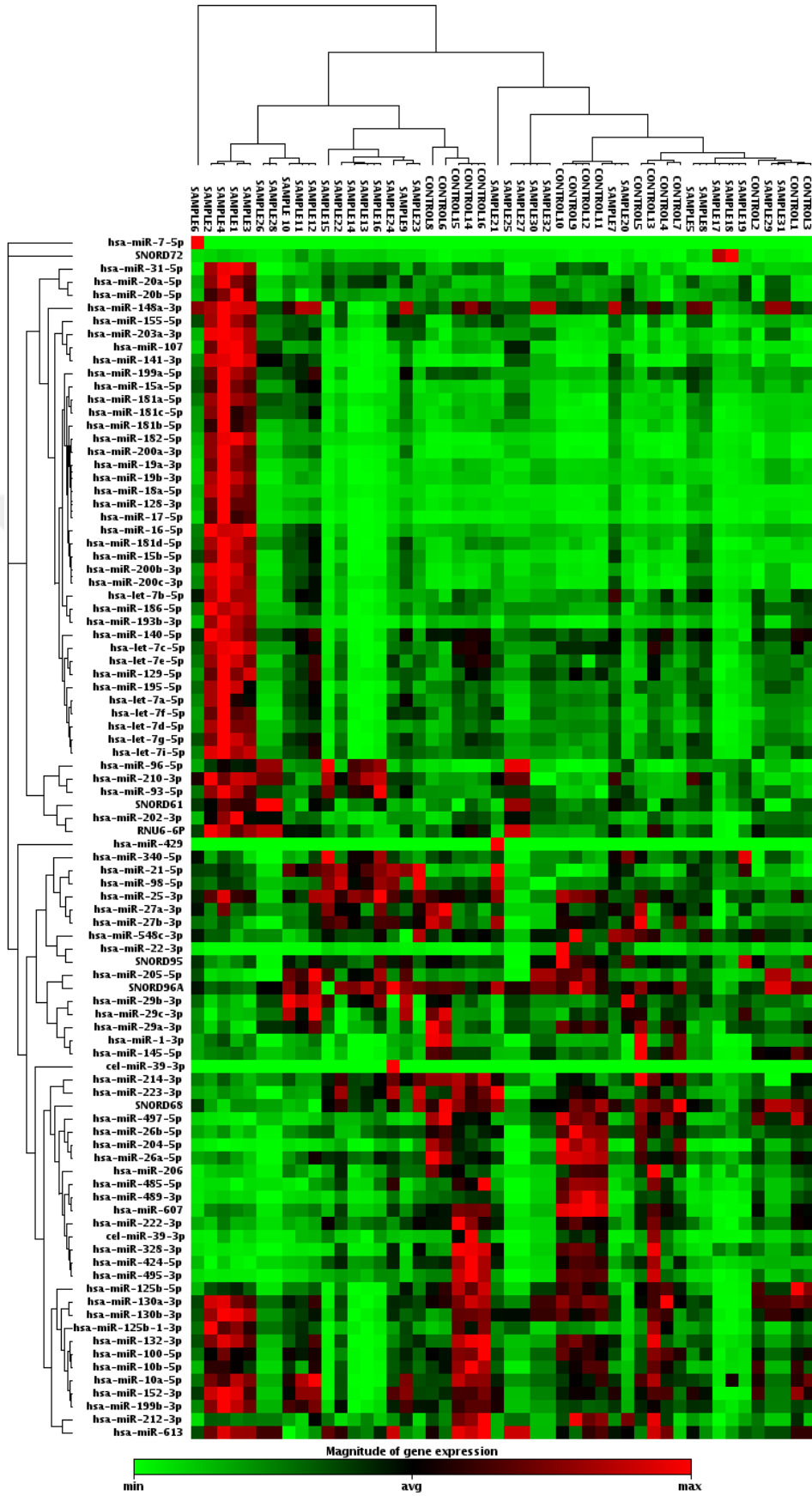
hsa-miR-96-5p	5,8199		
---------------	--------	--	--

Multisentrik kanserlerin örneklerinde saptanan upregüle genlerden miR-182-5p ve miR-96-5p, aynı zamanda unifokal kanserli vakaların örneklerinde de, farklı fold regülasyonları ile de olsa, upregüle olduğu saptandı (Tablo 14). miR-429 geninin multisentrik örneklerdeki analizlerde upregüle olmasına karşılık, unifokal kolda upregüle olmadığı dikkati çekti.

Unifokal hasta grubunda toplam 13 miRNA geni upregüle bulundu. Bunlar; miR-128-p3 (fold değeri: 4,2498), miR-141-ep (fold değeri: 11,3813), miR-15b-5p (fold değeri: 4,8665), miR17-5p (fold değeri: 5,3304), miR-181a-5p (fold değeri: 4,5774), miR-182-5p (fold değeri: 18,6905), miR-18a-5p (fold değeri: 9,1933), miR-200a-3p (fold değeri: 8,9429), miR-200b-3p (fold değeri: 5,4254), miR-200c-3p (fold değeri: 5,9935), miR-203a-3p (fold değeri: 4,3388), miR-7-5p (fold değeri: 4,9584), miR-96-5p (fold değeri: 5,8199) idi (Tablo 14). 5 genin ise downregüle olduğu bulundu. Bunlar; miR-204-5p (fold değeri: -11,8419), miR-328-3p (fold değeri: -6,4355), miR-489-3p (fold değeri: -4,3269), miR-495-3p (fold değeri: -4,0588), miR-497-5p (fold değeri: -4,1488) idi (Tablo 14).



Tablo 15: p değerleri ve miRNA genlerine ait grafik görüntüsü



Tablo 16: Gen ekspresyon şemasının magnitud görüntüsü

Gruplara ait veriler karşılaştırmalı olarak incelenecek olursa; Ki67 indeksi dışında bütün oranların normal dağılımda olduğu belirlenmiştir. Yaş, tümör boyutu, Ki67 indeksi, kilo, boy ve BMI unifokal ve multisentrik hastalar arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir (Tablo 17).

	Unisentrik			Multisentrik			p değeri
	Ortalama	Medyan	SD	Ortalama	Medyan	SD	
Yaş	58,3	56,0	13,3	53,07	56,0	11,5	0,118
Boyut	29,0	25,0	20,3	26,3	25,0	9,9	0,508
Ki67	33,8	30,0	22,7	26,6	25,0	17,2	0,254
Kilo	70,3	67,0	10,05	74,9	72,5	12,04	0,129
Boy	159,8	160,0	5,2	161,9	161	5,7	0,170
BMI	27,6	26,5	4,2	28,6	27,8	4,5	0,395

Tablo 17: Unifokal-Multisentrik tümör karşılaştırması

Tümör boyutu ve Ki67 indeksi menapoz durumuna göre incelendiğinde tümör boyutu açısından menapoza girmiş ve girmemiş hastalar arasında bir fark belirlenmemişken, menapoza girmemiş kadınların daha yüksek Ki67 oranlarına sahip oldukları belirlenmiştir ($Ki67_{men(-)} = 40,8$; $Ki67_{men(+)} = 24,6$; p-değeri = 0,015) (Tablo 18). Ki67 oranlarının miRNA ifade seviyeleri ile korelasyonu incelendiğinde özellikle miR-182-5p ifade seviyeleri ile Ki67 oranları arasında güçlü pozitif korelasyon görülse de, istatistiksel anlamlılık belirlenmemiştir ($R_{miR-182-5p} = 0,724$; $p_{miR-182-5p} = 0,066$) (Tablo 19).

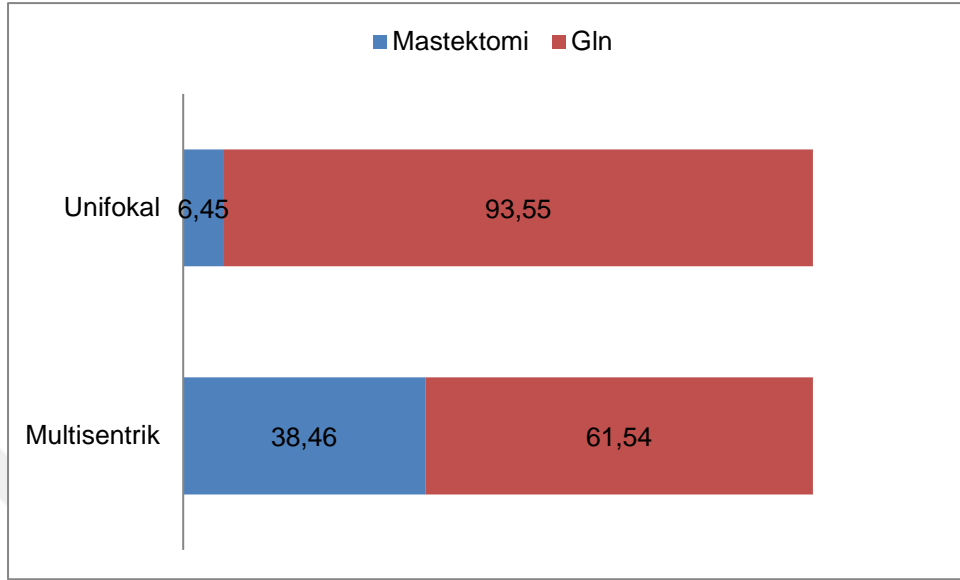
	Menapoz (-)			Menapoz (+)			p değeri
	Ortalama	Medyan	SD	Ortalama	Medyan	SD	
Boyut	26,0	25,0	13,1	28,9	25,0	18,04	0,494
Ki67	40,8	40,0	15,3	24,6	25,0	15,3	0,015

Tablo 18: Menapoz öncesi ve sonrası karşılaştırma

miRNA	Korelasyon kat sayısı	p değeri
miR-182-5p	0,724	0,066
miR-429	0,342	0,453
miR-96b-5p	-0,292	0,525

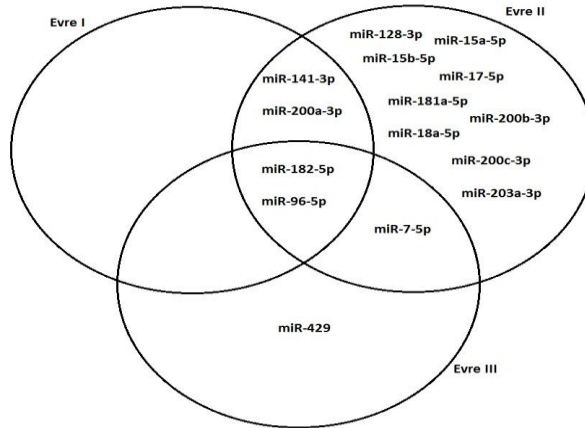
Tablo 19: Disregüle miRNAların korelasyon ve p değeri karşılaştırması

Multisentrik örneklerle (%38,46) unifokal tümörlere (%6,45) göre anlamlı şekilde daha fazla mastektomi uygulandığı belirlenmiştir ($p= 0,002$; $OR= 9,062$) (Şekil 15).



Şekil 15: Unifokal ve multisentrik tümörlerin mastektomi açısından karşılaştırması

Çalışma grubuna dahil edilen örnekler evrelerine göre gruplanıp mikroRNA ifade seviyeleri karşılaştırıldığında miR-141-3p ve miR-200a-3p'nin hem evre I, hem de evre II tümörlerde yüksek oranda ifade edilirken, miR-7-5p'nin hem evre II, hem de evre III tümörlerde yüksek oranda ifade edildiği belirlenmiştir. miR-429 ise özellikle evre III tümörlerde yüksek ifade



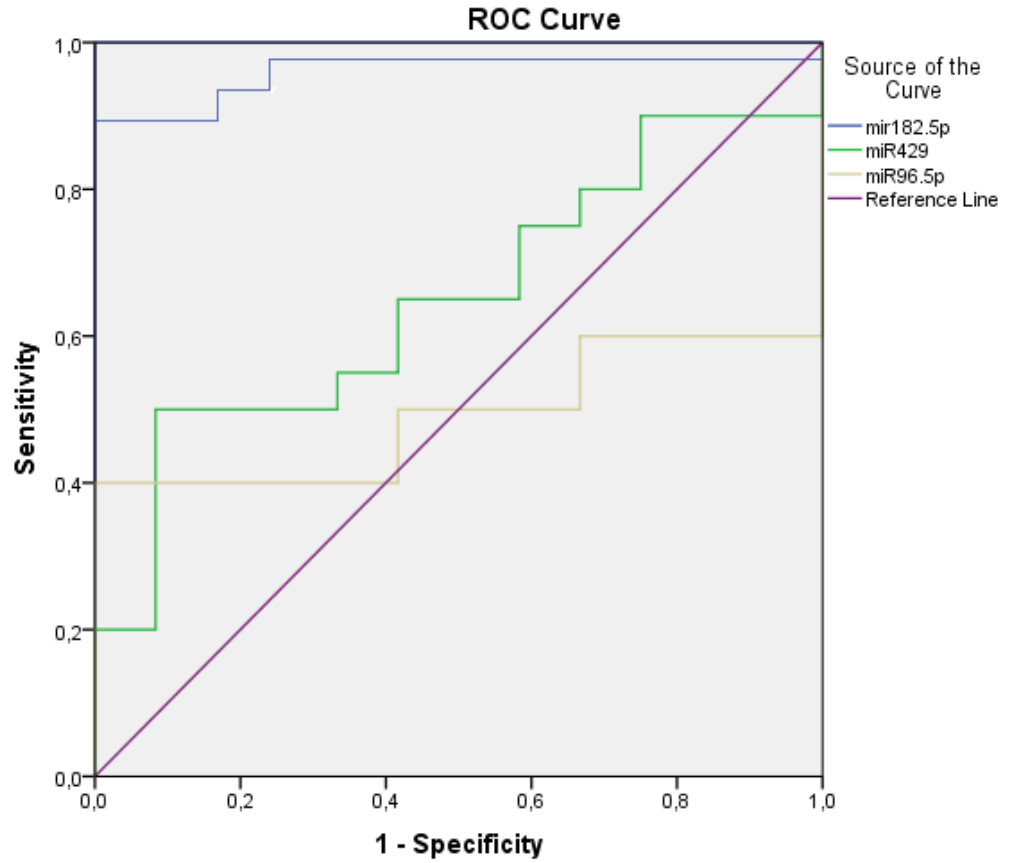
Şekil 16: Evrelere göre miRNA karşılaştırması

seviyeleri göstermektedir. Bunun yanında miR-182-5p ve miR-96b-5p'nin evrelemeden bağımsız olarak tüm tümörlerde yüksek oranda eksprese olduğu tespit edilmiştir (Şekil 16).

Multisentrik grupta yüksek ifade gösteren miRNA'ların unifokal-multisentrik ayırım gücü analizi, miR-182-5p'nin yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu ve multisentrik meme kanserlerinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Tablo 20) (Şekil 17).

miRNA	Alan	p değeri
miR-182-5p	0,984	<0,0001*
miR-429	0,650	0,161
miR-96-5p	0,492	0,938

Tablo20: miR-182-5p biyobelirteç olabilir mi?

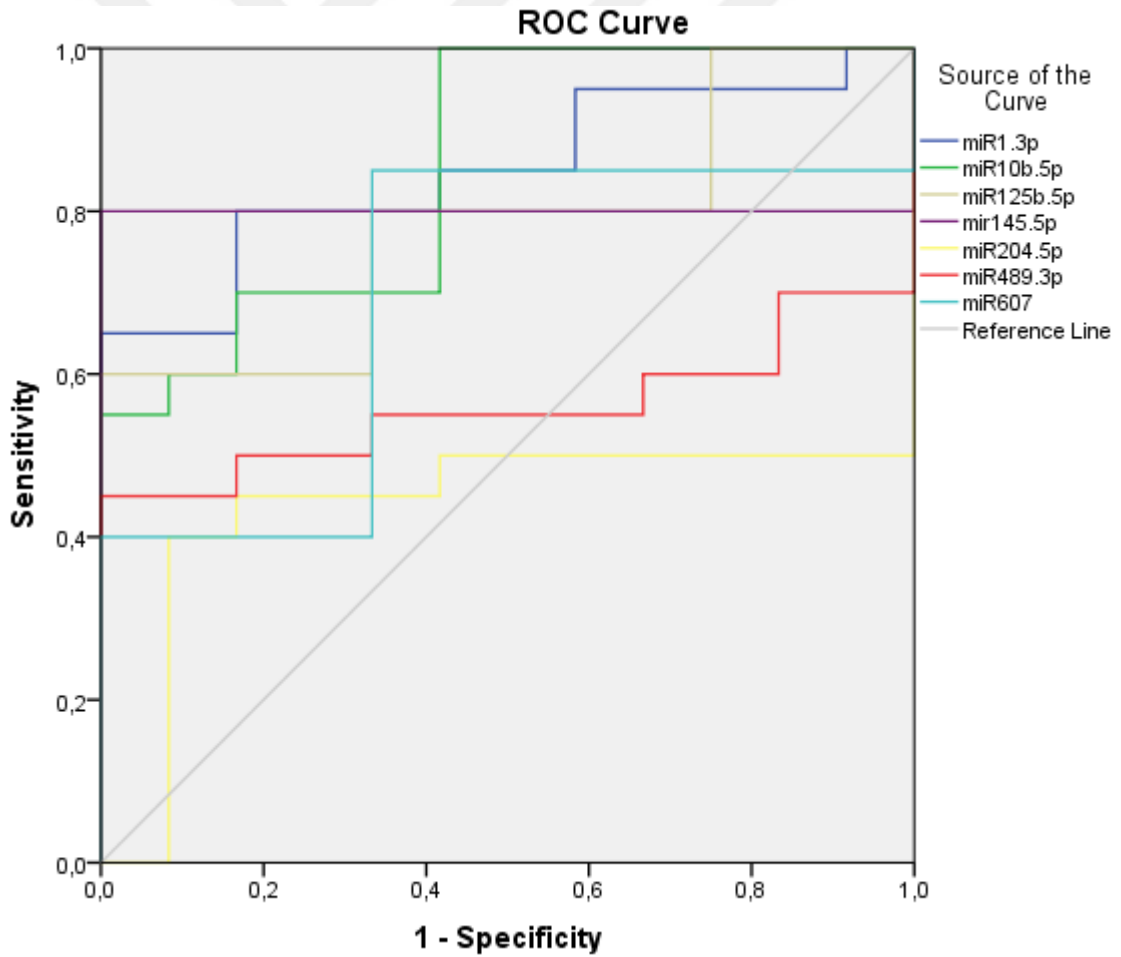


Şekil 17: miR-182-5p biyobelirteç olabilir mi?

Unifokal gruba göre multisentrik grupta azalmış ifade gösteren miRNA'ların ayırım gücü alıcı işletim karakteristiği testi ile incelendiğinde miR-1-3p, miR-10b-5p, miR-125-5p ve miR-145-5p'nin yüksek ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 21) (Şekil 18).

miRNA	Alan	p değeri
miR-1-3p	0,850	0,001
miR-10b-5p	0,854	0,001
miR-125-5p	0,783	0,008
miR-145-5p	0,800	0,005
miR-204-5p	0,437	0,559
miR-489-3p	0,558	0,586
miR-607	0,700	0,062

Tablo21: Unifokal ve mutisentrik gruplarda downregule miRNA'lar

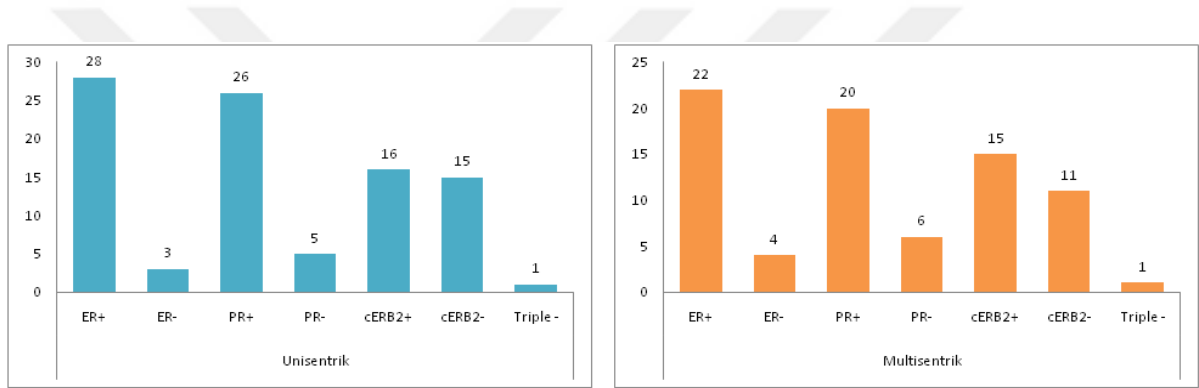


Şekil 18: Unifokal ve mutisentrik gruplarda downregule miRNA'lar

Çalışmaya dahil edilen örnekler reseptör pozitiviteyi açısından incelendiğinde unifokal ve multisentrik gruplar arasında reseptör dağılımı açısından önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 22) (Şekil 19).

	Unisentrik		Multisentrik		p değeri
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
Er	28	3	22	4	0,798
Pr	26	5	20	6	0,944
Cerb	16	15	15	11	0,503

Tablo22: Unifokal ve multisentrik tümörlerin reseptör pozitifliği açısından karşılaştırması



Şekil 19: Unifokal ve multisentrik tümörlerin reseptör pozitifliği açısından karşılaştırması

Farklı ifade seviyeleri gösteren miRNA'lar tarafından hedef alınan gen ve yolların belirlenmesi için web tabanlı *miRSystem* analiz yazılımı kullanılmıştır. (Tzu-Pin Lu, Chien-Yueh Lee, Mong-Hsun Tsai, Yu-Chiao Chiu, Chuhsing Kate Hsiao, Liang-Chuan Lai, Eric Y. Chuang. (2012) miRSystem: An Integrated System for Characterizing Enriched Functions and Pathways of MicroRNA Targets. PLoS ONE 7(8):e42390.doi:10.1371/journal.pone.0042390)

Gen adı	Açık isim
LAMC1	Laminin, gamma 1
ZIC3	Zic family member 3
ANLN	Anilin, actin binding protein
ARHGEF3	Arrestin domain containing 3

Tablo23: Multisentrik tümörlerde artmış ifade gösteren 3 miRNA tarafından ortak hedef alınan genler

Yolak	Yolakta rol alan toplam gen	Hedef alınan gen	Yolak işlevi
RHOA sinyal yolağı	44	7	Miktotübül etkileşimleri, hücre döngüsünün tetiklenmesi
PYK2 yolağı	29	7	İyon kanallarının modülasyonu, MAPK aktivasyonu ve apoptoz tetiklenmesi
L1 CAM etkileşim yolağı	94	11	Sitoskeleton etkileşimleri, hücre göçü
Fokal adhezyon kinaz aracılı yolak	58	9	İntegrin aracılı hücre göçü, anjiyogenez

Tablo24: Multisentrik tümörlerde artmış ifade gösteren 3 miRNA tarafından ortak hedef alınan yollar

Gen adı	Açık isim
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
CAPRIN1	Cell cycle associated protein 1
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
JARID2	Jumonji, AT rich interactive domain 2

Tablo25: Multisentrik tümörlerde azalmış ifade gösteren miRNA'lar tarafından genel olarak hedef alınan genler

Yolak	Yolakta rol toplam gen	Hedef alınan gen	Yolak işlevi
Fokal adhezyon	199	6	İntegrin aracılı hücre göçü, metastaz, invazyon
RNA metabolizması	264	7	RNA sentezi, hücre döngüsü
Ubiquitin aracılı proteoliz	135	4	Protein yıkımı
Aktin sitoskeleton regülasyonu	213	8	Hücre iskeletinin modülasyonu

Tablo26: Multisentrik tümörlerde azalmış ifade gösteren miRNA'lar tarafından ortak hedef alınan yollar

5. TARTIŞMA

Gelişen teknoloji ve tarama yöntemlerinin yaygınlaşması ile meme kanserinde daha erken tanı konabilmekte, aynı zamanda dokuların daha iyi görüntülenebilmesi ile multifokal ve multisentrik meme kanseri sayısında artış saptanmaktadır.

Gelişen cerrahi teknik, neoadjuvant ve adjuvant tedavilerde artmış başarı, hormonoterapi, immünoterapi gibi hedefe yönelik tedaviler ile bireyselleştirilmiş tedavilerin gündeme gelmesinin yanında, meme koruyucu cerrahi de giderek yaygınlaşmıştır. Ancak, multisentrisite meme koruyucu cerrahinin önünde halen engel oluşturabilmektedir. Bizim çalışmamızda da uyumlu bulgular elde edilmiş ve multisentrik grupta mastektomi oranının, unifokal gruptan daha fazla olduğu saptanmıştır. Memeyi korumaya yönelik eğilimden dolayı unifokal, multisentrik kanser ayırımını iyi yapmak gerekmektedir. Aksi halde lokal rekürrenslerde artış, mortalite ve morbidite artışına sebep olabilecektir. Bu bağlamda multisentrisiteyi öngörebilecek bir tetkik, radyolojik görüntülemelere de destek olarak ve hatta bazen yarattıkları kafa karışıklıklarına çözüm getirerek, belki de seçilecek cerrahi tedavi tipini değiştirerek meme koruyucu cerrahi sonrası oluşacak nüks, komplikasyon ya da surviye kötü etkinin görülme ihtimalini azaltabilecek, kişiye özgün tedavinin şekillenmesine yardım edecektir. Bu çalışmada multisentrisiteyi öngörmeye etkisini değerlendirmek üzere dokudan “Qiagen miSCRIPT II RT kit” ile izole edilen miRNA’lar PCR Array yöntemi kullanılarak kantite edildi ve incelendi.

MikroRNA’lara yönelik çalışmalar son 10 yılda ciddi artış göstermiş ve hücre döngüsünde, metastaz, tümör baskılama ya da onkogen etkileri ortaya kondukça çeşitli kanserlerde çeşitli mikroRNA’ların hangi etkilerle ne sonuçlar doğurduklarına yönelik çok fazla çalışma alanı oluşmuştur. Bu konu, tanıda etkili olup olmadığından, tedavi başarısının değerlendirilmesine kadar tümör biyolojisinde birçok bilinmeze ışık tutabilecek bir konudur.

Çalışmamızın bulguları doğrultusunda ön plana çıkan miRNA’lar incelendiğinde; miR182’nin matrix metalloproteinaz 9 aktivitesini, koloni formasyonu ve hücre invazyonunu arttırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur (89), aynı zamanda STAT-3 aktivasyonunu arttırdığı ve glioma oluşumunda da etkili olduğu literatürde bildirilmiştir (90). Bizim çalışmamızda da hem multisentrik kolda, hem de unifokal kolda upregüle bulunmuştur.

Epitelyal hücreler, TGF-beta1 aracılığı ile morfolojik ve migratuar özelliklerinde değişikliğe uğrayarak mezankimal hücrelere dönüşmektedir (91). Böyle değişiklikler, genomun kromatin reorganizasyonu sonucu gelişmekte ve hücre tipine özel gen ekspresyon özelliklerinin

oluşturulması ve korunmasında rol almaktadır (91). Bu süreçte aktif oyuncularından biri miR-200 ailesidir ve epitelyal hücrelerde aktif, mezankimal hücrelerde sessizdir ve bu durumun mezankimal hücrelerde hücre motilitesini arttırıcı, proliferasyon ve migrasyonu indükleyici olduğunu belirten görüşler bulunmaktadır (91). Bizim çalışmamızda, miR-200 ailesinin üyesi olarak görülen miR429 multisentrik kolda upregüle bulunmuştur. Bu sonuca göre, multisentrik olgulardaki kanserli doku volümüne karşı savunma mekanizmalarında artış söz konusu olabilir. Başka bir olasılık olarak da; miR-200a, b, c ve miR-141'in unifokal kanser kolunda upregüle olup multisentrik kolda upregüle bulunmayışı da, multisentrisiteye yol açan etkenlerden biri olarak kabul edilebilir. Bu ailenin etki mekanizması halen net olarak ortaya konamamıştır. Ayrı bir çalışmada, miR-200c, miR-141 ve miR-31'in kemorezistan meme kanserlerinde upregüle olduğu gösterilmiştir (92). Takip eden süreçte yapılan çalışmalarda miR-141 de miR-200 ailesinin bir üyesi olarak değerlendirilmiş, nazofaringeal ve ovarian karsinomlarda upregüle bulunmuş ve kötü prognoz ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (93). Meme kanseri için de kötü prognoza işaret edebileceği belirtilmektedir (92). Bizim çalışmamızda da, unifokal grupta upregüle olduğu gözlenmiştir. miR-200 ailesi birçok çalışmada disregüle bulunmuş ancak tam olarak etkisinin ne yönde olduğu tespit edilememiştir.

Çin'de 2016'da yapılan bir çalışmada, miR-145'in epitelyal hücreden mezankimal hücreye dönüşümü azaltarak metastazı engelleyici bir rol aldığı gösterilmiş (94), bizim çalışmamızda da multisentrik kolda unifokalden farklı olarak downregüle olduğu gözlenmiştir. Bu açıdan ileriye dönük çalışmalarda metastatik hastalığın biyolojisinin aydınlatılması ve buna yönelik tedavilerin geliştirilmesine ışık tutabilecek niteliktedir. Yine miR-125 bir diğer multisentrik kolda izole olarak downregüle bulunmuş bir diğer gendir. Literatürde yapılan çalışmalarda miR-125'in özellikle triple-negatif meme kanserlerinde metalloproteinaz 2K7(MAP2K7) üzerinden epitelyal-mezankimal dönüşümü inhibe ettiği gösterilmiştir.

2013'te Şangay'da meme kanserli ve normal dokulardan alınan olgularda yapılan karşılaştırmalı çalışmada miR-96'nın kanser grubunda upregüle olduğu bildirilmiş (95). miR-96'nın ektopik ekspresyonu sonucu hücrel proliferasyonu, migrasyonu ve invazyon özelliklerini arttırıcı etkiler geliştiği görülmüş (95). Etki mekanizmasının reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) üzerinden gösterdiği, RECK'in tümör invazyonu, anjiyogenez ve metastazda etkili olduğu bilinen metalloproteinaz-9, MMP-2, MT1-MMP'a negatif etki ederek, tümör süpresör özellik gösterdiği bilinmektedir (95). miR-96'nın da RECK'i hedef alarak tümörögenezi arttırıcı ve metastaz, invazyon ve proliferasyonu

indükleyici etkisi olduğu düşünülmektedir (95). Connecticut’da yapılan başka bir çalışmada miR-27a, miR-96, miR-182; hücre kültürü MCF-7 düzeyinde meme kanseri hücreleri üzerinde çalışılmış ve kanser hücrelerinde bu 3 genin yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiş olup, etkileri, hücre metabolizması, hücrel farklılaşma, apoptoz, hücre döngüsü gibi önemli hücrel faaliyetlerde düzenleyici rol alan transkripsiyon faktörü Forkhead Box O alt ailesi(FOXO)’nin düzeyini azaltmasına bağlanmıştır (96). Bizim çalışmamızda da miR-96 multisentrik kolda, unifokal koldakine göre fold regülasyonu daha fazla olacak şekilde (sırasıyla 7,4 ve 5,8) upregüle bulunmuştur. miR-96’nın ayrıca prostat ve karaciğer karsinomları gibi kanserlerin patogeneğinde rol aldığına dair yayınlar mevcuttur (97).

miR-1, hakkında çok fazla çalışma yapılmış bir miRNA genidir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda glioblastomada tümör süpresör etkisi olduğu, kolorektal kanserlerde epitelyal-mezankimal dönüşümü baskıladığı, özefagus skuamoz hücreli kanserlerinde siklin D1, CDK4 üzerinden kanser büyümesini azalttığı, renal cell karsinomlarda down-regüle olması durumunda kötü prognoz ile ilişkili olduğu, prostat kanserinde kemik metastazı varlığında ekspresyonunun az olduğu, nazofaringeal karsinom hücrelerinde apoptozu arttırdığı, mide kanserinde proliferasyon ve migrasyonu azalttığı, malign mezotelyomada büyümeyi durdurduğu ve apoptozu hızlandırdığı, safra kesesi kanserinde miR-145 ile birlikte tümör süpresör etkisi olduğu sonuçlarına ulaşılmış. Meme kanserine yönelik miR-1 çalışmalarında da tümör süpresör etkileri olduğu gözlenmiştir. 2015 yılında Çin’de çok merkezli yapılan bir çalışmada, meme kanseri kök hücrelerinin beta-katenin yolağını inhibe ederek meme kanseri kök hücrelerinde migrasyonu ve proliferasyonu down-regüle ettiği gösterilmiş (98). Başka bir çalışmada, östrojen reseptörü pozitif olan 6 tane evre 4 meme kanserli olgu ve 5 tane evre 1, 2, 3 meme kanserli olgu, PCR Array ile, bizim çalışmamızda da kullanılan Qiagen miRNeasy kit kullanılarak çalışılmış (99). Evre 4 ve evre 1-3 lenf nodu metastazı müspet olan olgular karşılaştırıldığında, miR-1, miR-200a, miR-200b, miR-429, miR-206 fold regülasyonu 2 alındığında disregüle bulunmuş (99). Bu bulgular bizim çalışmamızla da uyumlu gözükmektedir. Ancak fold regülasyonu bizim çalışmamızda daha da yüksek tutulmuştur. Evre 1, 2, 3 lenf nodu metastazı olan olgular; evre 1, 2, 3 lenf nodu metastazı olmayan olgularla aynı yöntem ile karşılaştırıldığında miR-1, miR-145, miR-152, miR-214, miR-98, miR-204, miR-495, miR-497, miR-27, miR-100 ve miR-130 disregüle bulunmuştur. Bu iki karşılaştırmada ortak olarak göze çarpan miR-1 geni hastaların %20’sinde pozitif saptanmış ve istatistiksel anlamlı olarak tümör çapı, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, histolojik grade, östrojen,

progesteron reseptörü, ki-67 parametreleri ile ilişkili bulunmuştur (99). Çalışmanın multivariate analizinde de, ortalama 72 aylık takip süresinde (2–168 ay) miR-1 durumu hem hastaliksız sağkalım hem de toplam sağkalım açısından bağımsız kötü prognoz kriteri olarak değerlendirilmiştir (99). Bizim çalışmamız da göstermiştir ki; multisentrik olgularda miR-1 down-regüle bulunmaktadır. Bu da migrasyon, invazyon ve proliferasyon açısından tümör hücrelerinin bir arada gruplanmayıp, farklı odaklar oluşturmaya yöneldiklerini kısmen açıklamaktadır.

Multisentrik kolda down-regüle olup, unifokal grupta fold regülasyonu 4'ün üzerinde alındığında disregüle bulunmayan genlerden biri miR-10b genidir. Nazofaringeal karsinom, gastrik karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi bir çok kanser ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (100). Meme kanseri ve miR-10b'ye yönelik oldukça çalışma vardır. (101) Aşırı ekspresyonu durumunda xenotransplantasyon modellerinde, normalde metastatik olmayan meme kanserlerinin metastatik hale geldiği gösterilmiştir (102). Takip eden süreçte miR-10b'nin etkisini bloke edecek antagomir(in vivo miRNA antagonisti)-10b geliştirilmiş ve metastatik meme kanserli fare modelinde çalışılmış, primer tümörün büyümesine bir etki göstermese de metastazı baskılayıcı etkisi olduğu, ancak dissemine hastalıkta etkisiz olduğu, normal dokuda da kayda değer toksik bulguların izlenmediği bildirilmiştir (101). 2010 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bu çalışma, miRNA bazlı antimetastatik ajanların geliştirilmesi açısından önemli bir yayındır, ancak miR-10'un primer tümördeki etkisinin ne yönde olduğu, normal hücre siklusu süresince hangi etkilere sahip olduğu bilinmemektedir. 2 yıl sonra İtalya'da yapılan çalışmada ise; meme kanseri örnekleri, peritümöral alınan örnekler ile karşılaştırıldığında, miR-10b'nin meme kanseri grubunda down-regüle olduğu gösterilmiş, ayrıca meme kanseri hücrelerine ektopik olarak sentetik miR-10b verilmesi durumunda proliferasyonu durdurduğu, xenograft fare modellerine verildiğinde in vivo olarak tümör büyümesini durduğu gözlenmiştir (100). Bizim çalışmamızda da miR-10b down-regülasyonu multisentrik kanserlerde ön plana çıkmıştır. Son yıllarda Detroit'de yapılan bir çalışmada ise miR-10b'nin östrojen pozitif meme kanseri olgularında downregüle olduğunda tamoxifene duyarlılığı arttığı bildirilmiştir (103).

Çalışmamızda miR-204 hem multisentrik grupta hem de unifokal grupta downregüle olarak bulunmuştur (fold regülasyonları sırasıyla 8,8 ve 11,8). Literatürde miR-204'e yönelik çalışmalarda, intrahepatik kolanjiokarsinomda (104), gliomada (105), nöroblastomada (106), endometrial karsinomlarda (107), ve gastrik kanserlerde down-regüle bulunmuştur (108).

Meme kanseri ile ilgili miR-204 çalışmalarında da, kanserli olgularda downregüle bulunmuştur (109). miR-204'ün epitelyalden mezankimal hücreye dönüşümü inhibe ettiği, tümör büyümesini hücre proliferasyonunda düzenleyici rol olarak durdurduğu bildirilmektedir. Etki mekanizmasına yönelik yapılan bir çalışmada Six 1'in, agresif ve metastatik tümörlerle ilişkili, transkripsiyonel düzenleyici bir gen üzerinden etki ettiği, Six 1 aracılığı ile siklin A1, siklin D1, c-Myc ekspresyonunun arttığı, DNA tamirine yönelik hücre döngüsünün G2-M fazını zarara uğrattığı belirtilmektedir (110). miR-204, Six 1'in etkilerini azaltmakta ve bu süreçte tümör süpresör olarak görülmektedir (111). Başka bir çalışmada, 129 hastanın kanser dokuları gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilmiş ve miR-204 ekspresyonu yönünden yüksek ve düşük olmak üzere iki gruba ayrılmış; prognoz, toplam sağkalım ve hastaliksız sağkalım parametreleri incelendiğinde, tüm kriterler düşük ekspresyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha kötü bulunmuştur (112). Bu bulgular ışığında miR-204 prognostik bir belirteç olabilecek potansiyele sahiptir ve bizim çalışmamızda da bulgular literatür ile uyumludur.

Down-regüle genler arasında saptanmış olan miR-489 geni hem multisentrik kolda, hem de unifokal kolda down-regüle bulunmuştur. Literatürde miR-489 ile ilgili yapılan çalışmalarda hipofaringeal skuamoz hücreli karsinomlarda tümör-süpresör etkisi olduğu (113), over kanserlerinde sisplatin rezistansını module ettiği (114) bildirilmiştir. Meme kanseri ile ilgili yayınlarda; miR-489'un epitelyal-mezankimal dönüşümde regülasyon rolü olduğu, ekspresyon kaybı olduğunda meme kanserinin kemoterapiye direncinin arttığı (115), meme kanserlerinde down-regüle bulunduğu gösterilmiştir.

miR-607 ile ilgili literatürde çalışmalar sınırlıdır. Philadelphia'da 2009 yılında yapılan erkek meme kanserleri miRNA ekspresyon profili çalışmasında down-regüle bulunmuştur (116). Bizim çalışmamızda kadın hastalarda unifokal kolda değil ama multisentrik kolda down-regüle bulunmuştur. miR-607'nin etki mekanizmasına, meme kanseri ve diğer kanserler üzerine etkisine yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda görüntüleme ve rezeksiyon sonrası patoloji raporlarında odak durumu verifiye edilerek gruplar oluşturulmuştur. In situ komponentine yönelik microRNA profilinin incelenmesi bu çalışmada amaçlanmamıştır. Başka bir çalışma ile değerlendirilmesi düşünülmektedir. Diğer bir nokta da; Görüntülemelerde unifokal olarak değerlendirilip rezeksiyon materyalinde multisentrik, ya da multifokal sonuçlanan olguların aydınlatılmasında microRNA'lar gelecek vaad etmektedir. Çalışmamızda multisentrisiteye yönelik bir biyobelirteç olarak kullanılabilir 3 miRNA geni (miR-429, miR-182-5p, miR-96b-5p) tespit

edilerek, bu genlere ait yolak analizleri sonucunda bu genlerin validasyonunda kullanılacak 4 gen (LAMC1, ZIC3, ANLN, ARHGEF3) ortaya konmuştur.

5 yıllık takip süresi sonunda ileri analiz için seçilmiş olan miRNA'ların sağ kalım üzerindeki etkisi log-rank analizi kullanılarak değerlendirilecek ve bu miRNA'lar ile sağkalım arasındaki ilişki Kaplan-Meier testi ile incelenecektir.

Sonuç olarak; meme kanseri, tanısı ve tedavisinde daha başarılı sonuçlara ulaşmak için tümör biyolojisini aydınlatmak ve hedefe yönelik, bireyselleştirilmiş tedavileri gündeme getirmek kilit rol oynamaktadır, bu bağlamda microRNAlar hem tümör karakterini aydınlatmada, hem tanıda radyolojiye destek olmada, hem de bireysel tedaviyi şekillendirmede yadsınamayacak bir potansiyele sahiptir.



6. KAYNAKÇA

1. *Cancer statistics*. Siegel, R. 2013, CA, s. 13-30.
2. *Multifocal and multicentric breast cancer is associated with increased local recurrence regardless of surgery type*. Shaikh, T. 2, 2015, Breast J, Cilt 21, s. 121-126.
3. Ünal, M. Meme hastalıkları giriş ve tarihçe. *Genel Cerrahi Cilt I*. İstanbul : Nobel Tıp Kitabevi, 2002, s. 533-536.
4. Beenken, SW. History of the therapy of breast cancer. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorder*. Philadelphia : Saunders, 2004.
5. *Genes, dreams and cancer*. Sikorak, K. 21, 1994, BMJ, Cilt 1217, s. 308.
6. Kelly, K. Chapter 17: The Breast. [dü.] Charles Brunacardi. *Schwartz's Principle of Surgery 10e*. United States : McGraw-Hill Education, 2015.
7. Sadler, TW. *Langman's Medikal Embryology (ed 11)*. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
8. Spratt, JS. Gross anatomy of the breast. *Cancer of the breast*. London : W.B. Saunders, 1995, s. 22-42.
9. Haagensen, CD. Physicians' role in the detection and diagnosis of breast disease. *Diseases of the Breast*. London : W. B. Saunders, 1986.
10. Kuhns, JG. Microscopic anatomy of the breast. [kitap yaz.] WL Donegan. *Cancer of the Breast*. London : WB Saunders, 1995.
11. Romrell, LJ. Anatomy of the breast, axilla, chest wall and related metastatic sites. [kitap yaz.] KI Bland. *The breast- Comprehensive management of benign and malignant diseases, 2nd Edition*. London : W.B. Saunders, 1998.
12. Hunt, Kelly, Robertson, John ve Bland, Kirby. The Breast. [kitap yaz.] Charles Brunacardi. *Schwartz's Principles of Surgery*. 10th Edition. basım yeri bilinmiyor : Mc Graw Hill Education, 2015.
13. MP, Osborne. Breast Development and Anatomy. [kitap yaz.] Harris Jr, ve diğerleri. *Breast Disease*. 2nd. Philedelphia : Lippicott, 1991, s. 1-13.
14. H, Rouviere. *Anatomic Des Lymphatiques de L'hamme*. Paris : Mason, 1932.
15. Kalimuthu, Ramasamy ve Yegiyants, Sarah. Anatomy of the Breast, Axilla, and Chest Wall. [kitap yaz.] Adam Riker. *Breast Disease*. New York : Springer, 2015.

16. *Risk determination and prevention of breast cancer*. Howell, Anthony, ve diğeri. 446, Manchester : Breast Cancer Research, 2014, Cilt 16.
17. *Priorities for the primary prevention of breast cancer*. Colditz, GA ve Bohlke, K. 186-194, CA Cancer J Clin, 2014, Cilt 64.
18. *Population-based study of changing breast cancer in Icelandic BRCA2 mutation carriers, 1920-2000*. Tryggvadottir, L, ve diğeri. 116-122, J Natl Cancer Inst, 2006, Cilt 98.
19. Frykberg, ER. Current concepts on the biology and management of in situ breast carcinoma. [kitap yaz.] KI Bland. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. Philadelphia : WB Saunders, 1998.
20. *Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium*. AC, Broders. 20, Rochester : JAMA, 1932, Cilt 70.
21. *Lobular carcinoma in situ: A rare form of mammary cancer*. Foote, FW ve Stewart, FW. Am J Pathol., 1941, Cilt 17, s. 491-496.
22. *The fourth EORTC DCIS Consensus meeting*. Recht, A, Rutgers, EJ ve Fentiman, IS. Heemskerk : Eur J Cancer, 1998.
23. Simpson, JF ve Wilkinson, EJ. Malignant neoplasia of the breast: İnfiltrating carcinomas. [kitap yaz.] KI Bland ve EMI Copeland. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. Philadelphia : WB Saunders, 1998, s. 285.
24. *Hormone receptor status, tumor characteristics and prognosis : a prospective cohort of breast cancer patients*. Dunwald, LK, Rossing, MA ve Li, CI. 9, Breast Cancer Res., 2007, Cilt R6.
25. *Tubular carcinoma of the breast. Clinical and pathological observations concerning 135 cases*. McDivitt, RW, Boyce, W ve Gersell, D., Am J Surg Pathol, 1982, Cilt 6.
26. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Sorlie, T, ve diğeri. 100, U.S.A : Proc Natl Acad Sci, 2003, Cilt 14.
27. *Advances in Molecular and Clinical Subtyping of Breast Cancer and Their Implications for Therapy*. Cadoo, Karen A, Traina, Tiffany A ve King, Tari A. 22, New York : Surg Clin N Am, 2013.
28. *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. Ji, Herschkowitz, K, Simin ve VJ, Weigman. 5, Genome Biol, 2007, Cilt 8.

29. *Molecular portraits of human breast tumours*. Perou, CM, ve diğeri. 6797: Nature, 2000, Cilt 406.
30. *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. Eroles, P, ve diğeri. 6: Cancer Treat Rev, 2012, Cilt 38.
31. *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. Konecny, H, ve diğeri. 20: J Clin Oncol, 2010, Cilt 28.
32. *Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy*. Rouzier, R, ve diğeri. 16: Clin Cancer Res, 2005, Cilt 11.
33. *Molecular stratification of triple-negative breast cancers*. Perou, CM. 1: Oncologist, 2011, Cilt 16.
34. *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Prat, A ve Perou, CM. 1: Mol. Oncol, 2011, Cilt 5.
35. Greene, FL, Page, DL ve Fleming, ID. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th. New York : Springer-Verlag, 2002.
36. *Use of ultrasound-guided axillary node core biopsy in staging of early breast cancer*. Britton, PD, ve diğeri: Eur Radiol., 2009, Cilt 19, s. 561-569.
37. *Number of lymph nodes examined and the prognosis of breast carcinoma*. Fisher, B ve Slack, NH. : Surg Gynecol Obstet., 1970, Cilt 131, s. 79-88.
38. *AJCC Cancer Staging Manual 7th Ed*. 7. : Springer, 2010.
39. *Sensitivity of imaging for multifocal-multicentric breast carcinoma*. Bozzini, A, ve diğeri. 275, Milan : BMC Cancer, 2008, Cilt 8.
40. *Clinical and pathologic features of multifocal and multicentric breast cancer in chinese women: A retrospective cohort study*. Mei-rong, Z, ve diğeri. 1, Beijing : Journal of Breast Cancer, 2013, Cilt 16, s. 77-83. ISSN: 1738-6756.
41. *Breast conserving therapy for macroscopically multiple cancers*. Kurtz, JM, ve diğeri. 1, Marseille : Ann Surg, 1990, Cilt 212.
42. *Conservative surgery in patients with multifocal/multicentric breast cancer*. Gentilini, O, ve diğeri. 3, Milan : Breast Cancer Res Treat, 2009, Cilt 113.
43. JH., Breasted. *The Edwin Smith Surgical Papyrus. Translation for The New York Historical Society*. Chicago : University of Chicago Press, 1930.
44. *Milestones in Breast Cancer Treatment*. Zurrada, Stefano ve Veronesi, Umberto. 10, Milan : The Breast Journal, 2014, Cilt 1.

45. *Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection and radiotherapy in patients with small cancers of the breast.* Veronesi, U, ve diğerleri. 6, Milan : N Engl J Med, 1981, Cilt 305.
46. *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer.* Veronesi, U, ve diğerleri. 32, Milan : N Eng J Med, 2002, Cilt 347.
47. *Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer.* Fisher, B, ve diğerleri. 665-74 : N Eng J Med, 1985, Cilt 312 .
48. *Trends in racial and age disparities in definitive local therapy of early stage breast cancer.* Freedman, RA, ve diğerleri. 713-9: J Clin Oncol 2009, 2009, Cilt 27.
49. *Mastectomy trends for early stage breast cancer: a report from the EUSOMA multi-institutional European database.* Garcia-Etienne, CA, ve diğerleri. 1947-56: Eur J Cancer, 2012, Cilt 48.
50. *Extent of metastatic axillary involvement in 1446 cases of breast cancer.* Verinosi, U, ve diğerleri. 127-33: Eur J Surg Oncol, 1990, Cilt 15.
51. *Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. A first report of results from a prospective randomized clinical trial.* Fisher, B, ve diğerleri. 2827-39: Cancer, 1977, Cilt 39.
52. *Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy.* Guiliano, AE, ve diğerleri. 394-401: Ann Surg, 1995, Cilt 222.
53. *A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer.* Veronessi, , U, ve diğerleri. Milan : N Engl J Med, 2003, Cilt 349, s. 549-53.
54. *Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastasis(BCSG 23.01): a phase 3 randomised controlled trial.* Galimberti, V, ve diğerleri. : Lancet Oncol, 2013, Cilt 14, s. 297-305.
55. *Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis.* Guiliano, AE, ve diğerleri. : JAMA, 2011, Cilt 305, s. 569-75.
56. *Comparison of radioguided excision with wire localization of occult breast lesions.* Luini, A, ve diğerleri. Milan : Br J Surg, 1999, Cilt 86, s. 522-5.
57. *New concept for immediate breast reconstruction for invasive breast cancers; feasibility, oncological safety and esthetic outcome of post-neoadjuvant therapy immediate breast*

- reconstruction versus delayed breast reconstruction: a prospective pilot study.* Giacalone, PL, ve diğeri. : Breast Cancer Res Treat, 2010, Cilt 122, s. 439-51.
58. *Quadrantectomy versus lumpectomy for small size breast cancer.* Veronesi, U, ve diğeri. : Eur J Cancer, 1990, Cilt 26, s. 371-3.
59. *Long term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer.* Whelan, TJ, ve diğeri. : N Engl J Med, 2010, Cilt 362, s. 513-20.
60. *Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial.* Veronesi, U, ve diğeri. : Lancet Oncol, 2013, Cilt 14, s. 1269-77.
61. Sedlmayer, Felix et al.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01343459?term=hiob&rank=1>. [Çevrimiçi] 2011.
62. *A new anti-estrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474.* Cole, MP, Jones, CT ve Todd, ID. : Br J Cancer, 1971, Cilt 25, s. 270-5.
63. *Improved survival among patients treated with adjuvant tamoxifen after mastectomy for early breast cancer.* Baum, M, Brinkley, DM ve Dossett, JA. 450 : Lancet, 1983, Cilt 2.
64. *Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials.* Group, Early Breast Cancer Trialists Collaborative. : Lancet, 1998, Cilt 351, s. 1451-61.
65. Hiscox, S, Davies, EL ve Barrett-Lee, P. *Aromatase inhibitors in breast cancer.* : Maturitas, 2009.
66. *Bone mineral density in breast cancer patients treated with adjuvant letrozole, tamoxifen, or sequences of letrozole and tamoxifen in the BIG 1-98 study.* Zaman, K, ve diğeri. : Ann Oncol, 2012, Cilt 23, s. 1474-1481.
67. *Skeletal effects of exemestane on bone-mineral density, bone biomarkers, and fracture incidence in postmenopausal women with early breast cancer participating in the Intergroup Exemestane Study (IES): a randomised controlled study.* Coleman, RE, ve diğeri. 2: Lancet Oncol, 2007, Cilt 8, s. 119-127.
68. *Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women.* Campos, SM. 2, Massachusetts : Oncologist, 2004, Cilt 9, s. 126-136.
69. *Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing Breast Cancer.* Vogel, VG, Costantino, JP ve Wickerham, DL. Philadelphia : Cancer Prev Res, 2010, Cilt 3, s. 396-706.

70. *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer*. Piccart-Gebhart, MJ, Procter, M ve Leyland-Jones, B. 1659-72 : N Engl J Med, 2005, Cilt 353.
71. *Final overall survival analysis from the CLEOPATRA study of first-line pertuzumab, trastuzumab ve docetaxel in patients with HER2 positive metastatic breast cancer*. Swain, S, Kim, S ve Ro, J. : European Society for Medical Oncology, 2014. 350.
72. *The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Lee, RC ve Feinbaum, RL. : Cell, 1993, Cilt 75, s. 843-854.
73. *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Lendeckel, W ve Tuschl, T. : Science, 2001, Cilt 294, s. 853-858.
74. *The functions of animal microRNAs*. Ambros, V. : Nature, 2004, Cilt 431, s. 350-355.
75. *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Lee, Y, ve diğerleri. : Nature, 2003, Cilt 432, s. 235-240.
76. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function*. Bartel, DP. : Cell, 2008, Cilt 116, s. 281-297.
77. *MicroRNAs in skin and wound healing*. Banerjee, J, Chan, YC ve Sen, CK. : Physiol. Genomics, 2011, Cilt 43, s. 543-556.
78. *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation*. Chen, JF, ve diğerleri. : Nat Genet, 2006, Cilt 38, s. 228-233.
79. *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high density lipoproteins*. Vickers, KC, ve diğerleri. : Nat Cell Biol., 2011, Cilt 113, s. 423-433.
80. *MicroRNA epigenetics: a new avenue for wound healing research*. Bavan, L, Midwood, K ve Nanchahal, J. : BioDrugs, 2011, Cilt 25, s. 27-41.
81. *MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases*. Alevizos, I ve Illei, GG. : Nat Rev Rheumatol, 2010, Cilt 6, s. 391-398.
82. *miRBase: tools for microRNA genomics*. Griffiths-Jones, S, ve diğerleri. : Nucleic Acids Res, 2008, Cilt 36, s. 154-158.
83. *MicroRNA signatures in human cancers*. Calin, GA ve Croce, CM. : Nat Rev Cancer, 2006, Cilt 6, s. 857-66.
84. *MicroRNAs as oncogenes*. Hammond, SM. 1 : Curr Opin Genet Dev, 2006, Cilt 16, s. 4-9.
85. *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Calin, GA, Lui, CG ve Sevignani, C. : Proc Natl Acad Sci USA, 2004, Cilt 101, s. 11755-11760.

86. *Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer*. Corcoran, C, et al. 1 : Clinical Chemistry, 2011, Cilt 57, s. 18-32.
87. *MicroTNAs in cancer invasio and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis related miRNAs*. Aigner, A. 5, Berlin : Journal of molecular medicine, 2011, Cilt 89, s. 445-57.
88. *MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer*. O'day, E ve Lal, A. 2 : Breast Cancer Research, 2010, Cilt 12, s. 201.
89. *Up regulation of miR182 by beta-catenin in breast cancer invreases tumoregnicity and invasiveness by rargetting the matrix metalloproeinase inhibitor RECK*. Chiang, CH, ve diğerleri. 4, : BBA-Gen. Subjects, 2013, Cilt 1830, s. 3067-3076.
90. *miR-182-5p induces by STAT-3 activation promotes glioma tumorigenesis*. Xue, J, ve diğerleri. 14, : Cancer Res, 2016, Cilt 76.
91. *Identificatiion of an Enhancer That Increases miR-200b-200a-429 gen expression in breast cancer cells*. Joanne, L,A, ve diğerleri. 9, Adelaide : Plos one, 2013, Cilt v8. e75517.
92. *miRNA expression patterns in chemoresistant breast cancer tissues*. Jianxin, LV, ve diğerleri. 11, Nanjing : Biomedicine & Pharmacotherapy, 2014, Cilt 9.
93. *microRNA-141 regulates Smad Interacting Protein 1(SIP1) and inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells*. Hu, M, ve diğerleri. 2365: Dig. Dis. Sci, 2010, Cilt 55.
94. *miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition*. Zhao, Hang, ve diğerleri. 7, Zhejiang : Am J Transl Res, 2016, Cilt 8, s. 3106-3114. ISSN:1943-8141.
95. *miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer*. Zhang, Junfeng, ve diğerleri. 3, Shangai : Oncology Reports, 2014, Cilt 31. 1791-2431.
96. *Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, miR-182 in breast cancer*. Irene, K, G ve Bruce, A, W. 35, Connecticut : J Biol Chem, 2009, Cilt 284, s. 23204-23216.
97. *miR-96 promotes the growth of prostate carcinoma cells by suppressing MTSS1*. Xu, L, ve diğerleri. Changchun : Tumour Biol, 2016, Cilt Epub(publication online).
98. *micro-RNA-1 down regulates proliferation and migration of breast cancer stem cells by inhibiting catenin pathway*. Liu, T, ve diğerleri. 39, Harbin : Oncotarget, 2015, Cilt 6.
99. *Abnormal expression of miR-1 in breast carcinoma as a potent prognostic factor*. Minemura, H, ve diğerleri. 11, Sendai : Cancer Sci, 2015, Cilt 106, s. 1642-1650.

100. *miR-10b, a master inhibitor of the cell cycle, is down regulated in human breast tumours.* Biagioni, F, ve diğerleri. 11, Roma : EMBO Mol Med, 2012, Cilt 4, s. 1214-1229.
101. *Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model.* Ma, L, ve diğerleri. 5, Texas : Nat Biotechnol, 2010, Cilt 28, s. 341-347.
102. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer.* Ma, L, Teruya-Feldstein, J ve Weinberg, RA. Texas : Nature, 2007, Cilt 449, s. 682-688.
103. *Functional role of miR-10b in tamoxifen resistance of ER-positive breast cancer cells through down regulation of HDAC4.* A, Ahmad, ve diğerleri. 540, Detroit : BMC Cancer, 2015, Cilt 15.
104. *miR-204 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting slug intrahepatic cholangiocarcinoma cells.* Qui, YH, ve diğerleri. 5, Shanghai : Cell Physiol Biomchem, 2013, Cilt 32.
105. *Loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype.* Ying, Z, ve diğerleri. 2, Guangdong : Cancer Res, 2013, Cilt 73.
106. *MicroRNA-204 increases sensitivity of neuroblastoma cells to cisplatin and is associated with a favourable clinical outcome.* Ryan, J, ve diğerleri. 6, Dublin : Br J Cancer, 2012, Cilt 107.
107. *Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1.* Chung, TK, ve diğerleri. 5, Hong Kong : Int J Cancer, 2012, Cilt 130.
108. *miR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1 induced epithelial to mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer.* Zhang, L, Wang, X ve Chen, P. 290, Zhongda : BMC Cancer, 2013, Cilt 13.
109. *Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization.* Imam, JS et al. 12, Texas : PloS One, 2012, Cilt 7.
110. *Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis.* Ford, HL, ve diğerleri. 21, Boston : Proc Natl Acad Sci U. S. A, 1998, Cilt 95.
111. *miR-204-5p/Six1 feedback loop promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer.* Zeng, J, ve diğerleri. 2, Guangdong : Tumor Biology, 2016, Cilt 37.

112. *Decreased expression of miR-204 is associated with poor prognosis in patients with breast cancer.* Li, W, ve diğerleri. 6, Taiyuan : Int J Clin Exp Pathol, 2014, Cilt 7. 1936-2325/IJCEP0000399.
113. *miR-489 is a tumour suppressive miRNA target PTPN11 in hypofaryngeal squamos cell carcinoma.* Kikawa, N, ve diğerleri. 6, Chiba : Br J Cancer , 2010, Cilt 103.
114. *miR*489 modulates cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by targetting Akt3.* Wu, H, ve diğerleri. 7, Chongqing : Anticancer Drugs, 2014, Cilt 25.
115. *miR-489 regulates chemoresistance in breast cancer via epithelial mesenchymal transition pathway.* Jiang, L, ve diğerleri. 11, Wuxi : FEBS Letters, 2014, Cilt 588.
116. *MicroRNA expression profiling of male breast cancer.* Fassan, M, ve diğerleri. 4 : Breast Cancer Research, 2009, Cilt 11.
117. *Breast Anatomy for the Interventionalist.* Robert, A. 002, 2013, Techniques in Vascular and Interventional Radiology, Cilt 12, s. 3-9.
118. *Gene expression patterns of breast carsinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* Sorlie, T, ve diğerleri. 19 : Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Cilt 98.
119. Technologies, Sample & Assay. *miScript® miRNA PCR Array Handbook.* : QIAGEN, 2012. 05/2012.