

**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İZMİR ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ**

**İMMUNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE MOLEKÜLER
GRUPLARA AYRILMIŞ ERKEN EVRE İNVAZİV
MEME KARSİNOMUNDA BAZAL BELİRTEÇLERİN
KLİNİK VE PATOLOJİK ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Fikret DİRİLENOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Demet ARIKAN ETİT**

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
6/2016 proje numarası ile desteklenmiştir.

**İZMİR
MAYIS – 2017**

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimde büyük emek ve katkıları olan, tezimin hazırlanmasında her aşamada önemli katkıları ve desteği bulunan, her daim bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın Doç. Dr. Demet ARIKAN ETİT'e,

Bir bilimsel araştırma projesinin nasıl yazılacağına inceliklerini öğrenmemde önemli katkıları olan sayın Prof. Tarık TİHAN, Asst. Prof. Melike PEKMEZCİ ve bu süreçte en başından sonuna kadar desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sayın Doç. Dr. Türkan ATASEVER REZANKO'ya,

Başta sevgili Ayhan KANCAR ve Hülya GÖREN olmak üzere, birlikte çalıştığım tüm teknisyenlerimize,

Dört sene boyunca günlerimin çoğunu beraber geçirdiğim, zorluklar karşısında birlik ve destek olan değerli asistan arkadaşlarıma,

İyi bir patolog olarak yetişmemde emek ve özverileri için tüm uzmanlarıma ve hocalarıma;

Her zaman en büyük destekçilerim olan aileme teşekkür ederim.

Mayıs, 2017

Dr. Fikret DİRİLENOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR	V
ŞEKİLLER	VII
TABLOLAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnvaziv meme karsinomu, başka türlü sınıflandırılmayan	4
2.1.1. Histopatoloji	4
2.1.2. Prognostik ve prediktif faktörler	5
2.1.3. Histolojik derecelendirme	5
2.2. Meme tümörlerinde TNM sınıflaması.....	6
2.3. Moleküler sınıflama	10
2.3.1. ER-pozitif meme karsinomu.....	12
2.3.1.1. Luminal A	12
2.3.1.2. Luminal B (Luminal B, HER2-negatif)	12
2.3.2. HER2-pozitif meme karsinomu.....	13
2.3.2.1. Luminal HER2 (Luminal B, HER2-pozitif).....	13
2.3.2.2. HER2-zengin	14
2.3.3. Üçlü negatif meme karsinomu.....	15
2.3.3.1. Bazal-benzeri meme karsinomu	15
2.3.3.2. Sınıflandırılmamış üçlü-negatif alt tip	15
2.3.4. Diğer meme karsinomu alt tipleri.....	16
2.3.4.1. Moleküler apokrin meme karsinomu	16
2.3.4.2. Claudin-low meme karsinomu	16
2.3.4.2. Normal meme-benzeri meme karsinomu	16
2.4. Sitokeratin 5/6.....	16
2.4.1. CK5/6 ve diğer keratinlerin olağan meme epitelindeki ekspresyon özellikleri.....	16
2.4.2. CK5/6'nın meme patolojisindeki kullanımı	17
2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
4. BULGULAR.....	24

5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
ÖZET.....	51
ABSTRACT.....	53
KAYNAKLAR	55



SİMGELER ve KISALTMALAR

AJCC:	American Joint Committee on Cancer Center
AR:	Androgen receptor
ASCO:	American Society of Clinical Oncology
BBMK:	Bazal-benzeri meme karsinomu
CK5/6:	Cytokeratin 5/6
DKİS:	Duktal karsinoma in situ
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
ER:	Estrogen receptor
FISH:	Fluorescence in situ hybridization
GEP:	Gen ekspresyon profillemesi
HE:	Hematoksilen-eozin
HER2:	Human epidermal growth factor receptor-2
HT:	Hormonoterapi
İKÇÜAEAH:	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
İMK-BTS:	İnvaziv meme karsinomu, başka türlü sınıflandırılmayan
KT:	Kemoterapi
LKİS:	Lobuler karsinoma in situ
MKC:	Meme koruyucu cerrahi
MRM:	Modifiye radikal mastektomi
NPI:	Nottingham prognostic index
PCR:	Polymerase chain reaction

PR: Progesteron receptor
ROC: Receiver operating characteristic
RT: Radyoterapi
SMA- α : Smooth muscle actin-alpha
UICC: Union for International Cancer Control



ŞEKİLLER

- Şekil 1.** Luminal A grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), PR >%20 (+), HER2 (-) ve Ki-67 <%14..... 12
- Şekil 2.** Luminal B grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), HER2 (-), PR <%20 veya Ki-67 >%14. 13
- Şekil 3.** Luminal HER2 PR (+) grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), PR (+), HER2 (+) [üçlü pozitif]. 14
- Şekil 4.** Luminal HER2 PR (-) grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), PR (-), HER2 (+). 14
- Şekil 5.** HER2-zengin grubunun klasik İHK özellikleri. ER (-), PR (-), HER2 (+). 14
- Şekil 6.** BBMK grubunun klasik İHK özellikleri. ER (-), PR (-), HER2 (-), EGFR (+), CK5/6 (+). 15
- Şekil 7.** A- Klasik duktal hiperplazi alanında myoepitelyal hücrelerde CK5/6 boyanması. B- DKİS alanında yalnızca periferde bulunan myoepitelyal hücrelerde CK5/6 boyanması 18
- Şekil 8.** Olağan meme parankiminde CK5/6 boyanma paternleri. A- Normal meme duktuslarında myoepitelyal hücrelerde sitoplazmik ve membranöz boyanma. B- Terminal duktal lobüler ünite luminal epitel hücreleri baskın sitoplazmik ve membranöz boyanma 27
- Şekil 9.** İnvaziv meme karsinomu alanlarında CK5/6 pozitifliği. A- İzole hücreler pozitif. B- Fokal, membranöz ağırlıklı pozitif. C, D- Diffüz pozitif. E- Tümör adalarının periferinde fokal pozitif F- Mikst boyanma, yaygın sitoplazmik-membranöz olarak ve izole hücrelerde pozitiflik..... 28
- Şekil 10.** A- Olağan duktus ve lobüllerde EGFR çoğunlukla zayıf bir boyanma gösterdi. B- Bazı olgularda güçlü myoepitelyal boyanma izlendi. Her iki olguda da tümör EGFR (-) olarak saptandı..... 29
- Şekil 11.** EGFR pozitif olgular. A- (1+) şiddetinde boyanma. B- (2+) şiddetinde boyanma. C- (3+) şiddetinde boyanma. 29

Şekil 12. Aynı olguda belirgin farklılık gösteren CK5/6 ve EGFR pozitiflik oranları. A- CK5/6 ile %3 oranında pozitiflik. B- EGFR ile %100 oranında pozitiflik	30
Şekil 13. İHK-temelli moleküler alt gruplarda genel sağkalım eğrisi	32
Şekil 14. İHK-temelli moleküler alt gruplarda progresyonsuz sağkalım eğrisi	32
Şekil 15. CK5/6 pozitifliği – genel sağ kalım eğrisi.....	35
Şekil 16. CK5/6 pozitifliği – progresyonsuz sağ kalım eğrisi	35
Şekil 17. EGFR pozitifliği – genel sağ kalım eğrisi	36
Şekil 18. EGFR pozitifliği – progresyonsuz sağ kalım eğrisi	36



TABLULAR

Tablo 1. Histolojik derecelendirmede kullanılan Modifiye Bloom-Richardson Sistemi	6
Tablo 2. Meme karsinomlarının intrinsik alt tiplerle örtüşen klinikopatolojik alt tiplerinin belirlenmesi	11
Tablo 3. İHK-temelli moleküler gruplara ait detaylı klinik ve patolojik veriler.....	26
Tablo 4. CK5/6 ve EGFR boyanması arasındaki ilişki.....	30
Tablo 5. İHK-temelli moleküler alt gruplarda CK5/6 ve EGFR pozitiflik oranları.....	31
Tablo 6. ROC analizine göre CK5/6 ve EGFR pozitif olguların negatif olgularla klinik ve patolojik karşılaştırması	33
Tablo 7. İzole pozitiflikler dahil CK5/6 ve EGFR pozitif olguların negatif olgularla klinik ve patolojik karşılaştırması.	34
Tablo 8. CK5/6 ve EGFR'nin İHK-temelli moleküler alt gruplarda progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma etkisini gösteren p değerleri	38
Tablo 9. İzole Pozitiflikler Dahil CK5/6 ve EGFR pozitif olguların negatif olgularla klinik ve patolojik karşılaştırması.	39
Tablo 10. Erken evre meme karsinomlu olgularda EGFR'nin İHK-temelli moleküler alt gruplarda progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma etkisini gösteren p değerleri.....	40
Tablo 11. Erken evre meme karsinomlu olgularda bazal pozitifliğin (CK5/6 ve/veya EGFR) İHK-temelli moleküler alt gruplarda progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma etkisini gösteren p değerleri.....	41

1. GİRİŞ:

İnvaziv meme karsinomu kadınlarda görülen en sık kanserdir ve tüm kadın kanserlerinin %23'ünü oluşturur. Meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra 2. sıradadır (1). Hastalıkla etkili bir mücadele için patogenezi ve prognostik özelliklerin aydınlatılması kuşkusuz önemlidir. Meme karsinomlarının heterojen tümörler olduğu bilinmektedir (2,3). Farklı meme karsinomu alt tiplerinde risk faktörleri, klinik bulgular, histopatolojik özellikler, prognoz ve tedaviye yanıt farklı olmaktadır. Bu nedenle olabildiğince alt tiplerin belirlenmesi elzemdir. Prognostik belirteçlerin bilinenleri olan tümör çapı, evre, histolojik derece, lenf nodu ve reseptör durumları klinik uygulama içerisine girmiş olsa da; heterojenitesi ile giderek daha da ün kazanan meme kanserinin daha homojen prognostik ve prediktif alt gruplarını oluşturma çabaları ve buna yönelik biyolojik belirteç arayışı yoğun bir şekilde süregitmektedir (4-6).

Perou, Sorlie ve ark. tarafından gerçekleştirilen global GEP çalışmaları sonucunda meme karsinomları birbirinden farklı biyolojik ve klinik özellikte beş farklı intrinsik moleküler profile ayrılmıştır: Luminal A, luminal B, HER2, bazal-benzeri, normal meme-benzeri tip (7-9). Gen ekspresyon analizleri altın standart olmakla birlikte bu yöntemin klinik pratikte sınırlılıkları; taze/donmuş dokuda çalışma koşulu, yüksek maliyet, karmaşık analiz süreci, teknik olanaklar vb. sebeplerle bu testlere alternatiflerin başında gelen, rutinde kolaylıkla uygulanabilecek İHK-temelli çalışmalara yönelim olmuştur (10). İHK yöntemiyle uygulanan ER, PR ve HER2 ile GEP çalışmalarıyla örtüşen biyolojik alt gruplar oluşturulmuştur (11,12). Kendi içinde biyolojik ve prognostik heterojenite gösteren bazı alt gruplarda da pratikte uygulanabilen belirteçlerle daha homojen alt gruplar elde edilmiştir. 2013 yılında St Gallen'de 95 ülkeden yaklaşık 3700 uzmanın katılımıyla gerçekleştirilen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı panelinde intrinsik meme karsinom alt tipleriyle örtüşen klinikopatolojik eşdeğer alt gruplar belirlenmiştir. Bu alt gruplar ve grupları belirleyen anahtar İHK belirteçler şu şekilde tanımlanmıştır: Luminal A: ER (+), PR >%20 (+), HER2 (-) ve Ki-67 <%14; luminal B: ER (+), HER2 (-), PR <%20 ve/veya Ki-67 >%14; luminal-HER2: ER (+), HER2 (+); HER2-zengin: ER (-) ve

PR (-), HER2 (+); üçlü-negatif: ER (-) ve PR (-), HER2 (-) (13). Semikantitatif olarak değerlendirilen Ki-67 ve PR boyaları luminal grupların daha özellikli alt tiplere ayrılmasında yardımcı olarak kullanılabilir (14,15). Ayrıca luminal HER2 alt grubu da PR'nin pozitif veya negatif olmasına göre farklı klinik özellikteki iki alt gruba daha ayrılabilir (16).

Üçlü negatif meme karsinomlarının (ER-/PR-/HER2-) bir alt grubunda, gen ekspresyon dizilerinde yüksek düzeyde CK5, CK14, CK17 mRNA ekspresyonu olduğu bulunmuştur. Bu çalışma öncesinde Dairkee ve ark. CK5, 14 ve 17'nin normal memenin sadece bazal (myoepitelyal) tabakasında bulunabileceğini öne sürdüğü için, bu belirteçleri eksprese eden üçlü negatif tümörler BBMK olarak isimlendirilmiştir (17). Oysa bu belirteçlerin meme duktus ağacındaki hücrelerin konumuna bağlı olarak luminal veya bazal tabakadan eksprese edildiği gösterilmiştir (18–21).

BBMK, keratin (CK5/6, CK14, CK17) yanı sıra EGFR, c-KIT, vimentin, fascin, INPP4B, nestin gibi oldukça fazla sayıda diğer proteinleri de eksprese etmektedir (12,22–24). BBMK ile ilişkili bu belirteçlerin tümü “bazal belirteçler” olarak önerilmiştir ve bir kısmı İHK yöntemiyle rutinde saptanabilmektedir. Nielsen ve ark.'nın BBMK olgularında yaptıkları İHK ilintili çalışmada daha önce GEP çalışmaları sonucu elde edilmiş BBMK olduğu bilinen olgulara ait parafin bloklar kullanılmıştır. Sonuç olarak ER (-), HER2 (-) ve bazal belirteçlerden CK5/6 veya EGFR (+) olan olguların BBMK'leri belirlemede %76 sensitivite ve %100 spesifite gösterdiği bildirilmiştir (12). Bu çalışmanın ardından CK 5/6 ve EGFR belirteçleri patoloji pratiğinde ve bilimsel araştırmalarda, BBMK olgularını belirleyebilmek amacıyla sıkça kullanılmaktadır (14,25–27) .

Meme karsinomlarında bazal belirteç ekspresyonu birçok çalışmada kötü prognostik parametrelerle ilişkili bulunmuştur (12,28–31). Bazal belirteçlerin BBMK dışındaki meme karsinomu alt gruplarında da (ör. luminal ve HER2-zengin) %1-18 oranlarında ekspresyonu belirtilmekle birlikte spesifik alt gruplardaki prognostik ve prediktif önemine odaklı araştırmalar devam etmektedir (32). Örneğin luminal A

grubu üzerinde yakınlarda yapılan çalışmalarda CK5/6 veya EGFR ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (31,33). HER2 pozitif hastalıkta %10 ve üzeri CK5/6 pozitifliği gösteren tümörler, diğer luminal-HER2 ve HER2-zengin tümörlere göre daha büyük boyutlu ve daha fazla yinelemeyle ilişkili bulunmuştur (34). Bir başka çalışmada HER2 (+) hastalıkta bazal-pozitif tümörlerin kötü prognoz gösterdiği ve hücre serilerinde trastuzumab direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (35).

Bu çalışmada amacımız BBMK'leri belirlemede en sık kullanılan bazal belirteçlerin (CK5/6 ve EGFR), İMK güncel İHK-temelli moleküler alt gruplarında klinik ve patolojik önemini araştırmaktı. Ayrıca değişken pozitiflik gösterebilen bu belirteçler için klinik açıdan anlamlı olabilecek boyanma alt sınır değerlerini (cut-off) saptamaya çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. İnvaziv Meme Karsinomu, Başka Türü Sınıflandırılmayan

İMKBTS (duktal karsinom olarak da bilinir) invaziv meme karsinomları içinde en geniş grubu (%40-75) oluşturmaktadır (2013 yılı Türkiye Birleşik Veri Tabanı'na göre tüm meme karsinomlarının % 81.2'si (36)). Karakteristik özelliklere sahip tümörlerdeki ör. lobüller veya tübüller karsinom, spesifik histopatolojik özelliklere sahip olmayan, heterojen bir tümör grubunu temsil etmektedir (37).

2.1.1. Histopatoloji

Bilinen diğer meme karsinomu tipleri dışlandıktan sonra İMKBTS tanısı konulabilir. Bu tanı kategorisi içerisinde morfolojik özellikler tümörden tümöre belirgin değişiklikler göstermektedir. Tümör büyüme paterni, infiltratif ya da itici tarzda olabilir. Bazı tümörlerde kordonlar, kümeler ve trabeküller görülürken, bazılarında nadir stromalı solid veya sınırsız baskın infiltratif patern izlenir. Bir kısım olguda tümör hücrelerinde lümenleri açık tübüler yapılar belirgindir. Tek tek infiltratif hücreler şeklinde ya da targetoid özellikler gösterebilir de; lobüller karsinomun sitomorfolojik özelliklerini taşımaz. Hücresel özellikler de değişiklik göstermektedir. Sitoplazma bol, eozinofilik olabilir. Nükleuslar düzenli ve uniform olabileceği gibi, belirgin nükleol içeren pleomorfik görünüm sergileyebilir. Mitoz bazen hiç saptanmayabilir, bazı olgularda ise çarpıcı, atipik formlar da içerir ve çok sayıda olabilir. Stromal komponent değişken miktardadır. Oldukça sellüler fibroblastik proliferasyon ya da seyrek bağ doku elemanları veya belirgin hyalinizasyon olabilir. Bazı tümörlerde nekroz veya eşlikçi lenfoplazmasiter infiltrasyon görülebilir.

İMKBTS tanısı için tümörün %50'sinden fazlası BTS paterninde olmalıdır. Pleomorfik karsinom, osteoklast-benzeri stromal dev hücreler içeren karsinom, koryokarsinomatöz özellikler içeren karsinom, melanotik özellikler içeren karsinom gibi bazı nadir morfolojik varyantlar tanımlanmış olmakla birlikte, bu tümörler henüz farklı bir antite olarak kabul edilmemiştir. %80'e varan oranlarda DKİS odağı eşlik

eder. Eşlikçi DKİS odağı invaziv karsinom ile genellikle aynı nükleer dereceye sahiptir (37).

2.1.2. Prognostik ve prediktif faktörler

İMK-BTS prognoz ve yönetim açısından diğer tiplerle benzer özellikte veya biraz daha kötü seyrebilmektedir. 10 yıllık sağ kalım oranları %35-50 arasındayken; tüm meme karsinomlarında bu oran %55'tir. Prognoz evre, lenf nodu durumu, histolojik derece, tümör boyutu, vasküler invazyon, tedavi prediktörleri, hormon reseptörler ve HER2 durumu ile ilişkilidir. Diğer prognostik parametreler içerisinde tümörün histolojik tipi, tümör proliferasyon hızı, moleküler belirteçler bulunmaktadır (38,39).

2.1.3. Histolojik derecelendirme

Tüm meme karsinomlarında histolojik derece klasik olarak üç parametre ile belirlenmektedir: tübül-gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz. Pek çok çalışmada histolojik derece ile hasta sağ kalımı arasında ilişki gösterilmiştir. Meme karsinomu klinik yönetiminde kullanılan NPI ve Adjuvant! Online gibi yöntemlerin anahtar bileşenlerinden biri olan histolojik derecelendirme, patoloji raporlarında belirtilmesi gereken olmazsa olmaz bilgilerdendir.

Patey ve Scarf ile Bloom ve Richardson tarafından önerilen yöntemler, Elston ve Ellis tarafından daha objektif bir forma dönüştürülmüş ve günümüzde de kullanılmakta olan Modifiye Bloom-Richardson Sistemi oluşturulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Histolojik derecelendirmede kullanılan Modifiye Bloom-Richardson Sistemi

<i>Kriter</i>	<i>Skor</i>
Tübül formasyonu	
Tümörün büyük çoğunluğunda (>%75)	1
Orta derecede (% 10-75)	2
Minimal veya hiç yok (<%10)	3
Nükleer Pleomorfizm	
Küçük, uniform hücreler	1
Orta derecede şekil ve boyut farkı, nükleol varlığı	2
Belirgin şekil ve boyut farkı, sıklıkla çok sayıda nükleol	3
Mitoz Sayısı	
0-9	1
10-19	2
>20	3

Toplam Skor; 3-5: Derece I, 6-7: Derece II, 8-9: Derece III

Değerlendirme yapılırken tübül formasyonu için küçük büyütmelerde tüm tümöral alan, nükleer pleomorfizm için en yüksek dereceli alan, mitoz için de mitozun en yoğun olduğu alan incelenmelidir.

Tübül ve glandüler yapılar, ortası boş bir lümen etrafında kutuplaşmış neoplastik hücreler olarak değerlendirilmelidir. Nükleer pleomorfizm belirlenirken komşu meme dokusundaki epitelin boyut ve şekli temel alınmalıdır. Ayrıca nükleer membran düzensizliği ile nükleol sayı ve boyutu da skorlamada yardımcı özelliklerdir. Mitoz en uygun doku fiksasyonu olan iyi alınmış kesitlerde dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Hiperkromatik ve piknotik nükleuslar görmezden gelinerek net olan mitotik figürler 10 farklı büyük büyütme alanında sayılmalıdır.

2.2. Meme Tümörlerinde TNM Sınıflaması

Evrelemede kullanılan en yaygın sistem, AJCC/UICC tarafından yayımlanan TNM sistemidir. Primer tümörün genişliği (T), bölgesel lenf nodları (N) ve uzak

metastaz (M) bilgileri bir araya getirilerek beş evre düzeyi (evre 0, I, II, III ve IV) belirlenir. Evreleme, lokal hastalığın kontrolü ve sistemik tedaviden görülecek faydanın ön görüşü yanı sıra; klinik ve epidemiyolojik çalışmalar ve diğer araştırmalarda karşılaştırma bakımından önemlidir (40).

Primer Tümör - patolojik (pT)

pTX Primer tümör değerlendirilemiyor

pT0 Primer tümöre ait kanıt yok

pTis Karsinoma in situ

pTis DKİS

pTis LKİS

pTis (Paget) Meme başının, altta yatan meme dokusunun invaziv karsinomu ve/veya karsinoma in situ (DKİS ve/veya LKİS) tanısıyla ilişkili olmayan Paget hastalığı. Altta yatan parenkimin Paget hastalığı ile ilişkili karsinomları, boyuta göre sınıflandırılmalı ancak Paget hastalığının varlığı işaret edilmelidir

pT1 Tümörün en büyük çapı ≤ 20 mm

pT1mi Tümörün en büyük çapı ≤ 1 mm

pT1a Tümörün en büyük çapı >1 mm fakat ≤ 5 mm

pT1b Tümörün en büyük çapı >5 mm fakat ≤ 10 mm

pT1c Tümörün en büyük çapı >10 mm fakat ≤ 20 mm

pT2 Tümörün en büyük çapı >20 mm fakat ≤ 50 mm

pT3 Tümörün en büyük çapı >50 mm

pT4 Herhangi bir boyuttaki tümörün direkt göğüs duvarı ve/veya cilt (ülserasyon veya cilt nodülleri) tutulumu var

pT4a Yalnızca pektoral kas yapışıklığını/invazyonunu içermeyen göğüs duvarı tutulumu var

pT4b İnflamatuar karsinom için gerekli olan özellikleri karşılamayan, cilt ülserasyon ve/veya ipsilateral satellit nodülleri ve/veya ödemi (peau d'orange dahil)

pT4c Hem T4a hem de T4b

pT4d İnflamatuar karsinom

Bölgesel Lenf Nodları – patolojik (pN)

pNX Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir (örneğin önceden çıkarılmıştır veya patolojik çalışma için çıkarılmamıştır)

pN0 Bölgesel lenf nodu metastazı histolojik olarak tanımlanmamıştır

pN0 (i-) Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı yok, İHK negatif

pN0 (i+) Bölgesel lenf nod(lar)da 0.2 mm daha büyük olmayan malign hücreler (HE) veya İHK ile saptanan, izole tümör hücresi dahil

pN0 (mol-) Bölgesel lenf nodu metastazı histolojik olarak yoktur, Moleküler bulgular (Real-Time PCR) negatif

pN0 (mol+) Moleküler bulgular (ters-transkriptaz/PCR) pozitifdir ancak bölgesel lenf nodu metastazı histoloji veya İHK ile saptanmamış

pN1 Mikrometastazlar veya 1-3 adet aksiller lenf nodu metastazı ve/veya sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanmış ancak klinik olarak saptanmamış internal mammarian lenf nodu metastazı var

pN1mi Mikrometastazları vardır (0.2 mm'den büyük ve/veya hiçbiri 2.0 mm'den daha büyük olmayan 200'den fazla hücre)

pN1a 1-3 adet aksiller lenf nodu metastazı, 2.0 mm'den daha büyük olan en az bir adet metastazı var

pN1b İnternal mammarian nodlarında mikrometastazları veya sentinel lenf nod biyopsisinde saptanan fakat klinik olarak saptanmamış makrometastazları var

pN1c 1-3 adet aksiller lenf nodu ve internal mammarial lenf nodu mikrometastazları veya sentinel lenf nod biyopsisinde saptanan fakat klinik olarak saptanmamış makrometastazları var

pN2 4-9 adet aksiller lenf nodu veya aksiller lenf nodu yokluğunda klinik olarak saptanmış internal mammarial lenf nodu metastazı var

pN2a 4-9 adet aksiller lenf nodu metastazı (2.0 mm'den daha büyük olan en az bir adet tümör depoziti) var

pN2b Aksiller lenf nodu yokluğunda klinik olarak saptanmış internal mammarial lenf nodu metastazı var

pN3 10 veya daha fazla aksiller lenf nodu veya infraklavikular (level III aksiller) lenf nodu veya bir veya daha fazla pozitif level I, II aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak saptanmış ipsilateral internal mammarian lenf nodu veya 3'ten daha

fazla aksiller lenf nodu mikrometastazı veya sentinel lenf nodu ile saptanmış fakat klinik olarak saptanmamış makrometastazları veya ipsilateral supraklavikular lenf nodu metastazları var

pN3a 10 veya daha fazla aksiller lenf nodu (2.0 mm'den daha büyük olan en az bir adet tümör depoziti) veya infraklavikular (level III aksiller) lenf nodu metastazı var

pN3b Bir veya daha fazla aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak saptanmış ipsilateral internal mammarian lenf nodu metastazı veya 3'ten fazla aksiller lenf nodu ve internal mammarial lenf nodu mikrometastazı veya sentinel lenf nodu ile saptanmış fakat klinik olarak saptanmamış makrometastazları var

pN3c İpsilateral supraklavikular lenf nodu metastazları var

Uzak Metastaz (M):

M0 Uzak metastazın klinik veya radyografik kanıtı yok

cM0 (i+) Klinik veya radyografik uzak metastaz kanıtı yoktur fakat metastaza ait belirti ve bulgusu olmayan hastada kan dolaşımında, kemik iliğinde veya diğer bölgesel olmayan lenf nodlarında 0.2 mm'den daha büyük olmayan moleküler depozitler veya mikroskopik olarak saptanmış tümör hücreleri var

M1 Klasik klinik ve radyografik yöntemlerle belirlenen ve/veya histolojik olarak kanıtlanmış 0.2 mm'den büyük saptanabilir uzak metastazlar var

2.3. Moleküler Sınıflama

2000 yılında Perou ve ark.'ın gerçekleştirdiği GEP çalışmaları sonucunda meme karsinomlarının moleküler portresi ortaya konmuştur (7). Meme karsinomlarının fenotipik çeşitliliği uzun yıllardır bilinmekle birlikte, bu farklılığın gen ekspresyon paternlerinde de görülmesi, hastalığın aslında heterojen bir grup tümörden oluştuğunu kanıtlamıştır. Perou ve Sorlie'nin birbirini doğrulayan GEP çalışmaları sonucunda beş farklı intrinsek meme karsinomu moleküler alt tipi ortaya konmuştur: luminal A, luminal B, HER2-pozitif, bazal benzeri, normal meme benzeri (7–9). Rutinde uygulanması oldukça zor, maliyeti yüksek ve teknik kısıtlılıklar içeren GEP analizleri yerine; bu alt grupları yansıtabilecek, eşdeğer İHK belirteçlerin belirlenebilmesi amacıyla çok sayıda araştırma yapılagelmektedir. Bu belirteçler aynı zamanda alt grupları daha da özgün prognostik gruplara ayırmada yardımcı olmaktadır. Güncel literatürde belirtilen İHK-temelli moleküler alt gruplar aşağıdaki tabloda (Tablo 2) özetlendi:

Tablo 2. Meme karsinomlarının intrinsik alt tiplerle örtüşen klinikopatolojik alt tiplerinin belirlenmesi

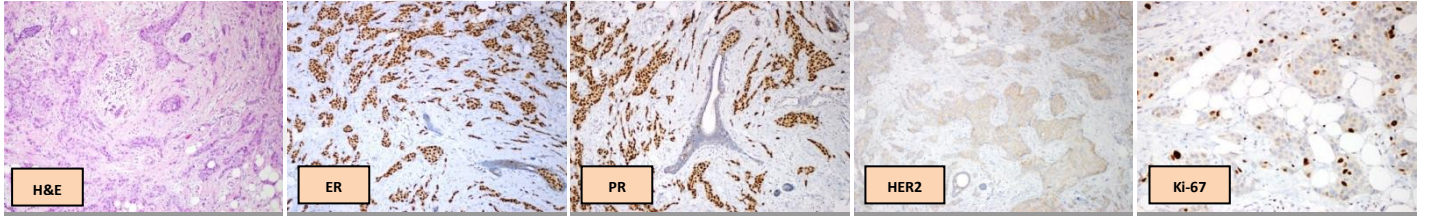
İntrinsik alt tip	Klinikopatolojik Tanımlama	Notlar
Luminal A	Luminal A-benzeri Tümü: ER ve PR + HER2 – Ki-67 düşük ^a	^a Yüksek ve düşük Ki-67 değerlerini ayırtlamada kullanılan kesim-noktası laboratuvarlar arasında değişkenlik göstermektedir. Bir referans laboratuvar çalışmasına göre Luminal A grubunu yansıtan GEP ile uyumlu sonuç veren sınır <%14 bulunmuştur.
Luminal B	Luminal B-benzeri (HER2 negatif) ER + HER2 – ve en az biri: Ki-67 yüksek PR – veya düşük Luminal B-benzeri (HER2 pozitif) ER + HER2 aşırı-eksprese veya amplifiye Luminal HER2, PR pozitif (PR ≥ %1) Luminal HER2, PR negatif (PR < %1)	Luminal A-benzeri grubun karakteristiklerini taşımayan bu grup için, yüksek Ki-67 değeri veya düşük PR değeri (<%20) bu iki grubu ayırt etmede kullanılabilir.
Erb-B2 aşırı-eksprese	HER2-zengin (non-luminal) HER2 aşırı-eksprese veya amplifiye ER ve PR –	
Bazal-benzeri	Üçlü negatif Bazal-benzeri ER, PR ve HER2 (-) CK5/6 veya EGFR (+) Sınıflandırılmayan ER, PR, HER2, CK5/6 ve EGFR (-)	Üçlü negatif grup ile intrinsik ‘bazal-benzeri’ alt-tip arasında %80 örtüşme vardır.

2.3.1. ER-pozitif meme karsinomu

Çoğu ER-pozitif tümör luminal A ve luminal B alt tipi içerisinde yer almaktadır. Normal meme dokusundaki luminal epitelyal hücre profiline uyan özellikler gösterir. Endokrin tedavi uygulanabilen, diğer alt tiplere göre iyi prognozla ilişkili gruptur. Biyolojik olarak heterojen özelliktedir. (41).

2.3.1.1. Luminal A

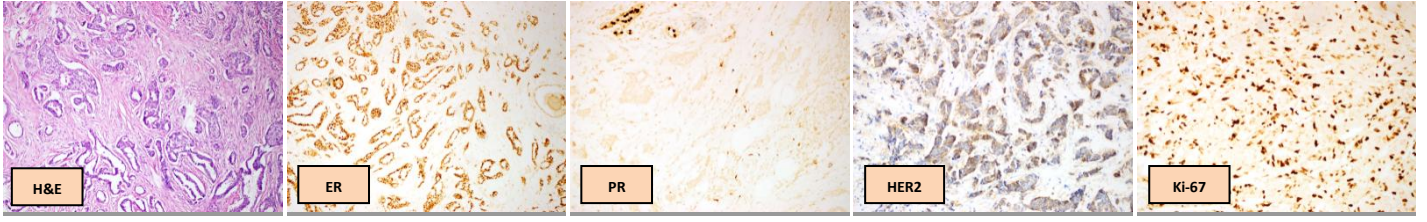
Tüm meme karsinomlarının %30-40'ını içermektedir. En yüksek seviyede ER ekspresyonunun izlendiği gruptur. HER2 aşırı-ekspresyonu görülmez (42). Histolojik olarak çoğu luminal A tümör iyi diferansiye İMK-BTS, tübüler karsinom, klasik lobüler karsinom, müsinöz karsinom ve nöroendokrin karsinomları içerir (43). İHK ile bu grup sıklıkla yüksek ER ve PR eksprese eder ve HER2 negatif, Ki-67 ise düşüktür. Luminal A grubunu belirlemede en yaygın şu İHK belirteçler kullanılır: ER (+), PR >%20 (+), HER2 (-) ve Ki-67 <%14 (Şekil 1).



Şekil 1. Luminal A grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), PR >%20 (+), HER2 (-) ve Ki-67 <%14.

2.3.1.2. Luminal B (Luminal B, HER2-negatif)

Tüm meme karsinomlarının %20-30'unu oluşturmaktadır. Luminal-spesifik genler düşük-orta derecede eksprese olmaktadır. HER2 ekspresyonu görülmez (44). Luminal A'ya kıyasla p53 mutasyonu daha sık ve PIK3CA mutasyonu daha az görülmektedir (45). Histolojik olarak çoğunlukla daha az diferansiye İMK-BTS ile bazı invaziv mikropapiller karsinomları içermektedir (14,46). Luminal B grubunu belirlemede en yaygın şu İHK belirteçler kullanılır: ER (+), HER2 (-), PR <%20 veya Ki-67 >%14 (Şekil 2).



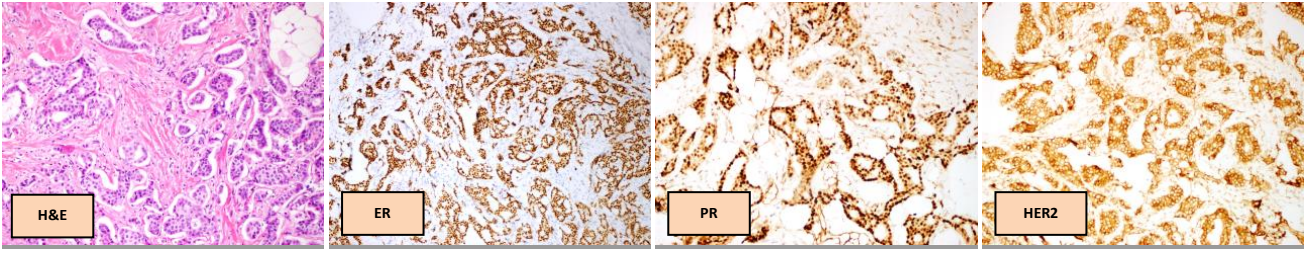
Şekil 2. Luminal B grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), HER2 (-), PR <%20 veya Ki-67 >%14.

2.3.2. HER2-pozitif meme karsinomu

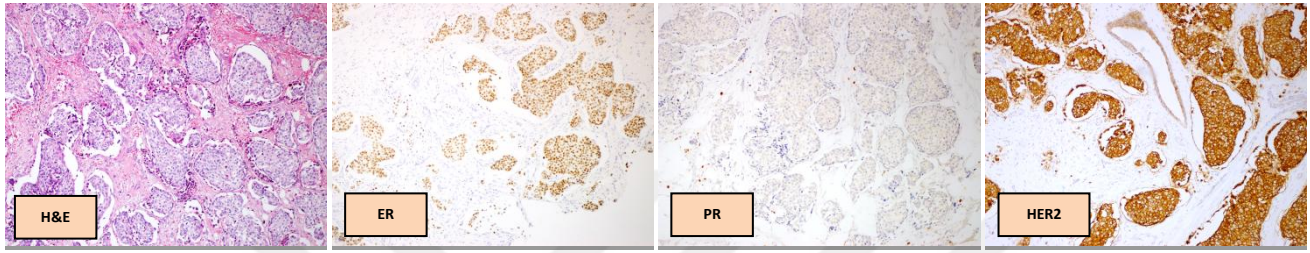
Tüm meme karsinomlarının %12-20'sini içermektedir. Moleküler özellikleri oldukça heterojendir. HER2-pozitif tümörlerde tedavi cevabı ve sağ kalımı belirleyen en önemli faktör hormon reseptör durumudur (16,47,48). Fountzilias ve ark. çalışmalarında luminal HER2 ve HER2-zengin alt tiplerinin farklı sağ kalım eğrileri ve metastaz paternleri bulunan klinik olarak ayrı tümörler olduğunu öne sürdüler (49). HER2-pozitif tümörler iki grupta incelenir:

2.3.2.1. Luminal HER2 (Luminal B, HER2-pozitif)

HER2 pozitif tümörlerin yaklaşık yarısı bu grup içindedir. HER2-negatif tümörlere oranla daha düşük düzeylerde de olsa ER-pozitiftir (50–52). Histolojik olarak çoğunlukla derece 2 veya 3 tümörlerdir. Nodal metastaz daha sıktır ve endokrin tedaviye yanıt genellikle daha azdır. (53,54). Bir çalışmada hormon reseptör-negatif grupla karşılaştırıldığında daha sık bölgesel yineleme bildirilmektedir (55). Luminal HER2 alt tipi PR ekspresyonuna göre, her biri ayrı klinik özellikler gösteren iki farklı alt gruba daha ayrılabilir: ER (+), PR (+), HER2 (+) [üçlü pozitif] ve ER (+), PR (-), HER2 (+) (56,57) (Şekil 3 ve 4). PR ekspresyonunun HER2 aşırı ekspresyonuyla ters ilişkili olması, bu tümörlerde PR ekspresyon kaybının ve aktive EGFR/HER2 yolağının bir göstergesi olabileceği öne sürülmektedir (58,59). Luminal HER2 grubunda PR negatifliğinin, PR pozitif alt gruba kıyasla daha iyi sağ kalımla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (16,60).



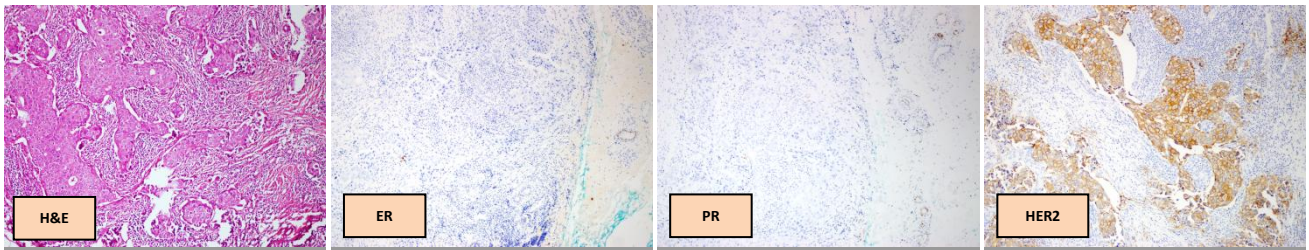
Şekil 3. Luminal HER2 PR (+) grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), PR (+), HER2 (+) [üçlü pozitif].



Şekil 4. Luminal HER2 PR (-) grubunun klasik İHK özellikleri. ER (+), PR (-), HER2 (+).

2.3.2.2. HER2-zengin

GEP'e göre ER ekspresyonu düşük olan veya hiç olmayan ve luminal grupta bulunan diğer bazı transkripsiyon faktörlerini eksprese eden alt gruptur. Bu alt tipin yaklaşık %71'inde p53 mutasyonu ve reseptör tirozin kinaz yolağı aktivasyonu, ör. EGFR, fibroblast-benzeri büyüme faktörü-4 ve HER2; %39'unda PIK3CA mutasyonu görülmektedir (7,8,45). Histolojik olarak İMK-BTS dışında, ER-negatif özel tipte tümörleri de içermektedir. Bazı apokrin karsinom ve pleomorfik lobüler karsinomlar da bu grup içerisinde. HER2-zengin grubunu belirlemede en yaygın şu İHK belirteçler kullanılır: ER (-), PR (-), HER2 (+) (Şekil 5).



Şekil 5. HER2-zengin grubunun klasik İHK özellikleri. ER (-), PR (-), HER2 (+).

2.3.3. Üçlü-negatif meme karsinomu

Kötü prognozla ilişkili ve hedefe yönelik tedavisi bulunmayan alt gruptur (61,62). Üçlü negatif olarak adlandırılan ER, PR ve HER2 negatif tümörlerin büyük bir kısmı BBMK içerisinde yer almakla birlikte bu iki kavram birbiriyle eşdeğer değildir (63). Histolojik olarak çoğu İMK-BTS olsa da, farklı morfoloji ve klinik davranışa sahip bazı özel tipteki meme karsinomlarını da içermektedir, ör. adenoid kistik karsinom, sekretuar karsinom ve medüller özellikler taşıyan karsinom (64,65).

2.3.3.1. BBMK

Tüm meme karsinomlarının yaklaşık %15'i bu grupta yer almaktadır. Histoloji, KT yanıtı, metastaz ve sağ kalım açısından oldukça farklı özellikler gösterebilmektedir (66,67). BBMK, GEP çalışmalarında tanımlanan, CK5 ve 17, laminin ve yağ asidi-bağlayan protein 7 gibi meme bazal epitelyal hücrelerine ait gen ekspresyon özelliklerini taşımaktadır. Bu grup ER, PR, HER2, CK5/6 ve EGFR İHK belirteçleri kullanılarak da belirlenebilmektedir (12). Histolojik olarak, sıklıkla yüksek dereceli, daha büyük boyutlu, itici tarzda sınırları olan, NPI'sı ve özellikle ilk 5 yılda yinelemesi ve sağ kalımı kötü olan tümörleri içermektedir (68–70). İlginç olarak, adenoid kistik karsinom ve sekretuar karsinomun da aralarında bulunduğu, histolojik derecesi düşük ve iyi prognoz gösteren küçük bir tümör grubu da BBMK içerisinde bulunmaktadır (63,71,72). BBMK için en yaygın şu İHK belirteçler kullanılır: ER (-), PR (-), HER2 (-), CK5/6 (+) ve/veya EGFR (+) (Şekil 6).



Şekil 6. BBMK grubunun klasik İHK özellikleri. ER (-), PR (-), HER2 (-), EGFR (+), CK5/6 (+).

2.3.3.2. Sınıflandırılmamış üçlü-negatif alt tip

CK5/6 ve EGFR ile de negatiflik gösteren nadir bir üçlü-negatif alt grubudur (31,73). Rakha ve ark. yaptığı çalışmada bu grubun BRCA1 ile daha az ilişkili olduğunu ve BBMK'dan biraz daha iyi seyrettiğini ileri sürdü (74).

2.3.4. Diğer meme karsinomu alt tipleri

2.3.4.1. Moleküler apokrin meme karsinomu

Apokrin histolojiye sahip, ER (-) ve AR (+) tümörleri kapsar (75,76). GEP çalışmaları sonucunda ER (-), AR (+) ve FOXA (+) olsalar da; İHK incelemede sırasıyla %93'ü ER (-) , %58'i AR (+) ve %90'ı FOXA (+) bulunmuştur (77). Bu alt grubun özelliklerinin tam olarak ortaya konması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.3.4.2. Claudin-low meme karsinomu

Luminal belirteçlerin düşük veya hiç eksprese olmadığı, stromal-spesifik ve lenfosit veya granülosit-speifik gen işaretlerinin yüksek seviyede ekspresyonu, E-cadherinibi hücre-hücre adhezyon moleküllerinin düşük düzeyde ekspresyonunun (epitelyal-mezenkimal geçiş özelliği fazla) saptandığı gruptur (78–80). Bu alt tip içinde genel olarak metaplastik karsinom ve medüller özellikler taşıyan karsinomlar bulunur (79). Genellikle üçlü-negatif ve kötü prognozlidir. Moleküler olarak heterojen bir tümör grubunu oluşturmaktadır (73,78).

2.3.4.3. Normal meme-benzeri meme karsinomu

Orijinal GEP çalışmasında tanımlanan, normal meme ve fibroadenomlarla benzer özellikler gösteren gruptur (7). Sonraki çalışmalar, bu grubun teknik bir artefakta bağlı, bol miktarda normal meme dokusu örneğini içermesi sebebiyle oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir (81,82).

2.4. CK5/6

2.4.1. CK5/6 ve diğer keratinlerin olağan meme epitelindeki ekspresyon özellikleri

Hücre iskeleti tüm memeli hücrelerinde üç tip filamandan oluşmaktadır: aktin mikrofilamanları (4-6 nm), ara filamanlar (10 nm) ve mikrotübüller (25 nm). Ara filaman proteinlerinin ekspresyonu (özellikle CKler) epitelyal hücre tipini, dokunun büyümesi, diferansiasyonu ve fonksiyonel durumunu göstermektedir (83).

Normal meme epiteli karmaşık bir hücresel yapıya sahiptir ve CK İHK profiliyle tanımlanan üç farklı hücre popülasyonuna sahip olduğu bilinmektedir. Luminal tabaka, dual bir hücre popülasyonundan oluşmaktadır: glandüler tip ve bazal tip luminal epitelyal hücreler. Glandüler tip luminal epitel hücreleri basit epitelyal

keratinleri (CK7, CK8, CK18, CK19) ile ilişkilidir. Bazal tip luminal epitel hücreleri ise bazal tip keratinleri (CK5, CK14, CK17) eksprese ederken SMA- α eksprese etmez. Bazal tabaka (myoepitelyal hücreler), bazal tip keratinleri (CK5, CK14, CK17) ve SMA- α eksprese eden myoepitelyal hücrelerden oluşur (84).

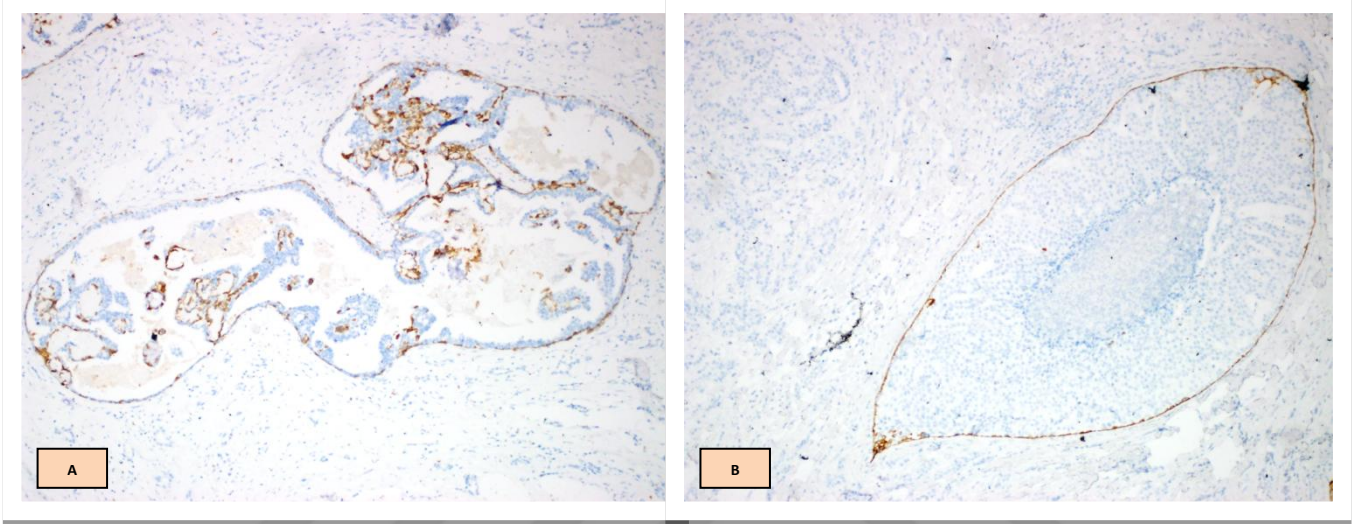
Dairkee ve ark. 1988'de CK14'ü eksprese eden ve kötü prognoza sahip üçlü negatif meme karsinomlarının bir alt grubunu tanımlamışlardır (17). Bu kanserlerin "bazal yerleşimli öncü hücreler"den kaynaklandığını ve farklılaşmamış bazal kök hücrelerden köken alan tümörleri temsil edebileceklerini öne sürmüşlerdir. 2000li yılların başlarında üçlü negatif meme karsinomlarının bir alt kümesinde, gen ekspresyon dizilerinde yüksek düzeyde CK5, CK14, CK17 mRNA ekspresyonu olduğu bulunmuştur (7). Bu çalışma öncesinde Dairkee ve ark. CK5, 14 ve 17'nin normal memenin sadece myoepitelyal/bazal tabakasında bulunabileceğini öne sürdüğü için, bu tümörler BBMK olarak adlandırılmıştır (21,63). Bu durum, ER+ ve HER2(+) meme kanserlerinin meme dokusunun luminal tabakasından, BBMK'nin ise bazal tabakasından geliştiğine dair farklı algılamalara yol açmış gibi görünmektedir.

Bununla birlikte, BBMK terminolojisinin yaygınlaştırılmasından önce bile [53], birçok araştırmacı CK5/6, 14 ve 17'nin memenin luminal tabakasından eksprese edildiğini ve bu gerçeğin çoğunlukla gözden kaçırıldığını göstermiştir (85–88). Sonraki çalışmalar da CK5/6, 14 ve 17'nin ağırlıklı olarak normal memenin lobülleri içindeki "luminal tabakadan" eksprese edildiğini doğrulamıştır (18,19). Bir diğer önemli gözlem ise, geniş duktuslarda çoğunlukla myoepitelyal CK5/6, 14 ve 17 ekspresyonu görülürken; meme lobüllerinde bu keratin belirteçlerin ekspresyonu yavaş yavaş luminal hücrelerce gerçekleşmektedir (18–20). Böylece, insan meme duktüleri ağacındaki hücrelerin konumuna bağlı olarak CK5/6, 14 ve 17 luminal veya bazal olabilmektedir.

2.4.2. CK5/6'nın meme patolojisindeki kullanımı:

İnvaziv karsinom geliştirme riski değişken, memenin proliferatif intraepitelyal lezyonlarının ayırıcı tanısında CK5/6 oldukça yardımcıdır. Klasik

duktal hiperplazi CK5/6 ile yoğun bir şekilde boyanırken; daha yüksek riskli lezyonlar olan atipik duktal hiperplazi, DKİS ve LKİS olgularının büyük çoğunluğunda %5'in altında boyanma izlenir ya da hiç boyanma olmayabilir (84) (Şekil 7). Klasik duktal hiperplazi lezyonlarının CK5/6 ile boyanma özelliği, bu lezyonlarla morfolojik olarak karışan solid papiller tipte DKİS'nin ayırımında da kullanışlı bulunmuştur (89)



Şekil 7. A- Klasik duktal hiperplazi alanında myoepitelyal hücrelerde CK5/6 boyanması. **B-** DKİS alanında yalnızca periferde bulunan myoepitelyal hücrelerde CK5/6 boyanması.

CK5/6 BRCA1-ilişkili meme kanserlerinde de sıklıkla eksprese olmaktadır (90,91). Nielsen ve ark.'ın yaptığı çalışmaya göre ER, HER2, CK5/6 ve EGFR BBMK'nın İHK yöntemiyle belirlenmesinde kullanılabilir. Bir başka çalışmada CK5/6'nın, bir diğer bazal keratin belirteci olan CK14'e kıyasla BBMK'yi daha yüksek oranlarda saptadığı bildirilmiştir (92). Meme kansinomlarında CK5/6'ya da içeren bazal keratinler birçok çalışmada kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (12,28–31). Literatürde pozitiflik için belirtilen alt sınır değer herhangi bir sitoplazmik-membranöz pozitiflik ile %20 oranı arasında değişmektedir (12,29,30,70,93).

2.5. EGFR

Epidermal büyüme faktörü (EGF), çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve diferansiasyonunu etkileyebilen 53-amino asitlik bir polipeptiddir. EGF'ye bağlı peptidler meme kanserinin patogeneğinde önemli rol

oyun [86]. EGF'nin indüklediği hücreler hücre zarı reseptörü olan EGFR aracılığıyla yapılır. EGFR (HER1, c-erbB-1) yapısal ve işlevsel olarak benzer özellikler taşıyan dört adet transmembran büyüme faktör reseptöründen biridir (94).

EGFR, memenin epitelyal ve myoepitelyal hücrelerince eksprese edilir ve normal meme büyümesi ve yetişkin meme dokusunun devamlılığında önemlidir (95). Sürekli EGF uyarımı sonucu hücreler EGFR'yi aşırı eksprese etmeye başlar (96). EGFR ekspresyonu ise artmış tümöral proliferatif aktivite, anjiyogenez ve metastatik potansiyel ile ilişkilidir (97).

HER2 İHK ekspresyon değerlendirmesine benzer kriterler kullanıldığında, tüm meme kansinolarının %10'undan azında EGFR aşırı ekspresyonu görülmüştür (98). Bir çalışmada artmış EGFR gen-kopya sayısı ile en iyi korelasyon gösteren İHK boyanmasının 3+ İHK skor olduğu bulunmuştur (98). Ancak prognostik çalışmalarda CK5/6'da olduğu gibi EGFR pozitifliğinin belirlenmesinde de bir konsensus bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda pozitiflik için alt sınır değer sitoplazmik-membranöz herhangi bir pozitiflik ile %10 arasında değişmekte veya H-skor değerlendirilmesiyle belirlenmektedir (12,23,99-102)

EGFR ekspresyonu veya aşırı ekspresyonu gösteren tümörler genellikle steroid hormon reseptörleri negatiftir (70,103). Meme kansinomu moleküler sınıflamasına göre EGFR ekspresyonu, CK5/6 ekspresyonu ile birlikte çoğunlukla BBMK'da görülmektedir (12,68).

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

Çalışmamıza İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul komisyonu'nun 24.08.2016 tarih ve 92 no'lu kararıyla onay alınmıştır.

Hastalar ve Klinik Bilgileri: İKÇÜAEAH'de Ocak 2007-Ekim 2011 arasında tümü uzak metastazsız (Evre I, II, III), İMK-BTS tanılı ve klinik takipli kadın hastalar retrospektif olarak Tıbbi Patoloji ve Tıbbi Onkoloji Kliniği elektronik bilgi sistemlerinden (Probel Yazılım, www.probel.com.tr) elde edildi. Her bir olguya ait yaş, menopozal durum, tümör lateralizasyonu, ameliyat tipi, odak sayısı, tümör çapı, tümörün histolojik derecesi, DKİS veya LKİS varlığı, cerrahi sınır durumu, evre, aksiller lenf nodu durumu, İHK boya sonuçları (ER, PR, HER2, Ki-67), aldığı tedaviler (HT, KT, RT ve diğer hedefe yönelik tedavi ajanları; ör. trastuzumab), klinik takip ve sağ kalım bilgileri not edildi. Menopoz durumu premenopoz ve postmenopoz olarak, ameliyat tipi MKC, basit mastektomi ve MRM olarak; odak sayısı tek veya multipl şeklinde ayrıldı. Evre I, II ve IIIA erken evre, evre IIIC erken ileri evre olarak gruplandı (104). Lenf nodu durumu N0, N1, N2, N3 olarak dört gruba ayrıldı. Eşlikçi ölümcül hastalığı bulunan olgular çalışmaya alınmadı. Yeterli klinik ve takip verisi olmayan veya yeterli nitelik ve nicelikte patoloji materyali bulunmayan olgular da çalışma dışı bırakıldı.

Tümörlerin histopatolojik ve İHK özelliklerinin tekrar değerlendirilmesi: Klinik bilgileri yeterli olan olgulara ait tüm lamlar İKÇÜAEAH Tıbbi Patoloji Kliniği lam arşiv odasından temin edildi. Tez asistanı, tez uzmanıyla birlikte HE lamları ve pozitif kontrolü bulunan İHK boyalı lamları tekrar değerlendirdi. Tümörün histolojik derecesi Modifiye Scarff Bloom Richardson sistemi ile belirlendi (105) (Tablo 1).

ER ve PR için %1 ve üzerinde boyanma pozitif kabul edildi (106). HER2 durumu değerlendirmesinde ASCO 2013 güncel kılavuzuna göre İHK ve FISH analizleri kullanıldı (107,108). Tümör hücrelerinin %10 ve fazlasında, sitoplazmik membranda çepeçevre (kümes teli şeklinde) güçlü boyanma (10X objektifle net

görülebiyecek şekilde) varlığında HER2 pozitif (skor 3+) olarak değeriendirildi. Skor 0: a. tümör hücrelerinde boyanma olmaması, b. tümör hücrelerinin %10'unun azında inkomplet ve belirsiz boyanma varlığında; Skor 1+: tümör hücrelerinin %10 ve üzerinde inkomplet ve belirsiz şiddette membranöz boyanma varlığında HER2 negatif olarak belirtildi. Skor 2+: a. tümör hücrelerinin %10 ve üzerinde inkomplet veya zayıf/orta şiddette membranöz boyanma b. tümör hücrelerinin %10'undan azında çepeçevre ve güçlü membranöz boyanma varlığında HER2 sonucu belirsiz olarak not edildi. HER2 skor 2+ olgular FISH analiziyle değeriendirilerek HER2 pozitif veya negatif olarak kaydedildi. FISH analizinde en az 50 hücre sayılarak, HER2 sinyali/CEP17 (kromozom 17 sentromer) sinyali oranı ≥ 2 olan olgular HER2 pozitif olarak değeriendirildi. Ki-67 proliferasyon indeksi, boyanma yüzdesinin en fazla olduğu alanda (hot spot), 40X'lik objektif ile değeriendirildi.

İHK çalışmalarına ait teknik özellikler: Laboratuvarımızdaki standart doku takip ve boyama işlemlerine göre, olgulara ait spesimenler ve alınan parçalar %10'luk nötral-tamponlu formaldehit solüsyonu içerisinde 24-48 saat süresince tespit edildi. Sonraki aşamada alınan doku örnekleri rutin kapalı doku takip sistemi ile takip edilerek parafine gömüldü.

ER, PR, HER2 ve Ki-67 boyaları: Hazırlanan parafin bloklardan alınan 3 mikronluk kesitler lizinli lamlara aktarıldı. Üretici firmanın yönergesine göre boyama işlemleri gerçekleştirildi. Streptovidin biotin peroksidaz yöntemi ile ER (Novocastra, fare monoklonal antikoru, SP1 klonu, 1:40 dilüsyon), PR (Novocastra, fare monoklonal antikoru, SP2 klonu, 1:100 dilüsyon), HER2 (Novocastra, fare monoklonal antikoru, CB11 klonu, 1:40 dilüsyon), Ki-67 (Novocastra, fare monoklonal antikoru, MIB1 klonu, 1:100 dilüsyon), EGFR (Novocastra, fare monoklonal antikoru, EGFR.25 klonu, 1:100 dilüsyon), CK5/6 (Dako, fare monoklonal antikoru, D5/16 B4 klonu, kullanıma hazır). Pozitif kontrol olarak ER, PR, CK5/6 için tümöre komşu olağan meme parankimi; HER2, Ki-67 ve EGFR için ise pozitif kontrol olarak tümörlü meme dokuları kullanılmıştır.

İHK-temelli moleküler alt grupların belirlenmesi: Tüm olgular 2013 yılında St Gallen’de gerçekleştirilmiş olan Uluslararası Meme Kanseri Konferansı sonuçlarında belirtildiği üzere intrinsik meme karsinom alt tipleriyle örtüşen alt gruplara ayrıldı (107) (Tablo 2). Güncel literatürde prognostik önemi olduğu belirtilen daha spesifik alt gruplar da ayrıca irdelendi. Bu amaçla HER2 (+) olgular luminal B içerisinden ayrılıp luminal HER2 [ER (+), HER2 (+)] grubuna dahil edildi. Luminal HER2 grubu ise PR pozitifliği ($PR \geq \%1$) veya negatifliğine ($PR < \%1$) göre 2 gruba daha ayrıldı: luminal HER2 PR (+), luminal HER2 PR (-) (14,15), (16).

Bazal belirteçlerin (CK5/6 ve EGFR) çalışılması: Arşivden çıkarılan lamalar değerlendirilirken her olgudan tümörlü doku içeren bir adet parafin blok seçildi. Uygun nitelikte olan blokların her birinden ikişer adet lizinli lama kesit alınarak CK5/6 ve EGFR boyaları uygulandı.

CK5/6 ve EGFR boyalarının değerlendirilmesi: Boyanma sınır değerleri ROC analiziyle belirlendi. İnvaziv tümör hücrelerinde CK5/6 için %1.5 ve üzeri; EGFR için %2.5 ve üzeri sitoplazmik ve/veya membranöz boyanmaya göre olgular her bir boya için pozitif ve negatif olarak ayrıldı. Ayrıca izole pozitifliklerin anlamını değerlendirebilmek amacıyla %1’in altında boyanma izole pozitiflik olarak kabul edildi.

Veri Analizi: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS paket programı kullanılarak yapıldı. Yaş, menopozal durum, tümör lateralizasyonu, ameliyat tipi, odak sayısı, tümör çapı, tümörün histolojik derecesi, DKİS veya LKİS varlığı, cerrahi sınır durumu, evre, aksiller lenf nodu durumu, İHK boya sonuçları ve aldığı tedavilere ait sıklıklar, İHK-temelli moleküler gruplara göre çarpaz tablolar kullanılarak verildi. Gruplar için bu sıklıklar arasında fark bulunup bulunmadığı yerine göre Ki-kare ya da Fisher testleri (hücrelerde gözlenen değerler Ki-kare testi varsayımlarını sağlamadığı durumda) kullanılarak karşılaştırıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. Normal dağılım göstermeyen veya ordinal değişkenler, gruplar arasında Mann-Whitney U testi ile

karşılaştırıldı. En az biri normal dağılmayan ya da ordinal olan değişkenler arası ilişkiler için korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar Spearman testi ile hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı. Yaşam analizinde Kaplan Meier Analizi, sağ kalım eğrisi karşılaştırılmasında log rank testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak değerlendirildi.



4. BULGULAR:

Klinik ve Patolojik Bilgiler: İKÇÜAEAH'de Ocak 2007-Ekim 2011 arasında tanı almış, tümü Tıbbi Onkoloji Kliniği tarafından takipli ve uzak metastazı bulunmayan, İMK-BTS tanı 187 olgu hastane bilgi sisteminden elde edildi. Tıbbi Patoloji Kliniği arşivinde parafin bloğu bulunmayan 27 olgu (konsültasyon olguları) ile histopatolojik olarak yeniden gözden geçirme sırasında yetersiz nitelik ve nicelikte doku içeren 7 olgu, mikst tipte meme karsinomu saptanan 3 olgu ile CK5/6 ve EGFR boyaları için kesitlerde yeterli invaziv tümöral alan bulunmayan 10 olgu çalışma dışı bırakıldı. En az bir bazal belirteç boyası değerlendirilebilen toplam 140 olgu çalışmaya alındı.

Olguların tümü kadın ve median yaş 51 idi (33-78). Olguların 79'u (%56.4) premenopozal, 61'i (%43.6) postmenopozal dönemdeydi. Lateralizasyonu bilinen tümörlerin 62'si (%44.6) sağ meme, 77'si (%55.4) sol meme yerleşimliydi. Olguların 83'ünde (%64.8) MKC, 41'inde (%32) MRM, 4'ünde (%3.1) basit mastektomi uygulanmıştı. On iki olguya ait ameliyat tipi bilgisine ulaşılamadı. Kayıtlarına ulaşılan tümörlerin 123'ü (%89.1) tek odakta, 15'i (%10.9) multipl idi. Ortalama tümör çapı 2.4 cm idi (0.6-7 cm). Histolojik derecesi değerlendirilebilen olguların 17'sinde (%12.5) derece 1, 99'unda (%72.8) derece 2, 20'sinde (14.7) derece 3 idi. 135 olgudan 89'unda (%65.9) DKİS odağı izlenmiş olup, bu olguların bir tanesinde LKİS de saptandı. Cerrahi sınır durumu değerlendirilebilen olguların 5'inde (%3.8) cerrahi sınır pozitif, 127'sinde (%96.2) negatifti. Klinik ve radyolojik olarak tanı anında hiçbir olguda uzak metastaz bulunmamaktaydı. Olguların 58'i (%41.4) evre I, 57'si (%40.7) evre II ve 25'i (%17.9) evre III'tü. Olguların baskın çoğunluğu (133 olgu, %95) erken evrede, 7'si ise (%5) erken ileri evredeydi. Aksiller lenf nodu durumu olguların 76'sında (%54.3) N0, 40'ında (%28.6) N1, 17'sinde (%12.1) N2, 7'sinde (%5) N3 idi. Olguların 64'ünde (%45.7) aksiller lenf nodu metastazı mevcuttu. 127 olgu (%90.7) HT, 122 olgu (%87.1) KT ve 114 olgu (%81.4) RT almıştı. Median takip süresi 90.7 ay (28-119 ay) idi. Takip süresince olguların 18'inde (%12.9) nüks meydana geldi, 10 olgu (%7.1) eks oldu. Median *progresyonsuz* sağ kalım süresi 88 ay (14-117 ay), median sağ kalım süresi 92 ay (27-120 ay) idi.

İHK-temelli moleküler alt gruplara ait özellikler: ER, PR, HER2, Ki-67, CK5/6 ve EGFR boyanma sonuçları ile 140 olgudan 50'si (%35.7) luminal A, 56'sı (%40) luminal B, 19'u (%13.6) luminal HER2 PR (+), 4'ü (%2.9) luminal HER2 PR (-), 5'i (%3.6) HER2-zengin ve 6'sı (%4.3) üçlü-negatif meme karsinomu olarak sınıflandırıldı. Çalışmamıza dahil edilen tüm üçlü-negatif olgular, en az bir bazal belirteç pozitifliği gösterdiğinden BBMK olarak gruplandı.

İHK-temelli moleküler gruplara ait detaylı klinik ve patolojik veriler Tablo 3'te belirtildi.

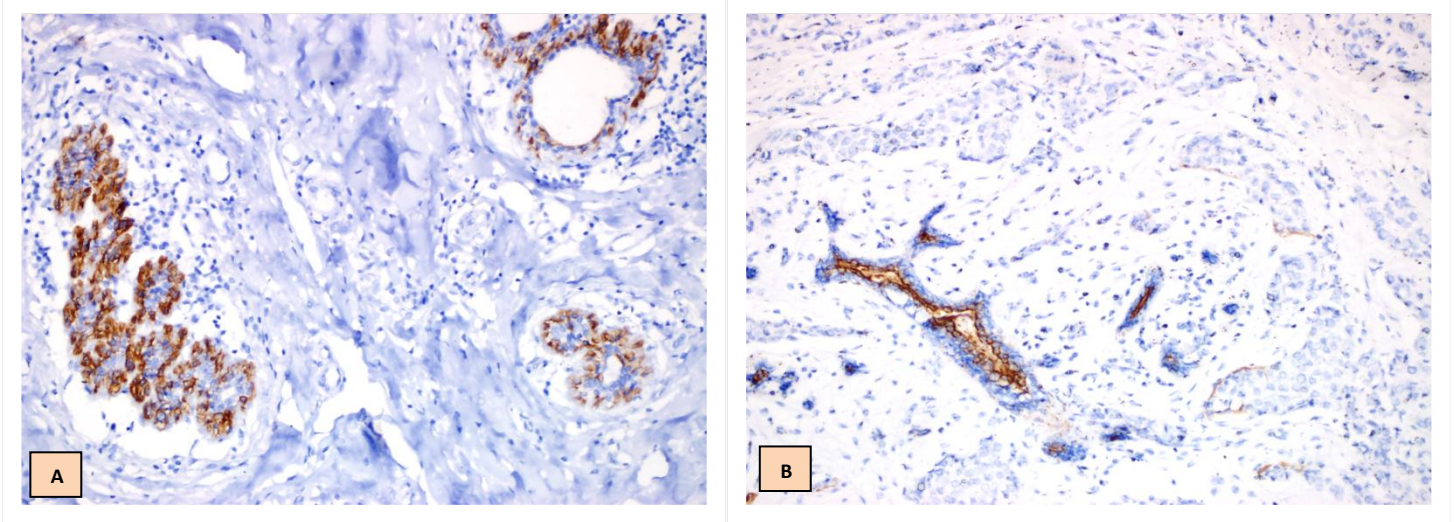


Tablo 3. İHK-temelli moleküler gruplara ait detaylı klinik ve patolojik veriler

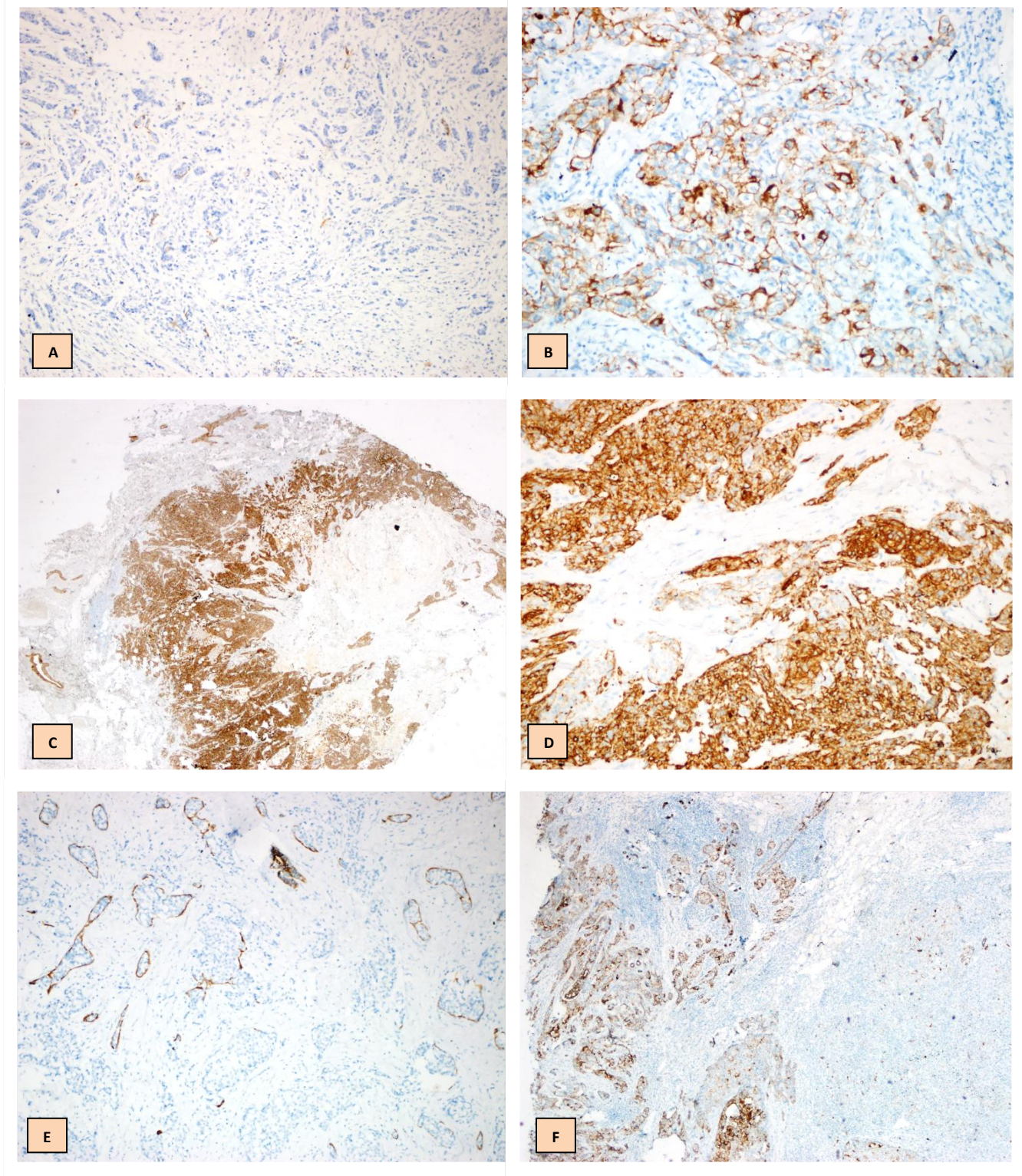
Klinik ve Patolojik Parametreler		İHK-temelli moleküler alt grup											
		Luminal A		Luminal B		Luminal HER2 PR+		Luminal HER2 PR-		HER2 zengin		Bazal-benzeri	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Yaş	<40	5	(10)	10	(18)	3	(16)	0	(0)	0	(0)	1	(17)
	40-55	27	(54)	24	(43)	5	(26)	4	(100)	4	(80)	3	(50)
Menopozal durum	>55	18	(36)	22	(39)	11	(58)	0	(0)	1	(20)	2	(33)
	premenopoz	30	(60)	27	(48)	10	(53)	4	(100)	4	(80)	4	(67)
Lateralizasyon	postmenopoz	20	(40)	29	(52)	9	(47)	0	(0)	1	(20)	2	(33)
	sağ	27	(54)	22	(39)	8	(42)	2	(67)	0	(0)	3	(50)
Operasyon tipi	sol	23	(46)	34	(61)	11	(58)	1	(33)	5	(100)	3	(50)
	MKC	31	(69)	33	(61)	12	(67)	2	(67)	2	(50)	3	(75)
Tümör odağı	basit mastektomi	2	(4)	2	(4)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
	MRM	12	(27)	19	(35)	6	(33)	1	(33)	2	(50)	1	(25)
	tek odak	43	(88)	48	(86)	19	(100)	4	(100)	4	(80)	5	(100)
Tümör çapı	multipl	6	(12)	8	(14)	0	(0)	0	(0)	1	(20)	0	(0)
	<2	37	(74)	26	(46)	11	(58)	4	(100)	3	(60)	3	(50)
	2-5	11	(22)	24	(43)	7	(37)	0	(0)	2	(40)	2	(33)
Histolojik derece	>5	2	(4)	6	(11)	1	(5)	0	(0)	0	(0)	1	(17)
	1	12	(24)	3	(6)	2	(11)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
	2	37	(74)	45	(83)	12	(67)	1	(25)	3	(60)	1	(20)
DKİS	3	1	(2)	6	(11)	4	(22)	3	(75)	2	(40)	4	(80)
	yok	33	(70)	39	(70)	9	(47)	3	(75)	3	(60)	2	(50)
Cerrahi sınır	var	14	(30)	17	(30)	10	(53)	1	(25)	2	(40)	2	(50)
	negatif	46	(100)	52	(93)	16	(94)	4	(100)	5	(100)	4	(100)
Evre	pozitif	0	(0)	4	(7)	1	(6)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
	evre 1	26	(52)	15	(27)	9	(47)	4	(100)	1	(20)	3	(50)
	evre 2	20	(40)	26	(46)	8	(42)	0	(0)	2	(40)	1	(17)
Lenf nodu evresi	evre 3	4	(8)	15	(27)	2	(11)	0	(0)	2	(40)	2	(33)
	0	31	(62)	25	(45)	11	(58)	4	(100)	1	(20)	4	(67)
	1	15	(30)	17	(30)	6	(32)	0	(0)	2	(40)	0	(0)
	2	4	(8)	8	(14)	2	(11)	0	(0)	1	(20)	2	(33)
Lenf nodu tutulumu	3	0	(0)	6	(11)	0	(0)	0	(0)	1	(20)	0	(0)
	yok	31	(62)	25	(45)	11	(58)	4	(100)	1	(20)	4	(67)
Trastuzumab	var	19	(38)	31	(55)	8	(42)	0	(0)	4	(80)	2	(33)
	almadı	50	(100)	56	(100)	11	(58)	2	(50)	2	(40)	6	(100)
Hormonoterapi	aldı	0	(0)	0	(0)	8	(42)	2	(50)	3	(60)	0	(0)
	almadı	0	(0)	0	(0)	1	(5)	2	(50)	5	(100)	5	(83)
Kemoterapi	aldı	50	(100)	56	(100)	18	(95)	2	(50)	0	(0)	1	(17)
	almadı	11	(22)	6	(11)	1	(5)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Radyoterapi	aldı	39	(78)	50	(89)	18	(95)	4	(100)	5	(100)	6	(100)
	almadı	15	(30)	7	(13)	3	(16)	0	(0)	1	(20)	0	(0)
Progresyon durumu	aldı	35	(70)	49	(88)	16	(84)	4	(100)	4	(80)	6	(100)
	yok	45	(90)	49	(88)	16	(84)	4	(100)	5	(100)	3	(50)
Sağ kalım durumu	var	5	(10)	7	(13)	3	(16)	0	(0)	0	(0)	3	(50)
	yaşıyor	50	(100)	50	(89)	17	(89)	4	(100)	5	(100)	4	(67)
	eks	0	(0)	6	(11)	2	(11)	0	(0)	0	(0)	2	(33)

CK5/6 ve EGFR Boyama Sonuçları: Boyaları incelenen 140 olgudan yeterli invaziv tümör alanı bulunmayan iki olguda sadece CK5/6, diğer ikisinde sadece EGFR boyanması değerlendirildi. Her iki boya açısından değerlendirmeye uygun 136 olgu mevcuttu.

CK5/6 olağan meme parankiminde myoepitelyal veya luminal epitelyal hücrelerde boyanma gösterdi (Şekil 8). Pozitif olgularda sitoplazmik ve membranöz boyanma paterni izlendi. Bazı tümör adalarında periferik boyanmalar gözlemlenirse de aynı olgularda diğer tümöral alanlarda sitoplazmik ve membranöz boyanma eşlik etmekteydi. Değerlendirilebilen 138 olgudan 34'ü (%24.6) CK5/6 pozitif. İzole pozitiflikler (<%1) dahil edildiğinde, 85'inde (%61.6) boyanma izlendi. Bu olgulardan 30 tanesinde (tüm olguların %21.7'si) izole hücrelerde boyanma mevcuttu. Tümörlerin boyanma yüzdesi % 0-100 arasında değişkenlik gösterdi (Şekil 9).



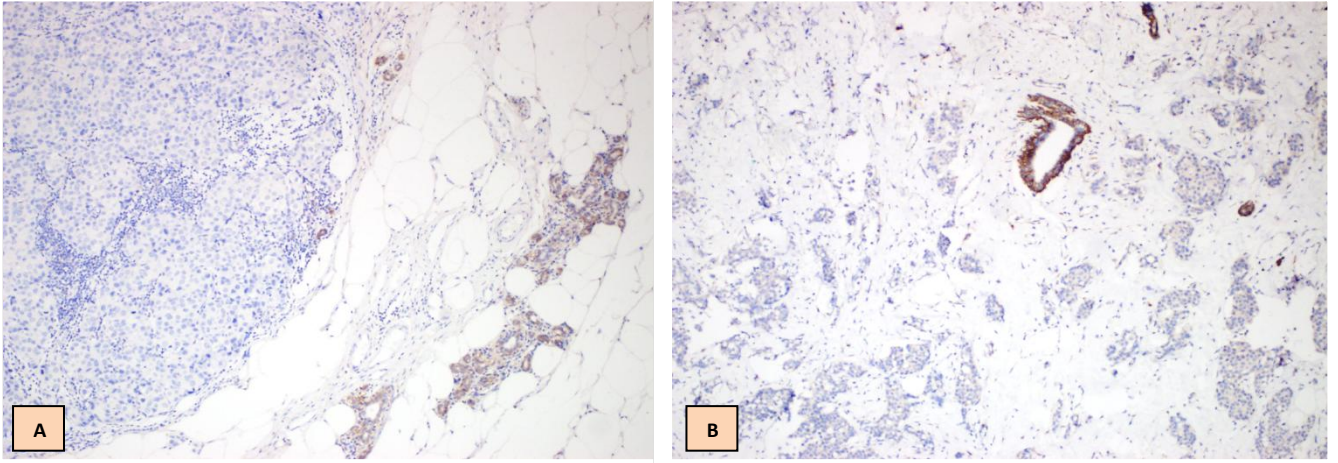
Şekil 8. Olağan meme parankiminde CK5/6 boyanma paternleri. **A-** Normal meme duktuslarında myoepitelyal hücrelerde sitoplazmik ve membranöz boyanma. **B-** Terminal duktal lobüler üniteye luminal epitel hücreleri baskın sitoplazmik ve membranöz boyanma.



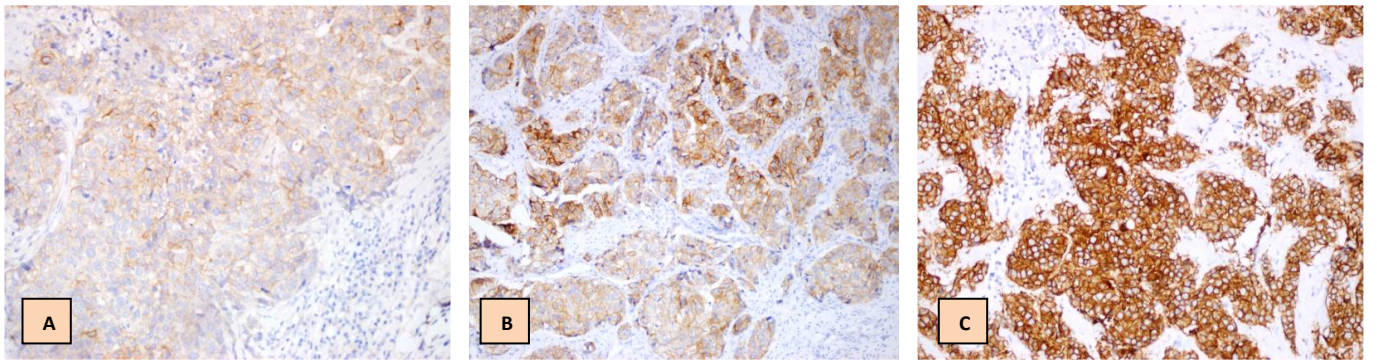
Şekil 9. İnvaziv meme karsinomu alanlarında CK5/6 pozitifliği. **A-** İzole hücreler pozitif. **B-** Fokal, membranöz ağırlıklı pozitif. **C, D-** Diffüz pozitif. **E-** Tümör adalarının periferinde fokal pozitif. **F-** Mikst boyanma, yaygın sitoplazmik-membranöz olarak ve izole hücrelerde pozitiflik.

EGFR olağan meme parankiminde epitelyal ve myoepitelyal hücrelerde genellikle zayıf, bazı alanlarda ise güçlü boyanma gösterdi (Şekil 10). Pozitif

olgularda sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma paterni mevcuttu. Üç olguda tümör adalarında belirgin periferik boyanma (inside-out patern) dikkati çekti. Bu olgular myoepitelyal belirteçlerle incelendiğinde aynı tümöral alanlarda boyanma görülmediğinden, bu boyanma paterni pozitif kabul edildi. Değerlendirilebilen 138 olgudan 35'i (%25.4) EGFR pozitifti. İzole pozitiflikler dahil edildiğinde, 75'inde (%54.3) boyanma kaydedildi. Bu olgulardan 26 tanesinde (tüm olguların %18.8'i) izole hücrelerde (<%1) boyanma mevcuttu. Tümörlerin boyanma yüzdesi % 0-100 arasında değişkenlik gösterdi. İzole boyanmalar hariç tutulduğunda, 31 olguda zayıf, 14 olguda orta şiddette, 4 olguda şiddetli boyanma izlendi (Şekil 11).

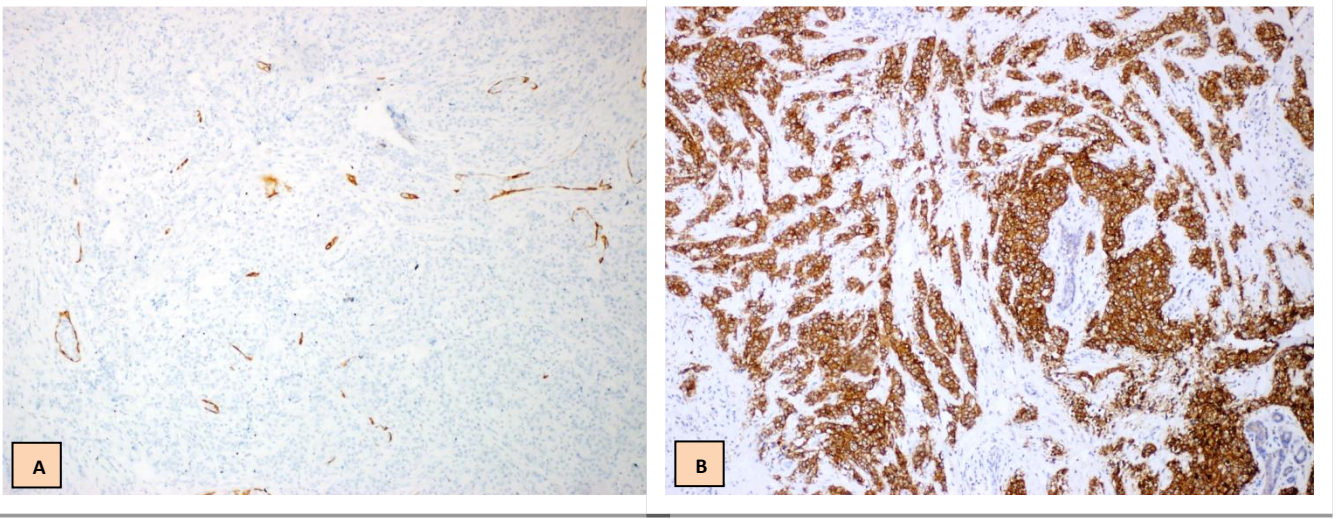


Şekil 10. A- Olağan duktus ve lobüllerde EGFR çoğunlukla zayıf bir boyanma gösterdi. B- Bazı olgularda güçlü myoepitelyal boyanma izlendi. Her iki olguda da tümör EGFR (-) olarak saptandı.



Şekil 11. EGFR pozitif olgular. A- (1+) şiddetinde boyanma. B- (2+) şiddetinde boyanma. C- (3+) şiddetinde boyanma.

CK5/6 ve EGFR pozitiflik korelasyonu orta derecede ($r=0.53$) ve çok anlamlı düzeydeydi ($p<0.001$, Spearman testi). Ancak her iki belirtecin birlikte boyandığı bazı olgularda *boyanma yüzdeleri* arasında belirgin farklılıklar dikkati çekti (Şekil 12). En az bir belirtecin pozitif izlendiği olgu sayısı 48 (%34.3), her iki belirtecin birlikte pozitif izlendiği olgu sayısı 21 (%15.4) idi. EGFR ve CK5/6 pozitiflikleri arasındaki ilişki Tablo 4’te gösterildi.



Şekil 12. Aynı olguda belirgin farklılık gösteren CK5/6 ve EGFR pozitiflik oranları. **A-** CK5/6 ile %3 oranında pozitiflik. **B-** EGFR ile %100 oranında pozitiflik.

Tablo 4. CK5/6 ve EGFR boyanması arasındaki ilişki

			CK5/6		Total
			negatif	pozitif	
EGFR	negatif	Sayı	92	11	103
		%	%89.3	%10.7	%100
	pozitif	Sayı	12	21	33
		%	%36.4	%63.6	%100
Total		Sayı	104	32	136
		%	%76.5	%23.5	%100

İzole boyanmalar (<%1) dahil, herhangi bir boyanma pozitif kabul edildiğinde de EGFR ve CK5/6 pozitifliği arasında orta derecede ($r=0.47$) ve çok

anlamli korelasyon ($p<0.001$) mevcuttu. İzole boyanmalar dahil edildiğinde, en az bir belirteç pozitifliği bulunan olgu sayısı 99 (%71); her iki belirtecin birlikte boyanma gösterdiği olgu sayısı 60 (%44.1) idi.

İHK-temelli moleküler gruplara ait boyanma verileri Tablo 5'te belirtildi.

Tablo 5. İHK-temelli moleküler alt gruplarda CK5/6 ve EGFR pozitiflik oranları

		CK5/6*				EGFR*				CK5/6 Alt Grup**				EGFR Alt Grup**			
		negatif		pozitif		negatif		pozitif		<1,5		>1,5		<2,5		>2,5	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
İHK-temelli Moleküler Alt Gruplar	Luminal A	20	(40.8)	29	(59.2)	24	(48.0)	26	(52.0)	41	(83.7)	8	(16.3)	42	(84.0)	8	(16.0)
	Luminal B	22	(39.3)	34	(60.7)	28	(50.9)	27	(49.1)	42	(75.0)	14	(25.0)	44	(80.0)	11	(20.0)
	Luminal HER2 PR+	7	(36.8)	12	(63.2)	7	(36.8)	12	(63.2)	13	(68.4)	6	(31.6)	11	(57.9)	8	(42.1)
	Luminal HER2 PR-	1	(25.0)	3	(75.0)	2	(50.0)	2	(50.0)	2	(50.0)	2	(50.0)	3	(75.0)	1	(25.0)
	HER2 zengin	2	(40.0)	3	(60.0)	1	(25.0)	3	(75.0)	3	(60.0)	2	(40.0)	2	(50.0)	2	(50.0)
	Bazal- benzeri	1	(20.0)	4	(80.0)	1	(16.7)	5	(83.3)	3	(60.0)	2	(40.0)	1	(16.7)	5	(83.3)

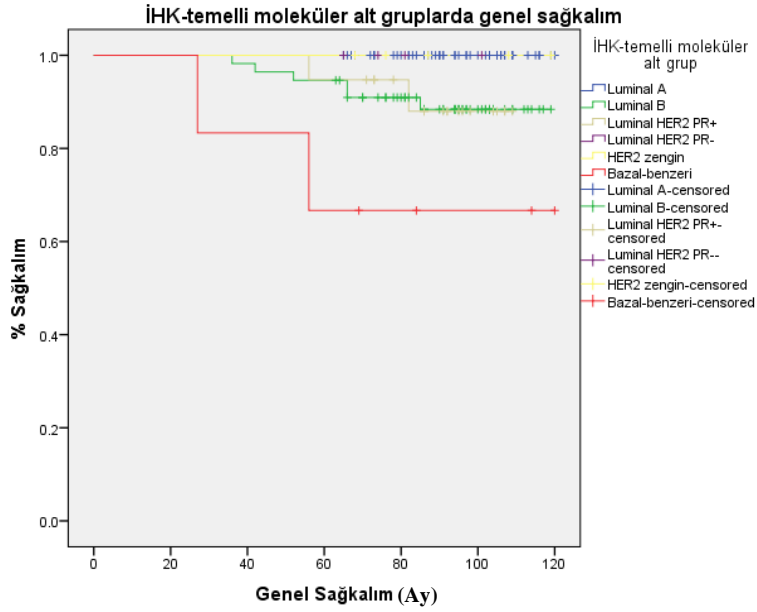
* İzole hücre boyanmaları dahil edilmiştir.

** Alt gruplarda CK5/6 için %1.5, EGFR için %2.5 boyanma sınır değerleri baz alınmıştır.

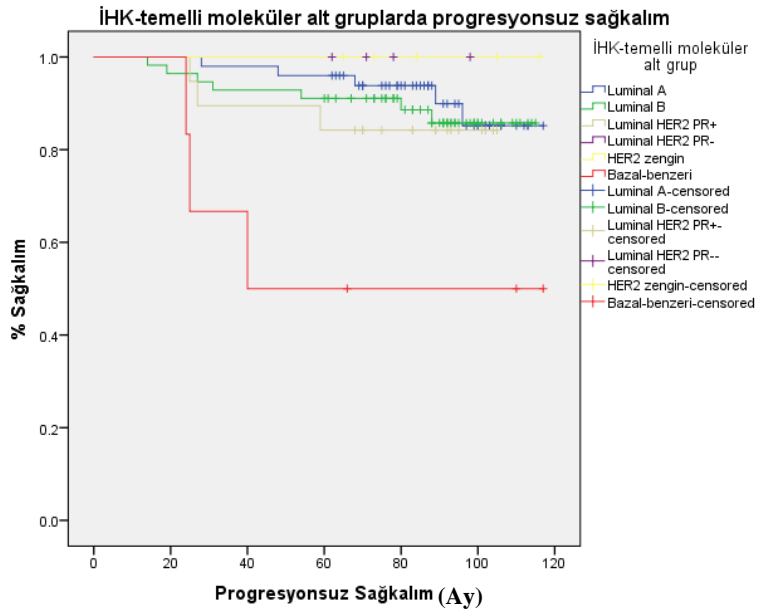
Sağ kalım Analizleri: Tümör çapı artışı ($p=0.013$), cerrahi sınır pozitifliği ($p<0.001$), evre artışı ($p<0.001$), evrenin ileri olması ($p=0.020$), lenf nodu evresi ($p<0.001$) ve İHK-temelli moleküler alt grupların ($p=0.017$) genel sağ kalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Premenopozal dönemde olma ($p=0.015$), tümör çapı artışı ($p<0.001$), cerrahi sınır pozitifliği ($p=0.01$), evre artışı ($p<0.001$), lenf nodu evresi ($p<0.001$), lenf nodu tutulumu ($p=0.005$) ve İHK-temelli moleküler alt grupların ($p=0.031$) *progresyonsuz* sağ kalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı. Sağ meme yerleşimli tümörlerde progresyon riski daha fazla olsa da bu eğilim istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı ($p=0.053$).

İHK-temelli moleküler alt gruplar genel sağ kalım açısından karşılaştırıldığında luminal A grubu diğer alt gruplara göre en iyi genel sağ kalımla ($p=0.015$), BBMK grubu ise diğer alt gruplara göre en kötü genel sağ kalımla ilişkiliydi ($p=0.004$). Diğer alt grupların genel sağ kalıma etkisi saptanmadı. Sadece BBMK alt grubunun *progresyonsuz* sağ kalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.001$). Evresi IA olan 57 olgu içinden progresyon ve ardından eks

görülen iki olgunun da Luminal HER2 PR (+) fenotipe sahip olması dikkat çekiciydi. Eks olan toplam 10 olgunun 6'sı luminal B, 2'si luminal HER2 PR (+), 2'si ise BBMK idi. Luminal HER2 (+) olgular luminal B içerisinde değerlendirildiğinde ise, eks olan olgulardan 8'i (%80) luminal B grubundaydı. Tüm alt gruplarla *genel* sağ kalım ve *progresyonsuz* sağ kalım eğrileri Şekil 13 ve Şekil 14'te sunuldu.



Şekil 13. İHK-temelli moleküler alt gruplarda *genel* sağkalım eğrisi.



Şekil 14. İHK-temelli moleküler alt gruplarda *progresyonsuz* sağkalım eğrisi.

CK5/6 ve EGFR Boyanması ile Klinikopatolojik Verilerin ve Sağ kalım Durumlarının Karşılaştırılması: ROC analizine göre CK5/6 pozitifliği, EGFR pozitifliği veya en az bir belirteç pozitifliği klinikopatolojik verilerle karşılaştırıldı (Tablo 6). Klinikopatolojik veriler aynı zamanda izole hücre boyanmaları dahil edilerek oluşturulan gruplarda da irdelendi (Tablo 7).

Tablo 6. ROC analizine göre CK5/6 ve EGFR pozitif olguların negatif olgularla klinik ve patolojik karşılaştırması

Klinik ve Patolojik Parametreler	CK5/6				EGFR				En az bir belirteç pozitifliği						
	negatif		pozitif		negatif		pozitif		yok		var				
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%			
Yaş	<40	14 (74)	5 (26)	12 (63)	7 (37)	11 (58)	8 (42)	40-55	47 (72)	18 (28)	49 (75)	16 (25)	43 (64)	24 (36)	
	>55	43 (80)	11 (20)	42 (78)	12 (22)	38 (70)	16 (30)	Menopozal durum	premenopoz	55 (71)	22 (29)	54 (69)	24 (31)	47 (59)	32 (41)
	postmenopoz	49 (80)	12 (20)	49 (82)	11 (18)	45 (74)	16 (26)	Lateralizasyon	sağ	47 (77)	14 (23)	46 (74)	16 (26)	40 (65)	22 (35)
	sol	57 (75)	19 (25)	56 (75)	19 (25)	52 (68)	25 (32)	Operasyon tipi	MKC	63 (77)	19 (23)	62 (75)	21 (25)	56 (67)	27 (33)
	b. mastektomi	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)		MRM	28 (70)	12 (30)	28 (72)	11 (28)	25 (61)	16 (39)
	Tümör odağı	tek odak	92 (75)	30 (25)	93 (76)	29 (24)	82 (67)	41 (33)	multipl	10 (71)	4 (29)	9 (64)	5 (36)	9 (60)	6 (40)
	Tümör çapı	<2	63 (76)	20 (24)	64 (77)	19 (23)	57 (68)	27 (32)	2-5	34 (74)	12 (26)	32 (70)	14 (30)	28 (61)	18 (39)
	>5	7 (78)	2 (22)	7 (78)	2 (22)	7 (70)	3 (30)	Histolojik derece	1	13 (81)	3 (19)	14 (82)	3 (18)	13 (76)	4 (24)
	2	77 (78)	22 (22)	77 (79)	21 (21)	69 (70)	30 (30)	3	11 (58)	8 (42)	10 (53)	9 (47)	8 (40)	12 (60)	
	DKİS	yok	65 (74)	23 (26)	68 (77)	20 (23)	60 (67)	29 (33)	var	34 (76)	11 (24)	32 (71)	13 (29)	29 (63)	17 (37)
	Cerrahi sınır	negatif	93 (74)	32 (26)	95 (76)	30 (24)	85 (67)	42 (33)	pozitif	4 (80)	1 (20)	3 (60)	2 (40)	3 (60)	2 (40)
	Evre	evre 1	45 (79)	12 (21)	45 (78)	13 (22)	41 (71)	17 (29)	evre 2	42 (74)	15 (26)	42 (74)	15 (26)	37 (65)	20 (35)
	evre 3	17 (71)	7 (29)	16 (70)	7 (30)	14 (56)	11 (44)	Lenf nodu evresi	0	58 (77)	17 (23)	57 (75)	19 (25)	52 (68)	24 (32)
	1	30 (75)	10 (25)	31 (78)	9 (23)	27 (68)	13 (33)	2	13 (81)	3 (19)	12 (75)	4 (25)	11 (65)	6 (35)	
	2	3 (43)	4 (57)	3 (50)	3 (50)	2 (29)	5 (71)	3	3 (43)	4 (57)	3 (50)	3 (50)	2 (29)	5 (71)	
	3	58 (77)	17 (23)	57 (75)	19 (25)	52 (68)	24 (32)	Lenf nodu tutulumu	yok	46 (73)	17 (27)	46 (74)	16 (26)	40 (63)	24 (38)
	var	8 (67)	4 (33)	5 (42)	7 (58)	5 (38)	8 (62)	Hormonoterapi	almadı	96 (76)	30 (24)	98 (78)	28 (22)	87 (69)	40 (31)
	aldı	16 (89)	2 (11)	16 (89)	2 (11)	15 (83)	3 (17)	Kemoterapi	almadı	88 (73)	32 (27)	87 (73)	33 (28)	77 (63)	45 (37)
	aldı	19 (73)	7 (27)	21 (81)	5 (19)	18 (69)	8 (31)	Radyoterapi	almadı	85 (76)	27 (24)	82 (73)	30 (27)	74 (65)	40 (35)
	aldı	85 (76)	27 (24)	82 (73)	30 (27)	74 (65)	40 (35)								

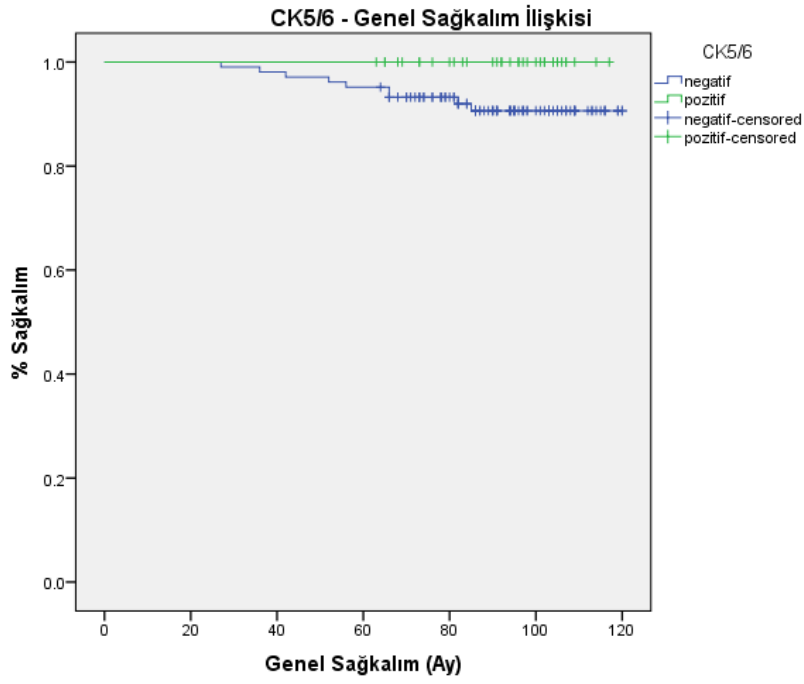
b. mastektomi: basit mastektomi

Tablo 7. İzole pozitiflikler dahil CK5/6 ve EGFR pozitif olguların negatif olgularla klinik ve patolojik karşılaştırması

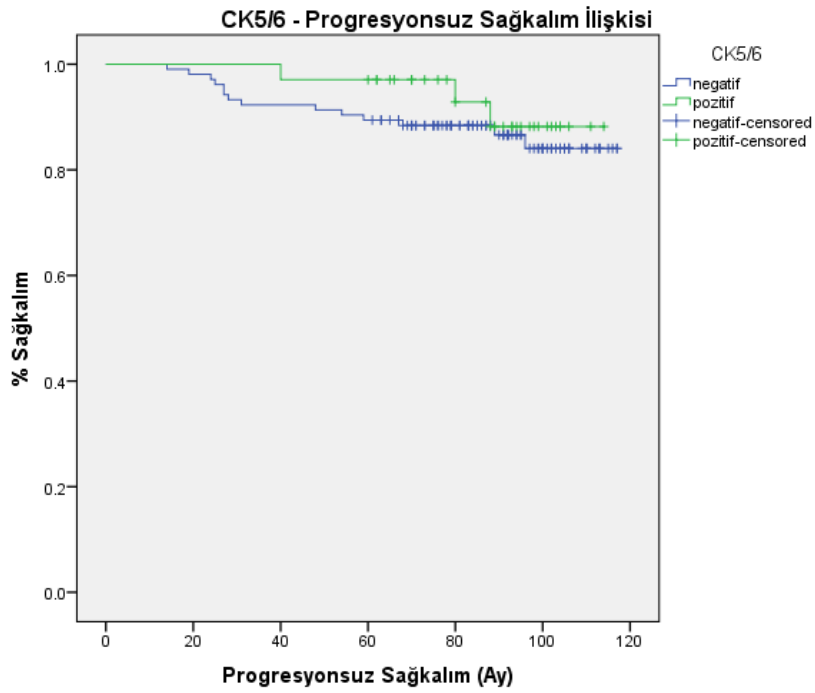
Klinik ve Patolojik Parametreler		CK 5/6				EGFR				En az bir belirteç pozitif			
		negatif		pozitif		negatif		pozitif		yok		var	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Yaş	<40	7	(37)	12	(63)	5	(26)	14	(74)	4	(21)	15	(79)
	40-55	22	(34)	43	(66)	29	(45)	36	(55)	18	(27)	49	(73)
	>55	24	(44)	30	(56)	29	(54)	25	(46)	19	(35)	35	(65)
Menopozal durum	premenopoz	26	(34)	51	(66)	28	(36)	50	(64)	17	(22)	62	(78)
	postmenopoz	27	(44)	34	(56)	35	(58)	25	(42)	24	(39)	37	(61)
Lateralizasyon	sağ	26	(43)	35	(57)	27	(44)	35	(56)	20	(32)	42	(68)
	sol	27	(36)	49	(64)	36	(48)	39	(52)	21	(27)	56	(73)
Operasyon tipi	MKC	28	(34)	54	(66)	36	(43)	47	(57)	22	(27)	61	(73)
	b. mastektomi	2	(50)	2	(50)	3	(75)	1	(25)	2	(50)	2	(50)
	MRM	17	(43)	23	(57)	19	(49)	20	(51)	13	(32)	28	(68)
Tümör odağı	tek odak	46	(38)	76	(62)	55	(45)	67	(55)	34	(28)	89	(72)
	multipl	6	(43)	8	(57)	7	(50)	7	(50)	6	(40)	9	(60)
Tümör çapı	<2	33	(40)	50	(60)	37	(45)	46	(55)	24	(29)	60	(71)
	2-5	15	(33)	31	(67)	20	(43)	26	(57)	12	(26)	34	(74)
	>5	5	(56)	4	(44)	6	(67)	3	(33)	5	(50)	5	(50)
Histolojik derece	1	4	(25)	12	(75)	9	(53)	8	(47)	3	(18)	14	(82)
	2	42	(42)	57	(58)	43	(44)	55	(56)	31	(31)	68	(69)
	3	5	(26)	14	(74)	9	(47)	10	(53)	5	(25)	15	(75)
DKİS	yok	36	(41)	52	(59)	45	(51)	43	(49)	28	(31)	61	(69)
	var	14	(31)	31	(69)	16	(36)	29	(64)	12	(26)	34	(74)
Cerrahi sınır	negatif	46	(37)	79	(63)	57	(46)	68	(54)	37	(29)	90	(71)
	pozitif	2	(40)	3	(60)	3	(60)	2	(40)	2	(40)	3	(60)
Evre	evre 1	23	(40)	34	(60)	27	(47)	31	(53)	16	(28)	42	(72)
	evre 2	21	(37)	36	(63)	26	(46)	31	(54)	16	(28)	41	(72)
	evre 3	9	(38)	15	(63)	10	(43)	13	(57)	9	(36)	16	(64)
Lenf nodu evresi	0	31	(41)	44	(59)	37	(49)	39	(51)	21	(28)	55	(72)
	1	14	(35)	26	(65)	17	(43)	23	(57)	12	(30)	28	(70)
	2	7	(44)	9	(56)	8	(50)	8	(50)	7	(41)	10	(59)
	3	1	(14)	6	(86)	1	(17)	5	(83)	1	(14)	6	(86)
Lenf nodu tutulumu	yok	31	(41)	44	(59)	37	(49)	39	(51)	21	(28)	55	(72)
	var	22	(35)	41	(65)	26	(42)	36	(58)	20	(31)	44	(69)
Hormonoterapi	almadı	4	(33)	8	(67)	4	(33)	8	(67)	2	(15)	11	(85)
	aldı	49	(39)	77	(61)	59	(47)	67	(53)	39	(31)	88	(69)
Kemoterapi	almadı	5	(28)	13	(72)	11	(61)	7	(39)	4	(22)	14	(78)
	aldı	48	(40)	72	(60)	52	(43)	68	(57)	37	(30)	85	(70)
Radyoterapi	almadı	10	(38)	16	(62)	14	(54)	12	(46)	8	(31)	18	(69)
	aldı	43	(38)	69	(62)	49	(44)	63	(56)	33	(29)	81	(71)

b. mastektomi: basit mastektomi

CK 5/6 pozitif olgular negatif olgulara göre istatistiksel anlamlılık izlenmese de *genel* sağ kalım açısından daha iyi gidiş gösterme eğilimindeydi ($p=0.086$) (Şekil 15). 138 olgu içinde eks olan 9 olgunun tümünde CK5/6 negatif olarak izlendi. CK5/6 durumunun *progresyonsuz* sağ kalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.452$) (Şekil 16).

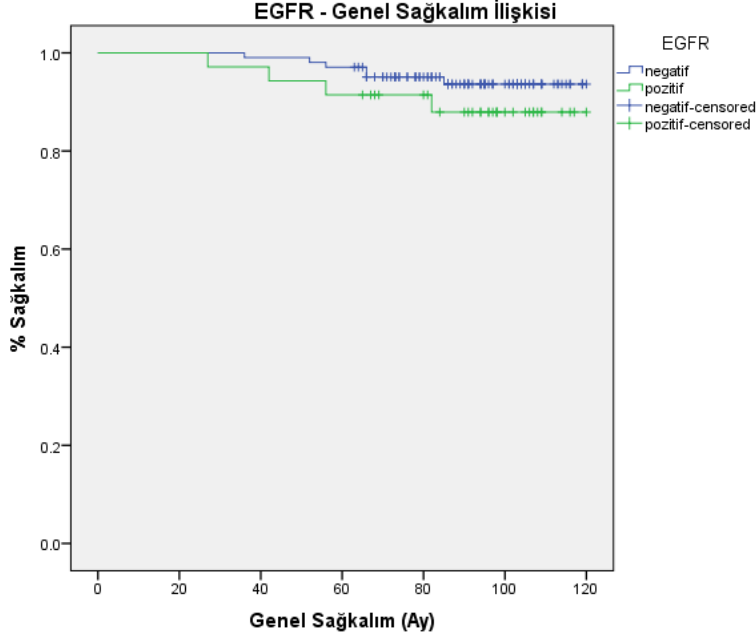


Şekil 15. CK5/6 pozitifliği – genel sağ kalım eğrisi.

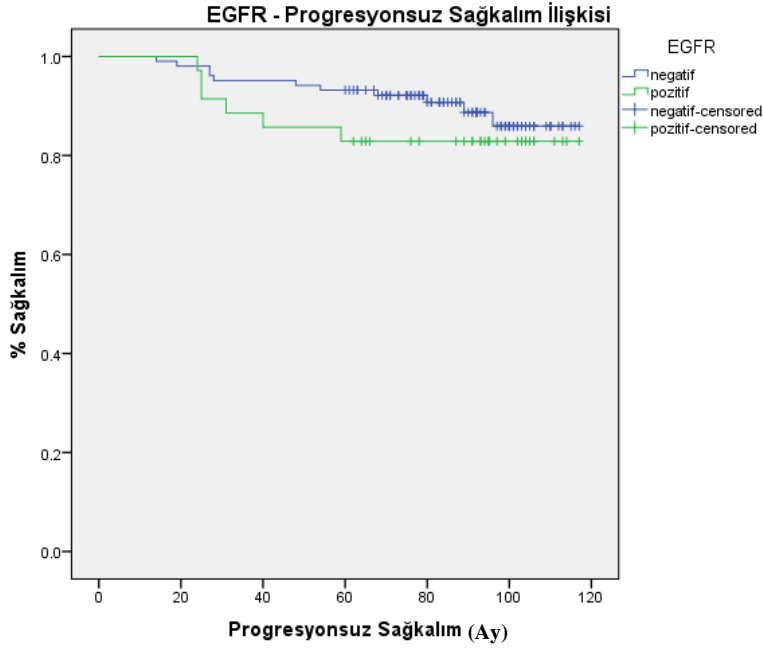


Şekil 16. CK5/6 pozitifliği – progresyonsuz sağ kalım eğrisi.

EGFR pozitif olgular negatif olgulara göre sırasıyla *genel* sağ kalım ve *progresyonsuz* sağ kalım açısından karşılaştırıldı. Her ikisinde de istatistiksel anlamlılık izlenmedi ($p=0.277$, $p=0.339$) (Şekil 17 ve 18).



Şekil 17. EGFR pozitifliği – *genel* sağ kalım eğrisi.



Şekil 18. EGFR pozitifliği – *progresyonsuz* sağ kalım eğrisi.

EGFR pozitifliğinin *genel* sağ kalım üzerindeki etkisi, sırasıyla evre ve lenf nodu evresine göre düzeltme uygulanarak hesaplandı. Bu analiz sonucunda EGFR pozitifliğinin *genel* sağ kalıma etkisi saptanmadı ($p=0.303$, $p=0.371$). EGFR pozitifliğinin *progresyonsuz* sağ kalım üzerindeki etkisi, sırasıyla evre ve lenf nodu evresine göre düzeltme uygulanarak hesaplandı. Bu analiz sonucunda da EGFR pozitifliğinin *progresyonsuz* sağ kalıma etkisi görülmedi ($p=0.431$, $p=0.351$).

Histolojik derecesi 3 olan 19 olguda EGFR pozitifliğinin *progresyonsuz* sağ kalıma etkisi istatistiksel anlamlılığa yakındı ($p=0.052$). Bu ilişkinin CK5/6 ve/veya EGFR pozitifliği gösteren olgularda CK5/6'nın etkisine bağlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p=0.139$).

CK5/6'nın *genel* sağ kalım üzerindeki etkisi, evreye göre düzeltme uygulanarak hesaplandığında, CK5/6 negatif grup, pozitif gruba göre daha kötü *genel* sağ kalım açısından istatistiksel anlamlılığa yakındı ($p=0.053$). Erken ve erken ileri evre hastalık durumuna göre düzeltme uygulandığında, CK5/6 negatifliğinin *genel* sağ kalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.03$). Lenf nodu evresine göre düzeltme uygulanarak hesaplandığında ise CK5/6 negatif grup pozitif gruba göre daha kötü *genel* sağ kalım göstermekteydi ($p=0.033$).

CK5/6 pozitifliğinin *progresyonsuz* sağ kalım üzerindeki etkisi, evreye göre düzeltme uygulanarak hesaplandı. Bu analiz sonucunda CK5/6 pozitifliğinin *progresyonsuz* sağ kalım üzerinde etkisi saptanmadı ($p=0.240$).

İHK-temelli moleküler grupların her birinde CK5/6 ve/veya EGFR pozitifliğinin sağ kalıma etkisi araştırıldı. HER2-zengin ve luminal-HER2 PR (-) gruplarında yeterli olgu sayısı bulunmadığından veya takipte progresyon/eks olayları izlenmediğinden istatistiksel değerlendirme yapılamadı. Luminal A grubundaki tüm olgular takip süresince hayatta olduğundan *genel* sağ kalım analizi yapılamadı. Diğer alt gruplarda ayrıca tümör çapı, evre, lenf nodu tutulumu ve cerrahi sınır durumuna göre düzeltme uygulanarak sağ kalım analizleri yapıldı. Sadece luminal B grubunda [luminal-HER2 (+) olgular dahil edildiğinde] lenf nodu evresine göre düzeltme uygulandığında CK5/6 negatif olgular pozitif olgulara göre istatistiksel anlamlılıkla

birlikte daha kötü *genel* sağ kalımla ilişkili bulundu (p=0.035). Diğer alt gruplarda istatistiksel anlamlılık izlenmese de, luminal A grubunda progresyon görülen 5 olgunun tümü ile luminal HER2 PR (+) grubunda progresyon izlenen 3 olgunun tamamında CK5/6 negatifti.

Evreden bağımsız olarak tüm seride (n=140) CK5/6 ve EGFR'nin meme karsinomunun *güncel* İHK-temelli moleküler alt gruplarında *progresyonsuz* sağ kalım ve *genel* sağ kalımla ilişkileri incelenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmadı. Her bir alt grupta izlenen p değerleri Tablo 8'de belirtildi.

Tablo 8. CK5/6 ve EGFR'nin İHK-temelli moleküler alt gruplarda progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma etkisini gösteren p değerleri

Alt gruplar	CK5/6		EGFR	
	PS	GS	PS	GS
Luminal A	0.358	-*	0.337	-*
Luminal B	0.984	0.136	0.788	0.801
Luminal-HER2 PR (+)	0.220	0.313	0.360	0.991
Luminal-HER2 PR (-)	-*	-*	-*	-*
HER2-zengin	-*	-*	-*	-*
Üçlü-Negatif	0.886	0.414	0.377	0.502

PS: progresyonsuz sağ kalım, GS: genel sağ kalım

* Olay görülmemesi sebebiyle istatistiksel analiz yapılamadı

Erken evre meme karsinomlu 133 olgu üzerinde yaptığımız analizlerde CK5/6 ve/veya EGFR ile bazal pozitifliğin *genel* sağ kalım ve *progresyonsuz* sağ kalım üzerinde etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (CK5/6 için p=0.151, p=0.756; EGFR için p=0.387, p=0.416, bazal pozitiflik için p=0.336, p=0.745). Bununla birlikte, eks olan 7 olgunun tamamında CK5/6 negatifti. İHK-temelli moleküler alt gruplarda erken evre meme karsinomlu olguların CK5/6 ve EGFR pozitifliğinin *genel* sağ kalım ve *progresyonsuz* sağ kalıma etkisi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup, bulgular Tablo 9, Tablo 10 ve Tablo 11'de belirtildi.

Tablo 9. Erken evre meme kansinömlü olgularda CK5/6'nin İHK-temelli moleküler alt gruplarda progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma etkisini gösteren p değeri

Alt Grup	CK5/6	Sayı (n)	Progresyon (n)	Progresyonsuz Sağ kalım p değeri	Eks (n)	Genel Sağ kalım p değeri
Luminal A	Negatif	41	5	0.358	0	-
	Pozitif	8	0		0	
	Toplam	49	5		0	
Luminal B	Negatif	39	3	0.432	4	0.266
	Pozitif	11	2		0	
	Toplam	50	5		4	
Luminal HER2 PR+	Negatif	13	3	0.220	2	0.313
	Pozitif	6	0		0	
	Toplam	19	3		2	
Luminal HER2 PR-	Negatif	2	0	-	0	-
	Pozitif	2	0		0	
	Toplam	4	0		0	
HER2 zengin	Negatif	3	0	-	0	-
	Pozitif	1	0		0	
	Toplam	4	0		0	
Bazal-benzeri	Negatif	3	1	0.886	1	0.414
	Pozitif	2	1		0	
	Toplam	5	2		1	
Tüm olgular	Toplam	131*	15	0.599 ⁺	7	0.089 ⁺

*Erken evre meme kansinömlü 133 olgudan 2'sinde CK5/6 teknik nedenlerle değeriendirilemedi.

+ İHK-temelli moleküler alt gruplara göre düzeltme uygulandığında elde edilen sonuçlar

Tablo 10. Erken evre meme kansinomu olgularda *EGFR*'nin İHK-temelli moleküler alt gruplarda *progresyonsuz sağ kalım* ve *genel sağ kalım* etkisini gösteren p değeri

Alt Grup	EGFR	Sayı (n)	Progresyon (n)	Progresyonsuz Sağ kalım p değeri	Eks (n)	Genel Sağ kalım p değeri
Luminal A	Negatif	42	5	0.337	0	-
	Pozitif	8	0		0	
	Toplam	50	5		0	
Luminal B	Negatif	41	4	0.348	4	0.342
	Pozitif	8	0		0	
	Toplam	49	4		4	
Luminal HER2 PR (+)	Negatif	11	1	0.360	1	0.991
	Pozitif	8	2		1	
	Toplam	19	3		2	
Luminal HER2 PR (-)	Negatif	3	0	-	0	-
	Pozitif	1	0		0	
	Toplam	4	0		0	
HER2 zengin	Negatif	2	0	-	0	-
	Pozitif	2	0		0	
	Toplam	4	0		0	
Bazal-benzeri	Negatif	1	0	0.377	0	0.502
	Pozitif	5	3		2	
	Toplam	6	3		2	
Tüm olgular	Toplam	132*	15	0.950 ⁺	8	0.760 ⁺

*Erken evre meme kansinomu 133 olgudan 1'inde EGFR teknik nedenlerle değeriendirilemedi.

+ İHK-temelli moleküler alt gruplara göre düzeltme uygulandığında elde edilen sonuçlar

Tablo 11. Erken evre meme kansinomu olgularda bazal pozitifliğin (CK5/6 ve/veya EGFR) İHK-temelli moleküler alt gruplarda* progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma etkisini gösteren p değerleri

Alt Grup	Bazal Pozitiflik	Sayı (n)	Progresyon (n)	Progresyonsuz Sağ kalım p değeri	Eks (n)	Genel Sağ kalım p değeri
Luminal A	Negatif	38	5	0.228	0	-
	Pozitif	12	0		0	
	Toplam	50	5		0	
Luminal B	Negatif	38	3	0.527	4	0.236
	Pozitif	12	2		0	
	Toplam	50	5		4	
Luminal HER2 PR+	Negatif	9	1	0.608	1	0.807
	Pozitif	10	2		1	
	Toplam	19	3		2	
Luminal HER2 PR-	Negatif	2	0	-	0	-
	Pozitif	2	0		0	
	Toplam	4	0		0	
HER2 zengin	Negatif	2	0	-	0	-
	Pozitif	2	0		0	
	Toplam	4	0		0	
Tüm olgular	Toplam	127	13	0.977⁺	8	0.280⁺

*BBMK olguları analize dahil edilmemiştir.

+ İHK-temelli moleküler alt gruplara göre düzeltme uygulandığında elde edilen sonuçlar

5. TARTIŞMA:

İki binli yılların başından itibaren moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte meme karsinomlarının davranışları ve tedavi yanıtları birbirinden oldukça farklı, moleküler özellikleriyle birbirinden ayrılan, heterojen hastalıklar olduğu anlaşılmıştır (7–9,12). Ancak belirlenen moleküler alt gruplar kendi içinde de klinik olarak heterojenite göstermektedir. Örneğin luminal A grubunun en iyi median sağ kalımı göstermesine rağmen, en belirgin sağ kalım değişkenliğine sahip ve geç dönem mortaliteyle ilişkili grup olduğu bildirilmiştir (31,109,110). HER2 (+) meme karsinomlarının bir kısmı anti-HER2 tedavisine direnç göstermektedir (34,35,111). BBMK'ler içerisinde iyi prognozla ilişkili olduğu bilinen adenoid kistik karsinom, sekretuar karsinom, medüller karsinom ve lobüler karsinom gibi özellikli morfolojik tümör tipleri yer almaktadır (68,72,112). Tam da bu noktada, özellikle meme karsinomlarında ekspresyon gösteren bazı belirteçler üzerinde, daha homojen prognostik ve prediktif alt grupların tanımlanması amacıyla yoğun bir şekilde araştırmalar sürmektedir (76,79,113–115). Bu çalışmada, kötü prognozla ilişkili meme karsinomu alt tipi olan BBMK'nin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bazal belirteçlerin (CK5/6 ve EGFR) erken evre meme kanserinde ve spesifik alt tiplerindeki prognostik önemini araştırmayı amaçladık.

Bazal belirteçlerin meme karsinomlarında önemi üzerine yapılan birçok çalışmada bazal-pozitiflik kötü prognostik parametrelerle ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmalardan bazıları, bazal belirteçlerden birinin tek başına pozitifliğini; bazıları ise birden fazla belirteçten en az birindeki pozitifliği temel almıştır. Korsching ve ark.'nın 166 meme karsinomlu olguda CK5/6 ve EGFR'yi de içeren 15 farklı İHK belirteci kullanarak yaptığı çalışmada, CK5/6 pozitif tümörlerin genel olarak hormon reseptör negatifliği, yüksek proliferatif aktivite ve daha agresif davranışla ilişkili olduğu saptanmıştır (116). Van de Rijn ve Potemski'nin çalışmalarında bazal keratin ekspresyonu lenf nodu negatif grupta kısa sağ kalımla ilişkili bulunmuşken; Nielsen ve Mahlzan'ın çalışmalarında ise bu ilişki lenf nodu pozitif grupta izlenmiştir (12,28,86,117). El-Rehim ve ark.'ın 1944 meme karsinomlu olgu üzerinde yaptığı çalışmada, luminal keratin (CK7/8, 18 ve 19) pozitifliği diferansiye glandüler fenotip ve iyi prognozla ilişkiliyken; bazal keratin (CK5/6 ve 14) pozitifliği ER negatifliği,

genç yaş ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (29). Sözü geçen çalışmada keratin pozitifliklerine göre dört farklı alt grup belirlenmiştir: pür lüminal, mikst lüminal/bazal, pür bazal, keratin eksprese etmeyen. Bazal keratin ekspresyonunun izlendiği iki grup da kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Yine bu çalışma ve Nassar ve ark.'ın çalışmasında, multivaryat analiz sonucunda CK5/6'nın nüksüz sağ kalım (relapse-free interval) için bağımsız gösterge olduğu bildirilmiştir (29,99). Nielsen ve ark.'ın yaptığı 663 olguluk seride CK5/6 pozitifliği daha düşük hastalık-spesifik sağ kalım ile ilişkili; EGFR pozitifliği ise bağımsız negatif prognostik faktör olarak bulunmuştur (12). İki farklı çalışmada ise beyin metastazı bulunan meme kanserli olgularda CK5/6 ve EGFR ekspresyonu ile artmış beyin metastazı geliştirme riski olduğu belirtilmiştir (118,119). Serimizde erken evre İMK-BTS tanılı 140 olguda, CK5/6 ile EGFR boyanmasının genel sağ kalıma etkisini incelediğimizde, literatürdeki sonuçlardan farklı olarak CK5/6 negatif grup pozitiflere göre daha iyi prognozla ilişkili bulundu. EGFR pozitifliği ya da EGFR ve CK5/6'dan en az birindeki pozitifliğin sağ kalıma etkisini değerlendirdiğimiz analizlerde istatistiksel anlamlılığa ulaşan bir sonuç izlemedik. Histolojik derecesi 3 olan 19 olguda CK5/6 ile EGFR boyanmasının sağ kalım üzerindeki etkisini araştırdığımızda EGFR pozitif olgular negatiflere göre progresyonsuz sağ kalım açısından istatistiksel anlamlılığa yakın ($p=0.052$) olarak kötü gidişle ilişkili bulundu. CK5/6 ve EGFR'nin en az biri pozitif olan olguları negatif olgularla karşılaştırdığımızda ise bu eğilimin CK5/6'nın etkisine bağlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p=0.139$). Rakha ve ark.'ın yaptığı çalışmada olgular histolojik dereceye göre ayrıştırıldığında bazal belirteçler sadece derece 3 tümörlerde kötü sağ kalımla ilişkili bulunmuştur. Yazarlar özellikle derece 3 tümörlerde rutin bazal keratin kullanımını önermiştir (30).

İHK-temelli moleküler alt gruplarda yapılan çalışmalarda bazal belirteç pozitifliği, genellikle kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Blows ve arkadaşlarının 2010 yılında 12 çalışmadan derlediği 10000'in üzerinde meme karsinomu olgusunu içeren geniş çaplı veri analizinde, bazal belirteçler ve hormon reseptörlerini içeren altı meme karsinom alt tipi klinikopatolojik olarak incelenmiştir. Bu çalışmada CK5/6 veya EGFR'den en az biri mevcut olan olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Tümörler önce luminal-nonluminal şeklinde, daha sonra HER2 pozitifliğine göre ve son olarak bu gruplar da bazal belirteç pozitifliğine göre sınıflandırılmıştır. Bazal

belirteçlerin HER2 negatif luminal ve non-luminal tümörlerde kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca üçlü negatif-bazal pozitif tümörlerin, luminal-bazal pozitif tümörlerden de daha kötü prognoza sahip olduğu gösterilmiştir (31). 2015 yılında Sung ve ark. tarafından yapılan çalışmada 5040 luminal A grubu olguda bazal belirteç pozitifliğinin etyolojik faktörlerle birlikte klinikopatolojik önemi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda da istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmasa da, Blows ve ark.'ın çalışmasını destekler şekilde bazal pozitifliğin kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Kötü prognoza rağmen, ilginç olarak bazal-pozitiflik daha az agresif özelliklerle, yani küçük boyut, daha düşük derece ve lenf nodu negatif hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Bu uyumsuzluğun luminal grupta endokrin tedaviye değişken yanıtla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (33). Örneğin Horwitz ve ark. yaptığı çalışmada luminal tümörlerde endokrin tedaviye direnç gösteren “ER (-) PR (-) CK5 (+)” tümör hücre popülasyonu saptanmıştır (120). Bir başka çalışmada “ER (-) PR (-) CK5 (+) hücreler içeren ER (+) tümörler”de 17-beta östradiol ve anti-östrojen tamoksifen veya fulvestran tedavisi sonrasında ER ekspresyonunun azaldığı, CK5 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (121). HER2-pozitif grup üzerine yapılan bazı çalışmalarda ise bazal belirteçlerin hem prognostik hem de prediktif değeri araştırılmıştır. Martin-Castillo ve ark.'ın yaptığı çalışmada HER2 pozitif hastalıkta CK5/6 pozitifliği gösteren tümörler, diğer luminal-HER2 ve HER2 pozitif tümörlere göre daha büyük boyutlu ve daha fazla nükle ilişkili bulunmuştur (34). Bagaria and ark.'ın HER2 pozitif meme kanserli olgularda yaptığı çalışmada bazal keratin ekspresyonu gösteren tümörlerin 5 yıllık sağ kalımlarının daha kötü olduğu gösterilmiştir (122). İki farklı çalışmada HER2 (+) hastalıkta bazal-pozitif tümörlerin kötü prognoz gösterdiği ve trastuzumab direnciyle ilişkili olduğu saptanmıştır (35,100). Liu ve ark.'ın çalışmasında, 713 ER-negatif meme kanserli olguda bazal pozitif-HER2 alt tipinin diğer tüm alt tipler arasında en kötü toplam sağ kalıma sahip olduğu bulunmuştur (23). Ancak, Blows ve ark.'ın 10000'in üzerinde meme karsinomlu olguda yaptığı geniş analizde ise bazal belirteç pozitifliğinin HER2 pozitif grupta prognostik önemi görülmemiştir (31). Bizim serimizde İHK-temelli moleküler alt gruplardan sadece luminal B (luminal-HER2 (+) olgular dahil edildiğinde) grubunda CK5/6 negatifliği kötü *genel* sağ kalımla ilişkiliydi (p=0.035). Diğer alt gruplarda istatistiksel anlamlılık saptanmasa da, luminal A grubunda

progresyon görülen 5 olgunun tümü ile luminal HER2 PR (+) grubunda progresyon izlenen 3 olgunun tamamında CK5/6 negatifti. Ayrıca tümör çapı 5 cm ve üzeri olan 10 olgudan 3'ünde CK5/6 ve/veya EGFR pozitif iken, 7 olguda (%70) bazal belirteçlerle negatiflik saptandı. Lenf nodu metastazı olmayan toplam 76 olguda bazal belirteçlerle izole boyanmalar göz önüne alındığında olguların %72.3'ünde (55/76 olgu) bazal pozitiflik saptandı. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olmakla birlikte, metastatik olmayan hastalıkta yüksek bazal belirteç pozitifliği yukarıda sayılan bazı çalışmaların aksine bazal fenotipin olumsuz gösterge olmadığı kanaatini uyandırdı.

Çalışmalarda kullanılan bazal belirteçlerin çok çeşitli olması ve farklı klonlarının kullanımı yanı sıra değerlendirme yönteminde standardizasyonun olmaması, bulunan sonuçların karşılaştırılması ve genellenebilirliğini zorlaştırmaktadır. Bazal belirteç pozitifliği için kabul edilen boyanma sınır değerleri de çalışmalara göre oldukça farklılık göstermektedir. Bazal belirteçler, BBMK'leri İHK kullanarak belirleyebilmek amacıyla ilk kez Nielsen ve ark. tarafından kullanılmış ve sınır değer olarak herhangi bir zayıf pozitiflik alınmıştır (12). Ancak bu belirteçlerin meme karsinomlarındaki prognostik ve prediktif önemini araştıran çalışmalardan bazıları herhangi bir zayıf sitoplazmik veya membranöz boyanmayı pozitif olarak kabul ederken; diğerleri yüzde 1-20 arasında değişen oranlarda sınır değerler kullanmıştır (12,29,30,70,93,101,102,123). Çalışmamızda ROC analizi ile saptadığımız anlamlı olabilecek boyanma alt sınır değerleri CK5/6 için %1.5, EGFR için %2.5 bulundu. Bu sınır değerler ile değerlendirdiğimizde olguların %25.4'ü EGFR pozitif ve %24.6'sı CK5/6 pozitif iken; izole pozitiflikleri dahil ettiğimizde pozitiflik oranları artarak EGFR için %54.3'e, CK5/6 için %61.6'ya ulaşmıştır. Birçok çalışmada kullanılan sınır değerler subjektif bir şekilde belirlenmiştir. Sınır değerler sağkalım analizi sonuçlarında da belirleyici olabilir. Örneğin çalışmamızda izole boyanmalar dahil veya hariç (>%1 boyanma) kabul edildiğinde CK5/6 negatifliğinin kötü prognozla ilişkisi bulunmadı. Ayrıca literatürdeki çalışmaların hemen tamamında doku mikrodizini yöntemi kullanıldığından olasılıkla bir kısım olguda fokal veya izole boyanmalar göz ardı edilmiştir. Bir diğer sorun, İHK-temelli moleküler grupların oluşturulması sırasında kullanılan boyanma sınır değerleridir. Örneğin, Rijn ve ark.'nın çalışmasında ER pozitifliği için sınır değer %5 olarak

kabul edilmiştir (28). Bizim çalışmamızda da kullandığımız, günümüzde ASCO/CAP rehberlerince önerilen ER sınır değeri ise %1'dir (106). Luminal B grubunun luminal A grubundan ayrımında Ki-67 proliferasyon indeksi için kabul edilen sınır değer ise bazı otörlerce %14, bazılarına göre ise %20 olarak değerlendirilmektedir (124). Bu durumda bir çalışmadan diğerine göre bu grupların dağılımı ve klinik özellikleri değişkenlik gösterebilmektedir. Bu sebeplerle meme karsinomlarında ve alt tiplerinde bildirilen bazal belirteç pozitifliği oranları oldukça farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda ise bazal belirteç pozitifliği yüzdesine göre farklı gruplar oluşturulmuş ve bunun prognostik anlamı araştırılmıştır. Örneğin Laakso ve ark.'ın CK5 ve CK14 bazal keratinleriyle yaptığı çalışmada parsiyel boyanma gösteren (%5-69) tümörlerin, yaygın bazal keratin pozitif (>%70) tümörlere kıyasla belirgin HER2 pozitifliğiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yaygın bazal keratin (+) tümörlerle karşılaştırıldığında, parsiyel (+) tümörlerde relapsız sağ kalım önemli derecede kısalmış ve bu durum sahip oldukları daha sık HER2 amplifikasyonu ile açıklanamamıştır (125). Rakha ve ark.'ın yaptığı çalışmada bazal keratin pozitif olgular %10-50 arası boyananlar ile %50 ve üzeri boyananlar şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Bu iki grubun tümör karakteristikleri ve davranış özelliklerinin birbirinden farklılıklar gösterdiği görülmüştür (70). Bu çalışmalar, bazal belirteç boyanma oranlarının da klinik ve patolojik farklılıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Bazal fenotip ve BBMK kavramları ile ilgili literatürde bir karmaşa olduğu dikkati çekmiştir. Bu durumun kötü prognoz gösteren BBMK'leri İHK ile belirlemede kullanılan belirteçlerin de yapılan çalışmalarda kötü prognozla ilişkilendirilmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu ilişkilendirme "bazal fenotip = BBMK = kötü prognoz" şeklinde bir düşünceye yol açmış görünmektedir. 2007 yılında Rakha ve ark., bazal fenotip gösteren tümörlerin bazı çalışmalarda "hormon reseptör negatif ve bazal belirteç pozitif tümörler (BBMK)" şeklinde, diğer bazı çalışmalarda ise "hormon reseptör durumuna bakılmaksızın sadece bazal belirteç pozitif" tümörler şeklinde ele alındığını belirtmiş; bazal fenotip kavramını sadeleştirilip netleştirmeye çalışmıştır (126). Görünen odur ki; bu çıkarımı yaparken yazarlar da benzer düşünceyle iki farklı kavramı aynı çatı altında toplamışlardır. Öncü çalışmalarda BBMK grubu tümörün bazal belirteç ekspresyonu yanında

“hormon reseptör ve HER2 negatif” profili ile ayrıntılandırılmıştır. Bu tanımlamanın nedeni GEP çalışmalarında karşılaşılan sonuç gibi görünmektedir. Nielsen ve ark., biri BBMK olgularının İHK eşdeğerlerinin belirlendiği, diğeri ise bazal belirteç pozitifliğinin prognostik öneminin araştırıldığı iki farklı çalışma tasarımı oluşturmuştur. Bazal belirteçlerin kötü prognozla ilişkili olduğunu belirttiği kısımda “bazal belirteç pozitifliği = BBMK” şeklinde bir ifade kullanmamıştır; sadece ek bulgu olarak, bazal belirteçlerin aynı zamanda kötü prognozla ilişkili olduğunu bulduklarını belirtmiştir (12). Sonuç olarak moleküler sınıflamadan bağımsız kötü prognostik olabilecek bazal belirteçler ile moleküler sınıflamadaki bazal belirteç ekspresyona eden BBMK grubu birbirine karışmış görünmektedir. Bizim çalışmamızda da bazal belirteçlerin BBMK dışındaki diğer alt gruplarda da yüksek oranlarda pozitiflik gösterebileceğini ve BBMK’ye spesifik olmadığını gösterdik. Bu sebeple BBMK’nin sadece bazal belirteç pozitifliğine bakılarak belirlenmesi doğru olmayacaktır kanaatindeyiz.

Özetle çalışmamızda, 140 adet invaziv meme karsinomlu olguda CK5/6 ve EGFR pozitifliğinin hem klasik prognostik parametrelerle ilişkisini, hem de İHK-temelli moleküler alt gruplardaki klinik ve prognostik önemini araştırdık. Tümörlerden tam birer doku kesiti olarak, her bir belirteci tek başına ve en az bir belirteç pozitifliğini farklı boyanma sınır değerleriyle birlikte değerlendirdik. Sonuçta CK5/6 negatifliğini daha kötü *genel* sağ kalımla ilişkili bulduk. Alt gruplar içerisinde ise sadece luminal B grubunda (luminal HER2 (+) olgular dahil edildiğinde) benzer şekilde kötü prognostik bir ilişki saptadık. Çalışmamızda ilk kez Luminal HER2 PR (+) grubunda yer alan 19 olgu üzerinde bazal belirteçlerin prognostik önemini değerlendirdik, ancak istatistiksel anlamlılık bulmadık. Bu seride yer alan üçlü-negatif meme karsinomları ise hem sayıca az hem de tümü BBMK fenotipinde izlendiğinden, üçlü-negatif grupta bazal pozitiflik ve negatifliğin önemini istatistiksel olarak değerlendiremedik. Luminal A grubunda ise takip süresince eks olan olgu bulunmadığından sadece *progresyonsuz* sağ kalım açısından analiz ettik. Histolojik derece 3 tümörlerde EGFR pozitifliğini *progresyonsuz* sağ kalım açısından istatistiksel anlamlılığa yakın düzeyde kötü prognostik olarak bulduk. Ancak tüm seride EGFR pozitifliği ya da bazal pozitiflik gösteren olgular, negatif olgulara göre sağ kalım açısından istatistiksel bir farklılık göstermedi. Meme

karsinomlarında daha homojen alt grupların belirlenmesi ve hedef tedavi açısından uygun hasta seçiminde bazal belirteçlerin önemi daha fazla çalışmayla net olarak ortaya konması gerektiği sonucuna ulaştık.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

- Meme karsinomları oldukça heterojen bir hastalık grubudur. Günümüzde oluşturulan biyolojik ve prognostik alt gruplarda heterojenite azalmış olmakla birlikte arayışlar sürmektedir. Daha homojen alt grupların oluşturulmasında bazal belirteçlerin kullanılması yararlı olabilir.

- Çalışmamızda bazal belirteç pozitifliği ile ER pozitif ya da HER2 pozitif grup arasında prognostik bir ilişki izlenmemiştir. Yaş, menopozal durum, evre, lenf nodu pozitifliği, tümör çapı, tümör sayısı, lateralizasyon, DKİS varlığı, tedavi ile bazal belirteç pozitifliği arasında istatistiksel ilişki görülmemiştir.

- Histolojik derece 3 tümörlerde EGFR pozitifliği *progresyonsuz* sağ kalım açısından istatistiksel anlamlılığa yakın düzeyde kötü gidişle ilişkili bulunmuştur (p=0.052). Bu ilişkinin CK5/6 ve/veya EGFR pozitifliği (bazal pozitif) gösteren olgularda CK5/6'nın etkisine bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir (p=0.139)

- Evre, lenf nodu evresi, lenf nodu varlığı, cerrahi sınır pozitifliği, BBMK grubu istatistiksel olarak kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Ayrıca premenopozal dönemde tanı alan hastalar, postmenopozal dönemdekilere göre daha kötü prognozlu olarak izlenmiştir. Luminal A grubu en iyi prognoza sahip alt gruptur.

- Çalışmamızda CK5/6 negatifliği lenf nodu evresine göre düzeltme yapıldığında kötü sağ kalımla ilişkili bulunmuştur. Benzer ilişki luminal B [luminal-HER2 (+) ve luminal-HER2 (-) dahil] grubunda da istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır. Diğer alt gruplarda istatistiksel anlamlılık izlenmese de, luminal A grubunda progresyon görülen 5 olgunun tümü ile luminal HER2 PR (+) grubunda progresyon izlenen 3 olgunun tamamında CK5/6 negatifti. Bu bulgular, literatürdeki genel olarak “bazal belirteç pozitifliği=kötü prognoz” çıkarımlarına ters düşmektedir.

- Luminal HER2 PR (+) grubunda bazal belirteçlerin prognostik önemi ilk kez bu çalışmayla değerlendirilmiş olup, istatistiksel anlamlılık düzeyinde bir ilişki bulunmamıştır. Ancak, evresi IA olan 57 olgu içinden progresyon ve ardından eks görülen iki olgunun da Luminal HER2 PR (+) fenotipe sahip olduğu dikkat çekicidir.

- Eks olan toplam 10 olgunun 6'sı luminal B, 2'si luminal HER2 PR (+), 2'si ise BBMK alt grubunda yer almıştır. Luminal HER2 (+) olgular luminal B içerisinde değerlendirildiğinde ise, eks olan olgulardan 8'i (%80) luminal B grubundadır.

- Çalışmamızda HER2-zengin alt grubu ve klinik ile-ilişkili yeni meme karsinomu alt gruplarından luminal-HER2 PR (-) ile ilgili olgu sayısı yetersizliğinden veya bu gruplarda takipte progresyon/eks olayları görülmediğinden istatistiksel olarak sağ kalım analizleri yapılamamıştır. Ayrıca luminal A grubunda takip süresince tüm olgular hayatta olduğundan *genel* sağ kalım analizi gerçekleştirilememiştir. Üçlü-negatif alt grup olgularının tümü en az bir bazal belirteç pozitifliği gösterdiğinden, bu olgular BBMK grubuna dahil olmuştur. Üçlü-negatif alt grupta bazal-pozitiflik ve negatifliğin önemi bu sebeple incelenememiştir. Ancak bu alt grup bazal belirteçlerden bağımsız olarak en kötü sağ kalımla ilişkili grup olarak izlenmiştir.

- Bazal belirteçlerle izole hücrelerde (<%1) pozitiflikler oldukça sık olarak izlenmiştir. Bu pozitifliklerin bir kısmını tümör hücreleri arasında bulunan nontümöral epitelyal-myoepitelyal hücreler oluşturuyor olabilir. Bu boyanmanın klinik ve patolojik önemi, gerekli olgularda myoepitelyal belirteçlerle birlikte daha geniş serilerde değerlendirilmelidir. Bazal belirteçlerin pozitif boyanma sınır değerlerinin netleştirilmesi, çalışmacılar açısından ve güncel pratikte yararlı olacaktır.

- Ayrıca kimi çalışmalara göre bazal belirteç boyanma oranları klinik ve patolojik farklılıklarla ilişkili bulursa da bizim çalışmamızda böyle bir ilişki görülmemiştir. Konunun aydınlatılması için geniş serilerde büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

İmmünohistokimyasal Yöntemle Moleküler Gruplara Ayrılmış Erken Evre İnvaziv Meme Karsinomunda Bazal Belirteçlerin Klinik ve Patolojik Önemi

Giriş: Meme karsinomları heterojen tümörlerdir. Daha homojen prognostik ve prediktif grupları oluşturma çabaları ve buna yönelik biyolojik belirteç arayışı yoğun bir şekilde sürmektedir.

Amaç: Bu çalışmada erken evre invaziv meme karsinomu ve güncel İHK-temelli moleküler alt gruplarında bazal belirteçlerin klinikopatolojik önemini araştırmak amaçlandı.

Materyal-Metod: İKÇÜAEAH'de 4 yıllık periyotta İMK-BTS tanılı, uzak metastazsız ve takipli olgular çalışmaya alındı. Klinikopatolojik bilgiler kaydedildi. İHK-temelli moleküler alt gruplar ASCO 2013'e göre belirlendi. Ayrıca luminal HER2 (+) olgular luminal B grubundan ayrılarak, bu grup PR durumuna göre iki kategoride irdelendi. Bazal belirteçlerden CK5/6 ve EGFR için İHK boyanma sınırları ROC analiziyle saptanarak not edildi.

Bulgular: Çalışmaya tümü kadın, 140 olgu alındı. Median yaş 51 idi. Olguların %12.5'u histolojik derece 1 iken, %72.8'i derece 2, %14.7 derece 3'tü. Grubun çoğunluğu %75.7'si luminal A ve B idi. Bazal-pozitiflik oranı toplamda %34.3, CK5/6 ve EGFR pozitifliği sırasıyla luminal A'da %16.3 ve %16, luminal B'de %25 ve %20'di. Olguların %95'i erken evrede, aksiller metastaz oranı %45.7 olup %90.7'sine HT, %87.1'ine KT, %81.4'üne RT uygulandı. Median takip süresi 90.7 ay, %12.9 nüks %7.1 eks not edildi. Median *genel* sağ kalım süresi 92 aydı. CK5/6 negatifliği istatistiksel anlamlı olarak kötü *genel* sağ kalım ile ilişkiliydi ($p=0.033$, log rank test, lenf nodu evresine göre düzeltildi). İHK-temelli alt gruplardan luminal B'de de (luminal-HER2 (+) olgular dahil) CK5/6 negatifliği kötü *genel* sağ kalımla ilişkili bulundu ($p=0.035$, log rank test, lenf nodu evresine göre düzeltildi). Histolojik derece 3 tümörlerde EGFR pozitifliği *progresyonsuz* sağ kalım açısından istatistiksel anlamlılığa yakın düzeyde kötü gidişle ilişkiliydi ($p=0.052$). Bu ilişki "CK5/6 ve/veya EGFR pozitifliği"nde, CK5/6'nın etkisine bağlı azaldı ($p=0.139$).

Sonuç: Genel olarak CK5/6 pozitifliği daha iyi prognozla ilişkili olma eğilimindeydi. Ayrıca histolojik derece 3 olgularda bazal belirteç pozitifliğinin prognostik anlamı daha geniş serilerde değerlendirilmelidir kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: bazal belirteç, CK5/6, EGFR, meme kanseri, immunhistokimya, moleküler sınıflama



ABSTRACT

Clinical and Pathological Significance of Basal Markers in Immunohistochemistry-based Molecular Subtypes of Early Stage Invasive Breast Carcinoma

Introduction: Breast carcinomas are heterogeneous tumors. There is an intensive effort to create more homogeneous prognostic and predictive subgroups for which an extensive search for new biomarkers continues.

Objectives: The aim of this study was to elucidate the clinicopathologic significance of basal markers in early stage invasive breast carcinoma and its current IHC-based molecular subtypes.

Materials and Methods: In a 4-year period at IKCUAEAH, the cases without distant metastasis with the diagnosis of invasive breast carcinoma, no special type with follow-up were included in the study. Clinical and pathological information were recorded. The IHC-based molecular subtypes were identified according to ASCO 2013. In addition, luminal HER2 (+) cases were separated from luminal B group and this group was examined in two subcategories based on PR status. Cutoff values for the basal markers, CK5/6 and EGFR, were established by using ROC analysis.

Results: One hundred forty women were included in the study. The median age was 51. Histologic grade was 1 in 12.5% of the cases, grade 2 in 72.8%, and grade 3 in 14.7%. The majority of the group (75.7%) comprised luminal A and B. Basal-positivity rate was 34.3% in total. CK5/6 and EGFR positivity were 16.3% and 16% in luminal A and 25% and 20% in luminal B, respectively. Ninety-five percent of the cases were in early stage, while axillary metastasis rate was 45.7%. 90.7% of the cases received hormone therapy, 87.1% received chemotherapy, and 81.4% had radiotherapy. Median follow-up time was 90.7 months. The relapse ratio was 12.9% and 7.1% of the cases died of disease. Median overall survival was 92 months. CK5/6 negativity was associated with statistically significantly poor overall survival ($p=0.033$, log rank test, adjusted for lymph node status). The same association was observed in luminal B (including luminal-HER2 (+) cases) among all IHC-based

subtypes ($p=0.035$). In histologic grade 3 tumors, EGFR positivity was associated with poor progression-free survival ($p=0.052$), close to statistical significance. However, this significant level of association was disappeared in “CK5/6 and/or EGFR positive tumors” attributable to the effect of CK5/6 positivity ($p=0.139$).

Conclusion: In general, CK5/6 positivity tended to be associated with better prognosis in our series. Furthermore, in our opinion, prognostic significance of basal marker positivity should be assessed in larger series in histologic grade 3 cases.

Key words: basal marker, CK5/6, EGFR, breast cancer, immunohistochemistry, molecular classification



7. KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7–30.
2. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, et al. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* (80-). 2007 Nov 16;318(5853):1108–13. Available from: [citeulike-article-id:1812438%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1126/science.1145720](http://dx.doi.org/10.1126/science.1145720)
3. Byler S, Goldgar S, Heerboth S, Leary M, Housman G, Moulton K, et al. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res.* 2014;34(3):1071–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596345>
4. Nelson L, McKeen HD, Marshall A, Mulrane L, Starczynski J, Storr SJ, et al. FKBPL: a marker of good prognosis in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(14):12209–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494933/>
5. Kim SJ, Kim YS, Jang ED, Seo KJ, Kim JS. Breast Cancer Prognostic Impact and Clinicopathological Correlation of CD133 and ALDH1 Expression in Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2015;18(4):347–55.
6. Köksal H, Nazik EE, Turan E, Karanis MİE, Ulusoy U, Doğru O. Are Peripheral Blood Derived Inflammation Markers Prognostic Indicators in Breast Cancer? *Gazi Med J.* 2016;28(1).
7. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Rijn M Van De, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Lett to N.* 2000;533(May):747–52.
8. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19).
9. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8418–23.
10. Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular Classification of Breast Carcinomas by Immunohistochemical Analysis. Are We Ready? *Diag Mol Pathol.* 2009;18(3):125–32.
11. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3271–7.
12. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(919):5367–74.
13. Tang P, Tse GM. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Aug;140(8):806–14. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2015-0133-RA>
14. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736–50.
15. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):203–9.
16. Parise CA, Caggiano V. Breast cancer survival defined by the er/pr/her2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J Cancer Epidemiol.* 2014;2014.
17. Dairkee SH, Puett L, Hackett AJ. Expression of Basal and Luminal Epithelium-Specific Keratins in Normal, Benign, and Malignant Breast Tissue. *J Natl Cancer Inst.* Oxford University Press; 1988 Jul 6 [cited 2017 Jan 29];80(9):691–5. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/80.9.691>
18. Gusterson B a, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):143–8.
19. Santagata S, Ince TA. Normal cell phenotypes of breast epithelial cells provide the foundation of a breast cancer taxonomy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014;14(12):1385–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263303>
20. Santagata S, Thakkar A, Ergonul A, Wang B, Woo T, Hu R, et al. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J Clin Invest.* 2014;124(2):859–70. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/70941>
21. Dontu G, Ince TA. Of Mice and Women: A Comparative Tissue Biology Perspective of Breast Stem Cells and Differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015;20(1–2):51–62.
22. Won JR, Gao D, Chow C, Cheng J, Lau SYH, Ellis MJ, et al. A survey of immunohistochemical biomarkers for basal-like breast cancer against a gene expression profile gold standard. *Mod Pathol.* Nature Publishing Group; 2013;26(11):1438–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2013.97>
23. Liu H, Fan Q, Zhang Z, Li X, Yu H, Meng F. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Hum Pathol.* 2008 Feb [cited 2017 Feb 18];39(2):167–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045647>

24. Asleh-Aburaya K, Sheffield BS, Kos Z, Won JR, Wang XQ, Gao D, et al. Basal biomarkers nestin and INPP4b identify intrinsic subtypes accurately in breast cancers that are weakly positive for oestrogen receptor. *Histopathology* . 2017 Jan [cited 2017 Feb 28];70(2):185–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.13038>
25. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, Mckinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Imaging, Diagnosis, Progn.* 2008;14(5):1368–77.
26. Kayahan M, Idiz UO, Gucin Z, Erozyen F, Memmi N, Muslumanoglu M. Clinical Significance of Androgen Receptor, CK-5/6, Ki-67 and Molecular Subtypes in Breast Cancer. *J Breast Heal.* 2014;10(10):201–8.
27. Eliyatkin N, Yalcin E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Heal.* 2015;11:59–66. Available from: <http://www.thejournalofbreasthealth.com/eng/makale/447/40/Full-Text>
28. Rijn M Van De, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1991–6.
29. El-rehim DMA, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JFR, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004;(April):661–71.
30. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer.* 2006;42(18):3149–56.
31. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, Leeuwen FE Van, Wesseling J, et al. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival : A Collaborative Analysis of Data for 10 , 159 Cases from 12 Studies. *PLoS Med.* 2010;7(5):1–12.
32. Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120:293–308.
33. Sung H, Chang-claude J, Blows FM, Ali HR. Heterogeneity of luminal breast cancer characterised by immunohistochemical expression of basal markers. *Br J Cancer.* 2015;(August):1–7.
34. Martín-castillo B, Lopez-bonet E, Buxó M, Dorca J. Cytokeratin 5 / 6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant Basal- HER2 subtype of breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(9):7105–22.
35. Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(4):1198–207.
36. TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye kanser istatistikleri . [Internet] 2016. 52 p. Available from: http://www.kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf
37. Colditz G, Chia K. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features. In: Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH van de VM, editor. *WHO Classification of Tumours of the Breast.* 4th ed. Lyon: IARC; 2012. p. 14.
38. Evcimik T. Meme kanserinde prognostik faktörlerin sağ kalıma etkisi. Genel Cerrahi, [Uzmanlık Tezi] TC Sağlık Bakanlığı İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2008.
39. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. 2012. *WHO classification of Tumours of the Breast,* 4th ed. IARC, Lyon.
40. Sinn HP, Helmchen B, Wittekind CH: [TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition]. *Pathologie* 2010, 31:361-366.
41. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *Jama.* 2006;295(14):1658–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1459540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(9):494–506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881035>
43. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv.* 2014. p. 1–14.
44. Feeley LP, Mulligan AM, Pinnaduwa D, Bull SB, Andrulis IL. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Mod Pathol.* 2014;27(4):554–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051696>
45. Network TCGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61–70. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v490/n7418/full/nature11412.html#supplementary-information>
46. Sato K, Miyashita M, Ishida T, Suzuki A, Tada H, Watanabe G, et al. Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki67-high and -low Luminal B-like HER2-negative breast cancers. *Breast Cancer.* 2016;23(2):310–7.
47. Hoadley K a, Andre F, Ellis MJ, Perou CM. Breast cancer intrinsic subtypes. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;
48. Bauer K, Parise C, Caggiano V. Use of ER/PR/HER2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breast cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:228.

49. Fountzilias G, Dafni U, Bobos M, Batistatou A, Kotoula V, Trihia H, et al. Differential Response of Immunohistochemically Defined Breast Cancer Subtypes to Anthracycline-Based Adjuvant Chemotherapy with or without Paclitaxel. Aziz SA, editor. *PLoS One* . Public Library of Science; 2012 Jun 5 [cited 2017 Jan 29];7(6):e37946. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037946>
50. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* . 2003 Jan 15 [cited 2017 Jan 29];95(2):142–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529347>
51. Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 Status With Estrogen and Progesterone Receptors and Histologic Features in 3,655 Invasive Breast Carcinomas. *Am J Clin Pathol* . 2005 Apr 1 [cited 2017 Jan 29];123(4):541–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743737>
52. Wu VS, Kanaya N, Lo C, Mortimer J, Chen S. From bench to bedside: What do we know about hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer? *J Steroid Biochem Mol Biol* . 2015 Sep [cited 2017 Jan 29];153:45–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25998416>
53. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* . 2004;96(12):926–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199112>
54. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(13):4741–8.
55. Kneubil MC, Brollo J, Botteri E, Curigliano G, Rotmensz N, Goldhirsch A, et al. Breast cancer subtype approximations and loco-regional recurrence after immediate breast reconstruction. *Eur J Surg Oncol*. 2013;39(3):260–5.
56. García Fernández A, Giménez N, Fraile M, González S, Chabrera C, Torras M, et al. Survival and clinicopathological characteristics of breast cancer patient according to different tumour subtypes as determined by hormone receptor and Her2 immunohistochemistry. A single institution survey spanning 1998 to 2010. *The Breast*. 2012;21(3):366–73.
57. Sanpaolo P, Barbieri V, Genovesi D. Prognostic value of breast cancer subtypes on breast cancer specific survival, distant metastases and local relapse rates in conservatively managed early stage breast cancer: A retrospective clinical study. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37(10):876–82.
58. Arpino G, Weiss H, Lee A V., Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen Receptor-Positive, Progesterone Receptor-Negative Breast Cancer: Association With Growth Factor Receptor Expression and Tamoxifen Resistance. *JNCI J Natl Cancer Inst* . Oxford University Press; 2005 Sep 7 [cited 2017 Jan 29];97(17):1254–61. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dji249>
59. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* . Nature Publishing Group; 2014 Feb 4 [cited 2017 Jan 29];110(3):565–72. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bjc.2013.756>
60. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, et al. Progesterone receptor loss identifies Luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse. *Ann Oncol*. 2013;24(3):661–8.
61. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer : Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* . Elsevier Ltd; 2010;36(3):206–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.12.002>
62. Tan DSP, Marchio C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, et al. Triple negative breast cancer : molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111:27–44.
63. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* . Nature Publishing Group; 2011 Feb 12 [cited 2017 Jan 29];24(2):157–67. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2010.200>
64. Pala EE, Bayol Ü, Cumurcu S, Keskin E. Triple-Negatif/Bazal Benzeri Meme Kanserinin İmmünohistokimyasal Özellikleri. *Turk Patoloji Derg*. 2012;28:238–44.
65. Chiorean R, Braicu C, Berindan-Neagoe I. Another review on triple negative breast cancer. Are we on the right way towards the exit from the labyrinth? *Breast* . Elsevier Ltd; 2013;22(6):1026–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.08.007>
66. Cakir A, Gonul IL, Uluoglu O. A comprehensive morphological study for basal-like breast carcinomas with comparison to nonbasal-like carcinomas. *Diagn Pathol* . Diagnostic Pathology; 2012;7(1):1. Available from: *Diagnostic Pathology*
67. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Basal Breast Cancer : A Complex and Deadly Molecular Subtype. *Curr Mol Med*. 2012;12:96–110.
68. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* . 2006;19(2):264–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16341146%5Cnhttp://www.nature.com/modpathol/journal/v19/n2/pdf/3800528a.pdf

69. Clinicopathologic U, Features M. Basal-Like Breast Cancer. Update on Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(January):37–43.
70. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*. 2006;208(4):495–506.
71. Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, Merle S, Al Ghuzlan A, Chnecker C, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2005 Sep 2 [cited 2017 Jan 29];18(12):1623. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.3800483>
72. Laé M, Fréneaux P, Sastre-Garau X, Chouchane O, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A. Secretory breast carcinomas with ETV6-NTRK3 fusion gene belong to the basal-like carcinoma spectrum. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2009 Feb 14 [cited 2017 Jan 29];22(2):291–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2008.184>
73. Lu S, Singh K, Mangray S, Tavares R, Noble L, Resnick MB, et al. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol*. 2013 Apr 7 [cited 2017 Jan 29];26(4):485–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222490>
74. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: Distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2302–10.
75. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005;24(29):4660–71.
76. Robinson JLL, Macarthur S, Ross-Innes CS, Tilley WD, Neal DE, Mills IG, et al. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J*. 2011;30(15):3019–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
77. Lehmann-Che J, Hamy A-S, Porcher R, Barritault M, Bouhidel F, Habuellelah H, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDPF15. *Breast Cancer Res*. 2013;15(3):R37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4053236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M, Viens P, et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer*. 2014;13(1):228. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-13-228>
79. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer Res*. 2010;12(5):R68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813035>
80. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*. 2011. p. 5–23.
81. Weigelt B, Mackay A, A'herm R, Natrajan R, Tan DSP, Dowsett M, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: A retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(4):339–49.
82. Bernard PS, Parker JS, Mullins M, Cheung MCU, Leung S, Voduc D, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160–7.
83. Taylor-Papdimitriou J, Lane EB. Keratin expression in the mammary gland. In *The Mammary Gland: Development Regulation and Function*, Daniel CW (ed). Plenum Press: New York, 1987; 181–215.
84. Lacroix-Triki M, Mery E, Voigt J-J, Istier L, Rochaix P. Value of cytokeratin 5/6 immunostaining using D5/16 B4 antibody in the spectrum of proliferative intraepithelial lesions of the breast. A comparative study with 34betaE12 antibody. *Virchows Arch*. 2003;442(6):548–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712335>
85. Lavasani MA, Moïnfar F. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on “basal-like” carcinoma: A critical review. *Journal of Biophotonics*. 2012. p. 345–66.
86. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch*. 1998;433(2):119–29.
87. Gusterson B. Do “basal-like” breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):128–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19132008%5Cnhttp://www.nature.com/nrc/journal/v9/n2/abs/nrc2571.html%5Cnhttp://www.nature.com/nrc/journal/v9/n2/pdf/nrc2571.pdf
88. Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif*. Blackwell Publishing Ltd.; 2003 Oct [cited 2017 Jan 29];36(s1):73–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2184.36.s1.7.x>
89. Rabban JT, Koerner FC, Lerwill MF. Solid papillary ductal carcinoma in situ versus usual ductal hyperplasia in the breast: a potentially difficult distinction resolved by cytokeratin 5/6. *Hum Pathol*. 2006;37(7):787–93.
90. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006;25(43):5846–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998499>
91. Foulkes WD. Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *CancerSpectrum Knowl Environ*. 2003;95(19):1482–5. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/content/95/19/1482.abstract>

92. Shao M-M, Chan SK, Yu AMC, Lam CCF, Tsang JYS, Lui PCW, et al. Keratin expression in breast cancers. *Virchows Arch.* 2012;461(3):313–22.
93. Ck C, Her O, Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, et al. Breast Cancers With Brain Metastases are More Likely to be Estrogen Receptor Negative , Express the Basal. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(9):1097–104.
94. Lv N, Xie X, Ge Q, Lin S, Wang X, Kong Y, et al. Epidermal growth factor receptor in breast carcinoma: association between gene copy number and mutations. *Diagn Pathol .* 2011;6(1):118. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132735>
95. Koletsis T, Kotoula V, Karayannopoulou G, Nenopoulou E. EGFR expression and activation are common in HER2 positive and triple-negative breast tumours. *Histol Histopathol. Murcia : F. Hernández;* 2010;25:1171–9.
96. Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I, et al. Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science (80-) .* 1987 Dec 4 [cited 2017 Feb 18];238(4832):1408–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3500513>
97. Pavelic K, Banjac Z, Pavelic J, Spaventi S. Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma. *Anticancer Res .* [cited 2017 Feb 18];13(4):1133–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394672>
98. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol .* 2005;18(8):1027–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920544>
99. Nassar A, Sussman ZM, Lawson D, Ascp CT, Cohen C. Inference of the Basal Epithelial Phenotype in Breast Carcinoma from Differential Marker Expression, Using Tissue Microarrays in Triple Negative Breast Cancer and Women Younger than 35. *Breast J.* 2012;1–7.
100. Chung A, Choi M, Han B, Bose S, Zhang X, Medina-kauwe L, et al. Basal Protein Expression Is Associated With Worse Invasive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer . Elsevier Inc.;* 2015;15(6):448–457.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2015.06.001>
101. Nogi H, Kobayashi T, Suzuki M, Tabei I, Kawase K, Toriumi Y, et al. EGFR as paradoxical predictor of chemosensitivity and outcome among triple-negative breast cancer. *Oncol Rep. Spandidos Publications;* 2009;21(2):413–7.
102. Ryden L, Jirstrom K, Haglund M, Stal O, Ferno M, Rydén L, et al. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat .* 2010;120(2):491–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20135347%5Cnhttp://download.springer.com/static/pdf/598/art%25A10.1007%252Fs10549-010-0758-6.pdf?auth66=1394971618_7686587215089c48b312375265ea36ae&ext=.pdf
103. Wrba F, Reiner A, Ritzinger E, Heinrich Holzner J, Reiner G. Expression of Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) on Breast Carcinomas in Relation to Growth Fractions, Estrogen Receptor Status and Morphological Criteria. *Pathol - Res Pract .* 1988 Feb [cited 2017 Feb 12];183(1):17–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S034403388801535>
104. Definition of early-stage breast cancer - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute . [cited 2017 Apr 13]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=446564>
105. Elston CW, Ellis O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;403–10.
106. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol .* 2010 Jun 1 [cited 2017 Feb 18];28(16):2784–95. Available from: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2009.25.6529>
107. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol .* 2013;24(9):2206–23. Available from: <http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mdt303>
108. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, Mcshane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2013;31(31).
109. Ciriello G, Sinha R, Hoadley KA, Jacobsen AS, Reva B, Perou CM, et al. The molecular diversity of Luminal A breast tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141(3):409–20.
110. Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G, Shi J, Avila C, Polikoff J, et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: An analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(10):1848–55.
111. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol .* 2015 Jul [cited 2016 Aug 14];12(7):381–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25895611>
112. Weigelt B, Horlings H, Kreike B, Hayes M, Hauptmann M, Wessels L, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol . John Wiley & Sons, Ltd.;* 2008 Oct [cited 2017 Feb 19];216(2):141–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.2407>

113. Nieto Y, Nawaz F, Jones RB, Shpall EJ, Nawaz S. Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and the presence of truncated EGFRvIII in locoregionally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(28):4405–13.
114. Zhang L, Fang C, Xu X, Li A, Cai Q, Long X. Androgen Receptor, EGFR, and BRCA1 as Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int* . 2015;2015:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/357485/>
115. Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer - current status and prospective targeted treatment based on her1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap*. 2009;153(1):13–8.
116. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, et al. Cytogenetic Alterations and Cytokeratin Expression Patterns in Breast Cancer: Integrating a New Model of Breast Differentiation into Cytogenetic Pathways of Breast Carcinogenesis. *Lab Investig* . 2002 Nov;82(11):1525–33. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1097/01.LAB.0000038508.86221.B3>
117. Potemski P, Kusinska R, Watala C, Pluciennik E, Bednarek AK, Kordek R. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*. 2006;69(6):478–85.
118. Grupka NL, Lear-Kaul KC, Kleinschmidt-DeMasters BK, Singh M. Epidermal growth factor receptor status in breast cancer metastases to the central nervous system. Comparison with HER-2/neu status. *Arch Pathol Lab Med* . 2004;128(9):974–9. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=15335267>
119. Shao M, Liu J, Vong JS, Niu Y, Germin B, Tang P, et al. A subset of breast cancer predisposes to brain metastasis. *Med Mol Morphol* . 2011 Mar 23 [cited 2017 Feb 18];44(1):15–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00795-010-0495-2>
120. Horwitz KB, Dye WW, Harrell JC, Kabos P, Sartorius CA. Rare steroid receptor-negative basal-like tumorigenic cells in luminal subtype human breast cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5774–9.
121. Kabos P, Ave E, Dye WW. Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers. 2013;128(1):1–19.
122. Bagaria SP, Ray PS, Wang J, Kropcho L, Chung A, Sim M-S, et al. Prognostic value of basal phenotype in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Surg Oncol* . 2012;19(3):935–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21879270>
123. Kordek R, Potemski P, Kusinska R, Pluciennik E, Bednarek A. Basal keratin expression in breast cancer by quantification of mRNA and by immunohistochemistry. *J Exp Clin Cancer Res* . 2010;29:39. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
124. Nielsen TO, Polley M-YC LS et al. An international Ki-67 reproducibility study. In Presented at the 35th San Antonio Breast Cancer Symposium, December 4–8, 2012 (Abstr S4–6).
125. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, et al. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Hum Cancer Biol*. 2006;12(14 Pt 1):4185–91.
126. Rakha EA, Green AR, Paish EC, Lee AHS, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation : a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007;50:434–8.