T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ONKOLOJİ
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

NEOADJUVAN KEMOTERAPİ ALAN MEME KANSERİ HASTALARINDA miR216b ve miR134'ün EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Müzeyyen Burcu KAPLAN YILMAZ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2021

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ONKOLOJİ
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

NEOADJUVAN KEMOTERAPİ ALAN MEME KANSERİ HASTALARINDA miR216b ve miR134'ün EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Müzeyyen Burcu KAPLAN YILMAZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba Dilay KÖKENEK ÜNAL
İkinci Danışman: Prof. Dr. Olçay KANDEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2021

TEŞEKKÜR

Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji EAH Tıbbi Patoloji bölümünde geçirdiğim uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, desteğini her zaman hissettiğim hocam Prof. Dr. Olçay KANDEMİR'e, uzmanlık eğitimim süresince her an bilgilerine ulaşabilmemi sağlayan ve bunu esirgemeyen bölümümüzün tüm eğitim görevlileri ve uzman doktorlarına teşekkür ederim.

Zorlu tez sürecinin her anında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Tuba Dilay KÖKENEK ÜNAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın PCR aşamasını Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde yürütmemi sağlayan sayın hocam Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye, çalışma arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Samed YORA'ya ve tüm GENKÖK çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Her zaman yardımlarını esirgemeyen laboratuvar teknikeri çalışanlarımıza ve tıpta uzmanlık eğitimini birlikte geçirdiğimiz asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkür ederim.

Varlıklarını her daim arkamda hissettiğim, eğitim hayatım boyunca bu gururu benden çok hak ettiklerini düşündüğüm annem ve babama, kardeşim Dr. Osman Burak KAPLAN'a teşekkür ederim.

Genelde benim katıldığım yoğun çalışma temposunu bu sefer lehime çevirdiğim, tez çalışmamın ortaya çıkmasında büyük katkısı olan eşim Dr. Niyazi Samet YILMAZ'a teşekkür ederim.

Ve uzmanlık eğitimimin son dönemine yetişen, varlığından güç aldığım miniğime sevgilerimle.

Dr. M.Burcu KAPLAN YILMAZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i

İÇİNDEKİLER ii

KISALTMALAR DİZİNİ iv

TABLOLAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

ÖZET ix

ABSTRACT xi

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1.MEME EMBRİYOLOJİSİ 3

2.2. MEME ANATOMİSİ 5

2.3. MEME HİSTOLOJİSİ 6

2.4. MEME KANSERİ 7

2.4.1. Epidemiyoloji 7

2.4.2. Etiyoloji 8

2.4.3. Semptom, Bulgular ve Görüntüleme 9

2.4.4. Patogenez 11

2.4.5. Histopatolojik Tipler 13

2.4.6. Evreleme 15

2.4.7. Prognostik ve Prediktif Faktörler 16

2.4.8. Moleküler Sınıflama ve Prognoza Katkısı 17

2.4.9. Tedavi Seçenekleri 21

2.4.10. Neoadjuvan Tedavi ve Neoadjuvan Tedavi Yanıtının Radyolojik ve Patolojik Açıdan Değerlendirilmesi 22

2.5. KANSER KÖK HÜCRESİ HİPOTEZİ 26

2.6. MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ 28
2.7. miRNA 30
2.8. CD133 VE ALDH1A1 34
2.9. miRNA134, miRNA216b 37
3. GEREÇ VE YÖNTEM 41
3.1. VAKA SEÇİMİ 41
3.2. DOKU HAZIRLANMASI 43
3.3. DEPARAFİNİZASYON 43
3.4. TOTAL RNA ve cDNA ELDESİ 43
3.5. PCR 44
3.6. İstatistiksel Analiz 47
4. BULGULAR 48
5. TARTIŞMA 68
6. SONUÇLAR 76
KAYNAKLAR 78
ÖZGEÇMİŞ 86
EKLER 88
EK-1. TEZ KONUSU ONAY FORMU 88
EK-2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ 94

KISALTMALAR DİZİNİ

ALDH : Aldehit Dehidrogenaz
DCİS : Duktal Karsinoma İn Situ
DFS : Disease Free Survival (Hastalıksız Sağkalım)
EMT : Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon
FFPE : Formaline Fixed Parafin Embled (Formalinde Fikse Edilmiş, Parafine Gömülmüş)
H&E : Hematoksilen & Eozin
HR : Hormon Reseptörleri
KKH : Kanser kök hücresi
KT : Kemoterapi
LNR : Lenf Nodu Oranı
Lum : Luminal
MiRNA : mikroRNA
MKC : Meme Koruyucu Cerrahi
MKKH : Meme kanseri kök hücresi
MRM : Modifiye Radikal Mastektomi
NAKT : Neoadjuvan Kemoterapi
OS : Overall Survival (Tüm Sağkalım)
RCB : Residual Cancer Burden
TN : Triple Negatif
TP : Triple Pozitif
TSG : Tümör Supresor Gen
WHO : World Health Organisation

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Nottingham Histolojik Skorlama Sistemi 14

Tablo 2. Meme kanserinde TNM evrelemesi - AJCC 2018'e göre (20) 16

Tablo 3. Residual Cancer Burden Sınıflaması Hesaplama Kriterleri 24

Tablo 4. Miller-Payne Sınıflaması 25

Tablo 5. Neoadjuvan tedavi yanıtının kategorizasyonu (AJCC-2018'den alınmıştır) (20). 26

Tablo 6. Korelasyon Katsayısına Göre İlişki Durumu 47

Tablo 7. Çalışmaya alınan hastaların demografik ve patolojik verileri 48

Tablo 8. Çalışma Grupları Arasında NAKT öncesinde CD133, ALDH1A1, miR134, miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması 48

Tablo 9. Çalışma Grupları Arasında NAKT sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134, miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması 49

Tablo 10. NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 Düzeylerinin Karşılaştırılması 49

Tablo 11. NAKT öncesi ve sonrası miR134 ve miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması 50

Tablo 12. ER ekspresyonuna göre yapılan gruplamada, çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 Düzeylerinin Karşılaştırılması 51

Tablo 13. ER ekspresyonuna göre yapılan gruplamada, çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrasında miR134 ve miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması 51

Tablo 14. HER2 ekspresyonuna göre yapılan gruplamada, çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrasında CD133 ve ALDH1A1 Düzeylerinin Karşılaştırılması 52

Tablo 15. HER2 ekspresyonuna göre çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrasında miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması 53

Tablo 16. Çalışma grupları arasında tedaviye yanıt durumlarının karşılaştırılması .. 53

Tablo 17. Tedaviye verdikleri yanıta göre (RCB sınıflaması), tedavi öncesinde ölçülen CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması 54

Tablo 18. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 düzeylerinin değişiminin değerlendirilmesi 54

Tablo 19. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların NAKT öncesi ve sonrası miR134 ve miR216b düzeylerinin değişiminin değerlendirilmesi..... 55

Tablo 20. Tedaviye yanıt grupları arasında NAKT öncesinde CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması 56

Tablo 21. Tedaviye yanıt grupları arasında NAKT sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması 56

Tablo 22. NAKT öncesinde tümör derecesine (Modifiye Bloom Richardson) göre CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması. 57

Tablo 23. NAKT öncesinde inflamatuar yanıt açısından CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması 57

Tablo 24. NAKT öncesinde desmoplazi varlığına göre CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması 58

Tablo 25. Tedavi öncesi desmoplazi olan ve olmayan gruplar arasında, tedavi yanıtı, nüks ve metastaz durumu..... 58

Tablo 26. NAKT öncesi lenf nodu tutulumu durumu açısından ölçüm parametrelerinin karşılaştırılması 59

Tablo 27. Vakaların NAKT sonrasındaki desmoplastik stroma durumuna göre, NAKT öncesi bazal CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması..... 59

Tablo 28. Vakaların NAKT sonrasındaki desmoplastik stroma durumuna göre, tedavi sonrasındaki CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması..... 60

Tablo 29. Tedavi sonrasında izlenen desmoplastik stroma grupları arasında, NAKT öncesi ve sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması..... 60

Tablo 30. NAKT öncesinde genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi 61

Tablo 31. Tüm hastaların olduğu grupta, NAKT sonrası tümör yatağı boyutu ile CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeyleri arasındaki korel asyon ilişkisi 62

Tablo 32. NAKT öncesinde, çalışma gruplarına göre genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi..... 63

Tablo 33. NAKT sonrası, genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi..... 64

Tablo 34. NAKT sonrasında, çalışma gruplarına göre genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi..... 65

Tablo 35. Tedaviye yanıt veren hastalarda, NAKT öncesindeki genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi 66

Tablo 36. Tedaviye yanıt veren hastalarda, NAKT sonrasında genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi 66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Embriyonik dönemden başlayarak meme gelişimi - Pansky B, Tıbbi Embriyoloji'den 4

Şekil 2. Memenin anatomik yapısı – Gray H, Gray's Anatomi'den değiştirilerek alınmıştır. 6

Şekil 3. Meme kök hücresinden meme kanserine olan diferansiasyonun şematik diagramı - WHO Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması, 5. Edisyon'dan alınmıştır. 12

Şekil 4. Meme kanseri oluşumu ve progresyonu sinyal yolakları 13

Şekil 5. Meme kanseri subtipleri 21

Şekil 6. miRNA biyogenezi ve miRNA benzeri ve antiMİR oligonükleotidleri ile miRNA modülas- yonu 31

Şekil 7. Meme kanserinde miR216b'nin rolü 39

Şekil 8. CD133'ün çalışma grupları arasında tedavi öncesi-sonrası değişiminin grafiği 50

Şekil 9. HER2 negatif hastalar (TN+Lum) ve HER(+) hastalar (TP+HER2) grupları arasında tedavi öncesi-sonrası CD133 değişiminin grafiği 52

Şekil 10. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen gruplardaki CD133 düzeyinin tedavi öncesi-sonrası değişim grafiği 55

Şekil 11. NAKT sonrası immatür desmoplastik stromal cevap görülen hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası miR216b düzeyleri 61

ÖZET

Amaç: Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, tedavisinde geleneksel tedavi yöntemlerinden kemoterapi, radyoterapi, hormonoterapi ve hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır. Tüm bu tedavilere rağmen bazı hasta gruplarında nüks ve metastazlar önlenememektedir. Bunun nedeninin de, tümör içerisinde mevcut bulunan kanser kök hücreleri olduğu son yıllardaki çalışmalarda gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda, kanser kök hücre genleri olan CD133 ve ALDH1A1 ile, kanser kök hücrelerini farklı çalışmalarda regüle ettikleri gösterilen miR134 ve miR216b ekspresyonlarını değerlendirmeyi, ve sonuçları klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışma Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği'nde trucut biyopsi ile tanı konan, sonrasında neoadjuvan tedavi alan ve ardından ameliyat edilip, ameliyat materyali hastanemizde değerlendirilen 40 kadın hasta ile yapılmıştır. Çalışmadaki hastaların yaş aralığı 20-80 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya yalnızca İnvaziv Duktal Karsinom tipi meme kanseri bulunan hastalar dahil edilmiştir. Hastaların uygun parafin blokları tedavi öncesi ve tedavi sonrası olarak belirlendi. Uygun parafin bloklardan kesitler alınarak deparafinize edildi, total RNA izolasyonu ve cDNA eldesi yapıldı. Kanser kök hücresi genleri ve miRNAlar için hazırlanmış primerler kullanılarak PCR ile seçili gen ve miRNA'ların ekspresyon düzeyleri belirlendi. PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile normalize edildi. Sonuçlar tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere, belirlenen klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Triple Negatif hasta grubu, HER2 negatifliği gösteren hasta grubu (Triple Negatif + Luminal (B) gruplar) ve tedavi yanıtı izlenen hastaların oluşturduğu grupların hepsinde ayrı ayrı ölçülen CD133 düzeyleri, tedavi sonrasında tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde, belirgin düşük bulunmuştur. Tanı anında desmoplastik stromal cevap izlenen hastalarda, miR216b düzeyleri izlenmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Neoadjuvan kemoterapi sonrası desmoplastik stromal yanıtlarına göre sınıflandırılan dokuların tedavi öncesi ölçülen değerleri incelendiğinde; immatür cevap oluşturan tümörlerde miR216b düzeyleri moderate ve matür cevap verenlere göre istatistiksel

olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. NAKT öncesi CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri ile, NAKT sonrası tümör yatağı boyutu istatistiksel olarak anlamlı, orta düzeyde korele bulunmuştur.

Sonuç: Triple Negatif subtipteki hasta grubunda, neoadjuvan kemoterapi yanıtını öngörmede CD133 biyobelirteci pratikte oldukça kullanışlı olabilir. Tedaviye yanıt verecek olan hastalarda, bazal miR216b düzeyleri düşük bulunmuştur. miR216b'nin tedaviye yanıt verecek olan hastalarda saptanan düşüklüğünden yola çıkarak daha kapsamlı çalışmalar ile miR216b, NAKT alacak hastalarda tedavi yanıtını öngörme aracı olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, kanser kök hücresi, neoadjuvan kemoterapi, miR216b, miR134

ABSTRACT

Aim: Breast cancer is the most common cancer in women, and treatment methods such as chemotherapy, radiotherapy, hormonotherapy and targeted therapies are used for treatment of the patients. Despite all these treatments, recurrence and metastases cannot be prevented in some patient groups. Recent studies have shown that the reason for this failure may be the cancer stem cells present in the tumor. In our study, we aimed to evaluate the expressions of cancer stem cells' CD133 and ALDH1A1 and miR134 and miR216b, which have been shown to regulate cancer stem cells in different studies, and to compare the results with clinicopathological parameters.

Materials and Methods: The study was carried out with 40 female patients who were diagnosed with core biopsy in Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Oncology Training and Research Hospital Pathology Clinic. After diagnosis, the patients received neoadjuvant treatment before surgery and surgical material evaluated in our hospital. The age range of the patients in the study was 20-80. Only patients with Invasive Ductal Carcinoma were included in the study. Appropriate paraffin blocks of the patients were defined before and after treatment. Sections were taken from the appropriate paraffin blocks and deparaffinized, total RNA isolation and cDNA obtained. Expression levels of selected genes and miRNAs were determined by PCR using primers prepared for cancer stem cell genes and miRNAs. PCR results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The results were compared with the clinicopathological parameters determined before and after the treatment.

Results: CD133 levels of the triple negative group, the patients with HER2 negativity (Triple Negative + Luminal B) and the patients with treatment response were found to be statistically significantly lower after treatment. In patients with desmoplastic stromal response at the time of diagnosis, miR216b levels were found to be statistically significantly lower than those who did not. When the measured parameters of the tissues classified according to their desmoplastic stromal responses after neoadjuvant chemotherapy were examined; in tumors with an immature response, miR216b levels were found to be statistically significantly higher than moderate and

mature responders. Pre-NACT CD133 and ALDH1A1 levels were found to be statistically significant and moderately correlated with post-NACT tumor bed size.

Conclusion: The CD133 can be useful predicting neoadjuvant chemotherapy response in the patient group with the triple negative subtype. miR216b levels before NACT were found to be low in patients who will respond to treatment. With more extensive studies, miR216b can be used to predict treatment response in patients who will receive NACT.

Keywords: Breast cancer, cancer stem cells, neoadjuvant chemotherapy, miR216b, mir134

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzde yüksek mortalite oranlarına sahip en önemli sağlık problemlerinden biridir. Zaman içerisinde farklı tedavi modaliteleri geliştirilmiş olmasına rağmen pek çok tümör için hiçbir tedavi tam olarak kür sağlayamamaktadır. Günümüzde tümörlere uygulanan cerrahi işlemler ve tedavi protokolleri ile erken evre tümörlerde oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır. İleri evre tümörlerde ise tedavinin asıl yararı sağkalım süresini artırmaktır. Ancak bu alanlardaki tüm ilerlemelere rağmen tedavi sonrası nüks ve metastazlar tam olarak önlenememektedir. Bu nedenle tümör biyolojisi ve patogenezi alanlarında kapsamlı çalışmalar devam etmektedir.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, tedavi seçeneklerinin çeşitliliği ve tedavi yanıtının nispeten öngörülebilmesi nedeniyle diğer kanserlerden ayrılmaktadır. Meme kanseri hastalarında ilk tanı anında elde edilen bazı parametreler hastalığın prognozu hakkında bilgi verici olmaktadır. Ancak daha detaylı prognostik öngörülere sahip olmamızı sağlayacak çalışmalar yapılması gerekmektedir. Ayrıca birçok hastalık ta olduğu gibi meme kanserinde de biyolojik alt tiplere ayrılarak kişiselleştirilmiş tedavilerin uygulanması ana hedefler arasındadır.

Neoadjuvan tedavi, meme kanserinde seçilmiş hasta grupları için kullanılır ve güzel sonuçlar alınabilmektedir. Neoadjuvan tedavinin meme kanseri üzerindeki etkileri, incelemeye oldukça ihtiyaç duyulan bir çalışma hedefidir.

Solid tümörlerde tanımlanan kanser kök hücreleri (KKH), son yıllarda kanser araştırmalarında ilgi çeken bir başlıktır. KKH'ler tümörün başlaması, progresyonu, metastazı, nüksü ve tedavi yanıtında rol oynayan bir hücre grubudur. KKH'ler, hücre içi ve dışındaki etkilerini birtakım sinyal yolakları, gen düzenlemeleri ve miRNA etkileşimleri üzerinden yaparlar. miRNA'lar da çeşitli sinyal yolakları ile KKH'leri regüle edebilmektedir.

Meme kanseri subtiplerinde, tanı konulduğu anda ek çalışmalar yapılarak, spesifik miRNA'ların tanımlanması ile prognoz ve tedavi yanıtı öngörülebilir. Bu şekilde hastalara kişiselleştirilmiş tedaviler sunulabilecektir. Keza, günümüzde uygulanan tedavi modalitelerinin KKH'lara ve KKH ilişkili miRNA'lara olan etkisinin

incelenmesi sonrasında elde edilecek bilgiler tümör biyolojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecektir.

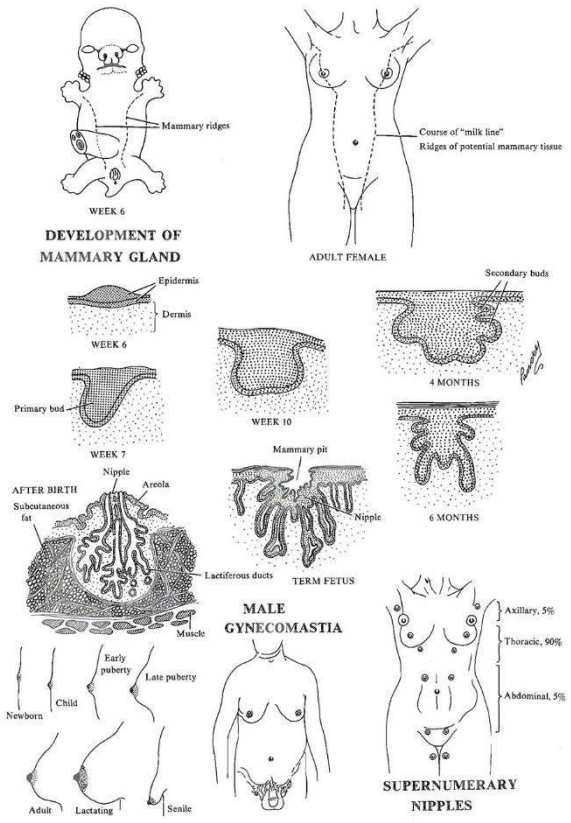
Bu çalışmada meme kanseri tanılı hastalarda, neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrasında ALDH1A1 ve CD133 genleri ile, miR134 ve miR216b'nin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ölçülen miRNA düzeylerinin diğer parametrelerle ilişkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Çalışma sonunda araştırılan miRNA'ların meme kanseri hastalarında tedavi cevabında prediktif ve prognostik bir araç olarak kullanılıp kullanılamayacağı da ortaya konacaktır. Ayrıca miR134 ve miR216b'nin meme kanseri moleküler subtiplerindeki düzeyleri değerlendirilerek bireysel tedaviler için bir hedef olup olmayacakları konusunda da bir fikir sahibi olunabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.MEME EMBRİYOLOJİSİ

Meme gelişimi intrauterin dönemde 1. trimesterde fetüsün ön yüzünde bilateral ektoderm katlantıları oluşması ile başlar (Şekil-1). Bu katlantılar kalınlaşarak aksilladan kasık bölgesine dek bu trase boyunca süt çizgisini oluştururlar. Fetüs büyüdükçe pektoral alan dışındakiler kaybolur (1). Eğer regresyon gerçekleşmezse, bu durum postnatal hayatta ektopik meme dokusu veya aksesuar meme başı olarak kendini gösterir (2). Meme gelişimi erken evrede seks steroid hormonlarından bağımsızdır. Gestasyonun 15. haftasından sonra gelişen meme dokusu geçici olarak testesterona duyarlıdır. Testesteron etkisi altındayken mezenkim göğüs duvarında epitelyal bir taslak etrafında meme tomurcuğunu oluşturmak üzere yoğunlaşır. Daha sonra mezenkim içinde epitel sütunları gelişir. Nihayetinde bunlar meme bezi lobları veya bölümlerini meydana getirir. Fetal papiller dermisin bölümleri gelişen epitelyal kordları örter ve sonunda meme kanallarını ve lobüllerini çevreleyen, bunları destekleyen vaskülarize fibröz bağ dokuyu oluşturur. Kollajenden zengin olan retiküler dermis ise memeye uzanarak, meme parankimini cilde bağlayan Cooper ligamentini oluşturur. Gestasyonun 20. ve 32. haftaları arasında mezenkimin bir kısmı yağ dokuya dönüşür. Son sekiz haftada da epitelyal kordlar lobüloalveolar yapıları oluşturmak üzere kanalize olur ve dallanırlar (2). Epidermis girintisi ile mammaryan boşlukta laktiferöz duktuslar oluşmaya başlar. Doğuma yakın bu mammaryan boşluğun evajinasyonu ile meme başı oluşur. Memenin lobüloalveoler gelişimi 32 ile 40. haftalar arasında olur ve bu dönemde spesifik hormonal dalgalanmalardan kısmen bağımsızdır. Gestasyonun son birkaç haftasında fetal meme dokusu maternal ve plasental steroid hormonlara duyarlı hale gelir ve sonuç olarak asiner birimlerdeki epitelyal hücreler sekretuar aktivite gösterebilirler. Doğumda maternal ve plasental seks steroidlerinin geri çekilmesi ile prolaktin sekresyonu uyarılır, bu da kolostrum salgılanmasını uyarır. Bu dönemde erkek ya da kız yenidoğanda ele gelen meme şişkinliği olabilir. Maternal ve plasental hormonların serumdaki seviyesi azaldıkça sekretuar aktivite sona erer ve meme dokusu regrese olur. Puberteye kadar meme dokusu genellikle dallanma gösteren laktiferöz duktuslardan oluşur. Progresif alveolar yapılanma yoktur ancak rudimenter lobüller olabilir (2). Kadınlarda adölesan meme

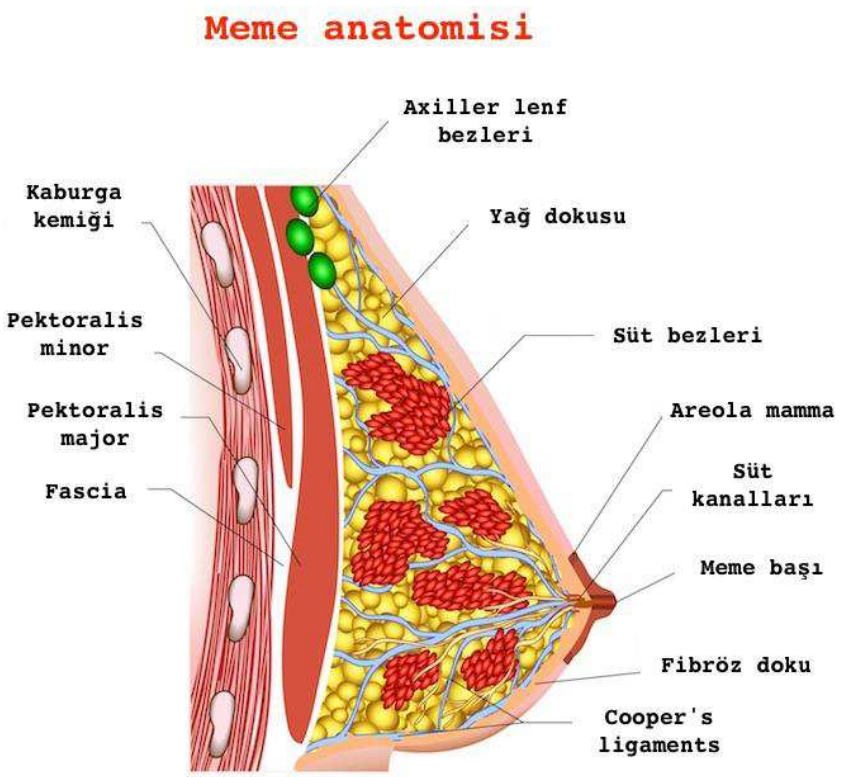
gelişimi puberte başında siklik olarak östrojen ve progesteron sekresyonu ile başlar. Duktuslar kıvrımlanır, dallanır ve öncelikle östrojenin etkisine bağlı epitel kalınlaşır. Duktusların büyüme ve dallanması genellikle progesterondan bağımsızdır. Rölatif östrojen yoğunluğunun da bir sonucu olarak periduktal bağ dokunun yoğunluğu artar. Fetal memede nadir de olsa ekstramedüller hematopoez izlenebilmekte ve doğumdan sonraki ilk 4 aya kadar bu durum devam edebilmektedir. Bu nedenle prepubertal dönemde bazen duktusların arasındaki stromada persistan mononükleer hematopoetik hücreler görülebilmektedir (2). Meme büyümesinin önemli nedeni olan stromal adipöz doku gelişimi ortaya çıkar. Ovulatuar siklus boyunca siklik progesteron ve östrojen maruziyeti lobüloasiner büyümeyi ve bağ doku gelişimini uyarır. Meme dokusunun gelişiminin çoğunluğu pubertede gerçekleşse de bu süreç üçüncü dekada kadar devam eder ve diferansiasyondaki son aşamaya gebelikte ulaşır (2).



Şekil 1. Embriyonik dönemden başlayarak meme gelişimi - Pansky B, Tıbbi Embriyoloji'den (3)

2.2. MEME ANATOMİSİ

Erişkin kadında, meme dokusu düşey düzlemde ikinci veya üçüncü kostadan altıncı kostaya uzanır. Transvers planda sternal kenar medialini oluşturur. Laterali ise mid-aksiller çizgiye kadar uzanmaktadır. Superolateral kadranı pektoralis majörün inferolaterali ile aksillaya doğru uzanım gösterir. Meme bezi, kadınlarda yarım küre şeklinde olup, kürenin düz olan yüzü linea sternalis ve linea axillaris anterior arasında göğse yapışıktır; pektoral kasın üzerinde göğüs ön duvarının yüzeyel fasyası içinde yerleşiktir (Şekil-2). Cooper asıcı ligamanları deriden pektoral fasyaya uzanır ve memeye destek sağlar. Derin fasya ile aksillanın apeksine kadar uzanım gösterebilir (Spence'in aksiller kuyruğu). Derin fasya: pektoralis major kasını saran derin fasya, aşağıda derin abdominal fasya ile devam eder; iç yanda sternum ve klavikulaya, dış yanda yukarıda aksiller fasyaya tutunur. Derin pektoral fasyanın ön yaprağı, kasın dış kenarı boyunca pektoralis minor kasının fasyası ile daha aşağıda serratus anterior kasının fasyası ile birleşir. Derin fasyanın arkaya uzantısı latissimus dorsi kasının fasyası ile devamlıdır. Meme, pektoralis majörü ve serratus anterioru üstten, eksternal oblik ve onun aponevrozunu alttan kaplayan derin pektoral fasya üzerinde yerleşmiştir. Meme ve derin fasya arasında, memenin bir miktar hareketine izin veren, submammaryan boşluğu oluşturan gevşek bağ dokusu bulunmaktadır (4). Meme başı santrale göre az miktarda medial ve inferiordadır. Meme başı, dens fibröz doku ile düz kaslardan oluşur ve hiperpigmente cilt ile kaplıdır. Düz kas sebebiyle erektil fonksiyona sahiptir, bu sayede süt boşaltımına yardımcıdır. 10-15 majör duktus ağzı meme başına açılarak süt sekresyonunu sağlar (5). Memeyi besleyen arterler posterior interkostal arter, lateral torasik arter, internal torasik arter ve torakoakromial arterin dallarıdır. Yüzeyel venleri internal torasik venin dallarına, derin venleri aksiller ve, interkostal ven ve internal torasik vene açılır. Memenin duyusal innervasyonunu interkostal sinir ve supraklavikuler sinirin dalları sağlar (1, 6). Memeyi yüzeyel, aksiller, internal torasik ve posterior interkostal olmak üzere 4 ana lenfatik yol drene eder. Aksiller lenf düğümleri meme lenfatiklerinin %75'inden fazlasını drene eder (4). Memenin lenfatik ve venöz drenajı karsinomların yayılımı açısından büyük öneme sahiptir. Lenf nodu grupları pektoralis minör kası ile ilişkilerine göre isimlendirilirler (7).



Şekil 2. Memenin anatomik yapısı – Gray H, Gray's Anatomi'den değiştirilerek alınmıştır (4).

2.3. MEME HİSTOLOJİSİ

Erişkin meme dokusu değişken oranda fibröz ve adipöz doku içeren stroma içerisine gömülmüş duktus, duktül ve lobüler asiner ünitlerden oluşur. Duktal-lobuler sistemdeki epitel iki katmandan oluşur: iç (luminal) epitelyal hücre tabakası ve dış (bazal) myoepitelyal hücre tabakası. Luminal epitelyal hücreler duktus ve lobuller boyunca uzanır ve kuboidalden kolumnara değişen yapıda izlenebilirler (2). Tipik olarak soluk eozinofilik sitoplazmalı ve uniform oval nükleusa sahiptirler. Dıştaki myoepitelyal hücre tabakası her zaman mevcut olmasına rağmen değişken görünümleri sebebiyle bazı durumlarda ayırt etmek güç olabilir. Görünümleri, ezilmiş nükleusa sahip basık hücre morfolojisinde olabileceği gibi bol şeffaf sitoplazmalı epiteloid hücreler şeklinde de olabilir. Aynı zamanda diferansiye luminal epitel hücrelerinin ve myoepitelyal hücrelerin yokluğunda üçüncü bir hücre tipi, duktal-lobuler sistemde irregüler ve dağınık olarak bulunmaktadır. Bu hücreler yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin 5 ve 14 eksprese ederler ve luminal ve myoepitelyal

hücrelere farklılaşabilen progenitör hücreler oldukları düşünülmektedir. Tip 4 kollajen ve lamininden oluşan bazal lamina, mammaryan duktusları, duktulleri ve asinileri çevrelemektedir. Bazal lamina myoepitelyal hücre tabakasının dışında bulunur ve memenin duktal-lobuler sistemini çevre stromadan ayırır (2). Meme dokusu tipik olarak 15-25 adet lob, lobları birleştiren fibröz doku ve lobları saran yağ dokusundan oluşur. Her lob bağ dokusu ile sarılıdır ve pek çok lobüle ayrılır. Lobüller, bazal lamina ile çevrili 10-100 kadar alveole dallanır. Alveollere duktül ya da asinüs de denir. Lobların her biri meme başındaki laktiferöz sinüse açılır. Laktiferöz sinüs, laktiferöz duktusların meme başına açılmadan önce oluşturduğu genişlemedir ve memenin segmental duktal sistemi bu sinüsle başlar. Laktiferöz duktuslar major (segmental) duktuslara, major duktuslar ise terminal (subsegmental) duktuslara dallanır. Terminal duktuslar lobüllerde sonlanır. Her bir lobül ve bu lobun terminal duktusu memenin temel yapısal birimi olan terminal duktal lobüler üniteyi oluşturur (2, 8-10) Normal bir lobul, asini olarak da adlandırılan değişken sayıda kör sonlanan terminal duktulden oluşur ve tipik çift sıralı döşemeye sahiptir. Terminal duktusu ile lobul birlikteliğine terminal duktal-lobuler unit denir. Meme stroması ise interlobuler ve intralobuler stroma olmak üzere ikiye ayrılır. İnterlobuler stroma meme hacminin büyük kısmından sorumludur. Sellüler komponenti fibroblastlar, myofibroblastlar, adipositler, kan ve lenf damarları meydana getirir. Intralobuler stroma ise daha gevşek bir yapıya sahiptir ve terminal duktal-lobuler unitleri çevreleyip destekler. Genellikle dağınık lenfosit ve plazma hücreleri içerir (11). Menstrual siklusun değişik evrelerinde farklı epitelyal ve stromal değişiklikler gözükür. Ayrıca gebelik ve laktasyon lobul sayısında artışa ve epitel proliferasyonuna yol açar. Epitelyal hücrelerde bulboz veya hobnail görünüm dikkati çeker. Menapozda ise mammaryan terminal duktal-lobuler unitte involusyon ve atrofi meydana gelir. Meme başı pigmente skuamöz epitel ile döşelidir ve Toker hücrelerini barındırır. Areolada pilosebase ünitler ve kıl kökü bulunmaz, bol miktarda sensöral sinir ucu barındırmaktadır (12).

2.4. MEME KANSERİ

2.4.1. Epidemiyoloji

Dünyada kansere bağlı ölümler, tüm ölümlerin 1/6'sını kapsamaktadır (13). 2018 yılında kanser tanısı alanlar tüm dünyada 18 milyon kişi iken, 2040 yılında bu

rakamın 29 milyon ile 37 milyon arasında olacağı öngörülmektedir. Kanserin, 75 yaşına gelmeden her beş kişiden birinde gelişeceği öngörülmektedir (13).

2020 yılında dünyada 2.26 milyon sayı ile organ tümörleri arasında en sık meme kanseri tanısı konmuştur. Bunu 2. sırada akciğer kanseri izlemektedir (2.21 milyon). 685.000 kişi ise meme kanseri dolayısıyla ölmüştür. Kanser nedeniyle ölüm sıralamasında ise meme kanseri dünya çapında 5. sıradadır. Meme kanserinin daha sık görülmesine rağmen diğer tümörlere oranla kanser nedeniyle ölümlerin daha düşük olma sebebi erken tanı - tarama programlarıdır. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (%24). Dünyada her sekiz kadından biri meme kanseri olma riski altındadır (13). Türkiye'de de kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir (%45). Ülkemizde 40-69 yaş aralığındaki kadınlar iki yılda bir mamografi çektirerek meme kanseri tarama programına katılmaktadırlar (14). Risk faktörü olan kadınlar ise daha erken, daha sık veya farklı yöntemlerle taranabilmektedir. Tarama yapılmasının amacı; hastalığa asemptomatik dönemde tanı konulabildiği için hastalara bu dönemde erken tanı koyarak, hastalığın erken yakalanması ve erken tedaviye başlanmasıdır. Hastaya tanı konduğu andaki hastalığın evresi en önemli prognostik faktörlerden biridir.

2.4.2. Etiyoloji

Meme kanserinin etiyolojisinde birçok faktörün etken olduğu düşünülmektedir. Risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, kişisel meme kanseri öyküsü, benign meme hastalığı öyküsü, aile öyküsü, ırk, erken menarş, geç menapoz, ilk gebelik yaşının gecikmesi, emzirmemek, alkol kullanımı, yağlı diyet, obezite, fiziksel inaktivite, OKS kullanımı, menapoz sonrası hormon replasman tedavisi ve iyonize radyasyon yer almaktadır.

Meme Kanseri Risk Faktörleri (10, 15):

Yaş: İlerleyen yaş ile kanser riski artar.

Cinsiyet: Kadın cinsiyet daha fazla risk altındadır.

Kişisel meme kanseri öyküsü: Bir memede kanser varsa diğer memede artmış risk mevcuttur.

Histolojik risk faktörleri: Biyopsilerde izlenen proliferatif lezyonlar kanser riskini rölatif artırır.

Ailede meme kanseri hikayesi ve genetik risk faktörleri: Meme kanseri hastalarının 1. derece akrabalarında risk 2-3 kat artmıştır. Genetik faktörler tüm meme kanseri vakalarının %10 undan sorumlu olup, 30 yaş altında bu risk %25 i bulmaktadır. BRCA1 ve BRCA2, meme kanseri gelişiminden sorumlu tutulan en önemli 2 gendir.

Reprodüktif risk faktörleri: Kadınlar hayatı boyunca östrojene ne denli maruz kalırlarsa meme kanseri gelişme riski o kadar artar. Bunlar erken menarş (12 yaşından önce), ilk canlı doğumun 30 yaşından sonra olması, nulliparite, geç menapozdur (Menapozun 55 yaşından sonra olmasıdır). Menstrual siklusların sayısıyla orantılı olarak meme kanseri riski artmaktadır. İlk mens yaşındaki her bir yıllık gecikmede risk yaklaşık olarak %15 azalmaktadır, aynı zamanda menapoz yaşındaki her bir yıllık gecikmede risk %3 artmaktadır. Sekonder menapoz doğal menapoza benzer koruyucu etki göstermektedir.

Ekzojen hormon kullanımı: Çeşitli nedenlerle östrojen ve progesteron kullanımından dolayı (premenopozal dönemde kontrasepsiyon amacı ile hormon alımı ve postmenopozal dönemde hormon replasman tedavisi en sık nedendir) risk artmaktadır.

2.4.3. Semptom, Bulgular ve Görüntüleme

Meme kanserinin en sık görülen belirtisi ele gelen kitledir. Memede ele gelen kitle ağrısız, sert ve düzensiz kenarlı ise kanser lehine yorumlanır. Bunun yanında meme kanserinde hassas, yumuşak ve düzgün kenarlı kitle de görülebilmektedir. Palpable veya non-palpable kitlelerin yarısından fazlası, en çok üst dış kadran lokalizasyonunda saptanmıştır (16). Bunu üst iç kadran, alt dış kadran, santral ve alt iç kadran takip etmektedir. Meme kanserinin semptomları arasında ele gelen kitleye ek olarak meme başında akıntı veya retraksiyon, meme cildinde portakal kabuğu görünümü, eritem veya ülserasyon da sayılabilir. Mastalji ise toplumda sanılanın aksine, meme kanserinin semptomları arasında son sıralarda gelir.

Kişinin kendi kendine yaptığı meme muayenesinde veya yapılan fizik muayenede tespit edilen kitlelerin natürüne yönelik incelemede görüntüleme

yöntemleri kullanılmaktadır. Meme muayenesi ve görüntüleme yöntemleri aynı zamanda taramalar için de kullanılmaktadır. Görüntüleme yöntemleri arasında meme ultrasonografisi (USG), mamografi (MMG) ve Manyetik Rezonans (MRG) ile görüntüleme bulunmaktadır.

Meme USG: 40 yaş altı semptomatik hastalarda ilk tercih edilen görüntüleme yöntemidir. Ayrıca 40 yaş üstü tarama programındaki kadınlardan dens meme yapısına sahip olanlarda ve MMG tetkikinde lezyon görülen hastalarda tamamlayıcı bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak USG'de karşılığı bulunan lezyonlarda, biyopsiye kılavuz olarak kullanılmaktadır. Kitle lezyonların sınır ve eko yapısı, şekli, konfigürasyonu, meme dokusundaki yerleşim şekli patolojiyi ön görmede yardımcı bulgulardır. Mikrokalsifikasyon ve yapı distorsiyonu saptamak için ideal yöntem olmasa da teknolojik gelişmeler sayesinde bu lezyonlar da USG ile saptanabilmektedir.

Meme MMG: 40 yaş üstü tüm kadınlarda tarama yöntemi olarak kullanılmakla birlikte tanı koymak amacıyla 40 yaş altı kadınlarda da başvurulan bir görüntüleme yöntemidir. MMG'de izlenen yapı distorsiyonu, mikrokalsifikasyon kümesi, fokal asimetrik dansiteler uyarıcı bulgulardır. Dens meme yapısına sahip hastalarda duyarlılığı düşüktür. Bu nedenle bu hasta grubunda sıklıkla tamamlayıcı tetkik olarak USG'ye başvurulmaktadır. USG'de karşılığı izlenmeyen, özellikle mikrokalsifikasyon kümesi için tetkik edilen hastalarda biyopsiye kılavuz yöntem olarak da kullanılmaktadır.

Meme MRG: Risk faktörü bulunan 40 yaş altı olgularda tarama yöntemi olarak başvurulan tetkiktir. Bunun dışında her yaş grubunda hastalığın yaygınlığını, meme başı tutulumunu, multifokalite ve multisentrisite araştırmada kullanılabilmektedir. Kitlesel olmayan kontrastlanmalar, kitlenin sınır ve kontur özelliği, kontrastlanma paterni lezyonun uyarıcı özellikleridir. MMG ve USG'de karşılığı saptanamayan olgularda MRG eşliğinde biyopsi için de MRG'ye başvurulmaktadır.

Görüntüleme eşliğinde biyopsiler ince iğne aspirasyon biyopsisi, trucut biyopsi, insizyonel biyopsi ve eksizyonel biyopsidir.

2.4.4. Patogenez

Meme kanseri biyolojik ve moleküler olarak heterojen bir hastalıktır. Diğer etiyolojik faktörlerin yanı sıra BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların, meme kanserine önemli bir yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir. Normal meme gelişimi ve meme kanseri gelişimi mekanizmaları arasında birtakım benzerlikler vardır. Meme gelişimi ve meme kök hücreleri işleyişinde ER, HER2, Wnt/βkatenin gibi bir çok sinyal yolağı kontrol sağlamaktadır. Bu yolaklar kök hücre proliferasyonu, hücre ölümü, diferansisasyon ve hücre motilitesini kontrol etmektedirler (17).

Meme kanserinin, normal meme dokusundan hiperplazi, premalign lezyonlar ve in situ karsinom aşamaları aracılığıyla diferansiasyon şeklinde geliştiği bilinmektedir. Bu diferasnsiasyona onkogen amplifikasyonları ve tümör süpresor genlerde mutasyon veya gen kayıpları eşlik etmektedir. TSG fonksiyonunun kaybı, ardışık gen mutasyonlarıyla veya bir germ line mutasyon mevcut olduğunda kalan tek sağlam kopyanın mutasyona uğraması ile oluşur. (18)

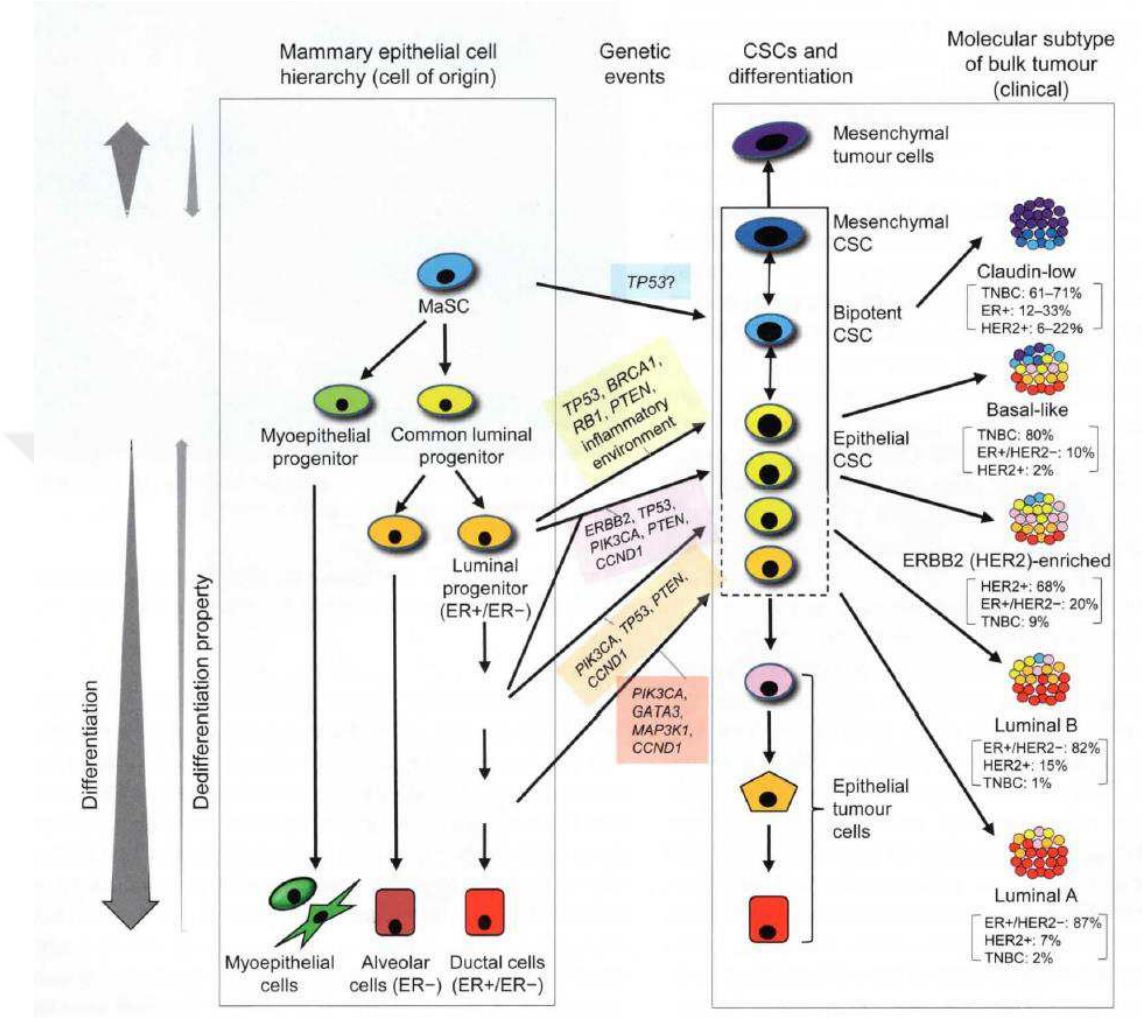
Meme kanserinde hücre orijinine göre iki karsinogenez yolağı işaret edilmiştir: sporadik klonal gelişim modeli ve kanser kök hücresi modeli. Moleküler veriler ER-pozitif ve ER-negatif kanserlerin temelde farklı hastalıklar olduğunu işaret etmektedir (19).

İlk yolakta (ER pozitif yolak) 16q kaybı, 1q artışı, sık olmamakla birlikte 17q12 amplifikasyonu görülmektedir. Bu lezyonlar hormon reseptörlerini eksprese ederler, HER2 overekspresyon kaybı sergilerler ve bazal belirteçleri eksprese ederler. Genel olarak bu yolakta düşük-orta grade'li fenotipte tümörler izlenir.

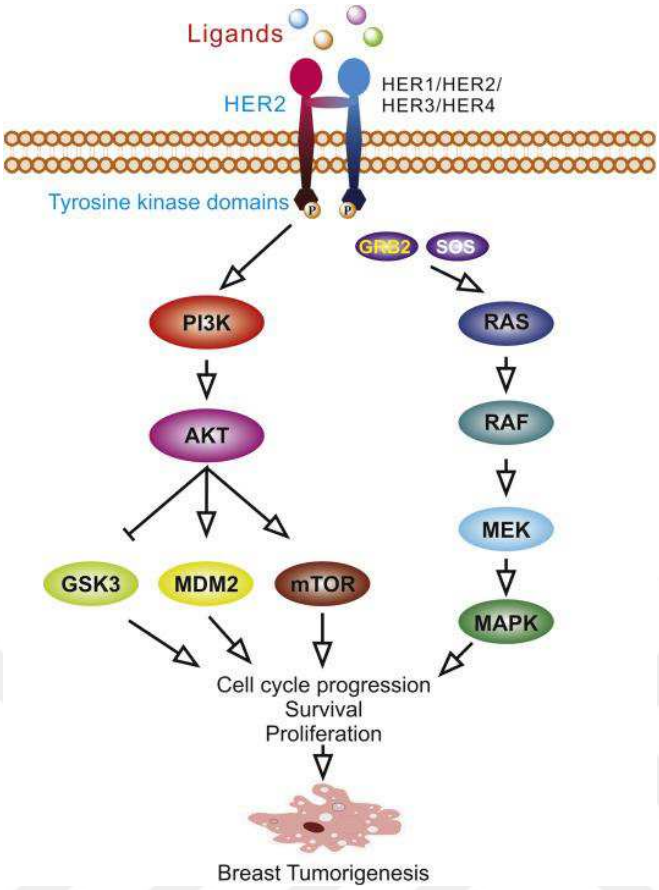
İkinci yolakta (ER negatif yolak) 13q kaybı, 11q13 artışı, 17q12 amplifikasyonu izlenmektedir. Bu yolakta genelde orta-yüksek grade'li tümörler bulunur.

PIK3CA mutasyonu her iki yolakta da bulunur. TP53 mutasyonu ise ER negatif yolakta daha sıktır (Şekil-3). ER negatif meme kanseri HER2 pozitif veya negatifliği sergileyebilir. ER negatif ve HER2 pozitif grupta 17q12 amplifikasyonuna ek olarak PIK3CA mutasyonu sıktır. ER negatif ve HER2 negatif grupta yüksek

proliferatif aktivite, artmış, immünolojik infiltrat ve mezenkimal fenotip izlenir (Şekil-4) (19).



Şekil 3. Meme kök hücresinden meme kanserine olan diferansiasyonun şematik diagramı - WHO Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması, 5. Edisyon'dan alınmıştır (19).



Şekil 4. Meme kanseri oluşumu ve progresyonu sinyal yolakları (17)

2.4.5. Histopatolojik Tipler

İnvaziv meme karsinomu özel olmayan tip (NST; Non Special Type): İnvaziv meme karsinomları içerisinde %80'den fazla görülen, en geniş grubu temsil etmektedir. Bu tümörler terminal dukto-lobuler üniteden gelişmektedir. Bu tümörlerde, daha önceden kullanılan "duktal" terimi nedeniyle bu tümörlerin duktus kökenli olduklarına dair yanlış bir kanı mevcuttu. Bu tanı diğer özel tiplerin dışlanması ile konulmaktadır. Bu sebeple vakadan vakaya değişebilen morfolojik özellikler gösterebilmektedir. Tümör infiltratif özellikte veya itici tarzda gelişebilir. Yapısal olarak kordonlar, trabeküller veya kümelenmeler yapabilir. Solid veya sinsityal infiltratif patern gösteren bazı tümörler, arada minimal stroma bırakmaktadır. Santral lümen bulunan tübüler yapılanmalar şeklinde de görülebilen bu tümörler, nadiren tek hücre veya hedef hücre tarzında alanlar içerebilse de, bu alanlar ve hücreler tipik olarak

lobuler karsinom morfolojisinde değildir. Berrak veya eozinofilik sitoplazmalı tümöral hücrelerin çekirdekleri az veya çok pleomorfik olabilir. Tümör içerisinde tümörün %10'dan fazlasını oluşturan bir alt tip var ise, bu mikst karsinom olarak belirtilmelidir. Eğer bu komponent %90'dan fazla tümör alanını oluşturuyor ise tanıya özel alt tip verilerek yazılmalıdır (19).

İnvaziv lobüler karsinom, %6'lık oran ile ikinci sırada gelen invaziv meme karsinomu tipidir. Geri kalan meme kanserlerini ise tübüler karsinom, kribriform karsinom, müsinöz karsinom, mikropapiller karsinom gibi daha az görülen tipler oluşturmaktadır.

Tümörün histolojik grade'lemesi Nottingham sistemine göre yapılmaktadır (Tablo-1).

Tablo 1. Nottingham Histolojik Skorlama Sistemi

ÖZELLİK	**SKOR**
Tübül ve gland formasyonu	
>%75 fazla tübül oluşumu	1
%10-%75 arası tübül oluşumu	2
<%10 altında tübül oluşumu	3
Nükleer pleomorfizm	
Küçük, regüleri uniform hücreler	1
Orta büyüklükte ve çeşitilikte hücreler	2
Belirgin varyasyon	3
Mitotik indeks	
Mikroskop alan çapına bağlı	1-3
Total skor	**Final grade**
3-5	1
6-7	2
8-9	3

Hormon reseptör durumu;

ER ve PR için ≥ %1 tümör hücresinde nükleer boyanma izlenmesi, ***Pozitif***

Eğer %0 veya < %1 tümör hücresinde boyanma var ise bu boyanma paterni ***Negatif*** kabul edilmektedir.

HER2 (CerbB2) boyanması;

Skor 0: x40 büyütmede membranöz boyanma izlemiyor ise, ***Negatif***

Skor 1: x40 büyütmede >%10 tümör hücresinde soluk membranöz boyanma var ise, ***Negatif***

Skor 2: x10-20 büyütmede <%10 tümör hücresinde zayıf membranöz boyanma varsa, ***Şüpheli (Refleks İn Situ Hibridizasyon testi uygulanmalıdır)***

Skor 3: x2-5 büyütmede <%10 tümör hücresinde kuvvetli membranöz boyanma varsa, ***Pozitif***

olarak değerlendirilir.

İnvaziv meme karsinomu subtipleri (19)

- ER pozitif, HER2 negatif,
- ER pozitif, HER2 pozitif,
- ER negatif, HER2 pozitif,
- ER negatif, HER2 negatif

2.4.6. Evreleme

Meme kanseri TNM sistemine göre evrelenir (Tablo-2).

T evresi tümör boyutu ile ilişkili parametredir.

N evresi metastatik lenf nodu durumu ile ilişkili parametredir.

M evresi uzak metastaz ile ilişkili parametredir.

Tablo 2. Meme kanserinde TNM evrelemesi - AJCC 2018'e göre (20)

Tümör Evresi (T)	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulgusu yok
Tis	DKIS ya da meme başının DKIS ile ilişkili Paget hastalığı
T1	Tümörün en büyük çapı ≤ 20 mm T1a Tümörün en büyük çapı >1 mm, ≤ 5 mm T1b Tümörün en büyük çapı >5 mm, ≤10 mm T1c Tümörün en büyük çapı >10 mm, ≤ 20 mm
T2	Tümör çapı >20 mm, ≤ 50 mm
T3	Tümör çapı >50 mm
T4	Göğüs duvarı ve/veya cilt (ülserasyon veya cilt nodülleri) tutulumu*
	T4a: Göğüs duvarı tutulumu
	T4b: Ciltte ülserasyon, satellit nodüller veya ödem mevcut ('peau d'orange' dahil)
	T4c: T4a+T4b
	T4d: İnflamatuvar meme karsinomu
Lenf Nodu Evresi (N)	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor (önceden çıkarılmış ya da fizik muayene bilgisi yok)
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aksiller lenf nod(lar) metastazı var
	cN1mi – Mikrometastaz var (>0,2 mm, < 2,0 mm)
N2	Klinik olarak fikse veya konglomere aksiller lenf nodu metastazı veya ipsilateral internal mammarian lenf nodlarında klinik olara metastaz var
	N2a: Birbirlerine veya diğer yapılara fikse, konglomere veya yapışık aksiller lenf nodu metastazı var
	N2b: Klinik olarak sadece ipsilateral internal mammarian lenf nodlarında metastaz var
N3	İnfraklavikular lenf nod(lar)'a metastaz veya klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı ile birlikte ipsilateral internal mammarian nod(lar)'da klinik olarak saptanmış metastaz veya aksiller veya supraklavikular nod(lar)'a metastaz.
	N3a: İpsilateral infraklavikular lenf nod(lar)'a metastaz
	N3b: İpsilateral internal mammarial ve aksiller lenf nod(lar)'a metastaz
	N3c: İpsilateral supraklavikular nod(lar)'a metastaz
Uzak Metastaz (M)	
M0	Uzak metastazın klinik veya radyolojik kanıtı yok
cM0 (i+)	Sadece kan dolaşımı, kemik iliği veya bölgesel olmayan lenf nodlarında 0.2 mm'den daha büyük olmayan moleküler depozitler veya mikroskopik tümör hücreleri var.
M1	Klinik ve radyolojik yöntemlerle belirlenmiş uzak metastazlar var.

*Pektoral kas invazyonu ve tek başına dermis invazyonu T4 olarak tanımlanamaz.

2.4.7. Prognostik ve Prediktif Faktörler

Meme kanserinde kabul gören başlıca prognostik faktörler evre, grade, aksiller lenf nodu durumu, tümör boyutu, lenfatik invazyon olup olmaması, hormon reseptör durumu, Ki67, HER2, uzak metastaz varlığı, aile hikayesi, sendrom varlığı, genetik mutasyon taşıyıcılığıdır. Bütün bunlara ek olarak yeni çalışmalarda prognostik

faktörlere etki eden neoadjuvan/adjuvan tedavi alıp alınmaması ve tedavi süresi, hormon replasman tedavileri ve yan etkileri gibi bir dizi faktör sıralanmaktadır.

Özellikle meme kanseri biyolojine ilişkin bilgiler arttıkça kanser yolağında etkili olan, tümörün agresivitesini ve tedaviye cevabı belirlemede etkili farklı genetik ve epigenetik faktörler ortaya çıkmaktadır. Bireysel tedavilerin planlandığı çağımızda bu konuda yapılacak spesifik çalışmalar son derece önem arzetmektedir.

2.4.8. Moleküler Sınıflama ve Prognoza Katkısı

Meme kanseri, sahip olduğu histomorfolojik özellikler, prognoz ve tedaviye yanıt açısından heterojen bir tümör grubudur. Bu heterojeniteden, tümörün köken aldığı hücrelerdeki farklılık, farklı onkogen aktivasyonu ve/veya tümör supresor gen (TSG) fonksiyon kayıpları gibi değişik kombinasyonlar sorumludur. Sporadik meme kanserlerine yönelik gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen ilk kapsamlı araştırma Perou ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılmış ve meme tümörleri dört ana gruba ayrılmıştır (21): 1) Lüminal hücre benzeri, 2) Bazal hücre benzeri, 3)Normal epitel benzeri, 4) HER2 pozitif grup. Prat ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları sınıflamada ise bu 4 gruba ek olarak "Claudin low" alt tipi bulunmaktadır (22). Sonraki çalışmalarda da lüminal hücre benzeri grup kendi içinde lüminal A ve lüminal B olmak üzere ayrılmıştır (23, 24). Meme kanserinin bu alt moleküler grupları farklı özellikler sergilemektedir (22, 25, 26).

Lüminal grup; totalde bakılacak olursa hasta sayısının en çok olduğu gruptur. ER pozitiftir ve normal lüminal hücrelerin özellikleri olduğu düşünülen genlerin transkripsiyonunda artış gözlenir. Lüminal A'da ER ilişkili genler daha fazla eksprese edilirken, lüminal B'de proliferatif genlerin ekspresyonu daha fazladır ve HER2 ekspresyonu yüksek izlenir. Lüminal A, postmenopozal hastalarda sıktır, bunlar genellikle iyi ve orta düzeyde diferansiye olup yavaş büyüyen tümörlerdir, aynı zamanda hormon tedavisine iyi yanıt verirler. Lüminal B grupta lenf nodu metastazı eğilimi izlenmektedir (10).

Bazal benzeri grubu Triple Negatif (TN) (ER, PR ve HER2 negatif) tümörler oluşturmakta, myoepitelyal hücre ve kök hücre belirteçleri ile (CK5/6, CK14, p63) ekspresyonu göstermektedirler (10). Bazal benzeri karsinomların %5-45'inde ER

pozitifliği olabileceği bildirilmiştir (27). Bu gruptaki tümörler yüksek proliferatif aktivite ve histolojik dereceye sahip, visseral organ ve beyin metastazının sık olması beklenen kötü prognozlu tümörlerdir. BRCA1 gen mutasyonu olan çoğu karsinom bazal benzeri tiptedir (10).

"Claudin low" gruptaki tümörler nadir görülen alt tiptir; claudin-3, claudin-4, e-cadherin, EpCAM ve mucin-1'in ekspresyon yokluğu ile karakterizedir. Metaplastik meme karsinomu ve "claudin low" tümörlerin gen ekspresyon paternleri birbirine benzer. Bu tümörlerin muhtemelen lüminal ve bazal benzeri tümörlerden daha primitif bir mezenkimal hücreden köken aldığı düşünülmektedir (28).

HER2 eksprese eden tümörlerde HER2 onkogen ekspresyonu yüksek ve ER negatiftir. Bu tümörler genellikle kötü diferansiyedir ve proliferasyon hızları yüksektir. Bu grupta da beyin metastazı sık görülür (10). HER2 reseptörü pozitif olan tümörlerin büyük kısmı, HER2'den zengin alt tipe değil; lüminal B alt tipine girer. Hedefe yönelik (anti-HER2) monoklonal antikor tedavisine iyi yanıt verirler.

Normal benzeri (null tip) grupta bulunan tümörlerin gen ekspresyon biçimi normal dokuya benzemektedir.

Bu moleküler alt tiplerin, prognostik açıdan önemli farkları olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bazal-benzeri ve HER2 eksprese eden tip prognozu en kötü öngörülen gruplar iken; lüminal A en iyi prognoz beklenen alt tiptir. Normal benzeri tipteki tümörlerin bazal benzeri gruba göre; lüminal A'nın ise lüminal B'ye göre daha iyi prognoz gösterdikleri bildirilmiştir (23, 24).

Lüminal A tümörler için sadece hormon tedavisi yeterli olabilir. Lüminal B tümörler için HER2 pozitif ise hormon tedavisine ek olarak anti-HER2 antikoru (trastuzumab ve/veya lapatinib) ve kemoterapi önerilmektedir. HER2 den zengin tip için anti-HER2 antikoru ve kemoterapi önerilirken, bazal benzeri tip için sadece kemoterapi tedavi protokolleri uygulanmaktadır (29, 30).

Prognostik önemleri anlaşıldıktan sonra, moleküler alt tipleri daha kolay ve ucuz yolla tespit edebilmek amacıyla immünhistokimyasal (İHK) çalışmalar yapılmış, eş zamanlı DNA mikroarray yöntemi ile karşılaştırılarak sınıflamada kullanılabilecek en uygun antikorlar belirlenmiştir. Gerek DNA mikroarray, gerekse İHK çalışmalarda

moleküler sınıflamanın temelini ER ve HER2 pozitifliğinin oluşturduğu görülmüştür. (24, 31, 32)

ER, PR ve HER2'yi kullanarak yapılan sınıflamada;

- ER ve/veya PR pozitif, HER2 negatif, proliferasyon indeksi düşük ise ''lüminal A'',
- ER ve/veya PR pozitif, Kİ67 proliferasyon indeksi yüksek ise (HER2 pozitif/negatif olabilir) ''lüminal B'',
- hormon reseptörleri (HR) negatif, HER2 pozitifse ''HER2'den zengin tip'',
- her üç belirleyici de negatifse (TN) ''bazal-benzeri tip'' olarak kabul edilmiştir (33).

Bazı araştırmacılar null (normal benzeri) tipin ayrı bir grup olmadığını, myoepitelyal belirteçleri fokal ya da zayıf eksprese eden bazal benzeri tümörlerden, yeterli ER ekspresyonu gösteremeyen lüminal tümörlerden oluştuğunu, teknik aksaklıklar nedeniyle boyanamayan tümörlerin de bu grupta yer aldığını düşünmektedir (34).

ER pozitif tümörlerdeki mevcut sınıflama ile tedaviye cevabın yeterince öngörülemeyişi ve alt tiplerin klinik gidişatlarının farklı olması nedeniyle, daha doğru bir sınıflandırma için yeni arayışlar içine girilmiştir. Sonuçta lüminal A ve lüminal B alt tiplerinin ayrımında Ki67 için bir eşik değer belirlenmiş ve ER pozitif tümörler için yeni bir sınıflama önerilmiştir. Buna göre Ki67 proliferasyon indeksi %14 veya üstünde olan ER ve/veya PR pozitif tümörler de lüminal B alt tipi içine alınmıştır (29). Ayrıca TN ve bazal benzeri meme kanserleri yaklaşık %80 oranında örtüşse de, medüller ve adenoid kistik karsinoma gibi uzak metastaz riski düşük, prognozu iyi olan bazı TN spesifik histolojik tipleri bazal benzeri tümörlerden ayırmada CK 5/6 ve EGFR'nin yetersiz kaldığı söylenmektedir (29).

Vici ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, normalde ER temelli yapılan sınıflamalardan ziyade HER2 yi esas alan sınıflama tartışılmış ve ER/PR/HER2 pozitif (Triple Pozitif-TP) tümörlerin tedavi modaliteleri ve prognoz açısından ayrı bir grup olarak ele alınması öngörülmüştür (Şekil-5) (35).

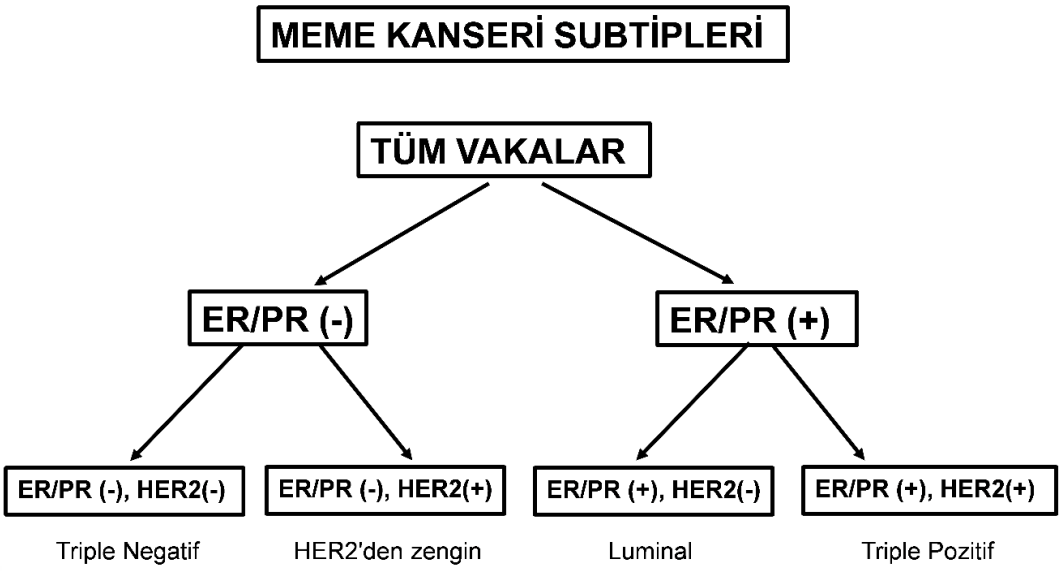
Moleküler alt tiplendirme dışında prognoza ve tedaviye yönelik farklı immünhistokimyasal ve genetik çalışmalar da yapılmaktadır. Örneğin Androjen Reseptörü iyi prognozla ilişkili önemli bir belirteçtir ve özellikle ER negatif meme kanserlerinin tedavisinde hedef olarak kullanılabilir (36). Meme kanseri tanısı konduğunda bazı parametreler incelenerek prognoz, nüks ve sağkalım hakkında fikir sahibi olunabilecek genetik testler üretilmiştir. Bu testlerden bazılarına aşağıda yer verilmiştir.

Meme kanseri indeksi testi; lenf nodu (-) ya da 1-3 arası lenf nodu (+), HR pozitif meme kanserinin tanıdan 5-10 yıl sonra tekrarlama riskini tahmininde ve kişinin 5 yıllık ek hormon tedavisinin fayda görme durumunun belirlenmesinde kullanılır.

EndoPredict test; nod (-) ya da 3 pozitif lenf noduna kadar lenf nodu pozitifliği olan; erken evre, HR pozitif, HER2(-) meme kanserinde uzun dönemdeki rekürrens riskini tahmininde kullanılmaktadır.

MammaPrint testi; HR (+) veya HR (-), evre 1 veya evre 2 meme kanserinde tanı anından itibaren 10 yıl içindeki rekürrens riskinin tahmininde kullanılmaktadır.

Oncotype DX Meme Rekürrens Skoru Testi; erken evre, HR (+), HER2(-) meme kanserinde uzun dönemdeki rekürrens riskini tahmin etmenin yanısıra, ayrıca belirtilen özelliklerde kanser teşhisi konan bir kişinin kemoterapiden fayda görme olasılığı için kullanılır. Oncotype DX Meme duktal karsinoma in situ (DCIS) Skoru Testi aynı memede DCIS rekürrensi ve/veya yeni bir invaziv kanser gelişme riskinin tahmininde kullanulır, ayrıca DIS teşhisi konan bir kişide ameliyattan sonra radyoterapiden fayda görme olasılığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Oncotype DX, 21 genin RT-PCR ile incelendiği bir testtir. Bu şekilde ER pozitif, LN metastazı olmayan hastalarda rekürrens ihtimalleri derecelendirilir. Yapılan bir çalışmada ER, PR, HER2 ve Ki67 kullanılarak, Oncotype-DX ile benzer sonuçlar elde edilebilmiştir (37).



Şekil 5. Meme kanseri subtipleri

2.4.9. Tedavi Seçenekleri

Cerrahi operasyon, meme kanseri tedavisinde esas rolü almaktadır. Meme kanserinin lokal kontrolünü sağlamak için cerrahi operasyona ek olarak radyoterapi kullanılabilir. Tümörün metastaz ve/veya nüks riski var ise sistemik tedavi verilir. Sistemik tedavi seçenekleri hormonal tedavi, kemoterapi, hedeflenmiş tedavi ve bunların farklı kombinasyonlarıdır. Lokal ileri hastalıkta sistemik tedavi verilmektedir. Sistemik tedavi cerrahi yapılamayacak hastalarda palyatif tedavi olarak kullanılır.

Radyoterapi, 5 cm'den büyük tümörlerde, tümör cildi veya göğüs duvarına infiltre olduğunda ve pozitif lenf nodları varsa yarar sağlamaktadır. Santral sinir sistemi veya kemik metastazı gibi ileri evre vakalarda palyatif tedavi olarak da kullanılabilir. Eksternal radyoterapi, brakiterapi veya her ikisinin kombinasyonu olarak verilebilir.

Kemoterapi seçeneklerinden; siklofosfamid, metotreksat ve 5-florourasil (CMF) gibi birinci nesil bir kemoterapi rejimi kullanılarak 10-15 yıllık bir dönemde nüks riskinde %25 azalma görülür. Antrasiklinler (doksorubisin veya epirubisin) ve taksanlar gibi daha yeni ajanlar, meme kanseri için kullanılan modern rejimlerdir. Adjuvan ve neoadjuvan kemoterapi 3-6 aylık süre ile devam eder.

Erken evre HR pozitif meme kanserinin en az 5 yıl boyunca tamoksifen ile adjuvan tedavisinin, nüks oranını ilk 10 yıl boyunca yaklaşık yarı yarıya düşürdüğü ve ilk 15 yıl boyunca meme kanseri ölüm oranını yaklaşık % 30 azalttığı gösterilmiştir. Postmenopozal hastalarda ek olarak aromataz inhibitörleri de kullanılabilmektedir.

Meme kanserinde ilk onaylanmış monoklonal antikor olan trastuzumab, HER2 reseptörünü doğrudan hedefleyen bir monoklonal antikordur. Tek başına kemoterapi ile karşılaştırıldığında HER2 pozitif erken evre meme kanserinde kemoterapi ile kombine edildiğinde nüks ve ölüm riskini azaltır.

2.4.10. Neoadjuvan Tedavi ve Neoadjuvan Tedavi Yanıtının Radyolojik ve Patolojik Açıdan Değerlendirilmesi

Neoadjuvan kemoterapi (NAKT), lokal ileri evre veya inoperable meme kanserinde hastalığın evresini azaltmak ve operable hale getirmek, erken evre meme kanserlerinde ise mastektomi yerine meme koruyucu cerrahiye olanak sağlamak için tercih edilen tedavi yöntemidir. NAKT genelde 6 ay süresince, ortalama 4 kür olarak uygulanır. Neoadjuvan tedavide antrasiklin ve taksan içeren rejimlerin kullanılması, HER2(+) hastalarda antrasiklin sonrasında taksanlarla beraber trastuzumab kullanılması önerilmektedir (38).

Neoadjuvan tedavi öncesinde kitlenin yerini belirlemek için görüntüleme eşliğinde bu alana klips koyulabilmektedir. Böylelikle tedavi sonrası tam yanıt alınırsa tümör yatağının yeri kolaylıkla bulunabilecektir. Hastalara tedavi öncesi görüntüleme yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Tedavi sonrasında ise radyolojik yanıt değerlendirmeleri günümüzde artarak yapılmaktadır. Bu değerlendirmeler meme MR ve Shear Wave Elastograf ile sağlanmaktadır.

NAKT tamamlandıktan sonra hastaların radyolojik değerlendirmeleri yapılır ve opere edilirler. Ameliyat, genellikle cerrah ile daha önceden planlandığı gibi meme koruyucu cerrahi ± aksiller diseksiyon, simple mastektomi ± aksiller diseksiyon, modifiye radikal mastektomi şeklinde yapılabilmektedir. Hastalarda bilinen aksiller tutulum devam etmekte ise aksiller diseksiyon rutin uygulanır, ancak tedaviye yanıt öngörülüyor ise ameliyat esnasında sentinel lenf nodu frozen incelemesi yapılır. 1 lenf nodunda metastaz kaydedilirse aksiller diseksiyon uygulanmaktadır. Frozen inceleme

esnasında sentinel lenf nodu olası bir mikrometastazı gözden kaçırmamak için 2 mm aralıklarla dilimlenerek total incelenir.

Tümöral kitle NAKT sonrasında sebat ediyor ise buna rezidü tümöral kitle denilebilir. Tümöral kitle tedaviye yanıt vermiş ve kısmı/tam küçülme sağlanmış ise, tümöral kitlenin bulundugu alan tümör yatağı olarak değerlendirilir. Makroskopik olarak bu alan yağlı meme dokusundan farklı olarak, fibrotik ve elastik kıvamlı krem renkli alanlar içerecektir. Bu materyallerde makroskopik olarak tümör yatağı boyutu verilmelidir. Tümör yatağı seçilemiyor ise, önceki radyolojik görüntülemelerine bakılıp, klinik bilgileri kontrol edilip, tümörün lokalizasyonu saptanır ve o kadrana yoğunlaşılır. Sonrasında gelen ameliyat materyalinde makroskopik olarak rezidü tümöral kitle mevcut ise tedavi almayan hastadakine benzer şekilde örneklenir, ancak tedaviye yanıt değerlendirilmesi yapılacağı için tümör yatağından daha geniş örnekleme ile parça alınır. Eğer tümör yatağı örneklenecek ise, palpabl ve ya gözle görülür kitle/lezyon olmadığından, oldukça geniş örnekleme ile her dilimden, tümör yatağını temsil edecek şekilde parça alınmalı ve kodlamalar yapılmalıdır. Kodlamalar, mikroskopik olarak olası dağınık tümöral odaklar bulunması halinde boyut verebilmek adına yardımcı olacaktır.

Aksiller diseksiyonda tedaviye sekonder olarak oldukça yağlı ve büyük lenf nodları izlenebilir. Genelde yağlı dejenerasyona uğrayan lenf nodlarının kenarlarında hilal şeklinde kalmış lenf nodu alanları izlenir. Bu alanlar total olarak örneklenir. Hepsi, ancak özellikle en büyük lenf nodları metastatik kapasiteye sahip oldugundan total örneklenir. Lenf nodlarının sayısı ve kodları not edilir. Lenf nodlarında da tedavi yanıtı izlenebileceği göz önüne alınmalıdır.

Mikroskopik değerlendirmede ise, memede rezidü tümöral kitle/tümör yatağından alınan örneklerin incelemesinde belirgin kitle yapan / dağınık odaklar halinde izlenen / solid gelişim paterninde rezidü tümöral hücreler izlenebilir. Rezidü tümöral hücreler neoadjuvan tedaviye sekonder olarak, fazlaca pleomorfizm gösterebilirler ve tedavi altında olduklarından mitoz nadir izlenir. Rezidü tümör, yeterli mitoz sayım alanı mevcut ise grade'lenmelidir. Tedavi sonrası evreleme yapılırken “ypTNM” olarak tariflenir. Rezidü tümörde hormon reseptörleri (ER ve PR), CerbB2 ve Kİ67 proliferasyon indeksi tekrar değerlendirilir. Tümör yatağında,

tedavi ile ilişkilendirilebilecek fibrozis, vasküler proliferasyon, hemosiderin yüklü makrofajlar gibi reaksiyon alanları izlenecektir. Neoadjuvan tedavi invaziv tümöre etki ettiği gibi, in situ karsinoma da etki edebilmektedir. Ancak yer yer in situ karsinomun sebat edebilir. Bu durum, bizim tedavi yanıtı değerlendirmemizi değiştirmeyecektir, çünkü tedavi yanıtı değerlendirilmesi invaziv tümör üzerinden yapılmaktadır. Günümüzde kullanılan farklı yanıt değerlendirme sınıflamaları bulunmaktadır (39).

1. Residual Cancer Burden (RCB) Sınıflaması

Bu sınıflamada rezidü tümöral kitlenin iki boyutu, tümör selülaritesi ve lenf nodundaki tümör yükü esas alınmaktadır. MD Anderson Kanser Merkezi'nin internet sayfasında mevcut olan hesaplama aracı ile tedavi yanıtı hesaplanabilmektedir. Bilinmesi istenen veriler ise aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo-3).

Tablo 3. Residual Cancer Burden Sınıflaması Hesaplama Kriterleri

(1) Primer Tümör Yatağı	
Primer Tümör Yatağı Alanı	(mm) x mm)
Hücresellik (alan yüzdesi):	(%)
In situ komponent yüzdesi	(%)
(2) Lenf Nodları	
Pozitif lenf nodu sayısı	
En büyük metastatik odak çapı	(mm)
Üstte yer alan veriler girildiğinde tedavi yanıtının hangi sınıfta olduğu hesaplanmaktadır.	
Residual Cancer Burden:	
RCB sınıfı:	

Bu veriler girildiği zaman rezidü kanser yükü (***RCB***) yüzdesi ve sınıfı belirlenmektedir.

Rezidü kanser yükü sınıflaması şu şekildedir:

RCB-0: Komplet Patolojik Cevap (tam yanıt)

RCB-1: Minimal rezidüel Hastalık (tama yakın cevap)

RCB-2: Orta derecede rezidüel hastalık (parsiyel yanıt)

RCB-3: Belirgin rezidel hastalık (minimal yanıt/yanıt yok)

2. Miller- Payne Sınıflaması

Miller - Payne sınıflamasında invaziv tümör varlığı ve tümör selülaritesi göz önünde bulundurularak sınıflandırma yapılır (Tablo-4).

Tablo 4. Miller-Payne Sınıflaması

GRADE	Tümör Yüzdesi
Grade 1	Malign hücrelerde değişiklik yok ve genel selülarite gerilememiş
Grade 2	Tümör hücrelerinde minor kayıp (%30), ancak genel sellülarite korunmuş
Grade 3	Tümör hücrelerinde %30-%90 kayıp
Grade 4	Tümör hücrelerinde belirgin kayıp (>%90), sadece küçük gruplar veya dağınık tek hücreler
Grade 5	Malign hücre yok, makrofaj içeren fibroelastik stroma (DCIS bulunabilir)

3. AJCC Sınıflaması

AJCC sınıflamasında invaziv tümörün boyutu ve lenf nodlarının durumu tedavi yanıtını değerlendirirken göz önünde bulundurulur (Tablo-5).

Tablo 5. Neoadjuvan tedavi yanıtının kategorizasyonu (AJCC-2018'den alınmıştır) (20).

Tedavi yanıtı kategorisi	Tanım
Tam yanıt (cCR and pCR) ycT0N0 ypT0N0 or ypTisN0	Klinik tam yanıt (cCR), memede ve lenf nodlarında kanser olmaması Patolojik tam yanıt (pCR), meme ve lenf nodlarında tedavi sonrasında invaziv karsinom olmamasıdır Tedaviden sonra rezidü invaziv hastalık yok ancak in situ kanser var ise pCR olarak tanımlanır
Parsiyel Yanıt (cPR and pPR)	Klinik veya patolojik parsiyel yanıt tedavi öncesi değerlendirmede izlenen T veya N'den biri ya da her ikisinde azalma ile birlikte T ve N'nin herhangi birinde artış olmamasıdır.
Yanıt Yok (NR)	Tedavi ile T veya N kategorisinde belirgin bir değişiklik izlenmemesi veya y kategorisi verilirken T ya da N'de bir artış izlenmesi

Biz bölümümüzde, günümüzde en çok kullanılan ve daha sağlıklı sonuçlar verdiği düşünülen RCB sistemini kullanmaktayız. Bu çalışmada da esas olarak RCB sistemi temel alınarak istatistiksel veriler hazırlanmıştır.

2.5. KANSER KÖK HÜCRESİ HİPOTEZİ

Tümörlerin gelişimini açıklamak için iki ayrı ve birbirine zıt model geliştirilmiştir. Klonal evrim modeli bir tümör içindeki tüm hücrelerin, tümörün korunmasına değişik derecelerde katkıda bulunduğunu varsaymaktadır. Bu modelde, zaman içinde bir takım genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelir, sonuçta en agresif kanser hücrelerinin tümörün progresyonundan sorumlu olduğu görülür. Ayrıca, bir dizi genetik mutasyonla, tümör içindeki herhangi bir kanser hücresi metastazların gelişmesine yol açabilir, tedavilere direnç oluşturabilir ve hastalığın tekrarlanmasına neden olabilir (40).

KKH modeli (hiyerarşik model) ise tümör hücrelerinin bir alt grubunu oluşturan kanser kök hücrelerinin, tümörün başlatılması, ilerlemesi ve/veya tekrarlanmasından sorumlu olduğunu öne sürmektedir. Furth ve arkadaşlarının 1930'lu

yıllarda yaptığı öncü çalışmalarda lösemi oluşturulmuş fare modelinde tek bir hücrenin tümörü oluşturabildiği, ancak her hücrenin tümör oluşturmada başarılı olamadığı tanımlanmıştır (41). Böylece tümör içerisinde sayıca az bir alt popülasyon bulunduğu düşünülmüştür. Kanser kök hücresi (KKH) teorisine dair en dikkat çekici gelişme CD34(+) yüzey antijenlerine sahip bir hücre alt grubunun, in vivo koşullarda tümör oluşturabildiğinin gösterilmesidir. Bu hücrelerin kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği de dahil olmak üzere, normal kök hücrelerle benzer özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (42). Kendini yenileme ve farklılaşabilme özellikleri sayesinde KKH, çeşitli tümör hücrelerinin üretilmesinden sorumlu olup, tümör heterojenitesine katkıda bulunur. Ve bu hipoteze göre metastaz ve tedavi direncinden doğrudan KKH sorumlu tutulmuştur (40). 2003 yılında Al-Hajj ve arkadaşları yaptığı çalışmada tarihte ilk kez solid bir kanserde (meme kanserinde) KKH varlığını ($CD44^{+}/CD24^{-/low}/Lineage^{-}$) göstermişlerdir (43).

Kök hücreler, kendilerini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesine sahip özel hücrelerdir. Farklılaşma kapasitelerine göre farklı sınıflamalar yapılabilir. Embriyonik kök hücreler, embriyoların blastokistlerinden gelişir ve pluripotent özellikte olup vücuttaki çeşitli olgun hücre ve dokulara farklılaşabilir. Somatik kök hücreler ise deri, karaciğer, akciğer ve meme bezi gibi çeşitli organlardan gelişir. Embriyonik kök hücrelerin aksine somatik kök hücreler sınırlı farklılaşma kapasitesine sahiptirler, bu nedenle multipotent veya unipolardırlar. Progenitör hücreler olgun hücre üretmek için farklılaştıkça, kendini yenileme yeteneklerini zamanla kaybetmektedirler. Kök hücreler yetişkin dokuların çoğunda az miktarda bulunur ve izole edilmesi zordur.

Normal kök hücreler ile kanser kök hücreleri ayırt etme açısından glikolizasyonun anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir (44, 45). Şu ana kadar tanımlanmış olan kök hücre belirteçlerinin çoğu proteinlerdir. Az sayıda kök hücre belirtecinin ise proteinlere veya lipidlere bağlı glikanlar olduğu gösterilmiştir (46). Normal bir kök hücre veya progenitör bir hücreden kanser kök hücresine malign transformasyon sırasında kök hücre glikoprotein belirteçlerinin glikolizasyonlarında değişiklikler meydana gelebilmektedir. Kök hücre belirteci glikosilasyonundaki değişikliklerin bu hücrelerin biyolojik davranışının değişmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (45).

KKH, kendini yenileme, diferansiasyon ve tümörün ilerlemesini sağlama kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu hücreler, yüzeylerinde sahip oldukları $CD44^{+}/CD24^{-}$ fenotipi ve ALDH1A1 ekspresyonu ile izole edilebilirler. Ayrıca in vitro olarak adhezyon yapmayan, çok hücreli küreler (tümorosfer) oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bununla birlikte, kök hücre modelini tanımlamaya yönelik tartışmalar mevcuttur. Tümör heterojenitesindeki KKH işlevinin anlaşılmasının ve KKH'lerini hedef almaktan ziyade; farklılaşmaya karşı koymak amacıyla kullanılabilecek ilaçları tanımlamanın önemi artmaktadır (47). Aldehit dehidrogenaz-1 (ALDH1) ile birleştirilen CD133 ekspresyonu, over KKH'lerinin uygun şekilde seçilmesini sağlamıştır. Ayrıca, CD133 ve ALDH1 birlikte ekspresyonu, yüksek dereceli over kanserinde sağkalımı bağımsız olarak tahmin edebilmiştir (48-50).

KKH lar, tedavide kullanılan ilaçlar tarafından elimine edilemediklerinde, hastalığın tekrarı ve tedavi direncinden sorumlu oldukları öngörülebilir (43). KKH tümör progresyonunun ve saldırganlığının sorumlusudur. Cinsiyet belirleyici bölge Y-box 2 (SOX2), oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (Oct4), Nanog ve DNA (sitozin-5) -metiltransferaz 1 gibi embriyonik kök hücre faktörlerini eksprese ederler. Geleneksel kanser tedavilerinin, tedaviye direnç geliştiğinden, tümör metastazı ve nüksü görülebildiğinden dolayı KKH'leri hedef almadığı düşünülmektedir.

KKH biyolojisinin anlaşılmasıyla, kanseri başlatan hücreleri ortadan kaldıracak ve böylece hastalığın nüksetme riskini büyük ölçüde azaltabilecek yeni nesil ilaçların geliştirilmesi sağlanabilir.

2.6. MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ

Mevcut tedavi yöntemleri ile meme kanseri başarılı sonuçlar elde edilmiş olsa da hastaların bir kısmında nüks ve metastazlar önlenememektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile tümör içinde az sayıda bulunan ve tümörü yeniden başlatabilme kapasitesine sahip kanser kök hücrelerinin nüks ve metastazlardan sorumlu olabileceği ortaya konulmuştur. MKKH somatik ve normal kök hücrelerden kaynaklanmaktadır. KKH'ler hem epitelyal (proliferatif) hem de mezenkimal (invaziv) özellikte fenotip geliştirme yeteneğine sahiptir. MKKH'lerin farklılaşma kapasitesi, kendini yenileme ve terapötik direnç gibi birçok özellik gösteren küçük bir meme kanseri hücreleri popülasyonu olduğu gösterilmiştir.

KKH'lerin tanımlanması ve karakteristik özelliklerinin ortaya konulması amacıyla, ayrıca tedavi etkinliğinin izlemindeki ve prognozdaki önemlerini belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. CD44 ve CD24, KKH popülasyonunu tanımlamak için incelenen ilk belirteçlerdendir. Daha sonra, aldehit dehidrogenaz enzimi (ALDH veya ALDH-1), başka bir KKH belirteci olarak tanımlanmıştır. ALDH1, CD44 ve CD24 birlikte değerlendirildiğinde, kısmen örtüşen ancak aynı olmayan iki kanser kök hücresi popülasyonunun varlığı gösterilmiştir. Her iki KKH popülasyonu ile ksenograftta yeni tümör inisiasyonunu meydana gelmiştir (51). Ek olarak, KKH'lerinde Wnt, PI3K/Akt/FOXO, TGF-β ve Notch gibi kendini yenileme ve köklülük yolaklarının regülasyonunda düzensizlikler saptanmıştır (52, 53); belirtilen bu yolaklar tümör invazyonu, hematojen yayılım ve metastazda rol oynamaktadırlar (54). Meme tümörlerinde kritik rol oynayan sinyal yolaklarının inhibisyonunun, etkili tedavi yaklaşımları için önemli olduğu gösterilmiştir (55).

CD44, CD24, CD133, ALDH1A1, epitelyal spesifik antijen, EpCAM, CD61, CD49f gibi meme kanseri kök hücrelerine (MKKH) özgü birçok biyobelirteç tanımlanmıştır (56). Bu biyobelirteçler, MKKH izolasyonu için hayati öneme sahiptir ve potansiyel olarak meme kanseri tedavisi için terapötik hedefler olarak hizmet ederler (56). Nakanishi ve Ross'un 2012 yılında yayımladıkları derlemelerinde meme kanseri kök hücrelerinin CD44, CD133 gibi yüzey belirteçlerini eksprese ederek hücre migrasyonu, farklılaşması ve çoğalmasını kontrol ettikleri gösterilmiştir (57). $CD44^{+}/24^{-}$, tekrarlayan meme kanserli hastalarda etkili tedavi ve sonuçların tahmin edilmesine izin veren uygun bir prognostik göstergedir (58, 59).

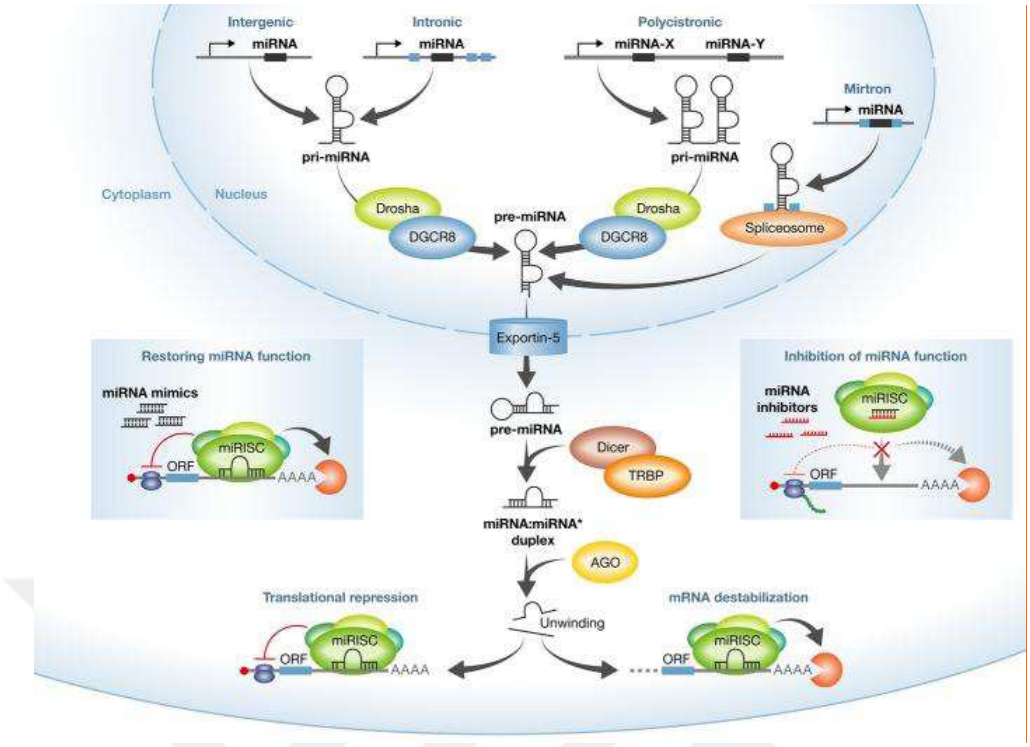
Holohan ve arkadaşlarının yayımladıkları çalışmaya göre KKH'lerin, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerinin yüksek ekspresyonu aldehit dehidrojenaz (ALDH) aktivitesi, Bcl-2 ve BCL-XL anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu, DNA hasarının onarımında artış, Notch ve NF-κβ gibi hücrenin hayatta kalmasını sağlayan temel sinyal moleküllerinin aktivasyonu dahil çeşitli önemli özellikler nedeniyle geleneksel kemoterapilere oldukça dirençli olduğunu belirtmişlerdir (60). Aynı çalışmada, oksidatif stresi azaltmak için detoksifiye edici enzim ALDH1 aktivitesinin artığını göstermişlerdir. KKH'ler terapötik hasarlardan hemen sonra DNA onarım sürecini aktive etme gibi farklı genotipik-fenotipik özellikler gösterirler. Bu özellikler de onları kemoradyoterapilere duyarsız kılabilmektedir. Ek olarak, kanser kök

hücreleri nispeten hareketsizdirler ve bu nedenle hızlı bölünen hücreleri hedefleyen kemoterapilere karşı dirençli olmalarına bu özelliklerinin etki ettiği düşünülmektedir. Daha farklılaşmış tümör hücrelerinin kök hücre benzeri duruma geri dönebileceği tümörlerin plastisite özelliğidir, bu durum bir tümör hücre kütlesinin yeni bir kök hücre hedefleme ajanı ile birlikte hedeflenmesi gerektiğini gösterir. MKKH'lerin ATP Binding Cassette Subfamily G Member-1 (ABCG1) ve ATP Binding Cassette Subfamily G Member-2 (ABCG2) gibi transporter proteinlerini yüksek seviyede eksprese ederek de kemoterapötik ilaçların atılımı yani ilaç direnci geliştirmede etkili oldukları gösterilmiştir. (57)

2.7. miRNA

MikroRNA'lar (miRNA), 18-24 nükleotitten oluşan ve kodlamayan RNA'lardır. miRNA 'ların esas rolü transkripsiyonu ve translasyonu düzenleyerek gen regülasyonunda rol almalarıdır (Şekil-6) (61). Ayrıca hücreler arası sinyalizasyonda da rol almaktadırlar. miRNA'lar hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe ederler ve böylece hücre proliferasyonunu, diferansiasyonunu, invazyonunu ve apoptozu kontrol ederler.

miRNA'ların çoğu hücre içindedir. Ancak dolaşımda ve vücut sıvılarında da tespit edilebilmektedirler (62-64). Bunlar dolaşımdaki miRNA'lar olarak adlandırılır ve kan, idrar, tükürük, seminal sıvı, anne sütü ve diğer sıvılarda bulunurlar (62, 63). Dolaşımdaki ve vücut sıvılarındaki miRNA'lar apoptoz/nekroz yoluyla veya bir proteine bağlanarak, mikroveziküllerde taşınarak eksozomlardan aktif taşıma ile boşaltılırlar (62, 65). miRNA regülasyonunun çok sayıda hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (66).



Şekil 6. miRNA biyogenezi ve miRNA benzeri ve antiMİR oligonükleotidleri ile miRNA modülas- yonu (67)

miRNA kodlayan genlerin önemli bir kısmı genomun kanser ile ilişkili bölgelerinden ve malignitelerde yer değiştiren veya çoğaltılan gen bölgelerinden kodlanmaktadır (68). miRNA'ların kanser biyobelirteçleri olarak ilgi çekici olmasının nedeni plazma, serum, idrar, tükürük, süt gibi farklı vücut sıvılarında dolaşan miRNA'ların bulunmasından kaynaklanmaktadır. Tümöre özgü miRNA'ların serumda tespit edildiği ilk çalışmalardan biri diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarında gerçekleştirilmiştir (69). Kanserde miRNA ekspresyonlarındaki düzensizliğe, pri-miRNA'nın transkripsiyonel hatalarının da neden olabileceği bildirilmiştir (68, 70).

Tümör supresör genlerin negatif regülasyonunda yer alan miRNA'ları kapsayan kromozomal bölgeler amplifiye edilebilmekte ve bu durum kanser gelişimi ile sonuçlanabilmektedir. (Bu amplifikasyon, miRNA'nın artan ekspresyonu ve bunun sonucunda TSG'nin susturulması ile sonuçlanır.) Tersine, onkogenleri inhibe edebilen miRNA'ların ifadelerindeki azalma ise hedef onkogenin aşırı ekspresyonundan sorumlu olabilmektedir (71, 72).

Calin ve arkadaşları, 2006 yılında, miRNA profilinin tümör tanı, sınıflandırma ve prognozu için kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır (73). Iorio ve arkadaşlarının normal ve tümörlü dokulardaki miRNA'ların ekspresyonu ve disregülasyonunu değerlendirmek için yaptığı çalışmalarında; farklı tümörleri olan bireylerin dolaşımdaki miRNA profillerinin tümör dokularında gözlenen paterni yansıttığı ve dolaşımdaki miRNA'ların erken teşhis için kolayca saptanabilir tümör biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (74). Kanser hastalarının doku, plazma ve serumları ile sağlıklı kişilerin örnekleri karşılaştırıldığında, çok sayıda miRNA'nın ekspresyon düzeylerinde düzensizlik gösterilmiştir (70).

miRNA'ların işlevlerinin inhibisyonu veya indüklenmesi yoluyla deneysel olarak yapılan çalışmalarda, genellikle, tümörlü dokularda onkomiR'ler daha fazla temsil edilme eğiliminde iken; tümör supresör fonksiyonu olan miRNA'lar daha az ifade edilmektedir (75, 76).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile meme kanserinde miRNA düzensizliğinin, kanser kök hücreleri ve ilgili sinyal yolakları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

miRNA'ların kök hücre fonksiyonunda önemli faktörler olduğu öne sürülmüştür. Bunun bir nedeni, kök hücrelerdeki belirli miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin diğer normal dokulardaki hücrelerden farklı olmasıdır. Bu, miRNA'ların kök hücre regülasyonunda benzersiz bir role sahip olabileceği anlamına gelir.

Meme kanserini başlatan hücrelerde let-7 ekspresyonunda azalma izlenmiştir (77). Meme tümörünü başlatan hücrelerin let-7-lentivirüsü ile enfekte edilmesi proliferasyonu, mamosfer oluşumunu, in vitro farklılaşmamış hücrelerin oranını, tümör oluşumunu ve metastazı azaltmıştır (77). Bu durum let-7'nin meme kanseri kök hücrelerinin karakteristik özelliklerinden kendini yenileme yeteneği, multipotent farklılaşma ve tümörlere dönüşme yeteneğini regüle ettiği saptanmıştır.

miRNA'ların kök hücre fonksiyonunu düzenlediğini doğrulamak için, birçok araştırmacı Dicer-1 mutantlarını kullanmıştır. Dicer-1, miRNA'ların biyogenezinde özel bir rol oynamakta ve bu nedenle miRNA'ların kök hücrelerdeki rolü hakkında büyük bir fikir vermektedir. Fare modellerinde Dicer-1 fonksiyonundaki kayıp, fare embriyolarında gelişimin erken dönemlerinde hayvan ölümüne ve kök hücrelerinde tükenmeye neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum, miRNA yolağında meydana gelen

bozuklukların kök hücre popülasyonunun korunmasına büyük bir etkide bulunduğunu göstermektedir. Farklılaşmamış kök hücreler de, kanser hücrelerine benzer bir miRNA ekspresyon profili sergilemektedir.

miRNA ekspresyonu, kanser kök hücre düzensizliği için hayati bir anahtardır. miR-21'in meme tümör dokularında aşırı eksprese edildiği, Bcl-2 ve programlı hücre ölümü-4 (PDCD-4) regülasyonu yoluyla tümör oluşumunu modüle ederek bir onkogen olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. (78)

Bazı miRNA'lar KKH'lerde upregüle edilir ve onkogen olarak işlev görür. Bu onkogenler, ifadelerini ortadan kaldıran tedavilerle hedeflenmelidir. Diğer miRNA'lar, doğaları gereği hücre çoğalmasını baskılayarak tümör baskılayıcılar olarak hareket ederler, ancak KKH'lerde aşağı regüle edilerek kanser ilerlemesine neden olurlar. Bu tümör baskılayıcılar, KKH'lerdeki tümör baskılayıcı yeteneklerini eski haline getiren tedavilerle hedeflenmelidir. Bu nedenle, bu anormal miRNA ekspresyon seviyelerini moleküler miRNA tedavisi ile ele almak, KKH düzensizliği ve dolayısıyla onkogenezin üstesinden gelmek için güçlü bir araç olabilir.

miRNA'lar, mRNA'lara kıyasla daha yüksek stabiliteye sahiptir ve diğer biyolojik materyallerde ekspresyonlarının incelenmesi çok daha kolaydır. Böylece minimal invazivşekilde ölçülebilen, yeni ve güçlü biyobelirteçler olarak kolay kullanımları söz konusu olabilir. miRNA'ların parafine gömülü dokulardan (FFPE), periferik kandan (serum/plazma) ve dolaşımdaki eksozomlardan güvenilir bir şekilde ölçülebileceği metodlar çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur (79). miRNA ve miRNA benzeri biyobelirteçlerin ortaya konulması, bu biyobelirteçlerin ölçülmesine dair yeni ve daha hassas teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ile birçok hastalıkta olduğu gibi kanser tanı, tedavisi ve prognozunda kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları söz konusu olabilecektir.

KKH regülasyonunu sağlayan spesifik miRNA'lar hakkında yapılacak araştırmalar, kanserlerdeki onkogenezin arkasında yer alan mekanizmaların aydınlatılması için çok önemli olacaktır. Düşük seviyelerde eksprese edildiğinde bile kanseri teşvik eden onkojenik olarak tanımlanan miRNA'lar lokal olarak uygulanan antagomirlerle hedeflenebilir (80). Öte yandan, tümör baskılayıcılar olarak sınıflandırılabilen ve aşağı regüle olduklarında kanser oluşan miRNA'lar, uygun

bir viral vektör aracılığıyla belirli bir kanser kök hücresini hedefleyerek intihar gen terapisi için aday olabilir.

Bununla birlikte, miRNA'ların KKH'lerin hayatta kalmasında ve sürdürülmesinde oynadıkları rollere ilişkin çok daha fazla bilgi, belirtilen çalışmaları gerçekleştirmeden önce gerekli olacaktır. Ancak bu mekanizmaların aydınlatılması ile belirtilen farmakolojik hedefler tam olarak gerçekleştirilebilir (81).

2.8. CD133 VE ALDH1A1

Literatürde, MKKH'leri belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda ALDH1A1^{+}, CD44^{+}/CD24^{-} ve CD133^{+} fenotipindeki hücrelerin tümör oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (82). Bu nedenle, çalışmamızda CD133 ve ALDH1A1 genlerinin ekspresyonlarını değerlendirmeyi amaçladık.

Aldehit dehidrogenazlar (ALDH'lar), endojen ve eksojen aldehit substratlarının ve retinolün oksidasyonunu katalize eden bir (NAD(P) $^{+}$) bağımlı enzimler grubudur (83). ALDH1, aldehitleri karboksilik asitlere kataliz eden ve ayrıca çeşitli alifatik ve aromatik aldehitlerin metabolizmasında rol oynayan bir enzimdir. ALDH1A1 beyin, testis, böbrek, göz, meme, over, karaciğer ve akciğerler gibi organlarda ve esas olarak sitozolde bulunmaktadır (83). ALDH1A1 izoenzimi retinaldehidi retinoik aside okside etmekte, ayrıca tümör başlatıcı kök hücre özelliği gösteren hücrelerde yer alan genlerin ekspresyonunu düzenlemekte bu şekilde tümör büyümesi ve ilaçlara karşı direnç oluşturabilmektedir.

ALDH1A1'in kanser kök hücresi belirteci açısından önemi çalışmalarda vurgulanmıştır. ALDH1A1'in yüksek düzeylerdeki ekspresyonunun çeşitli tümörlerde kötü prognoz ve sağkalım ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. ALDH1A1'in, meme, akciğer, özofagus, kolon ve mide gibi normalde yüksek düzeylerde ALDH1A1 eksprese etmeyen dokularda faydalı bir KKH tedavi hedefi olabileceği düşünülmektedir.

ALDH1 en yaygın MKKH belirtecidir ve hem in vitro hem de in vivo meme kanseri modellerinde çalışılmıştır. Yüksek ALDH1A1 düzeyleri çalışmalarda kötü prognoz, yüksek tümör grade i, lenf nodu metastazı ile korele bulunmuştur.

Çalışmalarda ALDH1A1 yüksekliği, VEGF asosiye anjiyogenez ile ilişkili bulunmuştur (84). Yine ALDH1A1, meme kanserinin ilerlemesi ve yayılması ile ilişkilidir (85). Ma ve arkadaşlarının TN meme kanserli hastalarda yaptığı çalışmalarında, ALDH-1 ekspresyonu ile tümör boyutu, tümör evresi ve sağkalım arasında korelasyon saptamışlardır (86). Charafe-Jauffret ve arkadaşları tarafından fare ksenograftlarında yapılan bir çalışmada ALDH1A1^{+} meme kanseri hücrelerinin in vitro olarak tümör invazyonunu ve tümör metastazını düzenlediği bildirilmiştir (87). Yüksek ALDH1A1 mRNA ekspresyonunun, meme kanseri hastalarında zayıf genel sağkalım ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, pozitif ALDH1 ekspresyonu tahmin edici bir belirteç gibi görünmektedir. Ayrıca, yakın tarihli bir metaanaliz, ALDH1A1'in meme kanseri hastalarında kötü prognozun bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir (88). Charafe-Jaufret ve ark. 2013 taze tümör dokusu örneklerinde yaptıkları çalışmada ksenograft olarak kullanılan tümörlü dokuların yüzeylerinde ALDH1A1 reseptörleri bulunmuştur (89).

CD133 (Prominin-1, PROM1) pentaspan, transmembran, tek zincirli bir glikoproteini kodlamaktadır. CD133 ilk zamanlarda primitif hematopoietik ve nöral kök hücrelerin bir belirteci olarak sınıflandırılmıştır. Esas olarak hücre membranının çıkıntılarına, özellikle de kolesterol bazlı lipid mikrobölgelerinde lokalize olmuştur. Plazma membranının topolojisinin organizasyonunda rol oynadığı belirlenmiştir. Daha sonra birçok çalışma, CD133 ekspresyonunun kök hücreler, tümör oluşumu, rejenerasyon, diferensiasyon ve metabolizma ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. CD133 geninin demetilasyonu kolorektal kanser, mide karsinomu, gliomlar ve glioblastoma, hepatoselüler karsinom ve over kanseri gibi malignitelerde gösterilmiştir. (90).

CD133 ekspresyonu, birçok hücre dışı veya hücre içi faktör tarafından düzenlenir. Griguer ve arkadaşları hipoksi ve mitokondriyal disfonksiyonun CD133 ekspresyonunda reversible bir upregülasyonu indüklediğini göstermişlerdir. İnsanlarda, hipoksi ile indüklenen CD133 ekspresyonu akciğer kanseri, pankreatik kanser ve glioma hücrelerinde de ortaya konulmuştur. Hipoksik durumlar, HIF-1α ekspresyonunu artırmakta, bu da mTOR aktivitesini inhibe etmektedir. HIF-1α artışı CD133^{+} hücrelerde artışa yol açmaktadır. Rapamisin ile mTOR'un farmakolojik

inhibisyonu, hem $CD133^+$ hücre popülasyonlarını hem de kök hücre benzeri genlerin ekspresyonunu büyük ölçüde artırmaktadır (91).

Çeşitli hücrelerde CD133 ekspresyonunun düzenlenmesinde miRNA'ların rol oynadığı ortaya konulmuştur. miR-142-3p, miR199b-5p, miR-143, miR-145 ve miR-150, $CD133^+$ hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini ve tümörosfer oluşumunu inhibe ederler (90). Bununla birlikte, bu miRNA'ların birçoğu CD133 ekspresyonunu indirekt olarak regüle etmektedirler. CD133 ekspresyonunu hedefleyen spesifik bir miRNA henüz tanımlanmamıştır.

CD133 ekspresyonu epigenetik faktörlerle de düzenlenir. CD133 promotör bölgesinin metilasyonu, CD133 gen transkripsiyonunu baskılar. Glioma, glioblastom, kolorektal kanser, mide kanseri, hepatoselüler kanser ve over kanseri gibi insanlarda görülen çeşitli tümörlerde CD133 geninin demetilasyonu saptanmıştır. CD133'ün triple negatif fenotipli tümörlerde diğer meme kanseri alt tiplerine göre güçlü bir şekilde hipometilasyonu bazı yayınlarda tartışılmıştır (92).

Bir çalışmada $CD133^+$ hücrelerinin sayısı hem luminal, hem de HER2(+) hücrelerin % 1-2 sini oluşturduğu, bazal-benzeri kanserde ise %80'e kadar çıktığı görülmüştür (93). Bu durum, CD133'ün agresif meme kanseri türleri için bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. CD133 geni, mRNA ve protein ekspresyonu, artan tümör derecesi, lenf nodu metastazı, ER ve PR negatifliği, HER2 pozitifliği, metastaz, TNM evresi ve sağkalımda azalma ile ilişkili bulunmuştur. Sitoplazma ve membrandaki CD133 ekspresyonu, kısa sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Genç yaşta meme kanseri tanısında CD133'ün membranöz ekspresyonu yüksek bulunmuştur.

2020 yılında Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CD133 ve ilaç direnç genlerinden Topo II, GST-π, P-gp, LRP meme kanseri dokularında, meme kanseri hücre dizisinde ve ksenograft dokularında immünhistokimyasal olarak çalışılmış ve kemoterapötik ilaçlar olan paklitaksel, epirubisin, karboplatin, vinorelbin ve florourasil ile olan ilişkilerine bakılmıştır (94). Çalışma sonucunda CD133 düzeyi, bazal benzeri meme kanserlerinde yüksek bulunmuştur. CD133 ve Topo II ilaç direnç geni, hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım ile korele bulunmuştur. Çalışmada bazal benzeri ve HER2(+) meme kanseri alt grupları luminal gruba göre daha kemosensitif bulunmuştur.

Bir başka çalışmada ise, $CD133^+$ hücrelerin sayısının yanısıra CD133 yüzey antijeni ekspresyonu düzeylerinin de değerli olduğuna dikkat çekilmiştir (93). Bu durum, CD133'ün meme kanserlerinde belirtilen prognostik rolü ile ilgili çalışmalardaki tutarsızlıkları açıklayabilecektir. Ayrıca bir çalışmada CD133'ün özellikle TN hasta grubunda tümör ilişkili makrofajlar ve CXCR1'e etki ederek düzenleme yaptıgı için TN hasta grubu için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği de bildirilmiştir.

Nozaki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; bir tirozin kinaz reseptörü olan c-Met üzerinde çalışılmıştır (95). c-Met, hücre proliferasyon ve invazyonu ile ilgili tirozin kinaz reseptörüdür. Çeşitli kanserlerde overekspresyonu görülen c-Met, özellikle bazal-benzeri meme kanserinde artmış olarak bulunmuştur. Yüksek c-Met ekspresyonu ile MKKH belirteçleri olan ALDH1A3 ve CD133'ün ekspresyonu arasında güçlü korelasyon saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda c-Met inhibisyonu yapan ilaçların, $ALDH1^+$ meme kanseri tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

2.9. miRNA134, miRNA216b

Son yıllarda genlerin etkilerinin sadece genetik faktörlerle değil aynı zamanda epigenetik faktörlerle de düzenlendiği ortaya konmuştur (9). Epigenetik faktörlerin başında ise gen ifadesini düzenleyen miRNA'lar gelmektedir (10). miRNA fonksiyonunda olan kayıp ya da artışların, çeşitli hedef genlerin upregülasyonu veya aşağı regülasyonu ile meme kanseri gelişimini kolaylaştırdığı kaydedilmiştir.

miR134, 14. kromozomda lokalizedir. miR134 ile ilgili literatürdeki çalışmalar genelde nörogloial sistem ile ilişkilidir. Dendritik çıkıntıların gelişimi, hippokampal hafıza ve nöroplastisite ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda kanser patogenezinde de rol oynadığına dair yayınlar mevcuttur. mir134 akciğer, pankreas, kolon ve prostat kanserinde upregülasyonu; küçük hücreli dışı akciğer kanseri, glioblastom, renal hücreli karsinom, kolorektal karsinom, hepatoselüler karsinom, osteosarkom ve meme kanserinde aşağı regüle olduğu bulunmuştur (96). 2013 yılında yapılan bir in vitro çalışmada mir134'ün de içinde bulundugu 7 miRNA'nın, direk hedefleyerek 3′UTR koluna bağlanıp HER2'yi düzenlediği gösterilmiştir (97).

miR134'ün kanser hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon, metastaz, ilaç direncinin yanısıra kanser tanı, tedavi ve prognozunda kritik rol oynadığı ortaya konulmuştur.

miR134'ün doksorubisin dirençli meme kanseri hücrelerinde aşağı regüle olduğu ve miR134'ün meme kanseri hücrelerinde ABCC1'i hedefleyerek ilaç direncinin regülasyonunu etkilediği gösterilmiştir (98). Ayrıca, miR134'ün tümörlerde KRAS, STAT5B, EGFR gibi birçok geni hedeflediği ve MAPK/ERK, Notch ve EGFR sinyal yolaklarını etkilediği bilinmektedir (96).

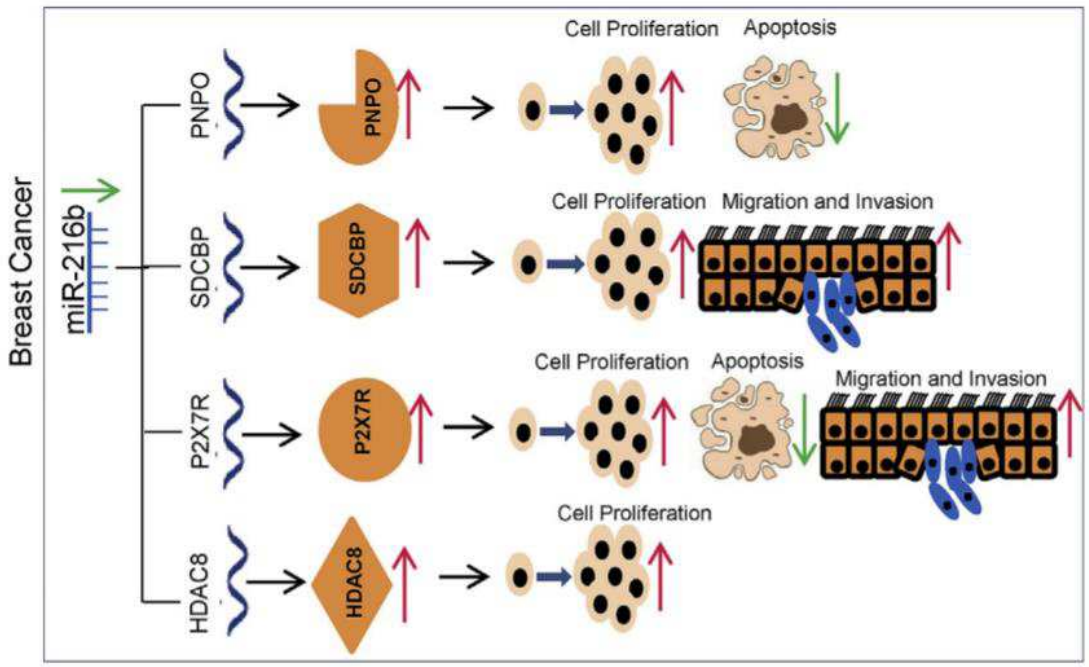
Meme kanseri hücre hatları ve dokularında, miR134 düzeylerinin azaldığı ve bu durumun lenf nodu metastazı ve azalmış hücre diferansiasyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (99). Ayrıca, miR134 ekspresyonunun hastaların klinikopatolojik özellikleri ile korele olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, miR134'ün meme kanser hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, migrasyon ve invazyonu azaltıcı etkisi ile metastaz inhibisyonu yaptığı sonucuna varılmıştır. Ek olarak, KRAS geninin miR134'ün hedef genlerinden biri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmadaki veriler miR134'ün KRAS'ı hedef alarak meme kanseri tümör oluşumunda ve gelişiminde tümör baskılayıcı bir rolde olduğunu ortaya koymuştur (99). miR134'ün aday hedef genlerinin belirlenmesi ile meme kanserinde miR134'ün işlevinin altında yatan potansiyel mekanizmalar daha iyi anlaşılabilecektir.

miR216b, 2. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. Yapılan çalışmalarda miR216b'nin bir TSG görevi gördüğü gösterilmiştir. miR216b aşağı regülasyonunun, çeşitli onkogenlerin düzensizliği, kanser hücresi proliferasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, migrasyon, invazyon, apoptoz ve tedavi direnci ile ilgili sinyal yolakları yoluyla kanser biyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (100). Çeşitli kanser tiplerinde miR-216b-5p, miR-216b-3p den daha çok saptanmıştır, ancak tümörigenezde her ikisi de etkilidir. miR216b ilk olarak insan nazofaregeal karsinomunda gösterilmiştir (100). Daha sonra meme kanserinin de içinde bulunduğu çeşitli kanser türlerinde miR216b'nin sıklıkla sıklıkla aşağı regüle olduğu bildirilmiştir.

Bir çalışmada meme kanseri dokularında miR216b ekspresyonunun normal bitişik doku örneklerinden daha düşük olduğu ve miR216b'nin ektopik ekspresyonunun, P2X7 reseptörünü hedefleyerek meme kanseri hücre hatlarında hücre

büyümesini inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Şekil-7) (101). Jana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada miR216b'nin syndecan bağlayıcı proteini düzenleyerek meme kanseri metastazını baskıladığı belirlenmiştir (102). Metastatik meme kanseri hastalarından alınan örneklerde, metastaz olmayanlara göre miR216b ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu bulunmuştur. miR216b'nin aşırı ekspresyonunun ise meme kanseri hücre dizilerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyonu azalttığını gösterdiler (100). miRNA-miRNA ağ analizi, miR216b'nin meme kanseri hücre hatlarının, anti-HER2 tedavisinde kullanılan monoklonal antikor olan trastuzumaba olan yanıtlarını düzenleyen metabolik yolakları etkilediğini ortaya çıkarmıştır (103).

Tüm bu veriler, miR216b'nin meme kanseri patogenezinde tümör supresör özellikte olduğunu doğrulamaktadır. Bu nedenle meme kanseri oluşumu ve patogenezinde miR216b ve hedef genlerinin katkısının araştırılması önemlidir.



Şekil 7. Meme kanserinde miR216b'nin rolü (100)

Birtakım miRNA'ların, CD44, CD133 ve ALDH1 aktivitesi üzerine etki ederek MKKH çoğalmasını engellediği ortaya konulmuştur (50, 104).

Literatürde meme kanseri kök hücre belirteçlerinden CD133 ve ALDH1A1 ile ilgili çalışmalar mevcuttur fakat şimdiye kadar miR216b nin ve

miR134'ün meme kanserinde kanser kök hücresi ile ilişkilerini araştıran çalışma yapılmamıştır. MKKH belirteçlerini hedeflemek oldukça zordur çünkü bu belirteçlerin bazıları normal kök hücrelerde ifade edilmektedir. Yine, miRNA'lar da birden fazla gen üzerine etki edebilmektedir. Bu nedenle MKKH belirteçlerini hedefleyen spesifik miRNA'ların ortaya konulmasını sağlayacak çalışmaların yapılması miRNA ilişkili tedavilerin geliştirilmesi açısından değerli olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji EAH 2019-05/257 karar numaralı etik kurul kararıyla gerçekleştirilmiştir.

3.1. VAKA SEÇİMİ

Araştırma için Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Hastanesi Patoloji Kliniği'nde tanı konmuş ve neoadjuvan kemoterapi alan invaziv duktal karsinom tipi meme kanseri bulunan, 20-80 yaş arası kadın cinsiyette hasta grubu retrospektif olarak taranarak belirlendi. Bu hastalardan, tümör tanısı koyulan ilk trucut biyopsi materyali kliniğimizde bulunan ve neoadjuvan kemoterapi tedavisi sonrasında ameliyat materyali yine kliniğimizde değerlendirilen 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Başka tip meme kanseri tanısı olanlar, erkek cinsiyet, trucut biyopsi materyaline ait ve/veya mastektomi materyaline ait parafin blokları arşivde bulunmayan hastalar ile senkron/metakron kanseri olan hastalar alınmadı.

Seçilen hastaların demografik verileri not edildikten sonra trucut biyopsi örnekleri ve ameliyat materyalleri histopatolojik olarak yeniden değerlendirildi. Toplam 40 hasta moleküler alt tipler esas alınarak her biri 10'ar kişiden oluşan 4 gruba ayrıldı.

1. grup: HR (-), CerbB2 (-) -> Triple Negatif Grup **(TN)**
2. grup: HR(-), CerbB2 (+) -> HER2 den zengin grup **(HER2)**
3. grup: HR(+), CerbB2 (+) -> Triple Pozitif grup (HER2 pozitif Luminal B grup) **(TP)**
4. grup: HR(+), CerbB2 (-) -> Luminal grup (HER2 negatif Luminal B grup) **(Lum)**

Her bir grupta tümör derecesi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı durumu, hormon reseptör durumu, CerbB2 ekspresyon durumu, tedaviye verilen cevap, nüks varlığı, metastaz varlığı, sağkalım gibi parametreler kaydedilmiştir. Tedavi sonrası gruplar tedaviye verdikleri patolojik cevaba göre kategorize edildi. Hastaların tedaviye verdikleri cevap değerlendirilirken patolojik cevap için RCB sınıflaması kullanıldı.

İstatistiksel analizler yapılırken hem normal RCB sınıflaması kullanıldı, hem de RCB-0 ve RCB-1 olan gruplar tedaviye yanıt var; RCB-2 ve RCB-3 gruplar tedaviye yanıt yok şeklinde ikiye ayrılarak tekrar incelendi. RCB-0 ve RCB-1 grupları tedaviye yanıt var olarak gruplandırıldı çünkü RCB-1 grubunda tama yakın yanıt görülmekte ve rezidü tümör çok az izlenmekteydi. RCB-0 grubunda da örneklenen blokların derin kesitlerinden veya örneklenmeyen alanlarda minimal rezidü tümörün bulunabilme ihtimali her zaman bulunmaktadır. RCB-2 ve RCB-3 grupları da tedaviye yanıt yok olarak gruplandırıldı. Çünkü her iki grupta da makroskopik olarak tümör izlenmekte olup yanıt çok az veya hiç yoktur. Ayrıca kanser kök hücrelerinin tümörün %0.2-20 sini oluşturduğu düşünülecek olursa; bu gruplarda tümörü oluşturan kök hücrelerin tedaviden etkilenmemiş olma ihtimali ve bu nedenle tümörün yeniden progresyonu görülebileceğinden her iki grup yanıt yok olarak kabul edilmiştir. Tüm bu nedenlerle bu gruplar birleştirilerek de analizler yapılmıştır.

İnflamatuar cevap kategorisi trucut biyopsi dokularında; tümörün çevre stromasında izlenen lenfosit düzeylerine bakılarak gruplandırıldı: hiç izlenmiyor ise yok, %30'a kadar hafif, %30 üzeri orta-şiddetli olarak kaydedilmiştir.

Desmoplastik stromal cevap trucut biyopsi dokularında var/yok olarak, ameliyat materyallerinde ise matür/moderate/immatür olarak değerlendirildi. İnce uzun kollajen liflerin fibroblastlarla birlikte tabakalar halinde gelişim göstermesi matür desmoplazi, keloid benzeri parlak eozinofilik hyalinizasyona sahip geniş kollajen bantlar içermesi moderate desmoplazi, gevşek stroma ile çevrili keloid benzeri kollajen demetler ise immatür stroma olarak değerlendirildi.

Daha sonra vakaların H&E kesitleri incelenip, uygunluğuna karar verilen dokuların parafin blokları belirlenmiştir.

Çalışmamızda hastaların son 5 yıl içinde seçilmiş olması nedeni ile sağkalım değerlendirmesinin objektif olmadığı düşünülmektedir. 5 yıldan az sağkalım değerlendirmesi (OS, DFS), nüks, metastazlar ve prognoz açısından yanıltıcı bilgiler verebileceği için bu verileri detaylı olarak değerlendirmedik.

3.2. DOKU HAZIRLANMASI

Seçilen parafin bloklardan mikrotom cihazı kullanılarak 4 adet 10 mikron kalınlığında kesit alındı. Trucut biyopsi materyali içeren parafin bloklarda, doku kenarında bulunan boş alanlardaki parafin mikrotom bıçağı ile ayırılarak, tümörlü doku içeren alan "DNAse-RNAse free" eppendorf tüplerine alındı. Operasyon materyallerinde ise tümör/tümör yatağı içeren alanlar çevresindeki boş parafin mikrotom bıçağı ile temizlenerek, bu alanları içeren kesitleri eppendorf tüplerine alındı. Her tüpün üzerine, hangi hastaya ve hangi gruba ait olduğu bilgisi ile dokunun tedavi öncesi materyali mi yoksa tedavi sonrası materyale mi ait olduğu bilgisini içeren kodlamalar yazılarak bu kodlamalar not edildi.

3.3. DEPARAFİNİZASYON

FFPE dokulardan eppendorf tüplerine alınan kesitlerde deparafinizasyon işlemi yapıldı. Deparafinizasyon işlemi belirtilen sıra ile gerçekleştirildi: Ependorf tüpüne 1 mL ksilen konuldu. 10 saniye vortekslendi. 50°C'de 3 dakika inkübe edildi. 15000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. 5 dakika kuru buz üzerinde bekletildi. Üst kısımda donan parafin, pipet yardımıyla elimine edildi. Dipte kalan pellet kısmına 1 mL etanol kondu. 10 saniye vortekslendi. 15000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Son basamak 3 kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası alkol pipetle temizlendi. Daha sonra kalan kısım bir gece boyunca +4°C buzdolabında kurutuldu.

3.4. TOTAL RNA ve cDNA ELDESİ

Total RNA izolasyonu: Elde edilen örneklere 180 ul kloroform eklenerek 15 sn vorteks yapıldı. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 12000 g'de +4°C'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra üst faz yeni ependorfa alınarak alınan üst faz kadar 1:1 oranında izopropanol eklenerek alt-üst edilip 12000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant dökülüp pellet üzerine 1 mL %75 etanol eklenerek vortex yapıldı ve 7500 g'de +4°C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra supernatant döküldü ve pellet üzerine kalan alkol 10 uL'lik pipet kullanılarak çekilip kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra 30 uL Nükleaz Free Water eklenerek pellet resüspanse edildi ve elde edilen RNA'lar buz

içerisine alınıp +4°C'de 10-15 dakika bekletildi. Ardından Nano-Drop cihazında ölçümü yapılıp konsantrasyonları belirlendi.

cDNA sentezi: Çalışmaya başlamadan önce bütün RNA örnekleri için 96 kuyucuklu plate için çalışma düzeneği oluşturuldu. cDNA sentezi EvoScript cDNA sentez Kit (Roche) kullanılarak yapıldı. cDNA sentezi için RNA konsantrasyonları 10ng–100ng arasında olacak şekilde normalize edildi. Reaksiyon mix için gerekli olan malzemeler ve her bir örnek için kullanılan miktarlar aşağıda bulunan tablodaki gibidir.

Reaksiyon Mix'inin hazırlanması;

	Her bir örnek için
Reaction Buffer(5X)	4 µl
dH_2O	10 µl
RNA	5 µl

Hazırlanan mix çok kısa süre vortekslendikten sonra, tekrar çok kısa süre spin yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa 15 µL mix mikropipet aracılığı ile dağıtıldı ve daha sonra her bir tüpün üzerine 5'er µL RNA örneği eklenip 5 dk buz üzerinde bekletildi. Bu işlemden sonra ürünler üzerine 2 µL Enzim mix (Reverse Transkriptaz) eklendi. Ardından da aşağıdaki programa göre PCR cihazına kondu.

3.5. PCR

42°C	15 dakika
85°C	5 dakika
65°C	15 dakika
4°C	∞

PCR sonunda 20 µL cDNA ürünü elde edilmiştir.

Reaksiyon Mix'inin Hazırlanması;

Sybr Green Master Mix	**10 ul**
Primer F	**0,5 ul**
PrimerR	**0,5 ul**
dH2O	**5 ul**

Reaksiyon mix hazırladıktan sonra 96 kuyucuklu plate'e her bir örnek için 16 µL dağıtıldı ve üzerine 4 µL DNA örneği eklendi. Ardından Roche LightCyler LC480 cihazında aşağıda verilen PCR koşulları altında reaksiyon gerçekleştirildi.

Real Time PCR Programı		
95ºC	**10 dk**	
94 ºC	**20 sn**	40 siklus
60 ºC	**20 sn**	
72 ºC	**45 sn**	Melting
95 ºC	**15 sn**	Curve
67 ºC	**01 sn**	
95 ºC		
40 ºC	**30 sn**	

PCR sonucunda elde edilen Ct'ler ile standart eğri çizildi.

RT PCR: Hem izole edilen total RNA hem de DNA:RNA hibrit RNA örneklerinden ayrı ayrı Roche Light Cycler LC480 cihazı kullanılarak ekspresyon seviyeleri aşağıdaki protokole göre belirlendi.

AAşağıda belirtilen miktarlarda reaksiyon mix'i hazırlanarak her bir örnek için plate kuyucuklarına dağıtıldı.

Sybr Green Master Mix	10 ul
Primer F	0,5 ul
PrimerR	0,5 ul
DH_2O	5 ul

16 ul mix platenin kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 1:5 oranında sulandırılmış 4 ul cDNA örnekleri miksin üzerine eklendi. Ardından şeffaf kapatıcı ile plate'in üzeri kapatıldı. Spin yapılarak hava kabarcıkları yok edildi ve ardından Roche Light Cycler LC 480 II cihazında Ct değerleri belirlendi.

House-Keeping gen olarak β-Actin kullanıldı. PCR sonunda elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak normalize edildi.

	miRNA-Name	Accession Number	Qiagen Name	Sequence (5' -> 3')	Qiagen Catalog No	Product No
miR-134	hsa-miR-134-3p	MIMAT0026481	Hs_miR-134-3p_1 miScript Primer Assay	5'CCUGUGGGCCACCUAGUCACCAA	MS00045871	218300
miR-216b	hsa-miR-216b-5p	MIMAT0004959	Hs_miR-216b_1 miScript Primer Assay	5'AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA	MS00009107	218300

Gene Name	NCBI Gene ID	Accession Number	Qiagen Name	Qiagen Catalog No	Product No
ALDH1A1	216	NM_000689	Hs_ALDH1A1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00013286	249900
PROM1(CD133)	8842	NM_001145847	Hs_PROM1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00075586	249900

ACTB	60	NM_001101	Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00095431	249900

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatiksel analiz SPSS 22.0 for Windows (SPSS, Inc.; Chicago, USA) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı değerler sayı (n), yüzde (%), ortalama ± standart sapma (SS), ortanca (medyan) olarak belirtilmiştir. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson ki-kare ve Fisher testleri kullanılmıştır. Sürekli değişkenler, Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile yapılan normallik değerlendirmesine göre normal dağılıma uyduğu yerlerde parametrik testler (bağımsız gruplarda t testi, ANOVA testi) ile normal dağılıma uymadığı yerlerde ise nonparametrik testler (Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis testi) ile karşılaştırılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman Korelasyon Testi ile değerlendirilmiştir. Korelasyon katsayısına göre ilişki durumu aşağıdaki tabloda sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 6. Korelasyon Katsayısına Göre İlişki Durumu

Korelasyon Katsayısı	İlişki Durumu
0,00-0,24	Zayıf ilişki
0,25-0,49	Orta ilişki
0,50-0,74	Güçlü ilişki
0,75-1,00	Çok güçlü ilişki

4. BULGULAR

Tablo 7. Çalışmaya alınan hastaların demografik ve patolojik verileri

		Sayı	Yüzde
Yaş	≤40	10	25,0
	>40	30	75,0
Moleküler alt tip	Triple negatif	10	25,0
	HER2 pozitif	10	25,0
	Triple pozitif	10	25,0
	Luminal (B)	10	25,0
ER	Negatif	20	50,0
	Pozitif	20	50,0
PR	Negatif	20	50,0
	Pozitif	20	50,0
Her2	Negatif	20	50,0
	Pozitif	20	50,0
Lenf nodu metastazı (Tedavi öncesi)	Var	31	77,5
	Yok	9	22,5
Tümör boyutu	<2 cm	6	15,0
	2-5 cm	23	57,5
	>5 cm	11	27,5
Desmoplastik yanıt (Tedavi öncesi)	Var	19	47,5
	Yok	21	52,5
Tedaviye yanıt	Var	23	57,5
	Yok	17	42,5
Toplam		40	100,0

Tablo 8. Çalışma Grupları Arasında NAKT öncesinde CD133, ALDH1A1, miR134, miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		CD133	ALDH1A1	miR134	miR216b
TN	Ortanca	45,76	0,45	1,37	0,52
	IQR	0,29-5334,91	0,03-10,60	0,14-11,25	0,28-15,11
HER2	Ortanca	0,52	0,62	2,46	0,19
	IQR	0,00-6,01	0,16-1,05	0,06-4,03	0,12-181,66
TP	Ortanca	3,41	1,50	1,02	0,25
	IQR	0,15-197,79	0,51-996,78	0,28-4,03	0,04-3,71
Lum	Ortanca	0,28	0,80	0,37	0,41
	IQR	0,03-123,23	0,03-57,35	0,09-4,28	0,19-11,61
p*		0,327	0,597	0,649	0,423

IQR= interquartile range, *Kruskal Wallis testi, TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

Çalışma grupları arasında NAKT öncesi CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b'nin bazal düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo 9. Çalışma Grupları Arasında NAKT sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134, miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		CD133	ALDH1A1	miR134	miR216b
TN	Ortanca	0,67	2,50	1,23	1,64
	IQR	0,37-5,71	0,71-13,73	0,15-99,15	0,20-11,61
HER2	Ortanca	0,67	0,71	2,24	2,22
	IQR	0,15-6,36	0,28-2,04	0,02-19,14	0,05-11,61
TP	Ortanca	0,84	1,74	0,40	1,65
	IQR	0,59-3,27	0,55-5,19	0,05-13,88	0,12-6,05
Lum	Ortanca	0,61	0,84	5,11	0,99
	IQR	0,10-6,81	0,42-4,96	0,17-88,98	0,37-11,61
p*		0,928	0,388	0,754	0,988

IQR= interquartile range, *Kruskal Wallis testi, TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

Çalışma grupları arasında NAKT sonrası CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

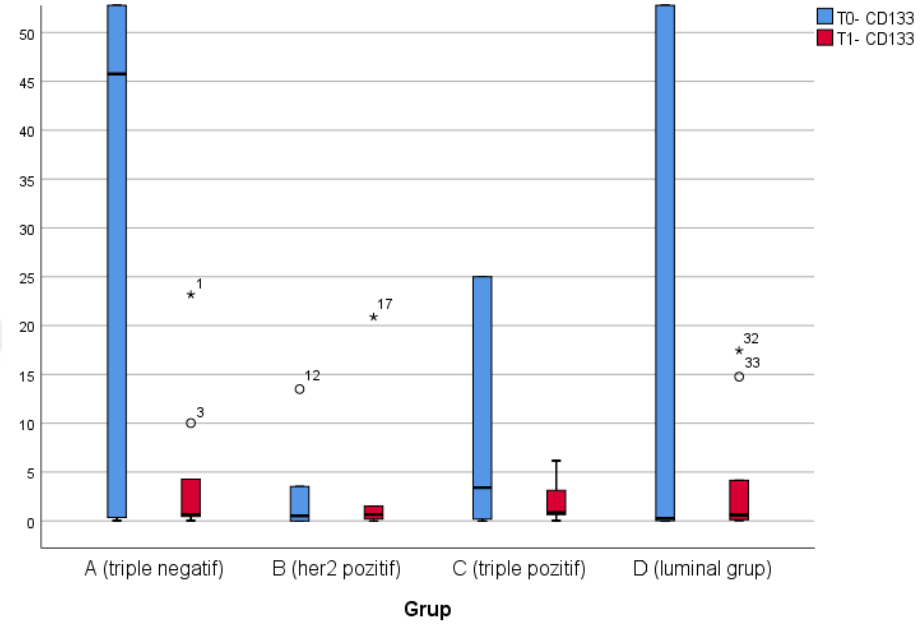
Tablo 10. NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		CD133		ALDH1A1	
		NAKT öncesi	NAKT sonrası	NAKT öncesi	NAKT sonrası
TN	Ortanca	45,76	0,67	0,45	2,50
	IQR	0,29-5334,9	0,37-5,71	0,03-10,60	0,71-13,73
p*		**0,047**		0,508	
HER2	Ortanca	0,52	0,67	0,62	0,71
	IQR	0,00-6,01	0,15-6,36	0,16-1,05	0,28-2,04
p*		0,575		0,445	
TP	Ortanca	3,41	0,84	1,50	1,74
	IQR	0,15-197,8	0,59-3,27	0,51-996,8	0,55-5,19
p*		0,285		0,241	
Lum	Ortanca	0,28	0,61	0,80	0,84
	IQR	0,03-123,23	0,10-6,81	0,03-57,35	0,42-4,96
p*		0,646		0,959	
Toplam	Ortanca	0,55	0,70	0,67	1,22
	IQR	0,09-71,76	0,23-3,57	0,09-7,45	0,47-4,61
p*		0,070		0,851	

IQR= Interquartile range, *Wilcoxon testi, , TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

NAKT sonrasında, TN grupta CD133 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) değişim izlenmiştir.

Çalışma gruplarında NAKT, ALDH1A1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim oluşturmamıştır.



Şekil 8. CD133'ün çalışma grupları arasında tedavi öncesi-sonrası değişiminin grafiği

Tablo 11. NAKT öncesi ve sonrası miR134 ve miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		**miR134**		**miR216b**	
		NAKT öncesi	**NAKT sonrası**	**NAKT öncesi**	**NAKT sonrası**
TN	Ortanca	1,37	1,23	0,52	1,64
	IQR	0,14-11,25	0,15-99,15	0,28-15,11	0,20-11,61
p*		0,386		0,721	
HER2	Ortanca	2,46	2,24	0,19	2,22
	IQR	0,06-4,03	0,02-19,14	0,12-181,66	0,05-11,61
p*		0,859		0,374	
TP	Ortanca	1,02	0,40	0,25	1,65
	IQR	0,28-4,03	0,05-13,88	0,04-3,71	0,12-6,05
p*		0,878		0,285	
Lum	Ortanca	0,37	5,11	1,02	0,99
	IQR	0,09-4,28	0,17-88,98	0,31-4,96	0,37-11,61
p*		0,203		0,799	
Toplam	Ortanca	0,79	1,26	0,41	1,29
	IQR	0,12-4,03	0,16-17,08	0,19-11,61	0,18-11,61
p*		0,209		0,769	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi, , TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

Çalışmada yer alan gruplarda, NAKT öncesi ve sonrasındaki miR134 ve miR216b düzeylerinde anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır.

Tablo 12. ER ekspresyonuna göre yapılan gruplamada, çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		**CD133**		**ALDH1A1**	
		NAKT öncesi	**NAKT sonrası**	**NAKT öncesi**	**NAKT sonrası**
ER negatif (TN+HER2)	Ortanca	0,55	0,67	0,54	1,47
	IQR	0,10-139,55	0,23-3,80	0,07-1,43	0,45-3,67
p*		0,204		0,370	
ER pozitif (TP+Lum)	Ortanca	1,78	0,72	0,89	1,18
	IQR	0,05-61,16	0,20-3,57	0,13-66,45	0,47-4,81
p*		0,232		0,263	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi, , TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

Vakalar hormon ekspresyon durumuna göre iki gruba ayrıldığında, 2 grup arasında, NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 13. ER ekspresyonuna göre yapılan gruplamada, çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrasında miR134 ve miR216b Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		**miR134**		**miR216b**	
		NAKT öncesi	**NAKT sonrası**	**NAKT öncesi**	**NAKT sonrası**
ER negatif (TN+HER2)	Ortanca	1,47	1,26	0,40	2,22
	IQR	0,11-5,22	0,07-36,32	0,19-22,10	0,20-11,61
p*		0,469		0,445	
ER pozitif (TP+Lum)	Ortanca	0,63	1,26	0,41	1,16
	IQR	0,13-4,03	0,16-17,08	0,16-2,58	0,14-9,76
p*		0,332		0,296	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi, TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

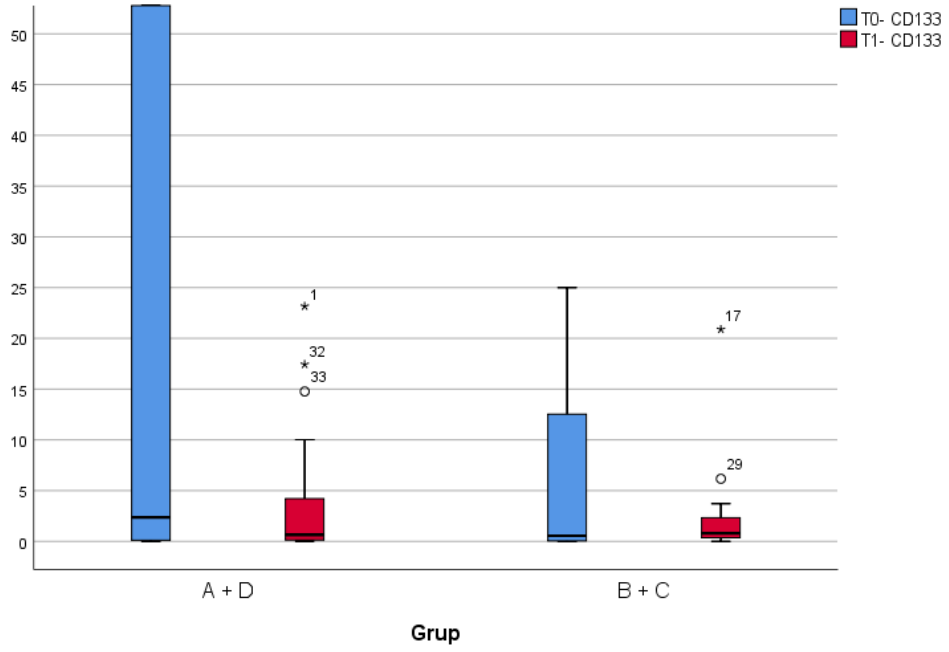
Vakalar östrojen hormonu ekspresyonu durumuna göre iki gruba ayrıldığında, 2 grup arasında NAKT öncesi ve sonrası miR134 ve miR216b düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo 14. HER2 ekspresyonuna göre yapılan gruplamada, çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrasında CD133 ve ALDH1A1 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup		**CD133**		**ALDH1A1**	
		NAKT öncesi	**NAKT sonrası**	**NAKT öncesi**	**NAKT sonrası**
HER2 negatif (TN+Lum)	Ortanca	2,36	0,65	0,56	1,74
	IQR	0,10-245,84	0,13-4,24	0,03-19,12	0,48-5,15
p*		**0,044**		0,765	
HER2 pozitif (HER2+TP)	Ortanca	0,55	0,80	0,71	1,06
	IQR	0,03-13,02	0,33-2,72	0,31-7,07	0,44-2,58
p*		0,681		0,940	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi, , TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

HER2 reseptör durumu baz alınarak yapılan gruplamada; HER2(-) olan vakaların oluşturduğu grupta NAKT uygulanmasının ardından CD133 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür.



Şekil 9. HER2 negatif hastalar (TN+Lum) ve HER(+) hastalar (TP+HER2) grupları arasında tedavi öncesi-sonrası CD133 değişiminin grafiği

Tablo 15. HER2 ekspresyonuna göre çalışma grupları arasında NAKT öncesi ve sonrasında miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

Grup		**miR134**		**miR216b**	
		NAKT öncesi	**NAKT sonrası**	**NAKT öncesi**	**NAKT sonrası**
HER2 negatif (TN+Lum)	Ortanca	0,57	1,74	0,52	0,99
	IQR	0,12-5,48	0,18-78,89	0,30-9,40	0,28-11,61
p*		0,156		0,970	
HER2 pozitif (HER2+TP)	Ortanca	1,24	0,94	0,20	2,03
	IQR	0,09-4,03	0,04-10,37	0,10-11,61	0,09-11,61
p*		0,778		0,872	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi, TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

HER2 reseptör durumu dikkate alınarak yapılan gruplamada; HER2(-) olan vakaların oluşturduğu grupta NAKT öncesi ve sonrası karşılaştırmada miR134 düzeyi tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin artış göstermiştir.

Tablo 16. Çalışma grupları arasında tedaviye yanıt durumlarının karşılaştırılması

		Tedaviye yanıt durumu			
		Yanıt var		Yanıt yok	
		n	%	n	%
Grup	TN	7	70,0	3	30,0
	HER2	6	60,0	4	40,0
	TP	8	80,0	2	20,0
	Lum	2	20,0	8	80,0
Toplam		23	57,5	17	42,5

n=sayı, %=satır yüzdesi, Ki-kare **p=0,037**, TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

TN, HER2 ve TP gruplarda hastaların yarıdan fazlasında tedavi yanıtı izlenirken; luminal grupta tedavi yanıtı daha az izlenmiştir.

Tablo 17. Tedaviye verdikleri yanıta göre (RCB sınıflaması), tedavi öncesinde ölçülen CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

RCB		CD133	ALDH1A1	miR134	miR216b
Tam yanıt **(RCB-0)**	Ortanca	3,59	0,74	0,63	0,20
	Min-maks	0,00-612395,90	0,00-168335,24	0,03-52,68	0,00-567,25
Tama yakın yanıt **(RCB-1)**	Ortanca	118467,07	1873,26	4,03	61,44
	Min-maks	3,52-236930,62	0,92-3745,59	4,03-4,03	11,61-111,26
Parsiyel yanıt **(RCB-2)**	Ortanca	0,33	0,57	1,37	1,62
	Min-maks	0,00-7102,47	0,00-1003,61	0,04-65,30	0,12-392,85
Yanıt yok **(RCB-3)**	Ortanca	0,12	0,36	2,82	0,48
	Min-maks	0,00-2786,24	0,00-80,50	0,12-5,61	0,22-487,02
p*		0,222	0,381	0,574	**0,043**

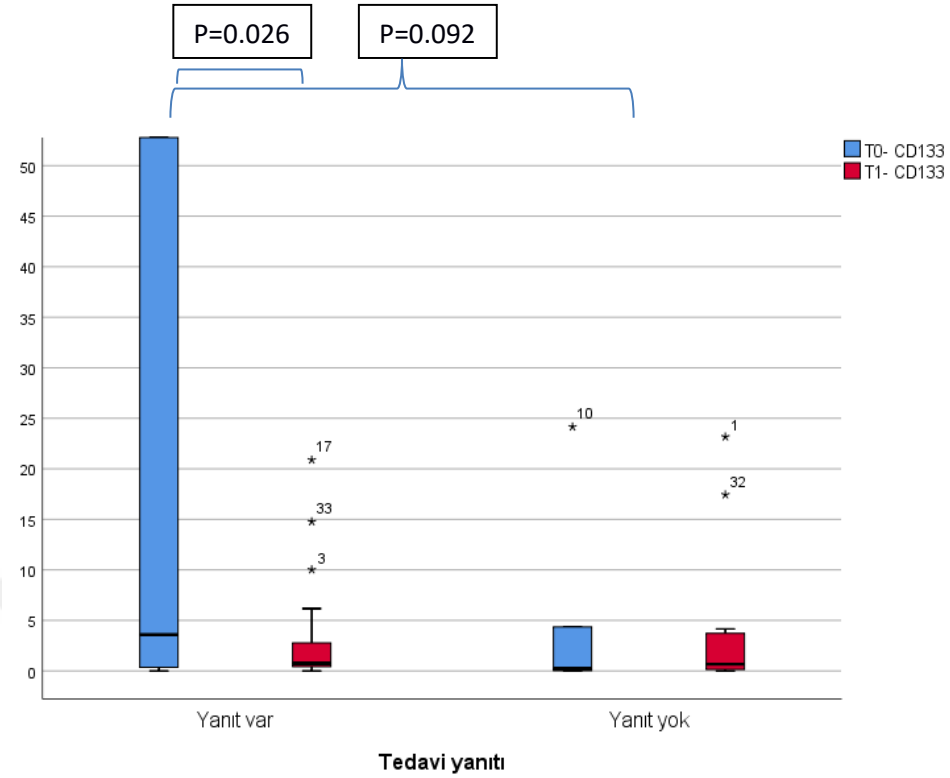
*Kruskal Wallis testi

Tablo 18. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların NAKT öncesi ve sonrası CD133 ve ALDH1A1 düzeylerinin değişiminin değerlendirilmesi

Tedaviye cevap		CD133		ALDH1A1	
		NAKT öncesi	NAKT sonrası	NAKT öncesi	NAKT sonrası
Yanıt var	Ortanca	3,59	0,75	0,81	2,22
	IQR	0,35-163,61	0,38-3,13	0,38-8,70	0,75-4,66
p*		**0,026**		0,761	
Yanıt yok	Ortanca	0,22	0,67	0,57	0,57
	IQR	0,04-14,26	0,10-3,94	0,03-12,85	0,35-3,77
p*		0,981		0,906	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi

Çalışmamızda tedavi yanıtı RCB sistemi ile değerlendirildikten sonra, RCB-0, RCB-1, RCB-2 ve RCB-3 olarak vakalar sınıflandırılıp istatistiksel analiz yapıldığında tedavi öncesi ve sonrası KKH genleri açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir. Ancak gruplar yanıt var ve yok olarak sınıflandırıldığında, tedaviye yanıt veren hastaların oluşturduğu grupta NAKT sonrasındaki CD133 düzeyleri, NAKT öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir.



Şekil 10. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen gruplardaki CD133 düzeyinin tedavi öncesi-sonrası değişim grafiği

Tablo 19. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların NAKT öncesi ve sonrası miR134 ve miR216b düzeylerinin değişiminin değerlendirilmesi

Tedaviye cevap		**mir134**		**mir216b**	
		NAKT öncesi	**NAKT sonrası**	**NAKT öncesi**	**NAKT sonrası**
Yanıt var	Ortanca	0,63	0,97	0,28	2,73
	IQR	0,14-4,03	0,03-25,98	0,09-2,10	0,13-11,61
p*		0,200		0,200	
Yanıt yok	Ortanca	1,84	3,48	0,62	0,75
	IQR	0,09-4,54	0,16-15,54	0,31-11,61	0,19-7,12
p*		0,687		0,381	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi

miR134 ve miR216b düzeyleri açısından, tedavi yanıtı olan ve tedaviye yanıt vermeyen hasta gruplarında NAKT sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim izlenmemiştir.

Tablo 20. Tedaviye yanıt grupları arasında NAKT öncesinde CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

Tedaviye cevap		**CD133**	**ALDH1A1**	**Mir134**	**Mir216b**
Yanıt var	Ortanca	3,59	0,81	0,63	0,28
	IQR	0,35-163,61	0,38-8,70	0,14-4,03	0,09-2,10
Yanıt yok	Ortanca	0,22	0,57	1,84	0,62
	IQR	0,04-14,26	0,03-12,85	0,09-4,54	0,31-11,61
p*		0,092	0,176	0,641	*0,063*

IQR= interquartile range, *Mann Whitney U testi

Tedavi yanıtı olan ve tedaviye yanıt vermeyen grupların NAKT öncesinde ölçülen CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216 düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte, tedavi öncesinde, NAKT'ye yanıt veren grupta tedavi öncesi ölçülen miR216b düzeyleri, yanıt vermeyen gruba göre belirgin düşüktür.

Tablo 21. Tedaviye yanıt grupları arasında NAKT sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

Tedaviye cevap		**CD133**	**ALDH1A1**	**miR134**	**miR216b**
Yanıt var	Ortanca	0,75	2,22	0,97	2,73
	IQR	0,38-3,13	0,75-4,66	0,03-25,98	0,13-11,61
Yanıt yok	Ortanca	0,67	0,57	3,48	0,75
	IQR	0,10-3,94	0,35-3,77	0,16-15,54	0,19-7,12
p*		0,795	*0,087*	0,702	0,329

IQR= interquartile range, *Mann Whitney U testi

Tedavi yanıtı olan ve tedaviye yanıt vermeyen grupların NAKT sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216 düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tedavi sonrasında NAKT'ye yanıt veren grupta ölçülen ALDH1A1 düzeyleri, yanıt vermeyen gruba göre belirgin yüksektir.

Tablo 22. NAKT öncesinde tümör derecesine (Modifiye Bloom Richardson) göre CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

	Grade 2		**Grade 3**		**p***
	Ortanca	IQR	Ortanca	IQR	
CD133	25,00	1,81-494,70	0,35	0,04-13,49	0,116
ALDH1A1	0,98	0,39-580,11	0,60	0,07-2,19	0,137
miR134	0,33	0,08-4,03	1,37	0,14-4,03	0,325
miR216b	1,08	0,07-6,86	0,40	0,20-11,61	0,740
Ki 67	30	22-40	60	50-80	**<0,001**
Tümör boyutu (mm)	32	27-48	30	22-55	0,554

IQR= interquartile range, *Mann Whitney U testi

NAKT öncesi trucut dokularında tümörler Grade 2 ve 3 özellikteydi. Grade 1 tümör izlenmemiştir.

Tablo 23. NAKT öncesinde inflamatuar yanıt açısından CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

İnflamatuar yanıt		**CD133**	**ALDH1A1**	**Mir134**	**Mir216b**
Yok	Ortanca	0,22	0,74	1,90	11,61
	IQR	0,02-148,70	0,03-90,44	0,17-4,82	0,39-24,91
Az	Ortanca	0,35	0,58	0,57	0,34
	IQR	0,10-12,06	0,08-1,52	0,06-4,03	0,07-4,96
Orta-şiddetli	Ortanca	67,37	0,98	0,90	0,31
	IQR	0,28-6848,53	0,42-1877,15	0,23-4,54	0,18-1,86
p*		0,276	0,512	0,665	0,104

IQR= interquartile range, *Kruskal Wallis testi

İnflamatuar yanıt açısından gruplar arasında CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark izlenmemiştir. Bununla birlikte tümör çevresinde izlenen inflamatuar yanıt düzeyi arttıkça, miR216b düzeyinin azalması dikkat çekicidir.

Tablo 24. NAKT öncesinde desmoplazi varlığına göre CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

Desmoplazi	**VAR**		**YOK**		**p***
	Ortanca	IQR	Ortanca	IQR	
CD133	0,35	0,00-3,59	24,15	0,15-1751,19	**0,025**
ALDH1A1	0,60	0,00-1,44	0,98	0,24-118,55	*0,081*
miR134	0,63	0,06-4,03	1,11	0,18-4,03	0,416
miR216b	0,20	0,09-0,52	1,62	0,30-11,61	**0,008**

IQR= interquartile range, *Mann Whitney U testi

Tanı anında desmoplastik stromal cevap izlenen hastalarda, CD133 düzeyleri izlenmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur.

Tanı anında desmoplastik stromal cevap izlenen hastalarda ALDH1A1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da (p=0,081) desmoplazi izlenmeyenlere göre düşük bulunmuştur.

Tanı anında desmoplastik stromal cevap izlenen hastalarda, miR216b düzeyleri izlenmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Tablo 25. Tedavi öncesi desmoplazi olan ve olmayan gruplar arasında, tedavi yanıtı, nüks ve metastaz durumu

		Tedavi öncesi desmoplazi durumu				**p***
		Var		Yok		
		n	%	n	%	
Tedavi yanıtı	Yanıt var	12	63,2	11	52,4	0,713
	Yanıt yok	7	36,8	10	47,6	
Nüks	Var	1	5,3	4	19,0	0,204
	Yok	18	94,7	17	81,0	
Uzak organ metastazı	Var	5	26,3	4	19,0	0,431
	Yok	14	73,7	17	81,0	

n=sayı, %=sütun yüzdesi, *ki-kare testleri

Tedavi öncesi desmoplazi durumuna göre hastalar değerlendirildiğinde, desmoplazi olan ve olmayan hastalar arasında tedavi yanıtı, nüks ve metastaz açısından farklılık izlenmedi.

Tablo 26. NAKT öncesi lenf nodu tutulumu durumu açısından ölçüm parametrelerinin karşılaştırılması

	Var		**Yok**		**p***
	Ortanca	IQR	Ortanca	IQR	
CD133	0,51	0,04-25,00	11,58	0,29-3587,84	0,250
ALDH1A1	0,61	0,07-2,19	0,98	0,55-27,82	0,323
miR134	1,37	0,15-4,03	0,14	0,08-1,40	0,101
miR216b	0,40	0,17-11,61	0,43	0,27-13,16	0,476

IQR= interquartile range, *Mann Whitney U testi

Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan grup arasında, MKKH genleri ve miRNA parametrelerinin NAKT öncesi düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Tablo 27. Vakaların NAKT sonrasındaki desmoplastik stroma durumuna göre, NAKT öncesi bazal CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

Desmoplazi		**CD133**	**ALDH1A1**	**miR134**	**miR216b**
Matür	Ortanca	3,59	0,68	0,15	0,20
	IQR	0,17-49,11	0,22-1,21	0,08-2,97	0,07-1,59
Moderate	Ortanca	0,35	1,42	0,63	0,29
	IQR	0,00-119858,43	0,02-4751,05	0,08-4,54	0,13-1,01
İmmatür	Ortanca	0,44	0,64	3,92	7,18
	IQR	0,16-20,11	0,36-43,65	0,80-4,42	0,49-181,66
p*		0,832	0,823	0,141	**0,004**

IQR= interquartile range, *Kruskal Wallis testi

NAKT sonrası desmoplastik stromal yanıtlarına göre sınıflandırılan dokuların tedavi öncesi ölçülen değerleri incelendiğinde; immatür cevap oluşturan tümörlerde miR216b düzeyleri moderate ve matür cevap verenlere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

Tablo 28. Vakaların NAKT sonrasındaki desmoplastik stroma durumuna göre, tedavi sonrasındaki CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

		CD133	**ALDH1A1**	**miR134**	**miR216b**
Matür	Ortanca	3,13	2,22	4,03	11,61
	IQR	0,75-12,39	0,44-4,95	0,40-99,32	1,46-11,61
Moderate	Ortanca	0,20	0,75	0,95	0,75
	IQR	0,06-1,58	0,44-3,56	0,08-7,42	0,04-7,17
İmmatür	Ortanca	0,63	1,47	0,95	0,81
	IQR	0,25-1,82	0,53-5,34	0,05-10,50	0,19-2,02
p*		**0,015**	0,713	0,164	0,112

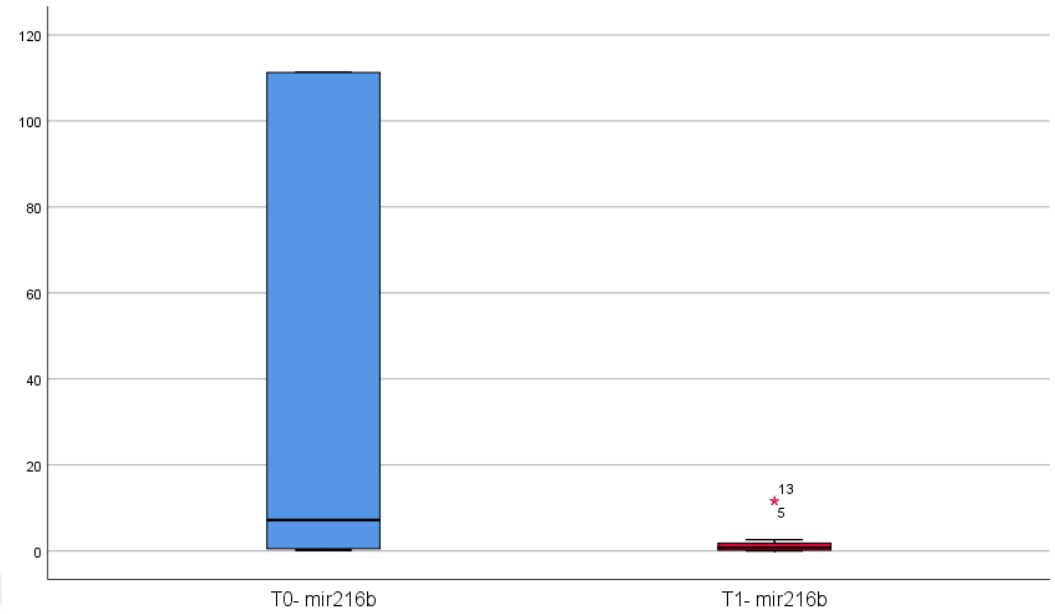
IQR= interquartile range, *Kruskal Wallis testi

NAKT sonrası izlenen desmoplastik stromal yanıtlarına göre sınıflandırılan dokuların tedavi sonrasındaki ölçülen parametre değerleri incelendiğinde; matür desmoplastik stromal yanıt oluşturan tümörlerin CD133 düzeyleri diğer gruplardan yüksek bulunmuştur.

Tablo 29. Tedavi sonrasında izlenen desmoplastik stroma grupları arasında, NAKT öncesi ve sonrasında CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeylerinin karşılaştırılması

		Matür		**p***	**Moderate**		**p***	**İmmatür**		**p***
		Ortanca	IQR		Ortanca	IQR		Ortanca	IQR	
CD133	**NAKT öncesi**	3,59	0,17-49,11	0,279	0,35	0,00-119858,43	0,116	0,44	0,16-20,11	0,925
	NAKT sonrası	3,13	0,75-12,39		0,20	0,06-1,58		0,63	0,25-1,82	
ALDH1A1	**NAKT öncesi**	0,68	0,22-1,21	**0,033**	1,42	0,02-4751	0,311	0,64	0,36-43,65	0,730
	NAKT sonrası	2,22	0,44-4,95		0,75	0,44-3,56		1,47	0,53-5,34	
miR134	**NAKT öncesi**	0,15	0,08-2,97	**0,050**	0,63	0,08-4,54	0,600	3,92	0,80-4,42	0,638
	NAKT sonrası	4,03	0,40-99,32		0,95	0,08-7,42		0,95	0,05-10,50	
miR216b	**NAKT öncesi**	0,2	0,07-1,59	*0,084*	0,29	0,13-1,01	0,196	7,18	0,49-181,6	**0,030**
	NAKT sonrası	11,61	1,46-11,61		0,75	0,04-7,17		0,81	0,19-2,02	

IQR= interquartile range, *Wilcoxon testi



Şekil 11. NAKT sonrası immatür desmoplastik stromal cevap görülen hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası miR216b düzeyleri

Tablo 30. NAKT öncesinde genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi

		CD133	**ALDH1A1**	**miR134**	**miR216b**
CD133	r	1,000			
	p	-			
ALDH1A1	r	**0,501**	1,000		
	p	**0,001**	-		
miR134	r	-0,148	-0,179	1,000	
	p	0,361	0,270	-	
miR216b	r	0,029	0,044	**0,469**	1,000
	p	0,861	0,790	**0,002**	-

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT öncesi CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü düzeyde korelasyon bulunmuştur.

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT öncesi miR134 ve miR216b düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde korelasyon bulunmuştur.

Tablo 31. Tüm hastaların olduğu grupta, NAKT sonrası tümör yatağı boyutu ile CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi

			NAKT sonrası tümör yatağı boyutu
NAKT Öncesi	CD133	r	**0,323**
		p	**0,042**
	ALDH1A1	r	**0,317**
		p	**0,046**
	miR134	r	-0,039
		p	0,813
	miR216b	r	0,233
		p	0,147
NAKT sonrası	CD133	r	0,284
		p	0,076
	ALDH1A1	r	0,022
		p	0,892
	miR134	r	0,285
		p	0,074
	miR216b	r	**0,326**
		p	**0,040**

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi

NAKT öncesi CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri ile, NAKT sonrası tümör yatağı boyutu istatistiksel olarak anlamlı, orta düzeyde korele bulunmuştur. NAKT sonrası mir216b düzeyleri ile, NAKT sonrası tümör yatağı boyutu istatistiksel olarak anlamlı, orta düzeyde korele bulunmuştur.

Tablo 32. NAKT öncesinde, çalışma gruplarına göre genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi

			CD133	ALDH1A1	miR134	miR216b
TN	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	**0,661**	1,000		
		p	**0,038**	-		
	miR134	r	-0,297	0,055	1,000	
		p	0,405	0,881	-	
	miR216b	r	-0,564	0,139	0,321	1,000
		p	0,090	0,701	0,365	-
HER2	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	0,503	1,000		
		p	0,138	-		
	miR134	r	-0,387	-0,387	1,000	
		p	0,270	0,270	-	
	miR216b	r	-0,236	0,042	0,620	1,000
		p	0,511	0,907	0,056	-
TP	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	0,248	1,000		
		p	0,489	-		
	miR134	r	-0,024	-0,036	1,000	
		p	0,947	0,920	-	
	miR216b	r	-0,036	0,109	**0,890**	1,000
		p	0,920	0,763	**0,001**	-
Lum	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	0,576	1,000		
		p	0,082	-		
	miR134	r	-0,333	-0,164	1,000	
		p	0,347	0,651	-	
	miR216b	r	**0,709**	0,382	0,055	1,000
		p	**0,022**	0,276	0,881	-

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi

NAKT öncesi TN grupta CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri anlamı güçlü düzeyde korele bulunmuştur.

NAKT öncesi TP grupta miR134 ve miR216b düzeyleri anlamı çok güçlü düzeyde korele bulunmuştur.

NAKT öncesi luminal grupta CD133 ve miR216b düzeyleri anlamı güçlü düzeyde korele bulunmuştur.

Tablo 33. NAKT sonrası, genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi

		CD133	**ALDH1A1**	**Mir134**	**Mir216b**
CD133	r	1,000			
	p	-			
ALDH1A1	r	**0,327**	1,000		
	p	**0,040**	-		
miR134	r	0,093	0,094	1,000	
	p	0,569	0,564	-	
miR216b	r	0,037	0,060	**0,835**	1,000
	p	0,822	0,713	**0,000**	-

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT sonrası CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri anlamlı orta düzeyde korele bulunmuştur.

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT sonrası miR134 ve miR216b düzeyleri anlamlı çok güçlü düzeyde korele bulunmuştur.

Tablo 34. NAKT sonrasında, çalışma gruplarına göre genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi

Grup			**CD133**	**ALDH1A1**	miR**134**	miR**216b**
TN	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	**0,733**	1,000		
		p	**0,016**	-		
	miR134	r	0,626	0,182	1,000	
		p	0,053	0,614	-	
	miR216b	r	0,506	0,201	**0,850**	1,000
		p	0,136	0,577	**0,002**	-
HER2	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	0,006	1,000		
		p	0,987	-		
	miR134	r	-0,176	-0,042	1,000	
		p	0,627	0,907	-	
	miR216b	r	-0,117	-0,104	**0,841**	1,000
		p	0,748	0,774	**0,002**	-
TP	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	0,564	1,000		
		p	0,090	-		
	miR134	r	-0,273	0,188	1,000	
		p	0,446	0,603	-	
	miR216b	r	-0,600	0,030	**0,842**	1,000
		p	0,067	0,934	**0,002**	-
Lum	CD133	r	1,000			
		p	-			
	ALDH1A1	r	-0,152	1,000		
		p	0,676	-		
	miR134	r	0,115	0,176	1,000	
		p	0,751	0,627	--	
	miR216b	r	0,055	0,122	**0,809**	1,000
		p	0,881	0,738	**0,005**	-

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi, TN=Triple negatif grup, HER2=Her2 (+) grup, TP= Triple pozitif grup, Lum= Luminal (B) grup

NAKT sonrası TN grupta CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri anlamlı ve güçlü düzeyde korele bulunmuştur.

NAKT sonrası her bir grupta ayrı ayrı olarak miR134 ve miR216b düzeyleri anlamlı ve çok güçlü düzeyde korele bulunmuştur.

Tablo 35. Tedaviye yanıt veren hastalarda, NAKT öncesindeki genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi

		CD133	**ALDH1A1**	miR**134**	miR**216b**
CD133	r	1,000			
	p	-			
ALDH1A1	r	**0,466**	1,000		
	p	**0,025**	-		
miR134	r	-0,324	-0,207	1,000	
	p	0,131	0,343	-	
miR216b	r	-0,001	0,005	**0,434**	1,000
	p	0,995	0,982	**0,038**	-

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi

NAKT sonrası tedavi yanıtı izlenen hastalarda, NAKT öncesi dokulardaki bazal CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri istatistiksel anlamlı ve orta düzeyde korele bulunmuştur. Benzer şekilde miR134 ve miR216b düzeyleri de istatistiksel anlamlı ve orta düzeyde korelasyon göstermektedir.

Tablo 36. Tedaviye yanıt veren hastalarda, NAKT sonrasında genler ve miRNA'lar arasındaki korelasyon ilişkisi

		CD133	**ALDH1A1**	miR**134**	miR**216b**
CD133	r	1,000			
	p	-			
ALDH1A1	r	**0,567**	1,000		
	p	**0,005**	-		
miR134	r	0,181	0,399	1,000	
	p	0,409	0,059	-	
miR216b	r	0,022	0,209	**0,859**	1,000
	p	0,921	0,340	**0,000**	-

r=Spearman korelasyon katsayısı, p=anlamlılık düzeyi

NAKT sonrası tedavi yanıtı olanlarda, tedavi sonrasındaki CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri arasında anlamlı ve güçlü korelasyon, miR134 ve miR216b düzeyleri arasında anlamlı düzeyde çok güçlü korelasyon izlenmiştir.

Ek bulgular:

NAKT sonrasında 9 hastada uzak organ metastazı izlenmiştir. Bu hastaların 4 tanesi TN gruptaydı. Uzak organ metastazı ile tedavi öncesi ve sonrası CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunamamıştır.

8 hastada ise nüks izlenmiştir. Bu hastaların da 4 tanesi TN gruptaydı. Nüks ile tedavi öncesi ve sonrası CD133, ALDH1A1, miR134 ve miR216b düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Toplamda 2 hasta ex olmuştur ve ikisi de TN gruptaydı.

Hastaların tümünün verilerine ulaşamasak da; elimizdeki verilerde iki hastanın BRCA pozitif olduğu ve ikisinin de TN grupta oldugu izlenmektedir. Bu 2 hastadan biri ex olmuştur.

TN gruptaki hastaların %40'ında, TP gruptaki hastaların %10'Nüks 1-36 ay arasında izlenmiştir (ortanca 6 ay).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda NAKT alan meme kanseri hastalarının doku örneklerinde miR134, miR216b ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilmesi muhtemel kanser kök hücre genlerinden CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri tedaviden önce ve sonra olmak üzere incelenmiştir.

Çalışmamızda, TN hasta grubunda, neoadjuvan kemoterapi öncesindeki doku CD133 ekspresyonu düzeyleri tedavi sonrasına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olup, tedavinin ardından dramatik bir düşüş görülmüştür ($p=0.047$). Kanser kök hücre biyobelirteci olmasının yanısıra, CD133'ün TN meme kanseri fenotipinde tümör hücrelerinin invazivliğini direkt olarak modüle edici etkisi nedeniyle prognozun ve malign progresyonun bir indikatörü olduğu ortaya konulmuştur (93). Brugnoli ve arkadaşları, 2017 yılında yapılan çalışmalarında, PLC enziminin β2 izoformunun (PLC-β2) TN fenotipindeki tümör hücrelerindeki up-regülasyonunun malignitelerde önemli rol oynayan yüzey antijenlerinin aşağı regülasyonunu sağladığı ve kök hücre benzeri fenotipe sahip hücre sayısını azalttığını göstermişlerdir (105). MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, PLC-β2'nin CD133 üzerindeki direkt etkisi ortaya konulmuş ve PLC overekspresyonu ile hem membran-ilişkili ve hem de stoplazmik CD133 düzeylerinin azaldığı görülmüş, bununla uyumlu olarak CD133 ilişkili invazyon kapasitesi de azalmıştır (106). Yine aynı hücre modelinde, PLC-β2'nin kök hücre özelliği gösteren $CD133^+$ hücre sayısını düzenlediği, PLC-β2 overekspresyonunun $CD44^+/CD133^+/EpCAM^+$ hücre sayısını azalttığı ve $CD133^+/EpCAM^+$ hücre subtipinin proliferasyon ve invazyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. Yin ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmalarında ise, TN meme kanseri kök hücrelerini hedefleyen bir anti-miRNA teknolojisi araştırılmıştır (107). Bu çalışmada, TN meme kanseri kök hücrelerinin yüzeylerindeki CD133'ü hedefleyen miR21 inhibitörü ile kaplı RNA nanopartikülleri kullanmışlardır. Bu şekilde anti-miR21 uygulanması ile miR21 ekspresyonu azalmış ve PTEN ve PDCD4 gibi tümör süpresor genleri hedeflenerek gen ekspresyonlarında upregülasyon sağlanmıştır. Bizim çalışmamızda TN grupta CD133 düzeyleri anlamlı olarak azalmasına rağmen miR134 ve miR216b düzeyleri TN grupta anlamlı bir değişime uğramamıştır. Neoadjuvant kemoterapinin PLC-β2 gibi bir enzimin ya da

çalışmamızda ölçülmeyen başka bir miRNA düzeyinin veya başka bir molekül üzerinden CD133 gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğu düşünülmekle birlikte, bu konuda daha kapsamlı ek çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz. Literatürde TN profile sahip hastaların NAKT'nin en fazla etki etmesi beklenen gruplardan olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda, TN meme kanseri grubundaki 10 hastanın 7'sinde tedavi yanıtı izlenmiştir. CD133'te izlenen düşüş, neoadjuvan kemoterapinin bu hasta grubundaki etkisini desteklemektedir.

HER2 negatif hastaların oluşturduğu çalışma grubunda (TN+Lum) da NAKT sonrasındaki CD133 düzeylerinin NAKT öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür. Lum grubu tek başına incelendiğinde ise bu gruptaki CD133 düzeyleri tedavi sonrasında istatistiksel anlamlı düşüş sergilememiştir. Bu bilgiler ışığında, TN hasta grubunda CD133 düzeyindeki izlenen düşüşün çok belirgin olmasının TN+Lum grubu birlikte değerlendirildiğinde, TP+HER2 grubundan farklı çıkmasına katkıda bulunmuştur düşüncesindeyiz.

CD133'ün protoonkogen şeklinde etki ettiğini gösteren ve CD133 ekspresyonunun tümör grade'i, nüks, lenf nodu metastazı ile korele olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (50). CD133'ün etkilerini tümör mikro çevresi, epigenetik faktörler, sinyal yolakları ve miRNA'lar üzerinden yaptığı düşünülmektedir. CD133, KKH özelliğini hücrede farklı yolakları kullanarak gösterir (WNT/β katenin, Notch vb.) (50). NAKT ile CD133'ün protoonkogen ve EMT oluşturucu etkisi azaltılıp, tümörigenezde sahip olduğu etki inhibe edilmektedir. Çalışmamızda, RCB 0-1 ve RCB 2-3 olarak gruplar tedavi yanıtı açısından iki gruba ayrılarak istatistiksel analiz yapılmış ve tedaviye yanıt veren hastaların oluşturduğu grupta NAKT sonrasında CD133 istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür. Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak, tedavi yanıtı olan hastalarda tedavi etkisi ile CD133 arasında bir etkileşim olduğu sonucuna vardık. Ancak çalışmamızda CD133 düzeyinin tümör boyutu, tümör derecesi, nüks, lenf nodu metastazı gibi diğer prognostik parametrelerle anlamlı bir ilişkisi saptanmamıştır.

Tanı anında desmoplastik stromal cevap izlenen hastalarda, CD133 düzeyleri, izlenmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0.025$). Desmoplastik stromal yanıt; tümörün üzerinde geliştiği dokuda yaptığı destrüksiyon

veya dokunun tümöre verdiği cevap olarak değerlendirilebilir. Desmoplastik stromal yanıtın nedeninin dokunun kendisini korumak için mi, yoksa tümörün rahatça dokuya yerleşebilmek amacıyla mı yaptığı belirli değildir (108). Çalışmamızda, tanı anında desmoplastik stromal yanıt izlenen hastalarda protoonkogen olarak çalışan KKH'lerden CD133 düzeyleri düşük bulunmuştur. KKH düzeylerinin düşüklüğü nedeniyle, kanser prognozunun daha iyi olacağı beklenmektedir. Bununla birlikte, bizim çalışmamızda tedavi öncesi desmoplazi yanıtı olan ve olmayan hastaların oluşturduğu gruplarda tedavi yanıtı, nüks ve metastaz açısından farklılık izlenmemiştir.

NAKT sonrasında desmoplastik stromal yanıtlarına göre hastalar 3 sınıfa ayrılmıştır. İmmatür cevap oluşturan tümörlerde tedavi sonrası miR216b değerleri tedavi öncesine göre istatistiksel anlamlı düşüş göstermiştir. Ayrıca, matür desmoplastik stromal yanıt gösteren dokularda ise miR134 ve miR216b düzeyleri istatistiksel anlamlı olmasa da (sırasıyla p=0.050 ve p=0.084) artış göstermiştir. Bu durum özellikle miR216b'nin desmoplastik stromal yanıt durumu ile ilişkili olduğunu işaret edebilir.

NAKT sonrası lenf nodu metastazı bulunan hastalarda tedavi sonrasındaki ALDH1A1 düzeyleri, metastaz olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktür (p=0.014). Bu hastalarda damar invazyonu değerlendirildiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir (p=0.012). Damar invazyonu ve lenf nodu metastazı sonuçlarının birbiri ile uyumlu olması, vakaların patolojik değerlendirilmesinin ve çalışmadaki preanalitik aşamaların kaliteli bir şekilde yapıldığını göstermektedir. ALDH1A1 düzeylerinin NAKT sonrasında düşük izlenmesi ise, aslında düzeyleri yüksek izlenmesi beklenen metastatik hastaların da kemoterapi etkisine maruz kaldığını ve KKH'lerin etkisini bir nebze azalttığını düşündürmektedir. Ayrıca, çalışılan FFPE dokuları meme lokalizasyonundaki tümör/tümör yatağı dokuları olduğu için, bu dokulardaki ALDH1A1 düzeyleri ile metastatik lenf nodundan elde edilecek olan ALDH1A1 düzeyleri aynı olmayacaktır. Viabl tümöral alanda KKH'lerinin tabii olarak yüksek bulunması beklenmektedir.

NAKT öncesi CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri ile NAKT sonrası tümör yatağı boyutu istatistiksel olarak anlamlı ve orta düzeyde korele bulunmuştur (p=0,042 ve

p=0,046). Bu korelasyon, tümör ne kadar büyükse o kadar çok kök hücre içereceği düşünülürse, oldukça kıymetlidir. Ayrıca KKH'lerin tespit edilmesi kadar, tespit edildikleri düzeyler de nicelik olarak önem arz etmektedir.

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT öncesi CD133 ve ALDH1A1 arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü düzeyde korelasyon bulunmuştur. Yine, tedavi yanıtı olan hastalarda kök hücre genleri arasında güçlü korelasyon izlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda da bu iki KKH geninin korele oldukları tanımlanmıştır. Her iki KKH geni de protoonkogen olarak çalıştığından, bu aslında oldukça beklenen bir durumdur. Meme kanseri kök hücrelerini regüle eden ve tümorigenezde rol oynayan bu iki genin tümör oluşumu üzerinde aynı yönde etki ettiğini göstermektedir. CD133 ve ALDH1A1 genleri, etkilerini apoptozu azaltarak, hipoksi indükleyerek, EMT oluşturarak gerçekleştirdikleri için, benzer yolaklar üzerinden etki etmektedirler.

TN grupta CD133 ve ALDH1A1 düzeylerinin tedavi öncesi düzeyleri güçlü düzeyde ve istatistiksel anlamlı korele bulunmuştur. Ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da (p=0,082) luminal grupta da yine kanser kök hücre genleri arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Özellikle TN grupta olmak üzere, HER2 negatifliği gösteren tümörlerde kök hücre genlerinin aynı yönde değiştiği izlenmektedir.

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT öncesi CD133 ve ALDH1A1 arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü düzeyde korelasyon bulunmuştur. Bununla birlikte NAKT sonrasında bu korelasyonun derecesi orta düzeyde saptanmıştır. TN grupta tedavi öncesi güçlü derecede izlenen korelasyonun tedavi sonrasında da güçlü bir şekilde sebat ettiği izlenmiştir. Bununla birlikte luminal grupta genler arasındaki istatistiksel anlamlı olmayan korelasyon tamamen bozulmuştur.

NAKT sonrası tedavi yanıtı izlenen hastalarda, tedavi öncesi bazal kanser kök hücresi gen ekspresyon düzeyleri orta düzeyde korele bulunmuş, NAKT sonrasında CD133 ve ALDH1A1 arasındaki bu korelasyon güçlü düzeye yükselmiştir. KKH genlerinde görülen bu ekspresyon değişikliklerinin neoadjuvan kemoterapi etkisi ve miRNA değişimleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tedavi öncesinde yüksek olan KKH düzeylerinde düşüş (özellikle CD133'te istatistiksel anlamlı azalma) mevcuttur, düşük olan miRNA düzeylerinde ise istatistiksel anlamlı olmasa da bir

miktar artış görülmüştür. Tedavi ile aynı yönde değişmesi beklenen genler ve korelasyon göstereceği düşünülen miRNA'lardan beklenilen sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmayı oluşturan her bir gruptaki (TN, HER2, TP ve Luminal) NAKT öncesi bazal miR134 ve miR216b düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamaktaydı. Ek olarak, NAKT sonrasındaki miRNA düzeyleri açısından da gruplar arası herhangi bir fark izlenmedi. Yine çalışmayı oluşturan her bir grupta NAKT öncesi ve sonrasında miR134 ve miR216b düzeylerinin değişim göstermediğini gördük.

Lu ve arkadaşlarının 40 meme kanseri hastası ile yaptığı çalışmada doksorubisin-dirençli meme kanseri hücrelerinde ABCC1 ekspresyonunda artış ve miR134 aşağı regülasyonu olduğu bulunmuş ve miR134'ün ABCC1 ekspresyonunu azalttığı sonucu elde edilmiştir (98). Bizim çalışmamızda HER2 reseptör durumu dikkate alınarak yapılan gruplamada; HER2 negatif (TN+Lum) vakaların oluşturduğu grupta NAKT öncesi ve sonrası karşılaştırmada miR134 düzeyi tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar artış göstermiştir. Çalışmamızdaki hasta sayısının fazla olmaması nedeniyle bu artışın istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığını düşünmekteyiz.

Kök hücre pluripotensi durumunun SOX2, NANOG, NOTCH be Bcl-2 gibi birtakım genler ve miR134, mir-470, mir-296 ve mir-34 ailesi tarafından düzenlendiği belirtilmiştir (109, 110). Belirtilen miR134 artışı bu genler üzerine etki ederek kök hücre pluripotensini etkilemiş olabilir. miR134'ün KRAS üzerine direkt etkisi ortaya konulmuştur, bu şekilde artan miR134 KRAS inhibisyonu yaparak EMT geçişini engelleyebilir (111). EGFR'nin miR134'ün hedefi olduğu ve miR134'ün PIK3CA/AKT/mTOR sinyal yolağını regüle ettiği bir yayında ortaya konulmuştur (112). Yine artan miR134, PIK3CA/AKT/mTOR yolağını etkileyerek tümör progresyonunu geriletici etki ortaya koyabilir.

NAKT yanıtı olan grupta ölçülen bazal miR216b düzeyleri, tedaviye yanıt vermeyen gruba göre daha düşüktür; diğer bir ifadeyle NAKT öncesi miRNA düzeyi daha düşük olan grupta tedavi yanıtı öngörülebilir. Ancak hasta sayısı nispeten az olduğundan bu farkın istatistiksel olarak anlamlı çıkmadığı düşünüldü. ($p=0.063$) Tedaviye yanıt veren grupta, NAKT sonrasında, tedavi öncesine göre miR216b düzeylerinde bir miktar artış izlenmiştir, fakat istatistiksel anlam bulunamamıştır.

NAKT öncesi ölçülen miR216b düzeyi düşük olan hastalarda tedavi ile birlikte miR216b düzeylerinin yükselmesi miR216b'nin etkilediği yolakları aktive ederek hastalarda tedavi yararı sağlayabilir düşüncesindeyiz. Örneğin, miR216b, BRCA1'in 3'UTR ucuna bağlanarak BRCA1'i baskılar. Baskılanan BRCA1 MALAT1 inhibisyonuna neden olur ve böylece sisplatinin sitotoksik etkileri artar. Bu da tedavi yanıtının daha etkin olması ile ilişkilidir. (Bu nedenle miR216b artışının istatistiksel olarak anlamlı olmasa da dikkate değer olduğunu ve daha fazla hasta sayısı içeren çalışmalarda tekrar incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.)

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT öncesi miR134 ve miR216b düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde korelasyon bulunmuştur. Bununla birlikte TP grubunda NAKT öncesi gözlenen bu korelasyon çok güçlü düzeydeydi. Ek olarak, sınırda anlamlı güçlü bir korelasyon HER2 pozitif grupta (TP+HER2) görülmüştür. ($p=0.056$). Bu nedenle HER2 pozitif meme kanseri olan hastalarda miR134 ve miR216b ilişkisinin birlikte incelendiği detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, NAKT sonrası miR134 ve miR216b düzeyleri anlamlı çok güçlü düzeyde korele bulunmuştur. Yine, NAKT sonrası her bir grupta ayrı ayrı olarak miR134 ve miR216b düzeyleri anlamlı ve çok güçlü düzeyde korele bulunmuştur. Tedavi öncesinde tüm hastaların oluşturduğu grupta görülen orta düzeyde korelasyonun tedavi sonrasında çok güçlü düzeye ulaşması, keza NAKT öncesi sadece TP ve nispeten HER2(+) grupta gözlenen korelasyonun tedavi sonrasında grupların hepsinde çok güçlü düzeye çıkması neoadjuvan kemoterapinin miR134 ve miR216b aynı yönde birlikte eksprese edilmesine katkıda bulunduğu söylenebilir. NAKT sonrası tedavi yanıtı izlenen hastalarda, NAKT öncesindeki miR134 ve miR216b düzeylerinin orta düzeyde korelasyon göstermesi ve NAKT sonrasında bu korelasyonun çok güçlü düzeye yükselmesi de neoadjuvan kemoterapinin ölçtüğümüz miRNA'ları indüklediğini destekler niteliktedir. miR134 ve miR216b, benzer yolaklar üzerinden (PI3K/AKT/mTOR, KRAS, ERK, EBP-α, TGF-β, Bcl-2) EMT regülasyonu ve antitümörigenik etki gösterirler. miR134 ve miR216b'nin ayrı ayrı ve muhtemelen korele bir şekilde göstermiş oldukları bu etkiler, NAKT sonrası daha belirgin olacaktır çünkü neoadjuvan kemoterapi ile birlikte etki edebilecekleri yolaklar aktif hale gelecektir.

TN, HER2 ve TP gruplarda hastaların yarıdan fazlasında tedavi yanıtı izlenirken; luminal grupta beklenildiği üzere tedavi yanıtı az sayıda hastada izlenmiştir (113). Bu hastalarda NAKT tercih edilmesinin sebebi hastalara MKC uygulanmasının planlanması, tümörün çok büyük olması gibi sebepler olarak değerlendirildi. Lum grup için literatürde farklı NAKT görüşleri bulunmaktadır. Ek olarak, NAKT ile hastaların moleküler alt tiplerinde değişmeler olabileceği de literatürde mevcuttur. Bizim çalışmamızda da NAKT öncesinde;

- 1 hasta TP grupta iken, NAKT sonrasında HER2 den zengin şekilde moleküler alt tipi değişmiştir. Bu hasta tama yakın tedavi yanıtı göstermektedir. NAKT ile ER ve PR negatifleşmiştir.

- 1 hasta ise Lum grupta iken, NAKT sonrasında TP hormon profili sergilemiştir. Bu hasta tedaviye kısmı yanıt vermiştir. Bu hastada HER2 tedavi ile pozitifleşmiştir.

Çalışmamızda meme kanserinin luminal A subtipi yer almamaktadır. Luminal B ise iki grupta (TP / Lum) incelenmiş olup. Bu iki grup kemoterapiye oldukça farklı yanıt sergilemişlerdir. TP grupta kemoterapiye yanıt oldukça iyiyken, Lum grubunda az hastada tedavi yanıtı izlenmiştir.

TN grup tedaviye iyi yanıt verse dahi tedavi ile yok edilemeyen KKH'leri mevcut olduğu sürece, her zaman tümörü yeniden başlatabilme kapasitesine sahiplerdir. Bu nedenle KKH'lerinin etki mekanizmalarını ve ilgili miRNA'ları bilmek ve bunlara yönelik kişiselleştirilmiş tedaviler uygulanması gerekmektedir.

Yine çalışma grupları arasında tedaviye yanıt durumları karşılaştırıldığında Lum grubundaki hastaların sadece %20'sinde tedavi yanıtı izlenmiş ve tedavi yanıtı açısından Lum grubu çalışmadaki diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde diğer gruplardan farklı bulunmuştur ($p=0.037$).

Çalışmamızda miRNA'ları sadece PCR yöntemi ile inceledik. miRNA düzeyinin ve kök hücre biyobelirteçlerinin belirlendiği çalışmamızda Western Blot, İHK vb. ek teknikler ile ölçüm yapılamamıştır. miRNA düzeylerine ek olarak yapılabilecek protein ölçümleri ile kanser patogenezi daha iyi ortaya konabilir. miRNA'lar ile genler arasında bir korelasyon bulamamış olmakla birlikte

çalışmamızda bu genlerin hedefi olan proteinlerin düzeyleri incelenememiştir. miRNA'lar genlerin ekspresyonlarını farklı aşamalarda etkileyebildikleri için protein düzeylerinin de inceleneceği çalışmalarla daha kesin sonuçlar elde edilebilecektir. Çalışmamızın bir diğer dezavantajı hasta sayısının nispeten az olmasıdır. Bu durum çalışmada anlamlı çıkabilecek birtakım sonuçların istatistiksel anlamlılığa ulaşmamasına neden olmuştur düşüncesindeyiz. Zayıf yönlerine rağmen miRNA216 ve miR134'ün, CD133 ve ALDH1A1 ile birlikte düzeylerini inceleyen ilk çalışma olması açısından çalışmamız literatürde önemli bir yer tutacaktır.

6. SONUÇLAR

Meme kanserinde tümörlerin tedavi sonrası nüks ve metastazı, tümör biyolojisi ve patogenezinde hala araştırılması gereken konuların olduğunu göstermektedir. Meme kanserinde kanser kök hücreleri ve spesifik miRNA'lar ile yapılacak olan çalışmalar ilaç direnci, nüks ve tedavi yanıtı ile ilgili varolan bilgilerimize katkı sağlayabilir.

Çalışmamıza neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrası meme kanseri dokularında miR134, miR216b ve kanser kök hücreleri biyobelirteçlerinden CD133 ve ALDH1A1 düzeyleri ölçülmüştür. Tedavi öncesi ve sonrasında ölçülen gen ve miRNA düzeylerinin çalışma gruplarını oluşturan farklı meme kanseri subtipleri arasında benzer olduğu saptanmıştır. CD133 düzeyi, TN grupta NAKT sonrası ölçümde anlamlı olarak düşmüştür. Ayrıca HER2 negatifliği baz alınarak yapılan gruplamada (TN ve Luminal subtipteki hastaları içeren grupta) da CD133 düzeylerinin tedavi ile azaldığı izlenmiştir. TN gruptaki hastaların %70 inde tedavi yanıtı izlenmiştir. CD133 protoonkogen olarak görev yaptığından dolayı, NAKT ile düzeyinin düşmesi ve hatta belki de buna bağlı olarak tedavi yanıtı izlenmesi hem beklenen, hem de çalışmamızda tanımladığımız bir sonuçtur. Çalışmanın gücü bu aşamada literatür ile benzer şekilde bulunan sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Böylece, NAKT alacak olan TN subtipteki hasta grubunda, tedavi yanıtını öngörmede CD133 biyobelirteci pratikte oldukça kullanışlı olacaktır. Bu hedef için, aynı hastalarda yapılacak olan eş zamanlı immünhistokimyaasal çalışma ile de skorlama sistemi geliştirilerek daha sağlam veriler ortaya konabilir.

CD133 ve ALDH1A1 tedavi öncesi ve sonrasında ölçülen düzeyleri korele izlenmiştir. Her iki KKH geni, hücre içi yolakları benzer amaç ile aynı yönde çalıştırdığından, korelasyon izlenmesi beklenen ve güvenilir birer sonuçtur.

NAKT öncesi ve sonrası düzeylerinde istatistiksel anlamlı değişiklik saptanmayan miR134 ve miR216b ise, yine benzer şekilde hareket edip, hücrede TSG olarak görev görmektedir. NAKT ile etkilenmeyen düzeylerindeki korelasyon ise, bize her iki miRNA nın meme kanserinde neoadjuvan tedavi yanıtını öngörmek için spesifik olmadığını göstermektedir. Ancak tedaviye yanıt verecek olan hastalarda,

bazal miR216b düzeyleri düşük bulunmuştur. miR216b'nin tedaviye yanıt verecek olan hastalarda bu düşüklüğünden yola çıkarak daha kapsamlı çalışmalar ile miR216b, NAKT alacak hastalarda tedavi yanıtını öngörme aracı olarak kullanılabilir.

Gelecek zamanlarda adenoviral vektörler, nanopartiküller veya lipid temelli materyaller ile hücrelerde aşağı regüle olan miRNA ekspresyonunu artıracak miRNA replasman tedavilerinin ve upregüle olan miRNA'ları normal düzeye getirecek antiMİR tedavilerinin uygulanması öngörülmektedir. Bahsedilen bu hedefe yönelik tedavilerin önümüzdeki yıllarda özellikle kanser hastalarının tedavisinde etkin şekilde ve yan etki geliştirmeden uygulanması için kanser kök hücre genlerini spesifik olarak hedefleyen miRNA'ların tanımlanması beklenmektedir. Bu şekilde miRNA-miRNA arası etkileşimler ve miRNA'lar arasındaki korelasyonlar da ortaya konulacaktır. miRNA lar vücutta bir çok mRNA nın düzenlenmesinde rol oynarlar. Bu sebeple miRNA temelli tedavilerdeki en büyük dezavantaj istenmeyen etkilerin oluşma riskidir. Keza, yan etki oluşmasını önlemek amacıyla da kanser dokularına özgü spesifik miRNA'ların tanımlanması elzemdir.

Günümüzde, kanser ile ilgili kitap ve yayınlar neredeyse her gün güncellenmektedir. Bunun nedeni kanserlerin de her geçen gün kendini yenilemesinden kaynaklanmaktadır. Son yıllarda histopatolojik olarak da daha agresif, klinik olarak tedaviye yanıt vermeyen, yanıt verse bile nüks ve metastazlar ile hastayı bırakmayan kanserler ile sıklıkla karşılaşmaktayız. Bununla birlikte, kanser araştırmaları da hız kazanmış ve kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerin yanında kişiselleştirilmiş tıp başlığı altında hastaya özgü tedaviler üzerinde çalışılmaktadır. miRNA temelli tedaviler de, kanser hastalarının tedavilerinde bu kisşisellleştirilmiş alanın temel yapıtaşını oluşturacaklardır.

KAYNAKLAR

1. Dabbs DJ. Breast Pathology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2016.
2. Mills S. Histology for pathologists: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
3. Pansky B. Review of medical embryology: Macmillan; 1982.
4. Gray H, Standring S. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice: Churchill Livingstone; 2008.
5. Lindberg MR. Diagnostic Pathology: Normal Histology-E-Book: Elsevier; 2017.
6. Hoda SA, Rosen PP, Brogi E, Koerner FC. Rosen's breast pathology: Lippincott Williams & Wilkins; 2020.
7. Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. Clinical obstetrics and gynecology. 2011;54(1):91-5.
8. John R, Laura W, Jesse KM, Jeffrey L. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Saunders-Elsevier Philadelphia; 2017.
9. Tavassoli F. Normal development and anomalies. Pathology of the breast New York: McGraw-Hill. 1999:1-25.
10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book: Elsevier health sciences; 2014.
11. Lester SC, Hicks DG. Diagnostic pathology: breast: Elsevier Health Sciences; 2016.
12. Mills SE, Carter D, Greenson JK, Reuter VE, Stoler MH. Sternberg's diagnostic surgical pathology: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
13. Organization WH. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. 2020.
14. Bakanlığı TS, Müdürlüğü SHG, Başkanlığı STDD. TC Sağlık Bakanlığı Yayın Numarası: 1170 ISBN: 978-975-590-771-0.
15. Nadia H. GM Breast cancer. Lancet. 2017;389(10074):1134-50.
16. Rummel S, Hueman MT, Costantino N, Shriver CD, Ellsworth RE. Tumour location within the breast: Does tumour site have prognostic ability? ecancermedicalscience. 2015;9.
17. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes & diseases. 2018;5(2):77-106.

18. Beckmann M, Niederacher D, Schnürch H-G, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. Journal of Molecular Medicine. 1997;75(6):429-39.

19. Breast Tumours, WHO Classification of Tumours, 5th Edition.

20. AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, 2018.

21. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. nature. 2000;406(6797):747-52.

22. 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 research. 2010;12(5):1-18.

23. 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. Proceedings of the national academy of sciences. 2003;100(14):8418-23.

24. 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. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(19):10869-74.

25. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. Clinical Cancer Research. 2003;9(7):2406-15.

26. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron J, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC genomics. 2006;7(1):1-12.

27. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer. Pathology. 2009;41(1):40-7.

28. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. Nature medicine. 2009;15(8):842-4.

29. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annals of oncology. 2011;22(8):1736-47.

30. Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. Advances in anatomic pathology. 2012;19(1):39-53.

31. Eliyatkın N, Yalçın 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. The journal of breast health. 2015;11(2):59.

32. Kapp AV, Jeffrey SS, Langerød A, Børresen-Dale A-L, Han W, Noh D-Y, et al. Discovery and validation of breast cancer subtypes. BMC genomics. 2006;7(1):1-15.

33. Zhao J, Liu H, Wang M, Gu L, Guo X, Gu F, et al. Characteristics and prognosis for molecular breast cancer subtypes in Chinese women. Journal of surgical oncology. 2009;100(2):89-94.

34. 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. Clinical cancer research. 2004;10(16):5367-74.

35. Vici P, Pizzuti L, Natoli C, Gamucci T, Di Lauro L, Barba M, et al. Triple positive breast cancer: a distinct subtype? Cancer treatment reviews. 2015;41(2):69-76.

36. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. Breast cancer: basic and clinical research. 2010;4:117822341000400004.

37. O'Toole SA, Selinger CI, Millar EK, Lum T, Beith JM. Molecular assays in breast cancer pathology. Pathology. 2011;43(2):116-27.

38. Utkan G. Meme Kanserinde Neoadjuvan Kemoterapi. Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special 66 Topics. 2012;5(2):66-9.

39. Park CK, Jung W-H, Koo JS. Pathologic evaluation of breast cancer after neoadjuvant therapy. Journal of pathology and translational medicine. 2016;50(3):173.

40. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis A. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. Nature Reviews Cancer. 2005;5(11):899-904.

41. Furth J, Kahn MC, Breedis C. The transmission of leukemia of mice with a single cell. The American Journal of Cancer. 1937;31(2):276-82.

42. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature medicine. 1997;3(7):730-7.

43. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(7):3983-8.

44. Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1999;1473(1):67-95.

45. Karsten U, Goletz S. What makes cancer stem cell markers different? Springerplus. 2013;2(1):1-8.

46. Fenderson BA, Andrews PW. Carbohydrate antigens of embryonal carcinoma cells: changes upon differentiation. APMIS Supplementum. 1992;27:109-18.

47. Klevebring D, Rosin G, Ma R, Lindberg J, Czene K, Kere J, et al. Sequencing of breast cancer stem cell populations indicates a dynamic conversion between differentiation states in vivo. Breast cancer research. 2014;16(4):1-7.

48. Ruscito I, Castillo-Tong DC, Vergote I, Ignat I, Stanske M, Vanderstichele A, et al. Exploring the clonal evolution of CD133/aldehyde-dehydrogenase-1 (ALDH1)-positive cancer stem-like cells from primary to recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). A study of the Ovarian Cancer Therapy–Innovative Models Prolong Survival (OCTIPS) Consortium. European Journal of Cancer. 2017;79:214-25.

49. Silva IA, Bai S, McLean K, Yang K, Griffith K, Thomas D, et al. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. Cancer research. 2011;71(11):3991-4001.

50. Aghajani M, Mansoori B, Mohammadi A, Asadzadeh Z, Baradaran B. New emerging roles of CD133 in cancer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation. Journal of cellular physiology. 2019;234(12):21642-61.

51. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell stem cell. 2007;1(5):555-67.

52. Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? Clinical cancer research. 2010;16(12):3153-62.

53. Smit L, Berns K, Spence K, Ryder WD, Zeps N, Madiredjo M, et al. An integrated genomic approach identifies that the PI3K/AKT/FOXO pathway is involved in breast cancer tumor initiation. Oncotarget. 2016;7(3):2596.

54. Scioli MG, Storti G, D'Amico F, Gentile P, Fabbri G, Cervelli V, et al. The role of breast cancer stem cells as a prognostic marker and a target to improve the efficacy of breast cancer therapy. Cancers. 2019;11(7):1021.

55. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. Nature reviews Clinical oncology. 2011;8(2):97-106.

56. Niu T, Zhang W, Xiao W. MicroRNA regulation of cancer stem cells in the pathogenesis of breast cancer. Cancer Cell International. 2021;21(1):1-14.

57. Nakanishi T, Ross DD. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. Chinese journal of cancer. 2012;31(2):73.

58. Horimoto Y, Arakawa A, Sasahara N, Tanabe M, Sai S, Himuro T, et al. Combination of cancer stem cell markers CD44 and CD24 is superior to ALDH1 as a prognostic indicator in breast cancer patients with distant metastases. PloS one. 2016;11(10):e0165253.

59. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. Scientific reports. 2017;7(1):1-15.

60. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nature Reviews Cancer. 2013;13(10):714-26.

61. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. cell. 2009;136(2):215-33.

62. Qu H, Xu W, Huang Y, Yang S. Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(5):1117-25.

63. Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. Cancer letters. 2013;329(2):125-36.

64. Ashby J, Flack K, Jimenez LA, Duan Y, Khatib A-K, Somlo G, et al. Distribution profiling of circulating microRNAs in serum. Analytical chemistry. 2014;86(18):9343-9.

65. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. Theranostics. 2015;5(10):1122.

66. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. Journal of cellular physiology. 2018;233(3):2007-18.

67. Van Rooij E, Kauppinen S. Development of micro RNA therapeutics is coming of age. EMBO molecular medicine. 2014;6(7):851-64.

68. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(9):2999-3004.

69. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. British journal of haematology. 2008;141(5):672-5.

70. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. Cells. 2020;9(2):276.

71. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell. 2005;122(1):6-7.

72. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. Journal of clinical oncology. 2009;27(34):5848.

73. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. Cancer research. 2006;66(15):7390-4.

74. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. EMBO molecular medicine. 2012;4(3):143-59.

75. Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu CG, Palazzo JP, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2009;219(2):214-21.

76. He Y, Lin J, Kong D, Huang M, Xu C, Kim T-K, et al. Current state of circulating microRNAs as cancer biomarkers. Clinical chemistry. 2015;61(9):1138-55.

77. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell. 2007;131(6):1109-23.

78. DeSano JT, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. The AAPS journal. 2009;11(4):682-92.

79. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. The Breast. 2011;20:S63-S70.

80. Krützfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. Cell metabolism. 2006;4(1):9-12.

81. Hatfield S, Ruohola-Baker H. microRNA and stem cell function. Cell and tissue research. 2008;331(1):57-66.

82. Ko CCH, Chia WK, Selvarajah GT, Cheah YK, Wong YP, Tan GC. The Role of Breast Cancer Stem Cell-Related Biomarkers as Prognostic Factors. Diagnostics. 2020;10(9):721.

83. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. Oncotarget. 2016;7(10):11018.

84. Ciccone V, Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Morbidelli L, Ziche M. Stemness marker ALDH1A1 promotes tumor angiogenesis via retinoic acid/HIF-1α/VEGF signalling in MCF-7 breast cancer cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2018;37(1):1-16.

85. Althobiti M, El Ansari R, Aleskandarany M, Joseph C, Toss MS, Green AR, et al. The prognostic significance of ALDH1A1 expression in early invasive breast cancer. Histopathology. 2020;77(3):437-48.

86. Ma F, Li H, Li Y, Ding X, Wang H, Fan Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). Medicine. 2017;96(14).

87. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1–Positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. Clinical cancer research. 2010;16(1):45-55.

88. Liu Y, Lv D-l, Duan J-j, Xu S-l, Zhang J-f, Yang X-j, et al. ALDH1A1 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. BMC cancer. 2014;14(1):1-11.

89. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Bertucci F, Cabaud O, Wicinski J, Finetti P, et al. ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. Cancer research. 2013;73(24):7290-300.

90. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. Experimental hematology & oncology. 2013;2(1):1-8.

91. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, et al. mTOR Signal and Hypoxia-Inducible Factor-1A Regulate CD133 Expression in Cancer Cells.

92. Kagara N, Huynh KT, Kuo C, Okano H, Sim MS, Elashoff D, et al. Epigenetic regulation of cancer stem cell genes in triple-negative breast cancer. The American journal of pathology. 2012;181(1):257-67.

93. Brugnoli F, Grassilli S, Al-Qassab Y, Capitani S, Bertagnolo V. CD133 in breast cancer cells: more than a stem cell marker. Journal of oncology. 2019;2019.

94. Zhao J, Zhang H, Lei T, Liu J, Zhang S, Wu N, et al. Drug resistance gene expression and chemotherapy sensitivity detection in Chinese women with different molecular subtypes of breast cancer. Cancer Biology & Medicine. 2020;17(4):1014.

95. Nozaki Y, Tamori S, Inada M, Katayama R, Nakane H, Minamishima O, et al. Correlation between c-Met and ALDH1 contributes to the survival and tumor-sphere formation of ALDH1 positive breast cancer stem cells and predicts poor clinical outcome in breast cancer. Genes & cancer. 2017;8(7-8):628.

96. Pan J-Y, Zhang F, Sun C-C, Li S-J, Li G, Gong F-Y, et al. miR-134: a human cancer suppressor? Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2017;6:140-9.

97. Leivonen S-K, Sahlberg KK, Mäkelä R, Due EU, Kallioniemi O, Børresen-Dale A-L, et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. Molecular oncology. 2014;8(1):93-104.

98. Lu L, Ju F, Zhao H, Ma X. MicroRNA-134 modulates resistance to doxorubicin in human breast cancer cells by downregulating ABCC1. Biotechnology letters. 2015;37(12):2387-94.

99. Su X, Zhang L, Li H, Cheng P, Zhu Y, Liu Z, et al. MicroRNA-134 targets KRAS to suppress breast cancer cell proliferation, migration and invasion. Oncology letters. 2017;13(3):1932-8.

100. Jana S, Krishna M, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Salgia R, et al. Therapeutic targeting of miRNA-216b in cancer. Cancer letters. 2020;484:16-28.

101. Zheng L, Zhang X, Yang F, Zhu J, Zhou P, Yu F, et al. Regulation of the P2X7R by microRNA-216b in human breast cancer. Biochemical and biophysical research communications. 2014;452(1):197-204.

102. Jana S, Sengupta S, Biswas S, Chatterjee A, Roy H, Bhattacharyya A. miR-216b suppresses breast cancer growth and metastasis by targeting SDCBP. Biochemical and biophysical research communications. 2017;482(1):126-33.

103. Cilek EE, Ozturk H, Gur Dedeoglu B. Construction of miRNA-miRNA networks revealing the complexity of miRNA-mediated mechanisms in trastuzumab treated breast cancer cell lines. PLoS One. 2017;12(10):e0185558.

104. Garofalo M, Croce CM. Role of microRNAs in maintaining cancer stem cells. Advanced drug delivery reviews. 2015;81:53-61.

105. Brugnoli F, Grassilli S, Lanuti P, Marchisio M, Al-Qassab Y, Vezzali F, et al. Up-modulation of PLC-β2 reduces the number and malignancy of triple-negative breast tumor cells with a CD133+/EpCAM+ phenotype: a promising target for preventing progression of TNBC. BMC cancer. 2017;17(1):1-11.

106. Brugnoli F, Grassilli S, Piazzi M, Palomba M, Nika E, Bavelloni A, et al. In triple negative breast tumor cells, PLC-β2 promotes the conversion of CD133 high to CD133 low phenotype and reduces the CD133-related invasiveness. Molecular cancer. 2013;12(1):1-15.

107. Yin H, Xiong G, Guo S, Xu C, Xu R, Guo P, et al. Delivery of anti-miRNA for triple-negative breast cancer therapy using RNA nanoparticles targeting stem cell marker CD133. Molecular Therapy. 2019;27(7):1252-61.

108. Walker RA. The complexities of breast cancer desmoplasia. Breast Cancer Research. 2001;3(3):1-3.

109. Li N, Long B, Han W, Yuan S, Wang K. microRNAs: important regulators of stem cells. Stem Cell Research & Therapy. 2017;8(1):1-7.

110. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. Nature. 2008;455(7216):1124-8.

111. Zhang J, Ma L. MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. Cancer and Metastasis Reviews. 2012;31(3):653-62.

112. El-Daly SM, Abba ML, Patil N, Allgayer H. miRs-134 and-370 function as tumor suppressors in colorectal cancer by independently suppressing EGFR and PI3K signalling. Scientific reports. 2016;6(1):1-11.

113. Collins PM, Brennan MJ, Elliott JA, Abd Elwahab S, Barry K, Sweeney K, et al. Neoadjuvant chemotherapy for luminal a breast cancer: Factors predictive of histopathologic response and oncologic outcome. The American Journal of Surgery. 2020.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Müzeyyen Burcu KAPLAN YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresi:

İletişim telefonu:

Yabancı dili: İngilizce

II-Eğitimi

Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi (2017-2021)

Tıp Fakültesi Eğitimi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (2007 – 2014)

Orta Öğretim: Afyon Süleyman Demirel Fen Lisesi

İlköğretim: Konya Ereğli Namık Kemal İlköğretim Okulu

III-Ünvanları

Tıp Doktoru (2014)

IV-Mesleki Deneyimi

Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi (Mart 2017-Devam ediyor)

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi (2015-2016)

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Ankara Patoloji Derneği

Patoloji Dernekleri Federasyonu

VI- Bilimsel Çalışmalar

Yayın: -

Bildiri:

1. Malign Mezotelyomanın Atipik Lokalizasyonda Kutanöz Metastazı: Olgu Sunumu ve Literatür Taraması, 2018 Ulusal Patoloji Kongresi

Müzeyyen Burcu KAPLAN, Gülçin ŞİMŞEK, Nesrin GÜRÇAY

2. Metastatik Prostat Kanserinin Supraklaviküler Prezentasyonu: Olgu Sunumu ve Literatür Gözden Geçirilmesi, 2018 Ulusal Patoloji Kongresi

Gülçim ŞİMŞEK, Ayşegül ERDEM, Esma GÜRBÜZ, Gülsüm Şeyma YALÇIN, **Müzeyyen Burcu KAPLAN**

3. Dev Myelolipom – Nadir Bir Lokalizasyon, 2017 Ulusal Patoloji Kongresi

Müzeyyen Burcu KAPLAN, Gülçin ŞİMŞEK, Gülsüm Şeyma YALÇIN, Esma GÜRBÜZ, Ayşegül ERDEM, Mustafa ALİMOĞULLARI

4. Perinatal Otopsi: Patognomonik Bir Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı Olgusu, 2017 Ulusal Patoloji Kongresi

Müzeyyen Burcu KAPLAN, Gülçin ŞİMŞEK

VII-Diğer Bilgiler

Sertifikalar ve Yeterlilik Belgeleri: İyi Klinik Uygulamalar Sertifikası (2021)

EKLER

EK-1. TEZ KONUSU ONAY FORMU

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Müzeyyen Burcu Kaplan Yılmaz
Uzmanlık Dalı:	Tıbbi Patoloji
Eğitim Kurumu:	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	24.03.2017
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	24.03.2021
Program Yöneticisinin **Adı Soyadı:**	Prof. Dr. Olçay Kandemir
Tez Danışmanının **Adı Soyadı:** **Telefon:** **E-Posta:**	Dr.Öğr.Üy. Tuba Dilay Kökenek Ünal

*Araştırma/Tez Konusu (Study Title)

Neoadjuvan kemoterapi alan meme kanseri hastalarında mirRNA216b ve miR134'ün ekspresyonlarının araştırılması

1-Araştırma Sorusu (Research problem)

Neoadjuvan kemoterapi alacak olan meme kanseri hastalarında kök hücre genlerini regüle eden miRNAlardan olan miRNA216b ve miR134'ün tedaviye cevabı öngörmede bir rolü olabilir mi?

Hangi hastaların tedaviye daha iyi cevap vereceğini, hangilerinin hastalıklarının daha iyi bir seyir göstereceğini ayırt etmemizde miR216b, ve miR134'ün yardımı olacak mıdır?

CD133 genini regüle eden miR216b ve ALDH1A1 genini regüle eden miR134'ün prognostik ve prediktif değeri var mıdır?

Meme kanseri nedeniyle neoadjuvan kemoterapi alan hastaların bazılarında neden daha uzun hastalıksız sağkalım görüldüğü halde bazılarında görülmemektedir? Kök hücre genlerini regüle eden miRNA'lar bu konuda bize nasıl yardımcı olabilir?

2-Arka Plan ve Gerekçe (Background/rationale)

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup yine kadınlarda kanser sebebiyle ölümlerde ilk sırada yer almaktadır. Günümüzde meme kanseri tedavisinde genel olarak kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır. Hastaların bir kısmında başarılı sonuçlar elde edilmiş olsa da nüks ve metastazlar tamamiyle önelenememektedir. Güncel kanser tedavi yöntemleri tümörün büyük çoğunluğunu oluşturan hücreleri hedef alarak tümör boyutunda belirgin gerilemeye sebep olmaktadırlar. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda tümör içinde az sayıda bulunan ancak tümörü yeniden başlatabilme kapasitesine sahip hücrelerin varlığı gösterilmiş ve kanser kök hücreleri tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerinin tümörün invazyon ve metastazında rol oynadığı ve tedaviye karşı direnç geliştirebildiği ortaya konmuştur.

Literatürde, meme kanseri kök hücrelerini belirlemeye yönelik olarak yapılan farklı çalışmalarda $ALDH1A1^{+}$, $CD44^{+}/ CD24^{-}$ ve $CD133^{+}$ hücrelerin tümörü oluşturabilme

kabiliyetine sahip olduğu belirtilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda biz de bu genlerin ekspresyonlarını değerlendirmeyi amaçladık.

Son yıllarda genlerin çalışmasının sadece genetik faktörlerle değil aynı zamanda epigenetik faktörlerle de belirlendiği ortaya konmuştur. Bu epigenetik faktörlerin başında gen ifadesini düzenleyen miRNA'lar gelmektedir. Kodlanmayan yeni bir RNA sınıfı olan miRNA'ların hastalıkların ve özellikle de kanserlerin gelişimindeki rolü pek çok araştırmaya konu olmuştur. Biz de bu çalışmada kanser kök hücrelerini belirleyen sözkonusu bu genler üzerinde etkili olduğu veritabanlarından predikte edilen miRNA'lardan mirRNA216b ve miR134'ün ekspresyon düzeylerini belirlemeyi amaçladık.

Literatürdeki tüm bu bilgilerden yola çıkarak, meme kanserinde kanser kök hücresi ile ilişkili bulunan genlerin ve bunları düzenleyen miRNA'ların meme kanseri hastalarında tedaviye cevabı belirleyebileceği, nüks, metastaz ve sağkalım yönünde klinisyene yol gösterebileceği kanatindeyiz.

Kök hücre özelliğini düzenleyen genlere ait miRNA'ların tedavi ile değişen oranları tedaviye cevap ile de orantılı olacağını düşünmekteyiz. Bu miRNA'ların tedaviye cevabı ve prognozu tahmin etmede kullanılabileceğini, dolayısıyla miRNA'ların prediktif ve prognostik birer belirteç olabileceğine inanıyoruz. Ayrıca son yıllarda kanser tedavisinde miRNA'ları inhibe eden veya taklit eden moleküllerin tedavide kullanılabilirliğini araştıran yayınlar artmaktadır. Bu nedenle çalışmamız sonucunda anlamlı verilere ulaştığımızda, bu hastaların tedavisi için yeni bir seçeneğin de kapısı aralanmış olacaktır.

3-Araştırma amacı (Objectives)

- Meme kanseri hastalarında meme kanseri kök hücre özelliğini belirleyen genlerden ALDH1A1 ve CD133 geni ile bu genleri düzenleyen bazı miRNA'ların (miR134 ve miR216b) tedavi öncesi biyopsi materyallerindeki ve neoadjuvan kemoterapi sonrası operasyon materyallerindeki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması;
- Bu miRNA düzeylerinin tedavi sonrası değerlendirilen patolojik cevapla korelasyonunun araştırılması
- Bu miRNAların meme kanseri hastalarında tedaviye cevabı tahminde prediktif ve prognostik bir araç olarak kullanılıp kullanılamayacağının araştırılması
- Bu miRNA düzeylerinin hastaların nüks, metastaz ve sağkalım oranları ile karşılaştırılarak hastalığın prognozunu belirlemede bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağının araştırılması

4-Hipotez (Hypothesis)

Kanser kök hücre genlerini regüle eden mirRNA216b ve miR134 neoadjuvan kemoterapi alan meme kanseri hastalarında hastaların tedaviye cevabını ve prognozu tahmin etmede yararlı birer belirteçtirler.

5-Araştırma türü/tasarım (Study Design)

Retrospektif, analitik, kesitsel

6- Araştırma yeri (Study Setting/ Location)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuarı

7- Araştırmaya katılanlar/denekler (Study Population)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi 'nde biyopsi ile meme kanseri tanısı konarak neoadjuvan kemoterapi alan ve sonra ameliyat edilen ve ameliyat materyali patoloji kliniğimizde değerlendirilen hastalar çalışma grubunu oluşturmaktadır. Çalışmamızda hastalar tedavi öncesi ve tedavi sonrası olmak üzere önce iki gruba ayrılarak belirlenen parametreler açısından karşılaştırma yapılacaktır. Ayrıca tedavi sonrası grup da tedaviye gösterdiği cevaba göre parsiyel cevap ve komplet cevap olmak üzere iki ayrı altgrup halinde değerlendirilecektir. Bu altgruplardan elde edilen veriler bu hastaların tedavi öncesi verileri ile karşılaştırılacaktır.

Çalışmaya sadece invaziv duktal karsinom tanısı alan hastalar dahil edilecek, diğer tür meme kanseri hastaları çalışmaya alınmayacaktır.

Tedavi öncesi biyopsi materyali yetersiz bulunan olgular çalışmadan çıkarılacaktır.

Hastaların yaş dağılımının belli bir aralıkta olması hedeflenmekte olup çok genç ve çok ileri yaşdaki hastalar çalışmaya dahil edilmeyecektir.

8- Araştırmanın birincil ve ikincil sonuç değişkenleri (Primary and Secondary Outcome)

Birincil değişkenler: tedavi öncesi ve tedavi sonrası gen ve miRNA düzeyleri, tedaviye kısmi veya komplet patolojik cevap,

İkincil değişkenler; Tümör boyutu, desmoplastik-fibrotik cevap, metastaz, rekürrens, sağkalım

9- Araştırma Süreçleri (Study procedures)

Araştırmada önce neoadjuvan kemoterapi alan invaziv duktal karsinom tipi meme kanseri bulunan hasta grubu belirlenecektir. Bu hastalardan ilk biyopsisi bulunan ve tedavi sonrası ameliyat materyali bulunanlar çalışmaya dahil edilecektir. Hastaların ilk biyopsi örnekleri ve ameliyat materyalleri histopatolojik olarak yeniden değerlendirilecek ve tümör derecesi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, hormon reseptör durumu, cerbB2 ekspresyonu, tedaviye kısmi veya komplet cevabı, nüks, metastaz varlığı, sağkalım gibi parametreler not edilecektir. Tedavi sonrası gruplar tedaviye verdikleri patolojik cevaba göre kategorize edilecektir. Daha sonra H&E kesitleri incelendikten sonra uygunluğuna karar verilen parafin bloklar belirlenecektir. Parafin bloklardan uygun yöntemlerle RNA izolasyonu gerçekleştirilecek, daha sonra cDNA elde edilerek değerlendireceğimiz genler için hazırlanan primerler kullanılarak PCR çalışması yapılacaktır. Yine elde edilen genetik materyalden belirlediğimiz miRNAlar için özel olarak tasarlanmış primerler aracılığıyla miRNA ekspresyon düzeyleri belirlenecektir. Gen ve miRNA düzeylerindeki anlamlı görülen değişiklikler not edilecektir. Sonuçlar tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalarda patolojik cevapla karşılaştırılacaktır. Ayrıca gen ve miRNA düzeyleri belirlenen diğer parametrelerle de karşılaştırılacaktır. Gerekli istatistikler yapılarak sonuçlar değerlendirilecektir.

10-Örnek büyüklüğü ve istatistiksel güç (Sample size and statistical power)

Altgruplarda 20'şer kişi olmak üzere örnek büyüklüğü 40 hasta olarak belirlendi.
İstatistiksel güç %90 olarak hedeflendi.

11- İstatistiksel yöntemler (Statistical methods)

Elde edilen sonuçlar SPSS progromı ile değerlendirilecektir. Karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis test, Ki-kare, ManWithney U test ve Sperman korrelasyonu testi uygun olduğu şekilde kullanılacaktır. Post hoc Tukey test ile power analizi yapılacaktır.
12-Etik Öngörü (Ethical Considerations) Bu araştırmanın yürütülmesi sırasında yapılacak uygulamalar Helsinki deklarasyonu, İyi Klinik Uygulama (Good Clinical Practice) ilkelerine uygun olarak araştırma etik kuralları ile çelişmeyecek şekilde yapılacaktır.
13- Anahtar kelimeler (Key words) Meme kanseri, kanser kök hücresi, neoadjuvan kemoterapi, mirRNA216b, miR134

Kontrol edilmiştir ve uygundur.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba Dilay KÖKENEK ÜNAL

EK-2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Neoadjuvan Kemoterapi Alan Meme Kanseri Hastalarında Mirrna216b ve Mir134'ün Ekspresyonlarının Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ DR.ABDURRAHMAN YURTASLAN ANKARA ONKOLOJİ SAĞLIK UYGULAMA ve ARAŞTIRMA MERKEZİ ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	T.C Sağlık Bakanlığı İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman YURTASLAN Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mehmet Akif Ersoy Mahallesi 13. Cadde No:56 Yenimahalle-06200/ANKARA
	TELEFON	0 312 336 96 81
	FAKS	0 312 336 96 81
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Olcay KANDEMİR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Patoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji SUAM			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
		Diğer ise belirtiniz			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Lütfi DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Neoadjuvan Kemoterapi Alan Meme Kanseri Hastalarında Mirrna216b ve Mir134'ün Ekspresyonlarının Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 2019-05/257**	**Tarih:15.05.2019**
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Doç. Dr. Lütfi DOĞAN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
Doç. Dr. Lütfi DOĞAN	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Olcay KANDEMİR	Patoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Necati ALKIŞ	Tıbbi Onkoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mustafa ARSLAN	Fizyoloji/Anestezi	Gazi Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Prof. Dr. Nur AKSAKAL	Halk Sağlığı	Gazi Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS	Farmakoloji	Başkent Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Aşkın Esen HASTÜRK	Beyin Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Neriman SARI	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Eşref Oğuz GÜVEN	Üroloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Doç. Dr. Merih KIZIL ÇAKAR	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Doç. Dr. Nazan ÇİLEDAĞ GÖKBAYRAK	Radyoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Op. Dr. Hakan BULAK	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Uz. Dr. Özlem ŞEN	Anestezi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Av. Arzu BATUR	Avukat	Ankara İl Sağlık Md.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Fiz. Müh. Dinçer YEĞEN	Fiz. Mühendisi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Lütfi DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.