

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MEME KANSERİ OLGULARINDA CD44⁺/CD24⁻ KANSER KÖK
HÜCRE DAĞILIMI VE PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ

Dr Eylem YETİMOĞLU

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof Dr Kazım UYGUN
Anabilim Dalı Başkanı: Prof.Dr.Ahmet YILMAZ

Etik Proje No: 2009/112

Karar No: İAEK 13/18

2011

Bu tez 2007/70 no'lu proje ile KOU Araştırma Fonu tarafından
desteklenmiştir.

Tezım süresince benden yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam, tez danışmanım Prof Dr Kazım UYGUN'a,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof Dr Ahmet YILMAZ, Prof Dr İtir YEĞENAĞA, Prof Dr Saadettin HÜLAGÜ, Prof Dr Berrin ÇETİNARSLAN ARSLAN, Prof Dr Ömer ŞENTÜRK, Prof Dr Betül KALENDER, Doç Dr Abdullah HACIHANEFİOĞLU, Prof Dr Zeynep CANTÜRK, Prof Dr Ayşe ERGÜNEY ÇEFLE, Doç Dr İlhan TARKUN, Doç Dr Altay ÇELEBİ, Doç Dr Erkan DERVİŞOĞLU, Yrd Doç Elif BİRTAŞ ATEŞOĞLU, Yrd Doç Pınar TARKUN'a,

Başta Prof Dr Erdal KARAÖZ ve Doç Dr Gülçin Gacar olmak üzere tüm KÖGEM laboratuvar çalışanlarına, Prof Dr Zafer Cantürk ve Genel Cerrahi asistanlarına,

Tezimin yazımında bana yardımcı olan gönüllerimizin ablası Uz Dr Ayten YAZICI ve arkadaşım Uz Dr Mehmet TUNCAY'a

Burada geçirdiğim süre zarfında benden sevgi ve yardımlarını esirgemeyen tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma

ve

Her zaman yanımda olan, bana sevgileri ile güç veren sevgili aileme

Teşekkür Ederim

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<i>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</i>	1
<i>ŞEKİLLER DİZİNİN</i>	2
<i>TABLOLAR DİZİNİ</i>	3
1. AMAÇ ve KAPSAM	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. MEME KANSERİ	6
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ	6
2.1.2. ETİYOLOJİ	7
2.1.2.1. RİSK FAKTÖRLERİ	7
2.1.3. YÜKSEK RİSKLİ HASTALARIN TAKİBİ	14
2.1.4. PROGNOTİK VE PREDİKTİF FAKTÖRLER	18
2.1.7. HİSTOLOJİK BULGULAR	23
2.1.8. EVRELEME	23
2.2. MEME EPİTELYAL KÖK HÜCRESİ	26
2.2.1. MEME EPİTEL KÖK HÜCRELERİNİN TANIMLANMASI	30
2.2.2. KANSER KÖK HÜCRESİ	32
2.2.2.1. Kanser Kök Hücrelerinin Gelişimi	34
2.2.2.2. Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Tanımlanması	34
2.2.4. MEME KANSERİ İLAÇ VE RADYOTERAPİ	41
DİRENCİNDE KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ROLÜ	
2.2.5. MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ VE KANSER	44
İNVAZYONU	
2.2.6. KANSER KÖK HÜCRESİ VE YENİ TEDAVİ SEÇENEKLERİ	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
7. ÖZET	58

8. ABSTRACT.....	59
9. KAYNAKLAR.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALDH1= Aldehid dehidrogenaz1

ASMA= Alfa düz kas aktin

BCRPs= Meme kanseri direnç proteinleri (Breast cancer-resistant proteins)

CALLA= Common acute lymphoblastic leukemic antigens

CD= Cluster Determinant

CHEK2= Check point kinaz

CK= Sitokeratin

DCIS= Duktal karsinoma in situ

DLLC= Farklılaşmış (diferansiye) büyük soluk hücreler

ER= Östrojen Reseptörü

ESA= Epitel spesifik antijen

FISH= Fluoresence in situ hibridization

HER2= İnsan (human) epitalyal büyüme faktör

KKH= Kanser Kök hücreleri

LDC= Büyük koyu hücreler

M= Metastaz

MRI= Manyetik rezonans görüntüleme

MUC-1= Siyalomucin-1

N= Lenf nodu sayısı

NASBP= National surgical adjuvant breast and bowel project

PR= Progesteron reseptörü

Sca1= Stem cell antigen-1

SERMs= Selektif östrojen reseptör modülatörleri

SLC= Küçük soluk hücre

SP= Side-population

T= Tümör boyutu

TDLD= Terminal kanal lobuler ünite

ULLC= Undiferansiye büyük soluk hücreler

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sekil altı yazısı</u>	<u>Sayfa No</u>
1-	HER2 reseptörünün yapısı	20
2-	HER2 aşırı ekspresyonu ve amplifikasyonu	21
3-	HER2 immün boyama	22
4-	Meme epitelinde dönemsel değişimler	27
5-	Meme epitel hücrelerinin yenilenmesi	29
6-	Kanser gelişme modelleri	34
7-	Kanser kök hücrelerinin tanımlanması	37
8-	Al-Hajj ve ark'larının çalışma metodu	40
9-	Hedef olarak kök hücre	42
10-	İlaç direnci gelişme modelleri	43

TABLO DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Tablo üstü yazısı</u>	<u>Sayfa No</u>
1-	Meme kanseri için risk faktörleri	11
2-	BRCA1 ve BRCA2 mutasyonunu öngören durumlar	13
3-	Amerikan Kanser Cemiyetinin MRI kullanma kılavuzu	16
4-	Malign Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması	23
5-	Primer tümör boyutuna göre sınıflama	24
6-	Bölgesel lenf nodu tutulumuna göre sınıflandırma	25
7-	Uzak organ metastazına göre sınıflama	25
8-	TNM evrelemesi	26
9-	Kanser kök hücrelerinin izolasyonu için kullanılan yüzey belirteçleri	39
10-	Hasta özellikleri	48
11-	Tümörlerin yüzey belirteç dağılımları	48
12-	Prognostik faktörlere göre CD44 ⁺ /CD24 ⁻ hücre dağılımı	49
13-	Prognostik faktörlere göre CD18 ⁺ hücre dağılımı	50
14-	Prognostik faktörlere göre MUC1 hücre dağılımı	51

1. AMAÇ VE KAPSAM

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda görülen malign hastalıkların yaklaşık %30'unu, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %16'sını oluşturmaktadır (1). Bir kadının yaşam boyu meme kanseri geliştirme riski %12 ve meme kanserinden ölüm riski %5'dir. Meme kanserinin insidansı giderek artmaktadır; ancak son 15 yıldır birçok endüstrileşmiş ülkede mortalite stabil kalmakta ya da azalmaktadır. Mamografi ile yapılan taramalarla hastalığın erken saptanıp tedavi edilmesi, adjuvan kemoterapi ve endokrin tedavilerin gelişmesi mortalite oranlarında azalmaya neden olmuştur. Tanı ve tedavideki bu olumlu gelişmelere rağmen meme kanseri kadınlarda mortalite ve morbiditenin en sık nedenidir. Bunun sebebi meme kanserinin metastaza olan eğilimidir. Tümör metastaz yapmadan önce saptanıp çıkarıldığında prognoz iyidir ve hastalıksız sağ kalım beklentisi yüksektir. Ancak kanser hücreleri primer tümörden ayrılıp yayılmaya başlamışsa tedavi sistemik sitotoksik ilaçlarla sağlanır; bu durumda birçok vakada uzun süreli başarı şansı yoktur (2).

Meme kanserinin farklı morfolojik karakterleri, moleküler profili ve klinik davranışı nedeniyle klinik iyice karmaşık hale gelmektedir. Meme kanserinin Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanan on sekiz farklı histolojik tipi vardır ve bu histolojik tipler farklı klinik tabloları ortaya koymaktadır. Ayrıca morfolojik yapılarına ek olarak meme kanserleri proliferatif potansiyelleri, hormon reseptör durumu ve HER2 (insan epitelyal büyüme faktörü) aşırı ekspresyonu gibi biyolojik özelliklerine göre de farklı gruplara ayrılmaktadır. Histolojik tiplerdeki farklılıkların yanında tümör içinde bulunan hücrelerde fenotipik ve genotipik olarak da heterojenite vardır (3).

Böyle heterojen bir hastalığın altında yatan moleküler sebepleri anlamak meme kanseri gelişim mekanizmalarının da anlaşılmasını sağlayacaktır. Meme kanseri gelişim basamaklarının anlaşılması hastalığın etkili tedavisini ve metastazların önlenmesini sağlayacaktır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda birçok hipotez ortaya atılmıştır. Bunlardan biri kanser kök hücre hipotezidir; bu hipotez meme kanserinin, tümör oluşturma kapasitesine sahip küçük bir hücre grubundan kaynaklandığını savunmaktadır. Bu küçük hücre grubu, normal kök hücreye benzer

özellikleri nedeniyle kanser kök hücresi olarak adlandırılır. Deneysel kanıtlar kanser kök hücrelerinin kanser oluşumundan, tümör invazyonundan, metastazından ve çeşitli tedavi formlarına direnç gelişimden sorumlu olduklarını desteklemektedir (4). Bu kanser kök hücrelerini tanımlamak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (5,6). Bunlardan biri kanser kök hücresi olarak adlandırılan hücrelerin yüzey belirteçlerine göre tanımlanmasıdır. Meme kanseri kök hücresi fenotipi $CD44^+/CD24^-/Lin^-$ yüzey belirteçleriyle tanımlanmaktadır (7). Bu çalışmada; $CD44^+/CD24^-/Lin^-$ fenotipe sahip hücrelerin immun defisit farelerde tümör oluşturabildiklerini, bu fenotipe sahip olmayanların tümör oluşturamadıklarını gösterdiler. Aynı çalışmada dokuz tümör örneği kullanılmış, bunlardan bir tanesi sadece primer tümör dokusundan alınmış ve diğerleri metastatik dokudan alınmıştır (7).

Bu çalışmada amacımız kanser oluşumunda suçlanan $CD44^+/CD24^-/Lin^-$ fenotipe sahip hücrelerin primer meme tümöründeki dağılımını ve bu dağılım oranlarının prognostik faktörlerle olan ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda görülen malign hastalıkların yaklaşık %30'unu, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %16'sını oluşturur (1,8). Bir kadının yaşam boyu meme kanseri geliştirme riski %12 ve meme kanserinden ölüm riski %5'dir. Meme kanserinin insidansı giderek artmaktadır; ancak son 15 yıldır birçok endüstrileşmiş ülkede mortalite stabil kalmakta ya da azalmaktadır. Mamografi taramalarıyla hastalığın erken saptanıp tedavi edilmesi, adjuvan kemoterapi ve endokrin tedavilerin gelişmesi mortalite oranlarında azalmaya neden olmuştur. Tanı ve tedavideki bu olumlu gelişmelere rağmen meme kanseri kadınlarda mortalite ve morbiditenin en sık nedenidir. Bunun sebebi meme kanserinin metastaza olan eğilimidir. Tümör metastaz yapmadan önce saptanıp çıkarıldığında prognoz iyidir ve hastalısız sağ kalım beklentisi yüksektir. Ancak kanser hücreleri primer tümörden ayrılıp yayılmaya başlamışsa tedavi sistemik sitotoksik ilaçlarla sağlanır ve bu durumda birçok vakada uzun süreli başarı şansı yoktur (2,9).

2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Yıllık insidansı yaşla beraber artmaktadır. Yirmi beş yaşında insidansı yüz binde beş iken, yetmiş beş yaşında yüz binde iki yüzdür Tüm meme kanserlerinin %1'den azı erkeklerde görülür (8).

Meme kanserinin sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Yıllık insidans Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 184.000 olarak bildirilmektedir (10). Dünya Sağlık Örgütü geliştirmekte olan ülkeler için yıllık kanser insidans hızını yüz binde yüz iki olarak tahmin etmektedir. Bu oran dikkate alındığında ülkemizde her yıl 50-60 bin yeni kanser olgusunun görülmesi beklenmektedir. Sağlık Bakanlığının 1995 yılı verilerine göre kadınlarda görülen kanserlerin %23.5'ini meme kanserleri oluşturmaktadır ve

yıllık meme kanseri görülme sıklığı %12.7 olarak bildirilmektedir. Başka bir kaynağa göre ülkemizde her dört kadından birinde meme kanseri gelişmektedir (8). En sık 45-59 yaş arasında görülmektedir ve meme kanserlerinin %93'ü primer, %4.1'i metastatik ve %1.2'si de in-situ kanserdi (11).

2.1.2. ETİYOLOJİ

Hücresele düzeyde bir dizi moleküler değişiklik sonucu immortal özellikteki meme epitel hücrelerinin aşırı büyümesi ile meme kanseri gelişmektedir. Meme kanseri gelişimi ile ilişkili birçok risk faktörü tanımlanmıştır (11).

2.1.2.1. RİSK FAKTÖRLERİ

Epidemiyolojik çalışmalar, meme kanseri gelişmesine yol açan birçok risk faktörü tanımlamıştır (Tablo 1). Bu risk faktörlerinin çoğu, meme kanseri risk skorlamalarında da kullanılmaktadır. Birçok risk faktörünün ortak paydası endojen östrojene maruziyet süresi ve seviyesidir. Meme kanseri ile ilişkili risk faktörleri şöyle sıralanabilir;

- A -Yaş ve cinsiyet
- B- Üreme ve hormonal faktörler
- C- Aile öyküsü ve genetik faktörler
- D- İyi huylu meme hastalıkları
- E- Kişisel meme kanseri öyküsü
- F- Yaşam tarzı ve diyet
- G- Irk ve etnisite, sosyo-ekonomik durum ve yaşam tarzı
- H- Meme yoğunluğu
- İ- İyonize radyasyona maruziyet
- J- Çevresel faktörler

Yaş ve cinsiyet: Yaş ve cinsiyet, risk faktörleri arasındaki en önemli risk faktörüdür. Meme kanseri kadınlarda yüz kat daha fazla ortaya çıkmaktadır. Amerika Birleşik

Devletleri'nde 2010 yılında 207.000 invaziv meme kanseri tanısı alacak kadına karşılık erkeklerde 2000 vaka olacağı tahmin edilmektedir (12).

Meme kanseri insidansı 45-50 yaşından sonra hızla artmaktadır (13). Bu durum, bu yaş grubunda görülen menopoz bağlı hormonal değişikliklerden kaynaklanabilir (14). Ancak kız kardeşinde ve annesinde meme kanseri olanlarda meme kanseri daha erken yaşta görülmekte, kanser yaşı 40 yaş civarına inmektedir (15,16).

Üreme ve Hormonal faktörler: Uzun süreli yüksek düzeyde endojen östrojene maruz kalmak meme kanseri riskini artırmaktadır. Östrojen alt tiplerinin üretimi menarş, gebelik ve premenopoz dönemlerinde yumurtalıktan sağlanır. Menopoz sonrasında östrojen kaynağı adrenal bezden üretilen dehidroepiandrosterondur ve periferik yağ dokusunda östrodiol ve östron olarak dönüştürülür. Meme kanseri ile ilişkili önemli faktörler menarş yaşı, ilk doğum yapılan yaş, menopoz yaşı, doğum sayısı ve emzirmedir (1,17,18).

Genç yaşta menarş yüksek meme kanseri riski ile ilişkilidir (19,20). Menarş yaşı azaldıkça meme kanseri riski artmaktadır. Bir çalışmada menarş yaşında iki yıl gecikmenin meme kanseri riskinde %10 azalma sağladığı gözlenmiştir (19).

Geç menopoz yaşı meme kanseri riskini artırır (17,20,21). 40 yaşından önce iki taraflı oofektomi yapılanlarda yaşam boyu meme kanseri riski %50 oranında azalmaktadır (22).

Hiç doğum yapmamış kadınların meme kanseri riski doğum yapanlara göre daha fazladır. Gebeliğin koruyucu etkisi doğumdan on yıl sonrasına kadar görülmemektedir (23).

İlk doğumunu genç yaşta yapanlarda meme kanseri geliştirme riski düşüktür (24). Erken doğum yaşının etkisi gebelik sırasında ve sonrasında memede oluşan tam hücrel farklılaşmayla açıklanabilir. Bu tam hücrel farklılaşma memeyi kanser gelişimine karşı korur (25).

Çok sayıda vaka-kontrol ve kohort çalışmaları ile emzirmenin meme kanserine karşı koruyucu etkisi ortaya konulmuştur (26,27).

Obez postmenopozal kadınlar obez olmayanlara göre daha yüksek östrojen seviyesine sahiptir. Obez postmenopozal kadınlar yüksek meme kanseri riskine

sahiptirler (28,29).

Birçok epidemiyolojik çalışma oral kontraseptif kullanımı ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi göstermede yetersiz kalmıştır. Ancak meta-analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı düşük rölatif risk artışı saptanmıştır (30). İki farklı çalışmada doğum kontrol hapı kullanımı kesildiğinde yaşamın ilerleyen dönemlerinde meme kanseri gelişim riskinin arttığı gösterilmiştir (31,32).

Hormon replasman tedavisi ve meme kanseri, özellikle de hormon-reseptör pozitif meme kanseri ile arasındaki ilişki kanıtlara dayalı olarak ortaya konulmuştur (33). Östrojen ile beraber progesteron kullanımı meme kanseri riskini artırır (34,35). Özellikle uzun süreli hormon replasman tedavisi almak riski artırır. Aksine kısa süreli kullanım riski anlamlı olarak arttırmazken mamografi ile tümörün saptanmasını zorlaştırabilir (36).

Aile öyküsü: Yapılan kesitsel çalışmalarda meme kanseri olan kadınların %5-10'nunda anne ve kız kardeşlerinde de meme kanseri olduğu saptanmıştır (37,38). 38 ayrı çalışmanın meta-analizi sonucunda ailesinde meme kanseri öyküsü olanlarda meme kanseri gelişme rölatif riski 2.1 olarak saptanmıştır (39). Bu risk meme kanseri olan akrabanın yaşı ne kadar küçükse o kadar artmaktadır (14,28,39,40). Biyolojik yakınlık ve hasta akraba sayısı arttıkça meme kanseri riski de artmaktadır. Elli yaşın altında over kanseri olan birinci derece akrabada varlığında meme kanseri riski 2 kat artmaktadır. (14,39)

İyi huylu meme hastalıkları: Fibrokistik değişiklikler, soliter papilloma, basit fibroadenom gibi nonproliferatif meme hastalıkları meme kanseri riskini artırmaz. Çok sayıda nonproliferatif meme hastalığının olması meme kanseri riskini arttırabilir (41).

İnvaziv olan ve olmayan meme kanserlerinin en önemli kaynağı proliferatif lezyonlardır. Bu lezyonlarda sitolojik atipi önemlidir. Atipisiz proliferatif lezyonlar (kompleks fibroadenom, ılımlı hiperplazi, sklerozan adenosiz, intraduktal papilloma gibi) meme kanseri riskini (rölatif risk 1.3-2) hafifçe artırır. Atipik lobuler hiperplazi, atipik duktal hiperplazi gibi atipili proliferatif lezyonlarda risk yüksektir (rölatif risk 4-6) ve atipi multifokal olduğunda bu risk 10 kat artar (42).

Kişisel meme kanseri öyküsü: Kişisel invaziv ya da in situ meme kanseri öyküsü karşı memede meme kanseri riskini artırır. İn situ lezyonlarda karşı memede invaziv meme kanseri gelişme riski on yıl için %5'dir (43).

Sosyo-ekonomik durum ve yaşam tarzı: Yüksek sosyo-ekonomik düzeye sahip kadınlar diğerlerine göre daha fazla risklidir. Ancak sosyo-ekonomik durum bağımsız bir risk faktörü gibi görünmemektedir (44).

Düzenli fiziksel egzersiz meme kanserine karşı ılımlı bir koruma sağlar (45,46). Egzersiz ile meme kanseri riskinde azalma kilo kontrolünün sağlanması aracılığıyla olabilir. Bazı çalışmalarda fiziksel aktivite aracılı risk azalması östrojendeki azalmaya bağlanmaktadır (47,48).

Diyet faktörü: Prospektif kohort çalışmaların çoğunda premenopozal meme kanseri ve obezite arasında ters ilişki bulunmuştur. Yedi prospektif kohort çalışmanın analizinde premenopozal vücut kitle indeksi $>31\text{kg/m}^2$ olan kadınlarda, vücut kitle indeksi $<26\text{kg/m}^2$ olanlara göre daha az meme kanseri geliştiği gözlenmiştir (49). Bunun altında yatan biyolojik mekanizmalar açık değildir. Yüksek vücut kitlesi düzensiz ya da uzun menstural siklus ile ilişkilidir. Bu da azalmış meme kanseri riskini açıklayabilir (50). Postmenopozal kilo alımı ve yüksek vücut kitlesi birçok çalışmada artmış meme kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur (49,51).

Yağdan zengin diyetin meme kanseri riski ile ilişkili olup olmadığına dair tartışmalar devam etmektedir. 12 vaka kontrol çalışmanın analizinde yüksek lifden zengin diyetin meme kanserine karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir (52).

Kalifornia Teachers Study Cohort'unda günde iki ve daha fazla kadeh alkol alımının meme kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir (53).

Meme yoğunluğu: Meme dokusunun yoğunluğu toplum içinde farklılıklar gösterir. Sıklıkla kalıtsal olmasına rağmen değiştirilebilir bileşendir (54). Hormon tedavisi meme yoğunluğunu artırırken tamoksifen yoğunluğu azaltır (55). Yüksek meme yoğunluğu östrojen ve progesteron pozitif meme kanseri ile ilişkilidir (56).

Tablo 1: Meme kanseri için risk faktörleri (57)

RİSK FAKTÖRLERİ	TAHMİN EDİLEN RÖLATİF RİSK
<u>1- İleri yaş</u>	>4
<u>2-Aile hikayesi</u>	
-İki ya da daha fazla birinci derece akrabada (anne, kız kardeş)	>5
-Birinci derece akraba (tanı yaşı <50y)	>2
-Elli yaş altında over kanseri tanısı almış birinci derece akraba	>2
<u>3-Kişisel hikaye</u>	
-Kişisel hikaye	3-4
-BRCA1/ BRCA2 mutasyonu pozitif	>4
-Atipik hiperplazi gösteren meme biyopsisi	4-5
-LCIS ve DCIS gösteren meme biyopsisi	8-10
<u>4-Üreme öyküsü</u>	
-erken menarş (<12y)	2
-geç yaşta menopoz	1.5-2
-ilk gebelik yaşının geç olması (>30y)	2
-kombine östrojen-progesteron kullanımı	1.5-2
-doğum kontrol hapı kullanımı	1.25
<u>5- Yaşam tarzı</u>	
-erişkin kilo alımı	1.5-2
-sedanter yaşam	1.3-1.5
-alkol kullanımı	1.5

İyonize radyasyona maruziyet: Özellikle de erken yaşta meme kanseri riskini artırır. Bu faktörün incelemesi için atom bombası uygulamaları, tanısal amaçlı X-ray incelemesi yapılanlar ve tedavi amaçlı radyoterapi alanlar gözlenmiştir (58,59). 15 yaşından önce Hodgkin lenfoma için mantle radyoterapi alanlarda belirgin meme kanseri gelişme riski raporlanmıştır (60).

Diğer çevresel faktörler elektromanyetik alana maruziyet ve pestisid maruziyetidir; fakat bu faktörler tartışmalıdır (47,61).

Genetik Faktörler: BRCA1 ve BRCA2 tüm meme kanserlerinin %5-10'undan ve ailesel olanların %15-20'sinden sorumludur. Değişik penetrasyonları vardır ve otozomal dominant geçiş gösterirler (62). PTEN, TP53, MLH1, MLH2 ve STK11 genlerinde nadir de olsa mutasyonlar görülmüştür (63).

BRCA1 17. kromozom, BRCA2 13. kromozom üzerindeki gen mutasyonlarıdır. Kalıtsal meme kanserlerinin çoğundan sorumludur. Bu genlerin DNA bütünlüğünü koruyan ve transkripsiyonel düzenlemede rol oynayan tümör süpresör genler oldukları kabul edilmektedir (62,64).

Mutasyon oranları etnik ve ırksal gruplara göre değişmektedir. BRCA1 mutasyonu, en çok Aşkenaz Yahudi kadınlarında (%8.3) görülürken Asya kökenli Amerikalılarda bu oran %0.5'tir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu olan kadınlarda yaşamları boyunca %50-80 meme kanseri gelişme riskinin olduğu tahmin edilmektedir (57).

Özellikle BRCA1 mutasyonları çoklu meme kanseri olguları olan ailelerin %7'sinde, meme ve yumurtalık kanserli ailelerin %40'ında görülmektedir. BRCA1 mutasyonlu kişilerde yumurtalık kanseri gelişme riski %40'tır. Bu kişiler aynı zamanda prostat ve kolon kanseri için de yüksek risk altındadır. BRCA1 taşıyıcılarında gelişen meme kanseri, yüksek grade'li olma eğilimindedir ve tümör sıklıkla triple negatif ya da bazal-like alt tipindedir (57,65).

BRCA2 mutasyonları, meme ve yumurtalık kanseri için yüksek riskli ailelerin %10-20'sinde ve erken yaşta başlayan meme kanserli hastaların %2,7'sinde gösterilmiştir. BRCA2 mutasyonlu kişilerde yaşam boyu yumurtalık kanseri gelişme riski yaklaşık %10'dur. BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında gelişen meme kanseri yüksek grade'li, lüminal tipte (östrojen reseptörü=ER⁺/progesteron reseptörü=PR⁺/HER2⁻) olma eğilimindedir. BRCA2 mutasyonu erkek meme kanseri gelişimi için de risk faktörüdür. BRCA2 mutasyonu ile ilişkili maligniteler içinde prostat, pankreas, fallopian tüp, mesane, bazal hücreli karsinom ve non-hodgkin lenfoma da vardır (57,65).

BRCA1 ya da BRCA2 mutasyonunun varlığı aile öyküsü üzerinden

öngörülebilir. Preventive Services Task force tarafından 2005 yılında bildirilen özellikler tablo 2’de gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları Aşkenaz Yahudileri sık görülmektedir. Bu kılavuzlar özellikle hiç meme kanseri geliştirmemiş kişilerde önemlidir. Yeni tanı konmuş meme kanseri olgusu tanı sırasında 40 yaş ve altında ise, iki taraflı meme kanseri varsa, Aşkenaz kökenli ise ya da BRCA1 fenotipik özellikte kanserlere sahip ise, özellikle de az sayıda kadın yakını varsa genetik danışmanlığa yönlendirilmelidir (66).

Tablo 2: BRCA1 ve BRCA2 mutasyonunu öngören durumlar (57)

BRCA1 VE BRCA2 MUTASYONUNU ÖNGÖREN FAKTÖRLER**AŞKENAZ YAHUDİSİ OLMAYAN KADINLARDA**

1-Ailenin aynı tarafından iki birinci derece akrabada meme kanseri ve birinde tanı yaşı 50 ve altı olacak

2-Herhangi bir yaşta tanı almış üç ya da daha fazla birinci ya da ikinci derece akrabada meme kanseri

3-Birinci ya da ikinci derece akrabalar arasında meme ve yumurtalık kanseri olması

4-Birinci derece akrabada iki taraflı meme kanseri

5-Erkek yakınında meme kanseri olması

6-İki ya da daha fazla yakınında over kanseri olması

Li-Fraumeni sendromu, TP53 mutasyonundan kaynaklanır. Bu sendrom sarkom, meme ve beyin tümörü, lösemi, laringeal ve akciğer kanserinin de dahil olduğu birçok kanserle ilişkilidir. Kanser eğilimi otozomal dominant geçiş gösterir ve yaşam boyu meme kanseri geliştirme riski %90 olarak bildirilmektedir. Li-Fraumeni sendromu ailesel meme kanseri olgularının %1’inden sorumludur. İki taraflı meme kanseri hastalarının %25’inde görülür (67).

Cowden hastalığı PTEN mutasyonundan kaynaklanan nadir genetik bir sendromdur. İntestinal hamartom, kutanöz lezyonlar ve tiroid kanseri ile ilişkilidir.

Bu hastalıkta meme kanseri prevalansı yaklaşık %30'dur. İyi huylu meme hastalıkları sık görülmektedir (67).

Diğer genetik mutasyonlar da meme kanseri riski ile ilişkilidir, ancak etkinlikleri BRCA1 ve BRCA2'ye göre daha azdır. TP53 ve PTEN mutasyonlarının ikisi de %1'in altında görülmektedir. Checkpoint kinaz 2 (CHEK2) genine özgü mutasyon, 60 yaşın altında tanı konulan üç ya da daha fazla meme kanseri vakası bulunan ailelerin %11,4'ünde bulunmaktadır (63). Fakat rastgele seçilmiş 10,860 meme kanserinin dahil edildiği bir çalışmada CHEK2 mutasyonu %1,9 vakada tanımlanmıştır; kontrol grubunda bu oran %0.7 bulunmuştur. Düşük etkinliği nedeniyle CHEK2 mutasyonun test edilmesinin ve genetik danışmanlığının günümüz için erken olduğu belirtilmektedir (57).

2.1.3. YÜKSEK RİSKLİ HASTALARIN TAKİBİ

Meme kanseri için yüksek risk taşıyan kadınlarda riski azaltmak için olası stratejiler; yakın takip, selektif östrojen reseptör modulatorleri (SERMs) ile medikal önleme, profilaktik cerrahidir. Aylık kişisel meme muayenesi, yıllık mamografi taraması, yılda bir ya da iki kez klinik meme muayenesinin dahil olduğu takiplerin yüksek riskli kadınlarda erken tanıya katkısı olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP P1) önleme çalışmasının plasebo kolunda takip başarısız bulunmuş ve meme kanseri gelişen hastaların %29'unda tanı sırasında aksiller lenf nodu metastazı olduğu bildirilmiştir (68). Artan kanıtlar BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu bilinen veya şüphelenilen yüksek riskli kadınlarda, manyetik rezonans görüntülemenin (MRI) geleneksel takip stratejileri ile kıyaslandığında meme kanserinin erken tespit edilmesinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Kuhl ve ark'larının kohortunda, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu bilinen ya da şüphelenilen asemptomatik 529 kadında mamografi, ultrason ve MRI ile taramanın sonuçları karşılaştırılmıştır. Ortalama 5.3 yıllık takip sonrasında 43 meme kanseri vakası tanımlanmıştır. Duyarlılık sırasıyla mamografi, ultrason, MRI için %33, %40, %91 olarak bildirilmektedir (69). Benzer bir çalışmada Warner ve ark'ları 236 BRCA taşıyıcısında kişisel meme muayenesini de değerlendirmiş ve çalışma boyunca 22

meme kanserin geliştiğini, bunların 17'sinin MRI, 8'inin mamografi, 7'sinin ultrason ve 2'sinin kişisel muayene ile tespit edildiği bildirmiştir (70). MRI takibinin BRCA mutasyonlularda ölüm oranlarında belirgin azalma ortaya koymamasına rağmen bazı çalışmalarda MRI ile tespit edilen kanserlerin boyutlarının daha küçük olduğu ve koltuk altı lenf nodu tutulumunun daha az olduğu gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise MRI ile taramanın atipik hiperplazi ve lobuler in situ karsinomda faydalı olduğu gösterilememiştir (71).

Amerikan Kanser Cemiyeti tarafından 2007'de düzenlenen uzman panel toplantısında MRI görüntülemesi için bir kılavuz geliştirildi. Amerikan Kanser Cemiyeti, meme kanseri gelişme riski %15'in altında olanların takibinde MRI kullanımını önermemektedir. Amerikan Kanser Cemiyetinin, takipte MRI kullanma kılavuzu tablo 3'te gösterilmiştir (57).

Medikal tedavi ile kanseri önleme, yakıntakibe alternatif bir stratejidir. Tamoksifen ve Raloksifen ER-pozitif meme kanseri insidansını azaltan iki SERMs'dir. Dört prospektif randomize çalışmada tamoksifenin meme kanseri insidansındaki etkileri incelenmiştir. Çalışmalarda seçilen hasta gruplarına bağlı olarak farklı sonuçlar alınmış olsa da çalışmaların tümü değerlendirildiğinde tamoksifenin meme kanseri insidansını %38 ve ER-pozitif meme kanseri insidansını %48 azalttığı görülmüştür. Çalışmaların hiçbirinde ER-negatif kanser insidansında etki görülmemiştir. Tamoksifen kullanırken meme kanseri gelişenlerde plasebo ile karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu ya da tümör boyutu açısından farklılık olmadığı belirtilmiştir (57).

NSABP P1 çalışmasında tamoksifenin meme kanseri insidansını %49 azalttığı görülmüştür; bu çalışmanın plasebo kolunda her 1000 kadının 43,4'ünde, tamoksifen kolunda ise her 1000 kadının 22'sinde meme kanseri geliştiği belirtilmiştir (68). Tamoksifenin olumlu etkisi hem invaziv hem de noninvaziv meme kanserlerinde gözlenmiş olup tüm yaş gruplarında da yararı gösterilmiştir. Atipik hiperplazi nedeniyle riski olan hastalarda belirgin yarar gözlenmiş ve meme kanseri insidansının %84 azaldığı bildirilmiştir. BRCA taşıyıcılarında ise tamoksifen etkilerinin farklı olduğu belirtilmektedir. NSABP P1 çalışmasında meme kanseri gelişen 288 kadının 19'unda BRCA1 ya da BRCA2 mutasyonu saptanmıştır. Tamoksifen kullanan sekiz BRCA1 taşıyıcısında ilacın yararı gösterilemezken

BRCA2 taşıyıcılarında çok belirgin olmasa da ilacın yararı gösterilmiştir. Bu bulgular BRCA2 taşıyıcılarında BRCA1 taşıyıcılarına nazaran daha sık ER-pozitif kanser geliştiği gözlemi ile uyumlu görünmektedir (72). Tamoksifen kullanan BRCA taşıyıcılarında yapılan geriye dönük vaka kontrol çalışmasında, Naro ve ark'ları karsinom tedavisinde tamoksifen kullananlarda diğer memede kanser gelişme insidansının %50 azaldığını saptamıştır. Bu yarar hem BRCA1 hem de BRCA2 taşıyıcılarında görülmektedir. Bu bulgular tamoksifen etkinliğinin belirleyicisinin ER ekspresyonu olduğunu göstermektedir (73).

Tablo 3: Amerikan Kanser Cemiyetinin MRI kullanma kılavuzu (57)

MRI kullanma kılavuzu

KANITA DAYALI YILLIK MRI ÖNERİLENLER

- BRCA mutasyonu
- BRCA taşıyıcısı birinci derece akrabası olan test edilmemişler
- Yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %20-25 olanlar

UZMAN GÖRÜŞLERİNE DAYALI OLARAK YILLIK MRI TAKİBİ ÖNERİLENLER

- 10 ve 30 yaşları arasında göğüsden radyasyona maruziyet
- Li-Fraumeni sendromu ve birinci derece akrabalarda Cowden sendromu

MRI TAKİP İÇİN YETERLİ KANIT OLMAYAN YA DA ÖNERİLMİYEN DURUMLAR

- Yaşam boyu kanser beklentisinin %15-20 olanlar
 - Atipik hiperplazi
 - Mammografide heterojen ya da aşırı derecede yoğun meme
 - DCIS içeren kişisel meme kanseri öyküsü
- DCIS: Ductal karsinom in situ
-

Raloksifen osteoporozun önleminde ve tedavisinde kullanılan diğer bir SERMs'tir. Osteoporotik kadınlarda raloksifen ile yapılan çalışmalarda ikincil son noktası olarak meme kanseri insidansının azaldığı görülmüştür. Tamoksifende

olduğu gibi raloksifen de ER-pozitif meme kanseri insidansını azaltmaktadır; ancak ER–negatif kanserde etkisi yoktur. STAR çalışmasında, meme kanseri gelişme riski artmış olan 19.747 postmenopozal kadında tamoksifen ile raloksifenin etkileri ve yan etkileri karşılaştırılmıştır. Ortalama 3.9 yıllık takip sonrasında, invaziv meme kanseri gelişimi değerlendirildiğinde iki grup arasında fark saptanmamıştır. Tamoksifen kullananlarla kıyaslandığında raloksifen kolunda 6. yılda noninvaziv meme kanserinin daha belirgin olduğu görülmüştür. Yan etkiler açısından raloksifenin daha tercih edilebilir olduğu belirtilmektedir. Çünkü raloksifen kolunda endometrial hiperplazide %84 azalma saptanmış ve tamoksifen ile kıyaslandığında histerektomi sayısında belirgin azalma olduğu gözlenmiştir. Endometrium kanser riski raloksifen grubunda düşükken, istatistiksel olarak iki grup arasında belirgin fark saptanmamıştır. Tromboembolik olaylar ve katarakt gelişimi raloksifen grubunda daha az görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre postmenopozal yüksek riskli kadınlarda raloksifen medikal önlemede tamoksifen tedavisine alternatif olabilir (74). Adjuvan kemoterapi çalışmalarında aromataz inhibitörlerinin diğer memede kanser gelişme riskini tamoksifenden daha fazla azalttığı gözlenmiştir. Kanser insidansındaki azalma ER-pozitif kanserde görülmüştür. Günümüzde ER–negatif kanseri önlemede medikal önleyici ajan yoktur (57).

İki taraflı mastektomi ya da ooferektomi gibi koruyucu cerrahiler meme kanseri riskini azaltmak için uygulanabilecek diğer yöntemlerdir. Bugüne kadar koruyucu iki taraflı mastektominin etkisi değerlendirmek için prospektif randomize bir çalışma yapılmamıştır. İşlemin yararına ait bulgular retrospektif çalışmalar ve vaka kontrol çalışmalarından elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 1960 ve 1993 yılları arasında ailesinde meme kanseri öyküsü olması nedeniyle bilateral koruyucu mastektomi yapılan 639 kadını taranmış ve meme kanseri insidansında %90-94 azalma, meme kanserinden ölümden %81-100 azalma gözlenmiştir (57). Ortalama takibin 3 yıl olduğu 139 BRCA mutasyon taşıyıcısının dahil edildiği prospektif bir çalışmada, Meijers-Heijboer ve ark'ları koruyucu mastektomi yapılanlarda meme kanseri gözlenmediğini bildirmiştir (75). Rebbeck ve ark'ları 483 BRCA mutasyonu taşıyıcısını retrospektif ve prospektif değerlendirmiş ve bu çalışmada koruyucu mastektomi yapılanlarda meme kanseri insidansının %90-95 azaldığını bildirilmiştir (76).

İki taraflı koruyucu mastektomi BRCA mutasyon taşıyıcılarında etkili olmasına rağmen birçok kadın tarafından kabul edilmemektedir. İki taraflı ooferektomi BRCA mutasyon nedeniyle riskli kadınlarda alternatif risk azaltma stratejisidir ve BRCA mutasyonunda over kanseri riskini azaltmada da ek etki sağlar. 241 kadının dahil edildiği vaka kontrol çalışmasında, ortalama yaşı 42 olan 99 kadına iki taraflı ooferektomi uygulanmış ve bu işlemle meme karsinom riskinin azaldığı, over kanseri insidansının ise %96 azaldığı gözlenmiştir (77).

2.1.4. PROGNOTİK VE PREDİKTİF FAKTÖRLER

Amerika Patolog Cemiyeti tarafından meme kanseri için prognostik ve prediktif faktörler tanımlandı (57).

Meme kanseri prognostik faktörleri:

- Koltuk altı lenf nodu durumu
- Tümör boyutu
- Lenfatik ya da vasküler invazyon
- Hasta yaşı
- Histolojik grade
- Histolojik alt tip
- Neoadjuvan tedaviye yanıt
- ER, PR durumu
- HER2/neu amplifikasyonu ya da overekspresyonu

Meme kanserinin prediktif faktörleri:

- ER, PR durumu
- HER2 /neu amplifikasyonu ya da overekspresyonu

1-Lenf nodu durumu

Meme dokusundan gelen sıvılar koltuk altında yer alan lenf nodlarına boşalır. Bu lenf nodlarının kanser tarafından infiltre edilmesi, meme kanserinin diğer organlara yayılma eğilimini gösterir. Yaşam beklentisi direkt tutulan lenf nodu sayısı ile ilişkilidir. Lenf nodu negatif hastalarda on yıllık yaşam beklentisi %70 ve beş

yılda tekrarlama oranı %19'dur. Pozitif lenf nodu sayısı arttıkça relaps olasılığı artmaktadır. 1-3 lenf nodu pozitifliğinde tekrarlama oranı beş yılda %30-40, 4-9 pozitif lenf nodunda tekrarlama oranı %44-70, ondan fazla lenf nodu pozitifliğinde ise tekrarlama riski %72-82'dir (78).

2- Tümör boyutu

Tümörün boyutu, primer cerrahiden sonraki yıllarda tümörün yinelemesinde ve tümöre bağlı ölüm içinde değişmez prognostik faktördür. Tümör çapının >2cm olması tek başına yüksek risk bulgusu olarak kabul edilmektedir (79).

3-Hasta yaşı

Meme kanseri riski yaşla beraber artmakta ve hastalık her yaş grubunda görülebilmektedir. Birçok çalışmada, diğer yaş grupları ile kıyaslandığında 35 yaş ve daha genç olgularda daha yüksek oranda yineleme ve kötü sağkalım gösterilmiştir. St. Galen Konsensus panelinde; lenf nodu negatif olguların, 35 veya daha genç olmaları tek başına risk faktörü kabul edilmektedir (11).

4-Histolojik grade

St. Galen Konsensus panelinde, lenf nodu negatif olgularda grade 2-3 orta risk olarak kabul edilmektedir (11). Ancak histolojik grade'in sağkalım üzerinde etkisi belirgin olarak kanıtlanmamıştır (8).

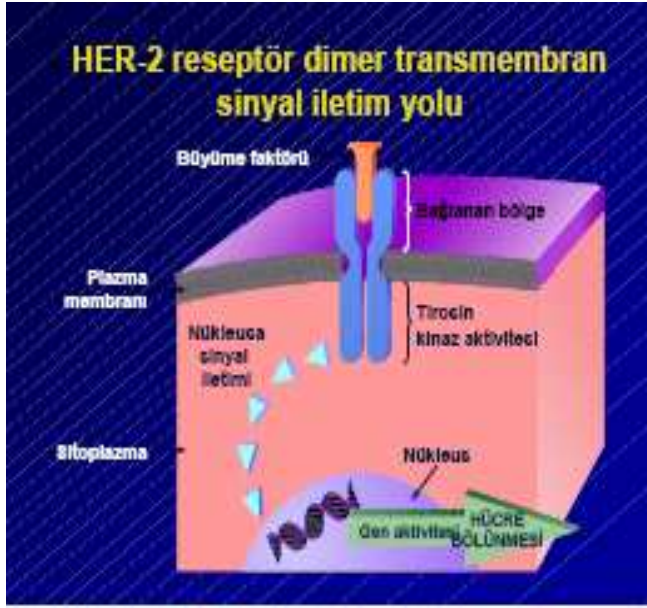
5-Hormon reseptör durumu

Genelde hormon pozitif tümörler iyi seyirlidir ve hormonal tedaviye yanıt verirler. Rutin patolojik tümör incelemelerinde ER ve PR değerlendirmesi yapılmaktadır. İmmunhistokimyasal boyama semikantitatif bir teknik olup gözlemci ve antikör bağımlı bir testtir. (80).

6-HER2/neu

Meme epitel hücreleri çeşitli hormon ve büyüme faktörlerinden etkilenmektedir. Birçok büyüme faktörü hücrel proliferasyonda membran reseptörleri aracılığıyla intrensik tirozin kinaz aktivitesine etki eder. Nükleer

transkript faktörlerini de etkileyerek büyüme kontrolünde yer alan genlerin düzenleyici bölgeleri ile ilişkiye girerler. Hücresel proonkogen olarak adlandırılan ve hücre düzeyine etki eden bu faktörler hücre büyümesinde önemli değişikliklere neden olurlar. Bu büyüme reseptörlerinden birisi HER2'dir. Cerb-2 olarak da adlandırılır (57). Şekil 1'de reseptörün yapısı gösterilmiştir.



Şekil-1: HER2 reseptörünün yapısı

İnvaziv meme kanserlerinin %20'si hem prognostik hem de prediktif etkisi olan HER2'yi overeksprese eder (57). HER2 aşırı ekspresyonu hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin sayıca normalin üstüne çıkmasıdır (Şekil 2). Adjuvan transtuzumab kullanımından önce HER2 overekspresyonu kötü prognoz ve agresif tümör fenotipi ile ilişkiliydi (81). HER2 durumuna göre hastanın hangi kemoterapi ilacından (doksorubicin, transtuzumab, lapatinib) fayda görüleceği öngörülebilir. Yapılan geriye dönük klinik çalışmalarda HER2-pozitif hastaların antrasiklin bazlı tedavi rejimlerinden fayda gördüğü gösterilmiştir. Devam etmekte olan çalışmalardan alınan bilgiler, HER2 pozitif tümörlerin paklitaksel bazlı adjuvan tedavilerden yarar sağlayacağını öne sürmektedir (82).

Yeni bir çift-kör, randomize, faz 3 çalışmada lapatinibin HER2^{-/+} tümörlerdeki etkisi değerlendirilmiştir. HER2 negatif ya da bakılmamış metastatik hastaların paklitaksele lapatinib eklenmesinden fayda görmediği, ancak HER2 pozitif olanlarda

paklitaksel ile lapatinibin birinci basamak tedavide belirgin bir klinik iyileşme sağladığı gösterilmiştir (83).



Şekil-2: HER2 aşırı ekspresyonu ve amplifikasyonu

HER2'yi test etmek için birçok model geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan testlerin %20'si yanlış kullanılmaktadır. Amerika Klinik Onkoloji Cemiyeti ve Amerika Patolog Cemiyeti HER2 testlerinde uyumluluğu sağlamak için bir kılavuz önermiştir. Buna göre meme kanseri dokusu, başlangıçta immunhistokimyasal boyama ile HER2 protein ekspresyonu için değerlendirilmelidir (84). HER2 ekspresyon skor metodu hücre membran boyanma şekline göre belirlenir. Skorlama aşağıda belirtilmiştir (Şekil 3);

+3: pozitif HER2 overekspresyonu; invaziv tümörün %30'undan fazlasında yoğun membran boyanmasının olması

+2: Şüpheli HER2 protein ekspresyonu; tek tip olmayan ya da zayıf yoğunlukta membran boyanması (hücrelerin en az %10 boyanma olacak)

0 yada +1: negatif HER2 protein ekspresyonu

Şüpheli boyanan meme kanseri dokuları HER2 geni amplifikasyon

yöntemlerinden biri kullanılarak yeniden değerlendirilmelidir. HER2 geni amplifikasyonu, HER2 geninin hücre nükleusunda bulunan kopya sayısının artmasıdır. Genelde fluorescence in situ hybridization (FISH) kullanılmaktadır. HER2 durumunu değerlendirmede FISH daha kabul edilebilir bir yöntem olmasına rağmen immunhistokimyasal boyamadan daha pahalı olması kullanımını sınırlamaktadır (84) .



Şekil 3: HER2 immun boyama

7-Diğer faktörler

Erken evre meme kanserlerini değerlendirmek için birçok prognostik ve prediktif faktör vardır; ancak bunlar Amerika’da rutin kullanıma yaygın olarak girmemiştir. Bunlar;

1-Proliferasyon belirteçleri: S-faz fraksiyonu, timidin ya da bromodeoksiüridin ile boyanan hücrelerin yüzdesi Ki-67’nin hücresel ekspresyonu ve mitotik indeksi

2-Plazminojen aktivatör sisteminin ölçümü: Ürokinaz plazminojen aktivatör konsantrasyonu, plazminojen aktivatör inhibitör-1 konsantrasyonu

3-Tümör anjiogenezinin ölçümü

4-İmmunhistokimyasal yöntemlerle kemik iliğinin gizli mikrometastazlarını saptamak (85).

2.1.7. HİSTOLOJİK BULGULAR

Meme kanseri histoloji sınıflaması tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Malign Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması (57)

Histoloji

1-Noninvaziv Karsinomlar

a- İntraduktal (in situ duktal) Karsinom

b-İn Situ Lobuler karsinom

2-İnvaziv Karsinomlar

a-İnvaziv Duktal Karsinom

b-İntraduktal Komponenti Baskın İnvaziv Duktal Karsinom

c-İnvaziv Lobuler Karsinom

d-Müsinöz Karsinom

e-Meduller Karsinom

f-Papillar Karsinom

g-Tubuler Karsinom

h-Adenoid Kistik Karsinom

i-Sekretuar (juvenil) Karsinom

j-Apokrin Karsinom

k-Metaplastik Karsinom

- Squamoz Tip

- İğsi Tip

- Kartilajinöz ve Osseöz Tip

- Miks Tip-Diğerler

3- Memenin Paget Hastalığı

2.1.8. EVRELEME

AJCC evreleme sistemi meme kanserini tümör boyutu (T), lenf nodu durumu (N) ve uzak organ metastaz (M) varlığına göre dört evreye ayırmaktadır (Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7) (86).

Tablo 5: Primer tümör boyutuna göre sınıflama (86)

Tümör boyutu

-Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

-T0: Primer tümöre ait kanıt yok

-Tis: (DCIS) karsinoma in situ

-Tis: (LCIS) karsinoma in situ

-Tis: Tümör olmadan meme başında paget hastalığı

-T1: Tümör boyutu 2 cm ve daha küçük

-T1mic: mikroinvazyon 0.1 cm ya da daha küçük

-T1a: Tümör 0.1-0.5 cm arasında

-T1b: Tümör 0.5-1 cm arasında

-T1c: Tümör 1-2 cm arasında

-T2: Tümör 2cm-5 cm arasında

-T3: Tümör >5 cm

-T4: Tümör çapı gözetilmeksizin göğüs duvarı ve cilt invazyonu

-T4a: Göğüs duvarı invazyonu (pektoral kas invazyonu yok)

-T4b: Ciltte ödem ya da ülserasyon ya da aynı memede
satellit cilt nodüllerinin varlığı

-T4c: Hem T4a ve T4b'nin olması

-T4d: İnflamatuar meme

Tablo 6: Bölgesel lenf nodları tutulumuna göre sınıflama (86)

Lenf nodu

Nx: Değerlendirilemiyor

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: İpsilateral hareketli aksillar lenf nodu ya da nodları

N2: Birbirine bağlı ve çevre yapılara fikse lenf nodu (N2a) ya da aksillar lenf nodu tutulumu olmadan klinik ipsilateral mammarian nodların pozitifliği (N2b)

N3: İpsilateral internal mammarian nod metastazı (N3a) ve aksillar lenf nodu tutulumu ya da ipsilateral infraklavikular (N3b) ya da supraklavikular lenf nodu (N3c) metastazı

Tablo 7: Uzak organ metastazına göre sınıflama (86)

Metastaz

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak organ metastaz var

Tablo 8: TNM Evrelemesi (86)

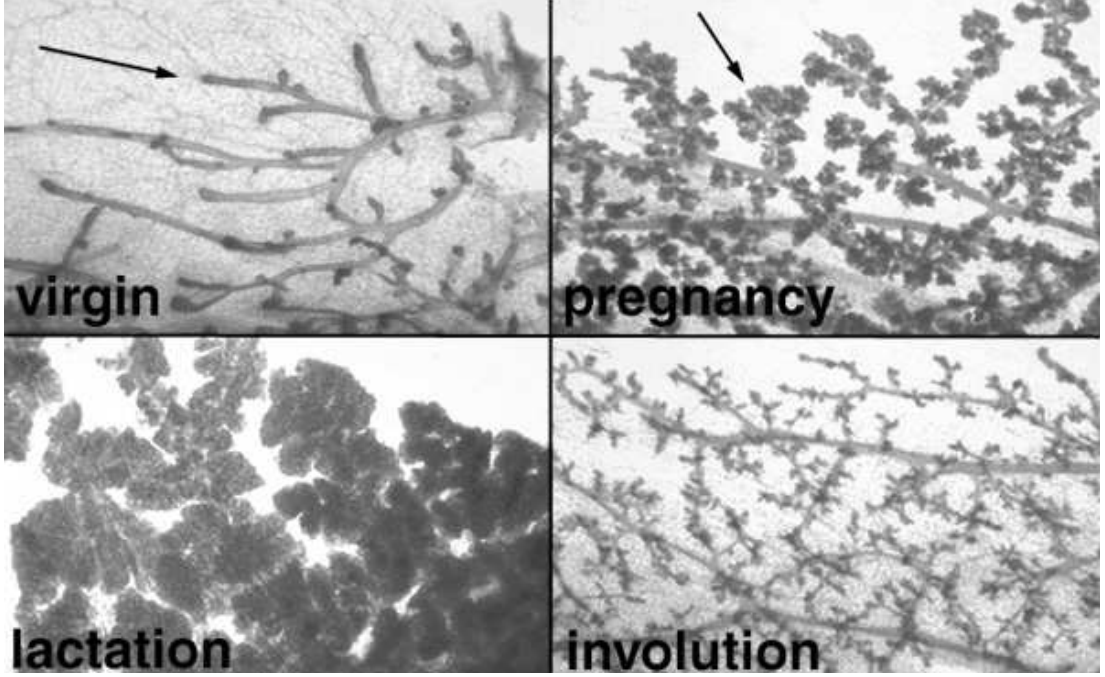
Evreleme			
<u>EVRE</u>	<u>TÜMÖR(T)</u>	<u>NOD(N)</u>	<u>METASTAZ(M)</u>
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II a	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIb	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIa	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
Evre IIIb	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIc	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

Beş yıllık yaşam beklentisi tümör evresi ile ilişkilidir. Evre 0 için beş yıllık yaşam beklentisi %99-100, evre I için %95-100, evre II için %86, evre III için %57, evre IV için %20'dir. Prognostik bilgiler hastanın tedavisinin planlanmasında hekimi yönlendirir. Prognozu belirlemede tümör dokusunun histolojik grade'i, ER/PR, HER2 durumu ve tutulan lenf nodları da belirlenmelidir (87).

2.2. MEME EPİTELYAL KÖK HÜCRESİ

Meme bezi yapısal olarak dinamik ve özel bir organdır. Yaşam boyunca gerçekleşen hormonal değişiklikler ile proliferasyon, yeniden düzenlenme ve farklılaşma gibi epizodların uyarıldığı bir organdır (88). Gebelik sırasında meme

epitel hücre sayısında masif artış olur (89). Bu artmış epitel popülasyonu laktasyon sonrasında apoptotik hücre ölümü ile azalır. Hücre büyümesi ve apoptotik hücre ölümü gibi ardışık olaylar, her gebelik döneminde ve sonrasında gerçekleşir (şekil 4).



Şekil 4: Meme epitelinde dönemsel değişimler

Meme bezine bu genişleme kapasitesini sağlamak için meme bezinde farklılaşabilen hücre hiyerarşisi olmalıdır. Erişkin meme dokusunda olması gereken bu hücre hiyerarşisi kök hücre ve progenitör hücre tipleri aracılığıyla sağlanmaktadır (90,91). Erişkin meme dokusunda kök hücrenin üç görevi vardır;

- 1- Gelişim sırasında erişkin meme bezi dokusunu oluşturmak
- 2- Gebelik, laktasyon, involüsyon sırasında meme bezinde oluşan büyük doku ekspansiyonunu ve yeniden düzenlenmesini sağlamak
- 3- Doku hasarı sonrasında tamir için kaynak sağlamak.

Kök hücre varlığını destekleyici bulgular transplantasyon çalışmalarından elde edilmiştir. Bu çalışmalarda gelişme veya laktasyon dönemindeki memeden alınan bir dokunun alveolar ve duktal yapılar dahil tüm memeyi yeniden oluşturduğu

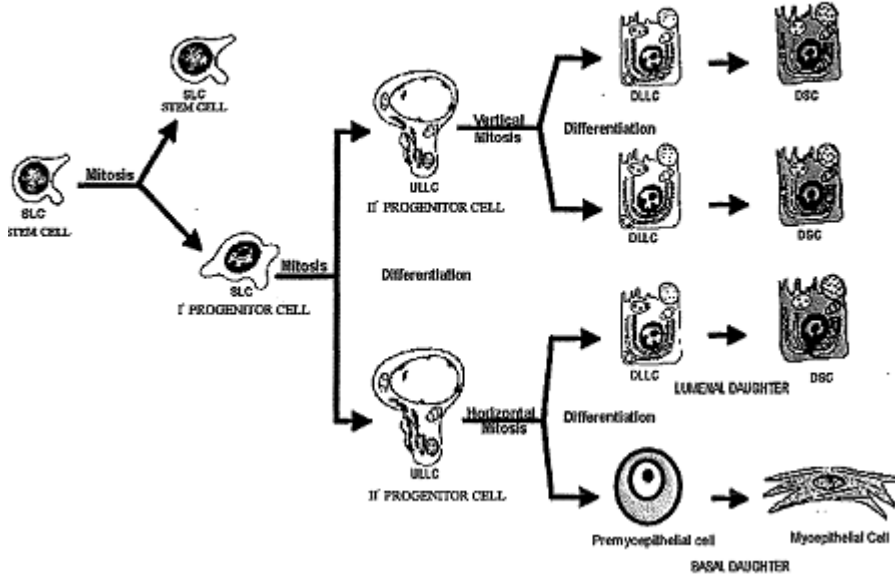
ortaya konulmuştur. Meme epitelyal kök hücre varlığı ilk kez De Ome ve ark'ları tarafından ortaya atılmıştır. De Ome ve ark'ları epitelden temizledikleri meme yağ dokusu içine doku parçalarını nakletme tekniğini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada farklı bölgelerden elde edilen ve farklı durumlardaki meme bezini başka bir fareye naklettikten sonra tüm glandüler yapının yeniden geliştiğini göstermişlerdir (92). Bu alanda en ikna edici çalışma Kordon ve Smith tarafından yapılmıştır. Bu deneysel modelde tüm epitel dokusu temizlenmiş fare meme yağ dokusuna, fare meme tümör virüsü kullanılarak tek bir hücre nakledilmiş ve tüm meme bezinin geliştiği ortaya konulmuştur. Ek olarak meme epitel kök hücresinde meydana gelen herhangi bir mutasyonun tüm meme epitel hücrelerini de etkileyeceği vurgulanmıştır (89).

Chepko ve Smith elektron mikroskobu çalışmalarıyla meme hücrelerini yapısal ve fonksiyonel olarak karakterize ederek önceki araştırmalarda da dikkati çeken ve mitoz yapabilen soluk boyanan hücreleri tanımladılar. Araştırmacılar meme hücre tiplerini karakterize etmek için bölünme, simetrik ve asimetrik bölünme, farklılaşmamış sitoloji gibi temel kök hücre özelliklerini kılavuz olarak kullandılar. Sitolojik farklılaşmada hücrelerin kaç organel içerdiklerine, özelleşmiş organeller içerip içermediklerine, apikal ya da bazal yüzde olup olmadığına göre değerlendirme yapmışlardır. Bu araştırmacılar meme epitel hücrelerini morfolojik özelliklerine göre beş gruba ayırmışlardır (90);

- 1- Morfolojik olarak primitif olan küçük soluk hücreler (Small light cell)-SLC
- 2- Sitolojik olarak daha kompleks olan fakat farklılaşmamış büyük soluk hücreler (Undifferentiated Large light cell)-ULLC
- 3- Sitolojik olarak iyi farklılaşmış büyük soluk hücre (differentiated large light cell)-DLLC
- 4- Lüminal hücre (large dark cell)-LDC
- 5- Miyoepitelyal hücre

Aynı araştırmacılar bu morfolojik belirteçleri kullanarak meme epitelindeki farklılaşma ve hücre proliferasyonu için bir model geliştirmişlerdir. Bu modele göre SLC ana hücreye benzer yavru hücreler üretir. Bu yavru hücrelerden biri farklılaşmamış doğasını korur ve kök hücre olarak kalır. Morfolojik olarak ana

hücreye benzeyen yavru hücre bölünme kapasitesi olan, ancak kendini yenilemeyen progenitör hücreyi oluşturur. Progenitör hücre bölünmesinden oluşan yavru hücreler sekonder progenitör hücrelere (ULLC) farklılaşır. Sekonder progenitör hücreler sekretuar ya da miyoepitelyal farklılaşma gösterebilir. ULLC DLLC ve sonrasında LDC'ye farklılaşacak çok sayıda ULLC oluşturmak için çok sayıda bölünür. Bunlar alternatif olarak miyoepitelyal hücrelere de farklılaşabilir (şekil 5) (90).



Şekil 5: Meme epitel hücrelerinin yenilenmesi

Normal insan meme epitel hücreleri, ekspres ettikleri yüzey belirteçlerine göre lüminal ve miyoepitelyal hücreler olarak ayrılabilir. Matür meme bezindeki lüminal epitel hücreleri sitokeratin 18 (CK18), sitokeratin19 (CK19), epitel spesifik antijen (ESA) ve sialomucin (MUC-1) ekspres ederken miyoepitelyal hücreler sitokeratin 14 (CK14), vimentin, beta-4 integrin, CALLA (common acute lymphoblastic leukemic antigen) ve alfa-düz kas aktin (ASMA) ekspres ederler (6,7,8). Kök hücrelerin sitokeratin 5 (93) ve ESA (94) ekspres ettiği varsayılmaktadır. Balzar ve ark'ları, ESA'nın artmış epitelial proliferasyon ile ilişkili olduğunu ancak hücre farklılaşması ile arasında ters bir ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir (94). Başka bir çalışma grubu CK19'un meme bezinde kök hücrelerin bir belirteci olabileceğini göstermiştir (95).

Kollajen ya da laminin gibi iki ya da üç boyutlu kültür sistemlerinde, akım sitometrisi ve tek hücre ayırıştırma yöntemleri ile elde edilen epitel hücrelerinin herhangi bir meme yapısını oluşturabildikleri gösterilmiştir. Sting ve ark'ları bazal membran sistemi oluşturmak için kollajen jel kültüründe, ESA⁺ ve MUC1⁻ insan meme epitel hücrelerini kullanarak hem lüminal hem de miyoepitelyal hücre kolonilerini oluşturmuşlar ve bu hücreleri kök/progenitör hücre olarak kabul etmişlerdir (96). Dontu ve ark'ları insan meme kök/progenitör hücrelerin çoğalmasını göstermek için in vitro hücre kültürü sistemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada meme epitel hücrelerini yapışık olmayan mammosfer süspansiyonunda kültüre ettiler. Bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerini matrijel ve kollajen gibi iki boyutlu kültür sistemleri kullanarak test ettiler ve yapışık olmayan mammosferin hem lüminal hem de miyoepitelyal farklılaşma kabiliyetine sahip olduğunu göstermişlerdir (97).

Gudjonsson ve ark'ları yaptıkları bir çalışmada, immunomanyetik ayırıştırma yöntemini kullanarak MUC1⁻, ESA⁺ yüzey belirteçleri ile bir epitel hücre popülasyonu izole ettiler. Klonal kültürlerde bu epitel hücre popülasyonunun hem farklılaşmış ESA⁺, MUC1⁺ lüminal hücreler hem de ASMA⁺ miyoepitelyal hücreler oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda laminin jel kültürüne ekildiklerinde, bu popülasyon terminal duct lobuler unit (TDLD) yapısına benzer dallanan yapılar oluşturduğu görülmüştür. Bu yüzden bu popülasyon meme bezinin kök hücre kompartmanı olarak kabul edilmiştir. Bu popülasyonun kök/progenitör hücre belirteci kabul edilen CK19'u eksprese ettiği de gözlenmiştir (95).

Farklı hücre tiplerinin oluşması için özel kültür ortamları oluşturulmuştur. Beslenme solüsyonu başka bir tipe dönüştürüldüğünde lüminal epitel hücrelerinin miyoepitelyal hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir. Ancak bunun tersi gerçekleştirilememiştir. Bu bulgulardan lüminal hücrelerin progenitör hücre özelliği gösterdiği sonucu çıkarılabilir (93,98,99).

2.2.1. MEME EPİTEL KÖK HÜCRELERİNİN TANIMLANMASI

Kök hücre fonksiyonlarının anlaşılması yanında, bu hücrelerin tanımlanması ve ayırıştırılması da gerekmektedir. Kök hücrelerinin sayıca az olması ve evrensel

morfolojik özelliklerinin olmaması nedeni ile bu hücrelerin tanımlanması zordur. Kök hücrelerinin tanımlanması için birçok belirteç (sca-1, p21, CK19, CK5, alfa-integrin gibi) kullanılmaktadır. Normal memede kök hücreleri nadiren bölünürler ve üretken yaş boyunca varlığını sürdürürler. Yani kök hücreler sessiz hücrelerdir. Bu özelliğinden yararlanılarak kök hücrelerini ayırtmak için bir DNA işaretleyicisi olan bromodeoksiuridine kullanılır (kök hücre bölünmediği için bu boyayı sabit olarak tutar). Bu yöntem birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (100,101,102). Kök hücrelerinin başka bir özelliği de Hoechst ya da rhodamine gibi boyaları hücre dışına atabilmeleridir. Bunu p-glikoproteinler ya da BCRPs (breast cancer resistant proteinler) gibi membran taşıyıcı proteinlerinin artmış ekspresyonu ile yaparlar. (103,104) Boyanın hücre dışına bu şekilde atılması, meme epitel hücrelerinde side-popülasyon (SP) olarak tanımlanan bir alt grubu ortaya çıkarır. Memedeki SP'nin multipotent özelliği transplante edildikleri farelerde meme dokusunu oluşturmaları ile anlaşılmıştır (104,105,106). Mammoplasti ya da memenin iyi huylu hastalıkları için yapılan cerrahilerinden elde edilen dokularda, fare meme bezindekine benzer SP özelliğinde alt grup tespit edilmiştir (97,107,108,109,110). İnsan meme bezinde SP ile ilgili çalışmalarda, SP hücrelerinin dağılımları analiz edilmiştir. Gözlemlenen dağılım oranları %0,2 (107, 109), %1 (97), %5 (108,110) olarak bildirilmektedir. Çalışmalardaki SP dağılımlarındaki farklılıklar metodolojik, hasta toplulukları, analiz edilen kök hücrelerin yapısı ve in vitro kültür ortamlarının farklılıklarından kaynaklanabilir (111). Dokuz kişinin dahil edildiği bir analizde SP dağılımı ile yaş, doğum sayısı, menstural siklus ve doğum kontrol hapı kullanımı arasında ilişki bulunamamıştır (109).

Kök hücrelerinin izolasyonu için kullanılan başka bir metod da hücrelerin yüzey belirteçlerine göre ayrıştırılmasıdır. Fare meme kök hücreleri, hematopoetik kök hücre tanımlanmasında kullanılan metodlara benzer yollar ile tanımlandı. İzolasyon yöntemi Shackleton ve ark'ları ile Sting ve ark'ları tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmada hematopoetik ve endotelial hücreler taze dokudan ayrıştırıldıktan sonra farklı meme alt grupları yüzey belirteçlerine göre tanımlanmıştır. Bu amaçla kullanılan yüzey belirteçleri CD24 (CD= cluster defination), CD29 (beta-1 integrin) ve CD49 (alfa 6 integrin) idi. CD24 ve CD29 ya da CD49'u fazla eksprese eden hücre alt tiplerinin (çift pozitif hücre popülasyonu)

fare meme kök hücrelerince zengin olduğu bulunmuştur (91,99).

Smalley ve ark'ları fare memesinde gösterilen SP hücrelerinin insan meme bezinde de olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında epitel belirteçleri kullanılarak SP hücrelerinin farklılaşmamış olduğunu ve SP olmayan hücrelere nazaran daha az CK14/19 ile fazla vimentin eksprese ettiğini bildirmişlerdir. SP hücrelerinin, epitel dokusu temizlenmiş fare meme yağ dokusuna nakledildiğinde lobüloalveolar ve duktal büyüme yaptığını gözlemişler. Bu da SP hücrelerinin tam farklılaşma ve gelişim kapasitesini sağladıklarını ortaya koymaktadır (105).

Nöral kök hücreleri süspansiyon içinde kültüre edildiklerinde görünüşte homojen hücreler topluluğu oluşturur (112). Bu artmış kendini yenileme kapasitesi gösteren hücre topluluğu nörosifer (neurosphere) olarak adlandırılır. Wicha ve ark'ları benzer bir yaklaşım kullanarak meme kök hücreleri için de bir metod geliştirmişlerdir. Hücreleri bağımsız besiyerinde tutarak farklılaşmadan kalmalarını sağlamışlardır. Bu ortamda insan meme epitel hücreleri yuvarlak yapılar oluşturduğu görülmüştür. Bu yapılara mammosfer (mammosphere) adı verilmiştir (113,114,115). Kollajen alt tabaka üzerinde büyütüldüklerinde mammosferden elde edilen tek hücrelerin sadece duktal ya da miyoepitelyal hücrelerin belirteçlerini eksprese eden kolonilere farklılaştığı gözlenmiştir. Matrijelde büyütüldüklerinde ise tek hücrelerin fonksiyonel kompleks dallanmış yapılar oluşturduğu görülmüştür. Ek olarak prolaktin eklendiğinde mammosfer lümene beta-casein sekrete eden fonksiyonel alveolar hücreler yapabildiği gözlenmiştir. Mammosfer çalışmalarında retroviral etiketleme ile mammosfer klonalitesi ortaya konmuştur. Ayrıca farklılaşmamış durumda çok sayıda pasajda bu hücrelerin çoğalabildiği ve multipotent kapasitelerini korudukları gözlenmiştir. Bu da her mammosferin ortalama bir sifer başlatıcı kök/progenitör hücre içerdiğini ve normal meme gelişiminin incelenmesinde değerli bir model olacağını göstermektedir (95,97,116).

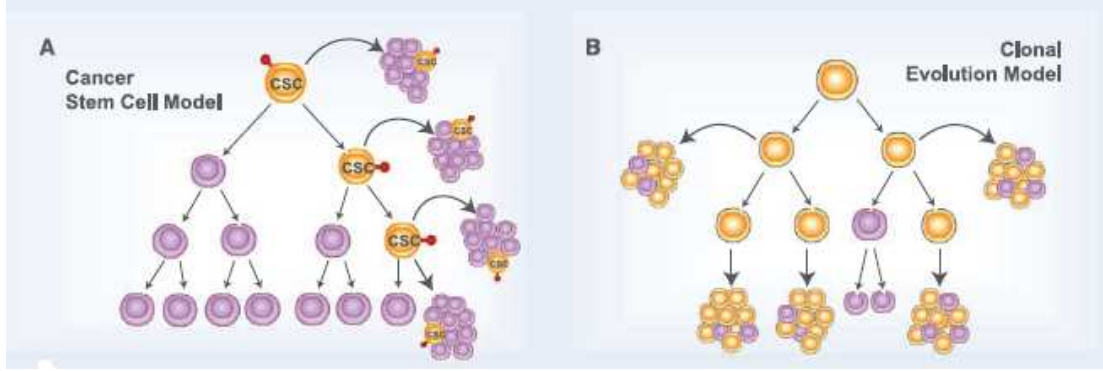
2.2.2. KANSER KÖK HÜCRESİ

Habis tümörlerin birçok ortak özelliği vardır. Bunlardan biri habis tümörlerin genetik ve çevresel faktörlerin neden olduğu mutasyonlardan kaynaklanmasıdır. Diğer bir ortak özellik tümör dokusu içindeki hücrelerin çeşitliliğidir. Bu hücreler

boyut, membran içeriği, antijen ekspresyonu, proliferasyon, metastaz kapasitesi gibi özellikler açısından farklılık gösterir. Tümörlerdeki bu heterojen yapı iki model ile açıklanmaya çalışılmıştır (Şekil 6). Bu modeller skolastik ve kök hücre modelidir. Skolastik modelde, tümör hücrelerini oluşturan hücrelerin hepsi kanser oluşturma yeteneğine sahiptir; bu hücreler zaman içerisinde çeşitli mutasyonlara uğramakta ve en agresif olan hücreler tümörün progresyonuna sebep olmaktadır. Kısaca tümör içerisindeki herhangi bir hücre invaziv olabilir ve metastaza sebep olabilir, ya da tedaviye dirençli hale gelebilir (88). Skolastik modelin aksine, kanser kök hücre modelinde tümör hücrelerinden küçük bir hücre grubu kanser oluşumu, progresyonu ve rekürrensinden sorumlu tutulmaktadır. Bu küçük hücre grubuna, kök hücre benzeri özelliklerinden dolayı kanser kök hücre (KKH) adı verilmektedir. Bu hücreler kendini yenileyebildikleri gibi farklılaşmış hücrelerin de oluşmasını sağlamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı bu hücre grubu tüm tümör tiplerinde heterojen hiyerarşik bir yapı oluşturmaktadır (88). Deneysel ve klinik bulgular, kanserin kök hücre popülasyonunda meydana gelen mutasyondan kaynaklandığını desteklemektedir (4). Kanser kök hücre modeli, normal kök hücrenin kanserin kaynağı olabileceği üzerinde durmaktadır (117). KKH normal kök hücreye benzer görünüme sahip olmasına rağmen proliferasyon ve farklılaşma açısından kök hücreden ayrılır. KKH'nın tümör başlatıcı kapasitesinin yanında vücuda yayılarak metastaza sebep olma özelliği de vardır (88). KKH tümör içerisindeki tümörojenik olmayan hücrelerin yapımından da sorumludur. Bu tümörojenik olmayan hücreler tümör kitlesinin çoğunluğunun oluşmasından sorumludur. Mutasyonların oluşmasından yıllar sonra meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Meme bezinin yüksek döngüsünden dolayı tüm onkojenik mutasyonları biriktirecek tek hücre topluluğu meme kök hücreleridir (88).

Kanser ve kök hücre ilişkisinin anlaşılması yıllar öncesine dayanmaktadır. Ancak KKH varlığına dair ilk direkt kanıt Lapidot ve ark'larının çalışmasından elde edilmiştir. Lapidot ve ark'ları kök hücrelerinin önemli bir özelliği olan kendini yenileme kapasitesini göstererek akut miyeloid lösemide KKH'yı tanımlamışlardır (118). Lösemik hücrelerde KKH'nın tanımlanması bilim dünyasının kanser ile ilgili düşüncelerini değiştirmiştir ve solid tümörlerden izolasyonunun önünü açmıştır (7,119). KKH buldukları tümörün sadece yaklaşık %1'lik kısmını temsil

etmektedir ve sadece immun defisit farelerde yeni bir tümör oluşturabilmişlerdir. Meme gibi sağlıklı dokulardan kök hücre izolasyonu zor olmasına rağmen, klonal tümörlerden elde edilen kanser kök hücrelerinin izolasyonu ve bunların uygun hayvanlara nakilleri ile yeniden tümör oluşturulması mümkündür (120,121).



Şekil 6: Kanser gelişme modelleri

2.2.2.1. Kanser Kök Hücrelerinin Gelişimi

Günümüzde kanser hastalarında birçok gende mutasyon olduğu gözlenmiştir. Kanser oluşumunu önlemede tümör baskılayıcı genlerin kritik rolleri vardır. Farklı yerleşik kök hücreler onkojenik potansiyellerine göre ayrılabilirler; çünkü genetik ve epigenetik faktörler kişiden kişiye değişebileceği gibi aynı insanın farklı organları arasında bile değişebilir. Son on yıl içinde yapılan çalışmalarda, dokularda KKH gelişimine neden olabilecek mutajenik etkilerle ilişkili hücresel mekanizmalar üzerinde durulmaktadır. Kanser oluşumuna neden olabilecek olası mekanizmalar aşağıda belirtilmiştir (122).

a-Dönüşüm mutasyonlarının hedefi olarak kök hücre

Multipotent doku kök hücreleri uzun ömürlü olmaları nedeniyle anormal büyüme ve farklılaşma özellikleri kazanarak KKH oluşturabilir. Normal doku düzenlemesi için gerekli geçici aktivasyon yerine baskın kök hücre aktivasyonu ile mikro çevreden ayrılma gelişir. Bu hormonal uyarı, tekrarlayan doku hasarları,

inflamasyon, radyasyon, kimyasallar, enfeksiyonlar, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ya da onkogenlerin aktivasyonu ile oluşabilir. Doku mikro çevresindeki değişiklikler kök hücrelerinin kronik uyarılmasına yol açar ve uzun süreli proliferasyonu ile sonuçlanır. Bu gibi sürekli bölünen hücrelerin ek genetik değişikliklere eğilimi olur. Bu genetik olayların bilinen etkileri arasında büyümenin otonom hale gelmesi, hücre döngüsü düzenlenmesinde bozulma, apoptoza direnç vardır. Bunlar da kanser hücrelerinin en iyi bilinen özellikleridir. Kanser genetik olaylar sonrasında kök hücrelerinin kronik aktivasyonundan kaynaklanan, anormal kök hücre büyümesi sonucu ortaya çıkan bir hastalık olarak düşünülebilir (123).

b-Dönüşüm mutasyonlarının hedefi olarak progenitör hücreler

KKH erken progenitör hücreden kaynaklanabilir. Progenitör hücreler kök hücresi özelliği kazanmak için bazı değişiklikleri bulundurmalıdır. Yani kök hücreye dönüşümünü sağlayacak mutasyonları geliştirmelidir (123).

c-Yönlendirilmiş progenitör hücrelerin ve farklılaşmış hücrelerin yeniden farklılaşmaması

Yönlendirilmiş progenitör hücrelerin kök hücre benzeri hücrelerin oluşmasına yol açan kendini yenileme özelliğini yeniden kazandıklarına dair kanıtlar vardır. Farklılaşmama fenomeni olarak da adlandırılan bu olay bitkilerde rapor edilmiştir. Yakın zamanda, bu fenomen fareden elde edilen dokularda da ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, aktive onkogenler eklenen fare fibroblastlarının kök hücre benzeri hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir (124,125).

d-Dolaşımdaki kemik iliği kök hücreleri ile doku spesifik kök hücrelerinin birleşmesi

Kanserin, kemik iliğinden kaynaklı kök hücrelerin yanlış zamanda ya da yanlış yerde bulunmalarından kaynaklandığına inanılmaktadır (126). Bu belki de dönüşümün ilk basamağı olabilir.

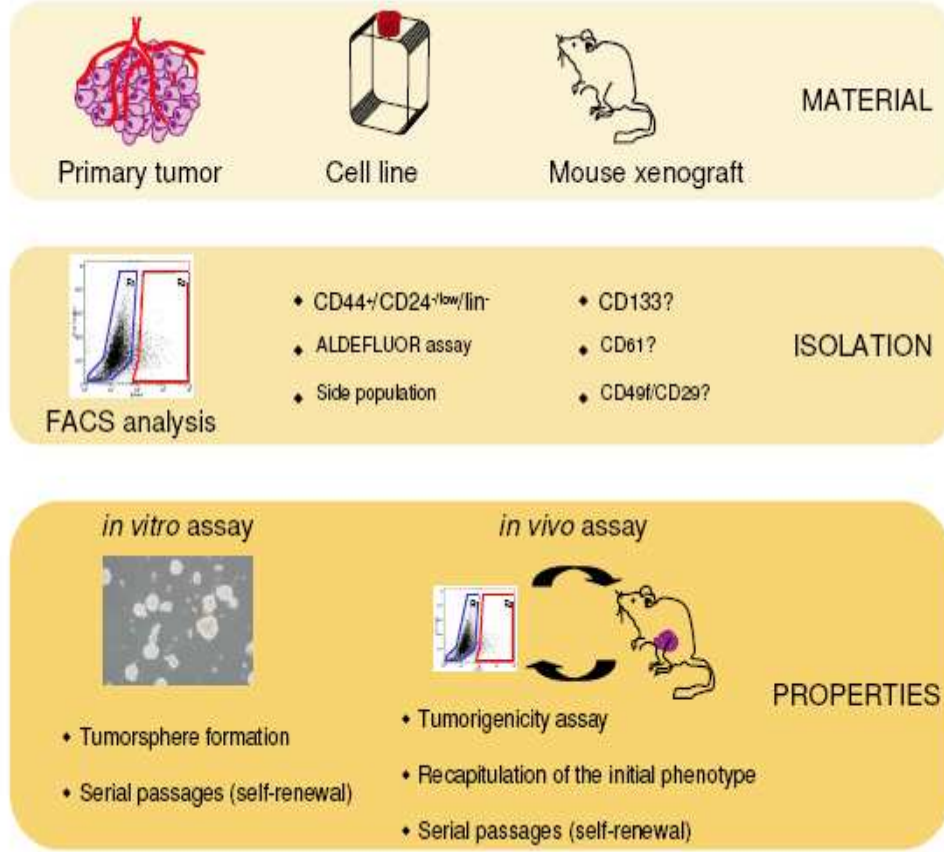
Çok basamaktan oluşan karsinogenez için tüm mutasyonları toplayabilecek uzun ömürlü bir hücreye ihtiyaç vardır. Bunu sağlayabilecek tek hücre kök hücredir. Kanser gelişim mekanizmalarından ve erişkin kök hücre tipinden bağımsız olarak, KKH ve normal erişkin kök hücresi arasında benzerlikler vardır (127). Bu benzerlikler şöyle sıralanabilir;

- Asimetrik bölünme kapasitesi
- Benzer sinyal yolları (Wnt, Sonic hedgehog ve Notch) ve polycomb genlerin epigenetik düzeyi ile kendini yenilemenin düzenlenmesi
- Fonksiyonel esnekliği (pluripotent ve ölümsüzlük) sağlayan bazı faktörlerin ekspresyonu
- Hücrel hiyerarşiyi sağlama kapasitesi
- Hücrel yaşam süresini arttıran uzamış telomeraz ve telomeraz aktivitesi
- ABC taşıyıcılarının ekspresyonu (spesifik büyüme inhibitörü ilaçlarına karşı dirençten sorumludurlar)
- Büyüme faktörlerine duyarlılık
- Anjiogenik faktörlerin salınımı ile anjiogenezin uyarılması
- Benzer yüzey belirteçlerinin ekspresyonu. Bu belirteçler ya kök hücre belirteci ya da metastaz ve tutunma ile ilişkili belirteçler olarak tanımlanır.

2.2.2.2. Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

KKH izolasyonu ve tanımlanması için bazı yöntemler kullanılmaktadır (Şekil 7). Kültür ortamında ve hayvan deneylerinde yapılan ardışık transplantasyonlar sırasında saptanan sitogenetik bozukluklara dayanarak malign asit sıvısında da KKH benzeri hücreler tanımlanmıştır (128). Sonrasında, Kleinsmith ve Pierce transplante teratokarsinomların tek bir pluripotent hücreden kaynaklandığını göstermişlerdir (129). Doku kök hücrelerine benzer biçimde KKH'nın da asimetrik bölünme kapasitesine sahip olduğuna inanılmaktadır. Bu bölünme ile kök hücre hem kendine benzer hem de farklılaşmaya yönlendirilmiş yavru hücre oluşturur. Ayrıca KKH'nın simetrik bölünme yapabildiği (bir hücreden iki yavru hücre oluşturması) gösterilmiştir (130). Bu hücrelerin normal kök hücreye benzer biçimde yara iyileşmesi ve inflamasyon durumunda hızlı proliferasyon olduğu gösterilmiştir. Kanser

dokusunun kendini yenileme kapasitesi olan kök hücreler, geçici olarak çoğalan progenitör (transiently amplifying progenitör) hücreler ve kısa yaşam süreli farklılaşmaya giden hücreler karışımından oluştuğu gözlenmiştir (131).



Şekil 7: Kanser kök hücrelerinin tanımlanması

KKH ile ilgili çalışmalar hematopoetik sistem üzerinden başlamıştır. Hematopoetik sistemde hücresel seriler detaylı açıklanmış ve hücre hiyerarşisi ile ilişkili olan çeşitli yüzey molekülleri tanımlanmıştır (132,133). Kan hücrelerinin hiyerarşik yapısının kabul edilmesinden sonra, çalışmalar lösemik kök hücrelerinin tanımlanmasına yoğunlaşmıştır. Lösemik kök hücreleri, CD hücre yüzey belirteçleri kullanılarak tanımlanmaya çalışıldı (134). Akabinde, Lapidot ve ark'ları başarılı bir biçimde sınırlı dilüsyon analizlerini kullanarak akut miyeloid lösemide lösemi başlatıcı hücreleri (lösemik kök hücrelerini) tanımlamıştır. Akut miyeloid lösemide yapılan bu çalışmada, malign lösemik kök hücrelerinin CD34⁺/CD38⁻ yüzey

belirteçlerini eksprese eden immatür (yönlendirilmemiş) hücrelerden geliştiği ve benzer kemik iliği mikro çevresinden kaynaklandığı gösterilmiştir (118). Benzer biçimde, multiple miyelomda da CD138⁻/CD34⁻ hücreler topluluğunun in vitro kolonik olduğu, immun defisit obez olmayan farelerde ardışık transplantasyonlar ile tümör oluşturabildikleri ve CD138⁺ hücrelerinin bunu yapamadıkları gösterilmiştir (135).

Hematopoetik sistem dışında, kanser kök hücre varlığı deri, bağırsak, testis ve solunum sistemi gibi hızlı çoğalan dokularda araştırılmıştır. Yakın dönemde yapılan çalışmalardan solid yavaş büyüyen doku ve organlarda kök hücre varlığına dair bilgiler elde edilmiştir (4,136,137). Normal kök hücre tarafından eksprese edilen spesifik belirteçler az sayıda bulunan KKH'nın ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Tablo 9'de kanserlere spesifik yüzey belirteçleri gösterilmiştir. Solid tümörlerin kültür ortamında fenotipik olarak heterojen ve kolonik oldukları bilinmektedir. Bu yüzden birçok çalışma grubu kanser kök hücre hipotezini hematopoetik sistem üzerinden solid tümörlere uygulamıştır. Beyin tümörlerinde KKH karakterindeki hücreler ilk kez insan glioblastomundan sağlanan kolonik nörosifer kültürlerinden izole edilmiştir (138). Günümüzde diğer çalışma grupları da bundan bağımsız olarak beyin tümörlerinin nörosifer oluşturucu hücreleri içerdiklerini doğrulamıştır (119,139). Bu hücrelerin yüzey belirteci olan CD133 ve netsinden zengin olduğu, belirgin proliferasyon, kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesine sahip oldukları bildirilmiştir. KKH prostat, (140), pankreas (141), kolon (142, 143) ve meme kanserinde (7) de gösterilmiştir.

Ksenograft bir modelde O'Brien ve ark'ları, insan kolon KKH süspansiyonunu, önceden ışınlanmış obez olmayan immun defisitli farelerin böbreklerinin altına ekmişler ve primer ya da metastatik kolon kanseri olan örneklerin hepsinin primer tümöre benzer şekilde tümör oluşturduklarını bildirmişlerdir. Bu tümörlerin pasajlanma sonrası ikinci ve üçüncü nakilde bile yeniden tümör oluşturdukları gösterilmiştir (142). Kolon KKH'sı CD133 ekspresyonuna göre ayrıştırılmış olup CD133⁺ hücrelerin dağılımı %1.8-24.5 arasında saptanmıştır. Bir çalışmada CD133⁺ hücreleri NOD/SCID farelere implante edildiğinde 49 tanesinin 45'inde, CD133⁻ hücreleri implante edildiklerinde ise 47 farenin 1'inde tümör oluşturduğu bildirilmiştir (122). Hücrelerin farklılaşmamış

durumda büyümesini sağlayan nörosifer benzeri kolon siferleri, kolon kanser hücrelerini büyütme için kullanılmıştır (122). Kolon siferlerinin CD133⁺ hücrelerden zengin olduğu ve farelerde tümör oluşturabildikleri gösterilmiştir. Primer kolon kanseri hücrelerinin bir yıl boyunca sifer olarak büyüdüğü ve primer tümöre benzer biçimde tümörleri başlatabildikleri bildirilmiştir (143). Bu çalışmaların hepsi, tümörün küçük bir grup farklılaşmamış hücre tarafından oluştuğu ve tümör kitlesinin farklılaşmış hücre popülasyonundan oluştuğunu savunan kanser kök hücre hipotezi ile uyumludur (4,131).

Tablo 9: Kanser kök hücrelerinin izolasyonu için kullanılan yüzey belirteçleri (127)

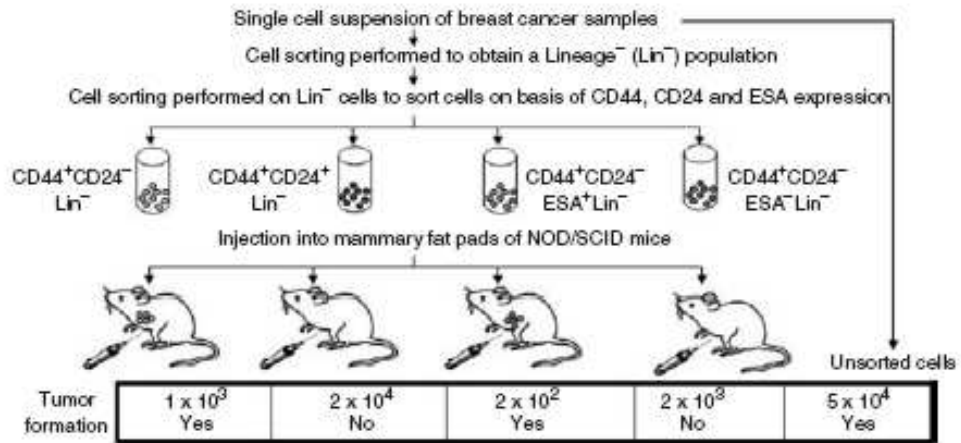
Kanserin Tipi	Yüzey Belirteçleri
Akut miyeloid lösemi	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD96 ⁺ , CD90 ⁻
Nöral	CD133 ⁺
Meme	CD44 ⁺ , CD24 ⁻
Prostat	CD133 ⁺ , beta-integrin
Akciğer	Sca1 ⁺ , CD45 ⁻ , CD31 ⁻ , CD34 ⁺
Hepatosellüler	CD133 ⁺
Pankreas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺
Kolorektal	EpCAM ^{-yüksek} , CD44 ⁺
Kolon	CD133 ⁺
Karaciğer	CD133 ⁺

2.2.3. Meme Kanser Hücrelerin Tanımlanması

Al-Hajj ve ark'ları, Michael Clarke laboratuvarında akımsitometri kullanarak hücre süspansiyonu haline getirilmiş primer meme tümörü ve metastatik plevral efüzyonlardan kanser kök hücrelerini CD44, CD24 gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonuna göre ayırtmışlardır (Şekil 8). Sıklıkla, primer tümör

dokusundan ayrıştırılan hücreler hemopoetik seri hücreleri ile kontamine olmuştur. Bu gibi kontaminasyonları dışlamak için hücreler önce lineage (nesil) belirteçleri ekspresyonlarına göre ayrıştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan yüzey belirteçleri CD2, CD3, CD10, CD18, CD31, CD64'dür. Bu yüzey belirteçleri lökosit, endotel hücreleri, mezotelyal hücreler ve fibroblast hücre popülasyonları ile ilişkilidir. Lineage negatif (Lin⁻) meme kanseri hücre fraksiyonu, CD44/CD24 yüzey belirteçleri kullanılarak ayrıştırıldı. CD44^{yüksek}, CD44^{düşük}, CD24^{yüksek}, CD24^{-/düşük} ve bunların kombinasyonları ayrıştırma sonrasında gruplandırılmıştır ve özellikle obez olmayan diyabetik immun defisit farelerin meme yağ dokusu içerisine implante edilmiştir. Böylece farklı yüzey belirteci ekspresyonu gösteren hücrelerin tümör oluşturma kapasiteleri değerlendirilmiştir (7).

CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücrelerin 1×10^3 tanesi yeni tümör oluştururken 2×10^4 tane CD44⁻/CD24⁺Lin⁻ hücrenin tümör oluşturmadığı gözlenmiştir. Hücre belirteci olarak epitel spesifik antijen (ESA) de değerlendirildiğinde 2×10^2 hücrenin de tümör oluşturabildiği görülmüştür. Bu çalışmada araştırmacılar, obez olmayan diyabetik immun defisit farelerde tümör oluşturma kapasitelerini değerlendirilerek sadece CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücre grubunun meme kanseri başlatabildiğini göstermişlerdir (7).



Şekil 8: Al-Hajj ve ark'larının çalışma metodu

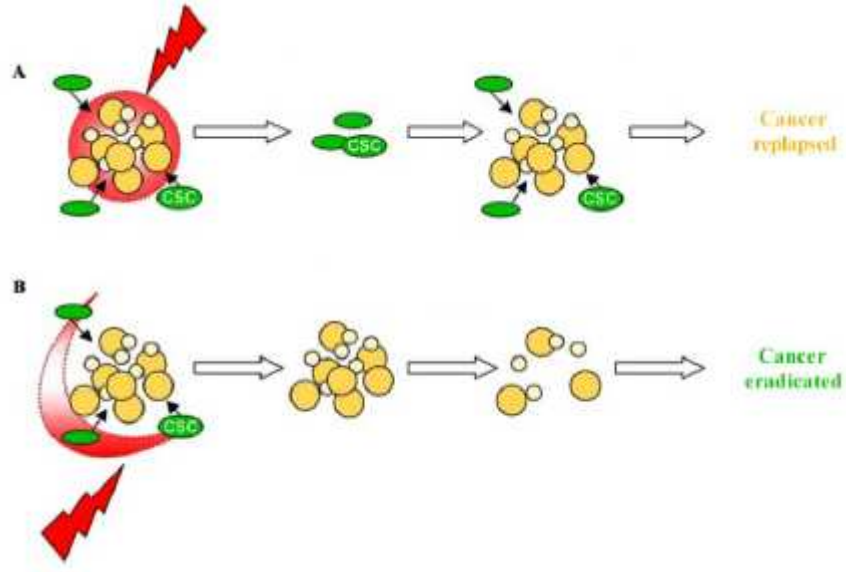
Meme KKH'nın mammosifer oluşturma kapasitelerini değerlendirmek için Ponti ve ark'ları, primer meme tümöründen alınan hücreleri süspansiyon kültürüne

yerleştirmişlerdir. Araştırmacılar 16 farklı meme kanserini değerlendirmiştir. Bu KKH'dan kaynaklanan mammosiferler farklılaşmamış ve kendini yenileme kapasitesi olan hücreleri içermektedir. Yani bu hücreler kök hücre/progenitör hücre özelliği göstermektedir. Bu grubun bulduğu diğer önemli bir veri de tümör grade'i ile ilişkili olarak sifer oluşturma kapasitesinin değişmekte olduğudur. Bu araştırmada, grade 3 meme karsinomlarından elde edilen hücrelerin mammosiferde daha fazla proliferasyonu olduğu, mammosifer oluşturma kapasitesinin grade 2 tümörlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Agresif tümörlerin artmış sifer oluşturma kapasitesi tümörde daha fazla sayıda kendini yenileme kapasitesi olan hücre yani KKH sayısı ile ilişkili bulunmuştur (114,127). Ek olarak Ponti ve ark'ları, mammosifer oluşturan hücrelerin fenotiplerini de belirlemişlerdir. Kanser siferlerinin CD44⁺/CD24⁻ hücre fenotipi ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir. Kanser sifer hücrelerinin %95-98'i CD44⁺/CD24⁻ hücrelerden oluşurken bunların ancak %10-20'sinde kendini yenileme kapasitesi olduğu gözlenmiştir. CD44⁺/CD24⁻ hücre topluluğu içinde bir grup hücrenin tümörojenik olabileceği ileri sürülmüştür (114).

Mammosifer olarak büyüyen MCF7 ve MDA-MB231 hücre dizilerindeki çalışmalarda, bu hücre dizilerinde CD44⁺/CD24⁻ hücre sayısının yüksek olduğu ve bu fenotipte ki KKH'nın radyoresistant olduğu gösterilmiştir (127).

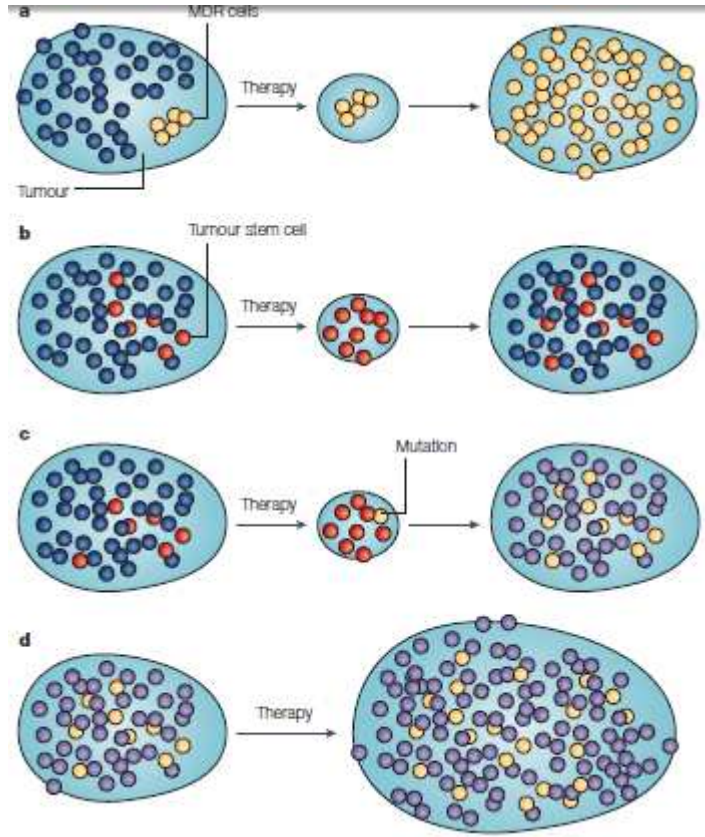
2.2.4. MEME KANSERİ İLAÇ VE RADYOTERAPİ DİRENCİNDE KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ROLÜ

Cerrahi, çeşitli tipte kemoterapi, hormon tedavisi ve radyoterapi gibi tedavi seçeneklerinin etkinliklerinin yanında bazı sınırlamaları da vardır. Mevcut tedavi seçenekleri iyi değerlendirilmektedir. Ancak tedavi direnci, hastalığın tekrarlaması ve metastatik hastalık için halen küratif bir tedavinin olmaması günümüz tedavi seçeneklerinin doğru hücreleri hedefleyemediği sorununu ortaya çıkarmaktadır (şekil 9).



Şekil 9: Hedef olarak kök hücre

Önceden ilaç direncinin, tümör popülasyonundaki bir ya da birkaç hücrenin ilaç direncine sebep olan genetik değişiklikleri edinmesi ile ortaya çıktığı kabul edilirdi. Kanser kök hücre modeline göre, KKH G0 fazında olan sessiz hücrelerdir ve doğal olarak kemoterapiye dirençlidir. Aynı zamanda KKH, DNA tamir etme kapasitesi ve yüksek düzeyde ATP binding cassette (ABC) transporter proteinlerine, özellikle ABCG2 proteinlerine sahiptir (103). ABC transporter proteinlerinin görevi, hücre dışına atma mekanizmaları ile hücreyi ilaç hasarına karşı korumaktır (144). Klinik pratikte optimal kemoterapi ile solid tümörlerdeki çoğu hücre ölmektedir; ancak KKH'lar hızlı bölünmedikleri için kemoterapi etkisinden korunmaktadır. Sonuç olarak KKH geride kalmakta ve sonra yeniden tümör oluşturmaktadır. İlaç direncini açıklamak için kullanılan başka bir modelde ise tümör hücre ölümü ile ilişkili uyarılar sonucu bu sessiz hücrelerin bölündüğü ve progenitor hücrelerin oluştuğu öne sürülmektedir. Akabinde bu progenitor hücreler kemoterapi direnç fenotipine sahip yeni hücelere farklılaşmakta, böylece hem KKH hem de farklılaşmış hücrelerde kalıtsal olarak ilaç direnci geni taşınmaktadır (Şekil 10). Bu yüzden tedavi başarısız olmakta ve tümör kontrolsüz büyümeye devam etmektedir (144).



Şekil 10: İlaç direnci gelişme modelleri

ABC transporter proteinlerinin artmış ekspresyonu, floresan boya olan Hoechst 33342 ve Rhodamine 123'ün hücre dışına atılmasına sebep olur. Hoechst 33342 boyasını dışarı atabilen hücreler SP oluşturur (145,146). Meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli solid tümörlerde bu işlem ile KKH benzeri hücreler topluluğu başarılı bir biçimde tanımlanmaktadır (145). İn vitro yapılan çalışmalarda, kemoresistant meme kanseri hücrelerinin fazla sayıda SP içerdikleri gösterilmiştir (147). Aynı zamanda adriamycin ve paklitaksele dirençli meme kanseri hücre dizilerinde $CD44^+/CD24^{-/düşük}$ popülasyonun kemoterapi duyarlı hücelere nazaran daha fazla olduğu gözlenmiştir (148).

$CD44^+/CD24^-$ hücrelerinin kemoterapi direnci yanında radyoterapinin de dahil olduğu diğer tedavi formlarına direnç gelişimde rolü olduğu varsayılmaktadır. MCF-7 ve MDA MB-231 meme kanseri dizilerinden elde edilen $CD44^+/CD24^{-/düşük}$ hücrelerin, $CD44^+/CD24^{-/düşük}$ olmayan hücelere göre daha fazla radyoterapiye dirençli oldukları gözlenmiştir. Radyoterapiye direnç gelişmesine sebep olan

mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Büyük olasılıkla bu direnç $CD44^+/CD24^-$ /düşük hücrelerde reaktif oksijen ürünlerinin uyarılmasının azalmasına ve DNA hasar bölgelerinin hızla tamir edilmesine bağlı olabilir. Ayrıca in vitro bir çalışmada, bir fraksiyonda uygulanan radyoterapi ile KKH sayısında artış olduğu ileri sürülmüştür (149).

Aldehid dehidrogenaz (ALDH1) detoksifiye edici bir enzimdir. Etanolden üretilen asetaldehitin oksidasyonunun katalize edilmesinde rol oynar. İlk olarak karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Karaciğer kanser hücrelerinde normal seviyesinden daha fazla olduğu gösterilmiştir (150). Yüksek ALDH1 aktivitesi insan meme ve kolonik kanser kök hücre/progenitör hücrelerinin bir özelliğidir (116,151). Adriamycin ve paklitaxel direnci olan meme kanseri hücre dizilerinde ALDH1 aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (147). Siklofosamid dirençli lösemik ve kolonik hücrelerde ALDH1 ekspresyonunun fazla olduğu bulunmuştur (151,152). ALDH1, detoksifiye edici bir enzim olmasından ve KKH'da aşırı eksprese edilmesinden dolayı kemoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli tedavilere direncin sebebi olarak değerlendirilmektedir.

2.2.5. MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ VE KANSER İNVAZYONU

KKH'nın sadece karsinogenez ile ilişkili olmadığı, aynı zamanda tümör invazyonu ve metastaz oluşumunda rol oynadığı varsayılmaktadır (153,154). Farklı invazyon düzeylerinde 13 farklı tipte meme kanserinden elde edilen $CD44^+/CD24^-$ /düşük hücrelerinde yapılan bir çalışmada, invazyon ile ilişkili genlerin yüksek düzeylerde eksprese edildiği doğrulanmıştır (155). Sonuç olarak, $CD44^+/CD24^-$ /düşük hücrelerin $CD44^-/CD24^+$ hücrelere göre daha yüksek invazyon indeksleri olduğu gözlenmiştir. Bir çalışmada, 136 meme kanseri dokusu incelenmiş ve $CD44^+/CD24^-$ /düşük hücre yüzdesi yüksek olanlarda (>%10) metastaz insidansının artmış olduğu bildirilmiştir (156). Başka bir çalışmada ise meme kanseri hastalarında kemik iliğine yayılan hücrelerin $CD44^+/CD24^-$ /düşük hücreler olduğu gösterilmiştir (157). Bu bulgular meme kanseri kök/progenitör hücrelerinin invazyon ve metastazdaki rolünü vurgulamaktadır.

2.2.6. KANSER KÖK HÜCRESİ VE YENİ TEDAVİ SEÇENEKLERİ

KKH ilaç direnci gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Bunun yanında tedavi sonrası rekürrenslerin önlenmesi için de CSCs'nin elimine edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli deneysel tedavi modelleri çalışılmaktadır (144). Bu tedavi seçenekleri aşağıda özetlenmiştir;

- 1- ABCG2 inhibitörleri: ABCG2 inhibitörlerinin kullanımı tümör kök hücrelerini elimine edebilir. Bu inhibitörler hem ABCB1 ve ABCG2'yi inhibe etmektedir.
- 2- ABCG2 antikoları: ABCG2 ve diğer kök hücre belirteçlerine yönelik antikor tedavileri kök hücreleri hedef alarak bu hücreleri elimine edebilir. Bu antikolar toksinlerin ya da radyoizotopların atılmasına yardımcı olabilir. Bu antikolar tümörün saptanması, metastazın gösterilmesi ya da tedavi yanıtlarının değerlendirilmesinde de kullanılabilir.
- 3- Kök hücre inhibitörleri: Kanser kök hücresi kendini yenilemek ve sağ kalmak için spesifik hücre yüzey belirteçleri aracılığıyla sağlanan moleküler sinyallere ihtiyaç duyar. Hedgehog-patched reseptör sinyalini inhibe eden cyclopamine, potansiyel bir kök hücre inhibitörüdür.
- 4- İmmunoterapi: Hastanın immun sistemini kendi kanser hücresine karşı uyaran ya da alıcıdaki kök hücrelerini öldürmek için kemik iliği kök hücrelerinin nakil edildiği protokoller vardır. Ayrıştırılan KKH belirteçleri hastayı immunize etmek ya da alıcının immun hücrelerini tümör hücrelerine karşı uyarmak için kullanılabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar: Çalışmaya Mayıs 2010-Ocak 2011 tarihleri arasında meme kanseri nedeniyle cerrahi planlanan 23 bayan hasta dahil edildi. Hastaların evrelemesi NCCN 2003 versiyonuna göre yapıldı. Evre I, IIA, IIB hastalar erken evre meme kanseri; Evre IIIA, IIIB, IIIC, IV hastalar ise ileri evre meme kanseri olarak kabul edildi.

Biyopsi Örneklerinin Alınması: KOUTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda, meme kanseri nedeniyle cerrahi planlanmış olan hastalardan cerrahi sonrasında makroskopik olarak görünen tümörden 0,5x0,5x0,5cm boyutlarında biyopsi örnekleri alındı. Bu örnekler +2-8C^o'de saklanan 100 unite/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin (P-S; GIBCO İnvitrogen Corporation) içeren, CaCl₂ ve MgCl₂ bulunmayan, içinde HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution 1x; GIBCO, İnvitrogen) bulunan steril 50ml'lik konik tüpe (BD Falcon Biosciences) alındı. Yaklaşık on dakika içerisinde +2-8C^o'de KÖGEM İnsan Hücre Kültürü Laboratuvarı'na ulaştırıldı ve ayrıştırma işlemleri başlayıncaya kadar saklandı.

Biyopsi örneğinin mekanik ve enzimatik ayrıştırılması: Tümör biyopsi örneği, içerisinde 15ml 100 unite/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin eklenmiş HBSS bulunan 5-6 adet 100x20mm'lik steril hücre kültürü petrilerinde (BD Falcon Biosciences) 5-6 kez kan ve diğer mikroorganizmalardan temizlenmek için yıkandı. En son, içerisinde HBSS bulunmayan kuru petriye alındı. Stereo-mikroskop altında, istenmeyen çevre bağ dokular diseke edilerek temizlendi. Biyopsi örneği, eğri uçlu makas ile biyopsi örneğine ardışık kesiler atılarak en büyük doku parçası 1x1x1mm³ olana kadar küçültüldü. Tümör dissosiasyon enzim solüsyonu (Tumor dissociation enzyme reagent; DCS Innovative Diagnostik-Systeme), tümör dissosiasyon enzimi 10ml hazır kültür mediumda (Complete assay medium CAM; Innovative Diagnostik-Systeme) çözüldü ve 0,22µm'lik filtreden (Minisart Sartorius stedim Biotec) geçirildikten sonra sterilize edilerek hazırlandı. Solüsyonun 5ml'si işlem için kullanıldı; geriye kalan enzim solüsyonu bir sonraki işleme kadar -20C^o'de dondurularak saklandı. Daha sonra içerisinde 5ml tümör dissosiasyon enzim solüsyonu bulunan 50ml'lik konik tüpe (BD Falcon Biosciences) 5ml daha CAM eklendi ve içerisine küçültülen tümör dokusu parçaları aktarıldı. Ardından tüp, 37C^o

çalkalamalı su banyosuna konularak 2 saat enzim inkübasyonuna bırakıldı. İnkübasyon süresince 30 dakikada bir doku kontrol edildi ve vorteks işleme tabi tutuldu. İnkübasyon süresinin sonunda tüpün içine 20ml'lik CAM eklendi. 400g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelete 10ml taze CAM eklenerek resüspanse edildi. 400g'de 5 dakika santrifüj edildi. İşlem iki kez tekrarlandıktan sonra en son pelet 1ml CAM ile resüspanse edilerek önce 70mikrometrelik sonra 40 mikrometrelik hücre süzgeçlerinden (BD Falcon Biosciences) geçirildi. Tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp pelet 1.5ml CAM ile resüspanse edilerek bekletilmeden flowsitometre laboratuvarına getirildi.

Meme kanser kök hücrelerinin Akım Sitometrik Analizi: Meme kanser kök hücre dizisi yüzey ekspresyon belirteçleri bakımından akım sitometrik analiz kullanılarak tanımlandı. İzolasyonu tamamlanan kanser kök hücreleri 1.5ml CAM ile resüspanse edilerek flowsitometre laboratuvarına getirildi. Hücreler daha sonra 500g'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp pelete 1,5ml stain buffer (BD Pharmingen/BD Bioscience) eklendi; 5ml tüplere (BD Falcon Biosciences) 100µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her tüpe CD24 PE, CD44 FITC, CD31 FITC, CD18 FITC, CD16 FITC, CD140b PE, CD10 PE, CD19 PerCP-Cy5.5, CD2 FITC, CD3 PerCP CD227(MUC1) (BD Bioscience) hücre yüzey belirteçleri ve izotip kontrolleri 10µl eklenip 30dk inkübe edildi. Süre bitiminde 500µl stain buffer eklenip BD FACSCalibur cihazında okutuldu. Ayrıca sitoplazmik belirteçler için hücrelere Fixation/permeabilization Kit (BD Bioscience) kullanıldıktan sonra PE Cytokeratin 14, 15, 16 ve 19 Set (BD Bioscience) 20µl eklendi. 30dk inkübasyon sonrasında 500µl stain buffer eklenip BD FACSCalibur cihazında okutuldu. Akım sitometri analizinde lineage negatif hücre gruplarında CD44⁺/CD24⁻ ile MUC1⁺ hücrelerin dağılımları değerlendirildi. Lineage⁺ hücrelerde CD18⁺ hücrelerin dağılımları değerlendirildi.

3.1. İstatistiksel İşlemler: İstatistiksel analizler için "SPSS for Windows 13.0 versiyonu" kullanıldı. Karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi, korelasyon için Spearman's rho korelasyon testi kullanıldı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya meme kanseri nedeni ile opere edilen 23 bayan hasta dahil edildi. Hastaların yaş ortalaması 46.65 ± 10.98 (min-max: 24-79) yıl idi. Hasta özellikleri (Tablo 10) ve yüzey belirteç dağılımları (Tablo 11) aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 10: Hasta özellikleri

Prognostik faktörler	% (n)
Menopozal durum	
Premenopozal	52,2 (12)
Postmenopozal	47,8 (11)
Evre	
Erken evre	52,2 (12)
İleri Evre	47,8 (11)
Lenf nodu sayısı	
0-3	56,5 (13)
4 ve üstü	43,5 (10)
Grade	
Grade I	30,4 (7)
Grade II	56,5 (13)
Grade III	13 (3)
ER durumu	
Pozitif	65,2 (15)
Negatif	34,8 (8)
PR durumu	
Pozitif	47,8 (11)
Negatif	52,2 (12)
HER2 durumu	
Pozitif	34,8 (8)
Negatif	65,2 (15)

Tablo 11: Tümörlerin yüzey belirteç dağılımları

%	% \pm sd	Min-max
CD44⁺/CD24⁻	1.43 \pm 1.16	0.12-4.8
CD18⁺	27.9 \pm 26,5	0,53-81
MUC1⁺	6.07 \pm 11.34	0.19-44.5

CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücre dağılımının postmenopozal kadınlarda daha yüksek olduğu gözlemlendi; ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı (p=0,17). Hastaların evrelerine göre değerlendirme yapıldığında CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücrelerin dağılımı erken evrede daha yüksek saptandı; fakat istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,90). Lenf nodu sayısı arttıkça CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücre dağılımının azaldığı gözlemlendi; ancak anlamlılık bulunmadı (p=0,535). CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücre dağılımı tümör grade'yi arttıkça artmaktaydı; ancak anlamlılık bulunmadı (p:0,84). Hormon durumuna göre yapılan değerlendirmede CD44⁺/CD24⁻Lin⁻ hücre dağılımı ile ER/PR durumu arasında ilişki saptanmadı (p=0,49). HER2 negatif tümörlerde CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ hücre dağılımı artmaktaydı; ancak istatistiksel ilişki bulunmadı (p=0,19) (Tablo 12).

Tablo 12: Prognostik faktörlere göre CD44⁺/CD24⁻ hücre dağılımı

Prognostik faktörler	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	P
Menopozal durum		0,17
Premenopozal	1,03 ± 0,70	
Postmenopozal	1,88 ± 1,43	
Evre		0,9
Erken evre	1,61 ± 1,48	
İleri Evre	1,24 ± 0,71	
Lenf nodu sayısı		0,535
0-3	1,67 ± 1,44	
4 ve üstü	1,12 ± 0,61	
Grade		0,84
Grade I	1,25 ± 0,80	
Grade II	1,43 ± 1,22	
Grade III	1,87 ± 1,91	
ER durumu		0,69
Pozitif	1,48 ± 1,18	
Negatif	1,34 ± 1,20	
PR durumu		0,49
Pozitif	1,17 ± 0,76	
Negatif	1,61 ± 1,44	
HER2 durumu		0,19
Pozitif	1,04 ± 0,65	
Negatif	1,64 ± 1,34	

CD18⁺ hücre dağılımı ile menopoz durumu, evre, ER durumu, HER2 açısından istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı. Ancak PR durumu ile CD18⁺ hücre dağılımı ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (p=0,042). PR pozitif olanlarda CD18⁺ hücre dağılımı yüksekti. Lenf nodu sayısı arttıkça CD18⁺ hücre dağılımının azaldığı gözlemdi; ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,193) (Tablo 13).

Tablo 13: Prognostik faktörlere göre CD18⁺ hücre dağılımı

Prognostik faktörler	CD18	P
Menopozal durum		0,97
Premenopozal	28,16 ± 24,64	
Postmenopozal	27,75 ± 29,61	
Evre		0,35
Erken evre	33,21 ± 28,14	
İleri Evre	22,24 ± 24,58	
Lenf nodu sayısı		0,193
0-3	34,12 ± 27,14	
4 ve üstü	19,96 ± 24,66	
Grade		0,52
Grade I	21,04 ± 26,03	
Grade II	33,93 ± 25,26	
Grade III	18,26 ± 18,93	
ER durumu		0,061
Pozitif	37,08 ± 28,08	
Negatif	10,87 ± 10,86	
PR durumu		0,042*
Pozitif	39,5 ± 22,8	
Negatif	17,38 ± 26	
HER2 durumu		0,605
Pozitif	22,05 ± 23,79	
Negatif	31,12 ± 28,1	

* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

MUC1⁺ hücre dağılımının postmenopozal kadınlarda daha düşük olduğu gözlemdi; ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı (p=0,424). Hastaların evrelerine göre değerlendirme yapıldığında MUC1⁺ hücre dağılımının erken evrede daha düşük olduğu saptandı; fakat istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,25). Lenf nodu sayısı arttıkça MUC1⁺ hücre dağılımının arttığı gözlemdi; ancak anlamlılık bulunmadı

(p=0,264). MUC1⁺ hücre dağılımının tümör grade'i arttıkça azaldığı gözlemlendi; ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,20). Hormon durumuna göre yapılan değerlendirmede MUC1⁺ hücre dağılımı ile ER/PR durumu arasında bir ilişki saptanmadı. MUC1⁺ hücre dağılımı ile HER2 ekspresyonu arasında bir ilişki saptanmadı (p=0,561) (Tablo 14).

Tablo 14: Prognostik faktörlere göre MUC1⁺ hücre dağılımı

Prognostik faktörler	MUC1	P
Menopozal durum		0,424
Premenopozal	9,09 ± 14,98	
Postmenopozal	2,77 ± 3,65	
Evre		0,25
Erken evre	4,27 ± 9,75	
İleri Evre	8,03 ± 13,05	
Lenf nodu sayısı		0,264
0-3	4,09 ± 9,36	
4 ve üstü	8,64 ± 13,59	
Grade		0,20
Grade I	10,08 ± 12,33	
Grade II	4,86 ± 12,02	
Grade III	1,97 ± 0,55	
ER durumu		0,272
Pozitif	5,32 ± 11,44	
Negatif	7,47 ± 11,79	
PR durumu		0,35
Pozitif	5,54 ± 12,1	
Negatif	6,55 ± 10,6	
HER2 durumu		0,561
Pozitif	7,16 ± 11,97	
Negatif	5,49 ± 11,38	

5. TARTIŞMA

Skolastik hipotezin aksine, kanser kök hücre hipotezinde kanser gelişiminin sebebi tümör içindeki küçük bir hücre grubudur. Bu hücre grubu tümörogeneze sebep olurken, oluşturduğu diğer yavru hücreler ile de tümörün büyük çoğunluğunu oluşturan tümörojenik olmayan hücreleri oluşturur (158). Bu amaçla yapılan birçok çalışma sonrasında, özellikle de hayvan modelleri ve hücre dizi çalışmaları ile diğer solid tümörlerde olduğu gibi meme kanseri için de tümör başlatıcı özelliği olan hücreler tanımlandı. Bu hücreler yapılan çalışmaların genelinde $CD44^+/CD24^-$ yüzey belirteç ekspresyonuna göre tanımlanmaktadır (7,114,155). Çalışmamızda meme kanser kök hücresi, diğer çalışmalarda olduğu gibi $CD44^+/CD24^-$ fenotipi kullanılarak tanımlandı. Lineage negatif olan hücrelerde $CD44^+/CD24^-$ fenotipi bakıldı. Al Hajj ve ark'nın tanımladığı lineage belirteçleri kullanıldı. Bu belirteçler normal hücre varlığı ile ilişkili antijenlerdi (CD2, CD3, CD10,CD16,CD18,CD140B). Bu grubun çalışmasında KKH'da lineage belirteçlerinin ekprese edilmedikleri saptanmıştır (7). Çalışmamızda bu yüzey belirteçlere ek olarak diğer normal meme epitel hücre belirteci olan, Donti ve ark'larının çalışmasında bahsedilen (121) sitokeratin için de hücreler değerlendirildi. KKH'yı yüzey belirteçleri ile tanımlamanın yanında, akım sitometresi ile bu hücrelerin DNA içeriklerine bakarak ya da KKH olarak tanımladığımız hücrelerin hücre dizilerinde tümör oluşturma kapasitelerine bakarak da değerlendirme yapılabilirdi. Fakat olanakların kısıtlılığı nedeni ile sadece yüzey belirteçleri çalışıldı.

Al Hajj ve ark'larının çalışmalarında meme tümör dokusu örneklerinin tümünde $CD44^+/CD24^-$ hücreler saptandığı bildirilmektedir (7). Honeth ve ark'larının yaptığı çalışmada, tümör örneklerinin %31'inde $CD44^+/CD24^-$ hücreler saptanmıştır (159). Honeth ve ark'larının yaptığı çalışmaya benzeyen başka bir çalışmada da tümör örneklerinin %56'sında $CD44^+/CD24^-$ hücreler saptanmıştır (160). Bu son iki çalışma sonuçlarının Al Hajj ve ark'larından farklı olmasının sebebi kullanılan teknik ve doku farklılığına bağlanmıştır. Al Hajj ve ark'larının çalışmasında genelde metastatik dokular ve hücre süspansiyonu kullanılırken diğerlerinde immunhistokimyasal boyama ile patoloji preparatlarındaki primer meme dokusu kullanılmıştır. Çalışmamızda primer tümör dokuları kullanıldı ve tümör örneklerinin

hepsinde CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin olduğu görüldü. Bu sonuç Al Hajj ve ark'larının sonuçlarına benzerdi. Bulduğumuz sonucun diğer iki çalışmadan farklı olmasının nedeni hücre süspansiyonu kullanmamız olabilir.

Meme kanseri gibi solid tümörlerde kök hücre dağılımı, yani yüzdesi tümörün %1-2'si olarak kabul edilmektedir (7). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin dağılımı %1.43±1.16 idi. Tümör içerisinde aranan tümör başlatıcı grup, kök hücre özelliği gösteriyorsa dağılımın da kök hücreye benzer olacağı düşünüldüğü için bizim çalışma sonuçlarımızdaki dağılımlar anlamlı kabul edilebilir. Bunun yanında Abraham ve ark'ları tarafından yapılan çalışmada primer meme tümör dokularına CD44 ve CD24 için immunhistokimyasal boyama yapılmış ve dokularda %0-80 aralığında CD44⁺/CD24⁻ hücre yüzdesi tanımlanmıştır. Bunlarında yaklaşık 3/4'ünde (%78) CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi %10'nun altında saptanmıştır (156). İmmunhistokimyasal boyama ile yapılan başka bir çalışmada CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi %0-70 arasında tanımlanmış ve bu çalışmada dokuların %97.6'sında CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinin dağılımı %10'un altında bulunmuştur (160). Honeth ve ark'larının yaptığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (159). İmmunhistokimyasal boyama ile yapılan başka bir çalışmada ise ortalama CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi %4.4 olarak bildirilmiştir (165). Normal meme dokusundaki kök hücre yüzdesi yaklaşık %0.2, %1 ve %5 bildirilmiştir (111). Dağılım yüzdesi yüksek olan bu çalışmalarla aramızdaki farkın nedeni kullanılan teknik olabilir. Bizim çalışmamızda lineage belirteçlerine de bakılabildiği için CD44⁺/CD24⁻ mononukleer hücreler de ayırt edilebildi. Diğer çalışmalarda bu hücreler ayırt edilemediği için yüzdelere yüksek saptanmış olabilir.

Abraham ve ark'larının çalışmasında CD44⁺/CD24⁻ hücre dağılımı ile yaşam beklenti süresi arasında ters ilişki saptanmadığı bildirilmektedir (156). Hastalık evresi arttıkça hastaların yaşam beklentisi de azalmaktadır. Bu bilgiden yola çıkan Mylona ve ark'ları yaptıkları çalışmada CD44⁺/CD24⁻ hücre dağılımı ile evre arasında ters ilişki (p=0.068) saptandıklarını belirtmektedir. Aynı çalışmanın tartışmasında bu sonuçların, CD44⁺/CD24⁻ fenotipe sahip hücrelerin invaziv genlere sahip olduğunu ve hastaliksız sağ kalımı olumsuz etkilediklerini savunan çalışmalara ters düşmekte olduğu da bildirilmektedir (160,161,162). Hastaların evrelerine göre yüzey belirteç dağılımlarına baktığımızda CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ fenotipe sahip hücre

dağılımının erken evrede daha yüksek olduğu saptandı; fakat istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p=0.90$). Waterworth ve ark'larının da belirttiği gibi $CD44^+/CD24^-$ hücre dağılımını belirleyen etken tümör oluşumunda rol oynayan bu KKH'ların etkileşimde oldukları sinyal yolları olabilir (163).

Abraham ve ark'larının yaptığı çalışmada lenf nodu sayısı ve $CD44^+/CD24^-$ hücre yüzdesi arasında ilişki saptanmadığı bildirilmektedir (156). Honeth ve ark'larının bazal-like meme kanserlerinde yaptıkları çalışmada ise lenf nodu sayısı ve $CD44^+/CD24^-$ hücre yüzdesi arasında herhangi bir ilişki saptanmadığı belirtilmiştir (156). On iki çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde, $CD44^+/CD24^-$ hücre yüzdesi ile lenf nodu durumu arasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir (164). Bununla birlikte Mylona ve ark'larının yaptığı çalışmada, $CD44^+/CD24^-$ hücre yüzdesi ile lenf nodu arasında ters ilişki saptandığı belirtilmektedir ($p=0.019$) (160). Bizim çalışmamızda ise daha önceki çalışmalara benzer şekilde lenf nodu sayısı ile $CD44^+/CD24^-$ hücre yüzdesi arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

Yapılan bir çalışmada KKH dağılımı ile tümör grade'i arasında bir ilişki olup olmadığına bakılmış ve ilişki saptanmadığı bildirilmiştir (165). Bu yıl yayınlanan bir meta-analizde, biyolojik olarak agresif fenotiple karakterize histolojik yüksek grade ile KKH dağılımı arasında ilişki saptandığı belirtilmektedir (164). Çalışmamızda tümör grade'i ile $CD44^+/CD24^-$ hücrelerin yüzdesi kıyaslandığında, tümör grade'i arttıkça $CD44^+/CD24^-$ hücrelerin yüzdesinin arttığı gözlemlendi; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuç çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların sayısının az olması ile açıklanabilir.

Daha önce yapılan iki farklı çalışmada $CD44^+/CD24^-$ hücrelerin yüzdesi ile ER ve PR durumu arasında herhangi bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir (156,160). Ancak yapılan bir meta-analizde ER ve PR negatifliği ile KKH dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunduğu belirtilmektedir (164). Bizim çalışmamızda da diğer iki çalışmaya benzer şekilde $CD44^+/CD24^-$ hücrelerin yüzdesi ile ER durumu arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Ancak PR negatif olanlarda PR pozitif olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile $CD44^+/CD24^-$ hücrelerin yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Hasta sayımızın az olması nedeni ile istatistiksel anlamlılık saptanamamış olabilir.

Honeth ve ark'larının yaptığı çalışmada Cerb2 negatifliği (HER2 ekspresyonu

olmayan) ile CD44⁺/CD24⁻ fenotipi arasında ilişki saptandığı gösterilmiştir (159). Aulman ve ark'larının yaptığı çalışmada ise HER2 ekspresyonu olanlarda CD44⁺/CD24⁻ hücre sayısının yüksek bulunduğu bildirilmiştir (165). Buna ek olarak bir meta-analizde HER2 durumu ile KKH dağılımı arasında ilişki olmadığı gözlenmiştir (164). Çalışmamızda Cerb2 negatif tümörlerde CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi, Cerb2 pozitif tümörlere göre yüksek saptanmış olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık bulunmadı. Bizim hastalarımızda Cerb2 pozitif (8 hasta) ve negatif (15 hasta) hasta dağılımı eşit olmadığından istatistiksel anlamlılık elde edilememiş olabilir.

Yapılan çalışmalarda kök hücre dağılımı ile hasta yaşı arasında bir ilişki gösterilmemiş (159,160,165) olmasına rağmen bizim çalışmamızda CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi ile hasta yaşı arasında pozitif bir korelasyon saptandı.

CD18 bir mononükleer hücre yüzey belirteçidir. Çin'de 2000 yılında yapılan çalışmada lenf nodu negatif olanlarda lenf nodu pozitif olanlara kıyasla CD18⁺ ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu kanser oluşumu ve immunité arasındaki ilişkiyi destekleyen bir bulgudur (166). Çalışmamızı yaparken lineage antijenleri açısından dokuları incelediğimizde bazı tümörlerde CD18⁺ hücre dağılımının yüksek olduğu gözlemlendi. Bunun üzerine CD18⁺ hücre yüzdesi ile tümör evresi ve lenf nodu tutulumu açısından ilişkisi olup olmadığına da bakıldı. CD18⁺ hücre dağılımı erken evrede daha yüksek saptandı; ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Lenf nodu negatif olanlarda CD18⁺ hücre yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksekti. ER/PR durumuna göre CD18⁺ hücre dağılımı arasındaki farka bakıldığında CD18⁺ dağılımının PR pozitif olan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı (p=0.042). Literatürde bu konuyla ilgili bir bilgi tespit edilmedi.

MUC1, glandüler epitelin apikal tarafında eksprese edilen glikolize büyük trans-membran bir mütendir. Adezyon, gelişim ve farklılaşma gibi birçok fizyolojik rolü vardır. Meme başta olmak üzere kolon, böbrek, prostat ya da gastrointestinal karsinomlarda artmış ekspresyonu ve membrandaki yerinin değişmesi kötü prognoz ve kısa yaşam beklentisi ile ilişkili bulunmuştur. Aynı zamanda anti-tümör aşılarda yeni bir hedef olarak çalışılmaktadır (167). Bu nedenle çalışmamızda MUC1 ile evre ve grade arasında bir ilişki olup olmadığına bakıldı ve MUC1⁺ hücre dağılımının ileri

evre meme kanserlerinde yüksek olduğu gözlemlendi; ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu hasta sayımızın yeterli olmamasından kaynaklanabilir. MUC1⁺ hücre dağılımı ile grade arasında ise istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan ters bir ilişki mevcuttu.

Sonuç olarak çalışmamızda literatüre benzer şekilde tümör dokularının hepsinde CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin dağılımı %1.43±1.16 olarak bulundu. Çalışmamızda erken evre hastalıkta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bu hücre dağılımının yüksek olduğu görüldü. Prognostik faktörler ile CD44⁺/CD24⁻ hücre dağılımı arasında bir korelasyon saptamadık. ER/PR durumuna göre CD18⁺ hücre dağılımı arasındaki farka bakıldığında CD18⁺ hücre dağılımının PR pozitif olan hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p=0.042). Literatürde bu konuyla ilgili bir bilgiye rastlanmadı.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser kök hücre hipotezi, tümör içinde bulunan bir grup hücreyi tümör oluşumundan sorumlu tutmaktadır. Bu hipotez üzerinden meme kanser kök hücresi olarak tanımlanan CD44⁺/CD24⁻ fenotipe sahip hücrelerin erken evre ve ileri evre hastalıkta tümör dokusundaki dağılımını ve bunun prognostik faktörlerle ilişkisini değerlendirdik.

Sonuç olarak çalışmamızda literatüre benzer şekilde tümör dokularının hepsinde CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin dağılımının %1.43±1.16 olduğu görüldü. Evreye göre yüzey belirteç dağılımlarına bakıldığında CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ ve CD18⁺ hücre dağılımının erken evrede, MUC1⁺ hücre dağılımının ise ileri evrede daha yüksek olduğu saptandı; fakat istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. Tümör grade'i ile CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi kıyaslandığında, tümör grade'i arttıkça CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesinin arttığı gözlemlendi; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatüre uyumlu olarak CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi ile ER ve PR durumu arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Çalışmamızda, önceki çalışmalardan farklı olarak CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin yüzdesi ile hasta yaşı arasında pozitif bir korelasyon saptandı. ER/PR durumuna göre CD18⁺ hücre dağılımı arasındaki farka bakıldığında CD18⁺ dağılımının PR pozitif olan hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p=0.042). Çalışmamızda hasta sayımızın az olması nedeniyle Cerb2 ekspresyonu gibi özellikler açısından homojen bir grup oluşturulamadı. Bu da bazı sonuçlarımızın istatistiksel olarak anlamlılığını etkilemiş olabilir. Hastalık progresyonu açısından önemli olan bu belirteçlerin değerlendirilmesi için daha fazla sayıda hastanın bulunduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

KKH'yı sınırlı sayıda hücre yüzey belirteci kullanarak tanımlamak mümkün değildir; çünkü halen kanser hücrelerinin nasıl davranacağını bilmiyoruz. Hücreler stable olarak kalmamakta ve sürekli fenotipik değişikliğe uğramaktadır. CD44⁺/CD24⁻ hücre fenotipi ile tümör evre, grade, lenf nodu sayısı ve diğer faktörler açısından ilişki saptanamaması tüm olumlu gelişmelere rağmen kanser oluşumunun anlaşılması için daha çok araştırma yapmaya ihtiyacımız olduğunu ortaya koymaktadır.

7. ÖZET

Bu çalışmanın amacı, CD44⁺/CD24⁻ hücre yüzdesi ile klinikopatolojik ve prognostik faktörlerin ilişkisini araştırmaktır.

Materyal ve metod; çalışmaya meme kanseri nedeni ile opere edilen 23 bayan hasta dahil edildi. Hastaların yaş ortalaması 46.65±10.98 (min-max: 24-79) yıl olup bu hastaların %52.2'si (12 hasta) erken evre, %47.8'i (11 hasta) ileri evrede idi. Alınan tümör dokuları enzimatik olarak parçalandı; sonrasında yüzey belirteç antikoları kullanılarak CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ hücre fenotipi ve hücrelerin yüzey belirteç ekspresyonlarına göre yüzdesi belirlendi. Hasta evrelemesi için TNM evrelemesi ve grade için patolojik değerlendirme kullanıldı.

Sonuçlar; hastaların %65.2'sinde (15 hasta) ER/PR, %38.4'ünde (8 hasta) Cerb2 pozitif saptandı. ER/PR pozitif hastaların hepsinde ER pozitif iken 11 hastada (%47.8) PR pozitif saptandı. Tümör dokularının hepsinde CD44⁺/CD24⁻ hücreler mevcuttu. Tümörlerdeki CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ hücrelerin dağılımı ortalama 1.43±1.6 (min-max: 0.12-4,8) idi. CD18⁺ hücrelerin dağılımı ortalama 27.9±26,5 ve MUC1⁺ hücrelerin dağılımı ortalama 6.07±11.34 bulundu. ER/PR durumuna ve CD18⁺ hücre dağılımı arasındaki ilişkiye bakıldığında CD18⁺ dağılımının PR pozitif olan hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p=0.042). CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ hücre dağılımı ile menopoiz durumu, evre, grade, lenf nodu sayısı, hormon durumu ve HER2 durumu arasında bir korelasyon saptanmadı.

Tartışma; çalışmamızda literatüre benzer şekilde tümör dokularının hepsinde CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin yüzde ortalamasının %1.43±1.16 olduğu görüldü. Çalışmamızda erken evre hastalıkta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bu hücre dağılımının yüksek olduğunu bulduk. Prognostik faktörler ile CD44⁺/CD24⁻ hücre dağılımı arasında istatistiksel anlamlılık gösteren bir ilişki saptanmadı.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Kanser kök hücresi, CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻, CD18⁺, MUC1

8. ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the correlation between the percentages of CD44⁺/CD24⁻ cells and clinicopathologic and prognostic factors.

Material and Method; 23 women who undergo surgery for breast cancer enrolled in our study. Mean age of the patients was 46.65±10.98 (min-max: 24-79) years and 52.2% of the patients were in early stage breast cancer (12 patient), 47.8% of the patients were in advance stage breast cancer (11 patients). Tumor tissues that is taken from surgery, were broken up enzymatically and after then, using surface markers antibodies we identified CD44⁺/CD24⁻ cell phenotype and percentage was determined by surface marker expression of the cells. TNM staging was used for patients staging and pathological evaluation was used for grade.

Results; 65.2% of the patients were positive for ER/PR (15 patients) and 38.4% of the patients were positive for Cerb2 (8 patients). All of the patients with ER/PR positive were ER positive while 11 patients ((47.8) were PR positive. CD44⁺/CD24⁻ cells were present in all tumor tissues. In tumors, the mean proportion of the CD44⁺/CD24⁻ cells was 1.43±1.6 (min-max: 0.12-4,8). The mean percentage of CD18⁺ cells and MUC1⁺ were found 27.9±26,5% and 6.07±11.34%, respectively. When we investigated the correlation between the percentage of CD18⁺ cell and ER/PR status, in PR positive patients, the percentage of CD18⁺ cell was determined significantly higher than PR negative patients (p=0.042). We did not find correlation between the percentage of CD44⁺/CD24⁻ cells and menopause status, stage, grade, number of lymph nodes, hormone status, Cerb2 status.

Discussion; In our study we observed that CD44⁺/CD24⁻ cells were present in all tumor tissues and the mean percentage of this cell was 1.43±1.16%. In our study, the percentage of CD44⁺/CD24⁻ cell was higher in early stage disease although it was not statistically significant. The correlation was not found between prognostic factors and the percentage of the CD44⁺/CD24⁻ cells.

Key Words: Breast cancer, cancer stem cell, CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻, CD18⁺, MUC1

9. KAYNAKLAR

- 1- Parkin DM, Bray F, Ferlay J. (2005) Global Cancer Statistics. *Cancer J Clinic CA* 2002;**55**:74-108.
- 2- Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol* 1999;**21**:79-101.
- 3- Cobaleda C, Crus JJ, Gonzales-Sarmiento R. Emerging Picture of Human Breast cancer as a stem cell- based disease. *Stem Cell Rew* 2008;**4**:67-79.
- 4- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cell, cancer and cancer stem cell. *Nature*.2004;**414**:105-111.
- 5- Dick J.E. Breast Cancer stem cells revealed. *PNAS* 2003;**100**(7):3547-9.
- 6- Bueno JMG, Ocana A, Castro-Garsia P, et al. An update on the biology of cancer stem cells in breast cancer. *Clin Transl Oncol*.2008;**10**:786-793
- 7- Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:3983-8
- 8- Aydiner A, Topuz E. Onkoloji El Kitabı İstanbul: Turgut Yayıncılık, 2006;149-198
- 9- Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, et al. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Research*.2008;**10**:210-224.
- 10- Haydaroglu A, Dubova S, Özşaran Z, Bölükbaşı Y. Ege Üniversitesinde Meme kanserleri. *Meme Sağlığı Dergisi* 2005;**1**(1):6-7.
- 11- Bilgel N. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi. Ed: Kayhan E. *Meme Kanserleri*. Bursa; Nobel Tıp Kitabevi, 2005; 69-73.
- 12- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010;**60**:277-300.
- 13- Data on SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) cancer statistics available online at http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/results_merged/sect_04_breast.pdf (accessed October 11, 2006).
- 14- Peto J, Mack TM. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. *Nat Genet* 2000;**26**:411-4.
- 15- Malone KE, Dalling JR. BRCA1 mutation and breast cancer in general population analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first degree family history. *Journal of the American Medical Association*

1998;**279**:922-9.

16- Claus EB, Risch N. Autosomal dominant inheritance of early on set breast cancer implications for risk prediction. *Cancer* 1994;**73(3)**:643-651

17- Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;**15**:36-47.

18- MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, et al. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982;**30**:427-31.

19- Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, et al. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 1990;**46**:796-800.

20- Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2000;**152**:950-64.

21- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997;**350**:1047-59.

22- Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, et al. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest* 1988;**6**:245-54.

23- Bruzzi P, Negri E, La Vecchia C, et al. Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *BMJ* 1988;**297**:1096-8.

24- Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1994;**139**:819-35.

25- Colditz GA, Frazier AL. Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;**4**:567-71.

26- Stuebe AM, Willett WC, Xue F, et al. Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med* 2009;**169**:1364-71.

27- Jernström H, Lubinski J, Lynch HT, et al. Breast-feeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2004;**96**:1094-8.

28- Lahmann PH, Hoffmann K, Allen, N, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition

(EPIC). *Int J Cancer* 2004;**111**:762-71.

29- Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**:1218-26.

30- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996;**347**:1713-27.

31- Hankinson SE, Colditz GA, Manson JE, et al. A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer (Nurses' Health Study, United States). *Cancer Causes Control* 1997;**8**:65-72.

32- Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002;**346**:2025-323.

33- Chen WY, Hankinson SE, Schnitt SJ, et al. Association of hormone replacement therapy to estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma. *Cancer* 2004; **101**:1490-500.

34- Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003;**289**:3243-52.

35- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004;**291**:1701-12.

36- Costanza ME, Chen WY. Epidemiology and risk factors for breast cancer. UP TO DATE 2010.

37- Jatoi I, Chen BE, Anderson WF, et al. Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis. *J Clin Oncol* 2007;**25**:1683-90.

38- Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, et al. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;**15**:17-35.

39- Jemal, A, Thun, MJ, Ries, LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008;**100**:1672-94.

- 40- Palmer JR, Wise LA, Horton NJ, et al. Dual effect of parity on breast cancer risk in African-American women. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**:478-83.
- 41- Worsham MJ, Raju U, Lu M, et al. Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:5474-9.
- 42- Degnim AC, Visscher DW, Berman HK, et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol* 2007;**25**:2671-7.
- 43- Fisher B, Dignam J, Wolmark N, et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet* 1999;**353**:1993-2000.
- 44- Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, et al. Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981;**67**:327-33.
- 45- Maruti SS, Willett WC, Feskanich D, et al. A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;**100**:728-37.
- 46- Dallal CM, Sullivan-Halley J, Ross RK, et al. Long-term recreational physical activity and risk of invasive and in situ breast cancer: the California teachers study. *Arch Intern Med* 2007;**167**:408-15.
- 47- Willett WC, Rockhill B, Hankinson SE, et al. Nongenetic factors in the causation of breast cancer. In: Harris, JR, Lippman, ME, Morrow, M, Osborne, CK (Eds), *Diseases of the Breast*. 3rd ed, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004:223-76.
- 48- Brinton LA, Bernstein L, Colditz GA. Summary of the workshop: Workshop on Physical Activity and Breast Cancer 1997. *Cancer* 1998;**83**:595-9.
- 49- van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2000;**152**:514-27.
- 50- Key, TJ, Pike, MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;**24**:29-43.
- 51- Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV Jr, et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. *Arch Intern Med* 2007;**167**:2091-102.
- 52- Howe GR, Hirota T, Hislop TG. Dietary factor and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst*. 1990;**82**:561-569

- 53- Horn-Ross PL, Canchola AJ, West DW. Patterns of alcohol consumption and breast cancer risk in California Teacher Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.2004;**13**:405-11.
- 54- Boyd NF, Dite GS, Stone J, et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med* 2002;**347**:886-94.
- 55- Irwin ML, Aiello EJ, McTiernan A, et al. Physical activity, body mass index, and mammographic density in postmenopausal breast cancer survivors. *J Clin Oncol* 2007;**25**:1061-6.
- 56- Ziv E, Tice J, Smith-Bindman R, et al. Mammographic density and estrogen receptor status of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**:2090-5.
- 57- Wood WC, Muss HB, Solin LJ, et al. Malignant Tumors of the Breast. Chapter 43. In: Burstein HJ, Haris JR, Morrow M (Eds). *Cancer principles and practise of oncology*, 8th ed, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008:1606-54.
- 58- Ostroumova E, Preston DL, Ron E, et al. Breast cancer incidence following low-dose rate environmental exposure: Techa River Cohort, 1956-2004. *Br J Cancer* 2008;**99(11)**:1940-5.
- 59- Henderson, TO, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med* 2010;**152**:444-55.
- 60- John EM, Kelsey JL. Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;**15**:157-62.
- 61- Calle EE, Frumkin H, Henley SJ, et al. Organochlorines and breast cancer risk. *CA Cancer J Clin* 2002;**52**:301-9.
- 62- Narod SA. Modifier of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene* 2006;**25(43)**:5832-6.
- 63- Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J, et al. The CHEK2*1100delC variants acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple –case families. *Cancer Res* 2003;**63(23)**:8153-7.
- 64- Cullinane CA, Lubinski J, Neuhausen SL, et al. The pathology of familial breast cancer in BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Int J cancer* 2005;**117**:988
- 65- Lakhani SR, van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer; predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor,

progesterone receptor, HER-2 and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 2002;**20(9)**:2310-8.

66- U.S. Preventive Services Task Force. Genetic risk assesment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: recommendation statement. *Ann Intern Med* 2005;**143(5)**:355-61.

67- Pegram MD and Casciato DA. Breast Cancer. In: Casciato DA (Eds). Chapter 10. *Manual of Clinical Oncology*. 6th ed, Philedelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2009:237-64.

68- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of the breast cancer report of the National Surgical Adjuvant breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Ins.*1998;**90(18)**:1371-88.

69- Kuhl CK, Schrading S, Leutner CC, et al. Mammogarphy, breast ultrasound and magnetic resonance imaging for surveillance of women at high familial risk for breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;**23(33)**:8469-76.

70- Warner E, Plewes DB, Hill KA, et al. Surveillance of BRCA1 and BRCA2 mutation carrier with magnetic resononce imaging, ultrasound, mammography and clinical breast examination. *JAMA* 2004;**292(11)**:1317-25.

71- Port ER, Park A, Borgen PI, et al. Results of MRI screening for breast cancer in high risk patients with LCIS and atypical hyperplasia. *Ann Surg Oncol* 2007;**14(3)**:1051-7.

72- King MC, Wieand S, Hale K. et al. Tamoxifen and breast cancer incidence among with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast Bowel Project (NSABP-PI) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA* 2001;**286(18)**:2251-6.

73- Narod SA, Brunet JS, Ghadirian P, et al. Tamoxifen and risk of contralateral breast in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case control study. Hereditary Breast Clinical Study Group. *Lancet* 2000;**356(9245)**:1876-81.

74- Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP study Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* 2006;**295(23)**:2727-41.

75- Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, et al. Breast cancer after

- prophylactic bilateral mastectomy in women with BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2001;**345(3)**:159-64.
- 76- Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, et al. Bilateral prophylactic mastectomy reduces cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE study Group. *J Clin* 2004;**22(6)**:1055-62.
- 77- Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al. Bilateral prophylactic oophorectomy in case BRCA1 and BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002;**346(21)**:1616-22.
- 78- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 Breast cancer cases. *Cancer* 1989;**63(1)**:181-7.
- 79- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(18):3817-27.
- 80- Schnitt SJ. Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practise: what's the question? *J Clin Oncol* 2006;**24(12)**:1797-9
- 81- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human Breast Cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 1987;**235(1)**:177-182.
- 82- Piccart-Gebhart MJ. Anthracyclines and tailoring of the treatment for early breast cancer. *N Engl J Med* 2006;**354(20)**:2177-9.
- 83- Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, et al. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;**26(34)**:5544-52.
- 84- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;**25(1)**:118-45
- 85- Chang J, Hilsenbeck SG. Prognostic and predictive markers. In: Haris LM Jr. Eds. *Diseases of the breast*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2004;**675**.
- 86- NCCN Practice Guidelines. Invasive Breast Cancer. 2009;1:full text

- 87- Lippman ME. Breast Cancer. Chapter 76. Kasper D, Braunwald E, Hauser SL, et al (Eds). *Harrisons's Principles of Internal Medicine* 16th Ed, USA. MC Graw-Hill 2005;516-523.
- 88- Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginester C, et al. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 2008;**75**:75-84.
- 89- Kordon EC, Smith GH. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 1998;**125**:1921-30.
- 90- Chepko G, Smith GH. Three division–compotent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. *Tissue Cell* 1997;**29**: 239-53.
- 91- Sting J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; **439**:993-7.
- 92- Deome KB, Faulkin LJ, Bern HA, et al. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female CH3 mice. *Cancer Res* 1959;**19**:515-20.
- 93-. Boecker W, Moll R, Dervan P, et al. Common adult stem cells in human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new biological concept. *Laboratory Investigation* 2002;**82**:737-45.
- 94- Bazlar M, Winter MJ, de Boer CJ, et al. The biology of 17-1A antigens (Ep-CAM). *J Mol Med* 1999;**77**:699-712.
- 95- Gudjonsson T, Villiadsen R, Nielsen HL, et al. Isolation, immortalization and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 2002;**16**; 693-706.
- 96- Sting J, Eaves CJ, Kuusk U, et al. Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal human breast. *Differentiation* 1998;**63**:201-213.
- 97- Dontu G, Abdallah WH, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;**17**:1253-1270.
- 98- Asselin-Labat ML, Shackleton M, Sting J, et al. Steroid receptor status of Mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst* 2006;**98**:1011-4.
- 99- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006;**439**:84-88.

- 100- Kenney NJ, Smith GH, Lawrence E, et al. Identification of stem cell units in the terminal end bud and duct of the Mouse mammary gland. *J Biomed Biotechnol* 2001;**1**:133-143.
- 101- Smith GH. Label-retaining epithelial cells in Mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* 2005;**132**:681-7.
- 102- Welm BE, Tepera SB, Venezia T, et al. Sca-1 cells in the Mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* 2002;**245**:42-56.
- 103- Hirschamann-Jax C, Foster AF, Wulf GG, et al. A distinct “side-population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:14228-33.
- 104- Goodell MA, McKinney-Freeman S, Camargo FD. Isolation and characterization of side population cells. *Methods Mol Biol* 2005;**290**:343-52.
- 105- Smalley MJ, Clarke RB. The mammary gland “side population”: a putative stem/progenitor cell marker? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005;**10**:17-32.
- 106- Welm B, Behbod F, Goodell MA, et al. Isolation and characterization of functional mammary gland stem cell. *Cell Prolif* 2003;**36**:17-32.
- 107- Clayton H, Titley I, Vivanco M. Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp cell Res* 2004;**297**:444-460.
- 108- Clarke RB, Spence K, Anderson E, et al. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol* 2005;**277**:443-456.
- 109- Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, et al. Functional and molecular characterization of mammary side population cells. *Breast Cancer Res* 2003;**5**:R1-R8
- 110- Clarke RB, Anderson E, Howell A, et al. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2003;**36**:45-48.
- 111- Kalirai H, Clarke RB. Human breast epithelial stem cells and their regulation. *J Pathol* 2006;**208**:7-16.
- 112- Kim Jb, Zaehres H. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008;**454**:646-50.
- 113- Wicha MS, Dontu G. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol*

Neoplasia 2005;**10**:75-86.

114- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vivo propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;**65**:5506-11.

115- Farnie G, Clarke RB, Spence K, et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: Role of Notch and EGF receptor signalling pathways. *J Natl Cancer Inst* 2007;**99**(8):616-27

116- Ginestier GV, Hur MH, Charafe-Jauffret E, 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):555-567.

117- Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007;**6**(19):2332-8

118- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;**367**:645-8.

119- Hemati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:15178-83

120- Al Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004;**23**:7274-82.

121- Dontu G, Al Hajj M, Abdallah WM, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 2003;**1**:59-72.

122- Farnie G, Clarke RB. Breast Stem Cell and Cancer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007. *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, Vol 5, 141-153
123- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;**432**:324-31.

124- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;**448**(7151):313-7.

125- Takasashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663-76.

126- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004;**306**:1568-71.

127- Bapat S, Collins A, Dean M, et al. Cancer stem cell: Identification and targets. In: Bapat S (Ed). *Cells Stem Cells USA*: John Wiley & Sons. 2009;1-20.

- 128- Makino S. Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of rats. *Ann N Y Acad Sci* 1956;**63**:818-30.
- 129- Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of a single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 1964;**24**:1544-51.
- 130- Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;**66**:1883-90.
- 131- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumors; accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:755-68.
- 132- Baum CM, Weissmann IL, Tsukamoto AS, et al. Isolation of a candidate human hematopoietic stem –cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:2804-8.
- 133- Spangrude GJ, Aihara Y, Weissman IL. The stem cell antigens Sca-1 and Sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets. *J Immunol* 1988;**141**:3697-707.
- 134- Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993;**2**:137-144.
- 135- Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;**103**:2332-36.
- 136- Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;**19**:1-22.
- 137- Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:832-44.
- 138- Ignatova T, Kukekov VG, Laywell ED, et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002;**39(3)**:193-206.
- 139- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;**63(18)**:5821-8.
- 140- Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;**65(23)**:10946-51.
- 141- Li Y, Welm B, Podsypanina K, et al. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100(26)**:15853-8.
- 142- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable

- of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;**445(7123)**:106-10.
- 143- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;**445(7123)**:111-5.
- 144- Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;**5(4)**:275-84.
- 145- Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006;**24(1)**:3-12.
- 146- Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;**183**:1797-806.
- 147- Chuthapisith S, Robins RA, Eremin O. Increased presence of stem/progenitor cell subtypes. In: proceedings presence of the 99th annual meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 12-16 2008; San Diego, CA, Philadelphia (PA): AACR; Abstract number 3205;2008
- 148- Steiniger SCJ, Copinger JA, Kruger JA, et al. Quantative mass spectrometry identifies drug targets in cancer stem cell-containing side population. *Stem cell* 2008;**26**:3037-46.
- 149- Phillips TM, McBride WH; Pajonk F. The response of CD44+CD24-/low breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98(24)**:1777-85.
- 150- Jelski W, Zalewski B, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase(ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH1) activity in the sera of patients with liver cancer. *J Clin Lab Anal* 2008;**22(3)**:204-9.
- 151- Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS One* 2008;**3(6)**:e2428.
- 152- Bao F, Polk P, Nordberg ML, et al. Comparative gene expression analysis of a chronic myelogenous leukemia cell line resistant to cyclophosphamide using oligonucleotide arrays and response to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res* 2007;**31(11)**:1511-20.
- 153- Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 2005;**115(6)**:1503-21.

- 154- Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: review. *ANZ J Surg* 2007;**77(6)**:464-8.
- 155- Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al. CD44+CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006;**8(5)**:R59.
- 156- Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44+CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;**11(3)**:1154-9.
- 157- Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006;**12(19)**:5615-21.
- 158- Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cell in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007;**18(5)**:460-6.
- 159- Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M et al. The CD44 +/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* 2008;**10(3)**:53-65.
- 160- Mylona E, Ionna G, Emmanouil F, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24-/low and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human Pathology* 2008;**39(7)**: 1096-1102.
- 161- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007;**11(3)**:259-73.
- 162- Liu R, Wang X, Chen G, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cell. *N Eng J Med* 2007;**356(3)**:217-26.
- 163- Waterworth A. Introducing the concept of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* 2004;**6(1)**:53-4.
- 164- Zhou L, Jiang Y, Yan T, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res*. 2010;**122(3)**:795-801.
- 165- Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, et al. Reduction of CD44+/CD24- breast cancer cells by conventional cytotoxic chemotherapy. *Human Pathology* 2010;**41(4)**:574-81.
- 166- Zhang J, Wu X, Huang J. Clinical study on expression level of lymphocyte function –related antigen of breast cancer patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za*

Zhi 2000;**20(2)**:110-2.

167- Leroy X, Buisine MP, Leteurte E, et al. MUC1: A key molecules of carcinogenesis? *Ann Pathol* 2006;**26(4)**:257-66.