

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNİN PROGNOZUNU ETKİLEYEN
MİRNA'LAR**

**UZMANLIK TEZİ
DR. AÇELYA GÖKDENİZ YILDIRIM**

**DANIŞMAN
PROF.DR. ARZU YAREN**

DENİZLİ – 2019

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNİN PROGNOZUNU ETKİLEYEN
MİRNA'LAR**

**UZMANLIK TEZİ
DR. AÇELYA GÖKDENİZ YILDIRIM**


**DANIŞMAN
PROF.DR. ARZU YAREN**


Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 26.06.2018 tarih ve 2018TPF010 nolu kararı ile desteklenmiştir.

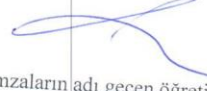
DENİZLİ - 2019

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Arzu YAREN danışmanlığında Dr. Açıya GÖKDENİZ YILDIRIM tarafından yapılan 'Meme kanserinin prognozunu etkileyen miRNA'lar' başlıklı tez çalışması 26.11.2019 tarihinde yapılan tez sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucunda jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı' nda tıpta uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Arzu Yaren


ÜYE Prof. Dr. Zübeyra Yılmaz


ÜYE Dr. Öğr. Üyesi Sezgin Toprak


Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu doğrularım.

Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Dört yıllık uzmanlık eğitimim süresince her daim bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Nadir YÖNETÇİ ve bu tezin hazırlanmasında bana tüm özveri ve sabrıyla yardımcı olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arzu YAREN olmak üzere tüm saygıdeğer hocalarıma,

Hayatıma girdikten sonra beni her zaman destekleyen en yakın arkadaşım, sevgili eşim Dr. Onurcan YILDIRIM'a,

Bu güne kadarki eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen kıymetli annem Nalan ve babam Hüseyin Osman GÖKDENİZ'e ve sevgili kardeşim Beliz GÖKDENİZ'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca dostluklarını hep yanımda hissettiğim sevgili eş kıdem arkadaşlarım Dr. Merve ERKEK TÜFEK, Dr. Merve BATUR ve Dr. Taliha GÜÇLÜ KANTAR'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Sayın Aydın DEMİRAY hocama ve tüm Tıbbi Biyoloji asistanlarına,

İstatistik bilgilerinden yararlandığım ve hiçbir zaman güler yüzünü eksik etmeyen Hande ŞENOL'a,

Çalışma hastalarını toplamama yardımcı olan başta Gamze DURAL ve tüm Tıbbi Onkoloji Kemoterapi Ünitesi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
ÖZET.....	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIV
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	2
I. MEME KANSERİ GENEL BİLGİLER.....	2
1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	2
2. Meme Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri	3
3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması	7
4. Meme Kanserinde Evreleme.....	11
5. Meme Kanserinde Tarama ve Erken Tanı.....	14
6. Meme Kanserinde Tedavi	17
II. MİKRORNA İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	21
1. MikroRNA'ların Tarihçesi	21
2. MikroRNA'ların Biyogenezi	21
3. MikroRNA'ların İşlevleri.....	22
4. MikroRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi.....	22
5. MikroRNA'ların Kanserle İlişkisi	23
6. Meme Kanserinde Biyobelirteç Olarak MikroRNA'nın Yeri	28
MATERYAL VE METHOD.....	33
1. ÖRNEK TOPLANMASI.....	33
2. TOTAL MİRNA İZOLASYONU	33
3. MİRNA cDNA SENTEZİ.....	34
4. REAL-TİME PCR (qRT-PCR)	34
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	35
BULGULAR	36
1. HASTALARIN ÖZELLİKLERİ.....	36

2. TEDAVİ ÖNCESİ MİRNA EKSPRESYON SEVİYELERİNİN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERE GÖRE ANALİZİ	38
3. TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI MİRNA EKSPRESYON ANALİZİ.....	51
3.1. Tüm Hastaların Tedavi Öncesi ve Sonrası Mirna Değişim Analizi	51
3.2. Hastaların Moleküler Alt tiplere göre tedavi öncesi ve sonrası mirna değişim analizleri	53
TARTIŞMA.....	57
SONUÇ	73
KAYNAKLAR.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ADH:** Atipik duktal hiperplazi
- AI:** Aromataz İnhibitörü
- AIDS:** Akkiz immün yetmezlik sendromu
- AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- ALH:** Atipik lobüler hiperplazi
- ATM:** Ataksi Telenjektazi
- BRCA:** *Breast cancer gen*
- CA-15-3:** kanser antijeni
- CDH1:** *Cadherin-1*
- CDK:** Siklin bağımlı kinaz
- CEA:** karsinoembriyonik antijen
- CHEK2:** *checkpoint kinase 2*
- CK:** Sitokeratin
- DCIS:** Duktal karsinoma in situ
- ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group
- EGFR:** epidermal büyüme faktör reseptörü
- EMT:** epitelyal-mezenkimal geçiş
- EPO:** eritropoietin
- ER:** Östrojen reseptörü
- ESMO:** European Society for Medical Oncology
- GnRH:** gonadotropin salgılayan hormon
- HBOC:** Herediter meme-over sendromu
- HCV:** Hepatit C virüsü
- HER-2:** İnsan epidermal büyüme faktörü 2

HRT: Hormon replasman tedavisi

IDK: invaziv duktal karsinoma

IGF-1: insülin-benzeri büyüme faktörü-1

IHK: immünhistokimyasal

IL: İnterlökin

ILK: invaziv lobüler karsinoma

ITH: izole tümör hücreleri

KLL: kronik lenfositik lösemi

LCIS: Lobüler karsinoma in situ

MiRNA/miR: MikroRNA

MLH1: *mutL homolog 1*

MRG: manyetik rezonans

MTDH: metadherini

NF-B: Nükleer faktör kappa B

ORF: Open Reading Frame

PARP: poli ADP riboz polimeraz

PFS: progresyonsuz sağkalım

PiRNA: piwi-interacting RNA

PR: Progesteron reseptörü

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

RISC: RNA kaynaklı susturma kompleksi

RR: Rölatif risk

RT: Radyoterapi

RT-PCR: Reverse transkriptaz/polimeraz zincir reaksiyonu

SERDs: Selektif östrojen reseptör azaltıcı

SERMs: Selektif östrojen reseptör modülatörü

SiRNA: small interfering RNA

STK11: *Serine/threonine kinase 11*

UTR: Translasyona uğramayan bölge

WHO: World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Uluslararası Kanser Ajansı kanser yeni tanı ve ölüm vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (https://gco.iarc.fr/today/home)	2
Şekil 2. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye’de kanserlerin cinsiyete göre dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (https://gco.iarc.fr/today/home)	3
Şekil 3. Tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası miRNA değişimlerinin grafiksel anlatımı	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Meme kanseri etyolojisinde rol oynayan başlıca genetik faktörler	4
Tablo 2. Meme kanseri tiplerinin major moleküler subtipleri	9
Tablo 3. Meme kanseri özel tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri	10
Tablo 4. TNM sınıflamasının T faktörü (41).....	11
Tablo 5. TNM sınıflamasında N faktörü klinik sınıflama (41).....	12
Tablo 6. TNM sınıflamasında N faktörü patolojik sınıflama (41)*	13
Tablo 7. TNM sınıflamasının M faktörü (41).....	13
Tablo 8. TNM sınıflamasına göre meme kanserinde evreleme (41)	14
Tablo 9. Risk seviyelerine göre meme kanseri risk faktörleri (43)	15
Tablo 10. HBOC hastalarının meme kanseri açısından takibi.....	16
Tablo 11. Meme kanserindeki tümör supressör microRNA'lar (89).....	26
Tablo 12. Meme kanserindeki onkojenik mikroRNA'lar (onkomiRler) (89).....	27
Tablo 13. Moleküler alt-tip ilişkili miRNA'lar(89)	29
Tablo 14. Çalışma hastalarının sosyodemografik özellikleri.....	37
Tablo 15. Çalışma hastalarının moleküler alt tiplere göre dağılımı	38
Tablo 16. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin yaşa göre analizi.....	39
Tablo 17. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin menapozal duruma göre analizi	40
Tablo 18. Östrojen reseptörüne (ER) göre analizi	42
Tablo 19. Progesteron reseptörüne (PR) göre analizi	43
Tablo 20. C-erbB-2 (Her2/neu) ye göre analizi	44
Tablo 21. Tümör çapına göre tedavi öncesi miRNA ekspresyon farklılıklarının analizi	45
Tablo 22. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin lenf nodu metastazı durumuna göre analizleri.....	46
Tablo 23. Tanı anında metastatik meme kanserine sahip hastalardaki tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeyi analizleri.....	47
Tablo 24. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin kemoterapi sonrası gelişen nötropeni varlığına göre analizleri.....	48
Tablo 25. Luminal A'nın diğer alttiplere göre mirna ekspresyon farklılıkları	49
Tablo 26. Luminal B'nin diğer alttiplere göre mirna ekspresyon farklılıkları	50
Tablo 27. Üçlü negatif grubun diğer alttiplere göre mirna ekspresyon farklılıkları ...	51
Tablo 28. Tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası miRNA ekspresyon değişimlerinin analizi	52
Tablo 29. Luminal A grubunun tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası mirna ekspresyon değişimleri.....	54
Tablo 30. Luminal B grubunun tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası mirna ekspresyon değişimleri.....	55
Tablo 31. Üçlü negatif grupta tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası mirna ekspresyon değişimleri.....	56

ÖZET

Meme kanserinin prognozunu etkileyen mirna'lar

Dr. Açelya GÖKDENİZ YILDIRIM

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve çoğu ülkede kadınların kanserden ölümlerin ana nedenidir. Meme kanserinin tanısında ve prognozunu belirlemede pek çok faktör bulunmaktadır. MiRNA'ların meme kanseri patogenezinde rol oynadığının belirlenmesi, miRNA'ların ileride meme kanserinin tanı ve tedavisinde de yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, 40 tedavi almamış invaziv meme kanseri tanılı hastanın, tanı anında ve tedavi sonrasında serum miRNA düzeylerini inceledik. Amacımız, meme kanserinde klinikopatolojik parametreler ile ilişkili olabilecek miRNA'ları saptamak ve bunların prediktif ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini araştırmaktır.

Çalışmamıza Temmuz 2018 ve Ağustos 2019 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran 40 tedavi almamış invaziv meme kanseri tanılı hasta alındı. Hastaların tanı anında ve tedavi sonrasında plazmasında, daha önceden belirlenmiş olan 20 miRNA'nın (miR-105, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-210, miR-375, miR-34a, miR-133a, miR-155, miR-139-5p, miR-143, miR-145, miR-365, miR-299-5p, miR-411, miR-452 ve miR-17) ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Moleküler alt gruplara göre luminal A, luminal B, Her2+ ve üçlü negatif olarak 4 gruba ayrılan hastaların arasındaki miRNA farklılıkları incelendiğinde, luminal A grubunda 3 miRNA'nın (miR-105, miR-200b ve miR-375) anlamlı olarak daha yüksek saptandığı ve luminal B grubunda miR-133a'nın istatistiksel olarak anlamlı olma eğilimi gösteren yüksekliği tespit edildi. Çalışılan miRNA'lardan 9 tanesinin (miR-105, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-34a, miR-452) tedavi sonrasında anlamlı olarak arttığı, 5 tanesinin (miR-155, miR-143, miR-145, miR-365, miR-299-5p) anlamlı olarak azaldığı görüldü. Bu değişim ve farklılıkların hastaların takibi ve prognozunu değerlendirmede yol gösterici olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak invaziv meme kanseri hastalarının plazmasında saptanan miRNA'lar, meme kanserinde prediktif ve prognostik değerini belirlemede ümit verici yeni bir

gelişmedir. miRNA'ların klinik kullanıma girebilmesi için bu konuda daha fazla hasta sayısını içeren ve uzun takipli çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnvaziv meme kanseri, miRNA, prediktif biyobelirteç, prognostik biyobelirteç

SUMMARY

MiRNAs that affect the prognosis of breast cancer

Dr. Açelya GÖKDENİZ YILDIRIM

Breast cancer is the most common cancer in women and the primary reason of women's death in many countries. There are a number of factors in diagnosing breast cancer and determining its prognosis. The recognition of miRNAs' critical role in the pathogenesis of breast cancer lead one to believe that miRNAs could be useful in the diagnosis and treatment of breast cancer in the future. In this study, the serum miRNA profiles of 40 patients diagnosed with invasive breast cancer who received no treatment were examined during diagnosis and after treatment. The purpose of this study is to identify miRNAs which could be linked to clinicopathologic parameters in breast cancer and examine their utility as predictive and prognostic biomarkers.

40 patients diagnosed with invasive breast cancer who received no treatment and applied to Pamukkale University's Medical Oncology Subdivision between July 2018 and August 2019 were included in this study. The expression levels of 20 miRNA's (miR-105, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-210, miR-375, miR-34a, miR-133a, miR-155, miR-139-5p, miR-143, miR-145, miR-365, miR-299-5p, miR-411, miR-452 ve miR-17) which were previously specified in plasma of patients were analyzed during diagnosis and after treatment. When the miRNA differences among patients who were based on molecular subtypes separated into four groups as Luminal A, Luminal B, HER2+ and triple-negative were examined, it was found that 3 miRNAs (miR-105, miR-200b and miR-375) were significantly higher in the group Luminal A, and that miR-133a's highness in the group Luminal B had the tendency to be statistically significant. It was observed that nine miRNAs examined (miR-105, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-34a, miR-452) significantly increased while five (miR-155, miR-143, miR-145, miR-365, miR-299-5p) significantly decreased. It has been concluded that these variations and differences can be instructive in following up patients and evaluating their prognosis.

As a conclusion, the miRNAs identified in the plasma of patients diagnosed with invasive breast cancer is a new development in determining predictive and

prognostic value of breast cancer. More studies with a longer time span and with more patients are needed to be able to include miRNAs in clinical studies.

Key words: Invasive breast cancer, miRNA, predictive biomarker, prognostic biomarker

GİRİŞ VE AMAÇ

Kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri, çoğu ülkede kadınların ana ölüm nedenleri arasında yer alan önemli bir halk sağlığı sorunudur(1). Yaş, kadın cinsiyet ve genetik faktörler meme kanserinin başlıca risk faktörlerini oluşturur. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de meme kanseri prevalansı her geçen gün artış göstermektedir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre Türkiye'deki 103 bin yeni kanser vakasının %10.6 (yaklaşık 22 bin)'sını meme kanseri oluşturmaktadır.

Meme kanseri genetik, epigenetik ve transkriptomik değişiklikler nedeniyle farklı histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik süreçleri farklı, tedavilere verdikleri cevapları farklı olan heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenite hastalığın kişisellik göstermesinin ve hastalığın prognozundaki değişikliklerin ana sebebidir. Gen ekspresyon profili gibi moleküler yöntemlerin gelişmesiyle yeni bir sınıflama olan "Moleküler sınıflama" ya geçilmiş olup hedefe yönelik tedavi ve bireyselleştirilmiş tedavinin önü açılmıştır (32). Günümüzde hastalar moleküler sınıflamaya göre luminal A, luminal B(Her2 pozitif ve negatif grup), Her2 ve üçlü negatif olarak 4 gruba ayrılmaktadır.

MikroRNA'lar 20-21 nükleotid uzunluğunda post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu kontrol eden ve kodlanmayan RNA regülatörleridir. MiRNA'ların hücre gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozis ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (63). Ayrıca, miRNA'ların %50'den fazlasının kanserle ilişkili genomik alanlarda ya da kolay kırılabilen bölgelerde yer aldıkları saptanmıştır(68, 74, 75). Mirnalar kanser üzerindeki etkilerini tümör supressör veya onkogen veya hem tümör supressör hem onkogen olarak gösterirler.

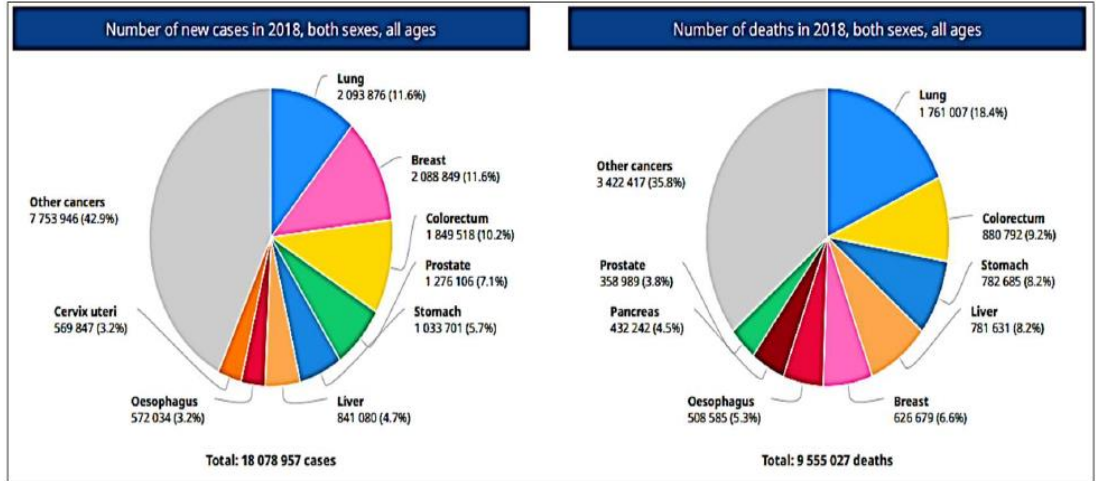
Meme kanserinin tanı ve tedavisinde son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. MiRNA'ların meme kanseri patogeneziindeki rolü çeşitli çalışmalarla aydınlandıkça, meme kanserinin tanı, prognoz takibi ve tedavi yanıtını değerlendirmede klinisyenlere yol gösterecek yeni biyobelirteçler ortaya çıkmıştır. Biz çalışmamızda, yeni tanı meme kanseri hastalarında prediktif ve prognostik değer taşıyabilecek mikronları tedavi öncesi ve sonrası hasta plazmasında araştırdık. Saptadığımız mirnaları önce hastaların klinikopatolojik özellikleri ile karşılaştırdık ve daha sonra tedaviyle değişimlerini inceledik. Amacımız, hastalığın tanı ve takibini kolaylaştıran, klinisyene tedavi seçimi ve hastalığın seyri hakkında fikir verebilecek minimal invaziv biyobelirteçleri saptamak ve yeni çalışmalara öncülük etmektir.

GENEL BİLGİLER

I. BÖLÜM: MEME KANSERİ GENEL BİLGİLER

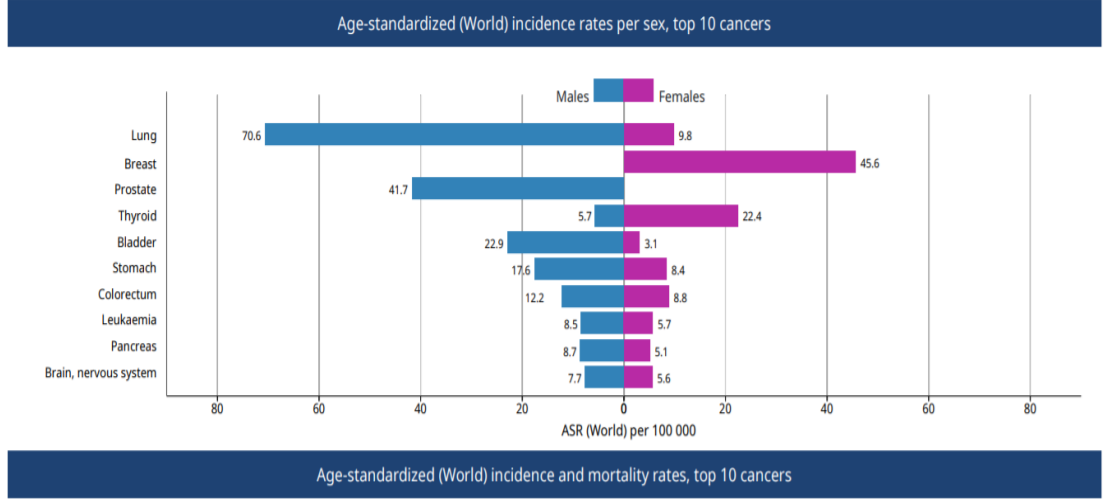
1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri, çoğu ülkede kadınların ana ölüm nedenleri arasında yer alan önemli bir halk sağlığı sorunudur(1). 2018 GLOBOCAN (uluslararası kanser ajansı) istatistiklerine göre, tüm dünyada yaklaşık 18 milyon yeni kanser vakasının yaklaşık 2 milyonu (%11.6) meme kanseri tanısı almış ve bunların 626 bini ölümlle sonuçlanmıştır (Şekil-1)(2). Bu rakamlar 2012 deki verilerle karşılaştırıldığında %15 lik bir artış olduğu görülmektedir ve dünya çapında kadın meme kanseri insidansının 2050 yılına kadar yılda yaklaşık 3,2 milyon yeni vakaya ulaşacağı tahmin edilmektedir(3).



Şekil 1. Uluslararası Kanser Ajansı kanser yeni tanı ve ölüm vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

Türkiye’de coğrafi, ekonomik, sosyal ve kültürel faktörler nedeniyle 2000’li yıllarda meme kanseri insidansının dağılımı farklı bölgelerde değişim göstermiştir. Türkiye’nin batısındaki meme kanseri insidansı (50 / 100.000), “batılılaşan yaşam” (erken menarş, geç menopoz, ilk doğum > 30 yaş, daha az emzirme vb.) nedeniyle Türkiye’nin doğu kısmından (20 / 100.000) iki kattan fazla görülmektedir(4). GLOBOCAN 2018 verilerine göre Türkiye’deki 103 bin yeni kanser vakasının %10.6 (yaklaşık 22 bin)’ sını meme kanseri oluşturmaktadır. Meme kanseri erkeklerde en sık görülen kanserler arasında ilk 10 sıralamada yer almazken, kadınlarda %45.6’lık oranla ilk sıradadır(Şekil-2) ve tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de insidansının giderek arttığı görülmektedir.



Şekil 2. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye'de kanserlerin cinsiyete göre dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

2.Meme Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

Meme kanseri insidansı, diğer malignensilere oranla daha erken yaşlarda artış gösterir. Meme kanseri için yaşa özgü insidans oranlarındaki bu erken artış, meme dokularının ergenlikten menopoza kadar aktif olan ovarian hormonlarına karşı duyarlılığına bağlanmaktadır(5). Bununla birlikte meme kanserinin iyi bilinen birçok risk faktörü bulunmaktadır.

2.1.Yaş ve Cinsiyet

Kadın cinsiyet bilinen en önemli risk faktörüdür ve erkeklere oranla 1000 kat daha artmış riski ifade eder. Riskin ortaya çıkışı yaşın ilerlemesi ile birlikte artış gösterir(13).

2.2.Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler

Aile öyküsü meme kanserinin en iyi bilinen risk faktörlerinden biridir. Annesi veya kız kardeşinde meme kanseri öyküsü olan bir kadının hastalığa yakalanma riski 2-3 kat artış göstermektedir(6). Yapılan çalışmalar ışığında, tüm meme kanseri olguların yaklaşık % 7'sinin kalıtsal genlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Over ve meme kanseri ile ilişkisi gösterilen ilk gen olan BRCA1 geni erken başlangıçlı hastalık ile ilişkilendirilmiş olup , bu gene sahip taşıyıcılarda yaş arttıkça da hastalık prevalansının arttığı gözlenmiştir(5). BRCA1 gibi meme kanserinde rol oynadığı ortaya çıkan birçok başka genetik bölge tespit edilmiştir. Meme kanserinde başlıca rol oynayan genetik faktörler Tablo-1 de verilmiştir (7, 8).

Tablo 1. Meme kanseri etyolojisinde rol oynayan başlıca genetik faktörler

BRCA1 ve BRCA2	Herediter meme-over kanseri Sendromu
p53	Li-Fraumeni sendromu
ATM	Ataksi-Telenjektazi Mutasyon geni
PTEN	Cowden sendromu
CHEK2	Li- Fraumeni sendromu
MSH1 ve MLH2	Muir-Torre/Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanseri
STK11/LKB1	Peutz-Jeghers Sendromu
CDH1	Herediter Diffüz Gastrik Kanseri

BRCA1-2, *Breast Cancer Gen1-2*; ATM, Ataksi Telenjektazi; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; CHEK2, *checkpoint kinase 2*; MLH1, *mutL homolog 1*; STK11, *Serine/threonine kinase 11*; CDH1, *Cadherin-1*

2.3.Mamografik dansite

Mamografideki non-radyölüsen alanlar memenin fibroz ve glanduler yapısını gösterir ve mamografik dansite olarak tanımlanır. Yüksek dansite oranlarına sahip postmenapozal kadınlarda yapılan birçok çalışmada, düşük dansiteye sahip kadınlarla yapılan kıyaslamada meme kanseri riskinin 4 kata kadar arttığı belirtilmiştir(9). Kadınlar arasındaki bu dansite farkının mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte insülin-benzeri growth faktör-1 (IGF-1) ve hormonların etkili olduğu öne sürülmektedir(5).

2.4.Benign lezyonların histolojisi

Atipinin eşlik ettiği hiperplaziler meme kanseri riskini 3-4 kat artırırken, atipisiz hiperplazilerin risk üzerine etkisi çok daha azdır(10). Fakat göreceli olarak değerlendirildiğinde, biyopsilerin yalnız %5 inde atipili hiperplazi görülmesi nedeniyle meme kanser riskinde rolü açık değildir.

2.5.İyonize radyasyon

Timus bezinin boyutunu azaltmak veya tüberküloz gibi akciğer kollapsına neden olan durumların önlenmesi tedavisi sırasında toraksa verilen tekrarlanan yüksek doz iyonlaştırıcı radyasyonun, daha sonrasında meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (10, 11). Şu anda kullanılmayan bu uygulamalar, birçok radyasyon maruziyetine neden olmuştur. Öte yandan Hodgkin lenfoma tedavisi sırasında mediastinal RT (radyoterapi) halen uygulanmakta ve meme kanseri riskini artırmaktadır. Günümüzde meme kanseri riski üzerinde en az etkisi olduğu hesaplanan 200-400 mrad aralığında yeni mamografi cihazları kullanılmaktadır.

2.6.Endojen östrojenler

Östrojen hormonu etyolojide en önemli rolü oynamaktadır. Risk faktörlerinin birçoğu doğrudan veya dolaylı olarak östrojen etkisine bağlıdır. Erken yaş menarş ve geç menapozun meme kanseri riskini artırmasının direkt olarak uzun süre ovarian hormon maruziyetine bağlı olduğu bilinmektedir. Doğal veya cerrahi yolla gelişen erken yaştaki menapozun meme kanseri üzerine koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bilateral oofektomi, meme kanseri üzerine önemli bir etkiye sahiptir ve erken yaşta overlerin çıkarılmasının meme kanseri riskini belirgin olarak azalttığı hormon ilişkili faktörlerle yapılan ilk gözlemlerden birisidir(12).

Genç yaştaki full-term gebelik öyküsü de meme kanseri riskini azaltmada belirgin bir rol oynar. Fakat ilginç olarak, 30 yaş ve üzeri gebelik yaşayan kadınlarda hiç doğum yapmamış kadınlara göre meme kanseri riski daha yüksektir (5). Bazı çalışmalarda gebelik ve sonraki dönemde artış gösteren östrojen ve progesterona bağlı olarak meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (14). Bununla birlikte, postpartum 10-15 yıllık bir periyotta gebelikteki meme dokusundaki değişikliklere bağlı olarak uzun dönem bir korumanın olduğu gözlemlenmiştir.

Laktasyonun östrojen maruziyetini geciktirmesi nedeniyle emzirme meme kanserinde korunmada etkilidir. Aynı zamanda potansiyel karsinojenlerin sütle ekskresyonu da mekanizmalardan biri olarak düşünülmektedir. Laktasyonun oluşturduğu risk azalmasının premenapozal kadınları daha fazla etkilediği görülmektedir(15).

Obezite postmenapozal kadınlar için bir risk faktörüdür. Adipoz dokudaki östrojen prekürsörlerin bu risk oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Fakat nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte obez premenapozal kadınlarda bu risk düşüktür.

2.7.Eksojen östrojenler

Eksojen östrojenlerin meme kanserine etkisini araştıran çalışmalarda asıl olarak hormon replasman tedavileri ve oral kontraseptif kullanımları üzerinde durulmuştur.

Oral kontraseptiflerin kullanım şekli ve doz miktarı zaman içinde değişim göstermiştir. Günümüzde oral kontraseptiflerle alınan östrojen ve progesteron dozu 1960'lara kıyasla çok daha az miktardadır. Tüm dünyada kontrasepsiyon amaçlı

yaygın olarak kullanılan oral kontraseptiflerin yan etkilerini inceleyen birçok çalışma mevcuttur. 1992'de kurulan The Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer'in yaptığı bir analizde oral kontraseptif kullanımının meme kanseri riskini çok az artırdığı (RR: 1.7) ve bu artışın kullanımdan sonraki ilk 4 yıl içinde belirgin olup, sonrasında azaldığı ve 10 yıl sonrasında kullanmayanlara göre aralarında bir fark olmadığı gösterilmiştir (16)

Östrojenin postmenapozal kadınlarda osteoporozdan ve kalp hastalıklarından koruma, sıcak basması gibi menapozun diğer semptomlarını azaltma etkisinden dolayı endometriumu koruyan progestin ile birlikte verilmesi önerilmiştir. Son çalışmalarda, uzun süreli (5 yıl) kullanımlarda hormon replasman tedavisinin meme kanseri riskini %30-%40 oranlarda artırdığı bildirilmiştir(17, 18). Yaşla birlikte bu oran 2 katına kadar artmaktadır. Konjuge östrojen kullanımı ile ilgili yapılan neredeyse her çalışmada meme kanseri riskinin yalnız östrojen kullananlar kadar progestin+östrojen kullananlarda da yüksek olduğu görülmüştür(19). Verilen progestinin endometriumun aksine meme dokusunu östrojenin yan etkilerinden korumadığı anlaşılmıştır.

2.8.Diyet

Diyet uzun zamandır ülkeler arasında meme kanseri oranlarındaki farklılıkların nedenleri arasında düşünülmüş olup, yağ alımı bunun en önemli komponenti olmuştur (20). Uluslararası kıyaslamalarda ülkelerin yağ alım oranları ile meme kanseri arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Fakat, prospektif epidemiyolojik çalışmalarda yağ alımı ve meme kanseri arasında belirgin bir ilişki saptanamamıştır. Gözlemsel çalışmalardaki hata payı düşünülerek, bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Vitamin A, E, C ve selenyum da antioksidan özellikleriyle meme kanser riskini azalttığı düşünülmektedir(21). Vitamin A'nın deneysel modellerde tümör proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Vitamin D bir steroid hormondur. İn vitro sistemlerde, hücre diferansiyasyonunu artırma ve proliferasyonunu azaltma etkileri bilinmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak düşük seviyelerdeki 1.25 (OH) D-vitamin düzeylerinin artmış meme kanseri riski ile ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Janowsky E. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 157 meme kanseri vakasının kontrol grubuna göre daha düşük 1.25 (OH) D-vitamin düzeylerine sahip olduğu görülmüş olup, bu

ilişkinin özellikle ER (östrojen reseptör)/ PR(progesteron reseptör) pozitif ve 55 yaş üstü kadınlarda daha belirgin olduğu gözlenmiştir(22).

2.9.Diğer faktörler

Alkolün östrojen seviyelerini artırmasının bilinmesi üzerine yapılan çalışmalar, alkol tüketiminin meme kanseri riskinde artışa yol açtığını düşündürmektedir (23). Çalışmalar arasındaki oranlar farklı olsa da bir çok çalışmada günde 1-2 kadeh alınan içkinin meme kanseri insidansını %30-%50 oranlarında artırdığı gösterilmiştir(24).

Sigara içiminin meme kanseri riskine etkisini inceleyen çalışmalarda tutarsız sonuçlar elde edilmiştir(25). Literatüre yeni eklenen prospektif çalışmalar ile sigara kullanımının meme kanseri gelişimini artırdığına yönelik fikir birliği sağlanmaya başlamıştır(26). Özellikle sigara kullanımının süresi ve sıklığındaki artışla güçlü bir korelasyon gösterdiği yeni çalışmalarla kanıtlanmıştır(27).

Sosyo-ekonomik düzey meme kanserinde bir risk faktörü olarak karşımıza çıkar. Yüksek sosyo-ekonomik düzeye sahip ülkelerde bu risk artışı 2 kat ile ifade edilmektedir. Bu risk tek başına sosyo-ekonomik düzeye bağlanmayıp reproduktif alışkanlıkların bir sonucu olarak görülmüştür (28).

Fiziksel aktivitede artış premenapozal kadınlarda meme kanseri riskini azaltmasıyla ilişkilidir(29). Düzenli egzersiz yapmanın anovulasyonu engellediği ve böylelikle meme kanseri riskinde azalmaya yol açabileceği üzerinde durulmaktadır.

3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması

Günümüzde invaziv meme kanserleri histopatolojik olarak özel olmayan duktal karsinom ve özel subtipler olarak sınıflandırılmaktadır. Özel subtipler tüm meme kanserlerinin %20-25 'inden sorumlu olup en yaygın tipleri lobuler, müsinöz, tübüler ve papiller meme kanserleridir. Özel olmayan invaziv duktal karsinomlar ise meme kanserlerinin %60-65'inde sorumlu olup geri kalan kısmı oluşturur(30, 31).

En son yayınlanan WHO (World Health Organization) tümör sınıflamasında meme kanserinin 20 major tip ve 18 minor subtipi olmak üzere bir çok varyantının mevcut olduğu bilinmektedir (31). Meme kanseri genetik, epigenetik ve transkriptomik değişiklikler nedeniyle farklı histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik süreçleri farklı, tedavilere verdikleri cevapları farklı olan heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenite hastalığın kişisellik göstermesinin ve hastalığın prognozundaki

değişikliklerin ana sebebidir. Gen ekspresyon profili gibi moleküler yöntemlerin gelişmesiyle yeni bir sınıflama olan "Moleküler sınıflama" ya geçilmiş olup, hedefe yönelik tedavi ve bireyselleştirilmiş tedavinin önü açılmıştır (32).

2000'li yıllarda başlayan moleküler sınıflama çalışmalarında 500'den fazla intrinsik gen ekspresyonu tanımlaması yapılmıştır. Fakat bu sınıflandırmalarda yapılacak küçük değişikliklerin subgrupların hiyerarşik kümelenmesinde oldukça farklı sonuçlar doğurabileceği gözlenmiştir. Bu sebeple subgruplandırma yapılırken yalnızca ER(östrojen reseptörü) ve HER-2(insan epidermal büyüme faktörü 2) fenotipleri ile ilişkili genlerle üç temel subtipin tanımlanmasının mümkün olduğu gösterilmiştir (33). Tanımlanan subtipler ER-/HER2- (bazal benzeri), HER2+, ER+/HER2- (luminal A ve B) dir. Bu yaklaşım günümüz sınıflandırmasının temelini oluşturmaktadır.

Moleküler subgruplandırma çalışmalarının çoğu özel olmayan tipte duktal karsinomlar üzerinde yapılmıştır. Bu gruba birçok tümör tipinin dahil olması sebebiyle daha fazla alt grup belirteciye ihtiyaç duyulmuştur. ER, PR, HER2, Ki-67, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve bazal sitokeratinlerden (CK14 ve CK5/6 gibi) oluşan immünohistokimyasal (IHK) belirteçler "luminal", HER2 ve üçlü negatif tümörleri ayırt etmek için kullanılabilir. Luminal tümörlerin ayrımının yapılması büyük oranda proliferasyon yoğunluğuna göre olmaktadır. Ki-67 bir proliferasyon belirteci olmasına rağmen hasta takibi ve tedavisinde kullanımı tartışmalıdır. Bu sebeple Ki-67 sınır değerinin belirlenmesi amacıyla İHK ile kombine gen ekspresyon profilleme çalışması yapılmıştır(35). Fakat kesin bir sınır değer klinik pratikte kullanımının uygun olmadığı ve bu amaçla daha uygulanabilir prognostik belirteçler için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bazal tümörleri ise tanımlayacak belirteçler net olmamasına karşın, EGFR ve CK 5/6 kullanımının subgrup tanımlamada ve prognozu öngörmede önemli olacağı düşünülmektedir(34). Meme kanserinde gen ekspresyon profiline göre majör moleküler subtipler tablo-2'de özetlenmiştir(36).

Tablo 2. Meme kanseri tiplerinin major moleküler subtipleri

Moleküler Subtip				
	<u>Luminal A</u>	<u>Luminal B</u>	<u>Her2/neu</u>	<u>Bazal benzeri*</u>
Gen ekspresyon paterni	Luminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	Luminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin orta-düşük ekspresyonu	Her2/neu yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelyal genlerin ve bazal sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu , Her2/neu düşük ekspresyonu
Klinik ve biyolojik özellikler	İnvaziv meme kanserlerinin ~%50 si, ER/PR pozitif, Her2/neu negatif	İnvaziv meme kanserlerinin ~%20 si, ER/PR pozitif, Her2/neu ekspresyonu değişken, luminal A'dan daha yüksek proliferasyon, luminal A'dan daha yüksek histolojik dereceli	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15 si, ER/PR negatif, Her2/neu pozitif, yüksek proliferasyon, yaygın Tp53 mutasyonu, yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik oranı	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15 si, çoğu ER/PR ve Her2/neu negatif (triple negatif), yüksek proliferasyon, yaygın Tp53 mutasyonu, BRCA1 disfonksiyonu
Histolojik korelasyon	Tübüler karsinom Kribriiform karsinom Düşük dereceli invaziv duktal karsinom, NOS Klasik lobüler karsinom**	İnvaziv duktal karsinom, NOS Mikropapiller karsinom	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, NOS	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, NOS Metaplastik karsinom Meduller karsinom
Tedaviye cevap ve seyir	Endokrin tedaviye iyi cevap Kemoterapiye değişken cevap İyi prognoz	Endokrin tedaviye iyi cevap (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Luminal A kadar iyi olmayabilir. Kemoterapiye değişken cevap Luminal A dan daha iyi Prognoz; Luminal A kadar iyi değil	Transtuzumaba (Herceptin) cevap Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap Genellikle kötü prognoz	Endokrin tedaviye ve transtuzumaba (Herceptin) cevap yok Platin grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı Genellikle kötü prognoz

* Bazal benzeri tümörlerin grubunda bazal tip (yüksek moleküler ağırlıklı) sitokeratin ekspresyon eden ve triple negatif fenotip gösteren, fakat düşük proliferasyonlu low-grade bir grup (adenoid kistik karsinom gibi) bulunmaktadır.

** Klasik lobüler karsinom genellikle lüminal A özellikleri gösterir, pleomorfik lobiler karsinom ise sıklıkla diğer moleküler subtiplerin özelliklerini gösterir.

Meme kanserinin histopatolojik özel tipleri %25'ini oluşturur ve özel olmayan tipte duktal karsinoma göre daha iyi prognozludurlar. Yapılan moleküler çalışmalar

özel tip meme kanserlerinin daha homojen olduğunu göstermektedir. Bazı özel tipler, hem gelişim paterinini hem de prognozunu açıklayan spesifik genetik değişikliklerle birliktedir(37). Weigelt ve ark. yaptığı bir gen ekspresyon profillemesi çalışmasında, 11 farklı özel tipi içeren (lobüler ve apokrin özel tip dışında) 113 meme tümöründen her bir özel subtipin yalnızca bir moleküler subtip (lüminal, HER2, normal meme benzeri ve bazal) dahil olduğunu kanıtlamışlardır(38). Meme kanseri özel tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri Tablo-3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. Meme kanseri özel tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri

Moleküler subtip	Yaygın histolojik tipler	ER durumu (IHK ile)	HER2 durumu (ISH/IHK ile)	Ki-67 (IHK ile)	Özel IHK/ Moleküler özellikler
Luminal A	Klasik, Lobüler, Tübüler, Kribriform	+	-	Düşük	Lüminal CK+ E-cadherin +/-
Luminal B	Mikropapiller	+/-	-/+	Yüksek	Lüminal CK+ P53 mutasyon
Bazal benzeri	Medüller, Metaplastik, Adenoid, Kistik, Sekretuar	-	-	Yüksek	Bazal CK+ P53 mutasyon DNA onarım kaybı EGFR +/- mutasyonları
Mol. apokrin	Apokrin, Pleomorfik lobuler	-	-/+	Yüksek	Androjen reseptörü+
Claudin-low	Metaplastik	-	-	Yüksek	Kanser kök hücre benzeri, EMT benzeri, düşük E-cadherin seviyesi

En yaygın özel tip, tüm meme kanserleri içinde %5-15 oranına sahip invaziv lobüler karsinom (ILK) dur. Invaziv lobüler karsinom, invaziv duktal karsinoma (IDK) göre daha iyi prognoz göstermesine rağmen uzun dönemde benzer ya da daha kötü bir seyir gösterebilirler (39). Bu genellikle yavaş seyir göstermesine, geç tanınmasına, tanı anında uzak metastaz yapmış olmasına bağlanabilir. İnvaziv lobüler karsinomun metastaz yerleri, kemik, gastrointestinal trakt, jinekolojik organlar ve peritoneal kavite gibi oldukça nadir yerlerdir. İnvaziv lobüler karsinom diğer özel tiplerin aksine birçok varyant içerir. Bu varyantlar solid, alveolar, pleomorfik, mikst duktal/lobüler, tübülobüler, taşlı yüzük hücreli ve histiositik tip olarak sayılabilirler (40). Lobüler meme kanserlerinde lenfovasküler invazyon yoktur. Genellikle ER ve PR pozitifdir; HER2, p53, EGFR ve bazal sitokeratinleri ise nadiren eksprese ederler. Fakat ILK'yı moleküler sınıflama sistemine dahil etmek sahip olduğu heterojenite ve kompleks yapısı nedeniyle uygun bir yaklaşım olmayacaktır.

4. Meme Kanserinde Evreleme

Meme kanseri evrelemesinde uluslararası TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. TNM Evreleme Sistemi'nde tümörleri sınıflamak için kullanılan kriterler; tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılımdır (M). Hastalığın evresi meme kanserli hastalarda tedaviye yön veren önemli bir prognostik faktördür.

American Joint Committee on Cancer (AJCC) aralıklı olarak evreleme sistemini güncellemektedir. 2017 yılında 2009 yılındaki evrelemeden farklı olarak yeni TNM evreleme sistemini oluşturmuş ve 8. sürüm olarak yayımlamıştır.

4.1. Primer tümör (T)

Patolojik ve klinik sınıflamalarda primer tümörün tanımlanmasında değişiklik olmamıştır. Tümör boyutu ölçümü eğer fizik muayene ile yapıldıysa, sınıflamada ana gruplar (T1, T2 veya T3), mamografik veya patolojik olarak yapıldıysa T1'in alt grupları kullanılabilir. Tablo-4 'de TNM evrelemesinin T faktörü özetlenmiştir(41).

Tablo 4. TNM sınıflamasının T faktörü (41)

Tx	Primer tümör saptanamamaktadır
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinoma in situ
Tis(DCIS) Tis (Paget)	Duktal karsinoma in situ Meme başının kitlesiz Paget hastalığı (Paget hastalığına bağlı meme parankimindeki karsinomlar, parankimal hastalığın boyutuna ve özelliklerine göre kategorize edilir)
T1	Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az
T1mic T1a T1b T1c	En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroinvazyon En büyük boyutu 0.1 cm den büyük olan ancak 0.5 cm yi geçmeyen tümör En büyük boyutu 0.5 cm den büyük olan ancak 1 cm yi geçmeyen tümör En büyük boyutu 1 cm den büyük olan ancak 2 cm yi geçmeyen tümör
T2	En büyük boyutu 2 cm den büyük olan ancak 5 cm yi geçmeyen tümör
T3	En büyük boyutu 5 cm den büyük olan tümör
T4	Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım
T4a T4b	Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı Meme cildinde ödem (peau d'orange da dahil) veya ülserasyon veya aynı memede satellit deri nodülleri
T4c T4d	T4a ve T4b birlikte Enflamatuvar karsinom

4.2.Bölgesel lenf nodları (N)

Bölgesel lenf nodu evrelemesi klinik ve patolojik evreleme olarak 2'ye ayrılmaktadır. Tablo-5-6 da TNM evrelemesinin N faktörü klinik ve patolojik sınıflama olarak özetlenmiştir.

Tablo 5. TNM sınıflamasında N faktörü klinik sınıflama (41)

cNx	Bölgesel lenf nodları saptanamamaktadır (örn. daha önce çıkartılmış)
cN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
cN1	İpsilateral lenf nod(lar)ında metastaz (fikse değil)
cN1mi	Mikrometastaz (yaklaşık 200 hücre, 0.2-2.0 mm arası)
cN2	
cN2a cN2b	Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral level I,II aksiller lenf nodlarında metastaz Klinik olarak aksiller level I,II lenf nodu metastazı olmadan sadece klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarda metastaz
cN3	Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(ları) metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller ya da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı
cN3a cN3b cN3c	İpsilateral infraklavikular lenf nod(lar)ında metastaz İpsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)ında ve aksiller lenf nod(lar)ında metastaz İpsilateral supraklaviküler lenf nod(lar)ında metastaz

Tablo 6. TNM sınıflamasında N faktörü patolojik sınıflama (41)*

pNx	Bölgesel lenf nodları saptanamamakta (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış veya çıkartılmamış)
pN0	Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı yok, izole tümör hücreleri(ITH) için ek inceleme yok
pN0(i+) pN0(mol+)	Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif IHK, 0.2 mm den geniş IHK kümesi yok Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif moleküler bulgular (RT-PCR)**
pN1	Mikrometastaz, 1-3 arası aksiller lenf nodlarında, ve/veya internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan mikroskopik hastalıkla birlikte metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil***
pN1mi pN1a pN1b pN1c	Mikrometastaz (yaklaşık 200 hücre, 0.2-2.0 mm arası) 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz, en az bir tanesi 2.0 mm den geniş İpsilateral internal mammaryal sentinel lenf nodu metastazı, ITH hariç pN1a ve pN1b birlikte
pN2	4-9 aksiller lenf nodunda metastaz, veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin**** metastaz
pN2a pN2b	4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm den büyük en az bir tümör odağı) Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin**** metastaz
pN3	10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda, veya infraklaviküler(level III aksiller) lenf nodlarında, veya 1-3 aksiller(level I,II) lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin**** ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz; veya klinik olarak negatif internal mammaryal lenf nodlarında sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanan mikro veya makrometastazla birlikte 3'ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz
pN3a pN3b pN3c	10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm den büyük en az bir tümör odağı), veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz cN2b ile birlikte pN1a veya pN2a (internal mammaryal lenf nodu pozitifliği); veya pN1b ile birlikte pN2a İpsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

Not: H&E boyası ile elde edilebilen ancak sıklıkla sadece immünohistokimyasal(IHK) veya moleküler metodlarla saptanan, 0.2 mm den daha geniş olmayan tek tümör hücreleri veya 200'den daha az hücre içeren küçük hücre kümeleri 'izole tümör hücreleri(ITH)' olarak tanımlanır.

* Sınıflama sentinel lenf nodu diseksiyonu uygulanan veya uygulanmayan aksiller lenf nodu diseksiyonuna göre yapılır. Aksiller lenf nodu diseksiyonu uygulanmayan sentinel lenf nodu diseksiyonuna dayalı yapılan sınıflama, sentinel nod için (sn) ile belirtilir, örn ; pN0(i+)(sn)

** Reverse transkriptaz/polimeraz zincir reaksiyonu

*** Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile saptanamayan metastazlarda 'klinik olarak belirgin olmayan' terimi kullanılır.

****Görüntüleme metodları (lenfosintigrafi hariç) veya klinik muayene ile saptanan metastazlarda 'klinik olarak belirgin' terimi kullanılır.

4.3.Uzak metastaz (M)

Uzak metastaz sınıflaması tablo-7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. TNM sınıflamasının M faktörü (41)

M0 cM0(i+)	Klinik veya radyografik uzak metastaz yok Metastaz bulguları olmayan bir hastada kanda, kemik iliğinde veya bölgesel olmayan nodal dokularda 0.2 mm den küçük moleküler veya mikroskopik olarak algılanan tümör hücrelerinin birikmesi
M1	Klinik ve radyografik yöntemlerle belirlenen ve / veya histolojik olarak 0,2 mm'den daha büyük olduğu kanıtlanmış uzak metastazlar

TNM sınıflamasına göre meme kanserinde evrelerin gruplandırılması tablo-8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. TNM sınıflamasına göre meme kanserinde evreleme (41)

ANATOMİK EVRELEME / PROGNOSTİK GRUP			
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1*	N0	M0
Evre IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Evre IIA	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	M0
	T3	N2	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

*T1, T1mic 'i de içerir.

**Nodal mikrometastaza sahip T0 ve T1 tümörler evre IIA' nın dışında tutulur ve evre IB'ye dahil edilir.

Metastatik olmayan meme kanseri yaygın olarak iki kategoride değerlendirilir:

- Erken evre – Evre I, IIA ve IIB' nin T2N1M0 alt sınıfını içerir.
- Lokal ileri evre – Evre IIB' nin T3N0M0 alt sınıfını ve evre III hastaları içerir.

5. Meme Kanserinde Tarama ve Erken Tanı

Meme kanseri insidansı ve bu kansere bağlı ölüm oranının giderek artması nedeniyle hastalığın erken evrede yakalanması amacıyla yapılan mamografik tarama oldukça etkili olmuştur. Klinik çalışmalarda, mamografik taramanın ölüm oranlarını %25-30 oranında azalttığı saptanmıştır(42). Hastalar sahip oldukları risk

faktörlerine göre katagorize edilerek yeni tarama protokolleri geliştirilmiş ve bu yöntemle daha fazla hastayı erken evrede yakalama ihtimalini artırmak hedeflenmiştir. Oluşturdukları risk seviyelerine göre bu faktörler 3 ana grupta toplanmıştır(43).

Tablo 9. Risk seviyelerine göre meme kanseri risk faktörleri (43)

Çok yüksek risk	Yüksek/artmış risk	Düşük/orta risk
BRCA1/2 mutasyonu LKIS ^a Multifokal ADH ^b /ALH ^c İyonize radyasyon ^d	İleri yaş Diğer memede meme kanseri ^e Yakın akrabada meme kanseri ^f Yoğun meme dokusu Tek odakta ADH/ALH	Erken menarş Geç menapoz HRT ^g Geç doğum yapma ^h Nulliparite Emzirmeme Alkol Sedanter yaşam Obezite Şiddetli epitelyal hiperplazi papillom

a:Lobüler karsinoma in situ, b:Atipik duktal hiperplazi, c:Atipik lobüler hiperplazi, d:Göğüs boşluğuna yönelik, e:invaziv kanser veya duktal karsinoma in situ, f:Hereditör meme kanseri özellikleri taşıyan 1. dereceden aile ferдинin olması riski bir üst seviyeye çıkarır. g:Hormon replasman tedavisi, h:35 yaş sonrası

Ailesel (hereditör) meme kanseri riski taşıyan bireylerde öncelikle genetik mutasyonların varlığının değerlendirilmesi önerilmektedir. Aşağıda BRCA1/2 mutasyon analizi için endikasyon oluşturan durumlar belirtilmiştir(44).

1- Ailede BRCA1/2 mutasyonu olan birey varlığı

2- Meme kanseri olan hastada aşağıdakilerden bir ya da fazlasının varlığı

- a. 45 yaş ve altında tanı almış olmak
- b. 50 yaş altında tanı almış olmak ve ailede en az bir yakın akrabasının 50 yaş altında meme kanseri ve/veya over/fallop tüpü/primer peritoneal kanser olması
- c. Kişide biri 50 yaş ve altında olmak üzere iki primer meme kanseri varlığı
- d. Herhangi bir yaşta tanı almış olmak ve ailede en az iki yakın akrabasının herhangi bir yaşta meme kanseri ve/veya over/ fallop tüpü/primer peritoneal kanser olması
- e. Ailede meme kanseri olan 1., 2. ve 3. derece erkek akraba öyküsü
- f. Kendisinde over/fallop tüpü/primer peritoneal kanseri varlığı

3- Erkek meme kanseri olgusu

4- Over/fallop tüpü/primer peritoneal kanseri olgusu

5- Yukarıdaki koşulları taşıyan bir 1., 2. ve 3. derece akraba varlığı

Bu kriterleri karşılayan bireylerde yapılan analiz sonucunda BRCA1/2 mutasyonu saptanmış hereditör meme-over sendromlu (HBOC) hastalarda tarama ve takip protokolleri Tablo-10 de verilmiştir(44).

Tablo 10. HBOC hastalarının meme kanseri açısından takibi

Eğitim	Hastaya kendi kendine meme muayenesi öğretilmelidir. BRCA mutasyonları ile ilişkili hastalıklar anlatılmalıdır (pankreas ca, prostat ca, melanoma, fanconi anemisi taşıyıcılığı vb.). Genetik danışmanlık hizmeti sağlanmalıdır.
KADIN	
Hastanın kendisini muayene etmesi	18 yaşından sonra ayda 1 kez
Klinik meme muayenesi	25 yaşından sonra yılda 2 kez
Mamografi ve MRG	25 yaşından ya da en erken hastalığa yakalanan aile üyesinin tanı yaşından başlayarak yıllık
ERKEK	
Hastanın kendisini muayene etmesi	Yılda 2 kez
Mamografi	İlk başvuruda yapılmalıdır. İlk mamografide parankimal/ glandular densite varsa yılda 1 kez Jinekomasti varsa yılda 1 kez

Non-hereditör meme kanseri riskini hesaplamak için günümüzde Gail ve Claus modelleri kullanılmaktadır. Bu modellerde ilk adet yaşı, ilk doğumun yapıldığı yaş, meme kanseri öyküsü bulan birinci veya ikinci derece yakın akrabanın varlığı, atipik hiperplazi varlığı gibi parametreleri kullanarak hastanın ilk 5 yıldaki ve 90 yaşına kadar kümülatif invaziv meme kanseri riski hesaplanır(45).

Tüm dünyada meme kanseri taramasına yönelik çalışmaların büyük çoğunluğu ortalama riske sahip kadınlar üzerine yapılmıştır. Meme kanseri olgularının %75'i 50 yaş ve üzerinde görülmesi nedeniyle Avrupa Birliği'nin  ye ülkelerine yayınlamış olduğu tavsiyede mamografi ile tarama başlangıç yaşı 50'dir (46). Bu karar ülkemizde de kabul edilmiş olup 50-69 yaş arası kadın hastalarda 2 yılda bir mamografi taraması önerilmektedir. Risk hesaplama yöntemleriyle yüksek risk saptanan bireylerde bu tarama yaşı daha erkene çekilmelidir. Bununla birlikte ailesinde 1. derece yakınında meme kanseri öyküsü bulunan hastalarda meme

kanserinin tanımlanmasından 10 yıl öncesinde taramaya başlanması önerilmektedir (47).

Taramada mamografiye ilave olarak ultrason görüntülemesi özellikle dens memeli kadınlarda meme kanseri saptama oranını artırmıştır. Bu hususta yapılan çok merkezli [American College of Radiology Imaging Network National Breast Ultrasound Trial (ACRIN 6666)] çalışmasının sonuçları önemlidir (48). Çalışmada taramaya ultrasonun eklenmesinin özellikle yüksek riskli popülasyonda meme kanseri yakalama oranında artışa yol açtığı fakat yalancı pozitiflik oranlarını da artırdığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple henüz rutin tarama olarak önerilmemektedir.

Yüksek riskli hasta grubunda özellikle mamografi etkinliğinin düşük olduğu 40 yaş ve altında, manyetik rezonans (MRG) görüntülemenin meme kanseri saptama oranına katkısı oldukça önemlidir. Bu konudaki en kapsamlı rehber 2007 yılında Amerikan Kanser Derneği tarafından yayınlanmıştır. Avrupa, Amerika ve Kanada'da yapılan 6 ayrı çalışmada yüksek riskli hasta gruplarında MRG sensitivitesi %71-100 arasında bulunurken, mamografinin sensitivitesi %16-40 arasında bulunmuştur(13). Fakat MRG'in pahalı bir tetkik olması, her merkezde bulunamaması, değerlendirecek yeterli uzmanın olmaması nedeniyle sadece yüksek riskli hasta grubunda önerilmektedir.

6. Meme Kanserinde Tedavi

6.1. Erken Evre Meme Kanserinde Tedavi

Erken evre meme kanseri hastalarında genel yaklaşım, öncelikle RT eşlik etsin veya etmesin, meme ve bölgesel lenf nodu cerrahisi (mastektomi ve lumpatektomi) uygulamasıdır. Cerrahi lokal tedavinin ardından, tümör boyutu, derecesi, dahil olan lenf nodu sayısı, östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri ve human epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) ifadesi gibi primer tümör özelliklerine göre adjuvan sistemik tedavi önerilebilir. Bununla birlikte, erken evre meme kanserli bazı hastalar (özellikle HER2-pozitif veya üçlü-negatif hastalığı olan hastalar) önce neoadjuvan tedavi, ardından cerrahi tedavi ile tedavi edilebilir.

6.1.1. Adjuvan tedavi: Sistemik tedavi endokrin terapi, kemoterapi ve biyolojik tedaviyi içeren medikal tedavidir. Adjuvan sistemik tedavinin kullanımı ile meme kanserindeki nüks ve ölüm oranında belirgin bir azalma meydana gelmiştir(49). Tümörlerin östrojen (ER) veya progesteron (PR) reseptörü pozitif veya

negatif olmasına bakılmaksızın, benzer adjuvan kemoterapi rejimleri uygulanır ve sonrasında HER2 aşırı ekspresyonu olan hastalara HER2'ye yönelik tedavi eklenir.

Adjuvan kemoterapinin başlanma kararı, tümör histolojisi, östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri, tümör evresi ve derecesi, hasta yaşı ve lenfovasküler invazyon gibi yüksek risk özelliklerine göre alınır(50). ER-pozitif tümörleri olan hastalarda adjuvan kemoterapi verilmesine uygun hastaları belirlemede genomik analiz ve fayda-risk hesaplamaları yapılmaktadır. Birçok durumda, adjuvan kemoterapinin faydaları tartışmalıdır.

Tümör boyutu ER pozitif olanlarda <1 cm, diğerlerinde <0.5 cm olan vakaların çoğu, sadece endokrin tedavisi ile iyi bir prognoza sahiptir ve genellikle adjuvan kemoterapi gerektirmez. Öte yandan ileri evrelerdeki hastaların çoğu yüksek nüks oranlarına sahiptir. Bu sebeple adjuvan endokrin tedavisine kemoterapi eklenmesine ilişkin kararlar kişiselleştirilmelidir. Genellikle kuvvetli ER ve PR pozitifliği olan, düşük proliferasyon ölçümlerine sahip HER2-negatif meme kanserleri, yalnızca endokrin tedavisi ile iyi bir prognoza sahiptir. Daha yüksek proliferasyon ölçümleri ve daha düşük ER / PR ekspresyona sahip yüksek dereceli tümörler, endokrin tedavisine daha az duyarlı olup adjuvan kemoterapiden daha fazla fayda sağlarlar.

Bununla birlikte üçlü negatif hastalıkta, tümör boyutu >0.5 cm olan, lenf nodu metastazı olan (tümör boyutuna bakılmaksızın) hastalara adjuvan tedavi standart yaklaşımdır. Bu hastalara hormon reseptör negatifliği nedeniyle endokrin tedavi verilmez ve çalışmalar adjuvan kemoterapi verilmemesi halinde nüks oranlarında belirgin bir artışı vurgulamışlardır. Tümör boyutu <0.5 cm, lenf nodu metastazı olmayan ve proliferasyon indeksi düşük olan üçlü negatif tümörlerin prognozu genelde iyi olup adjuvan tedaviye ihtiyaç duymayabilirler.

Meme kanserinin tedavisinde genel yaklaşım, AC-T olarak adlandırılan doksorubisin ve siklofosfamid (AC) ve takiben paklitaksel veya dosetakseli içeren taksan bazlı tedavidir. Ayrıca, AC-T'den üstün olduğu kanıtlanmamış olsa da, antrasiklin içermeyen rejimler bazı hasta grupları için uygun olabilir. Kalp hastalığı öyküsü, ileri yaş, toraksa radyoterapi öyküsü, kemoterapinin endike olduğu düşük riskli hastalığı olan ve antrasiklin bazlı tedavinin risklerini kabul etmek istemeyen hastalara dosetaksel ve siklofosfamid (TC) ile tedavi önerilmektedir. Öte yandan taksan bazlı kemoterapilerde periferik nöropati ve alerjik reaksiyon gelişmesi halinde siklofosfamid, metotreksat ve florourasil tedavileri alternatif olabilir.

6.2. Lokal İleri Meme Kanserinde Tedavi

Lokal ileri meme kanseri tedavisinde sistemik ve lokorejyonel terapinin birlikte yürütülmesi esastır.

6.2.1. Neoadjuvan Sistemik Tedavi: Lokal ileri ve bazı erken evre meme kanserinde (üçlü negatif veya HER2 pozitif) neoadjuvan sistemik tedavi verilir. Tedavinin amacı, ameliyattan önce tümörün yanıtını artırmak ve memenin korunmasını sağlamaktır. Neoadjuvan kemoterapi, hastalığın nüks olması halinde ilerde faydalı olabilecek tedavi hakkında bilgi sağlar.

Adjuvan olarak kullanılan rejimler, neoadjuvan tedavi olarak da uygulanmaktadır. HER2 negatif hastalara doksorubisin, siklofosamid gibi antrasiklin bazlı kemoterapiler veya dozetaksel, siklofosamid gibi antrasiklin içermeyen rejimler verilebilir. HER2 pozitif meme kanserli hastalar için, kemoterapi rejimine HER2'ye yönelik bir ajan (trastuzumab ve/veya pertuzumab) eklenmelidir. Neoadjuvan kemoterapi, cerrahi öncesi tamamlanmalıdır.

6.2.2. Adjuvan Tedavi: Neoadjuvan sistemik tedavi almayan hastalar adjuvan tedavi almalıdırlar. Tedavi seçimi erken evre meme kanserindeki aynı prensiplerle yönetilir. Meme koruyucu cerrahi yapılan hastalara radyoterapi uygulanmalıdır. Neoadjuvan tedaviyi tamamlayan hastalardan hormon reseptör pozitif olanlara endokrin tedavi önerilmektedir. Endokrin tedavinin seçimi hastanın menapozal durumuna göre belirlenir. Postmenapozal hastalarda anastrazol, letrazol ve ekzemestan gibi aromataz inhibitörleri veya bu ilaçlara intolerans olması durumunda tamoksifen tedavisi uygulanmaktadır(51).

Yüksek riskli premenapozal hastalarda nüksü önleyebilmek için toksisite riskine rağmen ovaryan ablasyon ve aromataz inhibitörü tedavisi önerilmektedir. Ovaryan ablasyonu tolere edemeyen hastalarda birkaç yıl aromataz inhibitörü tedavisi sonrası tamoksifen verilebilir. Ovaryan ablasyonu tolere eden ve ilerde çocuk planı olmayan hastalara goserelin, leuprolide ve triptorelin gibi GnRH (gonadotropin salgılayan hormon) agonisti önerilebilir.

Düşük- orta riske sahip premenapozal hastalarda tek ajan tamoksifen tedavisi verilebilir. Bununla birlikte, orta riski olan veya operasyon sonrası rezidü tümör dokusu bulunan bazı hastalarda, ovaryan ablasyona ek olarak aromataz inhibitörleri tedavide düşünülebilir.

6.3. Metastatik Meme Kanserinde Tedavi

Hormon reseptör pozitif metastatik meme kanserinde, endokrin tedavi ilk seçenektir. Endokrin tedavide östrojeni bloke eden ajanlar olarak premenapozal dönemde LHRH agonist ve antagonistleri, postmenapozal dönemde ise aromataz inhibitörleri (AI) olarak anastrozol ve letrozol (nonsteroidal), eksemestan (steroidal) kullanılabilir. Bir diğer grup ise östrojen reseptörünü direkt hedefleyen ajanlardır. Selektif östrojen reseptör modülatörü (SERMs) tamoksifen, selektif östrojen reseptör azaltıcı (SERDs) olarak fulvestrant tedavide tercih edilebilir. Adjuvan endokrin tedavinin tamamlanmasından ilk 12 ay içinde relaps gelişirse tedaviye direnç düşünülerek alternatif endokrin tedaviye geçilmesi önerilir. Bununla birlikte HER2 pozitif hastalara HER2'ye yönelik tedavi de eklenmelidir.

Postmenapozal metastatik meme kanserinin tedavisinde CDK 4/6 (siklin bağımlı kinaz) inhibitörleri (palbosiklib, ribosiklib ve abemasiklib) ve AI kombinasyon tedavisi tercih edilmelidir. Bu kombinasyonun tek ajan AI'ne kıyasla sağkalımı belirgin artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(52-54).

Hormon duyarlı premenapozal metastatik meme kanserinde tamoksifen, ovaryan ablasyon veya her ikisinin kombinasyonu uygun tedavi şekilleridir. Kombine hormonal tedavi (ovaryan ablasyon + tamoksifen) birçok klinisyen tarafından daha yüksek yanıt oranı, daha uzun progresyona kadar geçen zaman nedeniyle tercih edilmektedir. GnRH agonisti ile birlikte tamoksifen kombinasyonunun, tek başına GnRH agonistine göre daha etkili olduğunu kanıtlayan çalışmalar mevcuttur(55).

Hormon reseptör negatif ya da hormona dirençli hastalıkta, çok sayıda visseral organ metastazı ve tümörle ilişkili ciddi semptom varlığında, hastalığın hızlı progresyon göstermesi halinde sistemik kemoterapiler önerilmektedir. Sistemik kemoterapide ardışık tek ajan ya da kombine tedaviler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kombine kemoterapiler ardışık tek ajan tedavilere göre yanıt oranlarını artırsa da, sağkalım avantajı getirmediği ve toksisiteyi artırdığı görülmüştür(56).

HER2 negatif tedavi dirençli BRCA mutasyonu olan hastalarda PARP inhibitörlerinden olaparib ve talazoparib ile yapılan çalışmalarda bu ajanların progresyonsuz sağkalıma (PFS) pozitif etkisi saptanmıştır(57, 58). Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) 2019 sağkalım analizlerinde 102 Her2 negatif erken evre meme kanseri hastasının dahil edildiği çalışmada, epirubisin+siklofosfamid

tedavisini takiben paklitaksel+ olaparib tedavisinin, paklitaksel+karboplatin tedavisine kıyasla patolojik tam yanıt oranlarını artırdığı saptanmıştır.

HER2 pozitif metastatik meme kanserinde ise tek ajan trastuzumabın etkinliği kanıtlanmıştır(59). Trastuzumab'a dirençli HER-2 pozitif metastatik meme kanseri tedavisinde bir oral tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib hem erb-B1 hem de erb-B2 (HER-2) reseptörünü bloke ederek etkinlik göstermektedir(60). Pertuzumab, HER-2 ekstrasellüler subdomainine bağlanarak ve HER-2 dimerizasyonunu engelleyerek etki gösteren rekombine humanize monoklonal antikordur ve sağkalıma pozitif etkisi çalışmalarla gösterilmiştir(61) Son olarak, antianjiojenik tedavilerden bevasizumab ile yapılan çalışmalarda, paklitaksel ile kombinasyonunun tek ajan paklitaksele göre progresyona kadar geçen sürede anlamlı artış sağladığı gösterilse de sağkalıma katkı sağlamamaktadır(62).

II. BÖLÜM: MİKRORNA İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

RNA interference (RNAi) sistemi canlı hücrelerdeki genlerin aktivitesini ve etkisini kontrol eden bir sistemdir. RNAi'nin 3 çeşidi mevcuttur: 1) endojen kaynaklı mikro RNA (miRNA/miR) 2) eksojen kaynaklı small interfering RNA (siRNA) 3) eşey hücrelerdeki piwi-interacting RNA (piRNA). MikroRNA'lar 20-21 nükleotid uzunluğunda post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu kontrol eden ve kodlanmayan RNA regülatörleridir. MiRNA'ların hücre gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozis ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (63). Günümüzde insanlarda 2000'den fazla miRNA tesbit edilmiş olup genomun %30'unu regüle ettiği tahmin edilmektedir(64).

1. MikroRNA'ların Tarihçesi

MiRNA'lar ilk olarak 1993 yılında, Ambros ve arkadaşları tarafından nematod türü bir solucan olan *Caenorhabditis Elegans*'ların gelişimi üzerine yapılan genetik çalışmalar sırasında tanımlanmıştır (65). Lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini farketmişlerdir. 2000 yılında ise Reinhart ve arkadaşları tarafından yine *C.elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 ismini verdikleri, canlılığın gelişim aşamalarını düzenleyen farklı bir gen daha tespit edilmiştir (66) Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla let-4 ve let-7 ye benzeyen bir çok canlı küçük RNA molekülü keşfedilerek miRNA olarak isimlendirilmiştir (67).

2. MikroRNA'ların Biyogenezi

Hayvanlarda olgun miRNA'nın oluşumu birbirini izleyen 2 basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta miRNA geninden RNA polimeraz II enzimi ile pri-miRNA oluşturulur. Pri-miRNA'lar genellikle 5' ucunda "cap", 3' ucunda "poli-A" ucuna sahiptirler ve protein kodlayan mRNA'lara benzerlik gösterirler(68). Pri-miRNA'lar, nükleusta RNAaz III endonükleaz enzimi olan Drosha ve kofaktörü olan DGCR8/ PASHA tarafından kesilerek 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüşürler. Drosha enzimi dsRNA bağlayıcı domain ve amino terminal domain olmak üzere 2 domain içermektedir. Drosha enzimi tarafından kesilen pre-miRNA'lar nükleustan sitoplazmaya Exportin 5 ile taşınırlar(68)

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar, ikinci bir RNAaz III endonükleaz enzimi olan Dicer tarafından ds-miRNA'lara dönüştürülür. Dicer enziminde helikaz, DUF 283 , PAZ (Piwi, Argonaute, Zwiller) ve RNAaz III domaini olmak üzere 3 domain bulunmaktadır. MiRNA dubleksleri, helikaz enzimi tarafından olgun miRNA'ya dönüştürülür. Dicer, aynı zamanda RNA kaynaklı susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. MikroRNA'lar, RISC(RNA kaynaklı susturma kompleksi) kompleksine entegre olarak, ya mRNA'nin yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olarak fonksiyon görürler(68).

3. MikroRNA'ların İşlevleri

MikroRNA'lar fonksiyonlarını kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliği sayesinde gerçekleştirirler. MikroRNA'nın yapıya eklenmesi ile oluşan RISC kompleksi baz eşleşme özelliği ile hedef mRNA'nın ya 3'ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (untranslated region-UTR) ya da ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır ve ilgili gende protein translasyonunun inhibisyonuna veya mRNA'nın yıkılmasına sebep olur(68). Bu bağlanma mRNA ile gerçekleşen tamamlayıcılığa bağlıdır ve bağlanma bölgesine göre ortaya çıkan yanıt değişkenlik gösterir.

3'UTR bölgesine bağlanma tam olmayan, kusurlu bir bağlanmayı içerir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır fakat ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır. Bununla birlikte, mikroRNA'lar birden fazla mRNA'ya bağlanabilir ve aynı şekilde bir mRNA birden fazla mikroRNA tarafından düzenlenebilir(68).

4. MikroRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi

Yapılan çalışmalar doğrultusunda miRNAların ökaryot hücrelerde bazı hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Maligniteler, nöroloji, kardiyoloji ve viroloji gibi birçok alanda çalışmalar devam etmekte olup, elde edilen sonuçlarla tedavi stratejileri değişmektedir(69, 70). Spesifik bir gene bağlı ve dominant olarak aktarılan nörodejeneratif hastalıklara örnek olarak Huntington hastalığı ve Alzheimer verilebilir. Bu sebeple bu gen ürününün RNAi ile sessizleştirildiğinde, bu tür hastalıkların büyük ölçüde tedavi edilebileceği düşünülmektedir(71). Aynı şekilde, tüm dünyanın %3'ünü enfekte etmiş hepatit C virüsü üzerinde yapılan bir çalışmada, fare hepatositlerinde siRNA'ların direk olarak HCV sekansına ait gen ürününü sessizleştirdiği görülmüştür(72). Bu AIDS tedavisi için de oldukça önemli bir adım olmuştur. Eksojen ve endojen kaynaklı olarak sentezlenmiş olan siRNA'ların, HIV replikasyonu, T lenfositler ve hematopoetik kök hücrelerinin ürettiği makrofajlar gibi birçok hücrede inhibisyona yol açtığı görülmüştür(73).

MiRNA fonksiyonunun kalpteki rolünü araştıran deneylerde fare kalbindeki miRNAların olgunlaşması engellenmiş ve deney sonucunda miRNAların kalp gelişiminde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Ayrıca insanlarda yapılan miRNA ekspresyon profili çalışmalarıyla hastalığa sahip kalpte spesifik miRNA ekspresyon düzeylerinin değiştiği gözlemlenmiş ve dolayısıyla miRNAların kardiyomiyopatilerde rolü olabileceği üzerinde durulmuştur(69).

5. MikroRNA'ların Kanserle İlişkisi

Çeşitli deneyler ve klinik analizler miRNA'ların, onkogenlerin ve tümör süpresör genlerin yeni bir sınıfı olarak işlev gördüklerini kanıtlamıştır. miRNA'ların %50'den fazlasının kanserle ilişkili genomik alanlarda ya da kolay kırılabilen bölgelerde yer aldıkları gösterilmiştir(68, 74, 75). C.Elegans (lin-4) ve Drosophila canlılarında (bantam, miR-14, miR14-2,6,11,13,308) tanımlanan ilk miRNA'ların bazılarının kanserle ilişkili yollarda işlev gördükleri bildirilmiştir(77). MiRNA'ların kanserde rol oynadığını gösteren ilk kanıtlar Croce ve arkadaşları tarafından kronik lenfositik lösemi (KLL)'nin moleküler patogenezi çalışılırken ortaya konmuştur. Kronik lenfositik lösemi hastalarının %50'sinde 13q14 delesyonunun olduğu bilinmektedir. Yapılan delesyon analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca mir-15-a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu saptanmış ve Croce ve arkadaşları tarafından B hücreli KLL hastalarının % 68'inde bu miRNAların ekspresyonlarının azaldığı ya da hiç yapılmadığı bulunmuştur. Ayrıca miRNA ekspresyon profilinin, KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla yakın ilişkili

olduğu raporlanmıştır. Tüm bu veriler işığında miRNA'ların kanser patogenezindeki rolleri daha da güçlenmiştir(67).

Kanserde herhangi bir genin tek başına incelenmesi yerine, gen ekspresyonunun genel analizi, tanı açısından önem kazanmıştır. DNA mikrodizininin kullanımı, onbinlerce genin aynı anda incelenmesine olanak vermiştir. Calin ve arkadaşları tarafından, 2004 yılında yapılan bir çalışmada, insan miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için, 186 adet miRNA geninin DNA zerindeki pozisyonunu haritalandırarak daha önceden bilinen belirli kanser türlerinin ilişkili olduğu genetik değişiklikler ile karşılaştırılmıştır. Bu miRNA genlerinin çoğunlukla, heterozigozitenin kayboduğu bölgeler olan kırılğan kısımlara yerleşik olduğu saptanmıştır. Bu bölgelerde moleküler lezyon sonucu oluşan genetik hasar spesifik kanserlere neden olmaktadır(70, 74).

2003 yılında Michael ve arkadaşları tarafından, insanlardaki solid organ tümörleri (kolonik ve rektal adeno karsinomlar) ile normal dokular karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri farklı miRNA'lar tespit edilmiştir (76). Daha sonraki yıllarda solid organ tümörlerine bağlı değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri, farklı kanser türlerinde (meme, lenfoma, beyin, tiroid, akciğer, prostat ve hepatosellüler karsinoma) bulunmuştur(77). Lamy ve ark., 283 miRNA'nın mesane, prostat ve kolon kanserlerinde genomik DNA'daki kopya sayısı değişimini araştırmışlardır. Prostat ve kolon kanserlerinde kopya sayısının arttığı bölgelerde miRNA'ların yüksek oranda bulunduğunu, kopya sayısının azaldığı bölgelerde ise az olduğunu gözlemlemişlerdir. Mesane kanserinde ise kopya sayısı ile miRNA seviyesi arasında ters ilişkinin olduğunu belirlemişlerdir(78). Lorio ve ark. miRNA ifadelerinin normal ve neoplastik meme dokusu arasında farklılık gösterdiğini, özellikle miR-125b, miR145, miR-21 ve miR-155 miRNA'larının ifadelerinin meme kanseri dokusunda oldukça azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca normal ve kanserli meme dokusu arasında görülen miRNA ifade düzeyi farklılıklarının tümör seviyesi, çoğalma indeksi, östrojen ve progesteron reseptörü ifadesi ve vasküler invazyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(79).

Kanserde miRNA'nın az eksprese olması tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiğini onkogen veya hücre farklılaşmasını ya da apoptozisi kontrol eden genleri düzenleyerek kanseri engelleyebileceğini düşündürmüştür. Kanserde miRNA'nın aşırı eksprese olması, onkogen olarak işlev gösterdiğini ve apoptozisi kontrol eden genleri ya da tümör baskılayıcı genleri negatif olarak düzenleyerek

kanser gelişmesinde rol oynadığı ve bu bilgilerin tedavide kullanılabileceğini göstermiştir(75)

5.1. Meme Kanserinde Tümör Supressör Fonksiyona Sahip MiRNA'lar

Tümör supressör miRNA'lar kanser hücrelerinde daha düşük bir ekspresyon sergiler ve onkogen ekspresyonunu baskılayarak hücrel farklılaşmayı kontrol ederler(68) Kanser hücrelerinde azalan miRNA'ların çoğunun anti-metastatik özellikler de sergileyen bir tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olduğu belirtilmektedir. ERBB2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2) ile eritropoietini (EPO) ve reseptörünü (EPOR) hedefleyen miR-125b'nin meme kanserinde azalan en önemli miRNA'lardan biri olduğu çalışmalarda saptanmıştır(80).

MiR-205'in ektojik ekspresyonu, meme kanserinde hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe eder hücreyi apoptoza yönlendirir(81) Aynı şekilde, Jiang ve arkadaşları, üçlü negatif meme kanserinde miR-17-92 kümesinin ekspresyon artışının metastazda anlamlı derecede azalma ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır(82). Yine miR-206 da siklin D2 ve Cx43'ü hedef alarak hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu inhibe ettiği ileri sürülmektedir(83).

Bazı tümör supressör miRNA'ların metastaz kaskadında inhibitör rolü mevcuttur. Örneğin; miR-200 ailesi EMT(epitelyal-mezenkimal transition)'yi E-cadherin ekspresyonu yoluyla düzenlenmektedir(84). MiR-146b, kanser hücrelerinin sağkalım ve metastazı ile ilişkili nükleer faktör kappa B (NF-B) ve interlekin (IL) -6 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir(85). Bazı kanserlerde azaldığı görülen miR-126'nin ekspresyonunda artış sağlanması ile invazyon ve anjiyogenezde azalma gözlenmiştir(86). MiR-335 ise SOX4 ve TNC gibi birçok metastaz ile ilişkili geni hedef aldığı bilinmektedir(87). Son olarak, çeşitli araştırmalar, miR-31'in meme kanseri metastazı üzerindeki pleiotropik etkilerini ve metastaz kaskadının birden fazla basamağını, RhoA ve WAVE3'ü hedef alarak baskıladığını bildirmiştir(88). Tablo-11'de meme kanserindeki tümör supressör microRNA'ların listesi verilmiştir(89).

Tablo 11. Meme kanserindeki tümör supressör microRNA'lar (89)

miRNA	HEDEF	FONKSİYON
miR-125b	EPO, EPOR ENPEP,CK2- α ,CCNJ,MEGF9 ERBB2	Hücre proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu inhibe eder. Hücre proliferasyonunu inhibe eder. Migrasyonu ve invazyonu inhibe eder.
miR-205	HMGB3	Proliferasyonu ve invazyonu suprese eder.
miR-17-92	Mekk2	NK hücre antitümoral aktivitesini artırır ve metastazı azaltır.
miR-206	Cyclin D2, Cx43	Migrasyon, invazyon ve metastazı azaltır.
miR-200	ZEB1/2, SNAI1/2	Tümör büyümesi, metastazı ve EMT'yi baskılar.
miR-146b	NFkB, STAT3	Sağkalım ve metastazı azaltır.
miR-126	IGFBP2, MERTK,PITPNC1	Metastaz ve anjiyogenezi baskılar.
miR-335	SOX4, TNC	Metastaz ve migrasyonu baskılar.
miR-31	RhoA WAVE3, RhoA WAVE3	Meme kanserinde invazyon-metastaz kaskadını birçok basamakta inhibe eder. Kanseri progresyonunu ve metastazı indirger. Kanseri progresyonunu ve metastazı indirger.

Metastaz-supressif miRNA'lar kalın yazılmıştır. CCNJ, siklin J; CK2- α , kasein kinaz 2-alfa; Cx43, konneksin 43; ENPEP, glutamilaminopeptidaz veya aminopeptidaz A; EPO, eritropoietin; EPOR, eritropoietin reseptör; ERBB2, Reseptör tirozin-protein kinaz erbB-2 (insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2); HMGB3, *high-mobility group box 3* geni; IGFBP2, insulin-benzeri büyüme faktör-bağlayıcı protein 2; MEGF9, *multiple EGF-benzeri domains 9*; Mekk2, *mitojen-aktif* protein kinaz kinaz 2; MERTK, c-Mer tirozin kinaz; NFkB, nuklear faktör *kappa B*; NK, *natural killer*; PITPNC1, fosfatidilinositol transfer protein, sitoplazmik 1; RhoA, Ras homolog gen ailesi; SNAI1/2, *snail* ailesi çomak parmak 1/2; SOX4, *SRY-related HMG-box 4*; STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*; TNC, tenaskin C; WAVE3, WAS protein ailesi, üye 3; ZEB1/2, çomak parmak E-box bağlayıcı *homeobox 1/2*.

5.2. Meme Kanserinde Onkojenik Fonksiyona Sahip mikroRNA'lar (onkomiRler)

Meme onkomiRleri için miR-10b, miR-21, miR-155, miR-373 ve miR-520c örnekleri verilebilir. OnkomiRler onkojenik aktivitelerini, onkojenik transkripsiyon faktörlerini aktive ederek ve tümör supressör genleri hedefleyerek ortaya çıkarırlar. MiR-10b HOXD10'u hedef almakta, böylece hücre migrasyonunu ve invazyonunu tetiklemektedir(90). miR-21'in invaziv ve metastatik meme kanseri ile ilişkili olduğu(91) ve meme kanserinde kök hücre benzeri hücrelerde HIF1A ve EMT'yi düzenlediği bildirilmiştir(92). Bununla birlikte çeşitli tümör supresör proteinleri inhibe ettiği bildirilmiştir(93). MiR-155, hem in vivo hem de in vitro olarak SOCS1'i baskılamakta (94) ve MCF7'nin upregülasyonu (insan meme adenokanseri hücre

çizgisi) hücrelerinin proliferasyonunu sağlamaktadır(95). Son çalışmalarda mirna-155'in başka bir hedefi olan FOXO3 inhibisyonunun artmış hücre sağkalımı ve tümör büyümesine yol açtığı tanımlanmıştır(96). CD44'ü hedef alan miR-373 ve miR-520c metastaz, invazyon ve migrasyon ile ilişkilendirilmiştir(97). Tablo-12'de meme kanserindeki onkojenik mikroRNA'ların listesi verilmiştir(89).

Tablo 12. Meme kanserindeki onkojenik mikroRNA'lar (onkomiRler) (89)

miRNA	HEDEF	FONKSİYON
miR-10b	HOXD10	Hücre invazyon, migrasyon ve metastazını tetikler.
miR-21	PDCD4, HIF1A TPM1, PTEN, PDCD4 TIMP3	Hücre invazyon, migrasyon ve metastazını tetikler, EMT'yi düzenler. İnvazyonu artırır. İnvazyonu artırır.
miR-155	SOCS1 TP53INP1 FOXO3	Hücre büyümesi ve proliferasyonu tetikler. Proliferasyonu tetikler. Proliferasyon ve sağkalımı artırır.
miR-373	CD44	Hücre migrasyonuna, invazyona ve metastaza yönlendirir.
miR-520c	CD44	Hücre migrasyonuna, invazyona ve metastaza yönlendirir.

MetastamiRler koyu renkle gösterilmiştir. EMT, epitelyal-mezenkimal geçiş; FOXO3, *forkhead box protein O3*; HIF1A, *hypoxia-inducible factor-1 α* ; HOXD10, *homeobox D10*; miRNA, mikroRNA; PDCD4, programlanmış hücre ölümü protein 4; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; SOCS1, *suppressor of cytokine signaling 1*; TIMP3, *metalloproteinase inhibitor 3*; TM1, *tropomyosine 1*; TP53INP, *tumor protein p53 inducible nuclear protein*.

5.3. Hem Onkojenik Hem de Tümör Supressör Fonksiyona Sahip Mikrorna'lar

Bazı miRNA'ların etkileri çevresel ve hücrel nedenlere bağlı olarak hem tümör supresör hem de onkojenik yönde olabilmektedir(98) Bu durum kısmen, birçok miRNA inceleme çalışmasındaki olası tutarsız sonuçları açıklayabilmektedir.

Yukarıda belirtildiği gibi, miR-146b NF- κ B sinyalinin negatif düzenlenmesi yoluyla tümör supressör etkisini gösterir. Buna ek olarak diğer bir hedefi ise pro-apoptotik DNA onarıcı enzim olan BRCA-1 dir(90). Aynı şekilde miR-29, hücre adezyon molekülü peroksidazin homologunu baskılayarak metastazı ve EMT'yi uyarmakta, fakat aynı zamanda tümör baskılayıcı genlerin DNA metilasyonunu baskılayarak, onkogenlerin proliferasyonunu hedef alarak ve kemosenitiviteyi artırarak kanser ilerlemesini sınırlandırabilmektedir(100). Birçok veriye göre miR-373 ve miR-520c onkojenik fonksiyon göstermesine rağmen, son çalışmalarda bu

miRNA ailesinin ER(-) meme kanserinde bir tümör supressör gibi görev yaptığı rapor edilmiştir (101).

6. Meme Kanserinde Biyobelirteç Olarak MikroRNA'nın Yeri

İdeal bir biyomarker tümoral oluşumlara sensitif ve spesifik olup sağlıklı bireylerde tespit edilmemeli ve kolay ulaşılabilir olmalıdır. Farklı doku tiplerindeki yüksek doku spesifiteleri, yüksek stabiliteleri ve farklı tumoral dokulardaki belirgin ekspresyon seviyeleri nedeniyle miRNA'ların tanısasal, prediktif ve prognostik potansiyeli olan spesifik biyomarkerler olduğu düşünülmektedir.

6.1. Tanısal MikroRNA'lar

Meme kanserinde erken tanı amaçlı yapılan miRNA çalışmalarında, dolaşımdaki 9 adet miRNA'da sağlıklı kontrollerle yapılan karşılaştırmada belirgin ekspresyon farkı görülmektedir(102). Yine MiR-155 ile ilgili bir meta-analiz son derece sensitif ve spesifik bir tanısal doğruluğu göstermiştir(103). Meme kanserli hastaların serum örnekleriyle sağlıklı kontroller arasında yapılan bir karşılaştırmayı içeren başka bir çalışmada, Chan ve arkadaşları diagnostik belirteç olabilecek belirgin ekspresyon gösteren 4 miRNA daha tanımlamışlardır(104). Bu gibi birçok çalışma, miRNA'nın artan meme kanseri riskini öngörme potansiyeli hakkında yeni bir bakış açısı gelişmesini sağlamıştır.

MiRNA ekspresyon profilleri ile meme kanserinde moleküler alt tiplerinin belirlenebilirliği üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Farklı meme kanseri alt tipleri arasındaki farkı gösteren moleküler miRNA analizleri ilk kez Blenkiron ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır(105). Blenkiron ve arkadaşları farklı moleküler subtiplere sahip 93 meme tümöründe 309 adet miRNA tanımlamıştır. Çalışmada, diferansiyel miRNA ekspresyonu, bazal ve lümen alt tiplerinin doğru bir şekilde sınıflandırılmasını sağlamış ve tanımlanan 31 mirna'nın farklı alt tipleri ayırabildiği gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada, 29 erken evre meme kanseri tümöründeki 453 miRNA'dan, ER, PR ve HER2 durumuna göre belirgin farklılıklar gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir(106). Yapılan son çalışmalarda MiR-342 ER ve Her2/neu pozitif luminal B tümörlerde en yüksek seviyede saptanırken, üçlü negatif alt tipinde düşük ekspresyon seviyesinde görülmüştür(107). Aynı çalışmada, MiR-520'nin ER ve PR pozitif tümörlerde azaldığı gözlemlenmiştir. Yaygın olarak bulunan moleküler alt tip ilişkili miRNA'lar tablo-13 de gösterilmiştir(89).

Tablo 13. Moleküler alt-tip ilişkili miRNA'lar(89)

Luminal A	Basal	Her2	Normal-like
Let-7c	miR-18a	miR-142-3p	miR-145
miR-10a	miR-135b	miR-150	miR-99a
Let-7f	miR-93		miR-100
	miR-155		miR-130a

Histolojik subtipler ile miRNA ilişkisinin değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Volinia ve arkadaşları dokuda duktal karsinoma in situ ve duktal karsinom ile ilişkilendirilen 9 miRNA tespit etmişlerdir(108). Gircz ve arkadaşları lobuler karsinoma in situdan invaziv lobuler karsinoma progresyon sırasında dokuda 6 farklı miRNA ekspresyonunun değiştiğini ortaya koymuşlardır(109). Başka bir çalışmada ise, Van der Auwera ve arkadaşları, inflamatuvar meme kanserinde non-inflamatuvar meme kanserine kıyasla 13 miRNA'nın farklı bir ekspresyonunu göstermişlerdir(110).

6.2. Prognostik MikroRNA'lar

Daha yüksek risk altındaki hastalara farklı tedavi ihtiyacı gelişmesi sebebiyle prognozu belirleyecek miRNA'ların kullanıma geçmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple yapılan çeşitli gen ekspresyon çalışmalarında, yeni veya geliştirilmiş miRNA prognostik belirteçleri tanımlanmış ve bu çalışmalar hasta alt gruplarındaki hastalığın seyri ve sonucu hakkında bir öngörü oluşmasına yardımcı olmuştur.

6.2.1. Pozitif prognoz ile ilişkili mikroRNA'lar: Quesne ve arkadaşları HRAS ve HMGA-2 onkogenlerini hedefleyen let-7b'nin erken evrelerde ortaya çıktığını ve EMT sırasında azalarak daha az agresif tümörlerle ilişkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır(111). Aynı çalışmada miR-205'in diğer bir pozitif prognostik belirteç olduğu ve subtipten bağımsız olarak sağkalım ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yüksek miR-375 seviyeleri, neoadjuvan kemoterapiye patolojik tam yanıt ve nüksüz sağkalım açısından daha olumlu klinik sonuçları yansıtmaktadır(112). Başka bir çalışmada, IDK'lı hastalarda saptanan miR-30a'nın vimentin ekspresyonunu negatif yönde etkilediği ve aşırı ekspresyonunun invazyon ve metastazı baskıladığı görülmüştür.

MiR-342-5p hücre siklusunda ve hücre büyümesinde rol oynamaktadır. Leivonen ve ark. yaptığı bir çalışmada, Her2 yolunu negatif etkileyen miR-342-5p'nin sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(113). Aynı şekilde Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-30a'nın tümör supressör etkisinin MTDH'yi hedeflemesine bağlı olduğu ve böylelikle tümör büyümesi ve metastazı engellediği düşünülmektedir(114).

6.2.2. Negatif prognoz ile ilişkili mikroRNA'lar: miR-122, Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, relaps gösteren metastatik hastalık ile ilişkili bulunmuştur(112). Tümör supressör FOXO1 genini hedefleyerek hücre siklus progresyonunu düzenleyen miR-27b-3p ile ilişkili yapılan çalışmada, Shen ve arkadaşları üçlü negatif hastalarda miR-27b-3p'nin kötü prognozu belirlemede bağımsız bir negatif prediktör olduğunu göstermiştir(115).

MiR-21'in meme kanserinde yüksek ekspresyona sahip olduğu bilinmektedir. Bu miRna'nın prognostik belirteç olarak kullanılabileceği farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tümör boyutu, grad, hastalığın evresi ve ki-67 ile pozitif bir ilişki göstererek normal dokuya oranla IDK'lı hastalarda çok daha yüksek ekspresyon gösterdiği saptanmıştır(116). Aynı çalışmada yüksek miR-21 seviyeleri daha düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir.

Aynı şekilde BRCA1, E-cadherin, PARP1 VE RB1 gibi meme kanseri ilişkili genlerin miR-210'a karşı antagonist gibi davrandığı saptanmıştır. Volinia ve arkadaşları IDK'lı hastalarda miR-210'un metastaz ve sağkalım süresi ile ilişkili olduğunu göstermiştir(108). miR-210 ile ilişkili olarak yapılan dokuz çalışma özetlenecek olursa, bu mirnanın özellikle meme kanserli hastalardaki aşırı ifadesinin hastaliksız sağkalım açısından prognostik değere sahip olduğu keşfedilmiştir(117).

Nörogenez, apoptoz ve hücre gelişimi ile ilgili düzenleyici rolü bilinen miR-9'un hatalı düzenlenmesi proliferasyona ve metastaz oluşumuna sebebiyet vermektedir(118). Meme kanserinde miR-9, dokudaki E-cadherini baskılayarak hücre motilitesini ve invazyon yeteneğini artırmaktadır(119).

Bununla birlikte miR-155'in hücre büyümesi, migrasyon, invazyon gibi birçok biyolojik süreçte yer aldığı gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarda Kong ve arkadaşları miR-155 ekspresyonunun birçok kanserli dokuda pro-anjiogenik, proliferatif ve migratuar etki gösterdiğini rapor etmişlerdir(120). Ayrıca çalışmada miR-155'in sağkalım üzerindeki kötü prognostik etkisini farketmişlerdir.

6.3. Prediktif MikroRNA'lar

Prediktif belirteçler kanserlerde tanı ve tedavi kişiselleştirmesinde yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda verilen tedaviden alınan yanıtla ilişkilendirilip tedavinin yararını belirlemede fayda sağlamaktadırlar. Bu sebeple son çalışmalarda meme kanserine yönelik prediktör görevi görebilecek birçok yeni miRna tespit edilmiştir.

6.3.1. Hormon terapi ilişkili mikroRNA'lar: MiRna'ların endokrin direncinde önemli bir rol aldığı düşünülmektedir ve yapılan araştırmalar neticesinde hormon tedavilerinin klinik yararı ile ilişkili miRNA'lar saptanmıştır.

miR-375 metadherini (MTDH) doğrudan hedefleyerek tamoksifen yanıtı üzerinde etki göstermektedir. MTDH kaybı, tamoksifen duyarlılığındaki artışa bağlı olarak, tamoksifen ile tedavi edilen hastalarda hastalısız sağkalım ile korelasyon sağlamaktadır(121). Başka bir çalışmada He ve arkadaşları, miR-342 ekspresyonunun ER α ekspresyonu ile pozitif ilişkili olduğunu ve östrojene bağımlı meme kanseri hücrelerinde tamoksifene bağlı apoptozu arttırdığını bulmuşlardır(107). MiR-221/222 kümesi ise bir ER α inhibitörüdür ve meme kanseri hücrelerinde tamoksifen direnci ile ilişkilidir. Aynı zamanda bir selektif ER azaltıcı olan fulvestranta dirençle de ilişkisi görülmüştür(122).

Aromataz inhibitörleri bir aromataz gen olan CYP19A1'i bloke ederek östrojen üretimini azaltırlar. Let-7f'in aromataz geni CYP19A1'i hedeflemesi nedeniyle, letrozol tedavisi alan hastalarda, tedavi öncesi ve sonrası let-7f ekspresyonundaki değişiklikler tedaviye yanıt açısından prediktif bir değer sağlamaktadır(123).

6.3.2. Hedefe yönelik tedavi ilişkili mikroRNA'lar: Jung ve arkadaşları Her2+ meme kanserli hastalarda, trastuzumab içeren neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrasında plazma miR-210 seviyelerini araştırmışlardır(124). Yapılan araştırmada, tedavi öncesinde en yüksek ekspresyon seviyesine sahip mikroRNA'nın, miR-210 olduğu görülmüştür. Bu nedenle, yüksek miR-210 bazal ekspresyonu, trastuzumab içeren kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilmiştir. Araştırma sonucunda, trastuzumaba dirençli meme kanseri hücrelerinde, miR-210 ekspresyonunun plazma seviyelerinde anlamlı derecede yükseklik tespit edilmiştir.

6.3.3. Kemotörpitik ajanlara yanıt ilişkili mikroRNA'lar: İlaç duyarlılığı hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Prediktif belirteçler hastanın tedaviden fayda görüp görmeyeceğine yönelik öngörülerde bulunmaktadır ve böylelikle ilaca bağlı toksisite azalıp tedaviden alınan olumlu yanıt oranı artması planlanmaktadır.

Zhou ve arkadaşları miR-125b'nin Bak1'i (BCL2 antagonist killer1) baskılayarak bazı kemoterapatlere direnç oluşumunu indüklediğini raporlamışlardır(125). Bu çalışma, Wang ve arkadaşlarının klinik verilerinde 5-flurourasil tedavisine yanıtız hastalardaki yüksek plazma miR-125b seviyelerinin saptanmasıyla doğrulanmıştır(126). Climent ve arkadaşlarının çalışmasında, kromozom 11q'daki miR-125b delesyonu sonucunda, lenf nodu negatif meme kanserli hastalarda antrasiklin bazlı kemoterapi ile sağlanan yarar ve düşük nüks oranları rapor edilmiştir. Aynı şekilde Bockhorn ve arkadaşları artan miR-30c seviyelerinin, paklitaksel ve doksorubisine duyarlılığı nasıl etkilediğini anlatmışlardır(127),. miR-21'in artışı da yine paklitaksel direnci ile ilişkilendirilmiştir(128). Bu sonuçlar, miR-21 artışının meme kanseri hücrelerinde kemoresistansın yükselmesine ve anti-apoptosis proteini olan BCL-2'nin indüklenmesine neden olduğunu göstermektedir(129).

6.3.4. Radyoterapi ilişkili mikroRNA'lar: Düşük miR-34a seviyeleri meme kanseri hücrelerini radyoterapiye daha dirençli hale getirmiştir(130). Stankevics ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, düşük doz X radyasyonuna karşı yanıtta miR-34a'nın rol oynadığı doğrulanmıştır. Çalışmada ek olarak, radyasyona verilen yanıtta miR-34a regülasyonunun p53 ile sağlandığı saptanmıştır(131).

MATERYAL VE METHOD

Projede gerçekleştirilen bütün aşamalar Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirildi ve 20.02.2018 tarihli 04 sayılı etik kurul kararı ile çalışmaya alınan hastalardan çalışma için gerekli bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışmada kullanılan hasta materyalleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'ndaki hasta kayıtlarından sağlandı. Deneysel çalışmalar, Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma merkezi bünyesinde bulunan Kanser Biyolojisi laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışmaya 18-80 yaş aralığında, henüz herhangi bir tedavi almamış, metastatik (beyin metastazı hariç) veya metastatik olmayan, ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) Performans statusu 0,1,2 olan, yeni tanı 40 invaziv duktal meme kanseri hastası dahil edildi.

1. ÖRNEK TOPLANMASI

Çalışmaya alınan hastaların hepsinden tedavi öncesinde kan alındı. 40 hastanın 2'sinden onamı geri çektikleri için kan alınamadı ve bu sebeple kalan 38 hastanın 3 kür tedavi sonrası kanları alındı. Elde edilen kan örnekleri antikoagülan içeren tüplere alınarak santrifüj edildi ve plazma örnekleri elde edildi. Plazma örnekleri çalışılincaya kadar ependorf tüplerine konularak -80°C'de saklandı. İzolasyon için, plazmaya uygun hacimde trizol eklenerek standart total miRNA izolasyonu protokolü gerçekleştirildi.

2. TOTAL MİRNA İZOLASYONU

1- Serum örnekleri, 1 ml trizol reaktif kullanılarak toplandı. 2 mL lik steril tüplerde parçalanarak homojenize edildi. Kısaca vortex edildi

2- Homojenize edilen örnekler 5 dk oda ısısında bekletilerek nukleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlandı.

3- 1 ml trizol reaktifi için 0.2 ml kloroform eklendi. Tüplerin kapakları iyice kapatılıp 15 sn boyunca elle kuvvetlice çalkalayarak karıştırıldı. 2-3 dk oda ısısında bekletildi.

4- 15 dk 4 °C' de 12000 x g de santrifuj edildi.

5- Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarılıp isopropil (0,5 ml) alkolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlandı. (homojenizasyon esnasında kullanılan trizol reaktifinin yarısı kadar isopropil alkol eklendi). Örnekler oda ısısında 10 dk bekletildi.

6- 12000 x g'de 4°C de 10 dk santrifuj edildi. Sıvı kısım atıldı.

7- RNA çökeltisi %75'lik etanol (kullanılan her 1 ml trizol reaktifi için 1 ml etanol eklendi) eklenerek örnekler vorteks ile karıştırıldı.

8- 5 dk 7500 x g'de 4°C de santrifuj edildi. Etanol uzaklaştırıldı.

9- İşlemler sonunda RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakıldı.

10- RNA 30-50 uL steril su ile çözüldü ve 10 dk 55-60°C de bekletildi. Uzun süreli kullanım için - 80°C'de saklandı.

3. MİRNA cDNA SENTEZİ

cDNA sentezi abm miRNA cDNA Synthesis with Poly(A) Polymerase Tailing kiti (Kat. No: 903) ile gerçekleştirildi. Deney bu kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. Elde edilecek toplam miRNA'dan yaklaşık 75 ng alındı. 2 µL 5X Poly(A) Polimeraz Reaksiyon Tamponu, 1,5 µL ATP, 1 µL MnCl₂, 0,5 µL Poly(A) Polimeraz eklenerek, RNase-free su ile 10 µL'ye tamamlandı. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bir süre buzda bekletildikten sonra 2 µL miRNA Oligo (dT) adaptör eklenip 5 dakika 65°C'de inkübe edildi. Kısaca buzda bekletilerek, üzerine 1 µL dNTP, 4 µL 5X RT Tamponu, 1 µL EasyScript RTase ve 2µL RNase-free su eklenerek sırayla 42°C'de 15 dakika ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.

4. REAL-TİME PCR (qRT-PCR)

MiRNAların ekspresyon seviyeleri Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Avustralya) cihazı kullanılarak tespit edildi. miRNA primerlerinin tamamı abm'den (Kanada) temin edildi. qRT-PCR, EvaGreen miRNA qPCR MasterMix (abm, Kanada) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları; 1 µL cDNA, 10 µL EvaGreen miRNA Mastermix, 0,7 µL Forward primer, 0,7 µL Reverse Primer, 7,6 dH₂O şeklinde gerçekleştirildi. PCR şartları; 95°C'de 10 dakika 1 döngü, [95°C'de 10 saniye / 63°C'de 15 saniye / 72°C'de 5 saniye] 40 döngü ve en son 55°C-90°C arası 0,1°C hassasiyette melting curve analizi yapıldı. Normalizasyon için, normal meme

hücre hattı ve miR-39 miRNA kullanıldı. Real-Time PCR analizleri standart eğri ile kopya sayıları hesaplanarak gerçekleştirildi. Hesaplanan kopya sayıları $2^{\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile analiz için uygun sayısal verilere dönüştürüldü. $2^{\Delta\Delta CT}$ yöntemi, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) sistemi tarafından üretilen eşik döngülerini (CT'ler) kullanarak doğrudan hesaplama yaptığı için farklı örnekler arasındaki gen ekspresyon seviyelerini hesaplamada uygun bir yoldur. Bu yaklaşımda, tüm numunelerde % 100 PCR amplifikasyon verimliliğinin olmadığı varsayımına dayanılır ve qPCR yazılımı tarafından arka plan floresansının otomatik olarak kaldırılmasıyla verilere uygulanır.

5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY:IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve ortanca , en küçük - en büyük değerler; kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında İki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi kullanılmıştır. Parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Bağımlı grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında İki eş arasındaki farkın önemlilik testi; Parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

1.HASTALARIN ÖZELLİKLERİ

Çalışmamıza 39 (%97.5)'u kadın 1 (%2.5)'i erkek olmak üzere toplam 40 yeni tanı meme kanserli hasta alındı. Hastaların medyan yaşı 51 olup, yaş aralığı 29-79 arasındaydı. Çalışmamıza dahil olan hastaların hepsinin ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performans skoru 0-2 aralığındaydı. Hastalar 17 Temmuz 2018 ve 17 Ağustos 2019 tarihleri arasında 13 ay süre ile izlendi. Hastaların ortalama takip süresi 9.46 ±1.9 aydı.

Çalışmamıza dahil olan kadın hastaların tanı anında 20 (%51.3) 'si premenapozal iken, 19 (%48.7)'u postmenapozaldı. Hastaları hormon reseptör durumlarına göre ayırdığımızda 31 (%77.5) hastanın östrojen reseptörü (ER) pozitif, 9 (%22.5) hastanın östrojen reseptörü (ER) negatif, 31 (%77.5) hastanın progesteron reseptörü (PR) pozitif, 9 (%22.5) hastanın progesteron reseptörü (PR) negatif, 11(%27.5) hastanın c-eRBB-2'sinin pozitif, 29 (%72.5) hastanın c-eRBB-2'sinin negatif olduğu görüldü.

Çalışmaya dahil edilen hastaların tümör çapları 10 mm-90 mm aralığında olup, ortalama tümör çapları 25.8 ± 18.3 mm idi. Hastaların 18 (%45) inin tümör çapı 20 mm altında iken, 20 mm ye eşit ve büyük tümör çapına sahip hastaların sayısı 22 (%55) idi.

Lenf nodu metastazlarına göre hastalar değerlendirildiğinde 30 (%75) hastada lenf nodu metastazı var iken, 10 (%25) hastada tanı anında lenf nodu metastazı yoktu.

Hastaların evrelerine göre değerlendirme yapıldığında, 5 (%12.5) hastanın evre 1A, 1 (%2.5) hastanın evre 1B, 9 (%22.5) hastanın evre 2A, 3 (%7.5) hastanın evre 2B, 10 (%25) hastanın evre 3A, 2 (%5) hastanın evre 3C, 10 (%25) hastanın evre 4 olduğu belirlendi.

Kırk hastanın 36 (%90)'sına siklofosamid+ adriamisin tedavisi başlanmış olup, 1 (%2.5) hastaya paklitaksel+ karboplatin, 1 (%2.5) hastaya pertuzumab+doksetaksel, 1 (%2.5) hastaya siklofosamid+ dozetaksel, 1 (%2.5) hastaya sadece trastuzumab+anastrazol tedavisi verilmiştir. Alınan kemoterapiler sonrasında yan etki olarak nötropeni değerlendirildiğinde, 18 (%45) hastada nötropenin geliştiği saptanmış olup, 22 (%55) hastada ise nötropeni izlenmemiştir. Hastaların mevcut sosyodemografik özellikleri tablo-14'de belirtilmiştir.

Tablo 14. Çalışma hastalarının sosyodemografik özellikleri

		N	%
CİNSİYET	KADIN	39	97.5
	ERKEK	1	2.5
YAŞ	<50	19	47.5
	≥50	21	52.5
MENAPOZ	PREMENAPOZAL	20	51.3
	POSTMENAPOZAL	19	48.7
ER	POZİTİF	31	77.5
	NEGATİF	9	22.5
PR	POZİTİF	31	77.5
	NEGATİF	9	22.5
C-eRBB-2	POZİTİF	11	27.5
	NEGATİF	29	72.5
TUMÖR BOYUTU	<20 mm	18	45
	≥20 mm	22	55
LENF NODU METASTAZI	VAR	30	75
	YOK	10	25
KT SONRASI NÖTROPENİ	VAR	18	45
	YOK	22	55
HASTALIĞIN EVRESİ	EVRE 1A	5	12.5
	EVRE 1B	1	2.5
	EVRE 2A	9	22.5
	EVRE 2B	3	7.5
	EVRE 3A	10	25
	EVRE 3C	2	5
	EVRE 4	10	25
TEDAVİ	SİKLOFOSFAMİD+ADRIAMİSİN	36	90
	DİĞER	4	10

Hastaları hormon reseptör durumlarına göre luminal A, luminal B, Her2 grup ve üçlü negatif gruplar olarak moleküler alttiplerine ayırdık. 40 hastanın 23 (%57.5)'ü luminal A, 8 (%20)'i luminal B, 3 (%7.5)'ü Her2 grup ve 6 (%15)'sı üçlü negatif idi. Tablo-15'de hastaların moleküler alttiplere göre dağılımları gösterilmiştir.

Tablo 15. Çalışma hastalarının moleküler alt tiplere göre dağılımı

	MOLEKÜLER ALTTİP				Toplam
	Luminal A	Luminal B	Her2	Üçlü Negatif	
N	23	8	3	6	40
%	%57.5	%20	%7.5	%15	%100

2. TEDAVİ ÖNCESİ MİRNA EKSPRESYON SEVİYELERİNİN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERE GÖRE ANALİZİ

Hastaların tedavi öncesi miRNA $2^{-\Delta Ct}$ değerleri tespit edildi ve demografik özellikler açısından istatistiksel analizleri yapıldı. Çalışmamızda sadece 1 erkek hasta bulunmasından dolayı cinsiyet faktörü ile miRNA ekspresyonlarının istatistiksel analizi yapılamadı.

Hastalar öncelikle yaşlarına göre 50 yaş altı ve 50 yaş ve üzeri olarak iki gruba ayrıldı ve tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin yaş faktöründen etkilenip etkilenmediği araştırıldı. Analiz sonuçlarında her iki grup arasında herhangi bir mirna ekspresyon seviyesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Tablo-16'da her iki grubun miRNA ekspresyon değerleri ve istatistiksel analiz sonucu gösterilmektedir.

Tablo 16. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin yaşa göre analizi

	50 yaş altı		50 yaş ve üzeri		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.05 ± 0.1	0.01 (0 – 0.42)	0.14 ± 0.21	0.01 (0 – 0.83)	0.390
Mir-21	0.52 ± 1,74	0.02 (0 – 7.64)	0.49 ± 1.11	0.03 (0 – 3.74)	0.486
Mir-141	0.61 ± 0,64	0.42 (0.01 – 1.81)	0.4 ± 0.48	0.18 (0 – 1.99)	0.573
Mir-200a	0.71 ± 0.53	0.63 (0.03 – 1.79)	0.64 ± 0.46	0.55 (0.05 – 1.65)	0.654
Mir-200b	0.66 ± 0.5	0.56 (0.03 – 1.47)	0.53 ± 0.37	0.42 (0.04 – 1.38)	0.345
Mir-200c	0.66 ± 0.58	0.48 (0.02 – 1.83)	0.59 ± 0.44	0.66 (0 – 1.22)	0.810
Mir-203	0.31 ± 0.35	0.22 (0.01 – 1.37)	0.2 ± 0.24	0.08 (0.01 – 0.95)	0.205
Mir-210	0.41 ± 0.45	0.27 (0.01 – 1.93)	0.4 ± 0.26	0.31 (0.07 - 1)	0.436
Mir-375	0.64 ± 1.03	0.27 (0.01 – 4.44)	0.53 ± 0.59	0.46 (0 – 1.94)	0.915
Mir-34a	0.6 ± 0.48	0.41 (0.08 – 1.49)	0.79 ± 0.86	0.46 (0.07 – 3.13)	0.872
Mir-133a	0.2 ± 0.54	0.01 (0 – 1.88)	0.17 ± 0.34	0.02 (0 – 1.29)	0.555
Mir-155	1.89 ± 2.79	0.27 (0 – 9.37)	2.05 ± 2.78	0.8 (0 – 8.72)	0.768
Mir-139-5p	0.19 ± 0.39	0.03 (0 – 1.46)	0.36 ± 0.65	0.05 (0 – 2.28)	0.555
Mir-143	0.14 ± 0.2	0.04 (0 – 0.74)	0.19 ± 0.34	0.05 (0 – 1.34)	0.979
Mir-145	0.36 ± 0.57	0.07 (0 – 1.74)	0.24 ± 0.34	0.15 (0.01 – 1.16)	0.555
Mir-365	0.87 ± 0.83	0.58 (0 – 2.63)	1.37 ± 1.57	0.89 (0 – 6.03)	0.469
Mir-299-5p	0.76 ± 0.44	0.71 (0.27 – 2.18)	0.66 ± 0.35	0.58 (0.12 – 1.68)	0.436
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.06 ± 0.15	0.01 (0 – 0.65)	0.915
Mir-452	0.0012 ± 0.00314	0.0002 (0 – 0.01)	0,0009 ± 0,00192	0.0002 (0 – 0.01)	0.748
Mir-17	0.11 ± 0.19	0.03 (0 – 0.63)	0.21 ± 0.27	0.12 (0 – 0.83)	0.169

Hastalar daha sonra tanı anındaki menapoz durumlarına göre premenapozal ve postmenapozal olarak iki gruba ayrıldı ve menapozal durumun tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerine etkisi değerlendirildi. Analiz sonuçlarında yaş faktöründe olduğu gibi her iki grup arasında herhangi bir mirna ekspresyon seviyesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Tablo-17’de her iki grubun miRNA ekspresyon değerleri ve istatistiksel analiz sonucu gösterilmektedir.

Tablo 17. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin menopozal duruma göre analizi

	premenapozal		postmenapozal		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.06 ± 0	0.01 (0,42 - 0,1)	0.14 ± 0	0.01 (0.83 – 0.22)	0.411
Mir-21	0.5 ± 0	0.02 (7.64 – 1.7)	0.54 ± 0	0.03 (3.74 – 1.16)	0.258
Mir-141	0.58 ± 0.01	0.34 (1.81 – 0.63)	0.44 ± 0	0.22 (1.99 – 0.5)	0.749
Mir-200a	0.76 ± 0.03	0.66 (1.79 – 0.53)	0.62 ± 0.05	0.55 (1.65 – 0.44)	0.351
Mir-200b	0.66 ± 0.05	0.52 (1.47 – 0.47)	0.55 ± 0.04	0.42 (1.38 – 0.38)	0.399
Mir-200c	0.71 ± 0.02	0.54 (1.83 – 0.57)	0.55 ± 0	0.63 (1.13 – 0.43)	0.396
Mir-203	0.3 ± 0.02	0.21 (1.37 – 0.34)	0.22 ± 0.01	0.08 (0.95 – 0.25)	0.214
Mir-210	0.42 ± 0.01	0.3 (1.93 – 0.44)	0.4 ± 0.07	0.31 (1 – 0.27)	0.569
Mir-375	0.69 ± 0.01	0.32 (4.44 – 1.01)	0.5 ± 0	0.46 (1.94 – 0.59)	0.569
Mir-34a	0.72 ± 0.08	0.42 (3.13 – 0.74)	0.7 ± 0.07	0.46 (2.28 – 0.69)	0.989
Mir-133a	0.19 ± 0	0.01 (1.88 – 0.53)	0.18 ± 0	0.02 (1.29 – 0.35)	0.687
Mir-155	1.68 ± 0	0.26 (9.37 – 2.72)	2.2 ± 0	0.8 (8.72 – 2.88)	0.550
Mir-139-5p	0.19 ± 0	0.03 (1.46 – 0.37)	0.39 ± 0	0.02 (2.28 – 0.68)	0.857
Mir-143	0.13 ± 0	0.04 (0.74 – 0.19)	0.2 ± 0.01	0.06 (1.34 – 0.35)	0.444
Mir-145	0.35 ± 0.01	0.07 (1.74 – 0.55)	0.26 ± 0.01	0.15 (1.16 – 0.35)	0.708
Mir-365	1.04 ± 0	0.83 (2.84 – 0.9)	1.3 ± 0	0.51 (6.03 – 1.62)	0.967
Mir-299-5p	0.73 ± 0.27	0.69 (2.18 – 0.44)	0.67 ± 0.12	0.58 (1.68 – 0.36)	0.728
Mir-411	0.01 ± 0	0.01 (0.03 – 0.01)	0.06 ± 0	0.01 (0.65 – 0.16)	0.687
Mir-452	0.0012 ± 0.00307	0.0002 (0.01 - 0)	0.0010 ± 0.00201	0.0003 (0.01 - 0)	0.687
Mir-17	0.12 ± 0	0.03 (0.63 – 0.2)	0.22 ± 0	0.13 (0.83 – 0.27)	0.184

Hastalar üçüncü parametre olarak hormon reseptör durumlarına göre gruplandırıldı ve hormon reseptör durumuna göre tedavi öncesi miRNA ekspresyon seviyeleri incelendi. ER pozitif ve negatif gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde herhangi bir miRNA'nın ekspresyon seviyesinde anlamlı farklılık saptanmadı($p>0.05$) fakat mir-105 ($p=0.069$)'in ER negatif hastalarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek eksprese edildiği gözlemlendi. Hastaları PR pozitif ve negatif olma durumlarına göre ayırdığımızda mir-105 ($p=0.020$), mir-203 ($p=0.007$), mir-375($p=0.047$), mir-145 ($p=0.024$) ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Değerlendirmede bu dört miRNA'nın PR negatif hastalarda daha yüksek eksprese edildikleri saptandı. Öte yandan mir-365 ($p=0.055$) ve mir-200c ($p=0.064$) nin PR negatif hastalarda daha

yüksek eksprese edildiği gözlemlendi fakat bu istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Diğer miRNA'larda ise her iki grup arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmedi($p>0.05$).

Meme kanserli hastaları c-eRBB-2 'nin pozitif ve negatif olmasına göre gruplandırılarak yaptığımız istatistiksel analizde mir-375 ($p=0.018$), mir-133a ($p=0.007$) ve mir-17 ($p=0.033$)'nin tedavi öncesi ekspresyon seviyelerinde her iki grup arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi. Her üç miRNA'nın c-eRBB-2 pozitif hastalarda daha yüksek eksprese edildiği görüldü. Ek olarak mir-200c nin c-eRBB-2 pozitif hastalarda yüksek ekspresyon gösterdiği fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı görüldü ($p=0.079$). Bakılan diğer miRNA'larda ise c-eRBB-2 faktörü açısından anlamlı farklılık saptanmadı($p>0.05$). Tablo-18-19-20'de tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin hormon reseptör durumuna göre analizleri belirtilmiştir.

Tablo 18. Östrojen reseptörüne (ER) göre analizi

ER	negatif		pozitif		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.16 ± 0.14	0.18 (0 – 0.42)	0.08 ± 0.18	0.01 (0 – 0.83)	0.069
Mir-21	0.87 ± 2.54	0.03 (0 – 7.64)	0.4 ± 0.93	0.03 (0 – 3.74)	0.750
Mir-141	0.5 ± 0.56	0.22 (0.01 – 1.5)	0.5 ± 0.58	0.27 (0 – 1.99)	0.949
Mir-200a	0.89 ± 0.56	0.75 (0.27 – 1.79)	0.61 ± 0.46	0.52 (0.03 – 1.65)	0.167
Mir-200b	0.76 ± 0.51	0.89 (0.12 – 1.46)	0.54 ± 0.4	0.48 (0.03 – 1.47)	0.117
Mir-200c	0.76 ± 0.63	0.75 (0.01 – 1.79)	0.58 ± 0.47	0.49 (0 – 1.83)	0.370
Mir-203	0.33 ± 0.32	0.22 (0.02 – 1.05)	0.23 ± 0.3	0.13 (0.01 – 1.37)	0.223
Mir-210	0.27 ± 0.14	0.27 (0.04 – 0.51)	0.44 ± 0.4	0.31 (0.01 – 1.93)	0.425
Mir-375	1.04 ± 1,43	0.56 (0.02 – 4.44)	0.45 ± 0.5	0.29 (0 – 1.59)	0.235
Mir-34a	0.75 ± 0.98	0.29 (0.1 – 3.13)	0.68 ± 0.62	0.42 (0.07 – 2.28)	0.702
Mir-133a	0.22 ± 0.51	0.02 (0 – 1.55)	0.18 ± 0.42	0.01 (0 – 1.88)	0.633
Mir-155	2.21 ± 3.16	0.38 (0 – 9.37)	1.91 ± 2.67	0.79 (0 – 8.72)	0.975
Mir-139-5p	0.23 ± 0.47	0.03 (0 – 1.46)	0.29 ± 0.57	0.03 (0 – 2.28)	0.924
Mir-143	0.15 ± 0.23	0.05 (0 – 0.74)	0.17 ± 0.29	0.05 (0 – 1.34)	0.799
Mir-145	0.4 ± 0.46	0.18 (0.02 – 1.19)	0.27 ± 0.46	0.07 (0 – 1.74)	0.114
Mir-365	1.1 ± 1.06	0.58 (0.06 – 2.84)	1.15 ± 1.36	0.82 (0 – 6.03)	0.588
Mir-299-5p	0.68 ± 0.46	0.49 (0.27 – 1.68)	0.71 ± 0.38	0.68 (0.12 – 2.18)	0.463
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.04 ± 0.13	0.01 (0 – 0.65)	0.750
Mir-452	0.007 ± 0.00104	0.0002 (0 - 0)	0.0011 ± 0.00285	0.0002 (0 – 0.01)	0.849
Mir-17	0.14 ± 0.24	0.02 (0 – 0.63)	0.17 ± 0.24	0.06 (0 – 0.83)	0.406

Tablo 19. Progesteron reseptörüne (PR) göre analizi

PR	negatif		pozitif		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.19 ± 0.18	0.18 (0 – 0.48)	0.07 ± 0.16	0.01 (0 – 0.83)	0.020*
Mir-21	1.2 ± 2.6	0.05 (0 – 7.64)	0.3 ± 0.81	0.02 (0 – 3.74)	0.483
Mir-141	0.61 ± 0.57	0.42 (0.03 – 1.5)	0.47 ± 0.57	0.18 (0 – 1.99)	0.406
Mir-200a	0.82 ± 0.5	0.75 (0.27 – 1.79)	0.63 ± 0.49	0.52 (0.03 – 1.65)	0.211
Mir-200b	0.72 ± 0.5	0.69 (0.12 – 1.46)	0.56 ± 0.41	0.48 (0.03 – 1.47)	0.503
Mir-200c	0.92 ± 0.58	1.12 (0.01 – 1.79)	0.53 ± 0.46	0.48 (0 – 1.83)	0.064
Mir-203	0.41 ± 0.28	0.36 (0.06 – 1.05)	0.21 ± 0.3	0.12 (0.01 – 1.37)	0.007*
Mir-210	0.39 ± 0.28	0.32 (0.04 - 1)	0.41 ± 0.39	0.3 (0.01 – 1.93)	0.702
Mir-375	1.14 ± 1.38	0.62 (0.05 – 4.44)	0.42 ± 0.49	0.22 (0 – 1.59)	0.047*
Mir-34a	1.04 ± 1.04	0.55 (0.18 – 3.13)	0.6 ± 0.55	0.31 (0.07 – 2.28)	0.211
Mir-133a	0.26 ± 0.5	0.02 (0.01 – 1.55)	0.16 ± 0.42	0.01 (0 – 1.88)	0.114
Mir-155	3.11 ± 3.89	0.38 (0 – 9.37)	1.65 ± 2.3	0.79 (0 – 8.58)	0.679
Mir-139-5p	0.47 ± 0.82	0.11 (0 – 2.28)	0.22 ± 0.43	0.03 (0 – 1.75)	0.775
Mir-143	0.28 ± 0.46	0.05 (0 – 1.34)	0.13 ± 0.2	0.04 (0 – 0.86)	0.371
Mir-145	0.5 ± 0.48	0.23 (0.02 – 1.19)	0.24 ± 0.44	0.07 (0 – 1.74)	0.024*
Mir-365	1.74 ± 1.36	2.12 (0.06 – 3.98)	0.96 ± 1.23	0.57 (0 – 6.03)	0.055
Mir-299-5p	0.64 ± 0.44	0.55 (0.27 – 1.68)	0.72 ± 0.38	0.71 (0.12 – 2.18)	0.235
Mir-411	0.02 ± 0.01	0.02 (0 – 0.03)	0.04 ± 0.13	0.01 (0 – 0.65)	0.321
Mir-452	0.0009 ± 0.00109	0 (0 - 0)	0.0011 ± 0.00284	0.0002 (0 – 0.01)	0.899
Mir-17	0.19 ± 0.23	0.12 (0 – 0.63)	0.16 ± 0.24	0.04 (0 – 0.83)	0.726

Tablo 20. C-erbB-2 (Her2/neu) ye göre analizi

C-erbB-2	negatif		pozitif		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.07 ± 0.13	0.01 (0 – 0.48)	0.18 ± 0.25	0.15 (0 – 0.83)	0.131
Mir-21	0.26 ± 0.72	0.03 (0 – 2.95)	1.14 ± 2.42	0.05 (0 – 7.64)	0.323
Mir-141	0.48 ± 0.57	0.22 (0 – 1.99)	0.54 ± 0.57	0.34 (0.03 - 1.63)	0.591
Mir-200a	0.61 ± 0.48	0.48 (0.03 – 1.65)	0.85 ± 0.51	0,75 (0.23 - 1.79)	0.124
Mir-200b	0.54 ± 0.43	0.43 (0.03 – 1.47)	0,2 ± 0.43	0.81 (0.11 - 1.33)	0.241
Mir-200c	0.54 ± 0.5	0.48 (0.01 – 1.83)	0.83 ± 0.48	0.97 (0 – 1.4)	0.079
Mir-203	0.2 ± 0.18	0.16 (0.01 – 0.67)	0.4 ± 0.48	0.14 (0.01 - 1.37)	0.473
Mir-210	0.4 ± 0.38	0.32 (0.01 – 1.93)	0.42 ± 0.34	0.27 (0.07 - 1)	0.858
Mir-375	0.38 ± 0.49	0.22 (0 – 1.94)	1.11 ± 1.24	1.01 (0.05 - 4.44)	0.018*
Mir-34a	0.6 ± 0.62	0.31 (0.07 – 2.28)	0.94 ± 0.86	0.57 (0.1 – 3.13)	0.084
Mir-133a	0.04 ± 0.06	0.01 (0 – 0.27)	0.57 ± 0.72	0.17 (0 – 1.88)	0.007*
Mir-155	2.01 ± 2.94	0.79 (0 – 9.37)	1.89 ± 2.3	0.54 (0 – 5.59)	0.881
Mir-139-5p	0.19 ± 0.47	0.02 (0 – 2.28)	0.51 ± 0.66	0.18 (0 – 1.75)	0.166
Mir-143	0.15 ± 0.27	0.05 (0 – 1.34)	0.21 ± 0.31	0.05 (0 – 0.86)	0.976
Mir-145	0.3 ± 0.49	0.07 (0 – 1.74)	0.28 ± 0.39	0.15 (0.01 - 1.19)	0.929
Mir-365	0.91 ± 1.02	0.51 (0 – 3.98)	1.72 ± 1.74	1.36 (0.01 - 6.03)	0.124
Mir-299-5p	0.72 ± 0.44	0.68 (0.12 – 2.18)	0.65 ± 0.25	0.66 (0.32 - 1.14)	0.835
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.1 ± 0.21	0.02 (0 – 0.65)	0.131
Mir-452	0.0009 ± 0.00259	0.0002 (0 – 0.01)	0.0013 ± 0.00253	0.0004 (0 – 0.01)	0.369
Mir-17	0.13 ± 0.22	0.03 (0 – 0.83)	0.27 ± 0.26	0.23 (0.01 - 0.77)	0.033*

Hastalar tanı anındaki tümör boyutlarına göre <20 mm ve ≥20 mm olacak şekilde iki gruba ayrıldılar. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin tümör boyutu ile ilişkisinin değerlendirilmesi amacıyla iki grup arasındaki miRNA değişimleri analiz edildi. Analiz sonucunda mir-210 (p=0.037) ekspresyonunun 20 mm ve üstündeki tümörlerde daha yüksek eksprese edildiği istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer bakılan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı(p>0.05). Tablo-21'de tümör çapına göre miRNA ekspresyon farklılıkları belirtilmiştir.

Tablo 21. Tümör çapına göre tedavi öncesi miRNA ekspresyon farklılıklarının analizi

Tümör çapı	<20 mm		≥20 mm		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.12 ± 0.22	0.01 (0 – 0.83)	0.08 ± 0.13	0.01 (0 – 0.42)	0.989
Mir-21	0.85 ± 2	0.03 (0 - 7.64)	0.22 ± 0.58	0.02 (0 – 2.64)	0.443
Mir-141	0.59 ± 0.51	0.49 (0 – 1.81)	0.43 ± 0.61	0.14 (0.01 – 1.99)	0.140
Mir-200a	0.62 ± 0.5	0.53 (0.05 – 1.79)	0.72 ± 0.49	0.63 (0.03 – 1.65)	0.563
Mir-200b	0.55 ± 0.46	0.42 (0.03 – 1.47)	0.62 ± 0.42	0.49 (0.05 – 1.46)	0.623
Mir-200c	0.57 ± 0.59	0.42 (0 – 1.83)	0.67 ± 0.44	0.72 (0.01 – 1.4)	0.338
Mir-203	0.28 ± 0.33	0.18 (0.01 – 1.05)	0.23 ± 0.29	0.13 (0.02 – 1.37)	0.989
Mir-210	0.33 ± 0.42	0.26 (0.01 – 1.93)	0.47 ± 0.3	0.42 (0.04 - 1)	0.037*
Mir-375	0.6 ± 1.05	0.24 (0 – 4.44)	0.57 ± 0.6	0.35 (0.01 – 1.94)	0.492
Mir-34a	0.67 ± 0.61	0.44 (0.07 – 2.27)	0.72 ± 0.78	0.37 (0.08 – 3.13)	0.946
Mir-133a	0.17 ± 0.42	0.01 (0 – 1.55)	0.2 ± 0.46	0.04 (0 – 1.88)	0.155
Mir-155	2.61 ± 3.28	0.8 (0 – 9.37)	1.46 ± 2.17	0.46 (0 – 8.58)	0.619
Mir-139-5p	0.31 ± 0.65	0.02 (0 – 2.28)	0.25 ± 0.45	0.04 (0 – 1.75)	0.299
Mir-143	0.21 ± 0.37	0.05 (0.01 – 1.34)	0.12 ± 0.16	0.05 (0 – 0.58)	0.778
Mir-145	0.35 ± 0.46	0.11 (0 – 1.19)	0.26 ± 0.46	0.07 (0.01 – 1.74)	0.545
Mir-365	1.2 ± 1.65	0.39 (0 – 6.03)	1.08 ± 0.92	0.83 (0 – 2.84)	0.545
Mir-299-5p	0.75 ± 0.47	0.68 (0.12 – 2.18)	0.67 ± 0.33	0.62 (0.27 – 1.68)	0.798
Mir-411	0.03 ± 0.07	0.01 (0 – 0.32)	0.04 ± 0.14	0.01 (0 – 0.65)	0.717
Mir-452	0.0018 ± 0.00367	0.0002 (0 – 0.01)	0.0004 ± 0.00043	0.0003 (0 - 0)	0.527
Mir-17	0.2 ± 0,28	0.07 (0 – 0.83)	0.13 ± 0.19	0.03 (0 – 0.77)	0.527

Bir diğer analiz tanı anındaki lenf nodu metastaz varlığına göre yapıldı. Hastalar lenf nodu metastazı olan ve olmayanlar olarak iki gruba ayrıldı ve tedavi öncesinde miRNA ekspresyon düzeylerinin lenf nodu metastaz faktörüne etkisi araştırıldı. Analiz sonuçlarında mir-141 (p=0.043) in ekspresyon seviyelerinin lenf nodu metastazı olmayan grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü. Diğer bakılan miRNA'larda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar izlenmedi(p>0.05). Tablo-22'de lenf nodu metastaz varlığına göre her iki grubun miRNA ekspresyon değerleri ve istatistiksel analiz sonucu gösterilmektedir.

Tablo 22. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin lenf nodu metastazı durumuna göre analizleri

LN metastazı	yok		var		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.17 ± 0.28	0.01 (0 - .,83)	0.07 ± 0.11	0.01 (0 - 0.48)	0.528
Mir-21	0.69 ± 1.35	0.02 (0 - 3.74)	0.44 ± 1.47	0.04 (0 - 7.64)	0.794
Mir-141	0.78 ± 0.68	0.56 (0.07 - 1.99)	0.41 ± 0.5	0.17 (0 - 1.63)	0.043*
Mir-200a	0.61 ± 0.42	0.53 (0.07 - 1.38)	0.7 ± 0.52	0.6 (0.03 - 1.79)	0.724
Mir-200b	0.73 ± 0.47	0.59 (0.12 - 1.47)	0.55 ± 0.42	0.41 (0.03 - 1.38)	0.233
Mir-200c	0.49 ± 0.37	0.54 (0.01 - 0.97)	0.67 ± 0.54	0.6 (0 - 1.83)	0.528
Mir-203	0.26 ± 0.31	0.18 (0.03 - 0.95)	0.25 ± 0.3	0.13 (0.01 - 1.37)	0.963
Mir-210	0.44 ± 0.58	0.26 (0.01 - 1.93)	0.39 ± 0.27	0.32 (0.05 - 1)	0.508
Mir-375	0.43 ± 0.6	0.12 (0 - 1.59)	0.64 ± 0.88	0.41 (0.01 - 4.44)	0.331
Mir-34a	0.85 ± 0.7	0.47 (0.26 - 2.28)	0.65 ± 0.71	0.37 (0.07 - 3.13)	0.246
Mir-133a	0.23 ± 0.48	0.01 (0 - 1.29)	0.17 ± 0.43	0.02 (0 - 1.88)	0.116
Mir-155	0.9 ± 1.62	0.21 (0 - 5.2)	2.33 ± 2.97	0.83 (0 - 9.37)	0.158
Mir-139-5p	0.32 ± 0.64	0.01 (0 - 1.75)	0.26 ± 0.52	0.03 (0 - 2.28)	0.450
Mir-143	0.14 ± 0.26	0.02 (0.01 - 0.86)	0.17 ± 0.29	0.05 (0 - 1.34)	0.346
Mir-145	0.33 ± 0.4	0.07 (0.01 - 1.13)	0.29 ± 0.48	0.08 (0 - 1.74)	0.634
Mir-365	1.31 ± 1.81	0.83 (0 - 6.03)	1.08 ± 1.09	0.7 (0 - 3.98)	0.914
Mir-299-5p	0.68 ± 0.27	0.63 (0.27 - 1.14)	0.71 ± 0.43	0.69 (0.12 - 2.18)	1.000
Mir-411	0.1 ± 0.22	0.01 (0 - 0.65)	0.01 ± 0.01	0.01 (0 - 0.03)	0.770
Mir-452	0.0024 ± 0.00485	0.0002 (0 - 0.01)	0.0006 ± 0.00071	0.0003 (0 - 0)	0.590
Mir-17	0.2 ± 0.26	0.1 (0 - 0.69)	0.15 ± 0.23	0.03 (0 - 0.83)	0.818

Hastalar tanı anında tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve uzak organ metastazlarına bakılarak TNM evresine göre evrelendirildi. Tanı anında uzak organ metastazı bulunan hastalardaki miRNA ekspresyon seviyeleri diğer hastalarla karşılaştırıldı. Analiz sonuçlarında mir-375 (p=0.001) 'in ekspresyon seviyesi, metastatik hastalığa sahip grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Mir-200a (p=0.067) ve mir-203'ün (p=0.067) ise metastatik hastalığa sahip grupta yüksek ekspresyon gösterdiği izlense de bu istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmedi. Bakılan diğer miRNA'larda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar izlenmedi(p>0.05). Tablo-23'de hastalık evresine göre grupların miRNA ekspresyon değerleri ve istatistiksel analiz sonucu gösterilmektedir.

Tablo 23. Tanı anında metastatik meme kanserine sahip hastalardaki tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeyi analizleri

	Metastatik hastalık		diğer		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.09 ± 0.1	0.02 (0 – 0.26)	0.1 ± 0.19	0.01 (0 – 0.83)	0.140
Mir-21	0.86 ± 2.39	0.03 (0 – 7.64)	0.39 ± 0.95	0.03 (0 – 3.74)	0.842
Mir-141	0.62 ± 0.65	0.2 (0.02 – 1.57)	0.46 ± 0.54	0.3 (0 – 1.99)	0.590
Mir-200a	0.94 ± 0.56	0.74 (0.27 – 1.79)	0.59 ± 0.44	0.5 (0.03 – 1.65)	0.067
Mir-200b	0.45 ± 0.36	0.34 (0.05 – 1.02)	0.64 ± 0.45	0.49 (0.03 – 1.47)	0.259
Mir-200c	0.84 ± 0.58	0.97 (0.01 – 1.83)	0.55 ± 0.47	0.48 (0 – 1.79)	0.123
Mir-203	0.33 ± 0.28	0.28 (0.07 – 1.05)	0.23 ± 0.31	0.12 (0.01 – 1.37)	0.067
Mir-210	0.41 ± 0.33	0.31 (0.05 - 1)	0.4 ± 0.38	0.3 (0.01 – 1.93)	0.866
Mir-375	1.27 ± 1.24	0.95 (0.22 – 4.44)	0.36 ± 0.46	0.11 (0 – 1.59)	0.001*
Mir-34a	0.59 ± 0.46	0.53 (0.1 – 1.4)	0.73 ± 0.77	0.36 (0.07 – 3.13)	0.842
Mir-133a	0.23 ± 0.47	0.06 (0 – 1.55)	0.17 ± 0.43	0.02 (0 – 1.88)	0.209
Mir-155	2.45 ± 2.77	1.37 (0.04 – 7.73)	1.82 ± 2.77	0.67 (0 – 9.37)	0.508
Mir-139-5p	0.17 ± 0.45	0.02 (0 – 1.46)	0.32 ± 0.57	0.05 (0 – 2.28)	0.301
Mir-143	0.14 ± 0.25	0.03 (0 – 0.74)	0.17 ± 0.29	0.07 (0 – 1.34)	0.346
Mir-145	0.37 ± 0.54	0.11 (0.01 – 1.48)	0.27 ± 0.44	0.07 (0 – 1.74)	0.656
Mir-365	1.49 ± 0.97	1.57 (0.01 – 2.63)	1.02 ± 1.37	0.5 (0 – 6.03)	0.102
Mir-299-5p	0.85 ± 0.61	0.66 (0.34 – 2.18)	0.65 ± 0.28	0.67 (0.12 – 1.27)	0.548
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.04 ± 0.13	0.01 (0 – 0.65)	0.656
Mir-452	0.0012 ± 0.00291	0.0003 (0 – 0.01)	0.0006 ± 0.00069	0.0002 (0 – 0.01)	0.569
Mir-17	0.17 ± 0.25	0.03 (0 – 0.83)	0.17 ± 0.25	0.03 (0 – 0.83)	0.432

Verilen kemoterapiler sırasında hastalar yan etki açısından takip edildi ve takip sırasında nötropeni gelişen hastalar tespit edildi. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon seviyelerinin, tedavi sonrasında gelişen nötropeni ile anlamlı ilişkisi olup olmadığının değerlendirilmesi için her iki grup arasında istatistiksel analiz yapıldı. Yapılan analizde her iki grup arasında hiçbir miRNA'nın ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). Yalnız mir-452 ($p=0.079$)'nin nötropeni gelişmeyen hasta grubunda daha yüksek eksprese edildiği fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Tablo-24' de nötropeni gelişimine göre her iki grubun miRNA ekspresyon değerleri ve istatistiksel analiz sonucu gösterilmektedir.

Tablo 24. Tedavi öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin kemoterapi sonrası gelişen nötropeni varlığına göre analizleri

nötropeni	yok		var		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.1 ± 0.19	0.01 (0 – 0.83)	0.09 ± 0.15	0.01 (0 – 0.48)	0.819
Mir-21	0.39 ± 0.95	0.03 (0 – 3.74)	0.64 ± 1.88	0.04 (0 – 7.64)	0.619
Mir-141	0.49 ± 0.6	0.18 (0 – 1.99)	0.51 ± 0.54	0.34 (0.01 – 1.57)	0.798
Mir-200a	0.72 ± 0.52	0.58 (0.05 – 1.65)	0.62 ± 0.47	0.59 (0.03 – 1.79)	0.657
Mir-200b	0.61 ± 0.48	0.42 (0.03 – 1.47)	0.57 ± 0.38	0.52 (0.05 – 1.46)	0.968
Mir-200c	0.56 ± 0.46	0.56 (0 – 1.4)	0.7 ± 0.56	0.59 (0.02 – 1.83)	0.372
Mir-203	0.24 ± 0.33	0.12 (0.01 – 1.37)	0.27 ± 0.27	0.21 (0.02 – 1.05)	0.443
Mir-210	0.43 ± 0.42	0.29 (0.07 – 1.93)	0.38 ± 0.28	0.31 (0.01 – 1)	1.000
Mir-375	0.53 ± 0.56	0.35 (0.01 – 1.59)	0.65 ± 1.07	0.31 (0 – 4.44)	0.677
Mir-34a	0.71 ± 0.79	0.36 (0.08 – 3.13)	0.68 ± 0.59	0.47 (0.07 – 2.27)	0.619
Mir-133a	0.22 ± 0.49	0.02 (0 – 1.88)	0.14 ± 0.36	0.01 (0 – 1.55)	0.338
Mir-155	1.4 ± 1.71	0.67 (0 – 5.2)	2.68 ± 3.57	0.59 (0 – 9.37)	0.600
Mir-139-5p	0.25 ± 0.48	0.04 (0 – 1.75)	0.31 ± 0.63	0.02 (0 – 2.28)	0.840
Mir-143	0.14 ± 0.2	0.05 (0 – 0.86)	0.2 ± 0.35	0.05 (0.01 – 1.34)	0.904
Mir-145	0.31 ± 0.47	0.12 (0 – 1.74)	0.29 ± 0.45	0.07 (0.01 – 1.48)	0.925
Mir-365	1.06 ± 1.38	0.69 (0 – 6.03)	1.23 ± 1.19	0.87 (0 – 3.98)	0.411
Mir-299-5p	0.63 ± 0.24	0.67 (0.24 – 1.14)	0.79 ± 0.52	0.73 (0.12 – 2.18)	0.459
Mir-411	0.05 ± 0.15	0.01 (0 – 0.65)	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.925
Mir-452	0.0015 ± 0.00333	0.0004 (0 – 0.01)	0.0004 ± 0.00063	0.0002 (0 - 0)	0.079
Mir-17	0.19 ± 0.26	0.04 (0 – 0.83)	0.14 ± 0.21	0.05 (0 – 0.69)	0.638

Hastaların moleküler alttıplere göre mirna ekspresyon seviyelerini karşılaştırdığımızda bazı mirnaların gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturduğu saptandı. Luminal A grubunda tedavi öncesinde bakılan mirnalardan mir-105 (p=0.014), mir-200b (p=0.039) ve mir-375 (p=0.048)'in ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi. Bununla birlikte mir-133a (0.062)'nin yine luminal A grubunda daha düşük ekspresyon gösterdiği ve istatistiksel olarak anlamlı olma eğilimi taşıdığı görüldü. Bakılan diğer mirna analizlerinde her iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05). Luminal B ve üçlü negatif gruplarında ise diğer gruplara kıyasla anlamlı bir mirna ekspresyon farklılığı görülmedi (p>0.05). Sadece mir-133a (p=0.076)'da luminal B grubunda

anamlı olma eğilimi gösteren yükseklik izlendi. Ayrıca Luminal B grubunda mir34a (p=0.088), mir-411 (p=0.088) ve mir 17 (p=0.088) diğer gruplara göre anlamlı olmayan bir farklılık gösteriyordu. Çalışmamızda sadece 3 hasta Her2 grubunu oluşturduğu için bu hasta grubunda mirna ekspresyon analizleri istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Tablo-25-26-27'de hastaların moleküler alttiplere göre analizleri gösterilmektedir.

Tablo 25. Luminal A'nın diğer alttiplere göre mirna ekspresyon farklılıkları

	Luminal A		Diğer		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.04 ± 0.1	0.01 (0 – 0.48)	0.18 ± 0.21	0.15 (0 – 0.83)	0.014*
Mir-21	0.32 ± 0.8	0.03 (0 – 2.95)	0.75 ± 1.99	0.03 (0 – 7.64)	0.850
Mir-141	0.49 ± 0.61	0.18 (0 – 1.99)	0.52 ± 0.53	0.34 (0.01 – 1.63)	0.533
Mir-200a	0.62 ± 0.52	0.48 (0.03 – 1.65)	0.74 ± 0.45	0.64 (0.23 – 1.79)	0.242
Mir-200b	0.46 ± 0.36	0.42 (0.03 – 1.47)	0.77 ± 0.47	0.89 (0.11 – 1.46)	0.039*
Mir-200c	0.52 ± 0.45	0.48 (0.01 – 1.83)	0.75 ± 0.56	0.89 (0 – 1.79)	0.221
Mir-203	0.18 ± 0.17	0.12 (0.01 – 0.67)	0.36 ± 0.4	0.22 (0.01 – 1.37)	0.149
Mir-210	0.44 ± 0.41	0.34 (0.01 – 1.93)	0.36 ± 0.29	0.27 (0.04 - 1)	0.725
Mir-375	0.36 ± 0.42	0.22 (0 – 1.46)	0.89 ± 1.11	0.56 (0.02 – 4.44)	0.048*
Mir-34a	0.63 ± 0.66	0.31 (0.07 – 2.28)	0.79 ± 0.76	0.56 (0.1 – 3.13)	0.302
Mir-133a	0.04 ± 0.06	0.01 (0 – 0.27)	0.38 ± 0.63	0.02 (0 – 1.88)	0.062
Mir-155	2.02 ± 2.81	0.8 (0 – 8.72)	1.92 ± 2.75	0.38 (0 – 9.37)	0.588
Mir-139-5p	0.22 ± 0.53	0.02 (0 – 2.28)	0.35 ± 0.57	0.08 (0 – 1.75)	0.516
Mir-143	0.16 ± 0.3	0.04 (0 – 1.34)	0.17 ± 0.26	0.05 (0 – 0.86)	0.588
Mir-145	0.29 ± 0.51	0.07 (0 – 1.74)	0.31 ± 0.39	0.15 (0.01 – 1.19)	0.290
Mir-365	0.95 ± 1.07	0.51 (0 – 3.98)	1.39 ± 1.53	0.89 (0.01 – 6.03)	0.211
Mir-299-5p	0.71 ± 0.42	0.68 (0.12 – 2.18)	0.69 ± 0.36	0.66 (0.27 – 1.68)	0.892
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.07 ± 0.17	0.01 (0 – 0.65)	0.277
Mir-452	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.766
Mir-17	0.15 ± 0.24	0.03 (0 – 0.83)	0.18 ± 0.24	0.07 (0 – 0.77)	0.516

Tablo 26. Luminal B'nin diğer alt tiplere göre mirna ekspresyon farklılıkları

	Luminal B		Diğer		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.2 ± 0.29	0.09 (0 – 0.83)	0.07 ± 0.12	0.01 (0 – 0.48)	0.278
Mir-21	0,61 ± 1,29	0.05 (0 – 3.74)	0.48 ± 1.47	0.03 (0 – 7.64)	0.561
Mir-141	0.54 ± 0.52	0,47 (0,03 - 1,63)	0,49 ± 0,58	0,2 (0 - 1,99)	0,496
Mir-200a	0.58 ± 0.23	0.58 (0.23 – 0.86)	0.7 ± 0.54	0.59 (0.03 – 1.79)	1.000
Mir-200b	0.79 ± 0.44	0.92 (0.11 – 1.33)	0.54 ± 0.42	0.42 (0.03 – 1.47)	0.164
Mir-200c	0.75 ± 0.53	0.93 (0 – 1.4)	0.59 ± 0.5	0.53 (0.01 – 1.83)	0.454
Mir-203	0.4 ± 0.5	0.18 (0.01 – 1.37)	0.22 ± 0.23	0.15 (0.01 – 1.05)	0.630
Mir-210	0.46 ± 0.38	0.27 (0.07 - 1)	0.39 ± 0.36	0.31 (0.01 – 1.93)	0.703
Mir-375	0.73 ± 0.64	0.77 (0.05 – 1.59)	0.55 ± 0.86	0.28 (0 – 4.44)	0.249
Mir-34a	0.83 ± 0.47	0.61 (0.17 – 1.47)	0.67 ± 0.75	0.31 (0.07 – 3.13)	0.088
Mir-133a	0.56 ± 0.73	0.17 (0 – 1.88)	0.09 ± 0.27	0.01 (0 – 1.55)	0.076
Mir-155	1.59 ± 2.38	0.4 (0 – 5.59)	2.07 ± 2.86	0.8 (0 – 9.37)	0.539
Mir-139-5p	0.5 ± 0.67	0.15 (0 – 1.75)	0.22 ± 0.5	0.02 (0 – 2.28)	0.496
Mir-143	0.19 ± 0.3	0.05 (0.01 – 0.86)	0.16 ± 0.28	0.05 (0 – 1.34)	0.703
Mir-145	0.21 ± 0.29	0,8 (0.01 – 0.81)	0.32 ± 0.49	0.07 (0 – 1.74)	0.753
Mir-365	1.72 ± 1.95	1.12 (0.01 – 6.03)	0.99 ± 1.05	0.54 (0 – 3.98)	0.342
Mir-299-5p	0.71 ± 0.25	0.75 (0.32 – 1.14)	0.7 ± 0.43	0.67 (0.12 – 2.18)	0.561
Mir-411	0.13 ± 0.24	0.02 (0 – 0.65)	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.088
Mir-452	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.561
Mir-17	0.23 ± 0.25	0.18 (0.01 – 0.77)	0.18 ± 0.24	0.07 (0 – 0.77)	0.088

Tablo 27. Üçlü negatif grubun diğer alttiplere göre mirna ekspresyon farklılıkları

	Üçlü negatif		Diğer		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.17 ± 0.16	0.18 (0 – 0.42)	0.08 ± 0.17	0.01 (0 – 0.83)	0.148
Mir-21	0.03 ± 0.02	0.02 (0 – 0.06)	0.59 ± 1.53	0.03 (0 – 7.64)	0.343
Mir-141	0.47 ± 0.49	0.32 (0.01 – 1.35)	0.51 ± 0.59	0.23 (0 – 1.99)	0.868
Mir-200a	0.55 ± 0.25	0.52 (0.27 – 0.91)	0.7 ± 0.52	0.6 (0.03 – 1.79)	0.782
Mir-200b	0.87 ± 0.56	0.98 (0.12 – 1.46)	0.54 ± 0.4	0.45 (0.03 – 1.47)	0.184
Mir-200c	0.61 ± 0.71	0.41 (0.01 – 1.79)	0.62 ± 0.48	0.59 (0 – 1.83)	0.644
Mir-203	0.29 ± 0.19	0.25 (0.02 – 0.54)	0.25 ± 0.32	0.13 (0.01 – 1.37)	0.288
Mir-210	0.25 ± 0.12	0.3 (0.04 – 0.38)	0.43 ± 0.38	0.3 (0.01 – 1.93)	0.470
Mir-375	0.49 ± 0.74	0.18 (0.02 – 1.94)	0.6 ± 0.84	0.38 (0 – 4.44)	0.868
Mir-34a	0.5 ± 0.5	0.28 (0.18 – 1.49)	0.73 ± 0.73	0.44 (0.07 – 3.13)	0.493
Mir-133a	0.03 ± 0.06	0.01 (0 – 0.14)	0.21 ± 0.47	0.02 (0 – 1.88)	0.493
Mir-155	1.96 ± 3.69	0.3 (0 – 9.37)	1.98 ± 2.62	0.8 (0 – 8.72)	0.592
Mir-139-5p	0.06 ± 0.09	0.02 (0 – 0.22)	0.32 ± 0.58	0.03 (0 – 2.28)	0.425
Mir-143	0.1 ± 0.07	0.07 (0.02 – 0.19)	0.18 ± 0.3	0.05 (0 – 1.34)	0.493
Mir-145	0.37 ± 0.42	0.19 (0.07 – 1.16)	0.29 ± 0.47	0.07 (0 – 1.74)	0.184
Mir-365	0.78 ± 0.85	0.44 (0.06 – 2.33)	1.2 ± 1.35	0.83 (0 – 6.03)	0.868
Mir-299-5p	0.78 ± 0.54	0.72 (0.27 – 1.68)	0.69 ± 0.37	0.67 (0.12 – 2.18)	0.926
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.04 ± 0.12	0.01 (0 – 0.65)	0.726
Mir-452	0 ± 0	0 (0 – 0)	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.470
Mir-17	0.03 ± 0.04	0.01 (0 – 0.12)	0.19 ± 0.25	0.07 (0 – 0.83)	0.085

3. TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI MİRNA EKSPRESYON ANALİZİ

Çalışmamıza 20 tip miRNA dahil edilmiştir. Bu miRNA tipleri sırası ile miR-105, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-210, miR-375, miR-34a, miR-133a, miR-155, miR-139-5p, miR-143, miR-145, miR-365, miR-299-5p, miR-411, miR-452 ve miR-17'dir. Hastaların tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak istatistiksel analizler yapıldı. Çalışmamızda 2 hastanın onamı geri çekmesi nedeniyle tedavi sonrasında kanları alınamamış olup analizler 38 hastada yapıldı.

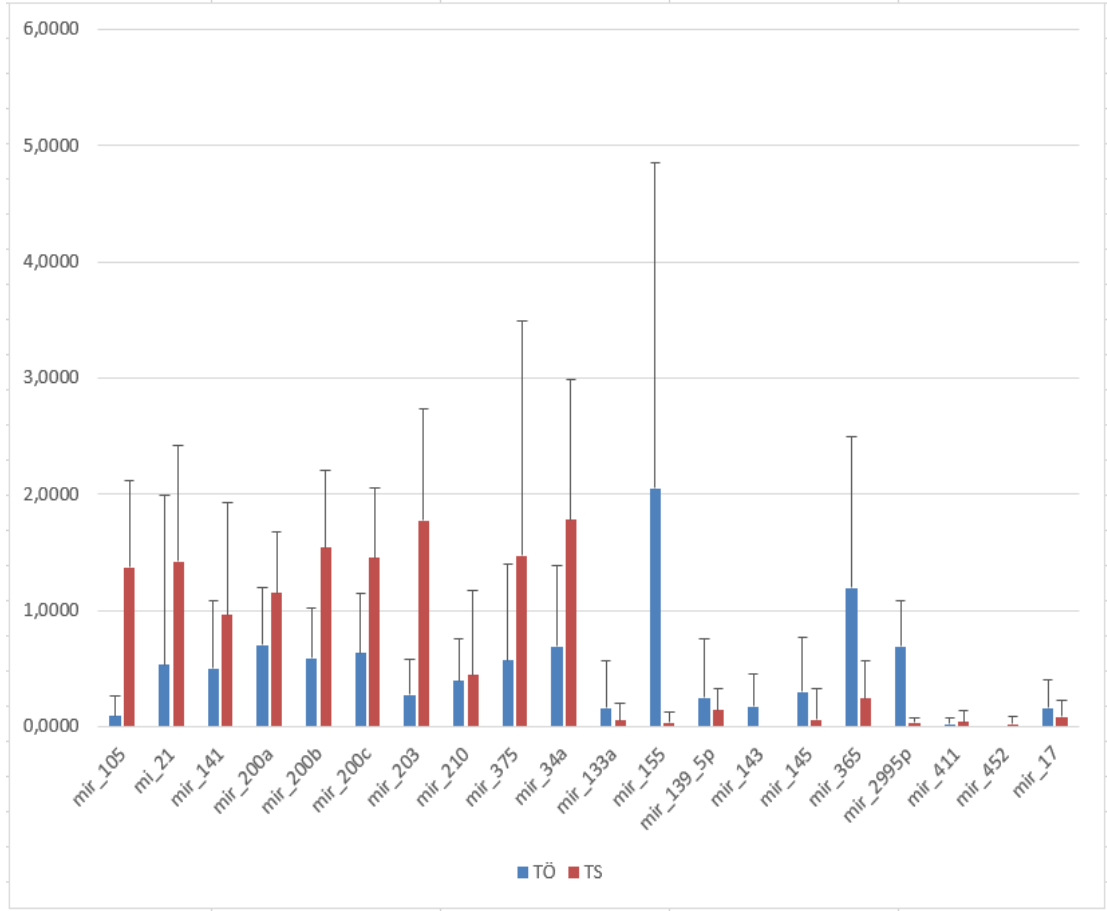
3.1. Tüm Hastaların Tedavi Öncesi ve Sonrası Mirna Değişim Analizi

Hastaların öncelikle tedavi öncesi ve sonrasındaki miRNA $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarında mir-105 ($p=0.0001$), mir-21 ($p=0.0001$), mir-141 ($p=0.025$), mir-200a ($p=0.001$), mir-200b ($p=0.0001$), mir-200c ($p=0.0001$), mir-203

(p=0.0001), mir-34a (p=0.0001) ve mir-452 (p=0.011)'nin tedavi öncesi ve tedavi sonrası ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı. Bu mikroRNA'ların tedavi öncesine kıyasla tedavi sonrasında artış gösterdiği tespit edildi. Öte yandan mir-155 (p=0.0001), mir-143 (p=0.0001), mir-145 (p=0.0001), mir-365 (p=0.0001) ve mir-299-5p (p=0.0001)'nin tedavi öncesi ve tedavi sonrası ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında tedavi sonrasındaki seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğu görüldü. Bakılan diğer miRNA'lardan mir-375 (p=0.062)'in tedavi sonrasında arttığı ve mir-133a (p=0.071)'nin tedavi sonrası azaldığı görülmüş olup bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Mir-210, mir-139-5p, mir-411 ve mir-17 ekspresyon seviyelerinde tedavi öncesi ve sonrasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p>0.05). Tablo-28 ve şekil-3'de çalışmamızdaki miRNA seviyelerinin tüm hastalarda tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası değişimleri ve analiz sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 28. Tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası miRNA ekspresyon değişimlerinin analizi

	Tedavi öncesi (n=38)		Tedavi sonrası (n=38)		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.09 ± 0.17	0.01 (0 – 0.83)	1.37 ± 0.75	1.2 (0.25 – 3.92)	0.0001*
Mir-21	0.53 ± 1.46	0.03 (0 – 7.64)	1.42 ± 1	1.21 (0.42 – 6.54)	0.0001*
Mir-141	0.5 ± 0.58	0.2 (0 – 1.99)	0.96 ± 0.97	0.62 (0 – 4.76)	0.025*
Mir-200a	0.7 ± 0.49	0.63 (0.03 – 1.79)	1.15 ± 0.53	1.03 (0.36 – 2.72)	0.001*
Mir-200b	0.59 ± 0.43	0.48 (0.03 – 1.47)	1.54 ± 0.67	1.47 (0.03 – 3.17)	0.0001*
Mir-200c	0.63 ± 0.51	0.59 (0 – 1.83)	1.45 ± 0.6	1.44 (0.3 – 2.74)	0.0001*
Mir-203	0.27 ± 0.31	0.17 (0.01 – 1.37)	1.77 ± 0.96	1.53 (0.51 – 4.5)	0.0001*
Mir-210	0.39 ± 0.36	0.29 (0.01 – 1.93)	0.44 ± 0.73	0.04 (0 – 2.8)	0.464
Mir-375	0.57 ± 0.83	0.28 (0 – 4.44)	1.47 ± 2.02	0.28 (0 – 6.84)	0.062
Mir-34a	0.69 ± 0.7	0.42 (0.07 – 3.13)	1.78 ± 1.21	1.49 (0.54 – 6.99)	0.0001*
Mir-133a	0.16 ± 0.41	0.02 (0 – 1.88)	0.05 ± 0.15	0 (0 – 0.71)	0.071
Mir-155	2.05 ± 2.8	0.67 (0 – 9.37)	0.03 ± 0.1	0 (0 – 0.47)	0.0001*
Mir-139-5p	0.25 ± 0.5	0.03 (0 – 2.28)	0.14 ± 0.18	0.04 (0 – 0.72)	0.925
Mir-143	0.17 ± 0.28	0.05 (0 – 1.34)	0 ± 0	0 (0 – 0.03)	0.0001*
Mir-145	0.3 ± 0.47	0.07 (0 – 1.74)	0.06 ± 0.27	0.01 (0 – 1.69)	0.0001*
Mir-365	1.19 ± 1.3	0.83 (0 – 6.03)	0.24 ± 0.32	0.09 (0 – 1.29)	0.0001*
Mir-299-5p	0.69 ± 0.39	0.67 (0.12 – 2.18)	0.03 ± 0.04	0.01 (0 – 0.15)	0.0001*
Mir-411	0.02 ± 0.05	0.01 (0 – 0.32)	0.04 ± 0.1	0.01 (0 – 0.41)	0.491
Mir-452	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.02 ± 0.06	0 (0 – 0.35)	0.011*
Mir-17	0.16 ± 0.24	0.04 (0 – 0.83)	0.08 ± 0.14	0.02 (0 – 0.56)	0.274



Şekil 3. Tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası miRNA değişimlerinin grafiksel anlatımı

3.2. Hastaların Moleküler Altliplere göre tedavi öncesi ve sonrası mirna değişim analizleri

Hastaları moleküler altliplere göre 4'e ayırdıktan sonra grupların kendi içinde tedavi öncesi ve sonrası mirna ekspresyon seviyelerini karşılaştırdık. Analiz sonuçlarında 22 hastadan oluşan luminal A grubunda mir-105 ($p=0.0001$), mir-21 ($p=0.002$), mir-200a ($p=0.005$), mir-200b ($p=0.0001$), mir-200c ($p=0.0001$), mir-203 ($p=0.0001$), mir-375 ($p=0.042$), mir-34a ($p=0.006$), mir-452 ($p=0.006$)'nin ekspresyon seviyelerinde tedavi sonrasında artış gözlenirken, mir-155 ($p=0.0001$), mir-143 ($p=0.0001$), mir-145 ($p=0.003$), mir-365 ($p=0.002$), mir-299-5p ($p=0.0001$)'nin ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edildi. Yedi hastanın oluşturduğu Luminal B grubunda ise Luminal A grubuna benzer şekilde tedavi sonrasında mir-105 ($p=0.018$), mir-200b ($p=0.018$), mir-203 ($p=0.028$), mir-34a ($p=0.018$) da artış gözlenirken, mir-155 ($p=0.028$), mir-143 ($p=0.018$), mir-365 ($p=0.043$), mir-299-5p ($p=0.018$) seviyelerinde azalma izlendi. Bununla birlikte mir-141 ($p=0.036$) ve mir-200a ($p=0.063$)'nin tedavi sonrasında artış gösterdiği görüldü.

de bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Her2 grubunu oluşturan yalnız 3 hastamız olması nedeniyle tedavi öncesi ve sonrası mirna değişim analizleri bu grup için yapılamadı. Üçlü negatif grupta olan 6 hastada tedavi öncesi ve sonrası mirna değişimleri incelendiğinde mir-105 (p=0.028), mir-21 (p=0.028), mir-34a (p=0.028) nın tedavi sonrasında arttığı, mir-210 (p=0.028), mir-155 (p=0.046), mir-143 (p=0.046), mir-145 (p=0.028) ve mir-299-5p (p=0.028) seviyelerinin azaldığı saptandı. Mir-203 (p=0.075)'ün de tedavi sonrasında artış gösterdiği fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Tablo 29-30-31'de üç moleküler alt grubun tedavi öncesi ve sonrası mirna değişimleri belirtilmiştir.

Tablo 29. Luminal A grubunun tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası mirna ekspresyon değişimleri

Luminal A	Tedavi öncesi		Tedavi sonrası		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.07 ± 0.14	0.01 (0 – 0.48)	1.39 ± 0.75	1.2 (0.69 – 3.92)	0.0001*
Mir-21	0.3 ± 0.82	0.02 (0 – 2.95)	1.43 ± 1.24	1.21 (0.42 – 6.54)	0.002*
Mir-141	0.51 ± 0.65	0.18 (0 – 1.99)	0.77 ± 1.03	0.39 (0 – 4.76)	0.485
Mir-200a	0.65 ± 0.44	0.53 (0.05 – 1.49)	1.13 ± 0.45	1.13 (0.36 – 2.15)	0.005*
Mir-200b	0.5 ± 0.42	0.39 (0.03 – 1.47)	1.43 ± 0.52	1.36 (0.03 – 2.33)	0.0001*
Mir-200c	0.57 ± 0.51	0.48 (0.01 – 1.83)	1.6 ± 0.55	1.56 (0.32 – 2.74)	0.0001*
Mir-203	0.18 ± 0.16	0.13 (0.01 – 0.67)	1.63 ± 0.88	1.39 (0.66 – 3.98)	0.0001*
Mir-210	0.39 ± 0.44	0.24 (0.01 – 1.93)	0.5 ± 0.7	0.04 (0 – 2.05)	0.545
Mir-375	0.43 ± 0.43	0.28 (0.01 – 1.46)	1.5 ± 1.94	0.53 (0 – 6.84)	0.042*
Mir-34a	0.71 ± 0.84	0.3 (0.07 – 3.13)	1.75 ± 1.31	1.63 (0.54 – 6.99)	0.006*
Mir-133a	0.05 ± 0.09	0.01 (0 – 0.3)	0.05 ± 0.15	0 (0 – 0.71)	0.390
Mir-155	1.99 ± 2.65	0.67 (0 – 8.72)	0.01 ± 0.01	0 (0 – 0.03)	0.0001*
Mir-139-5p	0.2 ± 0.52	0.02 (0 – 2.28)	0.14 ± 0.19	0.04 (0 – 0.72)	0.355
Mir-143	0.13 ± 0.28	0.04 (0 – 1.34)	0 ± 0.01	0 (0 – 0.03)	0.0001*
Mir-145	0.32 ± 0.52	0.07 (0 – 1.74)	0.02 ± 0.02	0.02 (0 – 0.07)	0.003*
Mir-365	1.08 ± 1.12	0.72 (0 – 3.98)	0.22 ± 0.31	0.11 (0 – 1.29)	0.002*
Mir-299-5p	0.68 ± 0.4	0.67 (0.12 – 2.18)	0.03 ± 0.04	0.01 (0 – 0.15)	0.0001*
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.05 ± 0.11	0.02 (0 – 0.38)	0.108
Mir-452	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.03 ± 0.08	0 (0 – 0.35)	0.006*
Mir-17	0.19 ± 0.26	0.05 (0 – 0.83)	0.08 ± 0.14	0.02 (0 – 0.5)	0.236

Tablo 30. Luminal B grubunun tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası mirna ekspresyon değişimleri

Luminal B	Tedavi öncesi		Tedavi sonrası		p değeri
	A.O \pm S.S	Med (min - maks)	A.O \pm S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.17 \pm 0,3	0.04 (0 – 0.83)	1.48 \pm 0.74	1.3 (0.68 – 2.55)	0.018*
Mir-21	1.69 \pm 2.96	0.19 (0 – 7.64)	1.49 \pm 0.62	1.2 (0.8 – 2.64)	0.866
Mir-141	0.51 \pm 0.52	0.42 (0.06 – 1.5)	1.11 \pm 0.89	1 (0.06 – 2.55)	0.063
Mir-200a	0.7 \pm 0.6	0.84 (0.03 – 1.79)	1.43 \pm 0.69	1.1 (0.69 – 2.72)	0.063
Mir-200b	0.72 \pm 0.41	0.81 (0,11 – 1.33)	1.93 \pm 0.81	1.9 (0.92 – 3.17)	0.018*
Mir-200c	0.7 \pm 0.66	0.48 (0 – 1.79)	1.23 \pm 0.76	1.42 (0.3 – 2.49)	0.176
Mir-203	0.39 \pm 0.43	0.24 (0.01 – 1.05)	2.23 \pm 1.39	2.07 (0.83 – 4.5)	0.028*
Mir-210	0.41 \pm 0.26	0.32 (0.07 – 0.82)	0.64 \pm 1.11	0.03 (0 – 2.8)	0.866
Mir-375	1.12 \pm 1.59	0.41 (0.04 – 4.44)	1.66 \pm 2.34	0.11 (0 – 5.81)	0.866
Mir-34a	0.78 \pm 0.57	0.55 (0.17 – 1.49)	2.17 \pm 1.48	1.4 (1.04 – 5.03)	0.018*
Mir-133a	0.66 \pm 0.81	0.12 (0.01 – 1.88)	0.04 \pm 0.05	0.02 (0 – 0.13)	0.128
Mir-155	3.1 \pm 3.34	2.43 (0 – 9.37)	0.01 \pm 0.01	0 (0 – 0.03)	0.028*
Mir-139-5p	0.53 \pm 0.58	0.22 (0.08 – 1.46)	0.17 \pm 0.24	0.03 (0 – 0.52)	0.128
Mir-143	0.27 \pm 0.37	0.08 (0.01 – 0.86)	0 \pm 0	0 (0 – 0.01)	0.018*
Mir-145	0.37 \pm 0.45	0.19 (0.01 – 1.19)	0.25 \pm 0.63	0.01 (0 – 1.69)	0.499
Mir-365	1.91 \pm 1.96	1.39 (0.06 – 6.03)	0.33 \pm 0.3	0.31 (0 – 0.76)	0.043*
Mir-299-5p	0.56 \pm 0.34	0.34 (0.28 – 1.14)	0.02 \pm 0.03	0 (0 – 0.05)	0.018*
Mir-411	0.06 \pm 0.11	0.02 (0 – 0.32)	0.01 \pm 0.01	0.01 (0 – 0.02)	0.128
Mir-452	0 \pm 0	0 (0 – 0.01)	0 \pm 0	0 (0 - 0)	0.612
Mir-17	0.15 \pm 0.23	0.05 (0 – 0.63)	0.02 \pm 0.01	0.02 (0 – 0.04)	0.176

Tablo 31. Üçlü negatif grupta tedavi öncesi ve 3 kür tedavi sonrası mirna ekspresyon değişimleri

Üçlü negatif	Tedavi öncesi		Tedavi sonrası		p değeri
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
Mir-105	0.05 ± 0.06	0.03 (0 – 0.15)	1.32 ± 0.84	1.22 (0.25 – 2.36)	0.028*
Mir-21	0.27 ± 0.36	0.07 (0 – 0.79)	1.26 ± 0.53	1.37 (0.5 – 1.81)	0.028*
Mir-141	0.53 ± 0.6	0.35 (0.05 – 1.63)	1.34 ± 0.9	1.07 (0.47 – 2.57)	0.173
Mir-200a	1.02 ± 0.53	0.92 (0.36 – 1.65)	1.11 ± 0.65	0.87 (0.72 – 2.43)	0.753
Mir-200b	0.78 ± 0.37	0.88 (0.13 – 1.1)	1.62 ± 1.01	1.71 (0.27 – 2.93)	0.116
Mir-200c	0.85 ± 0.3	0.79 (0.57 – 1.4)	1.25 ± 0.54	1.18 (0.64 – 2.13)	0.173
Mir-203	0.4 ± 0.5	0.25 (0.03 – 1.37)	1.76 ± 0.86	2.18 (0.51 – 2.43)	0.075
Mir-210	0.42 ± 0.28	0.35 (0.11 – 0.8)	0.03 ± 0.05	0.01 (0 – 0.14)	0.028*
Mir-375	0.31 ± 0.52	0.04 (0.01 – 1.31)	1.08 ± 2.29	0.11 (0.01 – 5.73)	0.463
Mir-34a	0.7 ± 0.46	0.51 (0.31 – 1.4)	1.68 ± 0.61	1.49 (0.89 – 2.42)	0.028*
Mir-133a	0.02 ± 0.02	0.02 (0 – 0.05)	0.11 ± 0.26	0 (0 – 0.64)	0.463
Mir-155	1.97 ± 3.36	0.44 (0.01 – 8.58)	0.07 ± 0.16	0.01 (0 – 0.4)	0.046*
Mir-139-5p	0.18 ± 0.39	0.02 (0.01 – 0.96)	0.06 ± 0.1	0.01 (0 – 0.25)	0.753
Mir-143	0.27 ± 0.24	0.27 (0.01 – 0.58)	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.046*
Mir-145	0.08 ± 0.07	0.06 (0.01 – 0.22)	0.01 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.028*
Mir-365	0.57 ± 0.89	0.17 (0 – 2.27)	0.2 ± 0.42	0.03 (0 – 1.07)	0.345
Mir-299-5p	0.74 ± 0,3	0.86 (0.24 - 1)	0.02 ± 0.02	0.01 (0 – 0.04)	0.028*
Mir-411	0.01 ± 0.01	0.01 (0 – 0.03)	0.07 ± 0.16	0.01 (0 – 0.41)	0.753
Mir-452	0 ± 0	0 (0 - 0)	0 ± 0	0 (0 – 0.01)	0.345
Mir-17	0.07 ± 0.1	0.02 (0 – 0.24)	0.13 ± 0.21	0.05 (0 – 0.56)	0.463

TARTIŞMA

Çalışmamızda, yeni tanı invaziv meme kanseri hastalarının plazmasında, prediktif ve prognostik değer taşıma potansiyeli gösteren mikroRNA'ları, tedavi öncesi ve tedavi sonrası araştırdık. Amacımız mikroRNA'ların meme kanserinin tanısında, takibinde ve tedavi seçiminde klinisyenlere yol gösterebilecek non-invaziv biyobelirteçler olduğunu ortaya koymak ve mevcut çalışmalara bu bağlamda katkı sağlamaktır.

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserler arasında ilk sırada yer almaktadır. Çoğu ülkede kadınların ana ölüm nedenleri arasında yer alan önemli bir halk sağlığı sorunudur(1).

Meme kanseri, farklı histolojik ve biyolojik özellikleri bulunan, klinik süreçleri farklı ve alt tiplerinin tedaviye verdikleri cevapları farklı olan, heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenite nedeniyle gen ekspresyon profili gibi moleküler yöntemler geliştirilerek moleküler sınıflamaya geçilmiş olup, hedefe yönelik tedavi ve bireyselleştirilmiş tedavinin önü açılmıştır(32). Günümüzde hastalar moleküler sınıflamaya göre luminal A, luminal B (Her2 pozitif ve negatif), Her2 grubu ve üçlü negatif olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. En sık görülen moleküler alt tip luminal A(%50), ikinci sıklıkta görülen luminal B (%20)'dir. Her2 grubu ve üçlü negatif grubun görülme sıklıkları birbirlerine benzerdir(%15)(36). Bizim çalışmamızda, verilere uygun olarak en fazla hasta luminal A(%57.5) alt tipindeydi. İkinci sırada ise luminal B(%20) yer aldı. Her2 grubu genel popülasyona göre beklenenden daha az sayıda hasta içermekteydi(%7.5). Hastalarımızın 1'i hariç 39'u kadındı ve yaş ortalamaları $50,8 \pm 13,0$ olup, ülkemiz verileri ile uyumlu bulunmuştur (4).

Mikronalar, 19-24 nükleotid uzunluğunda, endojen, post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu kontrol eden ve kodlanmayan RNA regülatörleridir. Tümör hücresinin inisiyasyonu, farklılaşması, proliferasyonu, anjiogenez, apoptozis ve tümörün migrasyon ve progresyonunda rol almaktadır (68, 132). MiRNA'ların çeşitli araştırmalarla meme, lenfoma, beyin, akciğer, prostat ve hepatoselüler karsinom gibi solid organ tümörlerinde farklı ekspresyonlar gösterdikleri saptanmıştır(81). Tümör dokusunda az eksprese olan miRNA'ların, tümör baskılayıcı olarak işlev gördükleri ve hücre farklılaşmasını düzenleyerek kanser gelişimini engelledikleri saptanırken, aşırı eksprese olan miRNA'ların ise onkogen olarak işlev gördükleri ve kanser gelişiminde rol oynadıkları gösterilmiştir(71).

MiRNA'ların farklı doku tiplerindeki yüksek doku spesifiteleri, yüksek stabiliteleri ve farklı tümöral dokulardaki farklı ve belirgin ekspresyon seviyeleri nedeniyle ideal biyobelirteçler olabilecekleri düşünülmektedir. Meme kanserinin patogenezindeki rolleri aydınlatılmaya başladıktan sonra çalışmalar tanısai, prediktif ve prognostik belirteç olma potansiyeli taşıyan miRNA'lar üzerine yoğunlaştırılmıştır. Kolay erişilebilir, non-invaziv ve tümöral oluşumlara sensitivitesi ve spesifitesi yüksek miRNA'ların yeni biyobelirteçler olarak kullanılmaya başlanılmasının, hastalığın tanı ve takibinin kolaylaşmasını ve aynı zamanda, prediktif olarak, tedaviye verilen yanıtın daha iyi değerlendirilmesini sağlaması beklenmektedir.

Literatürde meme kanserinde genç ve ileri yaşlı hastalara spesifik biyobelirteçlerin araştırıldığı çalışmalarda, bazı miRNA'ların hastaların yaşlarına göre farklı ekspresyon gösterdikleri bildirilmiştir. Chilet ve ark. genç yaş meme kanserinin agresif seyir izlemesi ve kötü sağkalım ile ilişkisinin altta yatan mekanizmalarının araştırdığı bir çalışmada, BRCA1/2 mutasyonu olmayan, ailesel meme kanseri öyküsü olmayan ve ESMO'nun(European Society for Medical Oncology) Kalıtsal Meme Kanseri Kılavuz İlkelerine göre düşük riskli kabul edilen 35 yaş altı 42 meme kanseri hastası ile 35-45 yaş arası 17 hasta ve 65 yaş üstü 29 hastada bakılan 121 miRNA'dan miR-1228, miR-3196, miR-1275, miR-92b, miR-139 ve miR-1207'nin ekspresyon seviyelerinde iki grup arasında belirgin farklılıklar saptanmıştır(133). Bu çalışma, genç yaş kadınlarda meme kanserine özgü miRNA profillerinin incelendiği ilk çalışmadır ve altta yatan nedenleri araştırmaya yönelik yeni bir araştırma alanı oluşturmuştur. Sigrid Hatse ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, meme kanseri hastalarında kemoterapatiklerin hasta yaşına bağlı olarak değişen etkisinin araştırılması amacıyla plazmada ifade edilen mikroRNA imzalarının potansiyel kullanımı araştırılmıştır. On genç ve 10 yaşlı meme kanseri hastasının dahil edildiği çalışmada, miR-20a-3p, miR-301a, miR-191, miR-200c, miR-30b-5p ve miR-106b'nin plazma ekspresyon seviyeleri yaşlı hastalarda anlamlı derecede düşük saptanmıştır (134). Aynı şekilde Nassar ve ark.nın meme kanserli hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, mir-155'in postmenapozal hastalarda daha yüksek saptandığı görülmüştür(135). Ayrıca Muti ve ark.nın, 133 postmenapozal meme kanseri hastası ve 133 sağlıklı postmenapozal kadının dahil edildiği, postmenopozal kadınlarda meme kanserinin erken belirleyicileri olarak görev yapabilecek miRNA'ları analiz ettikleri bir çalışmada, miR145-5p ve miR145-3p ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre düşük saptanmış ve bu durum azalmış sağkalım, artmış invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir(136). Biz çalışmamızda, yaş (50 yaş< , 50 yaş>) ve

menapozal (pre-post menopozal) durumlarına göre gruplanan hastalar arasında, her iki yaş ve menopozal durum özelinde, herhangi anlamlı bir miRNA ekspresyon farklılığı saptamadık. Hasta sayısının azlığı verilerimizin anlamlı sonuçlara ulaşamamasının en önemli nedeni olarak görülmektedir. Bu sebeple yaş ve menopozal durumun miRNA profilleri ile ilişkisinin inceleneceği, hem karsinogenez hem de hastalığın seyri ile ilgili mekanizmalar hakkında daha fazla bilgiye sahip olabileceğimiz, daha fazla hasta sayısı içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Meme kanserinin farklı klinik, patolojik ve moleküler özellikleri içermesi, tedavi sürecini ve takibini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri giderek daha fazla araştırılmakta ve uygulanmaktadır. Tedavi yanıtının öngörülememesi ve gelişen tedavi direnci klinik yönetimde büyük zorluklara yol açmaktadır. Doğru tedaviyi belirlemenin yolu meme kanserinin patogenezinin ve heterojen yapısına katkıda bulunan karmaşık moleküler etkileşimlerin daha iyi anlaşılmasında yatmaktadır. Günümüzde meme kanserleri hormon reseptör gen ekspresyon seviyelerine göre alt tiplere ayrılmaktadır. Bu gen reseptörleri hakkında henüz çok az bilgi olmasına rağmen tedavi seçiminde ve tedaviye yanıtın izlenmesinde belirgin fayda sağlamaktadırlar. Literatürde, meme kanserinde progresyonu öngörmek ve tedavi seçimini belirlemek için kullanılan hormon reseptör değişkenleri ile miRNA'ların ilişkisinin incelendiği çalışmalar bildirilmiştir. Lowery ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada 29 erken evre meme kanseri hücresinde 453 adet miRNA ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Analiz sonuçlarında, östrojen reseptörü (ER) ile miR-342, miR-299, miR-217, miR-190, miR-135b, miR-218; progesteron reseptörü (PR) ile miR-520g, miR-377, miR-527-518a, miR-520f-520c ve Her2 ile miR-520d, miR-181c, miR-302c, miR-376b, miR-30e'ların ilişkisi tanımlanmıştır. miR-342 ve miR-520g ekspresyonu 95 meme tümöründe ayrıca analiz edilmiş ve miR-342 ekspresyonu ER ve HER2 pozitif tümörlerde yüksek, ER, PR ve Her2 negatif tümörlerde düşük bulunmuştur(106). Başka bir çalışmada Foekens ve ark. meme kanseri ilerlemesi ve çeşitli biyolojik süreçlere etkisi olan miRNA'ları tespit etmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda, 184 ER pozitif ve 114 ER negatif hastanın katıldığı toplam 298 meme kanseri doku örneklerinde miR-7, miR-128a, miR-210 ve miR-516-3p miRNA'ların ER(-) ve lenf nodu metastazı negatif hastalarda tümör agresifliği ile ilişkisi bulunmuş, miR-210'nun ayrıca erken nüks ve üçlü negatif meme kanserinde kötü sağkalım ile anlamlı ilişkisi gösterilmiştir(137). Bizim çalışmamızda, miRNA'lar içinde PR negatif hastalarda miR-105, miR -203, miR -375, miR -145 seviyelerinin anlamlı olarak daha yüksek

ekspresyon gösterdiğini saptadık. Ayrıca, mir-105 seviyelerinin ER negatif hastalardaki yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı olma eğilimindeydi. Literatürde, mir-105 ile ilgili çalışmaların metastaz gelişimi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Zhou ve ark. yaptığı çalışmada, miR-105'in metastatik meme kanseri hücrelerinden eksprese edildiği ve hücre migrasyonunda önemli bir role sahip protein Zo-1'i regüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca metastatik olmyan hücrelerde miR-105'in aşırı eksprese edilmesinin uzak organlara metastazına ve vasküler permeabilite artışına yol açtığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise miR-105'in kötü sağkalım ile birlikte olduğu ve Wnt/ β -catenin sinyalizasyonunu aktive ederek kemorezistansa neden olduğu bildirilmiştir. miR-105'in pre-metastatik evrede dolaşımında tespit edilmesi erken evre tümörlerde metastatik progresyonu ön görebilir(138, 139). Aynı şekilde miR -365 ve miR -200c'nin de PR negatif hastalarda daha yüksek eksprese edildiği ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olma eğilimi gösterdiğini tespit ettik. Tuomarila ve ark.nın 172 invaziv meme kanseri olgusunun dahil edildiği bir çalışmasında, miR-200c'nin PR pozitif hastalarda daha düşük ekspresyon gösterdiği ve azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu belirtilmiş olup, PR-negatif hastalarda, yüksek miR-200c ekspresyonu nüksüz sağkalım ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (140). Çalışmamızda PR negatif hastalarda anlamlı olma eğilimi gösteren miR-200c artışı, kuvvetli bir kanıt olmasa da, yapılan diğer çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde, PR negatif hastalarda iyi bir prognoz ile ilişkilendirilebilir.

ER/PR pozitif hastalarla sağlıklı kontrollerin kıyaslandığı Yu ve ark.nın yaptığı çalışmada, ER/PR pozitif hastalarda, kontrol grubuna göre miR-203 seviyelerinin arttığı tespit edilmiş ve östradiolun miRNA ekspresyonunu düzenleyerek hücre proliferasyonunu kontrol edebildiği öne sürülmüştür (141). Yine Han ve ark. nın 120 hastanın dahil edildiği bir çalışmasında, mir-145 seviyeleri PR pozitif hastalarda PR negatif hastalara göre belirgin olarak daha yüksek saptanmıştır (142) Çalışmamızda, miR-203 ve miR-145 ekspresyonları PR negatif hastalarda, pozitiflere göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Literatürle çelişen çalışma sonuçlarımız, tespit edilen miRNA'lar ile ilgili, hormon reseptör durumu baz alınarak yapılan çalışma sayısının azlığına, çalışmamıza dahil edilen hasta sayısının az olmasına ya da teknik nedenlere bağlanabilir. İleride benzer konuda yapılacak olan daha geniş çalışmaların sonuçları, tespit edilen iki miRNA'nın hangi alt tip açısından daha anlamlı olduğunu ortaya koyacaktır.

On yedinci kromozomun (KR17) uzun kolunda yerleşen insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) geni, intrinsek tirozin kinaz aktivitesiyle hücre büyüme ve çoğalması, hücre farklılaşması, apoptozis, adhezyon ve migrasyon benzeri fonksiyonlarda rol oynayan transmembran reseptör proteinini kodlamaktadır. HER2 geninin kodladığı CerbB2 olarak da adlandırılan membranöz protein, immün histokimyasal boyamalarla gösterilebilmektedir. Günümüzde anti-HER2 antikorlarının en yaygın kullanım alanı meme ve mide tümörleridir. Sağkalım ve yaşam kalitesi açısından belirgin farklılıklar yaratabilen hedefe yönelik tedaviler arasında en bilinenlerinden olan Trastuzumab (Herceptin), özgül olarak HER2 reseptörüne karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. Trastuzumabın sağkalıma olumlu etkisi birçok çalışmada gösterilmesine rağmen Her2 aşırı ekspresyonu gösteren tümörlerin önemli bir kısmı trastuzumaba yanıt vermemekte ve direnç geliştirmektedir. Dirençten sorumlu mekanizmalarda miRNA'ların rolü araştırılmaktadır. Huiping ve ark. nın bir çalışmasında, trastuzumab direnci olan hastalarda mir-17-3p'nin ekspresyon seviyesinde anlamlı azalmalar saptanmıştır(143). Benzer şekilde başka bir çalışmada, Her2 pozitif hastalardaki trastuzumab direncinden, mir-375 seviyelerinin azalmasının sorumlu olabileceği vurgulanmıştır. Mir-375 artışının, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1'i (IGF1R) hedefleyerek trastuzumab tedavisinde yanıtı artırdığına yönelik çalışmalar devam etmektedir(144). Biz çalışmamızda, Her2 pozitif hastalarda mir-375, mir-133a ve mir-17'nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı yükseklik saptadık. Verilerimiz, anlamlı yükseklik saptadığımız bu üç miRNA'nın, Her2 aşırı eksprese eden tümörlerin sınıflandırılmasında ve anti-Her2 tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılabilir biyobelirteçler olduğunu göstermektedir. Ayrıca metastatik meme kanserinin tedavi seçiminde, hormon reseptör durumunu belirlemek için yapılan rebiyopsi sıklığının sınıflamada yol gösterici miRNA'ların klinik kullanıma girmesiyle azalacağı düşünülebilir.

Tümör çapı, meme kanserinde nüks riski ve özellikle lenf nodu negatif hastalarda adjuvan tedavi seçimi için önemli ve güvenilir bir prognostik faktördür(145). Tümör çapı büyüdükçe aksiller lenf nodu tutulumu riskinin arttığı ve çap artışı ile orantılı olarak tutulan lenf nodu sayısında da arttığı bilinmektedir. Aksiller tutulum gösteren küçük çaplı tümörlerin prognozu, büyük çaplı olanlara göre daha iyidir. Tüm nodal tutulumlu hastalarda tümör çapı büyüdükçe yaşam süresi kısalmaktadır(146). Tümör boyutu ile ilişkilendirilen miRNA'ların prognozu öngörmede klinisyenlere ek yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Literatürde tümör

boyutu ve miRNA ekspresyon korelasyonunun incelendiği geniş çaplı bir çalışma olmamasına rağmen Wang ve ark. meme kanseri hastalarının doku ve serumlarından alınan örneklerde miR-21, miR-106a ve miR-155 seviyelerinin tümör evresi ile korele olarak belirgin artış gösterdiğini bildirmiştir(147). Aynı şekilde Zhang ve ark. nın mir-10b'nin meme kanserindeki ekspresyonu ve klinik ilişkisini inceledikleri çalışmasında, mir-10b'nin tümör boyutu 20 mm üzerinde olan hastalarda daha yüksek ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir (148). Bizim çalışmamızda, mir-210, 20 mm ve üstündeki tümörlerde anlamlı olarak daha yüksek eksprese edildi. Literatürde mir-210'un tümör boyutu ile korelasyon gösterdiği bir çalışmaya rastlamasak da, bir çalışmada mir-210 seviyelerinin tümör yükünün azalmasına bağlı olarak postoperatif meme kanserli hastalarda azaldığı gösterilmiştir(124).

Günümüzde meme kanserinin prognozunu belirleyen en önemli faktör aksiller lenf nodlarının metastaz içerip içermediği, eğer içeriyorsa tutulan lenf nodlarının sayısıdır. Aksiller lenf nodu metastazı olmayan meme kanseri hastalarında,10 yıllık hastalısız yaşam süresi oranı %70-80 arasındadır. Bu oran aksillar metastazı bulunan hastalarda %30'lara kadar düşmektedir(149). Dolaşımdaki miRNA'ların lenf nodu metastazının erken evrede tespiti açısından güvenilir biyobelirteçler olma potansiyeli bazı çalışmalar ile desteklenmiştir. Chen ve ark. lenf nodu pozitif meme kanserinde plazma miR-10b ve miR-373 ekspresyon seviyelerinin arttığını göstermişlerdir(150). Aynı şekilde Schwarzenbach ve ark. tarafından meme kanserinin gelişiminden sorumlu tutulan PTEN genini hedefleyen miRNA'ların tanısal potansiyelini araştırdıkları çalışmada, mir-214'ün malign hastaları kontrol grubundan net bir şekilde ayırdığı ve artmış miR-214 seviyelerinin lenf nodu pozitifliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(151). Yedi makale ve 1629 olgunun değerlendirildiği bir meta analizde, miR-21 ekspresyonunda artışın kötü sağkalım ve lenf nodu tutulumu ile birlikte olduğu, subgrup analizlerinde hem dokudaki hem de serumdaki mir-21'in benzer oranda prediktif özelliği vurgulanmıştır (152). Biz çalışmamızda, lenf nodu metastazı olmayan grupta mir-141 seviyelerini anlamlı olarak yüksek saptadık. Çalışmamızı destekler nitelikte Ping ve ark. çalışmasında mir-141 ekspresyonunun tümör boyutu, lenf nodu metastazı, HER2 ekspresyon seviyeleri ve ki-67 seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir(153).

Meme kanserinde prognozu belirleyen bir diğer faktör uzak organ metastazıdır ve mortalite ve morbiditenin en önemli sebebidir. Metastatik meme kanseri için biyobelirteç olarak kullanılabilir dolaşımdaki miRNA'ların belirlenmesi birçok araştırmacı tarafından acil bir ihtiyaç olarak görülmektedir. Meme kanserinde uzak organ metastazı ile ilişkili miRNA'ları inceleyen bir çalışmada miR-10b, miR-34a ve miR-155'in metastatik meme kanseri hastalarında artmış ekspresyon gösterdiğini doğrulamıştır. Bu mirnaların arasında özellikle mir-155, immünitinin normal ve patolojik sürecinde inflamasyon ve karsinogenezde önemli bir role sahiptir (154). Daha sonraki bir çalışmada Madhavan ve ark., miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-210, miR-375 ve miR-801 seviyelerinin dolaşımda tümör hücresi bulunan meme kanseri hastalarında belirgin yüksek ekspresyon gösterdiklerini tespit etmişlerdir (155). Mir 200 ailesi, kanser hücresinin transformasyonunda, proliferasyonunda, migrasyonunda ve invazyonunda önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca, EMT, EGF sinyalizasyonunu, kanser kök hücresinin fonksiyonlarını ve p53 aracılığı ile apoptozisi düzenlediği ileri sürülmektedir. Başka bir çalışmada, Mir-375 inhibisyonu sonrası, incelenen meme kanseri hücre kültürlerinde hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür (156). Biz çalışmamızda benzer şekilde mir-375 seviyelerinin metastatik hastalığa sahip grupta belirgin yüksek olduğunu saptadık. Ayrıca, bakılan diğer miRNA'lar içinde mir-200a ve mir-203 seviyelerinin metastatik hastalardaki yüksek ekspresyonu anlamlı olma eğilimi göstermekteydi. Fakat literatürde mir-200a'nın metastatik hastalığıdaki rolünü açıklayan çelişkili çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada, miR-200 ailesinin üyesi olan mir-200a'nın EMT(epitelyal-mezenkimal geçiş)'yi E-cadherin ekspresyonu yoluyla düzenleyerek metastaz kaskadında inhibitör rolü olduğu gösterilmiştir (84). Bir başka çalışmada ise fare meme kanseri hücrelerinde beklenmedik şekilde metastazı arttırdığı saptanmıştır (157). Mir-200 ailesinin karsinogenez, metastaz, anjiogenez, apoptozis gibi süreçlerde etkisinin belirlenebilmesi için geniş hasta sayısını içeren çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Meme kanserinin prognozunu etkileyen faktörlerin miRNA'larla ilişkisini saptamak hastalığın erken teşhis ve tedavisi ile mortalite ve morbiditenin azalmasına olanak sağlayabilir. Çalışmamızda, tümör çapıyla korele olarak ekspresyonunun arttığını tespit ettiğimiz miR-210'un hastalarda tümör yükünü belirlemede kullanılabilirliği ve miRNA-375'in çalışmamız ile benzer sonuçlar elde eden diğer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, kötü prognoz ile

ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür. Ayrıca lenf nodu negatif hastalarda anlamlı düzeyde yüksek saptanan miR-141'in de iyi prognozla ilişkili olabileceği saptanmıştır.

Kemoterapi ilişkili nötropeni kanser tedavisinde doz kısıtlanmasına ve tedaviye ara verilmesine neden olan en önemli yan etkilerden biridir. Literatürde miRNA'ların meme kanserinde tedaviye bağlı gelişen nötropeniye öngörme potansiyellerini araştıran bir çalışmaya rastlamadık fakat Huang ve ark. nın bir çalışmasında kapesitabin bazlı kemoradyoterapi alan rektal kanserli hastalarda hsa-miR-4707-3p gen bölgesindeki tekli nükleotid polimorfizmlerin lökopeni ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(158). Çalışmada hsa-mir-4707-3p bölgesinin primidin ve pürin metabolizmasını hedefleyerek hücre çoğalmasını engellediği, ayrıca bcl-2'yi inhibe ederek hücreleri apoptozise götürmüş olabileceği üzerinde durulmuştur. Biz çalışmamızda meme kanserinde nötropeni gelişimi ile ilişkili prediktif bir miRNA saptamadık. Sadece miR-452 seviyeleri nötropeni gelişmeyen hasta grubunda daha yüksek eksprese edilme eğilimi gösterdi. Çalışmadaki hasta sayımızın azlığı tedavi yan etkilerini öngörmeye biyobelirteç olarak görev yapabilecek miRNA'ları saptamamıza engel olabilir. Bununla birlikte henüz mekanizmaları aydınlatılmamış veya tespit edilmemiş birçok miRNA olduğu unutulmamalıdır.

Meme kanserinde, tedavide karşılaşılan zorlukları minimuma indirebilmek ve bireysel tedaviler geliştirebilmek için moleküler sınıflama yöntemleri geliştirilmiştir. Tedaviye cevapların ve metastatik paternlerin, moleküler subtip'e göre değiştiğinin gösterilmesi moleküler sınıflamanın değerini daha da artırmıştır. Bugün için, geçerli moleküler sınıflama ile meme kanserleri, luminal A, luminal B, HER-2, üçlü negatif olmak üzere dört gruba ayrılır. Günümüzde biyopsi protokolüyle elde edilen doku örneklerinden tümörün histolojik ve moleküler sınıflaması yapılabilmektedir. Bu nedenle zamandan ve maliyetten fayda sağlayabilecek minimal invaziv biyobelirteçlerle meme kanseri sınıflamasının ve bireysel tedavinin belirlenmesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. MiRNA'ların meme kanseri alt tiplerini belirlemede kullanılmak üzere potansiyel belirteç olmaları üzerinde durulmaktadır. Farklı meme kanseri alt tipleri arasındaki farkı gösteren moleküler miRNA analizleri ilk kez Blenkiron ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır(105). Blenkiron ve ark. farklı moleküler subtiplere sahip 93 meme tümöründe 309 adet miRNA tanımlamıştır. Çalışmada, diferansiyel miRNA ekspresyonu, bazal ve luminal alt tiplerin doğru bir şekilde sınıflandırılmasını sağlamış ve tanımlanan 31 miRNA'nın farklı alt tipleri ayırabildiği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada, 54 erken

evre meme kanserini moleküler alttiplerine ayırarak sağlıklı hastalarla aralarındaki miRNA farklılıkları incelenmiştir. Çalışma sonucunda miR-25-3p'nin üçlü negatif meme kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre belirgin yükseklik gösterdiği saptanmıştır(159). Mir-25-3p'nin üçlü negatif meme tümörlerinde hücre siklus progresyonunda görev alan BTG2'yi hedefleyerek hücre proliferasyonunu desteklediği öne sürülmüştür. Biz çalışmamızda, miRNA'ların meme kanserinde alt tipe özgü profillerini belirlemek amacıyla, luminal A, luminal B, Her2 grubu ve üçlü negatif hastalarda miRNA ekspresyon seviyelerini inceledik. Mir-105, mir-200b ve mir-375'in ekspresyon seviyelerini luminal A grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük saptadık. Aynı zamanda mir-133a, mir-34a, mir-411 ve mir-17'nin seviyelerinin luminal B grubundaki yüksek ekspresyonu anlamlı olma eğilimindeydi. Bizim bulgularımızın tersine Gou ve ark yaptığı çalışmada, meme kanserli hastalarda miR-411 ekspresyonu düşük bulunmuş, lenf nodu metastazı ve histolojik derece ile anlamlı bir birliktelik tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hücre kültüründe hücrenin invazyon ve migrasyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir(160). Aynı şekilde mir-133a ve mir-17-92 ailesi üyelerinin, meme hücre kültüründe invazyon ve migrasyonu inhibe ettiği bazı çalışmalarla belirtilmiştir(82, 188). Aksi olarak literatürde, mir-34a'nın metastatik meme kanserinde yüksek ekspresyonunu gösteren çalışmalarla birlikte radyoterapiye duyarlılığını artırdığına yönelik sonuçlar mevcuttur(130, 189). Sonuç olarak, miR-411, mir-17, mir-34a ve mir-133a tümörigenez ve meme kanseri gelişiminde önemli fonksiyonlara sahip olduğu meme kanserli hastalara klinik uygulamalarda yer alabileceği belirtilmiştir. Mir 411, mir-17, mir-34a ve mir-133a'nın biyobelirteç olarak tanımlanabilmesi için iyi düzenlemiş ve uzun takip süreleri olan klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

MiRNA'ların moleküler alt tipleri belirlemede ve prognozlarını öngörmede minimal invaziv biyobelirteç olma potansiyelleri birçok çalışmada vurgulanmıştır. Li ve ark.'nın üçlü negatif meme kanseri hastalarında, olası prediktif, prognostik ve tedavi hedefi olarak belirlenebilecek miRNA'ları tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, 1299 meme kanseri hastası geriye dönük olarak incelenmiş ve miR-105'in üçlü negatif meme kanseri hastalarında, diğer alttiplere göre anlamlı şekilde daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır. Plasecka ve ark. üçlü negatif meme kanserinde miR-10b, miR-21, miR-29, miR-9, miR-221/222, miR-373 arttığını, miR-145, miR-199a-5p, miR-200 ailesi, miR-203, miR-205'in ise azaldığını tespit etmiştir. Ayrıca bu çalışmada miR-10b, miR-21, miR-29, miR-145, miR-200 ailesi, miR-203, miR-221/222 nin prognostik değerinin olduğu belirtilmiştir(161). Bizim çalışmamızda

miR-105'in luminal A'da, diğer tiplere kıyasla, anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda, metastatik meme kanseri ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen miR-105'in, bizim çalışmamızda luminal A kolunda daha düşük saptanmasının sebebi, en iyi prognoza sahip olan luminal A grubunda diğer gruplara göre daha az metastatik hasta bulunması olabilir. MiR-105'in meme kanseri alt tiplerinde prediktif değerini daha iyi anlamak için, daha fazla hasta sayısı içeren ve alt tiplerinde benzer oranda metastatik hasta bulunan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.(138). Literatürde mir-200b ile meme kanseri moleküler alt tiplerin ilişkisini inceleyen bir çalışma saptamadık fakat birçok çalışmada miR-200 ailesinin EMT'yi düzenleyen tümör baskılayıcıları mirnalar oldukları düşünülmektedir(162). Feng ve ark. bir çalışmada mir-200b nin meme kanserindeki düşük ekspresyonu kötü prognostik belirteç olarak bildirilmiştir(163). Moleküler alt tipler arasında en iyi prognoza sahip luminal A'da tümör supressör mirnaların düşük ekspresyon göstermesi, uzun süreli takipte hastaların prognozunun kötüye gidişatının bir göstergesi olabilir. MiR-375'in IGF1R ve MTDH'yi doğrudan hedefleyerek tamoksifen yanıtı üzerinde etki gösterdiği bildirilmiştir. Metadherin kaybı, tamoksifen duyarlılığında artışa yol açarak, tamoksifen ile tedavi edilen hastalarda hastalısız sağkalım ile korelasyon sağlamaktadır(121). Aynı zamanda yüksek miR-375 seviyeleri trastuzumab direncinden sorumlu IGF1R düzenleyerek Her-2 pozitif hastalarda tedavi yanıtını artırabilmektedir. Çalışmamızda mir-375 seviyelerinin luminal A grubunda düşük saptanması, luminal A alttipindeki hastaların tamoksifen tedavisine dirençli olabileceğini öngörebilir.

Literatürde meme kanserinin patogeneğinde rol oynayan miRNA'ların incelendiği çalışmaların birçoğu meme kanseri tümör dokusunda yapılmıştır. Özellikle plazmada eksprese olan miRNA'larının meme kanseriyle ilişkilendirildiği çalışmalar, hastalığın tanı ve takibinin yapılmasında klinisyenlere yol gösterici olması açısından çok değerlidir. Biz çalışmamızda mirnaların tedavi öncesi ve sonrası değişimlerini plazmada inceledik. Analiz sonuçlarımızda mir-105, mir-21, mir-141, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-203, mir-34a ve mir-452'nin tedavi sonrasında artış gösterdiğini, mir-155, mir-143, mir-145, mir-365 ve mir-299-5p'nin tedavi sonrasında azaldığını tespit ettik. Sun ve ark. yaptığı bir çalışmada, mir-155 'in meme kanserinde hastalığın izleminde belirteç olma potansiyelini incelemişlerdir. Çalışmada, 103 meme kanseri hastasında, sağlıklı kontrollere kıyasla artmış mir-155 seviyelerini tespit eden araştırmacılar, ek olarak 29 hastada adjuvan 4 kur kemoterapiden sonraki mir-155 ekspresyon seviyelerini incelemiştir. Elde edilen

sonuçlarda, hastaların %79 'unda tedaviden sonrası serum miR-155 seviyelerinde azalma tespit edilmiştir ve miR-155 seviyelerindeki azalma, tedaviye yanıt ve hastalık remisyonu ile birliktedir(164).Bizim çalışmamızda da Sun ve ark.nı destekler nitelikte miR-155 ekspresyonunda azalma saptandı.

Günümüzde, meme kanserinde tedavi sonrası takip açısından kullanılan belirteçler olan CA-15-3 (kanseri antijeni-15-3) ve CEA'nın (karsinoembriyonik antijen) daha çok metastatik meme kanseri hastalarında takip açısından değerli görülmesi, uzun yarı ömürleri ve tedavi sonrası ilaç ilişkili hücre ölümüne bağlı 6-12 hafta yalancı pozitif olabilmeleri nedeni ile yarı ömrü daha kısa olan miR-155 'in evreden bağımsız olarak ve daha yüksek bir sensitivite ve spesifite ile meme kanserinin tedavi sonrası takibinde kullanılabileceği düşünülebilir(165, 166). Başka bir çalışmada, Freres ve ark. 25 meme kanseri hastasının plazmasında neoadjuvan kemoterapi öncesi ve sonrası miRNA'lardaki değişimi incelemiştir. Çalışma sonucunda mir-34a ve mir-122 seviyelerinin tedavi sonrasında arttığı ve bu iki miRNA'nın özellikle tedaviye kısmi yanıt veren 7 hastada çok yüksek seviyelerde olduğu dikkat çekmiştir. Bu artış, mir-34a ve mir-122'nin, tümör dokusunun yanında, antrasiklin bazlı tedavilerin oluşturduğu hepatotoksisite nedeniyle karaciğer dokularından salınmasına ve tedavi ilişkili DNA hasarına bağlanmıştır(167). Bizim çalışmamızda da, antrasiklin grubu kemoterapiklerin p53 aktivasyonu üzerinden etki yaptığı göz önünde bulundurulursa, kemoterapi sonrası miR-34a artışının tedaviye bağlı DNA kırıkları yoluyla p53 aktivasyonu mekanizması üzerinden gerçekleştiği düşünülebilir. Matamala ve ark.nın erken evre meme kanserinin tanısında biyobelirteç olma potansiyelini içeren miRNA'ları analiz ettikleri çalışmalarında, 122 meme tümörü ve 11 sağlıklı dokudan elde edilen 1919 miRNA'dan en uygun olanları, 36 tedavi öncesi ve 37 tedavi sonrası meme kanseri ile 26 sağlıklı hastanın plazmasında analiz edilmiştir. Bakılan miRNA'lardan 4'ünün (miR-505-5p, miR-125b-5p, miR-21-5p ve miR-96-5p) meme kanseri ile ilişkisi tespit edilmiştir. Çalışmada tedavi öncesi ve sonrası hastalar aynı grup olmamasına rağmen iki grup arasındaki miRNA değişimlerine bakıldığında miR-3656, miR-21-5p ve miR-505-5p ifadesinin tedavi sonrası grupta önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (168). Literatürde farklı kanserlerde de, plazma miRNA'larının prediktif ve prognostik potansiyellerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Wong ve ark. tarafından dilin skuamöz hücreli karsinomunda mir-184 seviyelerinin postoperatif azaldığı gösterilmiştir(169). Başka bir çalışmada, Ng ve ark. kolorektal kanserli hastalarda yüksek saptadıkları miR-17-3p ve miR-92 seviyelerinin operasyon sonrasında

azaldığını göstermişlerdir(169). Aynı şekilde, mir-18a'nın pankreas kanserinde ve mir-122'nin hepatoselüler karsinomda postoperatif azaldığını gösteren çalışmalar bunlara örnek olarak verilebilir(170, 171).

Meme epitel hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasında görev alan ErbB reseptör tirozin kinaz ailesi üyelerinin aşırı ekspresyonu meme kanseri etyolojisinde suçlanan öğelerden biridir. miR-143 ve miR-145'in meme kanserinde kabul gören tümör baskılayıcı etkisinin erbb reseptörlerinin baskılanması yoluyla olduğu düşünülmektedir (172). miR-143 'ün diğer kanser türlerinde de proliferasyonu ve migrasyonu azalttığı gösterilmiştir (173). Bununla birlikte mir-145'in p53'ü aktive ederek apoptozisi indüklediği ve östrojen reseptörü- α 'yı azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur(174). Mir-299-5p nin meme kanseri hastalarındaki rolü çok fazla bilinmemektedir. Shevde ve ark. nın bir çalışmasında, meme kanseri tümör dokusunda mir-299-5p seviyelerindeki azalmanın radyoterapi ve kemoterapi direnci, invazyon ve metastaz ile ilişkili bir glikoprotein olan osteopontin artışına neden olabileceği belirtilmiştir(175). İlginç bir şekilde, çalışmamızda miR-143, miR-145, miR-299-5p gibi tümör baskılayıcı özellik gösteren bazı mikroRNA'lar tedaviden sonra azalma göstermiştir. MiR-143, kromozom 5q33'de lokalize olup pek çok kanserde azalmıştır. Bu anti kanser etkisi hücre proliferasyonu, apoptozis ve migrasyonunda rol oynayan Bcl-2, MYO6, ELK1 ve ERK5 bağlıdır. Hücresel mitojenler ve stres ile aktive olan ERK5, nükleer faktör (NF)-kB (NF-kB), c-Myc ve cyclin D1 gibi hücre proliferasyonunu düzenleyen proteinleri hedefler. Ek olarak, mitogen-activated protein 3 kinase 7 (MAP3K7) veya transforming growth factor (TGF-b)-activated kinase-1 üzerine etki etmektedir. Zhou ve ark yaptığı çalışmada, miR-143 meme kanserli dokuda azalmış, p-ERK5, ERK5, p-MAP3K7 ve MAP3K7 ekspresyonları artmış olarak saptanmıştır. MiR143 upregülasyonu ile ERK5, ERK5, p-MAP3K7, MAP3K7 ve cyclin D1 ekspresyonları azalmış olarak bulunduğundan, ERK5 ve MAP3K7 mir143'ün hedefi olduğu ileri sürülmüştür. (176). Literatürde çelişkili pek çok çalışmanın sonucunda, bu konuda geniş hasta sayısını içeren ve uzun izlem süresi olan çalışmaların düzenlenmesinin bu konuya ışık tutacağını düşünmekteyiz.

miR-365'in meme kanserindeki rolü henüz aydınlatılmamış olup, anti-anjiyojenik bir gen olan ADAMTS-1'i hedefleyerek hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artıran bir onkormir olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur(177). Bizim çalışmamız mir-365'in meme kanserinde eksprese olduğunu doğrulamıştır

fakat tedavi izleminde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Li ve ark. tarafından üçlü negatif meme kanserinde kötü sağkalım ile ilişkili miRNA'ları tanımlamak ve karsinogenez için katkıda buldukları temel mekanizmayı tespit etmek amacıyla yapılan, 25 doku ve 130 plazma örneğinin dahil edildiği çalışmada, miR-105'in yüksek ekspresyon seviyelerinde üçlü negatif meme kanseri hastalarında kemodirenç ve metastazı artırdığı ve kötü sağkalım ile korele olduğu saptanmıştır. Ek olarak, aynı çalışmada plazma miR-105 seviyelerinin üçlü negatif meme kanseri hastalarında belirgin ve spesifik olarak artış gösterdiği ve erken evre kanserlerde bile üçlü negatif alt tipi için güçlü prediktif güce sahip olduğu görülmüştür(139). Dokuda yapılan çalışmalara örnek olarak, Zhou ve ark.nın MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve MCF-10A sağlıklı meme epitelini karşılaştırdıkları çalışmada, metastatik meme kanseri hücreleri tarafından eksprese edilen ve salgılanan miR-105'in, sıkı birleşme proteini ZO-1 (zonula okludens)'i hedefleyerek güçlü bir migrasyon düzenleyici olduğu gösterilmiştir. Metastatik olmayan kanser hücrelerinde miR-105'in aşırı ekspresyonu, uzak organlarda metastaz ve vasküler geçirgenliğe neden olurken, metastatik tümörlerde miR-105'in inhibisyonu ile bu etkilerin azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada MDA-231-HM ksenograft tümörleri taşıyan farelerde metastaz öncesi ve metastaz sonrası alınan serum örneklerinde yüksek miR-105 seviyelerinin metastaz gelişimi ile ilişkili olduğu ve erken evre meme kanserinde metastatik ilerleme açısından prediktif ve prognostik değer taşıyabileceği belirtilmiştir(138). Hem doku hem plazma örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada, Yadav ve ark. 75 yeni tanı almış meme kanseri hücre kültürü ile tedavi öncesi ve sonrası plazma miR-21 seviyelerini karşılaştırmışlardır. Sağlıklı kontrollere kıyasla hasta grubunda mir-21 seviyelerinde 8.9 kat artış olduğu, artmış ekspresyonun ileri evre (11.72 kat), lenf nodu tutulumu (11.12 kat) ve uzak metastaz (20.17 kat) ile ilişkili olduğu bulunmuştur(178). Aynı şekilde artan miRNA-21 ekspresyonunun, meme kanseri hastalarının kötü sağkalımı ile de önemli derecede ilişkili olduğu saptanmıştır. Bundan başka, özellikle miR-21'in tümör supresör genleri hedefleyen onkogen olarak rol aldığı, ayrıca programmed cell death 4 (PDL4) ve tropomyosin 1 (TPM-1) in yol açtığı kontrolsüz hücre çoğalmasını, meme kanseri hücresinin büyümesini ve metastazını kontrol eden bir etkili bir biyobelirteç olduğu ileri sürülmektedir (179).Çalışmada tedavi sonrasında miR-21 seviyelerinde ortalama 3.2 kat azalma izlenmiştir. Bizim çalışmamızda, hastaları takip ettiğimiz süre zarfında, hastalarımızın 1'i hariç

hiçbirinde progresyon olmamasına rağmen, onkomir olarak işlev gördüğü belirtilen miR-105 ve miR-21 ekspresyon seviyelerinde tedavi sonrasında belirgin bir artış olduğu görüldü. MiR-105 ve miR-21 ile ilgili yapılan çalışmaların güçlü bir şekilde, bu iki biyobelirteci kötü prognoz ve tümör agresifliği ile ilişkilendirdiği düşünülürse, çalışmamız kapsamında hastaların takip süresinin, progresyonu değerlendirmede yetersiz olduğu yorumu yapılabilir.

Çalışmamızda, miRNA 200 ailesinin üyeleri olan mir-141, mir-200a, mir-200b ve mir-200c'nin tümünde tedavi sonrasında tedavi öncesine kıyasla artış saptandı. İyi prognozla ilişkilendirilen mir-141'in tümör boyutu, lenf nodu metastazı, HER2 ekspresyon seviyeleri ve ki-67 seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda in vitro olarak mir-141'in aşırı ekspresyonunun, ANP32E genini hedefleyerek hücre büyümesini, proliferasyonu ve invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir(153). Meme kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada miR-141-3p transfeksiyonunun migrasyon ve invazyonu baskıladığı, aynı zamanda CDK8'i hedefleyerek trastuzumab duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir(180). Yine başka bir çalışmada mir-200 ailesi üyelerinden mir-141, mir-200a, mir-200b, mir-200c seviyelerinin meme kanseri kök hücrelerdeki azalmış ekspresyonları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada mir-200 ailesinin ZEB1 gen ekspresyonunu baskılayarak EMT'yi önlediği ve miR-200c'nin in vivo olarak tümör oluşumunu da inhibe ettiği gösterilmiştir(181). Wang ve ark. nın üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde mir-203'ün hücre proliferasyonu ve göçü üzerindeki etkisini araştırdıkları bir çalışmada hücre mobilitesi ve migrasyonunun miR-203 transfekte edilmiş hücrelerde yaklaşık %50 oranında azaldığını göstermişlerdir. Çalışmada miR-203'ün hedef proteinleri olarak BIRC5 ve LASP1 proteinleri seçilmiştir. Veriler, mir-203'ün BIRC5 ve LASP1 proteinlerinin seviyelerini düşürerek üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu ve invazyonu inhibe ettiğini ve bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermiştir(182). Ayrıca, bir çalışmada miR-203 seviyeleri, metastatik meme kanseri dokusunda anlamlı derecede düşük eksprese edilmiştir(183). miR-203 meme kanserinin gelişmesinde ve progresyonunda önemli rolü bulunmaktadır. Ding ve ark miR-203'ün epitelial mezenkimal transisyonu ve TGF- β ve SNAI2 aracılığıyla oluşan metastazı inhibe ettiğini göstermiştir (184). Bununla birlikte, Lin ve ark yaptığı bir çalışmada, ER α -pozitif meme kanserinde östradiolün migrasyon ve invazyon yeteneğini artırdığı, bunu mir-203 düzeylerinde azalma ile birlikte olduğu ileri sürülmüştür(185). Mir-452 ile meme kanseri ilişkisi

üzerine yapılan az sayıdaki çalışmada, mir-452 'in tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını gösteren kanıtlar mevcuttur. Mir-452'nin sağlıklı dokulara oranla meme kanseri hücrelerinde daha az eksprese edilmesi, tümör baskılayıcı miRNA özelliğini gösteren kanıtlardan biridir. Bununla birlikte, miR-452'nin transfekte edildiği meme kanseri hücrelerinde RAB11A'yi hedefleyerek hücre migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığı da gösterilmiştir(186). Başka bir çalışma miR-452'nin adriamisin direnci etkisi üzerine yapılmıştır. Çalışma sonucunda azalmış miR-452 seviyelerinin ilaç direncinden sorumlu olan IGF1 reseptör proteinini hedef alarak adriamisin direncine neden olabileceği tespit edilmiştir(187). Bizim çalışmamızda tümör supresör özellikteki miRNAların tedavi sonrası artış göstermesi, hastaların tedaviden fayda sağladığını göstermektedir ve bu durum iyi prognoz ile ilişkilendirilebilir. Bu hipotezimizi destekleyecek çalışmalarla birlikte mir-141, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-203 ve mir-452'nin meme kanserinde prediktif ve prognostik miRNA'lar olarak kullanılabilir ve tedaviye yanıtta klinisyenlere yol gösterici olabilir.

Biz çalışmamızda moleküler alt tiplere ayrılan hasta gruplarında tedavi öncesi ve sonrası miRNA ekspresyon değişimlerini de inceledik ve genel popülasyon ile benzer sonuçlar gösterdiğini belirledik. Genel popülasyondan farklı olarak luminal A grubunda mir-375'in tedavi sonrasında artış gösterdiği dikkati çekti. Mir-375'in özellikle ER pozitif meme tümörlerinde arttığı çalışmalara ek olarak Simonini ve ark. mir-375'i ERa sinyalleşmesini artırma ve böylece hücre çoğalmasını destekleme kapasitesine sahip ilk miRNA olarak tanımlamışlardır(156). Bizim çalışmamızda tedavi sonrası artan mir-375'in luminal A grubunda hücre proliferasyonunu artırarak hastalık prognozuna negatif etki edebileceği düşünülebilir. Mir-375'in progresyonu ön görmedeki gücünü tespit etmek için daha uzun süre takip içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte Mir-375'in inhibisyonuna yönelik yeni tedavilerin geliştirilmesi, luminal A grubunun prognozuna olumlu katkı sağlayabilir.

Üçlü negatif grupta ise genel popülasyondan farklı olarak mir-210 seviyelerinde tedavi sonrasında azalma izlendi. Mir-210'un meme kanserindeki yüksek ekspresyonunu gösteren birçok çalışmaya ek olarak Foekens ve ark. çalışmasında ayrıca mir-210'un erken nüks ve üçlü negatif meme kanserinde kötü sağkalım ile anlamlı şekilde ilişkisi saptanmıştır(137). Ayrıca, Jung ve ark. postoperatif hastalarda tümör yükünün azalmasına bağlı olarak mir-210 seviyelerindeki azalmayı göstermiştir(124). Bizim çalışmamız literatür ile uyumlu

olarak mir-210'un üçlü negatif hasta grubunda tedavi izlemi ve hastalığın takibinde kullanılmasının muhtemel olabileceğini desteklemektedir.

Bu çalışma meme kanseri hastalarında plazmada saptanan mirna seviyeleri ile ilgili önceki çalışmaların bulgularını genişletmektedir. Verilerimiz, mirnaların tanısal değeri ve tedavi izleminde biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli hakkında tamamlayıcı bilgiler sunmaktadır. Bununla birlikte, meme kanserinde tedavi seçimi, tedavi izlemi ve hastalığın prognozunu değerlendirmek amacıyla miRNA'lara yönelik daha ileri tanısal çalışmalara zemin hazırlamaktadır.

SONUÇ

İnvaziv meme kanseri tanısı alan 40 hastada, meme kanseri ile ilişkilendirilen 20 miRNA'nın tanı anındaki ekspresyon seviyelerinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin ve tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon seviyelerindeki değişiminin incelendiği bu çalışmanın sonuçlarına göre;

1- Hastaların yaş (<50 yaş, ≥50 yaş) ve menapozal (pre-postmenapozal) durumlarına göre, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir miRNA ekspresyon farkı saptanmadı($p>0.05$).

2- Hormon reseptör değişkenlerine göre hastalar gruplandırıldığında;

- miR-105, miR-203, miR-375 ve mir-145, PR negatif hastalarda daha yüksek ekspresyon gösterdi($p<0.05$). MiR-365 ve miR-200c PR negatif hastalarda istatistiksel olarak anlamlı yükseklik gösterme eğilimindeydi($p=0.55$ ve $p=0.064$, sırasıyla).
- Hastalar arasında ER durumlarına göre anlamlı farklılık gösteren bir miRNA saptanmadı($p>0.05$). Sadece miR-105'in ER negatif hastalarda daha yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğu fakat bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü($p=0.069$).
- Mir-375, miR-133a ve miR-17 cerBB-2 pozitif hastalarda anlamlı olarak daha yüksek ekspresyon gösterirken($p<0.05$), mir-200c cerBB-2 pozitif hastalarda anlamlı yükseklik gösterme eğilimindeydi($p=0.079$).

3- Meme kanserindeki en önemli 3 prognostik faktörün miRNA'larla ilişkisi değerlendirildiğinde;

- MiR-210'un tümör çapı ≥ 20 mm olan hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek eksprese edildiği görüldü($p<0.05$).
- MiR-141, aksiller lenf nodu metastazı olmayan grupta anlamlı olarak daha yüksek eksprese edildi($p<0.05$).
- MiR-375, metastatik hastalığa sahip grupta anlamlı olarak daha yüksek ekspresyon gösterirken($p<0.05$), miR-200a ve miR-203'ün metastatik meme

kanserli hastalardaki yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı olma eğilimindeydi($p=0.067$).

4- Tedaviye bağlı gelişen nötropeni varlığına göre hastalar gruplandırıldığında aralarında herhangi bir miRNA ekspresyon farkı izlenmedi($p>0.05$). Sadece miR-452 seviyeleri, nötropeni gelişmeyen hasta grubunda daha yüksek eksprese edilme eğilimi gösterdi($p=0.079$).

5- Hastalar moleküler sınıflandırma yöntemlerine göre alt tiplere ayrıldı ve aralarındaki miRNA farkları incelendi;

- MiR-105, miR-200b ve miR-375 luminal A grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük saptandı($p<0.05$).
- Luminal B grubunda diğer gruplarla kıyasla anlamlı farklılık gösteren bir miRNA saptanmadı($p>0.05$) fakat miR-133a'nın luminal B grubundaki yüksek ekspresyonu anlamlı olma eğilimi gösterdi($p=0.076$). Bununla birlikte miR-34a, miR-411 ve miR-17'nin luminal B grubundaki yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı değildi($p=0.088$).
- Üçlü negatif hasta grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı farklılık gösteren miRNA saptanmadı($p>0.05$)
- Her2 grubundaki hasta sayısının yetersizliği nedeniyle istatistiksel analiz yapılamadı.

6- Hastaların tedavi öncesi ve sonrası miRNA değişimleri incelendiğinde, miR-105, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-34a, miR-452 ekspresyon seviyelerinin tedavi sonrasında anlamlı olarak arttığı görülürken, miR-155, miR-143, miR-145, miR-365, miR-299-5p seviyelerinde tedavi sonrasında anlamlı olarak azalma tespit edildi($p<0.05$). Bakılan diğer miRNA'lardan miR-375'in tedavi sonrasında artış gösterdiği ve miR-133a'nın tedavi sonrasında azalma gösterdiği belirlenmiş olup bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi($p=0.062$ ve $p=0.071$, sırasıyla).

7- Hastaların moleküler alt tiplere göre tedavi öncesi ve sonrası miRNA değişimleri incelendiğinde, genel popülasyondan farklı olarak luminal A grubunda miR-375'in tedavi sonrasında artış gösterdiği($p<0.05$) ve üçlü negatif grupta miR-210 seviyelerinin tedavi sonrasında anlamlı olarak azalma gösterdiği belirlendi($p<0.05$).

Sonuç olarak bu çalışmada, invaziv meme kanseri hastalarının klinikopatolojik parametreleri ile ilişkili bir takım miRNA'lar tespit edilmiş olup, bu miRNA'ların tedavi öncesi ve sonrasındaki değişimleri gösterilmiştir. Çalışmamızda, invaziv meme kanserinin tanısında, takibinde ve tedavi seçiminde klinisyene kılavuzluk edebilecek, prediktif ve prognostik potansiyeli olan bazı miRNA'lar tespit edilmiştir. Fakat yapmış olduğumuz çalışmada değerlendirmeye alınan gruptaki birey sayıları geniş bir örnekleme oluşturmamış ve yeterli süre takip edilememiştir. Literatürde var olan farklı sonuçların sebeplerinin ortaya konulabilmesi için elde edilen verilerle, daha fazla sayıda bireyi kapsayan ileri araştırmalar yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17:43-46.
- 2-The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved, March, 2019.
- 3- Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72:333–338.
- 4- Ozmen V. Breast cancer in the World and Turkey, *J Breast Health* 2008;4:6-12.
- 5- Hulka BS, Moorman PG. Reprint of Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas.* 2008;61(1–2):203–213.
- 6- Thompson WD. Genetic epidemiology of breast cancer. *Cancer.* 1994;74(Suppl. 1):279–87.
- 7- Newman B, Millikan RC, King M-C. Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev.* 1997;19:69–79.
- 8- Meme Kanseri Eğitim Modülü / Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu (MHDF)
- 9- Boyd N, Lockwood G, Byng J, Trichler D, Yaffe M. Mammographic Densities and Breast Cancer Risk. *Cancer Epid Biomark Prevent.* 1998;7:1133–44.
- 10- Hildreth NG, Shore RE, Dvoretzky PM. The risk of breast cancer after irradiation of the thymus in infancy. *New Engl J Med.* 1989;321:1281–4.
- 11- Miller AB, Howe GR, Sherman GJ, Lindsay JP, Jaffe MJ, Dinner PJ et al. Mortality from breast cancer after irradiation during fluoroscopic examinations in patients being treated for tuberculosis. *New Engl J Med.* 1989;321:1285–9.
- 12- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 1972;48:605–13.
- 13- Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Sak SD, Tükün A, Yalçın B. Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. *The Journal of Breast Health.* 2011;7:2.

- 14- Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami H. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *New Engl J Med.* 1994;331:5–9.
- 15- Newcomb P, Storeer B, Longnecker M, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *New Engl J Med.* 1994;330:81–7.
- 16- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53297 women with breast cancer and 100239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* 1996;347:1713–27.
- 17- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997;350:1047–59.
- 18- Colditz G, Hankinson S, Hunter D, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New Engl J Med.* 1995;332:1589–93.
- 19- Persson I, Weiderpass E, Bergkvist L, Bergstrom R, Schairer C. Risks of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen–progestin replacement. *Cancer Causes Control.* 1999;10:253–60.
- 20- Hunter DJ, Willett WC. Nutrition and breast cancer. *Cancer Causes Control.* 1996;7:56–8.
- 21- Garland M, Willett WC, Manson JE, Hunter DJ. Antioxidant micronutrients and breast cancer. *J Am Coll Nutr.* 1993;12:400–11.
- 22- Janowsky E, Lester G, Weinberg C, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA et al. The association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Publ Health Nutr* 1999;2:283–91.
- 23- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *J Am Med Assoc.* 1998;279:535–40.

- 24- Terry MB, Zhang FF, Kabat G, Britton JA, Teitelbaum SL, Neugut AI et al. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol*. 2006; 16: 230-240.
- 25- Reynolds P. Smoking and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18:15–23.
- 26- Terry PD, Rohan TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11:953–71.
- 27- Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int. J. Cancer*. 2015;136:2204–2209.
- 28- Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, LiVoisi VA, Mostow ED, Goldenberg IS et al. Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 327-333.
- 29- Mahoney MC, Bevers T, Linos E, Willett WC. Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58: 347-371.
- 30- Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6:718- 730.
- 31- Ellis IO, Cornelisse CJ, Schnitt SJ, Sasco AJ, Sastre-Garau X, Kaaks R. Invasive breast carcinomas. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press 2003;13-19.
- 32- Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way
J Breast Health 2015; 11: 59-66
- 33- Kapp AV, Jeffrey SS, Langerod A, Borresen-Dale AL, Han W, Noh DY et al. Discovery and validation of breast cancer subtypes. *BMC Genomics*. 2006; 7:231.
- 34- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:1368-1376.
- 35- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101:736-750.

- 36- Schnitt SJ. Will molecular classification replace traditional breast pathology? *Int J Surg Pathol.* 2010; 18:162S-166S.
- 37- Cummings MC, Chambers R, Simpson PT, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer: is it time to pack up our microscopes? *Pathology.* 2011; 43: 1-8.
- 38- Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008; 216:141-150.
- 39- Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, Rodrigues MJ, Pierron G, Goudefroye R et al. Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer.* 2010; 46:2399-2407.
- 40- Rakha EA, Ellis IO. Lobular breast carcinoma and its variants. *Semin Diagn Pathol.* 2010; 27:49-61.
- 41- Breast Cancer Staging 8th edition American Joint Committee on Cancer 2017
- 42- Gotzsche PC, Nielsen M. Screening of breast cancer with mammography. *Cochrane Database of Systemic Reviews* 2006;4: CD001877.
- 43- Güllüoğlu BM. Approach to common breast diseases: risk evaluation and screening strategies for breast cancer. *Türk Aile Hek Derg.* 2008; 12(1): 9-17
- 44- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, 2009.
- 45- Costantino JP, Gail MH, Pee D, Anderson S, Redmond CK, Benichou J et al. Validation studies for models projecting the risk of invasive and total breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 1541-8.
- 46- Piccart M, Blamey R, Buchanan M. Brussels statement on breast cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1335-7.
- 47- Dershaw DD. Mammographic screening of the high-risk woman. *Am J Surg.* 2000; 180: 288–289.
- 48- Berg WA, Blume JD, Cormack JB, Mendelson EB, Lehrer D, BöhmVélez M et al. ACRIN 6666 Investigators. Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA* 2008; 299: 2151-2163

- 49- Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Faryback DG, Clarke L, Zelen M et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353:1784.
- 50- Henry NL, Somerfield MR, Abramson VG, Allison KH, Anders CK, Openshaw TH et al. Role of Patient and Disease Factors in Adjuvant Systemic Therapy Decision Making for Early-Stage, Operable Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Endorsement of Cancer Care Ontario Guideline Recommendations. *J Clin Oncol* 2016; 34:2303.
- 51- Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:2431.
- 52- Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(20):1925-1936.
- 53- Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(18):1738-1748.
- 54- Goetz MP, Toi M, Campone M, Sohn J, Paluch-Shimon S, Huober J et al. MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(32):3638-3646.
- 55- Parton M, Smith IE. Controversies in the management of patients with breast cancer: adjuvant endocrine therapy in premenopausal women. *J Clin Oncol.* 2008;26:745-52.).
- 56- Soto C, Torrecillas L, Reyes S, Ramirez M, Perez L, Cervantes G et al. Capecitabine (X) and taxanes in patients (pts) with anthracycline-pretreated metastatic breast cancer (MBC): sequential vs. combined therapy results from a MOSG randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2006;24:(Abstr 570).
- 57- Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2017;377(6):523-533.
- 58- Litton J, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz S, Goncalves A, Lee K-H et al. EMBRACA: A phase 3 trial comparing talazoparib, an oral PARP inhibitor, to physician's choice of

therapy in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. Abstract GS6-07, San Antonio Breast Cancer Symposium 2017.

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

60- Burstein HJ, Storniolo AM, Franco S, Forster J, Stein S, Rubin S, et al. A phase II study of lapatinib monotherapy in chemotherapy-refractory HER2- positive and HER2-negative advanced or metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19:1068-74.

61- Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(8):724-34.

62- Miles D, Chan A, Romieu G, Dirix LY, Cortes J, Pivot X et al. Randomized, double-blind, placebocontrolled, phase III study of bevacizumab with docetaxel or docetaxel with placebo as first-line therapy for patients with locally recurrent or metastatic breast cancer (mBC): AVADO. *J Clin Oncol* 2008;26:(Abstr LBA1011).

63- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs— microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006; 6: 259-269.

64- Christodoulatos GS, Dalamaga M. Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis? *World Journal of Clinical Oncology.* 2014; 5(2): 71-81.

65- Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006;94: 776-780.

66- Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294(5543): 797-799.

67- Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1):113-120.

68- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2006; 289: 3–16.

69- Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P et al. MicroRNA133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13(5):613-618.

- 70- Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X et al. EpsteinBarr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *Journal of Virology* 2008;82(4):1946–1958.
- 71- Gonzalez-Alegre P. Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: from promise to progress. *Pharmacol Ther* 2007;114: 34–55.
- 72- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38–39.
- 73- Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(2-3):75-86.
- 74- Calin GA, Sevignani C, Dan DC, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 2999– 3004.
- 75- Wiemer AC. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* 2007;43: 1529–1544.
- 76- Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(12): 882-891.
- 77- Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology* 2010; 4(3): 230-241.
- 78- Lamy P, Andersen CL, Dyrskjøt L, Tørring N, Ørntoft T, Wiuf C. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Br J Cancer* 2006; 95 (10): 1415-1418.
- 79- Iorio MV, Ferracin M, Liu C, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research* 2005; 65:7065-7070.
- 80- Ferracin M, Bassi C, Pedriali M, Pagotto S, D'Abundo L, Zagatti B et al. miR-125b targets erythropoietin and its receptor and their expression correlates with metastatic potential and ERBB2/HER2 expression. *Mol Cancer.* 2013;12:130.
- 81- Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin J Cancer Res.* 2013;25:46–54.

- 82- Jiang H, Wang P, Li X, Wang Q, Deng ZB, Zhuang X et al. Restoration of miR17/20a in solid tumor cells enhances the natural killer cell antitumor activity by targeting Mekk2. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:789–799.
- 83- Li Y, Hong F, Yu Z. Decreased expression of microRNA-206 in breast cancer and its association with disease characteristics and patient survival. *J Int Med Res.* 2013;41:596–602.
- 84- Zhang H-F, Xu L-Y, Li E. A family of pleiotropically acting microRNAs in cancer progression, miR-200: potential cancer therapeutic targets. *Curr Pharm Des.* 2014;20:1896–903.
- 85- Xiang M, Birkbak NJ, Vafaizadeh V, Walker SR, Yeh JE, Liu S, et al. STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF- κ B to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Sci Signal.* 2014;7:ra11.
- 86- Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature.* 2012;481:190–194.
- 87- Zhang S, Kim K, Jin UH, Pfent C, Cao H, Amendt B et al. Aryl hydrocarbon receptor agonists induce microRNA-335 expression and inhibit lung metastasis of estrogen receptor negative breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:108–118.
- 88- Sossey-Alaoui K, Downs-Kelly E, Das M, Izem L, Tubbs R, Plow EF. WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. *Int J Cancer.* 2011;129:1331–1343.
- 89- Schooneveld EV, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Laere SJV. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Research* 2015;17:21.
- 90- Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2012;13:13414–13437.
- 91- Huang T-H, Wu F, Loeb GB, Hsu R, Heidersbach A, Brincat A et al. Upregulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion. *J Biol Chem.* 2009;284:18515–18524.

- 92- Han M, Wang Y, Liu M, Bi X, Bao J, Zeng N et al. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1 α expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells. *Cancer Sci.* 2012;103:1058–1064.
- 93- Qi L, Bart J, Tan LP, Platteel I, Sluis T, Huitema S et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer.* 2009;9:163.
- 94- Jiang S, Zhang H-W, Lu M-H, He X-H, Li Y, Gu H et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* 2010;70:3119–3127.
- 95- Zhang C-M, Zhao J, Deng H-Y. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci.* 2013;20:79.
- 96- Kong W, He L, Coppola M, Guo J, Esposito NN, Coppola D et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem.* 2010;285:17869–17879.
- 97- Yan G-R, Xu S-H, Tan Z-L, Liu L, He Q-Y. Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics.* 2011;11:912–920.
- 98- Gabriely G, Teplyuk NM, Krichevsky AM. Context effect: microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death. *Autophagy.* 2011;7:1384–1386.
- 99- Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med.* 2011;3:279–290.
- 100- Jiang H, Zhang G, Wu J-H, Jiang C-P. Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncol Rep.* 2014;31:1509–1516.
- 101- Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene.* 2012;31:4150–4163.

- 102- Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, Cold S, Gravgaard K, Knoop AS et al. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Mol Oncol.* 2014;8:874–883.
- 103- Wang F, Hou J, Jin W, Li J, Yue Y, Jin H et al. Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: a meta-analysis. *Molecules.* 2014;19:6282–6293.
- 104- Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thike AA et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2013;19:4477–4487.
- 105- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin S-F, Dunning MJ et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* 2007;8:R214.
- 106- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11:R27.
- 107- He Y-J, Wu J-Z, Ji M-H, Ma T, Qiao E-Q, Ma R et al. miR-342 is associated with estrogen receptor- α expression and response to tamoxifen in breast cancer. *Exp Ther Med.* 2013;5:813–818.
- 108- Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:1–6.
- 109- Giricz O, Reynolds PA, Ramnauth A, Liu C, Wang T, Stead L et al. Hsa-miR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity. *J Pathol.* 2012;226:108–119.
- 110- Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype. *Br J Cancer.* 2010;103:532–541.
- 111- Quesne JL, Jones J, Warren J, Dawson S-J, Ali HR, Bardwell H et al. Biological and prognostic associations of miR-205 and let-7b in breast cancer revealed by in situ hybridization analysis of micro-RNA expression in arrays of archival tumour tissue. *J Pathol.* 2012;227:306–314.

- 112- Wu X, Somlo G, Yu Y, Palomares MR, Li AX, Zhou W et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med.* 2012;10:42.
- 113- Leivonen S-K, Sahlberg KK, Mäkelä R, Due EU, Kallioniemi O, Børresen-Dale A-L et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. *Mol Oncol.* 2014;8:93–104.
- 114- Zhang N, Wang X, Huo Q, Sun M, Cai C, Liu Z, et al. MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. *Oncogene.* 2014;33:3119–3128.
- 115- Shen S, Sun Q, Liang Z, Cui X, Ren X, Chen H, et al. A prognostic model of triple-negative breast cancer based on miR-27b-3p and node status. *PLoS One.* 2014;9:e100664.
- 116- Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic implications of microRNA-21 overexpression in invasive ductal carcinomas of the breast. *J Breast Cancer.* 2011;14:269.
- 117- Li M, Ma X, Li M, Zhang B, Huang J, Liu L et al. Prognostic role of microRNA-210 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Dis Markers.* 2014;2014:106197.
- 118- Yuva-Aydemir Y, Simkin A, Gascon E, Gao FB. MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA. *RNA Biol.* 2011;8:557–564.
- 119- Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2010;12:247–256.
- 120- Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu C-X, Permeth-Wey J et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2014;33:679–689.
- 121- Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Küblbeck M, Pawitan Y, Hielscher T et al. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene.* 2013;32:1173–1182.

- 122- Rao X, Di Leva G, Li M, Fang F, Devlin C, Hartman-Frey C et al. MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2011;30:1082–1097.
- 123- Shibahara Y, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Chan MS, Yiu CC et al. Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1. *J Pathol*. 2012;227:357–366.
- 124- Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*. 2012;118:2603–2614.
- 125- Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y et al. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J Biol Chem*. 2010;285:21496–21507.
- 126- Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7:e34210.
- 127- Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nat Commun*. 2013;4:1393.
- 128- Mei M, Ren Y, Zhou X, Yuan X-B, Han L, Wang G-X et al. Downregulation of miR-21 enhances chemotherapeutic effect of taxol in breast carcinoma cells. *Technol Cancer Res Treat*. 2010;9:77–86.
- 129- Chen L, Bourguignon LY. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2014;13:52.
- 130- Kato M, Paranjape T, Müller RU, Nallur S, Gillespie E, Keane K et al. The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28:2419–2424.
- 131- Stankevicius L, da Silva APA, Ventura dos Passos F, dos Santos Ferreira E, Menks Ribeiro MC, G David M et al. MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat Oncol*. 2013;8:231.

- 132- Bahrami A, Aledavood A, Anvari K, Hassanian SM, Maftouh M, Yaghobzade A et al. The prognostic and therapeutic application of microRNAs in breast cancer: Tissue and circulating microRNAs. *J Cell Physiol* 2018;233:774-786.
- 133- Peña-Chilet M, Martínez MT, Pérez-Fidalgo JA, Peiró-Chova L, Oltra SS, Tormo E et al. MicroRNA profile in very young women with breast cancer *BMC Cancer* 2014; 14:529.
- 134- Hatse S, Brouwers B, Dalmaso B, Laenen A, Kenis C, Schöffski P et al. Circulating MicroRNAs as Easy-to-Measure Aging Biomarkers in Older Breast Cancer Patients: Correlation with Chronological Age but Not with Fitness/Frailty Status 2014;9(10):e110644.
- 135- Nassar FJ, Sabban ME, Zgheib NK, Tfayli A, Boulos F, Jabbour M et al. miRNA as Potential Biomarkers of Breast Cancer in the Lebanese Population and in Young Women: A Pilot Study 2014;9(9): e107566.
- 136- Muti P, Sacconi A, Hossain A, Donzelli S, Moshe NBB, Ganci F et al. Downregulation of microRNAs 145-3p and 145-5p Is a Long-term Predictor of Postmenopausal Breast Cancer Risk: The ORDET Prospective Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(11):2471-81.
- 137- Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, Weerd Vd, Boersma AWM et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer *PNAS* 2008;105: 13021–13026.
- 138- Zhou W , Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*. 2014; 25(4): 501–515.
- 139- Li H-Y, Liang J-L, Kuo Y-L, Lee H-H, Calkins MJ, Chang H-T et al. MiR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer, *Breast Cancer Res* 2017;19:133.
- 140- Tuomarila M, Luostari K, Soini Y, Kataja V, Kosma V-M, Mannermaa A. Overexpression of MicroRNA-200c Predicts Poor Outcome in Patients with PR-Negative Breast Cancer *PLoS One* 2014; 9(10): e109508.

- 141- Yu X, Zhang X, Dhakal IB, Beggs M, Kadlubar S and Luo D: Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012;12:29.
- 142- Han J-G, Jiang Y-D, Zhang C-H, Yang Y-M, Pang D, Song Y-N et al. A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer *Annals of Surgical Treatment and Research* 2017; 92(2):55-66.
- 143- Li H, Liu J, Chen J, Wang H, Yang L, Chen F et al. A serum microRNA signature predicts trastuzumab benefit in HER2-positive metastatic breast cancer patients *Nat Commun* 2018; 9: 1614.
- 144- Ye X-M, Zhu H-Y, Bai W-D, Wang T, Wang L, Chen Y Epigenetic silencing of miR-375 induces trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer by targeting IGF1R *BMC Cancer*. 2014;14:134.
- 145- Joensuu H, Toikanen S, Klemi PJ. DNA index and S phase fraction and their combinations as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer*. 1990; 66: 331-40.
- 146- Robbins GF, Leis HPJ, Rup H. A rational approach to and result of women with breast carcinoma. *J Breast* 1997; 3: 9-13.
- 147- Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor *Gynecologic Oncology* 2010;119:586–593.
- 148- Zhang J, Yang J, Zhang X, Xu J, Sun Y, Zhang P. MicroRNA-10b expression in breast cancer and its clinical association *PLoS One* 2018; 13(2): e0192509.
- 149- Saez RA, Clark GM, Mc Guire WL. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989; 5: 99-102.
- 150- Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z, Zhong XY. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biology* 2013; 34: 455.

- 151- Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, Muller V, Pantel K. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012;13: 933.
- 152- Jinlinga W, Sijingb S, Jiec Z, Guiniana W. Prognostic value of circulating microRNA-21 for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2017;45(6): 1216–1221.
- 153- Li P, Xu T, Zhou X, Liao L, Pang G, Luo W et al. Downregulation of miRNA-141 in breast cancer cells is associated with cell migration and invasion: involvement of ANP32E targeting *Cancer Medicine* 2017; 6(3):662–672.
- 154- Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer *Breast Cancer Research* 2010;12(6):R90.
- 155- Madhavan D, Zucknick M, Wallwiener M, Cuk K, Modugno C, Scharpf M et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012; 18, 5972.
- 156- Simonini PSR, Breiling A, Gupta N, Malekpour M, Youns M, Omranipou R et al. Epigenetically Deregulated microRNA-375 Is Involved in a Positive Feedback Loop with Estrogen Receptor α in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2010;70(22): 9175–9184.
- 157- Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F et al. miR-200 Enhances Mouse Breast Cancer Cell Colonization to Form Distant Metastases *PLoS One*. 2009; 4(9): e7181.
- 158- Huang Y, Feng Y, Ren H, Zhang M, Li H, Qiao Y. Associations of Genetic Variations in MicroRNA Seed Regions With Acute Adverse Events and Survival in Patients With Rectal Cancer Receiving Postoperative Chemoradiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;100(4):1026-1033.
- 159- Souza KBC, Evangelista AF, Leal LF, Souza CP, Vieira RA, Causin RL et al. Identification of Cell-Free Circulating MicroRNAs for the Detection of Early Breast Cancer and Molecular Subtyping *J Oncol*. 2019; 2019: 8393769.

- 160- Guo L, Yuan J, Xie N, Wu H, Chen W, Song S et al. MiRNA-411 acts as a potential tumor suppressor miRNA via the downregulation of specificity protein 1 in breast cancer *Molecular Medicine Reports* 2016;14: 2975-82.
- 161- Piasecka D, Braun M, Kordek R, Sadej R, Romanska H. MicroRNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2018;144:1401–1411.
- 162- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10: 593-601.
- 163- Ye F, Tang H, Liu Q, Xie X, Wu M, Liu X et al. miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family *Journal of Translational Medicine* 2014;12(1):17.
- 164- Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J et al. Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer. *PLOS ONE* 2012;7(10): e47003.
- 165- Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15–3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* 2010;411: 1869–1874.
- 166- Harris L, Fritsche H, Menel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25: 5287–5312.
- 167- Freres P, Josse C, Bovy N, Boukerroucha M, Struman I, Bours V et al. Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Induces miR-34a and miR-122 Expression. *J. Cell. Physiol.* 2015;230: 473–481.
- 168- Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias JI, Menéndez P et al. Tumor MicroRNA Expression Profiling Identifies Circulating MicroRNAs for Early Breast Cancer Detection *Clinical Chemistry* 2015;61(8):1098–1106.

- 169- Wong T-S, Liu X-B, Wong H-Yee B, Wai R-Ng M , Po A-Yuen W, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 2008;14(9): 2588-2592.
- 169- Ng EKO, Chong WWS, Jin H, Lam EKY, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009;58:1375–1381.
- 170- Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Nagata H et al. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 2011;105: 1733–1740.
- 171- Qi P, Cheng S, Wang H, Li N, Chen Y, Gao C. Serum MicroRNAs as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Chinese Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE* 2011;6(12): e28486.
- 172- Yan X, Chen X, Liang H, Deng T, Chen W, Zhang S et al. miR-143 and miR-145 synergistically regulate ERBB3 to suppress cell proliferation and invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 220.
- 173- Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S et al. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 399- 408.
- 174- Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S et al. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor- α in human breast cancer cells *Cell Death and Differentiation* 2010;17: 246–254.
- 175- Shevde LA, Metge BJ, Mitra A, Xi Y, Ju J, King JA et al. Spheroid-forming subpopulation of breast cancer cells demonstrates vasculogenic mimicry via hsa-miR-299-5p regulated de novo expression of osteopontin. *J Cell Mol Med.* 2010, 14: 1693-1706.

- 176- Zhou LL, Dong JL, Huang G, Sun ZL, Wu J. MicroRNA-143 inhibits cell growth by targeting ERK5 and MAP3K7 in breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017; 50(8): e5891.
- 177- Li M, Liu L, Zang W, Wang Y, Du Y, Chen X et al. miR-365 overexpression promotes cell proliferation and invasion by targeting ADAMTS-1 in breast cancer *International Journal of Oncology* 2015;47: 296-302.
- 178- Yadav P, Mirza M, Nandi K, Jain SK, Kaza RCM, Khurana N et al. Serum microRNA-21 expression as a prognostic and therapeutic biomarker for breast cancer patients. *Tumor Biol.* 2016;37(11):15275–15282.
- 179- Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 223-9.
- 180- Song W, Wu S, Wu Q, Zhou L, Yu L, Zhu B et al. The microRNA-141-3p/ CDK8 pathway regulates the chemosensitivity of breast cancer cells to trastuzumab *J. Cell Biochem.* 2019;120:14095-14106.
- 181- Shimono Y, Ugalde MZ, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D et al. Down-regulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells. *Cell.* 2009 ;138(3): 592–603.
- 182- Wang C, Zheng X, Shen C, Shi Y. MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2012; 31:58.
- 183- Zhao S, Han J, Zheng L, Yang Z, Zhao L, Lv Y. MicroRNA-203 Regulates Growth and Metastasis of Breast Cancer Cell *Physiol Biochem* 2015;37:35-42.
- 184- Ding X, Park SI, McCauley LK, Wang C-Y. Signaling between transforming growth factor β (TGF- β) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA miR-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *J Biol Chem* 2013;288: 10241-10253.

- 185- Lin J, Wang L, Gao J, Zhu S. MiR-203 inhibits estrogen-induced viability, migration and invasion of estrogen receptor α -positive breast cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017;14: 2702-2708.
- 186- Li W, Li G, Fan Z, Liu T. Tumor-suppressive microRNA-452 inhibits migration and invasion of breast cancer cells by directly targeting RAB11A *Oncology Letters* 2017;14(2): 2559-2565.
- 187- Hu Q, Gong J-P, Li J, Zhong S-L, Chen W-X, Zhang J-Y et al. Down-regulation of miRNA-452 is Associated with Adriamycin resistance in Breast Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15 (13): 5137-5142.
- 188- Wu Z-s, Wang C-q, Xiang R, Liu X, Ye S, Yang X-q et al. Loss of miR-133a expression associated with poor survival of breast cancer and restoration of miR-133a expression inhibited breast cancer cell growth and invasion. *BMC Cancer* 2012;12.
- 189- Mcguire A, Brown JAL, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis. *Cancer Metastasis Rev* 2015; 34:145–155.