

Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk

Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way

Nuket Eliyatkin¹, Evrim Yalçın², Baha Zengel³, Safiye Aktaş⁴, Enver Vardar¹

¹İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

²Erciş Devlet Hastanesi, Patoloji Bölümü, Van, Türkiye

³İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 3. Genel Cerrahi Kliniği, İzmir, Türkiye

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ABSTRACT

Breast carcinoma comprises a group of diseases with specific clinical, histopathologic and molecular properties. Traditional classification use morphology to divide tumors into separate categories with differing behavior and prognosis. However, there are limitations of traditional classification systems, and new molecular methods are expected to improve classification systems. Molecular subtypes of breast carcinomas have been characterized in the last 11 years, and have been studied extensively. Much of the information accumulated in recent years, and molecular taxonomy seems to be still developing and undergoing change. The main question is whether new molecular techniques such as gene expression profiling will be accepted as gold standard in determining breast cancer subtypes, and whether molecular classification is useful in specific subtypes of breast cancer as it is in ductal carcinoma (nonspecific type). In addition, critical review of the literature reveals major problems such as poor definition, lack of reproducibility and lack of quality control in current molecular techniques and classifications. Therefore, current molecular approaches are not yet used in routine clinical practice and treatment guidance since they are immature and can even lead to incorrect assessment.

Keywords: Breast cancer, the molecular classification, immunohistochemistry, microarray gene expression

ÖZ

Meme karsinomu kendine özgü klinik, histopatolojik ve moleküler özelliklere sahip bir grup hastalığı içerir. Geleneksel sınıflama, tümörleri değişik prognoz ve davranışta bulunan ayrı kategorilere bölmek için morfolojiyi kullanır. Ancak geleneksel sınıflamanın sınırlı kaldığı alanlar vardır ve dolayısıyla yeni moleküler methodların, sınıflama sistemlerini iyileştireceği umudu oluşmuştur. Son 11 yılda, meme karsinomunun moleküler subtipleri karakterize edilmiş ve yoğun olarak çalışılmıştır. Bilgilerin büyük kısmı, son yıllarda öğrenilmiş olup, moleküler taksonomi hala gelişmekte ve önümüzdeki yıllarda değişim geçirecek gibi görünmektedir. Asıl soru, gen ekspresyon profili gibi yeni moleküler tekniklerin, meme kanseri subtiplerini belirlemede altın standart kabul edilip edilmeyeceği ve moleküler sınıflamanın, meme kanserinin özel subtiplerinde, duktal karsinomda (özel tipi bulunmayan) olduğu gibi yararlı olup olmadığıdır. Ayrıca, literatür eleştirel bir şekilde gözden geçirildiğinde, güncel moleküler teknikler ve sınıflamalar konusunda; kötü tanımlamalar, tekrarlanabilirliğin yokluğu ve kalite kontrolünün olmaması gibi majör problemlerin çok açık bir şekilde bulunduğu görülmektedir. Dolayısıyla, güncel moleküler yaklaşımlar, immatür olduklarından ve hatta yanlış değerlendirmelere neden olabileceklerinden, rutin klinik pratikte ve tedavi düzenlenmesinde henüz kullanılmamaktadır.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, moleküler sınıflama, immunohistokimya, mikroarray gen ekspresyonu

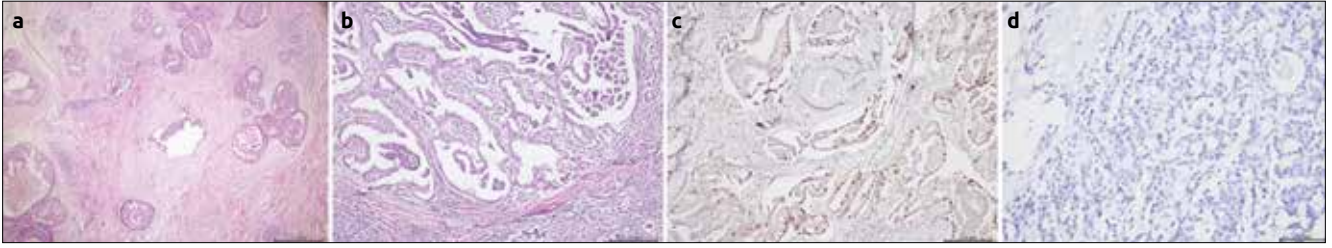
Giriş

Meme kanseri, kadın sağlığını olumsuz olarak etkileyen önemli ve sık görülen, aynı zamanda kansere bağlı ölümlerde başı çeken bir kanserdir. Tüm kanser olgularının %23'ünü ve kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturur (1). Yıllarca Mısırlı hekimler tarafından ölümcül hastalık olarak kabul edilmiş ve 19. yüzyılın sonlarına kadar da yoğun cerrahi tedavi uygulanmıştır (2). Son yüzyılın başlangıcında hastada meme malignitesi olduğunun bilinmesi yeterliydi ve meme kanser hastalarının tümüne tek tip tedavi uygulanmaktaydı. Zamanla aynı tip kanser tanısı alan hastaların farklı prognoz gösterdiğinin gözlemlenmesi ve son 50 yıldan uzun süredir her geçen gün artan şekilde, patoloğların farklı morfolojik varyantlar tanımlaması, meme kanser sınıflamasının tartışılır olmasına neden olmuştur. Bugün için bilinen ve son yayınlanan WHO tümör sınıflamasında meme kanserinin 20 major tip ve 18 minör subtip olmak üzere çok sayıda varyantı bulunmaktadır (3). Ancak bu tanımlanan varyantların biyolojik olarak önemli olup olmadığına dair bazı kuşkular dile getirilmiştir. Ayrıca, bu kadar çok sayıda varyant tanımlamanın patoloğların kendi tasarımlarının bir sonucu olabileceği de düşünülmüştür. Bununla birlikte patoloğlar, zaten uzun süredir, meme kanserinin tek bir hastalık olmadığını, tam tersine heterojen bir hastalık olduğunun altını çizmişlerdir. Günümüzde çok açık bir şekilde, meme kanserinin genetik, epigenetik ve transkriptomik değişiklikler nedeniyle çok farklı

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Nuket Eliyatkin, İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Tel. / Phone: +90 232 375 21 25 e-posta / e-mail: drnuket2003@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 26.12.2013
Kabul Tarihi / Accepted: 28.12.2013



Resim 1. a-d. H&E, İHK ve CISH ile intratümöral heterojenite. (a) Fokal invaziv duktal karsinom alanları içeren komedo tipte-duktal karsinoma insitu morfolojisi (b) Meme karsinomunun lenf düğümü metastazında heterojenite (papiller, mikropapiller ve duktal morfolojide) (c) ER pozitifliği ve yoğunluğunda heterojenite gösteren meme karsinomu (d) CISH ile intratümöral heterojenite

histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik bulguları farklı olan, ve tedaviye cevapları farklılık gösteren, beraberinde multipl antiteleri içeren heterojen bir hastalık olduğu görülmektedir. Bu fenotipik farklılık, çok belirgin olarak meme kanserinin tanısını, tanıya göre uygulanacak tedaviyi ve bunun sonucunda da prognozunu etkilemektedir. Tüm bu karmaşanın temelinde, belirleyici spesifik belirteçlerin bulunmaması ve meme dokusunu oluşturan epitelin hücrel gelişiminin tam olarak anlaşılmağı olması söz konusu gibi görünmektedir (4, 5). Gen ekspresyon profili gibi moleküler tekniklerin ilerlemesi ile “meme kanserinde heterojenite kavramı” artık genel kabul görür hale gelmiştir. Böylece meme kanser sınıflamasında yeni bir “*taksonomi*” gelişmeye başlamıştır. Bu gelişim, cerrahlar ve onkologlar arasında, patoloğların standard histopatolojik analiz ile hazırladıkları raporların, hasta tedavisini düzenlemede bazı önemli verileri içermemesi ve bunun sonucunda hasta tedavisinin uygun şekilde düzenlenmemiş olabileceği şeklinde bir endişeye neden olmuştur. Böylece patoloğlar da geleneksel eski moda “morfolojik” sınıflamayı geliştirerek yeni dönem yeni sınıflama denen “*Moleküler Sınıflama*” ile tanışmaya başlamışlardır. Bu sınıflama ile hedefe yönelik tedavi ve daha da önemlisi bireyselleştirilmiş tedavi programlarının uygulanması mümkün olmuştur.

Geleneksel, Eski Moda Uygulama

İnvaziv meme kanseri, günümüzde özel olmayan tipte duktal karsinom ve özel subtipler olarak sınıflanmaktadır. Özel subtipler içinde yer alan meme kanserleri, spesifik tanımlamalara sahipken, özel olmayan tip ise, özel subtipler dışındaki karsinomları içeren bir çöplük gibidir. Özel olmayan tipte invaziv duktal karsinomlar tüm meme kanserlerinin yaklaşık %60-75’ini kapsar. Özel subtipler ise %20-25’ini oluşturur ve lobüller, tübüler, papiller ve müsinöz tümörler bu grup içinde en yaygın tipleri temsil eder (3, 4). Tek bir tümör içinde (intratümöral) veya genelde morfolojik olarak benzer görünümlü aynı tip tümörler arasında (intertümöral) heterojenite günümüzde bilinir ve kabul edilir hale gelmiştir (Resim 1). Bu nedenle patoloğlar da, klinisyenlerin, hastalarını daha iyi takip edebilecekleri yeni sistemler üretmeye çalışmışlardır. Patoloji raporunun mutlak gerekli bir komponenti olan “histolojik derece”; tümörde diferansiyasyon derecesi (tübül formasyonu), nükleer pleomorfizm/ derece ve proliferasyonun (mitoz oranı) değerlendirilmesi ile belirlenir.

Meme karsinomunda mikroskopik derecelendirme (Bloom-Richardson sisteminin Nottingham modifikasyonu)

Tübül formasyonu

1 puan: Tübül formasyonu tümörün %75’den fazlasını oluşturur,

2 puan: Tübül formasyonu tümörün %10-75’ini oluşturur,

3 puan: Tübül formasyonu tümörün %10’undan azını oluşturur.

Not: Tübül formasyonunu değerlendirmede, tümörün tümü dikkate alınmalıdır.

Nükleer pleomorfizm

1 puan: Nükleus şekil ve boyut farkı hafif derecede,

2 puan: Nükleus şekil ve boyut farkı orta derecede,

3 puan: Nükleus şekil ve boyut farkı belirgin derecede.

Not: En belirgin nükleer pleomorfizm gösteren hücreleri içeren alanlar değerlendirilmelidir.

Mitoz sayısı

Mitoz sayma işlemi yalnızca tümörün periferinde yapılmalı ve mitotik olarak en aktif alandan başlanmalıdır. Önerilen durum, aynı alanda sayım yapılmasıdır, ancak birbirini takip eden alanlar olması gerekli değildir. Mümkün olduğunca tümörden zengin, normal meme dokusu içermeyen alanlar tercih edilmelidir. Profaz hücreleri sayılmamalıdır. Değerlendirme yapılan mikroskopların marka farklılıklarından kaynaklanan görüntü alanı farkı nedeniyle mitoz sayısı için belirlenen ve kabul edilmiş değerler mevcuttur. Bu değerlere göre mitoz sayısı 1, 2 ve 3 olarak skorlanır.

Tübül formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısına göre elde edilen puanlar ile toplam bir puan oluşturulur. Elde edilen toplam puana göre Tablo 1’de görüldüğü şekilde histolojik derece belirlenir.

Bu şekilde yapılan histolojik derecelendirme semikantitatifdir, ancak hasta prognozunu belirlemede oldukça güçlü bir öngörü sağlar (6). Ayrıca, histolojik derecelendirmenin, histolojik tip yanısıra östrojen-progesteron reseptör ekspresyonu ve HER-2 amplifikasyonu gibi moleküler değişikliklerle de belirgin şekilde birlikte olduğu bilinmektedir (7). Geleneksel yaklaşımda, tümör büyüklüğü ve yayılım paterni (özellikle lenf nodu tutulum durumu) gibi hastalığın evresini belirleyen güçlü birtakım parametreler vardır ve bunlar çok önemli prognostik faktörlerdir. Pierre Denoix tarafından tüm kanser tiplerine uygulanabilecek evreleme sisteminin prensipleri ve tanımlanan parametreleriyle tümör, nod, metastaz (TNM) sistemi geliştirilip bir süre sonra da kabul edilip yaygın olarak kullanılmıştır (8, 9). TNM sisteminin, tedavi merkezleri arasında ortak dil olarak kullanılması, tedavi planlamada yol gösterici olması, uygulanan tedavinin etkinliğinin takip edilebilmesine olanak sağlaması ve hastaların prognozunu göstermesi nedeniyle tüm dünyada yaygın olarak kullanılır. Ancak meme kanseri tanı ve tedavisindeki ilerlemeler, gelişen teknoloji ve bilgi artışı, tümörlerin biyolojisinin daha detaylı değerlendirilme girişimleri, prognostik faktörlerin büyük bölümünün tümörün biyolojik özellikleri ile ilgili olduğuna dair yeni verilerin birikmesi ve en önemlisi TNM sisteminde aynı grupta yer alan aynı histolojik tipteki tümörlerin sağkalım oranlarının birbirinden çok farklı olabilmesi nedeniyle alternatif çözüm arayışları başlamıştır.

Avrupa Onkoloji Enstitüsü (EIO) uzmanları tarafından, tedavi kararını etkileyen tümör özelliklerinin TNM sistemine dahil edilme çabası ile TNM_{EIO} sistemi önerildi (10). Bu sistemde tümöre ait tüm anatomik ve ER, PR, HER-2 gibi biyolojik özellikler yer almaktadır. Eğer meme karsinomunun çapı 1.3 cm ise T1.3 olarak tanımlanabileceği, benzer uygulamanın lenf nodu invazyonuna da uyarlanabileceği, sentinel (bekçi) lenf nodu dahil hem incelenen hem de invazyon saptanan

nodların sayısının belirtilebileceği (N0/1, N3/9, Ns0/9 gibi, s: sentinel lenf nodu) metastaz saptanan hastalarda ise M'e eklenen son ek ile (M_H: karaciğere metastaz, M_L: akciğere metastaz gibi) metastaz bölgesi bilgisinin verilebileceği bir sistem olarak sunuldu. Bu sisteme göre en büyük boyutu 1,8 cm, ERpozitif, PRnegatif, HER2 pozitif, karaciğer metastazı olan, 26 lenf nodundan 2'sinin tutulumu gözlenen meme kanseri tümörü T1.8, ER+, PR-, HER2+, N2/26, M_H olarak kodlanır. Bazı merkezlerde de lenfo-vasküler invazyon bulunduran tümörlerde, hastalığın daha agresif tedavi modeli ile tedavisi tercih edilmektedir.

Tedaviye karar verme sürecinde, sağkalım ve metastatik hastalığın gelişim öngörüsünün başarısını yükseltmek amacıyla Nottingham Prognostik İndeks (11), Adjuvant! Online (AO) (12) ve St. Gallen kriterleri (13) gibi indeksler yaygın olarak kullanılmaktadır. Histopatolojik değerlendirme, meme kanser hastasında klinik tedavinin şekillenmesinde çok etkilidir. Ancak aynı histolojik subtiplere sahip hastalar arasında (örneğin, tübüler karsinom gibi) ve aynı histolojik derece-aynı evre (örneğin, lenf nodu negatif hastalık gibi) hastalar arasında hem tedaviye cevapta, hem de uzun süreli sağkalım açısından önemli farklılıkların bulunması, ayrıca ER pozitif hastaların tamoksifen, HER-2 amplifikasyonu gösteren hastaların trastuzumab tedavisinden gördükleri yarar, meme kanserinin heterojen bir hastalık grubu olduğu yolundaki görüşleri destekler ve böylece tümörün biyolojik özelliklerinin tümör yönetimindeki önemini gösterir. Sınırlı klinik veriler, küçük klinik çalışma sonuçları ve tanımlanmış bazı algoritmaların çok sınırlı değerleri ile birlikte, yeni jenerasyon moleküler methodların, meme kanser sınıflamasında daha kusursuz, daha kesin bir sınıflamayı ve beraberinde hedefe yönelik ve belki de kişiye yönelik tedavi imkanları sağlayabilecek olması umut vericidir.

Yeni Dönem, Yeni Başlangıç

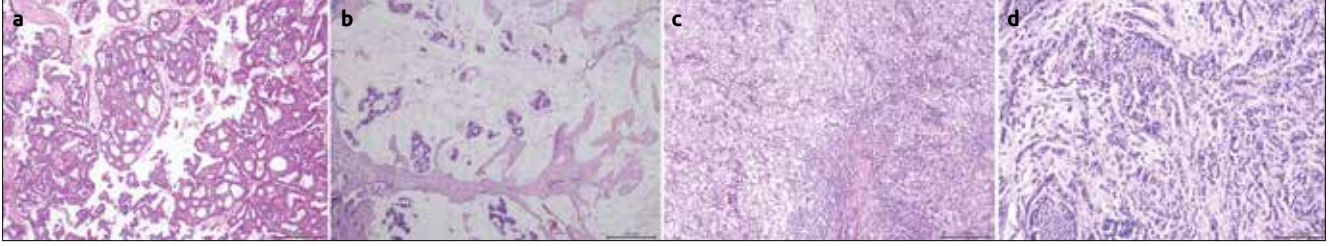
Kanser dokusuna uygulanan her türlü moleküler analitik yöntem, kanserin prognostik ve prediktif faktörlerini belirlememize yardımcıdır. Bu yararlı moleküler analitik yöntemlerden mikroarray temelli teknolojik uygulamalarla genomik ve ekspresyon profillemeye çalışmalarının gelişmesi ve kullanımı, meme kanserinde morfolojiden çok tümör biyolojisi temelinde bir klasifikasyon sisteminin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yöntemlerle yapılan çalışmalar da, meme kanserinin hem klinik olarak farklı, hem de moleküler olarak heterojen bir hastalık olduğunu, ayrıca prognozu belirleyen birbirinden çok farklı gen ekspresyon paternleri bulunduran kompleks bir hastalık olduğunu desteklemiştir (14-17). Ayrıca bu çalışmaların sonuçlarının, geçerli olarak kullanılan nispeten subjektif histopatolojik değerlendirmeden daha objektif olduğu düşünülmektedir. Yeni dönem, yeni yöntemle uygulanan yeni teknoloji, meme kanseri hakkında sahip olduğumuz bilgilerimizin çeşitli yönlerini yeniden, daha değişik bir şekilde tanımlamamızı ve meme kanserlerinin morfolojik görünüşleri ile korelasyonunu sağlamamıza olanak sağlar. Ancak yine de, yeni moleküler teknolojik değerlendirme yöntemlerinin tamamen tarafsız olmadığını, elde edilen verilerin aslında, birçok varsayımları içinde barındırdığını unutmamalıyız.

Meme kanserinde "Moleküler Sınıflama" terminolojisi, ilk olarak 2000 yılında Perou ve Sorlie tarafından yapılan gen ekspresyon farklılıklarını gösteren kapsamlı bir çalışma ile önerilmiştir (14). Bu çalışma ile çok sayıda gen ekspresyonuna göre, meme kanserleri farklı alt gruplara ayrılmıştır: "Lüminal" (sıklıkla iki yada üç subgruba ayrılmış; ER, ER düzenleyici genlerin ve normalde lüminal epitelial hücrelerden ekspres edilen genlerin ekspresyonunu yansıtan), "HER-2 pozitif" (ERBB2/HER-2 amplifikasyonu ve overekspresyonu gösteren), "bazal" (ER, PR ve HER-2 negatif olan ve memenin normal bazal/myoepitelial hücreleri tarafından ekspres edilen gen ekspresyonu gösteren). Normal ben-

zeri subgrup da tanımlanmıştır, ancak bu subgrubun tanımlanmasının önemi ve beraberinde getireceği sonuçlar belirsizdir, çünkü bu grup, tümör hücre içeriği az, buna karşın normal doku komponenti fazla olan örnekleri temsil ediyor gibi görünmektedir. Bu gibi moleküler subtipler, çok sayıda intrinsik genlerin (aynı tümörün tekrarlanan örneklerinde çok az farklılıklar gösteren ancak farklı tümörlerde çok yüksek oranda farklılık gösteren) ayrılaşmasıyla ve daha sonra da hastaların, transkripsiyonel olarak farklı gruplara ayırmak üzere hiyerarşik bir düzende kümelenebilmesiyle oluşturulmuştur (14). Bu method ile yalnızca, çok sayıda olgu içeren retrospektif değerlendirmelere ait örnekler sınıflandırılabilir için, "Single Sample Predictor (SSP)" tanımlaması yapılmıştır. SSP ile tek bir tümörün, en yakın olduğu merkezi sınıfın kullanılmasıyla, tümörün belirli bir subtipten dahil edilmesi sağlanmıştır (16-18). İlk tanımlanan SSP yani SSP2003, 500 gen ekspresyonunu kapsar (16). SSP2003, intrinsik gen listesinin tekrarlarıyla daha da ayrılaşırılır, sonuçta iki yeni SSP belirlenir: SSP2006 ve PAM50 (17, 18). Bu şekilde tanımlanan tüm SSP lerin belirli sınırlılıkları vardır. Bu gibi sınırlılıkları ayrıntılı şekilde vurgulayan Pusztai ve ark. (19), tanımlanan SSP ler için başlangıç setinde yapılacak küçük değişikliklerin bile, subgrupları tanımlamada kullanılan hiyerarşik kümelenede önemli değişikliğe neden olabileceğini göstermişlerdir. Böylece uygulanan methodun stabilitesi sorgulanır olmuştur (19, 20). Yüzlerce intrinsik gen kullanımı yerine, yalnızca ER ve HER-2 fenotipleri ile ilişkili genlerle çok stabil şekilde üç temel subtipin tanımlanmasını mümkün olduğu gösterilmiştir (21). Bu subtipler ER-/HER2- (bazal benzeri), HER2+ (HER2-enriched), and ER+/HER2- (kombine lüminal A ve B). Mackay ve arkadaşları ise hiyerarşik kümeleneyle oluşturulan dendrogramlardan, subtipleri tanımlamada interobserver uyumunun bulunmadığına dikkat çekmişlerdir (22). Bu gibi karmaşık çalışma ve değerlendirmeler yeni, alternatif sınıflama yaklaşımlarına neden olmuştur (23): Bu yaklaşım modelinde, ESR1, ERBB2 and AURKA şeklinde üç genin kantitatif ölçümünün meme tümörlerini, dört moleküler antite şeklinde sınıflayan bir mRNA ekspresyon prediktörü tanımlanmıştır. Burada adı geçen AURKA, düşük ve yüksek proliferatif tümörler arasında ayrımı sağlayan bir proliferasyon (aurora kinase A [AURKA]) modulüdür. Bu model ile tanımlanan dört antite de şöyledir: ER+/HER2-/düşük proliferatif, ER+/HER2-/yüksek proliferatif, HER2+ ve ER-/HER2-.

Tanımlanan model basitleştirilmiş bir subtip sınıflama modeli (Subtype Classification Model-SCM) olup kabaca yalnızca ESR1, ERBB2 ve AURKA genlerini içerir ve kısaca SCMGENE olarak bilinir. SCMGENE belirleyicileri (ESR1, ERBB2 ve AURKA) ile tanımlanan major meme kanser intrinsik subtiplerinin tanımlanabileceği ve 50 gen subtip prediktörüne (PAM50) çok benzer şekilde, klinik kullanım için sağlam bir ayırım sağladığı belirtilmiştir. Bunun üzerine çok yeni olarak, SCMGENE ve PAM50 ile değerlendirme sonuçlarının, değişik yönlerden (hasta prognozu, patolojik komplet cevap, biyolojik farklılıkları kapsama gibi) karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır (24). Bu çalışma ile meme kanserinde major ve klinikle ilişkilendirilebilir moleküler subtiplere klasifikasyonun, daha geniş gen panellerini kapsayan modellerin en iyisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Meme kanserinin moleküler subtipleme yöntemlerinin birbirine üstünlükleri günümüzde tartışılıyor olmasına rağmen, temelde lüminal A, lüminal B, HER2, bazal ve normal benzeri moleküler subgrupların farklı prognostik subgrupları temsil ediyor olması, önerilen sınıflama sisteminin hızlı bir şekilde klinik kullanımına neden olmuştur. Moleküler sınıflama sisteminin, diagnostik bir araç olarak yaygın kullanımını ve geçerliliğini sağlamak için çok çaba gösterilmiştir. Bu konuda yapılan değişik hasta çalışma gruplarından ve farklı array platformlarından analiz edilen birçok farklı verilerin, klasifikasyon sistemi ile ol-



Resim 2. a-d. Özel subtiplere ait örnekler. (a) İnvaziv kribriform karsinom (b) Müsinöz karsinom (c) Medüller karsinom (d) İnvaziv lobüler karsinom, lobüler karsinoma in situ alanları içeren

Tablo 1. Histolojik derecelendirme skor tablosu

Toplam puan	Histolojik Derece
3-5	I
6-7	II
8-9	III

dukça sıkı bir şekilde örtüştüğü de kanıtlanmıştır (15-18).

Tedaviye cevapların ve metastatik paternlerin de, moleküler subtipe göre değiştiğinin gösterilmesi moleküler sınıflamanın değerini daha da artırmıştır (25, 26).

Sonuçta, bir meme kanser hastasının, tümörün moleküler subtipine göre sınıflanabileceği ve böylece uygun, spesifik, hedefe yönelik tedavi programlarına yönlendirilebileceği fikri çok cazip hale gelmiştir. Çünkü artık günümüzde tüm kanser tiplerinde, hastanın tümörüne özel hedefe yönelik, kişiselleştirilmiş tedavi programları arayışları önplandadır. Bu noktada tümörün histolojik derecesi, ER ve HER-2 durumu gibi değerlendirmelerden elde edilen verilerin, moleküler sınıflamanın getireceği uygun tedavi programlarını sağlayabileceği konusunda tartışmalar bulunmaktadır.

Moleküler Subgruplar Nelerdir?

Bugün için, geçerli moleküler sınıflama ile meme kanserleri, ilk olarak lüminal A, lüminal B, HER-2, bazal ve normal meme benzeri olmak üzere beş gruba ayrılır. Bu şekilde tanımlanan subgrupların daha ileri boyutta gruplanıp ayrılaştırılması da mümkündür ve zorunlu gibi görünmektedir. Son zamanlarda, HER-2 sub grubu, klinik olarak farklı davranış paterni gösteren üç gruba ayrılmıştır, bunlardan birinin oldukça agresif bir davranış gösterdiği belirtilmiştir. Bu farklılık nedeniyle, HER-2 hastalarının prognozlarındaki bu farklılıkları açıklayabilecek belirleyiciler geliştirilmeye çalışılmıştır (27). Bu çalışmalardan yola çıkarak, gelecek yıllarda önemi daha da belirgin olacağı beklenen bir konu, tümörün moleküler kimliği, prognozu ve kişiye özel tedavi öngörüsünü sağlayabilen moleküler göstergelere uygun tedavi programlarına rağmen hastaların yine de farklı prognozlar göstermesidir. Örneğin HER-2 hastalarına uygulanan, ekstrasellüler domaini hedef alan monoklonal antikor (herceptin) tedavisinde zaman içinde relapslar ve tedaviye direnç gösteren olgular nedeniyle, bu duruma neden olabilecek olası mekanizmalar araştırılmıştır (28-30). Kötü prognozlu HER-2 pozitif meme kanser hastalarının bir kısmının, p95HER2 olarak bilinen HER2 karboksi-terminal fragmanlarının heterojen bir grubunu eksprese ettiği bildirilmektedir (29). Bu fragmanlardan biri, 611-CTF, HER2'nin onkogenidir. Böylece p95HER2 pozitif tümörlerin progresyonunda, muhtemelen 611-CTF gen durumunun etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca ekson 16 içermeyen bir reseptörü kodlayan HER2 izoformunun ekspresyonu delta 16HER2 olarak bilinir ve bugün için trastuzumab direnç mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir (31).

Klinik Kullanımda Geçerli Moleküler Subgruplama

Moleküler subgruplama çalışmalarının çoğu özel olmayan tipte duktal karsinom üzerinde yapılmıştır ve bilindiği gibi bu histolojik tip, özel olmayan tümör tiplerinin dahil edildiği gruptur. Bu nedenle de bu heterojen grubu alt gruplara ayırmak için çalışmaların yapılması anlamlı gibidir. Az sayıda immunohistokimyasal belirleyicinin kullanımı ile moleküler subgruplama yapılabilir. ER, PR, HER2, Ki-67, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve bazal sitokeratinlerden (CK14 ve CK5/6 gibi) oluşan bir panel "lüminal", HER2 ve triple negatif tümörleri ayırt etmek için kullanılabilir. Aslında "bazal" tümörleri tanımlayan belirleyiciler konusunda tam bir fikir birliği yoktur, ancak EGFR ve CK5/6 kullanımının, bu sub grubu tanımlama ve prognozu öngörebilmeyi sağlayacağı düşünülmektedir (32).

Moleküler subgruplamada, ER ve HER-2 yanısıra, özellikle de ER pozitif tümörlerde proliferasyon belirteçleri çok önemlidir. Ancak, bir proliferasyon belirteci olarak Ki-67 ya da daha ayrıntılı mitotik indeks skorlama sisteminin kullanımının ne kadar uygun olduğu sorgulanmaktadır. Ki67 skorlamasında, pozitif/yüksek ya da negatif/düşük şeklinde ayrımı sağlayan bir değer, hasta takibi ve tedavisinde kullanımı tartışmalıdır ve bu konuda bugün için tam bir konsensus sağlanmamıştır. Lüminal tümörlerin alt gruplara ayrılması, büyük oranda proliferasyon yoğunluğuna göre yapılmaktadır. Bu nedenle de lüminal A tümörleri, lüminal B tümörlerden ayırt etmede rutinde kullanılabilir, Ki67 sınır değerini belirlemek amacıyla, İHK ile kombine gen ekspresyon profillemeye çalışması yapılmıştır (33). Bu çalışmada sınır değer %13,25 olarak saptanmıştır. Böyle bir kesin-sınır değer klinik pratikte kullanımının çok gerçekçi olamayacağı açıktır. Rutin diagnostik patoloji laboratuvarlarında değerlendirilebilecek ve klinik pratikte de daha uygulanabilir prognostik testlere ihtiyaç var gibi görünmektedir. Histolojik derecelendirmede olduğu gibi gen ekspresyon seviyesinin ortalamasını alan moleküler testler de, meme kanserinin heterojen bir tümör olduğunu gösterir. Bu durum, tümörlerin, özel moleküler subtiplere ayırımında ortaya çıkan uyumsuzlukları kısmen açıklayabilir. Her bir tümörü, beş temel moleküler subtipten (lüminal A ya da lüminal B, normal meme benzeri, HER2 ve bazal) birine yerleştirmek için, çok sayıda değişik algoritmalar geliştirilmiştir (16-18). Bu algoritmalar, daha önce de sözü edildiği gibi "Single Sample Predictors" (SSP) olarak tanımlanır. Yeni tanı almış bir meme kanser hastasının prognozunun ve gerekli özel tedavi uygulamalarının belirlenmesi amacıyla spesifik bir moleküler subgruba ayrılması gerekli olduğundan, bu gibi algoritmaların kullanımı gerekli olacaktır.

Meme kanserinde gen ekspresyon profiline göre major moleküler subtipler Tablo 2'de özetlenmiştir (34, 35).

Özel Tiplerin Durumu

Meme kanserinin histopatolojik özel tipleri, yaklaşık olarak %25'ini oluşturur, farklı arşitektürel paternlere sahiptir, klinik özelliklerle daha az ilişkilidir, özel olmayan tipte duktal karsinomdan daha iyi prognozluudur. Gen ekspresyon profillemeye çalışmalarının çoğunluğu, özel

Tablo 2. Meme kanseri tiplerinin major moleküler subtipleri

	Moleküler Suptip			
	Lüminal A	Lüminal B	HER2/neu	Basal benzeri ^a
Gen ekspresyon paterni	Lüminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	Lüminal (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 epithelial 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, ER2/neu negatif	İnvaziv meme kanserlerinin ~%20 si, ER/PR pozitif, HER2/neu ekspresyonu değişken (+ya da-) Lüminal A'dan daha yüksek proliferasyon, Lüminal A'dan daha yüksek histolojik dereceli	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15'i, ER/PR negatif, HER2/neu pozitif, Yüksek Proliferasyon, Yaygın TP53 mutasyonu, Yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik oranı	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15'i, çoğu ER/PR ve HER2/neu negative (triple negative) Yüksek proliferasyon, Yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 disfoksiyonu (germline, sporadic)
Histolojik korelasyon	Tübüler karsinom Kribriform karsinom Düşük dereceli invaziv ductal karsinom, NOS Klasik lobüler karsinom ^b	İnvaziv ductal karsinom, NOS Mikropapiller karsinom	Yüksek dereceli invaziv ductal karsinom, NOS	Yüksek dereceli invaziv ductal karsinom, NOS Metaplastik karsinom, Medüller karsinom
Tedaviye cevap ve seyir	Endokrin tedaviye cevap Kemoterapiye değişken cevap daha iyi) İyi prognoz	Endokrin tedaviye cevap (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Lüminal A kadar iyi olmayabilir Kemoterapiye cevap değişken (Lüminal A'dan) Prognoz, Lüminal A kadar iyi değil	Trastuzumaba (Herceptin) cevap Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap Genellikle kötü prognoz	Endokrin tedaviye ya da trastuzumaba (Herceptin) cevap yok Platinum grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı Tümü değil ama genellikle kötü prognoz

PARP poli (adenozin difosfat-riboz) polimeraz.

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

^b Klasik lobüler karsinom genellikle Lüminal A özellikleri gösterir, pleomorfik lobiler karsinom ise sıklıkla diğer moleküler subtiplerin özelliklerini gösterir.

olmayan tipte duktal karsinom ile ilgilidir. Özel tip meme kanserleri için moleküler özelliklerin değerlendirilmesi, özel olmayan tipte duktal karsinom kadar yoğunlukta sistematik olarak araştırılmamıştır. Genomik ve gen ekspresyon çalışmaları da bu gibi özel histolojik tiplerin, özel olmayan tipte duktal karsinomdan çok daha homojen olduğunu göstermiştir. Bu da histopatologlar tarafından yapılan morfolojik değerlendirmenin önemini ön plana çıkarmaktadır (Resim 2). Meme kanserinin özel tipleri, patoloğların yıllardır bu gibi tipler için morfolojik olarak tanımladıkları özel gelişim paternlerine neden olan spesifik somatik yeniden düzenlenimleri ile açıklanabilir. Gerçekten bazı özel tipler, muhtemelen hem özel gelişim paternini, hem de özel davranışını açıklayan spesifik genetik değişikliklerle birliktedir (36). Lobüler karsinomların en tanımlayıcı moleküler özelliği, E-kadherin kaybıdır. Ayrıca sekretuar karsinom, adenoid kistik karsinomlarda ise meme dışında değişik malignitelere de tanımlanmış translokasyonlar görülmektedir (37, 38). Weigelt ve ark. (39), 11 farklı özel tipi içeren (lobüler ve apokrin özel tip dışında) 113 meme tümöründe gen ekspresyon profillemesi çalışması ile her bir özel subtipin yalnızca bir moleküler subtip (Lüminal, HER2, normal meme benzeri ve bazal) dahil olduğunu kanıtlamışlardır. Bu çalışmaya göre, nöroendokrin ve münisöz karsinomlar çok benzer genetik profillere sahiptir, bu durum bazen aynı tümörde bu iki komponentin histopatolojik olarak birlikteliğinin görülmesi nedeniyle de beklenen bir sonuçtu. Adenoid kistik, medüller, ve metaplastik karsinomlar ise yine beklendiği şekilde bazal gruptaydı. Ancak bu gibi karsinomların iyi prognozlu olmalarına rağmen diğer bazal tümörlerle birlikte kötü prognoz kategorisine dahil

olması ilginç bir durumdu (39). Bu durum, bazal fenotipe sahip özel olmayan tipte duktal karsinomda tanımlandığı gibi bazal tipin önemli oranda heterojenitesini yansıtır. Ayrıca bu gibi özel tipler için diagnostik uygulamada "histopatolojik değerlendirme"nin moleküler subtiplemeye çok fazla öneme sahip olduğunu vurgulamak yerindedir.

Meme kanseri özel tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri Tablo 3'de görülmektedir.

Çok Özel Subtip: Lobüler Karsinom

Tüm meme kanserlerinin %5-15'ini invaziv lobüler karsinom (İLK) oluşturur ve en yaygın "özel tip"tir. İLK'un, özel olmayan tipte duktal karsinomdan histopatolojik olarak farklı olmasından daha da önemlisi biyolojik ve klinik olarak çok özel davranış paterni göstermesidir. İLK, İDK'a göre daha iyi prognostik özellikler göstermesine rağmen, uzun süreli takiplerde duktal kanserlerle benzer ya da daha kötü bir seyir sergiler (40-43). Bu durumun nedeni, İLK'un geç dönemde tanınmasına neden olan yavaş seyri ve diffüz gelişim paterni, rutin tarama programları ile saptanmasının zor olması, güvenilir ve salim cerrahi sınırları temin etmenin zorluğu olabilir. Bu nedenle İLK uzak metastazlar ile ortaya çıkar. İLK da metastaz paterni, İDK'dan oldukça farklı olarak kemik, gastrointestinal trakt, jinekolojik organlar ve peritoneal kavite gibi oldukça nadir yerlere eğilim göstermesi nedeniyle de çok ilginçtir (44-46). İLK'un bu karmaşık yapısı, içerdiği çok sayıda varyantlarla da kısmen açıklanabilir. Bu varyantlar solid, alveolar, pleomorfik, mikst duktal/lobüler, tübülobüler, taşlı yüzük hücreli ve histiositik tip ola-

Tablo 3. Meme kanseri özel tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri

Moleküler subtip	Yaygın histolojik tipler	HG	ER durumu (IHK ile)	HER2 durumu (ISH/IHK ile)	Ki67 (IHK ile)	Özel IHK/ moleküler özellikler
Lüminal A	Klasik, Lobüler, Tübüler, kribriform	1 ya da 2	+	-	Düşük	Lüminal CK +, E-kaderin +/-
Lüminal B	Mikropapiller	2 ya da 3	+/-	-/+	Yüksek	Lüminal CK +, p53 mutasyonlar
Bazal benzeri	Medüller, metaplastic, adenoid, kistik, sekretuar	3	-	-	Yüksek	Bazal CK+, p53 m DNA onarım kaybı, EGFR+/- mutasyonları
Mol.apokrin	Apokrin, pleomorfik lobüler	2 ya da 3	-	-/+	Yüksek	Androjen reseptör +
Claudin-low	Metaplastik	3	-	-	Yüksek	Kanser kök hücre benzeri, EMT benzeri, düşük E-kaderin seviyesi

Tabloda görüldüğü gibi meme kanserinin çoğu özel tipi, homojen antitelendir ve yalnızca bir moleküler subtipde (adenoid kistik karsinom bazal benzeri, mikropapiller karsinomlar lüminal grupta gibi) yer almaktadır. Ancak klasik ve pleomorfik lobüler karsinomlar ile apokrin karsinomlar gibi özel tipler ise heterojendir. Tabloda her bir moleküler sınıflama için en olası histolojik derece, ER, HER2, Ki67 durumu verilmiştir.

rak sayılabilir (47). Pleomorfik subtip hariç, genelde bu varyantlar ile ilgili biyolojik olarak ve klinik olarak az bilgiye sahibiz (48-53). Sadece, az sayıda moleküler çalışmalar ile alveolar ve solid tiplerin klasik tip ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (54).

İlk hücreleri, karakteristik sitolojik özelliklere ve diffüz bir gelişim paternine sahiptir. Çoğunlukla histolojik derece 2'dir ve lenfovasküler invazyon yoktur. Genellikle ER ve PR pozitifdir; HER2, p53, EGFR ve bazal sitokeratinleri ise nadiren eksprese ederler.

Lobüler karsinomların moleküler analizleri özel olmayan tipte duktal karsinom kadar yoğun çalışılmamıştır. Çoğunlukla lüminal subtipdir, ancak bazal ve HER2 subtipler de tanımlanmıştır.

Weigelt ve ark. (39) çalışmasında, lobüler karsinomların, tübüler karsinomlar ile çok yakın hiyerarşik kümelenme gösterdiklerini saptamışlardır ve böylece tübüler karsinom ile lobüler karsinom arasında yakın ilişkinin varlığını öne sürmüşlerdir.

Genomik analizlerde, lobüler kanserler ve düşük dereceli duktal kanserler çok benzer genomik profil gösterir, bu genomik profil yüksek dereceli duktal karsinomlardan çok farklıdır. Bu durum, "low grade (düşük dereceli duktal ve lobüler)" ve ER pozitif tümör tipleri arasında çok yakın bir gelişimsel ilişkiyi göstermektedir. İlk yapılan genomik çalışmaların sonuçları, duktal ve lobüler karsinomlar arasındaki sınırların belirsiz olduğunu, böylece tüm düşük dereceli kanserlerin (duktal, lobüler ve tübüler) kolonlar hücre lezyonları gibi genel bir prekürsör lezyondan başlayan düşük dereceli tümör ailesini temsil ettiği düşüncesini de desteklemiştir (55-58). Duktal ve lobüler şeklinde bir sınıflamanın gerçekten uygunsuz olabileceği düşüncesiyle lobüler, duktal ve düşük dereceli duktal karsinomların ekspresyon profil çalışmaları yapılmış ve benzer profillere sahip oldukları gözlenmiştir (59-61). Ancak, tübüler, lobüler ve düşük dereceli tümörler arasında benzer profillerin saptanmasına rağmen bazı spesifik genlerin ekspresyonundaki farklılıkların varlığı bu tiplerin farklı antiteler olduğunu göstermektedir. Özellikle lobüler tümörlerde hücre adezyonu ve ekstrasellüler matriksle ilişkili genlerin azalmış fonksiyonları tanımlanmıştır. Lobüler tümörlerde bu şekilde varolan gen ekspresyon farklılıkları, invaziv lobüler karsinomların gelişim paternlerindeki karakteristik farklılıklarını ve aynı zamanda bir hücre adezyon molekülü olan E-kadherin kaybını yansıtır (62, 63).

Lobüler meme kanserlerini, moleküler lüminal A, lüminal B, HER2 ya da bazal şeklinde bir sınıflamaya dahil etmek meme kanserlerinin

kompleks yapısının ve heterojenitesinin anlaşılmasında bir kayba neden olabilir, çünkü lobüler meme kanserleri, tüm meme kanserleri içinde çok özel bir subtipdir.

DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalardaki ve mikroRNA (miRNA) gibi kodlamayan ancak işlev değişikliği yapabilen genetik bilgi taşıyıcılarındaki değişikliklerin araştırıldığı ve yakın gelecekte de daha çok araştırılacağı çalışmalar, meme kanserinin moleküler yapısının daha doğru ve daha tamamlayıcı şekilde tanımlanmasını sağlayacaktır. Çok sayıda değişik teknolojik platformun kullanılarak farklı meme kanseri tiplerini içeren çok kapsamlı bir çalışmada, farklı subtiplerde birçok kanser gelişim yolları değerlendirilerek tümör biyolojisinin anlaşılmasını ve hedef tedaviye ulaşılmasını sağlayan subtip-spesifik mutasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri tanımlanmıştır (64). Ancak bu değişiklikleri hedefleyen tedavi programlarının uygulanıma girmesi için bu gibi çalışmaların sayısının artması ve geniş tabanlı çalışma gruplarının değerlendirme sonuçları belirleyici olacaktır.

Sonuç

Meme kanserinde geliştirilen moleküler subtipleme, patologların uzun süredir zaten histopatolojik olarak da tanımladıkları biyolojik heterojeniteyi ön plana çıkarmıştır. Son yirmi yılı aşkın süredir HER-2 yolunun anlaşılması ve ilişkili olarak Herceptin kullanımı, DNA onarım mekanizması ve PARP inhibitörlerinin kullanımı, moleküler methodların meme kanseri biyolojisine önemli derecede açıklık getirmesi ve yeni tedavi girişimlerinin gelişiminde yeni ufuklar açması ile mümkün olmuştur. Meme kanserinin farklı subtiplerinin altındaki genomik arşitektür hakkında bildiğimiz ve ancak görüp tanımlayabildiğimiz manzara muhtemelen yeni jenerasyon sekanslamanın da dahil olduğu yeni moleküler jenerasyon methodları ile değişecektir. Biz bugün için meme kanserinde moleküler sınıflamanın henüz gelişme aşamasında olduğunu ve sınırlılıkları olduğunu unutmamalıyız. Eski moda, geleneksel histopatolojik subgruplama, özellikle özel tipleri (lobüler ya da duktal, sekretuar, mikropapiller, adenoid kistik karsinom gibi) sınıflandırmada tercih etmemiz için birçok özelliğe sahiptir. Bu durumda, meme kanserinde geleneksel histopatolojik methodlar ile yeni moleküler çalışmaları bir "ortaklık" gibi görmek ve uygulamak hasta takibi açısından en sağlıklı gibi görünmektedir. Patologların mikroskoplarını bir kenara bırakıp bilgisayara dayalı meme kanser sınıflaması ve onkologların sadece moleküler sınıflama ile takip programı uygulamaları için uygun bir zamanda olmadığımız çok açıktır.

Sonuç olarak, geleneksel eski moda ile moleküler sınıflama temelli yeni moda bir arada olmalıdır.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - N.E., S.A.; Design- N.E.,S.A., B.Z.; Supervision - N.E., S.A., E.V.; Funding - N.E., E.Y., E.V.; Data Collection &/or Processing - N.E., E.Y.; Analysis &/or Interpretation - N.E.; Literature Review - N.E., E.Y., B.Z.; Writer - N.E.; Critical Review - E.Y., S.A., E.V.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - N.E., S.A.; Tasarım - N.E.,S.A., B.Z.; Denetleme - N.E., S.A., E.V.; Kaynaklar - N.E., E.Y., E.V.; Veri toplanması ve/veya işlemesi - N.E., E.Y.; Analiz ve/veya yorum - N.E.; Literatür taraması - N.E., E.Y., B.Z.; Yazıyı yazan - N.E.; Eleştirel İnceleme - E.Y., S.A., E.V.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90. (PMID: 21296855) [CrossRef]
- Singleton SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*, 2006; 56:37-47. (PMID: 16449185)
- Ellis IO, Cornelisse CJ, Schnitt SJ, Saso 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. p 13-19.
- Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:718-730. (PMID: 19942925) [CrossRef]
- Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schäfer KL, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 1999; 189:521-526. (PMID: 10629552) [CrossRef]
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010; 12:207. (PMID: 20804570)
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120:293-308. (PMID: 20107892) [CrossRef]
- Denoix PF. Nomenclature classification des cancers [in French]. *Bull Inst Nat Hyg (Paris)* 1952; 7:743-748.
- International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. Geneva, Switzerland: International Union Against Cancer; 1968
- Veronesi U, Viale G, Rotmensz N, Goldhirsch A. Rethinking TNM: Breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research *The Breast* 2006; 15:3-8. (PMID: 16473737) [CrossRef]
- Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 22:207-19. (PMID: 1391987) [CrossRef]
- Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, Parker HL. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:980-991. (PMID: 11181660)
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ, Panel members: Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16:1569-1583. (PMID: 16148022) [CrossRef]
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-752. (PMID: 10963602) [CrossRef]
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869-10874. (PMID: 11553815) [CrossRef]
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418-8423. (PMID: 12829800) [CrossRef]
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27:1160-1167. (PMID: 19204204) [CrossRef]
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7:96-107. (PMID: 16643655) [CrossRef]
- Puztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11:868-877. (PMID: 16951390) [CrossRef]
- Andre F, Puztai L. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nat Clin Prac Oncol* 2006; 3:621-632. (PMID: 17080180) [CrossRef]
- Kapp AV, Jeffrey SS, Langerod A, Borresen-Dale AL, Han W, Noh DY, Bukholm IR, Nicolau M, Brown PO, Tibshirani R. Discovery and validation of breast cancer subtypes. *BMC Genomics* 2006; 7:231. (PMID: 16965636) [CrossRef]
- Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, Natrajan R, A'Hern R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of inter-server agreement. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:662-673. (PMID: 21421860) [CrossRef]
- Haihe-Kains B, Desmedt C, Loi S, Culhane AC, Bontempi G, Quackenbush J, Sotiriou C. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:311-325. (PMID: 22262870) [CrossRef]
- Prat A, Parker JS, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 135:301-306. (PMID: 22752290) [CrossRef]
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3271-3277. (PMID: 20498394) [CrossRef]
- Korde LA, Lusa L, McShane L, Lebowitz PE, Lukes L, Camphausen K, Parker JS, Swain SM, Hunter K, Zujewski JA. Gene expression pathway analysis to predict response to neoadjuvant docetaxel and capecitabine for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119:685-699. (PMID: 20012355) [CrossRef]
- Staa J, Ringér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson H, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Grabau D, Fernö M, Malmström PO, Johannsson OT, Loman N, Barkardottir RB, Borg A. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28:1813-1820. (PMID: 20231686) [CrossRef]
- Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci* 2010; 102(10):1-8. (PMID: 20825420) [CrossRef]
- Parra-Palau JL, Pedersen K, Peg V, Scaltriti M, Angelini PD, Escorihuela M, Mancilla S, Sánchez Pla A, Ramón Y Cajal S, Baselga J, Arribas JA. Major role of p95/611-CTF, a carboxy-terminal fragment of HER2, in the down-

- modulation of the estrogen receptor in HER-2 positive breast cancers. *Cancer Res.* 2010; 70:8537-8546. (PMID: 20978202) [\[CrossRef\]](#)
30. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, Saha A, Diedrich G, Huang W, Leitzel K, Weidler J, Ali SM, Fuchs EM, Singer CF, Köstler WJ, Bates M, Parry G, Winslow J, Lipton A. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by sections using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4226-4235. (PMID: 20664024) [\[CrossRef\]](#)
 31. Marianna Sasso, Francesca Bianchi, Valentina Ciravolo, Elda Tagliabue, Manuela Campiglio HER2 splice variants and their relevance in breast cancer. *Journal of Nucleic Acids Investigation* 2011; volume 2:e9. [\[CrossRef\]](#)
 32. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1368-1376. (PMID: 18316557) [\[CrossRef\]](#)
 33. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:736-750. (PMID: 19436038) [\[CrossRef\]](#)
 34. Modified from Schnitt SJ. Will molecular classification replace traditional breast pathology? *Int J Surg Pathol* 2010; 18:162S-166S. (PMID: 20484283) [\[CrossRef\]](#)
 35. Correa Geyer F, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol* 2009; 17:285-302. (PMID: 19103611) [\[CrossRef\]](#)
 36. Cummings MC, Chambers R, Simpson PT, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer: is it time to pack up our microscopes? *Pathology*. January 2011; 43, pp. 1-8. (PMID: 21240058) [\[CrossRef\]](#)
 37. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA, Becker L, Carneiro F, MacPherson N, Horsman D, Poremba C, Sorensen PH. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* 2002; 2:367-76. (PMID: 12450792) [\[CrossRef\]](#)
 38. Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:18740-18744. (PMID: 19841262) [\[CrossRef\]](#)
 39. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008; 216:141-150. (PMID: 18720457) [\[CrossRef\]](#)
 40. Rakha EA, El-Sayed ME, Powe DG, Green AR, Habashy H, Grainge MJ, Robertson JF, Blamey R, Gee J, Nicholson RI, Lee AH, Ellis IO. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur J Cancer* 2008; 44:73-83. (PMID: 18035533) [\[CrossRef\]](#)
 41. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, Holmberg SB, Lindtner J, Snyder R, Thürlimann B, Murray E, Viale G, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A; International Breast Cancer Study Group. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:3006-3014. (PMID: 18458044) [\[CrossRef\]](#)
 42. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Orvieto E, Maiorano E, Galimberti V, Luini A, Colleoni M, Goldhirsch A, Coates AS. Lack of prognostic significance of 'classic' lobular breast carcinoma: a matched, single institution series. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117:211-214. (PMID: 18629634) [\[CrossRef\]](#)
 43. Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, Rodrigues MJ, Pierron G, Goudeffroy R, Cottu P, Reyat F, Sastre-Garau X, Fourquet A, Delattre O, Vincent-Salomon A. Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer* 2010; 46:2399-2407. (PMID: 20570624) [\[CrossRef\]](#)
 44. Borst MJ, Ingold JA. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery* 1993; 114:637-641. (PMID: 8211676)
 45. Lamovec J, Bracko M. Metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma of the breast: an autopsy study. *J Surg Oncol* 1991; 48:28-33. (PMID: 1653879) [\[CrossRef\]](#)
 46. Harris M, Howell A, Chrissohou M, Swindell RI, Hudson M, Sellwood RA. A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1984; 50:23-30. (PMID: 6331484) [\[CrossRef\]](#)
 47. Rakha EA, Ellis IO. Lobular breast carcinoma and its variants. *Semin Diagn Pathol* 2010; 27:49-61. (PMID: 20306830) [\[CrossRef\]](#)
 48. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 1992; 23:655-662. (PMID: 1592388) [\[CrossRef\]](#)
 49. Weidner N, Semple JP. Pleomorphic variant of invasive lobular carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1992; 23:1167-1171. (PMID: 1398644) [\[CrossRef\]](#)
 50. Buchanan CL, Flynn LW, Murray MP, Darvishian F, Cranor ML, Fey JV, King TA, Tan LK, Sclafani LM. Is pleomorphic lobular carcinoma really a distinct clinical entity? *J Surg Oncol* 2008; 98:314-317. (PMID: 18668643) [\[CrossRef\]](#)
 51. Vargas AC, Lakhani SR, Simpson PT. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: molecular pathology and clinical impact. *Future Oncol* 2009; 5:233-243. (PMID: 19284381) [\[CrossRef\]](#)
 52. Simpson PT, Reis-Filho JS, Lambros MB, Jones C, Steele D, Mackay A, Irvani M, Fenwick K, Dexter T, Jones A, Reid L, Da Silva L, Shin SJ, Hardisson D, Ashworth A, Schmitt FC, Palacios J, Lakhani SR. Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. *J Pathol* 2008; 215:231-244. (PMID: 18473330) [\[CrossRef\]](#)
 53. Sneige N, Wang J, Baker BA, Krishnamurthy S, Middleton LP. Clinical, histopathologic, and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases. *Mod Pathol* 2002; 15:1044-1050. (PMID: 12379750) [\[CrossRef\]](#)
 54. Da Silva L, Parry S, Reid L, Keith B, Waddell N, Kossai M, Clarke C, Lakhani SR, Simpson PT. Aberrant expression of E-cadherin in lobular carcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:773-783. (PMID: 18379416) [\[CrossRef\]](#)
 55. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010; 57:171-192. (PMID: 20500230) [\[CrossRef\]](#)
 56. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:417-426. (PMID: 17325484) [\[CrossRef\]](#)
 57. Simpson PT, Gale T, Reis-Filho JS, Jones C, Parry S, Sloane JB, Hanby A, Pinder SE, Lee AH, Humphreys S, Ellis IO, Lakhani SR. Columnar cell lesions of the breast: the missing link in breast cancer progression? A morphological and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:734-746. (PMID: 15897740) [\[CrossRef\]](#)
 58. Schnitt SJ, Vincent-Salomon A. Columnar cell lesions of the breast. *Adv Anat Pathol* 2003; 10:113-24. (PMID: 12717115) [\[CrossRef\]](#)
 59. Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, Rodrigues MJ, Pierron G, Goudeffroy R, Cottu P, Reyat F, Sastre-Garau X, Fourquet A, Delattre O, Vincent-Salomon A. Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer* 2010; 46:2399-407. (PMID: 20570624) [\[CrossRef\]](#)
 60. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Natrajan R, Kreike B, Mackay A, Grigoriadis A, Reis-Filho JS, Weigelt B. Transcriptomic analysis of tubular carcinomas of the breast reveals similarities and differences with molecular subtype-matched ductal and lobular carcinomas. *J Pathol* 2010; 222:64-75. (PMID: 20593406) [\[CrossRef\]](#)
 61. Weigelt B, Geyer FC, Natrajan R, Lopez-Garcia MA, Ahmad AS, Savage K, Kreike B, Reis-Filho JS. The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. *J Pathol* 2010; 220:45-57. (PMID: 19877120) [\[CrossRef\]](#)
 62. Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. Multiple ways of silencing Ecadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer* 2001; 92:404-408. (PMID: 1129107) [\[CrossRef\]](#)
 63. Rakha EA, Patel A, Powe DG, Benhasouna A, Green AR, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 2010; 34:1472-1479. (PMID: 20871222) [\[CrossRef\]](#)
 64. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490:61-70. (PMID:23000897) [\[CrossRef\]](#)